Tento dokument slouží výhradně k informačním účelům a nemá žádný právní účinek. Orgány a instituce Evropské unie nenesou za jeho obsah žádnou odpovědnost. Závazná znění příslušných právních předpisů, včetně jejich právních východisek a odůvodnění, jsou zveřejněna v Úředním věstníku Evropské unie a jsou k dispozici v databázi EUR-Lex. Tato úřední znění jsou přímo dostupná přes odkazy uvedené v tomto dokumentu

►B

NAŘÍZENÍ KOMISE (ES) č. 440/2008

ze dne 30. května 2008,

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

(Text s významem pro EHP)

(Úř. věst. L 142, 31.5.2008, s. 1)

Ve znění:

		Úřední věstník		
		Č.	Strana	Datum
►M1	Nařízení Komise (ES) č. 761/2009 ze dne 23. července 2009	L 220	1	24.8.2009
►M2	Nařízení Komise (EU) č. 1152/2010 ze dne 8. prosince 2010	L 324	13	9.12.2010
►M3	Nařízení Komise (EU) č. 640/2012 ze dne 6. července 2012	L 193	1	20.7.2012
►M4	Nařízení Komise (EU) č. 260/2014 ze dne 24. ledna 2014	L 81	1	19.3.2014
►M5	Nařízení Komise (EU) č. 900/2014 ze dne 15. července 2014	L 247	1	21.8.2014
►M6	Nařízení Komise (EU) 2016/266 ze dne 7. prosince 2015	L 54	1	1.3.2016
►M7	Nařízení Komise (EU) 2017/735 ze dne 14. února 2017	L 112	1	28.4.2017
►M8	Nařízení Komise (EU) 2019/1390 ze dne 31. července 2019	L 247	1	26.9.2019

▼B

NAŘÍZENÍ KOMISE (ES) č. 440/2008

ze dne 30. května 2008,

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

(Text s významem pro EHP)

Článek 1

Zkušební metody k použití pro účely nařízení (ES) č. 1907/2006 jsou stanoveny v příloze tohoto nařízení.

Článek 2

Komise podle potřeby přezkoumá zkušební metody uvedené v tomto nařízení s cílem nahradit, omezit nebo zdokonalit zkoušky na obratlovcích.

Článek 3

Všechny odkazy na přílohu V směrnice 67/548/EHS se považují za odkazy na toto nařízení.

Článek 4

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

Použije se ode dne 1. června 2008.

▼B

PŘÍLOHA

▼M6

Poznámka:

Před použitím jakékoli z následujících zkušebních metod ke zkoušení vícesložkové látky, látky s neznámým nebo proměnlivým složením, komplexního reakčního produktu nebo biologického materiálu (UVCB) nebo směsi a v případě, že její použitelnost ke zkoušení vícesložkové látky, UVCB nebo směsí není v příslušné zkušební metodě uvedena, je třeba zvážit, zda je metoda přiměřená pro zamýšlené použití v právních předpisech.

Jestliže se zkušební metoda použije ke zkoušení vícesložkové látky, UVCB nebo směsi, měly by být pokud možno k dispozici dostatečné informace o jejím složení, jako např. chemická identita jejích složek, jejich kvantitativní výskyt a vlastnosti složek.

▼B

ČÁST A: METODY PRO STANOVENÍ FYZIKÁLNĚ-CHEMICKÝCH VLASTNOSTÍ

OBSAH

A.1 BOD TÁNÍ/BOD TUHNUTÍ

A.2 BOD VARU

A.3 RELATIVNÍ HUSTOTA

A.4 TLAK PAR

A.5 POVRCHOVÉ NAPĚTÍ

A.6 ROZPUSTNOST VE VODĚ

A.8 ROZDĚLOVACÍ KOEFICIENT

A.9 BOD VZPLANUTÍ

A.10 HOŘLAVOST (PEVNÉ LÁTKY)

A.11 HOŘLAVOST PLYNŮ

A.12 HOŘLAVOST (PŘI STYKU S VODOU)

A.13 PYROFORICKÉ VLASTNOSTI PEVNÝCH LÁTEK A KAPALIN

A.14 VÝBUŠNÉ VLASTNOSTI

A.15 BOD SAMOZÁPALU (KAPALINY A PLYNY)

A.16 RELATIVNÍ TEPLOTA SAMOZÁPALU PEVNÝCH LÁTEK

A.17 OXIDAČNÍ VLASTNOSTI (PEVNÉ LÁTKY)

A.18 POČETNĚ PRŮMĚRNÁ MOLEKULOVÁ HMOTNOST A DISTRIBUCE MOLEKULOVÉ HMOTNOSTI POLYMERŮ

A.19 OBSAH NÍZKOMOLEKULÁRNÍCH LÁTEK V POLYMERECH

A.20 CHOVÁNÍ POLYMERŮ PŘI ROZPOUŠTĚNÍ NEBO EXTRAKCI VE VODĚ

A.21 OXIDAČNÍ VLASTNOSTI (KAPALINY)

A.22 DÉLKOVĚ VÁŽENÝ STŘEDNÍ GEOMETRICKÝ PRŮMĚR VLÁKEN

A.23. ROZDĚLOVACÍ KOEFICIENT (OKTAN-1-OL/VODA): METODA POMALÉHO MÍCHÁNÍ

A.24. ROZDĚLOVACÍ KOEFICIENT (N-OKTANOL/VODA), METODA VYSOKOÚČINNÉ KAPALINOVÉ CHROMATOGRAFIE (HPLC)

A.25 DISOCIAČNÍ KONSTANTY VE VODĚ (TITRAČNÍ METODA – SPEKTROFOTOMETRICKÁ METODA – KONDUKTOMETRICKÁ METODA)

▼B

A.1 BOD TÁNÍ/BOD TUHNUTÍ

1. METODA

Většina dále popsaných metod je založena na Pokynech OECD pro zkoušení (1). Jejich základní principy jsou uvedeny v literatuře (2) a (3).

1.1 ÚVOD

Popsané metody a přístroje jsou určeny ke stanovení bodu tání látek bez omezení z hlediska stupně jejich čistoty.

Výběr metody závisí na povaze látky, která má být zkoumána. Omezením bude tedy skutečnost, zda lze danou látku rozmělnit na prášek snadno, obtížně nebo zda ji nelze rozmělnit.

U některých látek je vhodnější stanovení bodu tuhnutí nebo krystalizace a normalizované metody pro tato stanovení jsou v této metodě rovněž uvedeny.

Nelze-li vzhledem ke zvláštním vlastnostem látky dobře stanovit žádný z uvedených parametrů, může byt vhodné stanovit bod tekutosti.

1.2 DEFINICE A JEDNOTKY

Bod tání je definován jako teplota, při níž dochází za atmosférického tlaku k přechodu z pevného do kapalného skupenství a která za ideálních podmínek odpovídá bodu tuhnutí.

Vzhledem k tomu, že u mnoha látek dochází k fázovému přechodu v rozmezí teplot, je toto rozmezí často nazýváno rozmezím bodu tání.

Přepočet jednotek (K na ^{o}C)

$$t = T - 273{,}15$$

t: Celsiova teplota, stupně Celsia (^{o}C)

T: termodynamická teplota, kelvin (K)

1.3 REFERENČNÍ LÁTKY

Při zkoumání nové látky není nutné vždy používat referenční látky. Měly by v první řadě sloužit k občasné kontrole provedení metody a ke vzájemnému porovnávání výsledků získaných jinými metodami.

Některé kalibrační látky jsou uvedeny v literatuře (4).

▼B

1.4 PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

Stanovuje se teplota (teplotní rozmezí) fázového přechodu z pevného do kapalného skupenství nebo z kapalného do pevného skupenství. V praxi se při zahřívání/ochlazování vzorku zkoušené látky za atmosférického tlaku stanoví teploty počátku tání/tuhnutí a konce tání/tuhnutí. Je popsáno pět typů metod, jmenovitě kapilární metoda, metody používající zahřívací bloky, metody stanovení bodu tuhnutí, metody termické analýzy a stanovení bodu tekutosti (vyvinuto pro minerální oleje).

V některých případech může být vhodné měřit bod tuhnutí místo bodu tání.

1.4.1 **Kapilární metoda**

1.4.1.1 *Zařízení pro stanovení bodu tání s kapalinovou lázní*

Malé množství jemně rozmělněné látky se vpraví do kapiláry a zhutní se. Kapilára se zahřívá spolu s teploměrem, přičemž se rychlost nárůstu teploty během tání nastaví na méně než 1 K/min. Stanoví se teploty počátku a konce tání.

1.4.1.2 *Zařízení pro stanovení bodu tání s kovovým blokem*

Provádí se podobně jako v bodě 1.4.1.1 s tím rozdílem, že kapilára a teploměr jsou umístěny v kovovém vyhřívaném bloku a pozorují se otvory v bloku.

1.4.1.3 *Detekce fotočlánkem*

Vzorek v kapiláře se automaticky zahřívá v kovovém válci. Otvorem ve válci prochází látkou světelný paprsek na přesně kalibrovaný fotočlánek. Při tání mění většina látek optické vlastnosti a z neprůhledných se mění na průhledné. V tomto okamžiku vzroste intenzita světla dopadajícího na fotočlánek a do zařízení odečítajícího teplotu platinového odporového teploměru umístěného v topné komůrce je vyslán signál k zastavení zaznamenávání. Tato metoda není vhodná pro některé silně zbarvené látky.

1.4.2 **Zahřívací bloky**

1.4.2.1 *Koflerův zahřívací stolek*

Koflerův zahřívací stolek je tvořen dvěma kovovými částmi s různou teplotní vodivostí, je vyhříván elektricky a je konstruován tak, že teplotní gradient je po jeho délce téměř lineární. Teplota stolku se může měnit od 283 do 573 K; stolek je vybaven speciálním zařízením pro odečítání teploty, tvořeným jezdcem s ukazatelem a stupnici navrženou pro daný stolek. Pro stanovení bodu tání se látka nanese v tenké vrstvě přímo na povrch stolku. Během několika sekund se vytvoří ostrá dělicí linie mezi kapalnou a pevnou fází. Teplota v místě dělicí linie se odečte po nastavení ukazatele na tuto dělicí linii.

▼B

1.4.2.2 *Tavící mikroskop*

Pro stanovení bodu tání velmi malých množství látek se používají různé typy mikroskopů s ohřívacím stolkem. Většina ohřívacích stolků využívá k měření teploty citlivé termočlánky, používají se však i rtuťové teploměry. Typický přístroj pro stanovení bodu tání pomocí mikroskopu s ohřívacím stolkem má ohřívací komoru s kovovou deskou, na kterou se umístí vzorek na podložním sklíčku. Ve středu kovové desky je otvor, kterým může procházet světelný paprsek odražený osvětlovacím zrcátkem mikroskopu. Při měřeních se ohřívací komora přikryje skleněnou destičkou, aby se omezila cirkulace vzduchu v místě, kde se nachází vzorek.

Ohřev vzorku se kontroluje regulačním odporem. Pro velmi přesná měření opticky anisotropních látek lze používat polarizované světlo.

1.4.2.3 *Menisková metoda*

Tato metoda se používá především pro polyamidy.

Vizuálně se stanoví teplota, při které se zřetelně posune meniskus silikonového oleje uzavřeného mezi ohřívacím blokem a skleněnou krycí destičkou umístěnou na vzorku zkoušeného polyamidu.

1.4.3 **Metoda stanovení bodu tuhnutí**

Vzorek se vloží do speciální zkumavky, která se umístí do přístroje pro stanovení bodu tuhnutí. Během ochlazování se vzorek nepřetržitě pomalu míchá a ve vhodných intervalech se odečítá teplota. Jakmile je teplota po několik odečtů konstantní (po odpovídající korekci teploměru), je zaznamenána jako bod tuhnutí.

Podchlazení je nutno zabránit udržováním rovnováhy mezi pevnou a kapalnou fází.

1.4.4 **Termická analýza**

1.4.4.1 *Diferenční termická analýza (DTA)*

Při této technice se zaznamenává teplotní rozdíl mezi látkou a referenčním materiálem, jež jsou podrobeny stejnému řízenému teplotnímu programu. Jestliže u vzorku dojde k fázovému přechodu, který je spojen se změnou enthalpie, je tato změna zaznamenána jako endotermická (tání) nebo exotermická (tuhnutí) odchylka od základní linie záznamu teploty.

▼B

1.4.4.2 *Diferenční skenovací kalorimetrie (DSC)*

Při této technice se látka a referenční materiál podrobí stejnému řízenému teplotnímu programu a zaznamenává se rozdíl energie absorbované látkou a referenčním materiálem jako funkce teploty. Tato energie je energií potřebnou k zachování nulového teplotního rozdílu mezi látkou a referenčním materiálem. Jestliže u vzorku dojde k fázovému přechodu, který je spojen se změnou enthalpie, je tato změna zaznamenána jako endotermická (tání) nebo exotermická (tuhnutí) odchylka od základní linie záznamu tepelného toku.

1.4.5 **Bod tekutosti**

Metoda byla vyvinuta pro minerální oleje a je vhodná pro měření olejovitých látek s nízkým bodem tání.

Po počátečním zahřátí se vzorek určitou rychlostí ochlazuje a v intervalech po 3 K se stanovuje jeho tekutost. Nejnižší teplota, při níž je ještě pozorován pohyb látky, se zaznamená jako bod tekutosti.

1.5 KRITERIA JAKOSTI

Použitelnost a přesnost různých metod stanovení bodu tání/rozmezí bodu tání jsou uvedeny v této tabulce.

TABULKA: POUŽITELNOST METOD

A. **Kapilární metody**

Metoda měření	Látky, které lze rozmělnit na prášek	Látky, které nelze snadno rozmělnit na prášek	Rozsah teplot	Odhadnutá přesnost [1]	Existující norma
Zařízení pro stanovení bodu tání s kapalinovou lázní	ano	pouze pro několik látek	273 až 573 K	± 0,3 K	JIS K 0064
Zařízení pro stanovení bodu tání s kovovým blokem	ano	pouze pro několik látek	293 až > 573 K	± 0,5 K	ISO 1218 (E)
Detekce fotočlánkem	ano	pro některé látky s použitím přídavných zařízení	253 až 573 K	± 0,5 K	

[1] Závisí na typu zařízení a stupni čistoty látky.

▼B

B. **Zahřívací bloky a stanovení bodu tuhnutí**

Metoda měření	Látky, které lze rozmělnit na prášek	Látky, které nelze snadno rozmělnit na prášek	Rozsah teplot	Odhadnutá přesnost (1)	Existující norma
Koflerův zahřívací stolek	ano	ne	283 až > 573 K	± 1 K	ANSI/ASTM D 3451-76
Tavicí mikroskop	ano	pouze pro několik látek	273 až > 573 K	± 0,5 K	DIN 53736
Meniskova metoda	ne	především pro polyamidy	293 až > 573 K	± 0,5 K	ISO 1218(E)
Metoda stanovení bodu tuhnutí	ano	ano	223 až 573 K	± 0,5 K	např. BS 4695

(1) Závisí na typu zařízení a stupni čistoty látky.

C. **Termická analýza**

Metoda měření	Látky, které lze rozmělnit na prášek	Látky, které nelze snadno rozmělnit na prášek	Rozsah teplot	Odhadnutá přesnost (1)	Existující norma
Diferenční termická analýza	ano	ano	173 až 1 273 K	do 600 K ± 0,5 K do 1 273 K ± 2,0 K	ASTM E 537-76
Diferenční skenovací kalorimetrie	ano	ano	173 až 1 273 K	do 600 K ± 0,5 K do 1 273 K ± 2,0 K	ASTM E 537-76

(1) Závisí na typu zařízení a stupni čistoty látky.

D. **Bod tekutosti**

Metoda měření	Látky, které lze rozmělnit na prášek	Látky, které nelze snadno rozmělnit na prášek	Rozsah teplot	Odhadnutá přesnost (1)	Existující norma
Teplota tekutosti	pro minerální oleje a olejové látky	pro minerální oleje a olejové látky	223 až 323 K	± 0,3 K	ASTM D 97-66

(1) Závisí na typu zařízení a stupni čistoty látky.

1.6 POPIS METOD

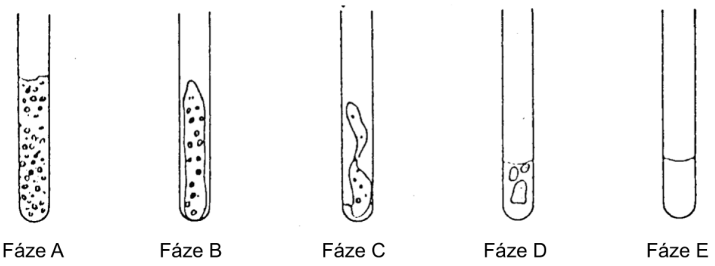
Postupy téměř všech těchto zkušebních metod jsou popsány v národních a mezinárodních normách (viz doplněk 1).

1.6.1 **Kapilární metody**

Při pomalém vzestupu teploty lze u jemně práškovitých látek obvykle rozlišit stupně tání znázorněné na obrázku 1.

▼B

Obrázek 1



Fáze A (Počátek tání): na vnitřní straně trubičky se stejnoměrně drží jemné kapičky.

Fáze B V důsledku smrštění vzorku se mezi vnitřní stěnou a vzorkem tvoří mezera.

Fáze C Smrštěný vzorek se začíná hroutit dolů a stává se tekutým.

Fáze D Na povrchu se tvoří úplný meniskus, ale značná část vzorku je dosud pevná.

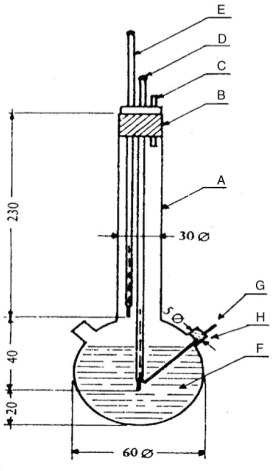
Fáze E (Konečná fáze tání): Vzorek již neobsahuje žádné pevné částice.

Během stanovení bodu tání se zaznamenávají teploty počátku tání a konečné fáze.

1.6.1.1. *Zařízení pro stanovení bodu tání s kapalinovou lázní*

Na obrázku 2 je znázorněna normalizovaná skleněná aparatura pro stanovení bodu tání (JIS K 0064); všechny rozměry jsou uvedeny v milimetrech.

Obrázek 2



A. Měřicí baňka
B. Zátka
C. Trubice pro vyrovnání tlaku
D. Teploměr
E. Pomocný teploměr
F. Kapalinová lázeň
G. Skleněná kapilára, délka 80-100 mm, vnitřní průměr 1,0 mm ± 0,2 mm, síla stěny 0,2 až 0,3 mm
H. Boční hrdlo

▼B

Kapalinová lázeň:

Je třeba zvolit vhodnou kapalinu. Volba kapaliny závisí na bodu tání, který má být stanoven, např. kapalný parafín pro stanovení bodu tání nižšího než 473 K, silikonový olej pro stanovení bodu tání nižšího než 573 K.

Pro stanovení bodu tání vyššího než 523 K lze použít směs tří hmotnostních dílů kyseliny sírové a dvou hmotnostních dílů síranu draselného. S tímto typem směsi je třeba pracovat s náležitou opatrností.

Teploměr:

Měly by se používat pouze teploměry, které splňují požadavky norem ASTM E 171, DIN 12770, JIS K 8001 nebo rovnocenných norem.

ASTM E 1-71, DIN 12770, JIS K 8001.

Postup:

Suchá látka se jemně rozetře v třecí misce a vpraví se do kapiláry zatavené na jednom konci, a to tak, aby po zhutnění byla kapilára naplněna do výšky přibližně 3 mm. Má-li se dosáhnout stejnoměrného zhutnění, nechá se kapilára dopadnout z výšky přibližně 700 mm skleněnou trubicí na hodinové sklíčko.

Naplněná kapilára se vloží do lázně tak, aby se střední část rtuťové baňky teploměru dotýkala kapiláry v místě, kde se nachází vzorek. Kapilára se obvykle vkládá do lázně při teplotě asi o 10 K nižší, než je bod tání.

Lázeň se zahřívá tak, aby vzestup teploty činil přibližně 3 K/min. Lázeň se míchá. Asi 10 K pod očekávaným bodem tání se růst teploty upraví na nejvýše 1 K/min.

Výpočet:

Bod tání se vypočte takto:

$$T = T_D + 0{,}00016\ (T_D - T_E)n$$

kde:

T = korigovaný bod tání v K

T_D = odečet teploty na teploměru D v K

T_E = odečet teploty na teploměru E v K

n = počet stupňů, o něž rtuťový sloupec teploměru D vyčnívá z kapaliny.

1.6.1.2 *Zařízení pro stanovení bodu tání s kovovým blokem*

Přístroj:

Je tvořen:

— válcovým kovovým blokem, jehož horní část je dutá a tvoří komoru (viz obrázek 3),

— kovovou krycí deskou se dvěma nebo více otvory, kterými je možno do kovového bloku zavést trubičky,

▼B

— ohřívacím systémem kovového bloku, například elektrickým topným odporem uzavřeným v kovovém bloku,

— regulačním odporem pro regulaci příkonu, je-li použit elektrický ohřev,

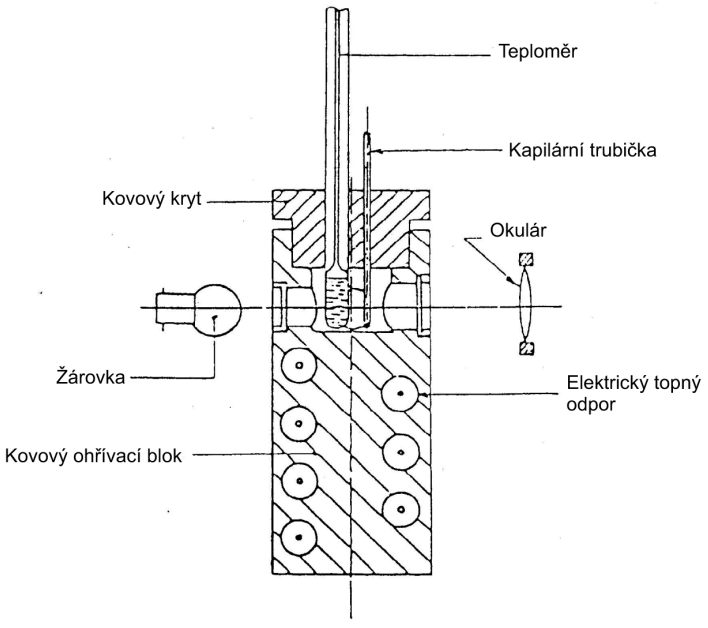
— čtyřmi okénky ze žáruvzdorného skla v bočních stěnách ohřívací komory, orientovanými vůči sobě pod pravým úhlem. Před jedním z těchto okének je umístěn okulár pro pozorování kapilární trubičky. Ostatní tři okénka slouží k osvětlení vnitřního prostoru žárovkami,

— kapilární trubičkou z žáruvzdorného skla zatavenou na jednom konci (viz 1.6.1.1).

Teploměr:

Viz normy uvedené v 1.6.1.1. Je rovněž možné použít termoelektrické měřicí přístroje srovnatelné přesnosti.

Obrázek 3



1.6.1.3 *Detekce fotočlánkem*

Přístroj a postup:

Přístroj se skládá z kovové komory s automatickým ohřívacím zařízením. Tři kapilární trubičky se naplní podle bodu 1.6.1.1 a umístí se do ohřívací komory.

▼B

Pro kalibraci přístroje je k dispozici několik lineárních režimů růstu teploty, přičemž vhodný lineární růst teploty se elektricky nastaví předem zvolenou konstantou. Zaznamenávací zařízení ukazují teplotu v ohřívací komoře a teplotu látky v kapilárách.

1.6.2 **Zahřívací bloky**

1.6.2.1 *Koflerův zahřívací stolek*

Viz doplněk.

1.6.2.2 *Tavící mikroskop*

Viz doplněk.

1.6.2.3 *Menisková metoda (pro polyamidy*

Viz doplněk.

V oblasti bodu tání by měla být rychlost ohřevu menší než 1 K/min.

1.6.3 **Metody stanovení bodu tuhnutí**

Viz doplněk.

1.6.4 **Termická analýza**

1.6.4.1 *Diferenční termická analýza*

Viz doplněk.

1.6.4.2 *Diferenční skenovací kalorimetrie*

Viz doplněk.

1.6.5 **Stanovení bodu tekutosti**

Viz doplněk.

2. **DATA**

V některých případech je nutno provést korekci teploměru.

3. **ZPRÁVY**

Protokol o zkoušce má pokud možno obsahovat tyto údaje:

— použitá metoda,

— přesná specifikace látky (identifikace a nečistoty) a popř. informace o provedeném předběžném čištění,

— odhad přesnosti.

Jako bod tání se uvede střední hodnota alespoň dvou měření, jejichž výsledky leží v rozmezí odhadnuté přesnosti (viz tabulky).

▼B

Leží-li rozdíl teplot počáteční a konečné fáze tání v mezích přesnosti metody, uvede se jako bod tání konečná teplota, v opačném případě se uvedou obě teploty.

Jestliže se látka před dosažením bodu tání rozkládá nebo sublimuje, uvede se teplota, při které dochází k pozorovanému jevu.

Musí být uvedeny všechny informace a poznámky, které jsou důležité pro interpretaci výsledků, zejména pokud jde o nečistoty a fyzikální stav látky.

4. **LITERATURA**

1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 102, rozhodnutí Rady C(81) 30 v konečném znění.

2) IUPAC, B. Le Neindre, B. Vodar, eds. Experimental thermodynamics, Butterworths, London 1975, vol. II, 803–834.

3) R. Weissberger ed.: Technique of organic Chemistry, Physical Methods of Organic Chemistry, 3rd ed., Interscience Publ., New York, 1959, vol. I, Part I, Chapter VII.

4) IUPAC, Physicochemical measurements: Catalogue of reference materials from national laboratories, Pure and applied chemistry, 1976, vol. 48, 505–515.

▼B

Doplněk

Další technické podrobnosti je možné zjistit například v těchto normách:

1. **Kapilární metody**

1.1 Zařízení pro stanovení bodu tání s kapalinovou lázní

ASTM E 324-69	Standard test method for relative initial and final melting points and the melting range of organic chemicals
BS 4634	Method for the determination of melting point and/or melting range
DIN 53181	Bestimmung des Schmelzintervalles von Harzen nach Kapilarverfarehn
JIS K 00-64	Testing methods for melting point of chemical products.

1.2 Přístroje pro stanovení bodu tání s kovovým blokem

DIN 53736	Visuelle Bestimmung der Schmelztemperatur von teilkristallinen Kunststoffen
ISO 1218 (E)	Plastics – polyamides – determination of „melting point“

2. **Zahřívací bloky**

2.1 Koflerův zahřívací stolek

ANSI/ASTM D 3451-76	Standard recommended practices for testing polymeric powder coatings

2.2 Tavicí mikroskop

DIN 53736	Visuelle Bestimmung der Schmelztemperatur von teilkristallinen Kunststoffen

2.3 Menisková metoda (pro polyamidy)

ISO 1218 (E)	Plastics – polyamides – determination of „melting point“

▼B

ANSI/ASTM D 2133-66	Standard specification for acetal resin injection moulding and extrusion materials
NF T 51-050	Resines de polyamides. Determination du „point de fusion“ methode du menisque

3. **Metody stanovení bodu tuhnutí**

BS 4633	Method for the determination of crystallizing point
BS 4695	Method for Determination of Melting Point of petroleum wax (Cooling Curve)
DIN 51421	Bestimmung des Gefrierpunktes von Flugkraftstoffen, Ottokraftstoffen und Motorenbenzolen
ISO 2207	Cires de petrole: determination de la temperature de figeage
DIN 53175	Bestimmung des Erstarrungspunktes von Fettsiiuren
NF T 60-114	Point de fusion des paraffines
NF T 20-051	Methode de determination du point de cristallisation (point de congélation)
ISO 1392	Method for the determination of the freezing point

4. **Termická analýza**

4.1 Diferenční termická analýza

ASTM E 537-76	Standard method for assessing the thermal stability of chemicals by methods of differential thermal analysis
ASTM E 473-85	Standard definitions of terms relating to thermal analysis

▼B

ASTM E 472-86	Standard practice for reporting thermoanalytical data
DIN 51005	Thermische Analyse, Begriffe

4.2 Diferenční skenovací kalorimetrie

ASTM E 537-76	Standard method for assessing the thermal stability of chemicals by methods of differential thermal analysis
ASTM E 473-85	Standard definitions of terms relating to thermal analysis
ASTM E 472-86	Standard practice for reporting thermoanalytical data
DIN 51005	Thermische Analyse, Begriffe

5. **Stanovení bodu tekutosti**

NBN 52014	Echantillonnage et analyse des produits du petrole: Point de trouble et point d'ecoulement limite – Monsterneming en ontleding van aardolieproducten: Troebelingspunt en vloeipunt
ASTM D 97-66	Standard test method for pour point of petroleum oils
ISO 3016	Petroleum oils – Determination of pour point

▼B

A.2 BOD VARU

1. METODA

Většina dále popsaných metod je založena na Pokynech OECD pro zkoušení (1). Jejich základní principy jsou uvedeny v literatuře (2) a (3).

1.1 ÚVOD

Popsané metody a zařízení lze použít pro kapaliny a látky s nízkým bodem tání, pokud nepodléhají chemickým reakcím pod bodem varu (např. autooxidaci, přesmyku, rozkladu atd.). Metody lze použít jak pro čisté kapalné látky, tak pro kapalné látky obsahující nečistoty.

Přednost mají metody využívající detekci fotočlánkem a metody termické analýzy, protože umožňují stanovení jak bodu tání, tak bodu varu. Tato měření mohou být navíc prováděna automaticky.

„Dynamická metoda“ má tu výhodu, že ji lze použít i ke stanovení tlaku par a přitom není třeba korigovat bod varu na normální tlak (101,325 kPa), neboť tento tlak lze během měření nastavit manostatem.

Poznámky:

Vliv nečistot na stanovení bodu varu závisí ve velké míře na jejich povaze. Jestliže vzorek obsahuje těkavé nečistoty, které mohou ovlivnit výsledky, může být látky přečištěna.

1.2 DEFINICE A JEDNOTKY

Standardní bod varu je definován jako teplota, při které je tlak par dané kapaliny roven 101,325 kPa.

Jestliže se měření bodu varu neprovádí za normálního tlaku, lze závislost tlaku par na teplotě popsat Clausiovou-Clapeyronovou rovnicí:

$$\log P = \frac{\Delta H_v}{2{,}3\ RT} + konst.$$

kde:

P = tlak par látky v Pa,

ΔH_V = výparné teplo v $Jmol^{-1}$

R = univerzální molární plynová konstanta = 8,314 $Jmol^{-1}\ K^{-1}$

T = termodynamická teplota v K

Bod varu se uvádí s ohledem na okolní tlak při měření.

▼B

Přepočty

Tlak (jednotka: kPa)

100 kPa = 1 bar = 0,1 Mpa

(jednotka „bar“ je nadále přípustná, její používání se však nedoporučuje)

133 Pa = 1 mm Hg = 1 torr

(jednotky „mm Hg“ a „torr“ nejsou povoleny)

1 atm = standardní atmosféra = 101 325 Pa

(jednotka „atm“ není povolena).

Teplota (jednotka:K)

t = T – 273,15

t: Celsiova teplota, stupeň Celsia (^{o}C)

T: termodynamická teplota, kelvin (K)

1.3 REFERENČNÍ LÁTKY

Při vyšetřování nové látky není nutné vždy používat referenční látky. Měly by v první řadě sloužit k občasné kontrole provedení metody a ke vzájemnému porovnávání výsledků získaných jinými metodami.

Některé kalibrační látky jsou uvedeny v doplňku.

1.4 PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

Pět metod stanovení bodu varu (teplotního rozmezí bodu varu) je založeno přímo na měření teploty varu, další dvě využívají termální analýzy.

1.4.1 **Stanovení ebuliometrem**

Ebuliometry byly původně vyvinuty pro stanovení molekulové hmotnosti na základě zvýšení teploty varu, jsou však vhodné také pro přesná měření bodu varu. Velmi jednoduchý přístroj je popsán v normě ASTM D 112072 (viz doplněk). V tomto přístroji se kapalina zahřívá za rovnovážných podmínek při atmosférickém tlaku, dokud nezačne vřít.

1.4.2 **Dynamická metoda**

Metoda zahrnuje měření teploty kondenzace páry vhodným teploměrem umístěným za varu ve zpětném toku (refluxu). U této metody lze měnit tlak.

1.4.3 **Destilační metoda pro stanovení bodu varu**

Metoda zahrnuje destilaci kapaliny a měření teploty kondenzace páry, přičemž se stanovuje také množství destilátu.

▼B

1.4.4 **Postup podle Siwoloboffa**

Vzorek se zahřívá ve zkumavce, která je ponořena do tepelné lázně. Do zkumavky se vzorkem je zasunuta zatavená kapilára, v jejíž spodní části se nachází vzduchová bublinka.

1.4.5 **Detekce fotočlánkem**

Při použití principu unikajících bublinek podle Siwoloboffa se provádí automatické fotoelektrické měření.

1.4.6 **Diferenční termická analýza**

Při této technice se zaznamenává teplotní rozdíl mezi látkou a referenčním materiálem jako funkce teploty, přičemž látka a referenční materiál se podrobí témuž řízenému teplotnímu programu. Jestliže u studované látky dojde k fázovému přechodu, který je spojen se změnou enthalpie, je tato změna indikována jako endotermická odchylka (var) od základní linie záznamu teploty.

1.4.7 **Diferenční skenovací kalorimetrie**

Při této technice se látka a referenční materiál podrobí stejnému řízenému teplotnímu programu a zaznamenává se rozdíl energie absorbované látkou a referenčním materiálem jako funkce teploty. Tato energie je energií potřebnou k zachování nulového teplotního rozdílu mezi látkou a referenčním materiálem. Jestliže u vzorku dojde k fázovému přechodu, který je spojen se změnou enthalpie, je tato změna indikována jako endotermická odchylka (var) od základní linie záznamu tepelného toku.

1.5 KRITERIA JAKOSTI

Použitelnost a přesnost různých metod používaných pro stanovení bodu/teplotního rozmezí bodu varu jsou uvedeny v tabulce 1.

Tabulka 1

Srovnání metod

Metoda měření	Odhadnutá přesnost	Existující norma
Stanovení ebuliometrem	± 1,4 K (do 373 K) (1) (2) ± 2,5 K (do 600 K) (1) (2)	ASTM D 1120-72 (1)
Dynamická metoda	± 0,5 K (do 600 K) (2)	
Destilační metoda (stanovení rozmezí bodu varu)	± 0,5 K (do 600 K)	ISO/R 918, DIN 53171, BS 4591/71
Postup podle Siwoloboffa	±2 K (do 600 K) (2)	
Detekce fotočlánkem	± 0,3 K (do 373 K) (2)	
Diferenční termická analýza	± 0,5 K (do 600 K) ± 2,0 K (do 1 273 K)	ASTM E 537-76
Diferenční skenovací kalorimetrie	± 0,5 K (do 600 K) ± 2,0 K (do 1 273 K)	ASTM E 537-76

(1) Tato přesnost platí pouze pro jednoduchý přístroj, popsaný např. v normě ASTM D 1120-72; může být zlepšena užitím dokonalejšího ebuliometru.

(2) Platí pouze pro čisté látky. Užití za jiných okolností by mělo být zdůvodněno.

▼B

1.6 POPIS METOD

Postupy některých zkušebních metod jsou popsány v mezinárodních a národních normách (viz doplněk).

1.6.1 **Ebuliometr**

Viz doplněk.

1.6.2 **Dynamická metoda**

Viz metoda A.4 pro stanovení tlaku par.

Zaznamená se teplota varu naměřená při tlaku 101,325 kPa.

1.6.3 **Destilační metoda (stanovení rozmezí bodu varu)**

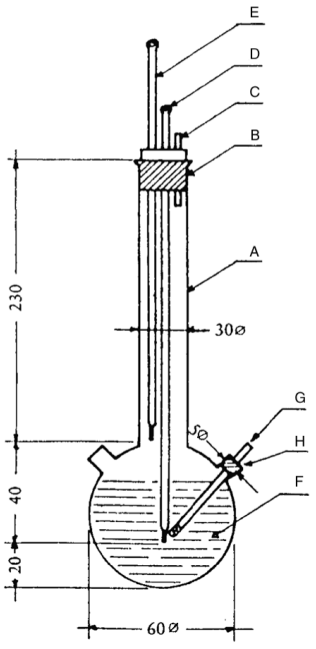
Viz doplněk.

1.6.4 **Postup podle Siwoloboffa**

Vzorek se zahřívá ve zkumavce o průměru přibližně 5 mm v přístroji pro stanovení bodu tání (obrázek 1).

Na obrázku 1 je znázorněn normalizovaný přístroj pro stanovení bodu varu (JIS K 0064) (přístroj je skleněný, všechny rozměry jsou uvedeny v milimetrech).

Obrázek 1



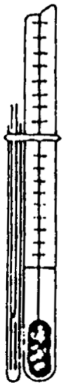
A. Měřící baňka
B. Zátka
C. Trubice pro vyrovnání tlaku
D. Teploměr
E. Pomocný teploměr
F. Kapalinová lázeň
G. Skleněná kapilára, délka 80–100 mm, vnitřní průměr 1,0 mm ± 0,2 mm, síla stěny 0,2 až 0,3 mm
H. Boční hrdlo

Do zkumavky se vloží kapilára (varná kapilára) zatavená asi 1 cm nad spodním koncem. Zatavená část kapiláry musí ležet pod hladinou kapaliny. Zkumavka obsahující kapiláru se upevní buď pryžovou páskou k teploměru, nebo pomocí bočního držáku (viz obrázek 2).

▼B

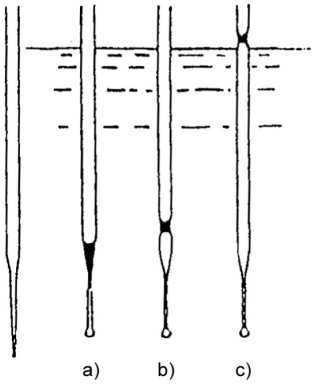
Obrázek 2

Princíp podle Siwoloboffa



Obrázek 3

Modifikovaný princíp



Kapalina pro lázeň se volí podle bodu varu. Pro teploty do 573 K lze použít silikonový olej. Parafinový olej lze použít pouze do 473 K. Kapalina v lázni se zahřívá tak, aby vzestup teploty byl zpočátku asi 3 K/min. Lázeň se míchá. Asi 10 K před očekávaným bodem tání se zahřívání sníží tak, aby nárůst teploty byl nejvýše 1 K/min. Krátce před dosažením bodu varu začnou z varné kapiláry rychle unikat bublinky.

Bodu varu je dosaženo, když při ochlazování náhle ustane unikáni bublinek a kapalina začne v kapiláře stoupat. Příslušný údaj na teploměru je bodem varu látky.

Modifikovanou metodou (obrázek 3) se bod varu stanovuje v kapiláře pro stanovení bodu tání. Ta se vytáhne do tenké špičky dlouhé asi 2 cm (a) a do ni se nasaje malé množství vzorku. Otevřený konec tenké části kapiláry se zataví tak, aby na konci byla malá vzduchová bublinka. Při zahřívání v aparatuře pro stanoveni bodu táni (b) se vzduchová bublinka rozpíná. Bod varu odpovídá teplotě, při které sloupeček látky dosáhne hladiny kapalinové lázně (c).

1.6.5 **Detekce fotočlánkem**

Vzorek se zahřívá v kapiláře ve vyhřívaném kovovém bloku.

Otvory v bloku se vede světelný paprsek tak, aby procházel látkou na přesně kalibrovaný fotočlánek.

Při zvyšování teploty vzorku stoupají z kapiláry jednotlivé vzduchové bublinky. Při dosažení bodu varu počet bublinek značně vzroste. To vede ke změně intenzity světla zaznamenané fotočlánkem a vyvolá signál v měřicím přístroji, kterým se zastaví zaznamenávání teploty měřené platinovým odporovým teploměrem umístěným v bloku.

Tato metoda je zvláště vhodná, protože umožňuje stanovení teplot nižších než laboratorní teplota až do 253,15 K (–20 °C) bez jakékoli úpravy přístroje. Pouze je třeba umístit přístroj v chladicí lázni.

▼B

1.6.6 **Termická analýza**

1.6.6.1 *Diferenční termická analýza*

Viz doplněk.

1.6.6.2 *Diferenční skenovací kalorimetrie*

Viz doplněk.

2. **DATA**

Při malých odchylkách od normálního tlaku (nejvýše ± 5 kPa) se hodnoty teploty varu přepočítávají na normalizovanou teplotu T_n pomocí Sidneyovy-Youngovy rovnice:

$$T_n = T + (f_T \times \Delta p)$$

kde:

Δp = (101,325 – p) [pozor na znaménko]

P = naměřený tlak v kPa

f_T = velikost změny teploty varu v závislosti na změně tlaku v K/kPa

T = naměřená teploty varu v K

T_n = teplota varu korigovaná na normální tlak v K

Teplotní korekční faktory f_T a rovnice pro jejich aproximaci jsou uvedeny pro řadu látek ve zmíněných mezinárodních a národních normách.

Například metoda podle DIN 53171 uvádí přibližné korekce pro rozpouštědla obsažená v nátěrových hmotách:

Tabulka 2

Teplotní korekční faktory f_T

Teplota T (K)	Korekční faktor f_T (K/kPa)
323,15	0,26
348,15	0,28
373,15	0,31
398,15	0,33
423,15	0,35
448,15	0,37
473,15	0,39
498,15	0,41
523,15	0,44
548,15	0,45
573,15	0,47

▼B

3. **ZPRÁVY**

Protokol o zkoušce má pokud možno obsahovat tyto údaje:

— použitá metoda,

— přesná specifikace látky (identifikace a nečistoty) a popř. informace o provedeném předběžném čištění,

— odhad přesnosti.

Jako bod varu se uvede střední hodnota alespoň dvou měření, jejichž výsledky leží v rozmezí odhadnuté přesnosti (viz tabulka 1).

Uvedou se naměřené teploty varu a jejich střední hodnota a dále hodnota tlaku v kPa, při kterém byla měření provedena. Tlak by se měl pokud možno blížit normálnímu tlaku.

Musí být uvedeny všechny informace a poznámky, které jsou důležité pro interpretaci výsledků, zejména pokud jde o nečistoty a fyzikální stav látky.

4. **LITERATURA**

1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 103, rozhodnutí Rady C(81) 30 v konečném znění.

2) IUPAC, B. Le Neindre, B. Vodar, editions. Experimental thermodynamics, Butterworths, London 1975, volume II.

3) R. Weissberger (ed.): Technique of organic chemistry, Physical methods of organic chemistry, Third Edition, Interscience Publications, New York, 1959, volume I, Part I, Chapter VIII.

▼B

Doplněk

Další technické podrobnosti je možné zjistit například v těchto normách:

1. **Ebuliometr**

1.1 Zařízení pro stanovení bodu tání s kapalinovou lázní

ASTM D 1120-72	Standard test method for boiling point of engine anti-freezes

2. **Destilační postupy (teplotní rozmezí bodu varu)**

ISO/R 918	Test Method for Distillation (Distillation Yield and Distillation Range)
BS 4349/68	Method for determination of distillation of petroleum products
BS 4591/71	Method for the determination of distillation characteristics
DIN 53171	Losungsmittel für Anstrichstoffe, Bestimmung des Siedeverlaufes
NF T 20-608	Distillation: détermination du rendement et de l'intervalle de distillation

3. **Diferenční termická analýza a diferenční skenovací kalorimetrie**

ASTM E 537-76	Standard method for assessing the thermal stability of chemicals by methods of differential thermal analysis
ASTM E 473-85	Standard definitions of terms relating to thermal analysis
ASTM E 472-86	Standard practice for reporting thermoanalytical data
DIN 51005	Thermische Analyse, Begriffe

▼B

A.3 RELATIVNÍ HUSTOTA

1. METODA

Popsané metody jsou založeny na Pokynech OECD pro zkoušení (1). Základní principy jsou uvedeny v literatuře (2).

1.1 ÚVOD

Popsané metody stanovení relativní hustoty jsou použitelné pro pevné a kapalné látky bez jakýchkoli omezení, pokud jde o jejich čistotu. Jednotlivé metody, které lze použít, jsou uvedeny v tabulce 1.

1.2 DEFINICE A JEDNOTKY

Relativní hustota D^{20}_4 pevných látek nebo kapalin je poměr mezi hmotností určitého objemu zkoumané látky stanovenou při 20 °C a hmotností stejného objemu vody stanovenou při 4 °C. Relativní hustota nemá rozměr.

Hustota látky P je podíl hmotnosti látky m a jejího objemu V.

Jednotkou hustoty P, v soustavě SI je kg/m^3.

1.3 REFERENČNÍ LÁTKY (1, 3)

Při vyšetřování nové látky není nutné vždy používat referenční látky. Měly by v první řadě sloužit k občasné kontrole provedení metody a ke vzájemnému porovnávání výsledků získaných jinými metodami.

1.4 PODSTATA METOD

Používají se čtyři skupiny metod.

1.4.1 **Vztlakové metody**

1.4.1.1 *Hustoměry* (pro kapaliny)

Dostatečně přesné a rychlé stanovení hustoty lze provést plovoucími hustoměry, které umožní stanovit hustotu kapaliny odečtením hloubky jejich ponoření na kalibrované stupnici.

1.4.1.2 *Hydrostatické váhy* (pro kapaliny a pevné látky)

Ke stanovení hustoty zkoušeného vzorku lze využít rozdíl mezi jeho hmotností stanovenou na vzduchu a ve vhodné kapalině (např. vodě).

U pevných látek je naměřená hustota reprezentativní jen pro daný použitý vzorek. Při stanovení hustoty kapalin se zváží těleso známého objemu nejdříve na vzduchu a poté v kapalině.

1.4.1.3. *Metoda ponořené kuličky* (pro kapaliny) (4)

Touto metodou se stanoví hustota kapaliny z rozdílu mezi výsledky vážení kapaliny před ponořením kuličky známého objemu do zkoušené kapaliny a po něm.

▼B

1.4.2 **Pyknometrické metody**

Pro pevné látky a kapaliny lze použít pyknometry různých tvarů o známém objemu. Hustota se vypočte z rozdílu výsledků vážení plného a prázdného pyknometru a z jeho známého objemu.

1.4.3. **Vzduchový srovnávací pyknometr** (pro pevné látky)

Hustotu pevné látky v libovolné formě je možné měřit při pokojové teplotě plynovým srovnávacím pyknometrem. Objem látky se měří ve vzduchu nebo v inertním plynu v kalibrovaném válci nastavitelného objemu. Pro výpočet hustoty se po skončení měření objemu provede vážení.

1.4.4 **Oscilační densimetr** (5, 6, 7)

Hustotu kapaliny lze měřit oscilačním densimetrem. Mechanický oscilátor konstruovaný ve tvaru U trubice se rozkmitá na rezonanční-kmitočet, který závisí na jeho hmotnosti. Po vložení vzorku se rezonanční kmitočet oscilátoru změní. Aparaturu je nutné kalibrovat dvěma kapalinami o známé hustotě. Kapaliny by měly být voleny nejlépe tak, aby pokrývaly rozmezí, ve kterém leží hustota měřeného vzorku.

1.5 KRITERIA JAKOSTI

Použitelnost různých metod pro stanovení relativní hustoty je uvedena v tabulce.

1.6 POPIS METOD

Normy uvedené jako příklady, ve kterých je možno vyhledat technické podrobnosti, jsou uvedeny v doplňku.

Zkoušky musí být provedeny při 20 °C a provedou se nejméně dvě měření.

2. **DATA**

Viz normy.

3. **ZPRÁVY**

Protokol o zkoušce má pokud možno obsahovat tyto údaje:

— použitá metoda,

— přesná specifikace látky (identifikace a nečistoty) a popř. informace o provedeném předběžném čištění.

Relativní hustota D_4^{20} se uvede podle definice v bodě 1.2 společně se skupenstvím měřené látky.

Musí být uvedeny všechny informace a poznámky, které jsou důležité pro interpretaci výsledků, zejména pokud jde o nečistoty a fyzikální stav látky.

▼B

Tabulka

Použitelnost metod

	Hustota		Nejvyšší možná hodnota	
	pevné látky	kapaliny		
1.4.1.1 Hustoměr		ano	5 Pa s	ISO 387 ISO 649-2 NF T 20-050
1.4.1.2 Hydrostatické váhy				
a) pevné látky	ano			ISO 1183 (A)
b) kapaliny		ano	5 Pa s	ISO 901 a 758
1.4.1.3 Metoda ponořené kuličky		ano	20 Pa s	DIN 53217
1.4.2 Pyknometr				ISO 3507
a) pevné látky	ano			ISO 1183 (B) NF T 20053
b) kapaliny		ano	500 Pa s	ISO 758
1.4.3 Vzduchový srovnávací pyknometr	ano			DIN 55990 Teil 3 DIN 53243
1.4.4 Oscilační densimetr		ano	5 Pa s	

4. **LITERATURA**

1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 109, rozhodnutí Rady C(81) 30 v konečném znění.

2) R. Weissberger ed., Technique of Organic Chemistry, Physical Methods of Organic Chemistry, 3rd ed., Chapter IV, Interscience Publ., New York, 1959, vol. I, Part 1.

3) IUPAC, Recommended reference materials for realization of physico-chemical properties, Pure and applied chemistry, 1976, vol. 48, 508.

4) Wagenbreth, H., Die Tauchkugel zur Bestimmung der Dichte von Flüssigkeiten, Technisches Messen tm, 1979, vol.11, 427–430.

5) Leopold, H., Die digitale Messung von Flüssigkeiten, Elektronik, 1970, vol. 19, 297–302.

6) Baumgarten, D., Füllmengenkontrolle bei vorgepackten Erzeugnissen – Verfahren zur Dichtebestimmung bei flüssigen Produkten und ihre praktische Anwendung, Die Pharmazeutische Industrie, 1975, vol. 37, 717–726.

7) Riemann, J., Der Einsatz der digital en Dichtemessung im Braue-reilaboratorium, Brauwissenschaft, 1976, vol. 9, 253–255.

▼B

Doplněk

Další technické podrobnosti je možné zjistit například v těchto normách:

1. **Vztlakové metody**

1.1 Hustoměr

DIN 12790, ISO 387	Hydrometer; general instructions
DIN 12791	Part I: Density hydrometers; construction, adjustment and use Part II: Density hydrometers; standardised sizes, designation Part III: Use and test
ISO 649-2	Laboratory glassware: Density hydrometers for general purpose
NF T 20-050	Chemical products for industrial use – Determination of density of liquids – Areometric method
DIN 12793	Laboratory glassware: range find hydrometers

1.2 Hydrostatické váhy

Pro pevné látky

ISO 1183	Method A: Methods for determining the density and relative density of plastics excluding cellular plastics
NF T 20-049	Chemical products for industrial use – Determination of the density of solids other than powders and cellular products – Hydrostatic balance method
ASTM-D-792	Specific gravity and density of plastics by displacement
DIN 53479	Testing of plastics and elastomers; determination of density

Pro kapaliny

ISO 901	ISO 758

▼B

	DIN 51757	Testing of mineral oils and related materials; determination of density
	ASTM D 941-55, ASTM D 1296-67 and ASTM D 1481-62	
	ASTM D 1298	Density, specific gravity or API gravity of crude petroleum and liquid petroleum products by hydrometer method
	BS 4714	Density, specific gravity or API gravity of crude petroleum and liquid petroleum products by hydrometer method
1.3	Metoda ponořené kuličky	
	DIN 53217	Testing of paints, varnishes and similar coating materials; determination of density; immersed body method
2.	**Pyknometrické metody**	
2.1	Pro kapaliny	
	ISO 3507	Pycnometers
	ISO 758	Liquid chemical products; determination of density at 20 °C
	DIN 12797	Gay-Lussac pycnometer (for non-volatile liquids which are not too viscous)
	DIN 12798	Lipkin pycnometer (for liquids with a kinematic viscosity of less than $100 \cdot 10^{-6} \cdot m^2 \cdot s^{-1}$ at 15 °C)
	DIN 12800	Sprengel pycnometer (for liquids as DIN 12798)
	DIN 12801	Reischauer pycnometer (for liquids with a kinematic viscosity of less than $100 \cdot 10^{-6} \cdot m^2 \cdot s^{-1}$ at 20 °C, applicable in particular also to hydrocarbons and aqueous solutions as well as to liquids with higher vapour pressure, approximately 1 bar at 90 °C)

▼B

DIN 12806	Hubbard pycnometer (for viscous liquids of all types which do not have too high a vapour pressure, in particular also for paints, varnishes and bitumen)
DIN 12807	Bingham pycnometer (for liquids, as in DIN 12801)
DIN 12808	Jaulmes pycnometer (in particular for ethanol – water mixture)
DIN 12809	Pycnometer with ground-in thermometer and capillary side tube (for liquids which are not too viscous)
DIN 53217	Testing of paints, varnishes and similar products; determination of density by pycnometer
DIN 51757	Point 7: Testing of mineral oils and related materials; determination of density
ASTM D 297	Section 15: Rubber products – chemical analysis
ASTM D 2111	Method C: Halogenated organic compounds
BS 4699	Method for determination of specific gravity and density of petroleum products (graduated bicapillary pycnometer method)
BS 5903	Method for determination of relative density and density of petroleum products by the capillary – stoppered pycnometer method
NF T 20-053	Chemical products for industrial use – Determination of density of solids in powder and liquids – Pyknometric method

▼B

2.2	Pro pevné látky	
	ISO 1183	Method B: Methods for determining the density and relative density of plastics excluding cellular plastics
	NF T 20-053	Chemical products for industrial use – Determination of density of solids in powder and liquids – Pyknometric method
	DIN 19683	Determination of the density of soils
3.	**Vzduchové srovnávací pyknometry**	
	DIN 55990	Part 3: Prüfung von Anstrichstoffen und ähnlichen Beschichrungsstoffen; Pulverlack; Bestimmung der Dichte
	DIN 53243	Anstrichstoffe; Chlorhaltige Polymere; Prüfung

▼M1

A.4 TLAK PAR

1. METODA

Tato metoda je rovnocenná Pokynu OECD pro zkoušení 104 (2004).

1.1 ÚVOD

Tato přepracovaná verze metody A.4 (1) zahrnuje jednu doplňkovou metodu, a to metodu efusní: isotermální termogravimetrii určenou pro látky s velmi nízkými tlaky (až 10^{-10} Pa). Vzhledem k tomu, že je zapotřebí postupů, zejména v souvislosti se stanovením tlaku par u látek s nízkou tenzí par, další postupy se přehodnocující v rámci této metody s ohledem na další rozmezí použitelnosti.

Při termodynamické rovnováze je tlak par čisté látky pouze funkcí teploty. Základní principy jsou popsány v literatuře (2, 3).

Neexistuje žádný postup vhodný pro celý rozsah tlaku par od méně než 10^{-10} do 10^5 Pa. Do této metody spadá osm metod měření tlaku par, které lze používat v různých rozmezích tlaku par. Jednotlivé metody jsou srovnány z hlediska použití a rozsahu měření v tabulce 1. Tyto metody lze použít pouze u sloučenin, které se za podmínek zkoušky nerozkládají. V případě, kdy nelze experimentální metody z technických důvodů použít, lze tlak par rovněž odhadnout, přičemž doporučená metoda odhadu je uvedena v dodatku.

1.2 DEFINICE A JEDNOTKY

Tlak par látky je definován jako tlak nasycené páry nad pevnou nebo kapalnou látkou.

Měla by být používána jednotka tlaku v soustavě SI, tj. pascal (Pa). Dále jsou uvedeny některé dříve používané jednotky s odpovídajícími přepočítávacími faktory:

1 torr	=	1 mm Hg	=	$1{,}333 \times 10^2$ Pa
1 fyzikální atmosféra (atm)	=	$1{,}013 \times 10^5$ Pa		
1 bar	=	10^5 Pa		

Jednotkou termodynamické teploty v soustavě SI je kelvin (K). Převod stupňů Celsia na kelviny se provádí podle vzorce:

$$T = t + 273{,}15$$

kde T je teplota v kelvinech, neboli termodynamická teplota, a t je teplota ve stupních Celsia.

▼**M1**

Tabulka 1

Metoda měření	Látky		Odhad opakovatelnosti	Odhad reprodukovatelnosti	Doporučená oblast
	pevné	kapalné			
Dynamická metoda	s nízkým bodem tání	ano	do 25 % 1 až 5 %	do 25 % 1 až 5 %	10^3 Pa až 2×10^3 Pa 2×10^3 Pa až 10^5 Pa
Statická metoda	ano	ano	5 až 10 %	5 až 10 %	10 Pa až 10^5 Pa 10^{-2} Pa až 10^5 Pa (1)
Metoda za použití isoteniskopu	ano	ano	5 až 10 %	5 až 10 %	10^2 Pa až 10^5 Pa
Efusní metoda: váhy pro měření tlaku par	ano	ano	5 až 20 %	do 50 %	10^{-3} Pa až 1 Pa
Efusní metoda: Knudsenova komůrka	ano	ano	10 až 30 %	—	10^{-10} Pa až 1 Pa
Efusní metoda: isotermální termogravimetrie	ano	ano	5 až 30 %	do 50 %	10^{-10} Pa až 1 Pa
Metoda sycení plynu	ano	ano	10 až 30 %	do 50 %	10^{-10} Pa až 10^3 Pa
Metoda rotujícího tělíska	ano	ano	10 až 20 %	—	10^{-4} Pa až 0,5 Pa

(1) Při použití kapacitního manometru.

1.3 PODSTATA ZKOUŠKY

Obecně se tlak par stanovuje při různých teplotách. V omezeném rozsahu teplot je logaritmus tlaku par čisté látky nepřímo úměrný termodynamické teplotě podle zjednodušené Clapeyronovy-Clausiovy rovnice:

$$\log p = \frac{\Delta Hv}{2{,}3RT} + konst$$

kde:

p = tlak par v pascalech,

ΔHv = výparné teplo v J mol^{-1},

R = univerzální molární plynová konstanta (8,314 J mol^{-1} K^{-1}),

T = termodynamická teplota v K.

▼M1

1.4 REFERENČNÍ LÁTKY

Referenční látky není nutné vždy používat. Slouží v první řadě k občasné kontrole provedení metody a ke vzájemnému porovnávání výsledků získaných jinými metodami.

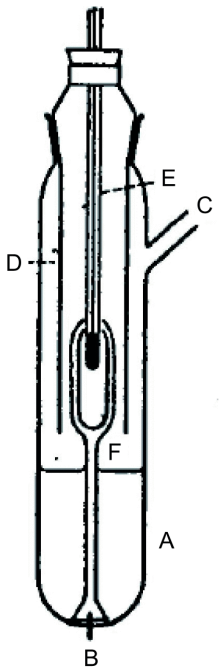
1.5 POPIS METODY

1.5.1 **Dynamická metoda (Cottrellova metoda)**

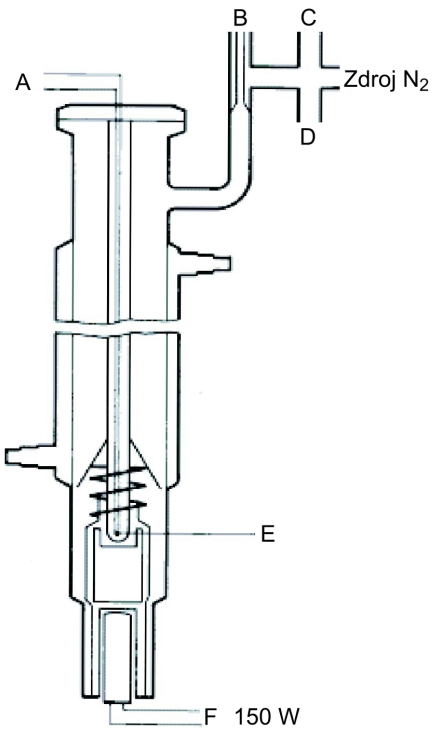
1.5.1.1 *Podstata*

Pro stanovení tlaku par látky se měří její teplota varu při různých specifikovaných tlacích mezi asi 10^3 a 10^5 Pa. Tato metoda se rovněž doporučuje pro stanovení bodu varu. K tomuto účelu je metoda vhodná až do teploty 600 K. Teploty varu kapalin jsou v hloubce 3 až 4 cm přibližně o 0,1 °C vyšší než na povrchu, a to kvůli hydrostatickému tlaku sloupce kapaliny. Při Cottrellově metodě (4) je teploměr umístěn do páry nad povrch kapaliny a vroucí kapalina se nepřetržitě čerpá okolo baňky teploměru. Baňku teploměru pokrývá tenká vrstva kapaliny, která je v rovnováze s párou při atmosférickém tlaku. Teploměr tak odečítá skutečnou teplotu varu bez chyb způsobených přehřátím nebo hydrostatickým tlakem. Vývěva původně používaná Cottrellem je zachycena na obrázku 1. Vroucí kapalina se nachází ve zkumavce A. Platinový drátek B zatavený do dna usnadňuje jednotný průběh vření. Boční trubička C vede do kondenzátoru a pouzdro D brání styku studeného kondenzátu a teploměru E. Když kapalina v A vře, bubliny a kapalina zachycená nálevkou se přelévá přes baňku teploměru prostřednictvím dvou ramen vývěvy F.

Obrázek 1



Obrázek 2



▼**M1**

Cottrellova vývěva (4)

A: Termočlánek

B: Vyrovnávací prostor vakua

C: Manometr

D: Vakuum

E: Měřicí bod

F: Topný článek asi 150 W

1.5.1.2 *Aparatura*

Velmi přesná aparatura využívající Cottrellův princip je zachycena na obrázku 2. Sestává se z trubice s varnou částí ve spodní části, chladiče ve střední části a výpusti a příruby v horní části. Cottrellova vývěva je umístěna ve varné části, která je ohřívána elektrickou topnou vložkou. Teplota se měří plášťovým termočlánkem nebo odporovým teploměrem zasunutým přes přírubu v horní části. Výpusť je připojena na systém regulace tlaku. Systém pro regulaci tlaku se skládá z vývěvy, vyrovnávacího objemu vakua, manostatu pro připouštění dusíku k ovládaní tlaku a manometru.

1.5.1.3 *Postup měření*

Látka se umístí do varné části. Při plnění pevných látek, které nejsou ve formě prášku, může dojít k problémům, kterým se však lze někdy vyhnout zahřátím chladicího pláště. Aparatura se uzavře přírubou a látka se odplyní. Touto metodou nelze měřit látky, které pění.

Poté se nastaví nejnižší požadovaný tlak a zapne se ohřev. Současně se teplotní čidlo připojí k zapisovači.

Rovnováhy je dosaženo, je-li při konstantním tlaku zaznamenána konstantní teplota varu. Je třeba věnovat zvláštní pozornost tomu, aby se zabránilo prudkému uvolňování par během varu. Navíc musí dojít k úplné kondenzaci v chladiči. Při stanovování tlaku par u nízkotajících pevných látek je třeba dbát na to, aby nedošlo k ucpání chladiče.

Po zaznamenání naměřeného rovnovážného teplotního bodu se nastaví vyšší tlak. Takto se pokračuje, dokud se nedosáhne tlaku 10^5 Pa (celkem asi 5 až 10 bodů měření). Pro kontrolu se musí stanovení rovnovážných bodů opakovat při klesajících hodnotách tlaku.

1.5.2 **Statická metoda**

1.5.2.1 *Podstata*

Statickou metodou (5) se měří tlak par, který se ustaví při termodynamické rovnováze při dané teplotě. Tato metoda je vhodná pro látky a vícesložkové kapaliny a pevné látky v rozsahu od 10^{-1} do 10^5 Pa a při potřebné pečlivosti lze tuto metodu použít také pro oblast od 1 do 10 Pa.

▼**M1**

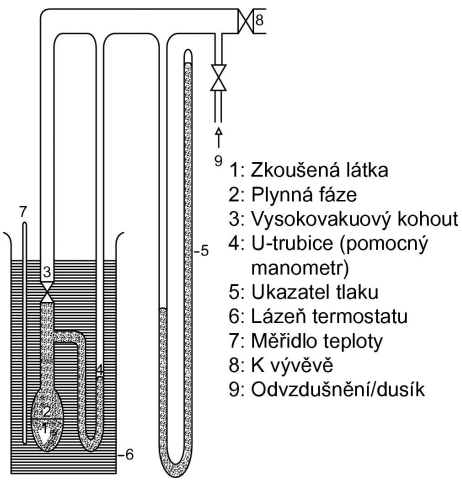
1.5.2.2 *Aparatura*

Zařízení se skládá z lázně o konstantní teplotě (preciznost ±0,2 K), zásobníku vzorku připojenému k podtlakovému potrubí, manometru a soustavy k regulaci tlaku. Baňka na vzorek (obrázek 3a) je připojena k podtlakovému potrubí přes ventil a diferenciální manometr (U-trubice obsahující vhodnou manometrickou kapalinu), který slouží jako ukazatel nuly. V závislosti na rozsahu tlaků a v závislosti na chemickém chování zkoušené látky jsou k použití v diferenciálním manometru vhodné rtuť, silikonové oleje a ftaláty. Avšak s ohledem na životní prostředí je třeba se vyvarovat použití rtuti, bude-li to možné. Zkoušená látka se nesmí znatelně rozpouštět ani nesmí reagovat s kapalinou v U-trubici. Namísto U-trubice lze použít manometr (obrázek 3b). V rozsahu od normálního tlaku do 10^2 Pa lze v manometru používat rtuť, zatímco silikonové oleje a ftaláty je vhodné používat pro tlaky pod 10^2 Pa až do 10 Pa. Existují též jiná měřidla tlaku, která lze použít pro tlak nižší než 10^2 Pa, a ohřívatelné membránové kapacitní manometry lze dokonce používat pro tlak nižší než 10^{-1} Pa. Teplota se měří na vnější stěně baňky se vzorkem nebo v baňce samotné.

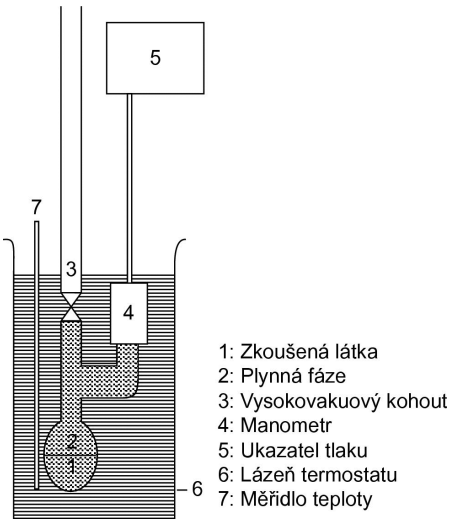
1.5.2.3 *Postup měření*

Při použití aparatury popsané na obrázku 3a se U-trubice naplní zvolenou kapalinou, která musí být před použitím odplyněna za zvýšené teploty. Zkoušená látka se vloží do aparatury a odplyní se za snížené teploty. V případě vícesložkového vzorku musí být teplota dostatečně nízká, aby se zajistilo, že se složení materiálu nezmění. Rovnováhy lze rychleji dosáhnout mícháním. Vzorek může být podchlazen kapalným dusíkem nebo suchým ledem, je ale nutno zabránit kondenzaci vzduchu nebo kapaliny z vývěvy. Při otevřeném ventilu nádoby se vzorkem se připojí na několik minut odsávání, aby se odstranil vzduch. Je-li to nutné, odplyňovací postup se několikrát opakuje.

Obrázek 3a



Obrázek 3b



▼**M1**

Při zahřívání vzorku za uzavřeného ventilu roste tlak par. To mění rovnováhu kapaliny v U-trubici. Aby se změna kompenzovala, připouští se ventilem dusík nebo vzduch do té doby, dokud není indikátor rozdílu tlaku opět na nule. Tlak potřebný k ustavení nulové hodnoty může být odečten přesným manometrem nebo přístrojem o vyšší preciznosti. Tento tlak odpovídá tenzi par látky při teplotě měření. Při použití aparatury popsané na obrázku 3b se tlak páry odečítá přímo.

Tlak par se stanoví ve vhodných krátkých intervalech teplot (celkem asi 5 až 10 bodů měření) až do požadovaného teplotního maxima.

Odečty při nízkých teplotách se musí pro kontrolu opakovat. Neleží-li hodnoty zjištěné z opakovaných odečtů na křivce zjištěné pro zvyšující se teplotu, může to být způsobeno jednou z těchto příčin:

i) vzorek stále obsahuje vzduch (např. u vysoce viskózních materiálů) nebo obsahuje látky s nízkým bodem varu, které jsou při zahřátí uvolňovány,

ii) v látce probíhá ve vyšetřovaném teplotní rozsahu chemická reakce (např. rozklad, polymerace).

1.5.3 **Metoda za použití isoteniskopu**

1.5.3.1 *Podstata*

Isoteniskop (6) vychází z podstaty statické metody. Metoda spočívá v uložení vzorku do baňky udržované při konstantní teplotě a připojené k manometru a vývěvě. Odplyněním za sníženého tlaku se odstraní nečistoty těkavější než vyšetřovaná látka. Tlak par vzorku při zvolených teplotách je vyrovnáván známým tlakem interního plynu. Isoteniskop byl vyvinut k měření tlaku par určitých kapalných uhlovodíků, ale hodí se rovněž k vyšetřování pevných látek. Metoda obvykle není vhodná pro vícesložkové systémy. U vzorků obsahujících netěkavé nečistoty jsou výsledky zatíženy pouze mírnými chybami. Doporučený rozsah je od 10^2 do 10^5 Pa.

1.5.3.2 *Aparatura*

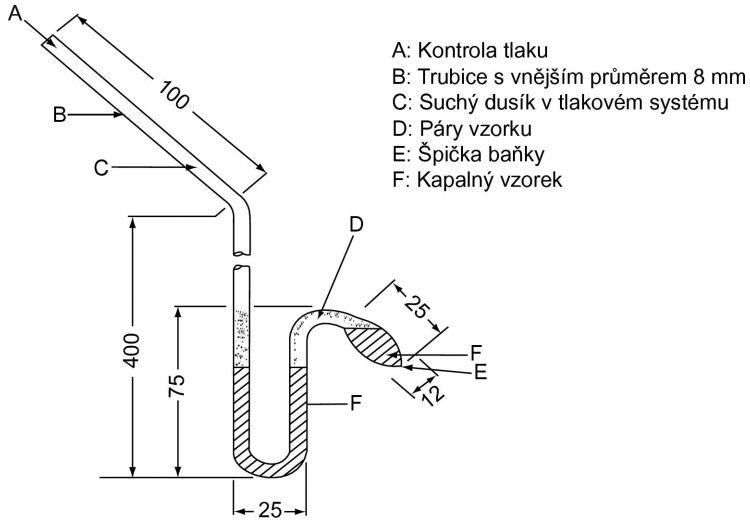
Příklad měřicího zařízení je zachycen na obrázku 4. Úplný popis lze nalézt v ASTM D 2879–86 (6).

▼**M1**

1.5.3.3 *Postup měření*

V případě kapalin slouží látka samotná jako indikační sloupec v diferenciálním manometru. Do isoteniskopu se odměří množství kapaliny postačující k naplnění baňky a krátkého ramene manometru. Isoteniskop se připojí k vakuovému systému, evakuuje se a poté se naplní dusíkem. Evakuace a výplach systému se opakuje dvakrát, aby se odstranil veškerý zbytkový kyslík. Naplněný isoteniskop se umístí do horizontální polohy, aby se vzorek rozprostřel v tenké vrstvě v baňce se vzorkem a v manometru. Tlak v systému se sníží na 133 Pa a vzorek se opatrně zahřeje právě k varu (odstranění rozpuštěných plynů). Poté se isoteniskop vrátí do původní polohy tak, aby se vzorek vrátil do baňky a krátkého ramene manometru. Tlak se udržuje na 133 Pa. Špička baňky se vzorkem se ohřívá malým plamenem, dokud uvolněná pára vzorku neexpanduje natolik, že přetlačí část vzorku z horní části baňky a ramene manometru do manometru, přičemž se vytvoří prostor bez dusíku naplněný výhradně parami. Isoteniskop se poté vloží do lázně se stálou teplotou a tlak dusíku se upraví tak, aby se rovnal tlaku vzorku. V rovnováze se rovná tlak dusíku tenzi par látky.

Obrázek 4



(Rozměry v mm)

U pevných látek se v závislosti na oblasti tlaku a teploty používají manometrické kapaliny, jako jsou například silikonové kapaliny nebo ftaláty. Odplyněná manometrická kapalina se naplní do rozšířené části dlouhého ramene isoteniskopu. Poté se vyšetřovaná látka naplní do baňky a odplyní se při zvýšené teplotě. Isoteniskop se poté nakloní, aby manometrická kapalina natekla do U-trubice.

▼M1

1.5.4 **Efusní metoda: váhy pro měření tlaku par** (7)

1.5.4.1 *Podstata*

Vzorek zkoušené látky se ohřeje v malé pícce a umístí se pod evakuovaný skleněný zvon. Pícka se zakryje víkem, které má malé otvory o známém průměru. Pára látky unikající jedním z otvorů je vedena na misku vysoce citlivých vah, která je rovněž umístěna pod evakuovaným skleněným zvonem. U některých konstrukcí je miska vah uzavřena v chladicím bloku, který zajišťuje rozptyl tepla do vnějšího okolí vedením tepla, a je ochlazována vyzařováním tak, aby unikající pára na ní kondenzovala. Hybnost proudu par působí jako síla proti misce vah. Tlak par lze odvodit dvěma způsoby: přímo ze síly působící na misku vah a rovněž z rychlosti vypařování s využitím Hertzovy-Knudsenovy rovnice (2):

$$p = G\sqrt{\frac{2\,\pi RT\ \times 10^3}{M}}$$

kde:

G = rychlost vypařování (kg s^{-1} m^{-2}),

M = molární hmotnost (g mol^{-1}),

T = termodynamická teplota (K),

R = univerzální molární plynová konstanta, (J mol^{-1} K^{-1}),

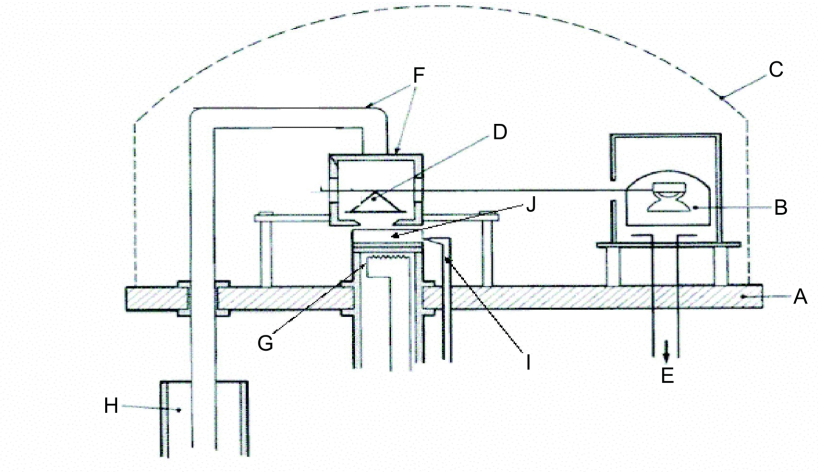
p = tlak páry (Pa).

Doporučený rozsah je od 10^{-3} do 1 Pa.

1.5.4.2 *Aparatura*

Obecný princip aparatury je znázorněn na obrázku 5.

Obrázek 5



A: Základní deska

B: Přístroj s pohyblivou cívkou

C: Skleněný zvon

D: Miska vah se stupnicí

E: Zařízení pro měření vakua

F: Chladicí blok a chladicí tyč

G: Odpařovací pícka

H: Dewarova nádoba s kapalným dusíkem

I: Měření teploty vzorku

J: Zkoušená látka

▼M1

1.5.5 **Efusní metoda: Knudsenova komůrka**

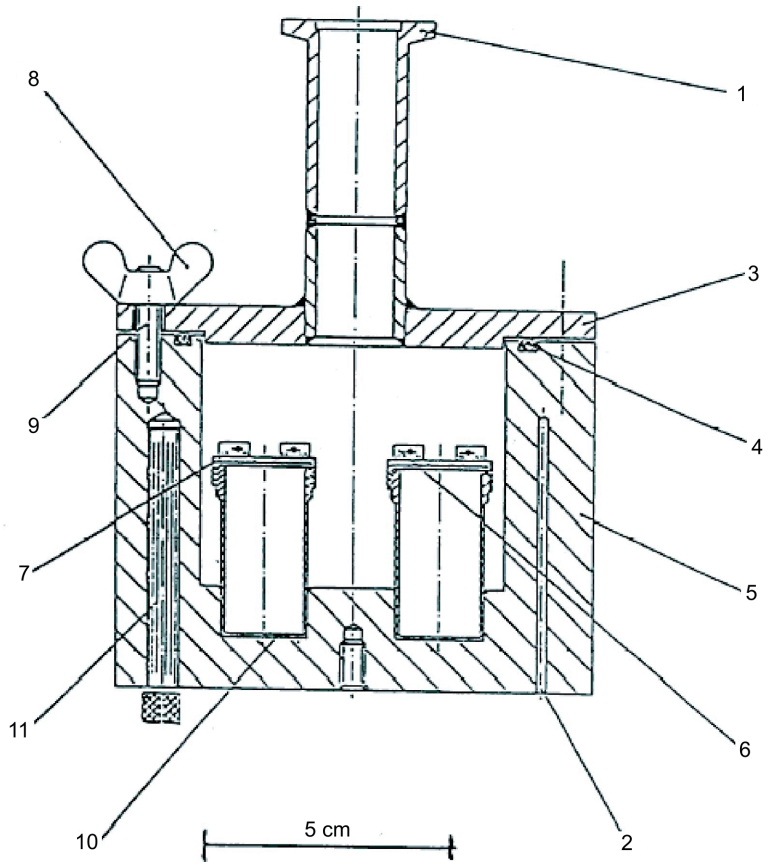
1.5.5.1 *Podstata*

Metoda je založena na odhadu hmotnosti par zkoušené látky unikající za jednotku času z Knudsenovy komůrky (8) mikrodýzou za podmínek vysokého vakua. Hmotnost difundujících par může být zjištěna buď stanovením úbytku hmotnosti komůrky nebo kondenzací par při nízké teplotě a stanovením jejich množství chromatografickou analýzou. Tlak par se vypočte za použití Hertzovy-Knudsenovy rovnice (viz bod 1.5.4.1) pomocí korekčních faktorů, které závisí na parametrech přístroje (9). Doporučený rozsah je od 10^{-10} do 1 Pa (10, 11, 12, 13, 14).

1.5.5.2 *Aparatura*

Obecný princip aparatury je znázorněn na obrázku 6.

Obrázek 6



1:	Přípojka k vakuu	7:	Šroubovací víko
2:	Otvory pro platinový odporový teploměr nebo pro systém měření a kontroly teploty	8:	Křídlové matice
3:	Víko vakuového bloku	9:	Šrouby
4:	O-kroužek	10:	Efusní komůrky z korozivzdorné oceli
5:	Hliníkový vakuový blok	11:	Topné těleso
6:	Zařízení pro zasouvání a vytahování efusních komůrek		

▼**M1**

1.5.6 **Efusní metoda: isotermální termogravimetrie**

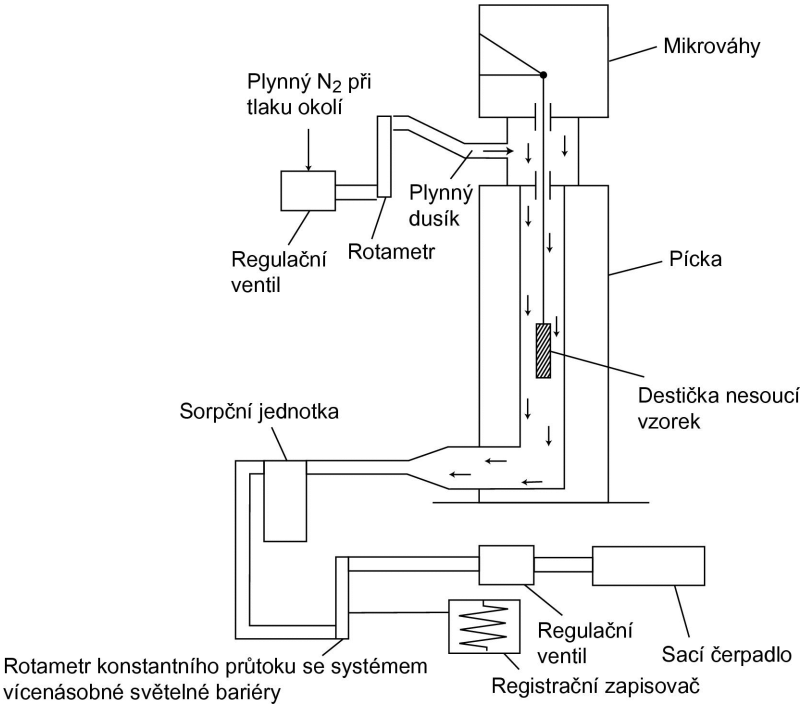
1.5.6.1 *Podstata*

Metoda je založena na stanovení zvýšených rychlostí vypařování zkoušené látky při zvýšených teplotách a tlaku okolí s využitím termogravimetrie (10, 15, 16, 17, 18, 19, 20). Rychlosti vypařování v_T jsou výsledkem vystavení zvolené sloučeniny působení pomalu protékajícího inertního plynu, přičemž se sleduje úbytek hmotnosti při definovaných isotermálních teplotách T v kelvinech během příslušných časových období. Tlaky par p_T se vypočítají z hodnot v_T s využitím lineární závislosti mezi logaritmem tlaku par a logaritmem rychlosti vypařování. V případě potřeby lze provést extrapolaci na teploty 20 °C a 25 °C regresní analýzou log p_T versus $1/T$. Tato metoda je vhodná pro látky s tlakem páry na úrovni 10^{-10} Pa (10^{-12} mbar) při čistotě co nejvíce se blížící 100 %, aby se zabránilo chybné interpretaci naměřených hmotnostních úbytků.

1.5.6.2 *Aparatura*

Obecný princip měřicí soustavy je zachycen na obrázku 7.

Obrázek 7



Destička nesoucí vzorek, zavěšená na mikrováhách v komůrce s kontrolovanou teplotou, je vlečena proudem suchého plynného dusíku, který unáší molekuly par zkoušené látky. Po průchodu komůrkou se proud plynu čistí v sorpční jednotce.

1.5.6.3 *Postup měření*

Zkoušená látka se nanese na povrch zdrsněné skleněné destičky jako homogenní vrstva. U pevných látek se destička rovnoměrně navlhčí roztokem látky ve vhodném rozpouštědle a vysuší se v inertní atmosféře. Pro měření se pokrytá destička zavěsí na termogravimetrický analyzátor a následně se průběžně měří úbytek hmotnosti jako funkce času.

▼M1

Rychlost vypařování v_T při určité teplotě se vypočítá ze ztráty hmotnosti Δm destičky se vzorkem pomocí rovnice

$$v_T = \frac{\Delta m}{F \cdot t} \left(\mathrm{gcm^{-2}h^{-1}} \right)$$

kde F je plocha povrchu pokrytého zkoušenou látkou, obvykle je to povrchová plocha destičky se vzorkem, a t je čas, během něhož dojde k úbytku hmotnosti Δm.

Tlak par p_T se vypočítá jako funkce rychlosti vypařování v_T:

$$\mathrm{Log}\ p_T = \mathrm{C} + \mathrm{D}\ \log\ v_T$$

kde C a D jsou konstanty specifické pro použité experimentální uspořádání v závislosti na průměru měřicí komůrky a rychlosti toku plynu. Tyto konstanty se musí jednorázově stanovit měřením množiny sloučenin se známým tlakem par a určit pomocí lineární regrese ze závislosti log p_T na log v_T (11, 21, 22).

Vztah mezi tlakem par p_T a teplotou T v kelvinech popisuje rovnice

$$\mathrm{Log}\ p_T = \mathrm{A} + \mathrm{B}\ 1/T$$

kde A a B jsou konstanty získané lineární regresí ze závislosti log p_T na $1/T$. Pomocí této rovnice lze vypočítat tlak par extrapolací pro jakoukoliv teplotu.

1.5.7 **Metoda nasycení plynu** (23)

1.5.7.1 *Podstata*

Inertní plyn se vede při pokojové teplotě a známém průtoku přes vzorek zkoušené látky nebo nad ním, a to dostatečně pomalu, aby bylo zajištěno nasycení. Dosažení nasycení v plynné fázi je zásadně důležité. Transportovaná látka se zachytí, obvykle za použití sorbentu, a stanoví se její množství. Jako alternativní metody zachycení páry a následné analýzy mohou být ke stanovení množství hmoty transportovaného materiálu použity průtokové analytické techniky, jako je plynová chromatografie. Tlak par se vypočítá s tím, že se předpokládá platnost zákona o ideálním plynu a že celkový tlak směsi plynů je roven součtu tlaků plynných složek. Dílčí tlak zkoušené látky, tj. tlak par, se vypočítá ze známého celkového objemu plynu z hmotnosti transportovaného materiálu.

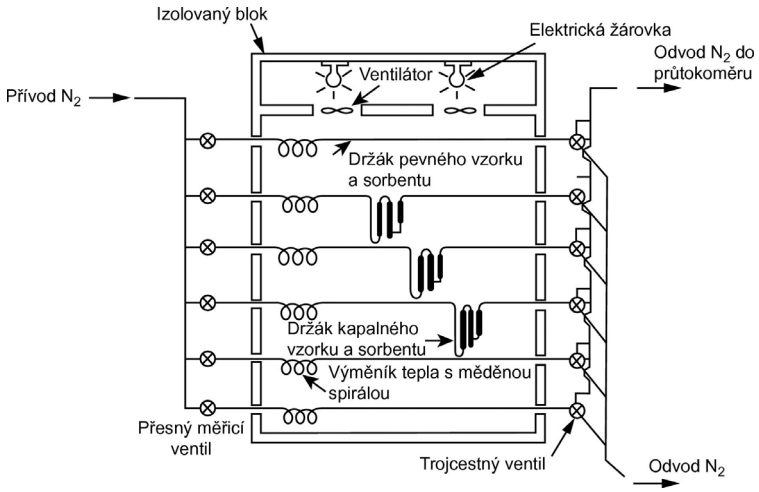
Metoda nasycení plynu je použitelná u pevných nebo kapalných látek. Lze ji použít pro tlaky par do 10^{-10} Pa (10, 11, 12, 13, 14). Metoda je nejspolehlivější pro tlaky par nižší než 10^3 Pa. Při tlaku nad 10^3 Pa jsou tlaky par všeobecně nadsazené, pravděpodobně kvůli tvorbě aerosolu. Protože se měření tlaku par provádí při pokojové teplotě, není nezbytné extrapolovat údaje získané za vysokých teplot a extrapolace vysokých teplot, která často způsobuje závažné chyby, se neprovádí.

1.5.7.2 *Aparatura*

Proces vyžaduje použití bloku s konstantní teplotou. Nákres na obrázku 8 ukazuje blok obsahující tři držáky pevných vzorků a tři držáky kapalných vzorků, které umožňují trojitou analýzu buď pevného, nebo kapalného vzorku. Teplota je regulována s precizností ±0,5 °C nebo lepší.

▼**M1**

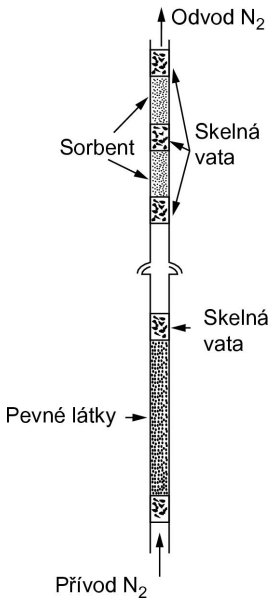
Obrázek 8



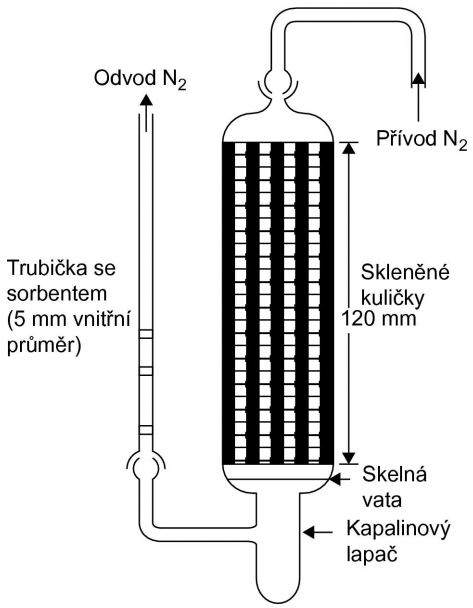
Obecně se jako inertní nosný plyn používá dusík, ale někdy může být nutno použít jiný plyn (24). Nosný plyn musí být suchý. Proud plynu se rozdělí do 6 proudů ovládaných jehlovými ventily (otvor přibližně 0,79 mm) a protéká do bloku měděnou trubkou o vnitřním průměru 3,8 mm. Po vyrovnání teplot plyn protéká okolo vzorku a sorbentovým lapačem a vychází z bloku.

Pevné vzorky se umístí do trubice o vnitřním průměru 5 mm mezi zátky ze skelné vaty (viz obrázek 9). Obrázek 10 ukazuje držák kapalného vzorku a systém se sorbentem. Metoda pro měření tlaku par kapalin s nejvyšší reprodukovatelností spočívá v nanesení kapaliny na skleněné kuličky nebo na inertní sorbent, například na oxid křemičitý, a obalení držáku těmito kuličkami. Druhou možností je nechat procházet nosný plyn hrubou fritou a probublávat sloupcem s kapalnou zkoušenou látkou.

Obrázek 9



Obrázek 10



▼M1

Systém se sorbentem obsahuje přední a zadní část se sorbentem. Při velmi nízkých tlacích páry se na sorbentu zachytí pouze malá množství a adsorpce na skelné vatě a ve skleněném potrubí mezi vzorkem a sorbentem může představovat závažný problém.

Lapače chlazené pevným CO_2 jsou dalším účinným způsobem pro zachytávání materiálu v podobě par. Nevyvolávají žádný protitlak v syticí koloně a rovněž lze snadno kvantitativně odstranit zachycený materiál.

1.5.7.3 *Postup měření*

Průtok vytékajícího nosného plynu se měří při pokojové teplotě. Průtok se během experimentu často kontroluje, aby se zajistilo, že je přesně zjištěna hodnota celkového objemu nosného plynu. Dává se přednost nepřetržitému sledování hmotnostním průtokoměrem. Nasycení plynné fáze může vyžadovat značnou kontaktní dobu, a tím i dosti nízké průtoky plynu (25).

Po skončení experimentu se samostatně analyzují jak přední, tak zadní část se sorbentem. Sloučenina v každé části se desorbuje přidáním rozpouštědla. Výsledné roztoky se analyzují kvantitativně, aby se stanovila hmotnost desorbovaná z každé části. Volba analytické metody (rovněž volba sorbentu a desorbčního rozpouštědla) je určována povahou zkoušeného materiálu. Účinnost desorpce je stanovena vstříknutím známého množství vzorku do sorbentu, jeho desorpcí a analýzou zpětně získaného množství. Je důležité kontrolovat účinnost desorpce při koncentraci vzorku za podmínek zkoušení nebo v její blízkosti.

Aby bylo zajištěno nasycení nosného plynu zkoušenou látkou, používají se tři odlišné průtoky plynu. Jestliže vypočítaný tlak par nevykazuje závislost na průtoku, předpokládá se nasycení plynu.

Tlak par se vypočítá pomocí rovnice:

$$p = \frac{W}{V} \times \frac{RT}{M}$$

kde:

p = tlak páry (Pa),

W = hmotnost odpařené zkoušené látky (g),

V = objem nasyceného plynu (m^3),

R = univerzální molární plynová konstanta 8,314 (J mol^{-1} K^{-1}),

T = termodynamická teplota (K),

M = molární hmotnost zkoušené látky (g mol^{-1}).

Naměřené objemy musí být korigovány v důsledku rozdílů tlaků a teplot mezi průtokoměrem a syticí kolonou.

▼**M1**

1.5.8 **Metoda rotujícího tělíska**

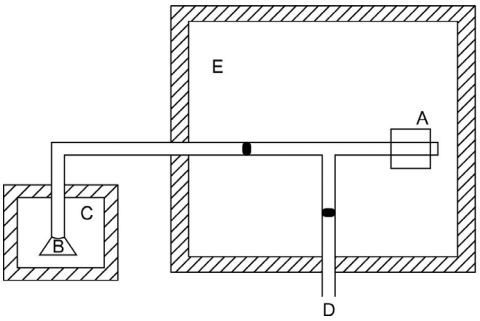
1.5.8.1 *Podstata*

Tato metoda využívá měřiče viskozity s rotujícím tělískem, kde je měřicím prvkem malá ocelová kulička zavěšená v magnetickém poli, která je uváděna do rotačního pohybu rotujícími magnetickými poli (26, 27, 28). Zvedací cívky umožňují měření rotační rychlosti. Když kulička dosáhne stanovené rotační rychlosti, obvykle přibližně 400 otáček za sekundu, zastaví se další napájení a zahájí se zpomalování vyvolané brzdicím účinkem plynu. Pokles rotační rychlosti je měřen jako funkce času. Tlak par je odvozen ze zpomalení rotující ocelové kuličky v závislosti na tlaku. Doporučený rozsah je od 10^{-4} do 0,5 Pa.

1.5.8.2 *Aparatura*

Schematický nákres měřicí soustavy je zachycen na obrázku 11. Měřicí hlava je umístěna v prostoru s konstantní teplotou, v němž je teplota regulována s přesností na 0,1 °C. Nádobka se vzorkem je umístěna do samostatného prostoru, v němž je teplota rovněž regulována s přesností na 0,1 °C. Všechny ostatní části soustavy jsou udržovány při vyšší teplotě, aby nedocházelo ke kondenzaci. K zařízení se připojí vysokovakuová vývěva.

Obrázek 11



A: Hlava pro snímání otáček rotujícího tělíska
B: Komůrka se vzorkem
C: Termostat
D: Zdroj vakua (turbomolekulární vývěva)
E: Vzduchový termostat

2. **DATA A ZPRÁVY**

2.1 DATA

Stanovení tlaku par kteroukoli z výše popsaných metod by se mělo provést nejméně při dvou teplotách. Aby se ověřil lineární průběh křivky tlaku par v oblasti teplot od 0 °C do 50 °C, doporučuje se měření při třech nebo více teplotách. V případě efusní metody (Knudsenova komůrka a isotermální termogravimetrie) a metody nasycení plynu se jako rozsah měřicích teplot doporučuje 120 °C až 150 °C namísto 0 °C až 50 °C.

2.2 PROTOKOL O ZKOUŠCE

Protokol o zkoušce musí obsahovat tyto údaje:

— použitá metoda,

▼M1

— přesná specifikace látky (identifikace a nečistoty) a popř. informace o provedeném předběžném čištění,

— nejméně dvě hodnoty tlaku par a teploty – pokud možno tři či více – v oblasti 0 °C až 50 °C (nebo 120 °C až 150 °C),

— nejméně jedna z teplot by měla činit 25 °C nebo méně, bude-li to technicky proveditelné při zvolené metodě,

— všechny původní údaje,

— křivka závislosti log p na $1/T$,

— odhadnutá hodnota tlaku par při 20 °C nebo 25 °C.

Zjistí-li se změna stavu (fázový přechod, rozklad), měly by být uvedeny tyto skutečnosti:

— druh změny,

— teplota při atmosférickém tlaku, při k které ke změně dochází,

— hodnoty tlaku par při 10 °C a 20 °C pod teplotou přechodu a nad teplotou přechodu (s výjimkou přechodů z pevného do plynného skupenství).

Musí být uvedeny všechny informace a poznámky, které jsou důležité pro interpretaci výsledků, zejména pokud jde o nečistoty a fyzikální stav látky.

3. **LITERATURA**

(1) *Úřední věstník Evropských společenství* L 383 A, 26–47 (1992).

(2) Ambrose, D. (1975). Experimental Thermodynamics, Vol. II, Le Neindre, B., Vodar, B., (*eds*.), Butterworths, London.

(3) Weissberger R., (*ed*.) (1959). Technique of Organic Chemistry, Physical Methods of Organic Chemistry, 3rd ed., Vol. I, Part I. Chapter IX, Interscience Publ., New York.

(4) Glasstone, S. (1946). Textbook of Physical Chemistry, 2nd ed., Van Nostrand Company, New York.

(5) NF T 20–048 AFNOR (September 1985). Chemical products for industrial use – Determination of vapour pressure of solids and liquids within a range from 10^{-1} to 10^{5} Pa – Static method.

(6) ASTM D 2879–86, Standard test method for vapour pressure – temperature relationship and initial decomposition temperature of liquids by isoteniscope.

(7) NF T 20–047 AFNOR (September 1985). Chemical products for industrial use – Determination of vapour pressure of solids and liquids within range from 10^{-3} to 1 Pa – Vapour pressure balance method.

▼**M1**

(8) Knudsen, M. (1909). *Ann. Phys. Lpz*., 29, 1979; (1911), 34, 593.

(9) Ambrose, D., Lawrenson, I.J., Sprake, C.H.S. (1975). *J. Chem. Thermodynamics* 7, 1173.

(10) Schmuckler, M.E., Barefoot, A.C., Kleier, D.A., Cobranchi, D.P. (2000), Vapor pressures of sulfonylurea herbicides; *Pest Management Science* 56, 521–532.

(11) Tomlin, C.D.S. (*ed*.), The Pesticide Manual, Twelfth Edition (2000).

(12) Friedrich, K., Stammbach, K., Gas chromatographic determination of small vapour pressures determination of the vapour pressures of some triazine herbicides. *J. Chromatog*. 16 (1964), 22–28.

(13) Grayson, B.T., Fosbraey, L.A., *Pesticide Science* 16 (1982), 269–278.

(14) Rordorf, B.F., Prediction of vapor pressures, boiling points and enthalpies of fusion for twenty-nine halogenated dibenzo-p-dioxins, *Thermochimia Acta* 112 Issue 1 (1987), 117–122.

(15) Gückel, W., Synnatschke, G., Ritttig, R., A Method for Determining the Volatility of Active Ingredients Used in Plant Protection; *Pesticide Science* 4 (1973) 137–147.

(16) Gückel, W., Synnatschke, G., Ritttig, R., A Method for Determining the Volatility of Active Ingredients Used in Plant Protection II. Application to Formulated Products; *Pesticide Science* 5 (1974) 393–400.

(17) Gückel, W., Kaestel, R., Lewerenz, J., Synnatschke, G., A Method for Determining the Volatility of Active Ingredients Used in Plant Protection. Part III: The Temperature Relationship between Vapour Pressure and Evaporation Rate; *Pesticide Science* 13 (1982) 161–168.

(18) Gückel, W., Kaestel, R., Kroehl, T., Parg, A., Methods for Determining the Vapour Pressure of Active Ingredients Used in Crop Protection. Part IV: An Improved Thermogravimetric Determination Based on Evaporation Rate; *Pesticide Science* 45 (1995) 27–31.

(19) Kroehl, T., Kaestel, R., Koenig, W., Ziegler, H., Koehle, H., Parg, A., Methods for Determining the Vapour Pressure of Active Ingredients Used in Crop Protection. Part V: Thermogravimetry Combined with Solid Phase MicroExtraction (SPME); *Pesticide Science*, 53 (1998) 300–310.

(20) Tesconi, M., Yalkowsky, S.H., A Novel Thermogravimetric Method for Estimating the Saturated Vapor Pressure of Low-Volatility Compounds; *Journal of Pharmaceutical Science* 87(12) (1998) 1512–20.

(21) Lide, D.R. (*ed*.), CRC Handbook of Chemistry and Physics, 81th ed.(2000), Vapour Pressure in the Range – 25 °C to 150 °C.

(22) Meister, R.T. (*ed*.), Farm Chemicals Handbook, Vol. 88 (2002).

(23) 40 CFR, 796. (1993). s. 148–153, Office of the Federal Register, Washington DC.

▼**M1**

(24) Rordorf B.F. (1985). *Thermochimica Acta* 85, 435.

(25) Westcott *et al*. (1981). *Environ. Sci. Technol*. 15, 1375.

(26) Messer G., Röhl, P., Grosse G., Jitschin W. (1987). *J. Vac. Sci. Technol*. (A), 5(4), 2440.

(27) Comsa G., Fremerey J.K., Lindenau, B. (1980). *J. Vac. Sci. Technol*. 17(2), 642.

(28) Fremerey, J.K. (1985). *J. Vac. Sci. Technol*. (A), 3(3), 1715.

▼M1

Dodatek

Metoda odhadu

ÚVOD

Odhadnuté hodnoty tlaku par lze využít:

— k rozhodnutí, která z experimentálních metod je vhodná,

— k provedení odhadu nebo ke stanovení mezní hodnoty v případech, kdy nelze z technických důvodů použít experimentální metodu.

METODA ODHADU

Tlak par kapalin a pevných látek může být odhadnut pomocí modifikovaného Watsonova korelačního vztahu (a). Požaduje se pouze jeden experimentální údaj, a to teplota varu za normálního tlaku. Metoda je použitelná pro tlaky od 10^5 do 10^{-5} Pa.

Podrobné informace o metodě jsou uvedeny v příručce *Handbook of Chemical Property Estimation Methods* (b). Viz rovněž OECD Environmental Monograph No. 67 (c).

POSTUP VÝPOČTU

Tlak par se vypočte podle vzorce:

$$\ln P_{vp} \approx \frac{\Delta H_{vb}}{\Delta Z_b R T_b}\left[1 - \frac{\left(3 - 2\frac{T}{T_b}\right)^m}{\frac{T}{T_b}} - 2m\left(3 - 2\frac{T}{T_b}\right)^{m-1} \ln \frac{T}{T_b}\right]$$

kde:

T = teplota, pro kterou je tlak par vypočítáván,

T_b = teplota varu při normálním tlaku,

P_{vp} = tlak par při teplotě T,

ΔH_{vb} = výparné teplo,

ΔZ_b = faktor stlačitelnosti (použije se hodnota 0,97),

m = empirický faktor, jehož hodnota závisí na fyzikálním stavu při teplotě, pro níž je prováděn výpočet.

Dále

$$\frac{\Delta H_{vb}}{T_b} = K_F\ (8{,}75 + R \ln T_b)$$

kde K_F je empirický součinitel zohledňující polaritu látky. V příručce (b) jsou uvedeny hodnoty faktoru K_F pro několik typů sloučenin.

▼**M1**

Velmi často jsou k dispozici data o teplotě varu při sníženém tlaku. V takovém případě se tlak par vypočte podle tohoto vztahu:

$$\ln P_{vp} \approx \ln P_1 + \frac{\Delta H_{v1}}{\Delta Z_b R T_1}\left[1 - \left(3 - 2\,\frac{T}{T_1}\right)^m \frac{T_1}{T} - 2\,m\left(3 - 2\,\frac{T}{T_1}\right)^{m-1} \ln\frac{T}{T_1}\right]$$

kde T_1 je teplota varu při sníženém tlaku P_1.

ZPRÁVA

Je-li použita metoda odhadu, musí zpráva obsahovat úplný postup výpočtu.

LITERATURA

(a) Watson, K.M. (1943). Ind. Eng. Chem., 35, 398.

(b) Lyman, W.J., Reehl, W.F., Rosenblatt, D.H. (1982). Handbook of Chemical Property Estimation Methods, McGraw-Hill.

(c) OECD Environmental Monograph No. 67. Application of Structure-Activity Relationships to the Estimation of Properties Important in Exposure Assessment (1993).

▼B

A.5 POVRCHOVÉ NAPĚTÍ

1. METODA

Popsané metody jsou založeny na Pokynech OECD pro zkoušení (1). Základní principy jsou uvedeny v literatuře (2).

1.1 ÚVOD

Popsané metody jsou určeny pro měření povrchového napětí vodných roztoků.

Před provedením těchto zkoušek je vhodné mít k dispozici předběžné informace o rozpustnosti látky ve vodě, o její struktuře, o hydrolýze a o kritické koncentraci pro tvorbu micel.

Níže uvedené metody jsou použitelné pro většinu chemických látek bez omezení z hlediska stupně jejich čistoty.

Měření povrchového napětí metodou prstencového tenziometru je omezeno na vodné roztoky s dynamickou viskozitou nižší než přibližně 200 mPa/s.

1.2 DEFINICE A JEDNOTKY

Povrchová volná enthalpie vztažená na jednotku povrchu se nazývá povrchové napětí.

Povrchové napětí se vyjadřuje těchto jednotkách:

N/m (v soustavě SI) nebo

mN/m (odvozená jednotka v soustavě SI)

1 N/m= 103 dyn/cm

1 mN/m = 1 dyn/cm ve staré soustavě CGS

1.3 REFERENČNÍ LÁTKY

Při vyšetřování nové látky není nutné vždy používat referenční látky. Měly by v první řadě sloužit k občasné kontrole provedení metody a ke vzájemnému porovnávání výsledků získaných jinými metodami.

Referenční látky, které pokrývají široké rozpětí hodnot povrchového napětí, jsou uvedeny v literatuře (1, 3).

1.4 PODSTATA METOD

Metody jsou založeny na měření největší síly, kterou je nutné působit ve svislém směru na třmínek nebo prstenec, který se dotýká povrchu zkoumané kapaliny umístěné v měřicí nádobě, aby se od tohoto povrchu oddělil, nebo na destičku, která se svým okrajem dotýká povrchu, aby se vzniklý film vytáhl nahoru.

Látky, jejichž rozpustnost ve vodě dosahuje hodnoty alespoň 1 mg/1, se zkoušejí ve vodných roztocích při jedné koncentraci.

1.5 KRITERIA JAKOSTI

Přesnost těchto metod je pravděpodobně vyšší, než je požadováno pro účely hodnocení stavu životního prostředí.

▼B

1.6 POPIS METOD

Připraví se roztok látky v destilované vodě. Koncentrace roztoku by měla být 90 % koncentrace nasyceného roztoku látky ve vodě; pokud tato koncentrace přesáhne 1 g/l, použije se k měření roztok o koncentraci 1 g/l. Látky, jejichž rozpustnost je menší než 1 mg/l, není nutné zkoušet.

1.6.1 **Destičková metoda**

Viz ISO 304 a NF T 73060 (Surface active agents – determination of surface tension by drawing up liquid films).

1.6.2 **Třmínková metoda**

Viz ISO 304 a NF T 73060 (Surface active agents – determination of surface tension by drawing up liquid films).

1.6.3 **Prstencová metoda**

Viz ISO 304 a NF T 73060 (Surface active agents – determination of surface tension by drawing up liquid films).

1.6.4 **Harmonizovaná prstencová metoda OECD**

1.6.4.1. *Aparatura*

Pro toto měření jsou vhodné komerční tenziometry. Skládají se z těchto částí:

— pohyblivý stolek pro vzorek,

— systém měření síly,

— měřicí tělísko,

— měřicí nádoba.

1.6.4.1.1 Pohyblivý stolek pro vzorek

Pohyblivý stolek pro vzorek slouží jako podložka pro termostatovanou měřicí nádobu, ve které je kapalina, která má být zkoušena. Spolu se systémem měření síly je upevněn na stojanu.

1.6.4.1.2 Systém měření síly

Systém měření síly je umístěn nad stolkem pro vzorek (viz obrázek). Chyba měření síly nemá překročit ± 10^{-6} N, což odpovídá chybě ± 0,1 mg při měřeni hmotnosti. Ve většině případů je měřicí stupnice komerčních tenziometrů dělena v mN/m, takže je možné povrchové napětí odečítat přímo v mN/m s přesností na 0,1 mN/m.

▼B

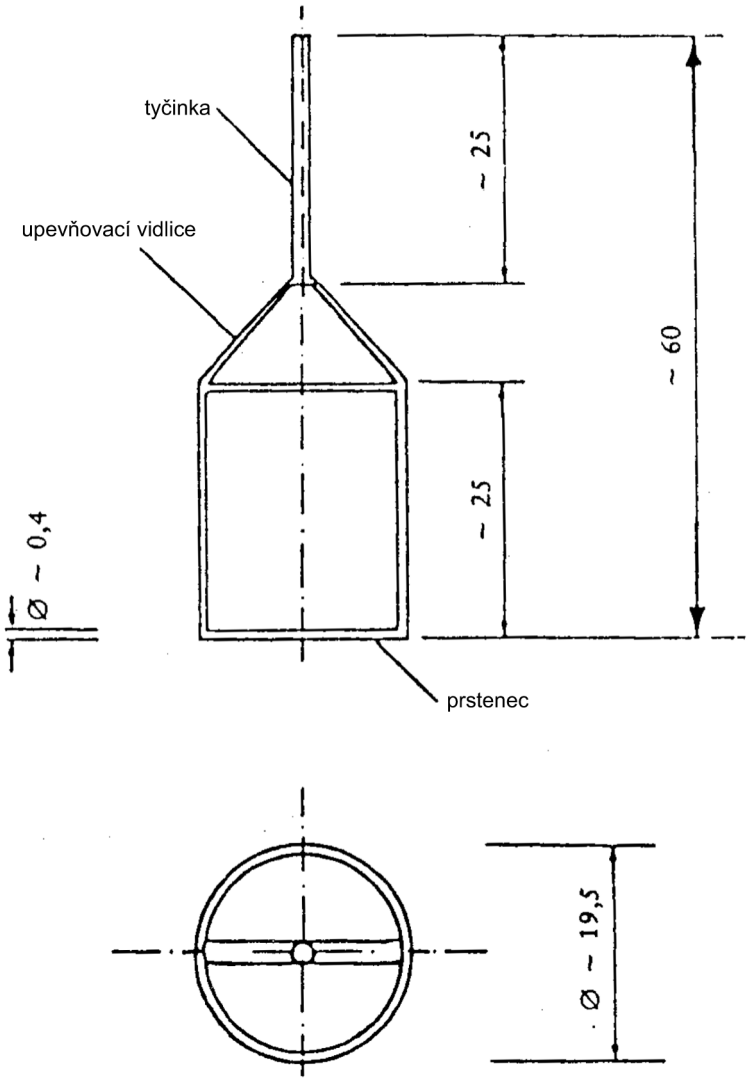
1.6.4.1.3 Měřicí tělísko (prstenec)

Prstenec je obvykle zhotoven z platino-iridiového drátu o průměru asi 0,4 mm a středním obvodu 60 mm. Prstenec z drátu je zavěšen vodorovně na upevňovací vidlici z drátu a na kovové tyčince, která tvoří spojení k systému měření síly (viz obrázek).

Obrázek

Měřicí tělísko

(všechny rozměry jsou uvedeny v milimetrech)



1.6.4.1.4 Měřicí nádoba

Měřicí nádobou pro zkušební roztok je termostatovaná skleněná nádoba. Má být konstruována tak, aby teplota zkoumané kapaliny i plynné fáze nad jejím povrchem zůstala během měření konstantní a aby se vzorek nemohl odpařovat. Vhodná je válcová skleněná nádoba o vnitřním průměru nejméně 45 mm.

▼B

1.6.4.2 *Příprava aparatury*

1.6.4.2.1 Čištění

Skleněné nádoby je třeba pečlivě vyčistit. Pokud je to nutné, měly by se vymýt horkou kyselinou chromsírovou a následně koncentrovanou kyselinou fosforečnou (83 až 98 % hmot. H_3PO_4), pečlivě vypláchnout tekoucí vodou a nakonec omýt redestilovanou vodou do neutrální reakce a následně vysušit nebo vypláchnout vzorkem kapaliny, která má být měřena.

Prstenec je třeba nejprve pečlivě umýt vodou, aby se odstranily všechny látky rozpustné ve vodě. Poté se krátce ponoří do kyseliny chromsírové, opláchne se v redestilované vodě do neutrální reakce a nakonec se krátce ohřeje nad methanolovým plamenem.

Poznámka:

Znečištění látkami, které se nerozpouštějí ani nerozkládají kyselinou chromsírovou ani kyselinou fosforečnou, jako například silikony, je nutné odstraňovat vhodnými organickými rozpouštědly.

1.6.4.2.2 Kalibrování aparatury

Validace aparatury spočívá v ověření nuly a v nastavení přístroje tak, aby jeho data umožňovala spolehlivé stanovení v mN/m.

Poloha:

Přístroj musí být nastaven do vodorovné polohy, např. pomocí libely položené na základovou desku tenziometru a nastavením stavěcích šroubů základnové desky.

Nastavení nuly:

Po upevnění prstence na aparatuře a před ponořením do kapaliny je třeba nastavit nulu ukazatele tenziometru a zkontrolovat rovnoběžnost prstence s hladinou kapaliny. K tomu je možné použít hladiny kapaliny jako zrcadla.

Kalibrace:

Vlastní kalibraci před měřením je možné provést dvěma postupy:

a) Použitím závaží: při tomto postupu se použijí jezdce o známé hmotnosti od 0,1 g do 1,0 g, které se umístí na prstenec. Kalibrační faktor Φ_a, kterým je třeba násobit všechny hodnoty odečtené na přístroji, je možné určit podle rovnice (1):

$$\Phi_a = \frac{\sigma_r}{\sigma_a} \qquad (1)$$

kde:

$$\sigma_r = \frac{mg}{2b} (mN/m)$$

m = hmotnost jezdce (g),

g = tíhové zrychlení (981 cm s^{-2} na úrovni hladiny moře),

b = střední obvod prstence (cm)

σ_a = odečtená hodnota na tenziometru po umístění jezdců na prstenec (mN/m).

▼B

b) Použitím vody: při tomto postupu se použije čistá voda, jejíž povrchové napětí má při 23 °C hodnotu 72,3 mN/m. Tento postup lze provést rychleji než kalibraci se závažími, ale existuje vždy nebezpečí, že povrchové napětí vody je zkresleno stopovým znečištěním povrchově aktivními látkami.

Kalibrační faktor Φ_b, kterým je třeba násobit všechny hodnoty odečtené na přístroji, je možné určit podle rovnice (2):

$$\Phi_b = \frac{\sigma_o}{\sigma_g} \qquad (2)$$

kde:

σ_o = hodnota povrchového napětí vody uvedená v literatuře (mN/m),

σ_g = naměřená hodnota povrchového napětí vody (mN/m), obě při stejné teplotě.

1.6.4.3 *Příprava vzorků*

Připraví se vodné roztoky zkoušených látek o požadované koncentraci, které nesmějí obsahovat nerozpuštěné složky.

Roztoky musí být udržovány při konstantní teplotě (± 0,5°C). Protože se povrchové napětí roztoku v měřicí nádobě v čase mění, provedou se měření v různých časech a sestrojí se křivka závislosti povrchového napětí na čase. Nedochází-li k žádným dalším změnám, bylo dosaženo rovnovážného stavu.

Měření je ovlivňováno znečištěním prachem nebo plynnými látkami. Práce musí být tedy prováděny pod ochranným krytem.

1.6.5 **Zkušební podmínky**

Měření se provádí přibližně při 20 °C a udržuje se tolerance ± 0,5°C.

1.6.6 **Postup zkoušky**

Roztoky, které mají být měřeny, se převedou do pečlivě vyčištěné měřicí nádoby, přičemž je třeba dbát na to, aby nedošlo k pěnění, a nádoba se poté postaví na stolek zkušební aparatury. Horní část stolku s měřicí nádobou se vysune tak vysoko, aby se prstenec ponořil pod povrch roztoku, který má být měřen. Horní část stolku se následně postupně a rovnoměrně sníží (rychlostí přibližně 0,5 cm/min), aby došlo k oddělení prstence od povrchu, a to až do dosažení maximální hodnoty síly. Film kapaliny lpící na prstenci se od něho nesmí odtrhnout. Po ukončení měření se prstenec opět ponoří pod povrch a postup se opakuje až do dosažení konstantní hodnoty povrchového napětí. Při každém stanovení se začne zaznamenávat čas v okamžiku plnění roztoku do měřicí nádoby. Odečty se provedou vždy v okamžiku, kdy je dosaženo maximální síly nutné pro oddělení prstence od povrchu kapaliny.

▼B

2. **DATA**

Za účelem výpočtu povrchového napětí se hodnota odečtená na přístroji v mN/m nejprve vynásobí kalibračním faktorem Φ_a nebo Φ_b (podle použitého postupu kalibrace). Získá se tak hodnota, která však platí pouze přibližně, a vyžaduje proto korekci.

Harkins a Jordan (4) empiricky stanovili korekční faktory pro hodnoty povrchového napětí měřeného prstencovou metodou, které závisí na rozměrech prstence, hustotě kapaliny a jejím povrchovém napětí.

Vzhledem k tomu, že je zdlouhavé stanovovat pro každé jednotlivé měření korekční faktor z tabulek Harkinse a Jordana, lze pro výpočet povrchového napětí vodných roztoků použít zjednodušenou metodu, která spočívá v odečtu korigovaných hodnot povrchového napětí přímo z tabulky. (Pro odečtené hodnoty, které leží mezi hodnotami uvedenými v tabulce, se provede interpolace.)

Tabulka

Korekce naměřených hodnot povrchového napětí

Pouze pro vodné roztoky $\rho = 1\ g/cm^3$

r	= 9,55 mm (střední poloměr prstence)
r	= 0,185 mm (poloměr drátu prstence)

Experimentální hodnota (mN/m)	Korigovaná hodnota (mN/m)	
	Kalibrace závažími (viz 1.6.4.2.2 písm. a))	Kalibrace vodou (viz 1.6.4.2.2 písm. b))
20	16,9	18,1
22	18,7	20,1
24	20,6	22,1
26	22,4	24,1
28	24,3	26,1
30	26,2	28,1
32	28,1	30,1
34	29,9	32,1
36	31,8	34,1
38	33,7	36,1
40	35,6	38,2
42	37,6	40,5
	39,5	42,3
46	41,4	44,4
48	43,4	46,5
50	45,3	48,6
52	47,3	50,7
54	49,3	52,8
56	51,2	54,9

▼B

Experimentální hodnota (mN/m)	Korigovaná hodnota (mN/m)	
	Kalibrace závažími (viz 1.6.4.2.2 písm. a))	Kalibrace vodou (viz 1.6.4.2.2 písm. b))
58	53,2	57
60	55,2	59,1
62	57,2	61,3
64	59,2	63,4
66	61,2	65,5
68	63,2	67,7
70	65,2	69,9
72	67,2	72
74	69,2	—
76	71,2	—
78	73,2	—

Tabulka byla sestavena na základě korekcí podle Harkinse a Jordana. Je obdobou tabulky podle normy DIN 53914 pro vodu a vodné roztoky (hustota p = 1 g/cm^3); platí pro běžný komerční prstenec o rozměrech R = 9,55 mm (střední poloměr prstence) a r = 0,185 mm (poloměr drátu prstence). Tabulka udává korigované hodnoty pro měření povrchového napětí získané po kalibraci závažími nebo vodou.

Jiným řešením je vypočítat povrchové bez předchozí kalibrace podle rovnice:

$$\sigma = \frac{fxF}{4\pi R}$$

kde:

F = síla udaná měřicím systémem při oddělení filmu,

R = poloměr prstence,

f = korekční faktor (1).

3. **ZPRÁVY**

3.1 PROTOKOL O ZKOUŠCE

Protokol o zkoušce má pokud možno obsahovat tyto údaje:

— použitá metoda,

— druh vody nebo použitého roztoku,

— přesná specifikace látky (identifikace a nečistoty),

— výsledky měření: povrchové napětí (odečtené hodnoty) s uvedením jednotlivých odečtených hodnot a jejich aritmetického průměru a rovněž korigované střední hodnoty (přičemž se bere v úvahu kalibrační faktor a tabulka korekcí),

▼B

— koncentrace roztoku,

— zkušební teplota,

— stáří použitého roztoku, zejména časový odstup mezi přípravou roztoku a měřením,

— znázornění časové závislosti povrchového napětí po převedení roztoku do měřicí nádoby,

— uvedou se všechny informace a poznámky, které jsou důležité pro interpretaci výsledků, zejména pokud jde o nečistoty a fyzikální stav látky.

3.2 INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

Vzhledem k tomu, že povrchové napětí vody je 72,75 mN/m při 20 °C, měly by být látky vykazující za podmínek této metody povrchové napětí menší než 60 mN/m považovány za povrchově aktivní materiály.

4. **LITERATURA**

1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 115, rozhodnutí Rady C(81) 30 v konečném znění.

2) R. Weissberger ed.: Technique of Organic Chemistry, Physical Methods of Organic Chemistry, 3rd ed., Interscience Publ., New York, 1959, Vol. I, Part I, Chapter XIV.

3) Pure Appl. Chem., 1976, vol. 48, 511.

4) Harkins, W.D., Jordan, H.F., J. Amer. Chem. Soc, 1930, vol. 52, 1751.

▼M4

A.6 ROZPUSTNOST VE VODĚ

ÚVOD

1. Tato zkušební metoda odpovídá Pokynům OECD pro zkoušení (TG) 105 (1995). Tato zkušební metoda je revidovanou verzí původních pokynů TG 105, které byly přijaty v roce 1981. Současná verze se obsahově od verze z roku 1981 neliší. Změnil se převážně formát textu. Revize vycházela ze zkušební metody EU „Rozpustnost ve vodě“ ([1]).

VÝCHOZÍ ÚVAHY

2. Rozpustnost látky ve vodě může být značně ovlivněna přítomností nečistot. Tato zkušební metoda se zabývá stanovením rozpustnosti ve vodě u víceméně čistých látek, které jsou stabilní ve vodě a nejsou těkavé. Před stanovením rozpustnosti ve vodě je vhodné mít k dispozici předběžné informace o zkoušené chemické látce, například o strukturním vzorci, tlaku par, disociační konstantě a hydrolýze jako funkci pH.

3. V této zkušební metodě jsou popsány dvě metody, a sice sloupcová eluční metoda pro rozpustnost nižší než 10^{-2} g/l a baňková metoda pro rozpustnost vyšší. Rovněž je zde popsána jednoduchá předběžná zkouška. Ta umožňuje přibližně stanovit vhodné množství vzorku, který se má použít v konečné zkoušce, a rovněž dobu nezbytnou k dosažení saturace.

DEFINICE A JEDNOTKY

4. Rozpustnost látky ve vodě je veličina udávající hmotnostní koncentraci jejího nasyceného vodného roztoku při dané teplotě.

5. Rozpustnost ve vodě se vyjadřuje jako hmotnost rozpuštěné látky v objemu roztoku. Jednotkou v soustavě SI je kg/m^3, ale může se používat také g/l.

REFERENČNÍ CHEMICKÉ LÁTKY

6. Při vyšetřování zkoušené chemické látky není nutné používat referenční chemické látky.

POPIS METOD

Zkušební podmínky

7. Zkouška se provádí optimálně při teplotě 20 ± 0,5 °C. Zvolenou teplotu je třeba udržovat ve všech důležitých částech aparatury konstantní.

Předběžná zkouška

8. Ke vzorku o hmotnosti přibližně 0,1 g (pevné zkoušené chemické látky musí být v práškové formě) umístěnému do odměrného válce o objemu 10 ml uzavíratelného skleněnou zátkou se při laboratorní teplotě přidávají po krocích neustále narůstající objemy vody. Po každém přidání dílčího objemu vody se směsí intenzivně třepe po dobu 10 minut a vizuálně se kontroluje obsah nerozpuštěných částic vzorku. Zůstanou-li vzorek nebo jeho část po přidání 10 ml vody nerozpuštěny, pokračuje se v experimentu v odměrném válci o objemu 100 ml. Přibližná rozpustnost je uvedena v tabulce 1 pod objemem vody potřebným k úplnému rozpuštění vzorku. Je-li rozpustnost

▼M4

nízká, může být doba potřebná k rozpuštění zkoušené chemické látky dlouhá a je třeba vyčkat alespoň 24 hodin. Není-li zkoušená chemická látka ani po 24 hodinách rozpuštěna, je třeba vyčkat delší dobu (až 96 hodin) nebo se pokusit o další ředění, aby se zjistilo, zda by se měla použít sloupcová eluční metoda nebo baňková metoda.

Tabulka 1

ml vody na 0,1 g rozpouštěné látky	0,1	0,5	1	2	10	100	> 100
přibližná rozpustnost v g/l	> 1 000	1 000–200	200–100	100–50	50–10	10–1	< 1

Sloupcová eluční metoda

Podstata

9. Tato metoda je založena na vymývání zkoušené chemické látky vodou z mikrokolony naplněné inertním nosičem pokrytým přebytkem zkoušené chemické látky (2). Rozpustnost ve vodě udává hmotnostní koncentrace eluátu poté, co dosáhla rovnovážného nasycení v závislosti na čase.

Aparatura

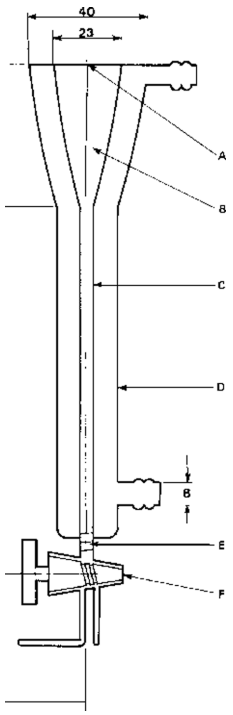
10. Aparatura se skládá z mikrokolony (obrázek 1) udržované při konstantní teplotě. Je připojena buď k oběhovému čerpadlu (obrázek 2) nebo k vyrovnávací nádobě (obrázek 3). Mikrokolona obsahuje inertní nosič, který je fixován na místě pomocí malého smotku skelné vaty, který současně slouží k odfiltrování částeček. Materiály, které lze použít jako nosič, jsou skleněné kuličky, infuzoriová hlinka nebo jiné inertní materiály.

11. Mikrokolona na obrázku 1 je vhodná pro konfiguraci s oběhovým čerpadlem. Prostor hlavy této mikrokolony pojme pět objemů sloupce (které se na začátku pokusu vypustí) a objem pěti vzorků (které se během experimentu odebírají k analýze). Velikost hlavy kolony může být menší, pokud lze během experimentu přidávat do systému vodu k nahrazení původních pěti objemů sloupce eluovaných s nečistotami. Kolona je připojena hadičkami z inertního materiálu k oběhovému čerpadlu, které je schopno zajistit průtok asi 25 ml/h. Oběhovým čerpadlem může být například peristaltické nebo membránové čerpadlo. Je třeba dbát na to, aby nedošlo ke kontaminaci materiálu hadičky a/nebo adsorpci na něj.

12. Obrázek 3 ukazuje schematické uspořádání při použití vyrovnávací nádoby. V tomto uspořádání je mikrokolona vybavena jednocestným uzavíracím kohoutem. Spojení s vyrovnávací nádobou se skládá ze zabroušeného skleněného spoje a hadičky z inertního materiálu. Průtoková rychlost z vyrovnávací nádoby by měla být přibližně 25 ml/h.

▼**M4**

Obrázek 1



Rozměry v mm

A. připojení pro skleněný zabroušený spoj

B. hlava kolony

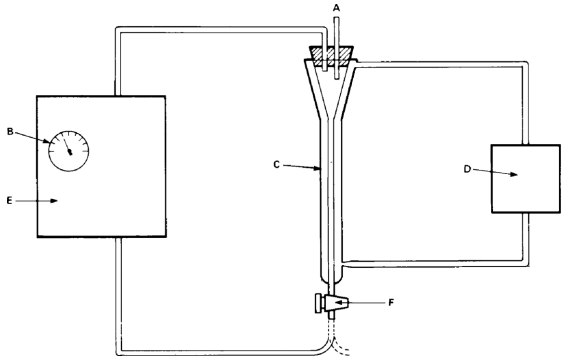
C. vnitřní průměr 5

D. vnější průměr 19

E. smotek skelné vaty

F. uzavírací kohout

Obrázek 2



A. vyrovnání atmosférického tlaku

B. průtokoměr

C. mikrokolona

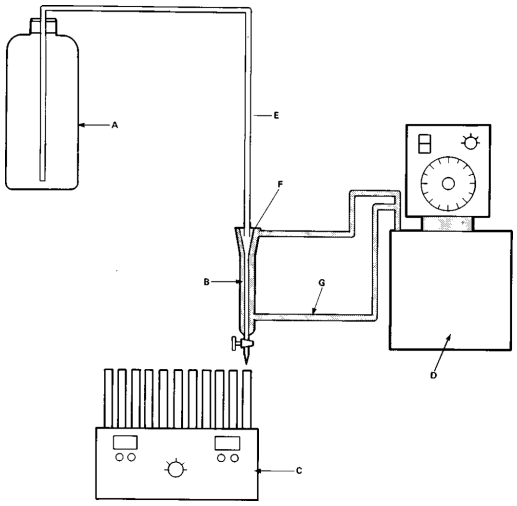
D. termostatované čerpadlo

E. oběhové čerpadlo

F. dvoucestný kohout pro odběr vzorků

▼M4

Obrázek 3



A. Vyrovnávací nádoba (např. chemická baňka o objemu 2,5 l)

B. Kolona

C. Sběrač frakcí

D. Termostat

E. Teflonová hadička

F. Skleněný zabroušený spoj

G. Hadice na vodu (mezi termostatem a kolonou, s vnitřním průměrem asi 8 mm)

13. Přibližně 600 mg nosiče se převede do 50 ml baňky s kulatým dnem. Vhodné množství zkoušené chemické látky se rozpustí v těkavém rozpouštědle o jakosti analytického činidla a příslušné množství tohoto roztoku se přidá k nosiči. Rozpouštědlo se zcela odpaří, např. za použití rotační odparky, jinak se nedosáhne úplného nasycení nosiče vodou během elučního kroku v důsledku rozdělování na povrchu nosiče. Nosič s nanesenou látkou se nechá dvě hodiny bobtnat v asi 5 ml vody a poté se suspenze nalije do mikrokolony. Je také možné naplnit mikrokolonu, která byla předtím naplněna vodou, suchým nosičem s nanesenou látkou a poté nechat během dvou hodin ustavit rovnováhu.

14. Nanášení zkoušené chemické látky na nosič může způsobit problémy a vést k chybným výsledkům, např. usazuje-li se zkoušená chemická látka jako olej. Tyto problémy by se měly prozkoumat a zaznamenat příslušné podrobné údaje.

Postup s použitím oběhového čerpadla

15. Zahájí se vymývání kolony. Doporučená rychlost průtoku je asi 25 ml/h, což odpovídá u popsané kolony desetinásobku objemu sloupce za hodinu. Nejméně prvních pět objemů sloupce obsahujících nečistoty rozpustné ve vodě se odstraní. Poté se nechá běžet oběhové čerpadlo až do ustavení rovnováhy, které je dosaženo, neliší-li se koncentrace pěti po sobě následujících vzorků při náhodném výběru o více než ± 30 %, přičemž rozdíly jsou nepravidelné. Tyto vzorky by se měly odebírat v intervalech, během kterých kolonou projde nejméně desetinásobek objemu sloupce. V závislosti na použité analytické metodě může být vhodnější stanovit křivku závislosti koncentrace na čase, aby se prokázalo dosažení rovnováhy.

▼M4

Postup s použitím vyrovnávací nádoby

16. Po sobě následující podíly eluátu se shromažďují a jejich koncentrace se analyzují zvolenou metodou. Pro stanovení rozpustnosti se použijí prostřední frakce eluátu, ve kterých zůstávají koncentrace nejméně v pěti po sobě jdoucích frakcích konstantní v rozmezí ± 30 %.

17. Nejvhodnějším eluentem je dvakrát destilovaná voda. Rovněž lze použít deionizovanou vodu s odporem vyšším než 10 MΩ/cm a s celkovým obsahem organického uhlíku nižším než 0,01 %.

18. V obou postupech se druhé promytí provede při poloviční průtokové rychlosti. Shodují-li se výsledky obou pokusů, považuje se výsledek zkoušky za uspokojivý. Je-li naměřená rozpustnost při nižší průtokové rychlosti vyšší, je nutno pokračovat ve snižování průtoku vždy na polovinu tak dlouho, dokud dvě po sobě následující měření nepovedou k stejné hodnotě rozpustnosti.

19. V obou postupech by se měly frakce otestovat na přítomnost koloidních částic zkouškou Tyndallova jevu. Při přítomnosti částic je výsledek zkoušky neplatný a zkouška by se měla zopakovat po zlepšení filtrační funkce kolony.

20. Mělo by se změřit pH každého vzorku, pokud možno pomocí speciálních indikátorových papírků.

Baňková metoda

Podstata

21. Zkoušená chemická látka (pevné látky musí být ve formě prášku) se rozpustí ve vodě při teplotě, která je o něco vyšší než teplota měření. Po dosažení nasycení se směs ochladí a udržuje se při zkušební teplotě. Jinou možností je provést měření přímo při zkušební teplotě, pokud je vhodným vzorkováním prokázáno, že je dosaženo saturační rovnováhy. Hmotnostní koncentrace zkoušené chemické látky ve vodném roztoku, který nesmí obsahovat žádné nerozpuštěné částice, se následně stanoví vhodnou analytickou metodou (3).

Aparatura

22. Je třeba toto vybavení:

— běžné laboratorní skleněné nádoby a pomůcky,

— zařízení pro třepání roztoků při regulované konstantní teplotě,

— odstředivka (nejlépe termostatovaná), je-li nutná v případě emulzí a

— analytické vybavení.

Postup

23. Množství zkoušené chemické látky potřebné pro nasycení požadovaného objemu vody se odhadne na základě předběžné zkoušky. Do každé ze tří skleněných nádobek opatřených skleněnými zátkami (např. centrifugačních kyvet, baněk) se naváží asi pětinásobek tohoto množství. Dále se do každé z nádobek přidá množství vody zvolené v závislosti na analytické metodě a rozmezí rozpustnosti. Nádobky se těsně uzavřou a poté se jimi třepe při 30 °C. K tomuto účelu by se měla použít třepačka nebo míchačka pracující při konstantní teplotě, např. magnetické míchání v termostatované vodní lázni. Po jednom dni se jedna z nádobek uvede během 24 hodin při zkušební teplotě za občasného protřepání do rovnováhy. Poté se obsah nádobky odstředí při zkušební teplotě a v čiré vodné fázi se vhodnou analytickou metodou stanoví koncentrace zkoušené chemické látky. Po dvou, resp. třech dnech se zbylé dvě baňky po počátečním ustavení rovnováhy při 30 °C zpracují podobným způsobem. Pokud se koncentrace naměřené v nejméně dvou posledních nádobkách neliší o více než 15 %, považuje se výsledek

▼M4

zkoušky za uspokojivý. Pokud hodnoty koncentrací pro nádobky 1, 2 a 3 vykazují stoupající tendenci, mělo by se celé stanovení zopakovat s prodloužením doby pro ustavení rovnováhy.

24. Zkoušku lze provést i bez předběžné inkubace při 30 °C. Aby se zjistila rychlost ustavení saturační rovnováhy, odebírají se vzorky do té doby, dokud doba míchání ovlivňuje měřené koncentrace.

25. Mělo by se změřit pH každého vzorku, pokud možno pomocí speciálních indikátorových papírků.

Analytické stanovení

26. Upřednostňuje se metoda specifická pro danou látku, protože malá množství rozpuštěných nečistot mohou způsobit velké chyby při stanovení rozpustnosti ve vodě. Příklady takových metod jsou plynová nebo kapalinová chromatografie, titrace, fotometrie, voltametrie.

ÚDAJE A JEJICH PŘEDKLÁDÁNÍ

Údaje

Sloupcová eluční metoda

27. Pro každý pokus by se měla vypočítat střední hodnota a směrodatná odchylka z nejméně pěti po sobě následujících vzorků vybraných z oblasti po dosažení rovnovážného nasycení. Střední hodnoty získané ze dvou měření při různých průtokových rychlostech by se neměly lišit o více než 30 %.

Baňková metoda

28. Zprůměrují se jednotlivé výsledky pro každou ze tří baněk, které by se neměly lišit o více než 15 %.

Protokol o zkoušce

Sloupcová eluční metoda

29. Protokol o zkoušce musí obsahovat tyto údaje:

— výsledky předběžné zkoušky,

— chemickou identitu látky a nečistoty (předběžný purifikační krok, pokud se použije),

— koncentrace, průtokové rychlosti a pH každého vzorku,

— střední hodnoty a směrodatné odchylky nejméně pro pět vzorků z rovnovážné oblasti křivky nasycení z každého pokusu,

— průměrnou hodnotu nejméně dvou po sobě jdoucích měření,

— teplotu vody během procesu tvorby nasyceného roztoku,

— analytickou metodu,

— druh materiálu nosiče,

— způsob nanesení zkoušené chemické látky na nosič,

— použité rozpouštědlo,

— poznatky o jakékoli chemické nestálosti látky během zkoušky,

— všechny informace, které mají význam pro interpretaci výsledků, zvláště s ohledem na nečistoty a fyzikální stav zkoušené chemické látky.

▼**M4**

Baňková metoda

30. Protokol o zkoušce musí obsahovat tyto údaje:

— výsledky předběžné zkoušky,

— chemickou identitu látky a nečistoty (předběžný purifikační krok, pokud se použije),

— výsledky jednotlivých analytických stanovení a průměrné hodnoty, pokud byla pro každou nádobku stanovena více než jedna hodnota,

— hodnotu pH každého vzorku,

— průměrnou hodnotu pro různé nádobky, jejichž výsledky jsou ve shodě,

— teplotu při zkoušce,

— analytickou metodu,

— poznatky o jakékoli chemické nestálosti látky během zkoušky,

— všechny informace, které mají význam pro interpretaci výsledků, zvláště s ohledem na nečistoty a fyzikální stav zkoušené chemické látky.

LITERATURA:

1) Směrnice Komise 92/69/EHS ze dne 31. července 1992, kterou se po sedmnácté přizpůsobuje technickému pokroku směrnice Rady 67/548/EHS o sbližování právních a správních předpisů týkajících se klasifikace, balení a označování nebezpečných látek, Úř. věst. L 383 A, 29.12.1992, s. 54.

2) NF T 20-045 (AFNOR) (September 1985). Chemical products for industrial use – Determination of water solubility of solids and liquids with low solubility – Column elution method.

3) NF T 20-046 (AFNOR) (September 1985). Chemical products for industrial use – Determination of water solubility of solids and liquids with high solubility – Flask method.

▼B

A.8 ROZDĚLOVACÍ KOEFICIENT

1. METODA

Popsaná metoda „třepací lahve“ je založena na Pokynech OECD pro zkoušení (1).

1.1. ÚVOD

Před provedením této zkoušky je vhodné mít k dispozici předběžné informace o strukturním vzorci látky, o disociační konstantě, o rozpustnosti ve vodě, o hydrolýze, o rozpustnosti v n-oktanolu a o povrchovém napětí.

U disociujících látek by měla být měření prováděna pouze s nedisociovanou formou (volná kyselina nebo volná báze), získanou při použití vhodného pufru o pH nejméně o 1 nižším (volná kyselina) nebo vyšším (volná báze) než pK.

Tato zkušební metoda zahrnuje dva samostatné postupy: metodu třepací lahve a vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii (HPLC). První metodu lze použít, leží-li hodnota log P_{ow} (definice viz níže) v rozmezí – 2 až 4, a druhou metodu, leží-li hodnota log P_{ow} v rozmezí 0 až 6. Před provedením kteréhokoli z experimentálních postupů by měl být nejdříve získán předběžný odhad rozdělovacího koeficientu.

Metoda třepací lahve je použitelná pouze pro v podstatě čisté látky, které jsou rozpustné ve vodě a v n-oktanolu. Nelze ji použít pro povrchově aktivní látky (pro které by měla být uvedena hodnota získaná výpočtem nebo odhad založený na příslušných rozpustnostech v n-oktanolu a ve vodě).

Metoda HPLC není použitelná pro silné kyseliny a zásady, komplexní sloučeniny kovů, povrchově aktivní látky a látky, které reagují s eluentem. Pro tyto látky by měla být uvedena hodnota získaná výpočtem nebo odhad založený na individuálních rozpustnostech v n-oktanolu a vodě.

Metoda HPLC je méně citlivá na přítomnost nečistot ve zkoušené látce než metoda třepací lahve. Někdy však mohou nečistoty ztížit interpretaci výsledků, protože přiřazení píků se stává nejistým. U směsí, které dávají nerozlišitelný pás, by měly být uvedeny spodní a horní mez hodnoty log P.

1.2 DEFINICE A JEDNOTKY

Rozdělovací koeficient (P) je definován jako poměr rovnovážných koncentrací (c_i) rozpuštěné látky ve dvoufázovém systému tvořeném dvěma prakticky nemísitelnými rozpouštědly. V případě n-oktanolu a vody platí:

$$p_{ow} = \frac{C_{Oktan-1-ol}}{C_{voda}}$$

Rozdělovací koeficient (P) je tedy podílem dvou koncentrací a udává se obvykle ve formě svého dekadického logaritmu (log P).

▼B

1.3 REFERENČNÍ LÁTKY

Metoda třepací lahve

Při vyšetřování nové látky není nutné vždy používat referenční látky. Měly by v první řadě sloužit k občasné kontrole provedení metody a ke vzájemnému porovnávání výsledků získaných jinými metodami.

Metoda HPLC

Za účelem korelace hodnot naměřených pro danou sloučeninu metodou HPLC s její hodnotou P je nutné sestrojit kalibrační graf závislosti log P na chromatografických datech tvořený nejméně šesti referenčními body. Vhodné referenční látky zvolí uživatel. Pokud je to možné, měla by mít alespoň jedna referenční látka P_{ow} vyšší než zkoušená látka a jiná referenční látka P_{ow} nižší než zkoušená látka. U hodnot log P nižších než 4 může být kalibrace založena na datech získaných metodou třepací lahve. U hodnot log P vyšších než 4 může být kalibrace založena na ověřených hodnotách z literatury, pokud jsou v souladu s vypočtenými hodnotami. Za účelem dosažení vyšší přesnosti je vhodnější volit látky, které mají podobnou strukturu jako zkoušená látka.

Rozsáhlé seznamy hodnot P_{ow} pro mnoho skupin chemických látek jsou dostupné v literatuře (2, 3). Nejsou-li k dispozici údaje o rozdělovacích koeficientech látek s podobnou strukturou, lze použít obecnější kalibraci s jinými referenčními látkami.

Seznam doporučených referenčních látek a jejich hodnot P_{ow} je uveden v doplňku 2..

1.4 PODSTATA METODY

1.4.1 **Metoda třepací lahve**

Pro stanovení rozdělovacího koeficientu musí být dosaženo rovnováhy mezi všemi vzájemně působícími složkami systému a musí být stanoveny koncentrace látek rozpuštěných v obou fázích. Ze studia literatury vztahující se k této otázce vyplývá, že k řešení tohoto problému lze použít několik různých postupů, např. důkladné promíchání obou fází a jejich následné oddělení za účelem stanovení rovnovážných koncentraci vyšetřované látky.

1.4.2 **Metoda HPLC**

HPLC se provádí na analytických kolonách plněných komerčně dostupnou pevnou fází obsahující dlouhé uhlovodíkové řetězce (např.. C_8, C_{18}) chemicky vázané na oxid křemičitý. Chemické látky nastříknuté do této kolony se v ní pohybují různou rychlostí v důsledku různých stupňů rozdělení mezi mobilní fázi a uhlovodíkovou stacionární fázi. Směsi chemikálií se eluují v pořadí své hydrofobnosti, přičemž se látky rozpustné ve vodě eluují jako první a látky rozpustné v olejích jako poslední, úměrně svému rozdělovacímu koeficientu uhlovodíky-voda. To umožňuje určit vztah mezi retenčním časem v této koloně (s reversními fázemi) a rozdělovacím koeficientem n-oktanol/voda. Rozdělovací koeficient se odvodí z kapacitního faktoru k, daného výrazem:

▼B

$$k = \frac{t_r - t_o}{t_o}$$

v němž, t_r = retenční čas zkoušené látky, t_o = průměrná doba, kterou molekula rozpouštědla potřebuje k průchodu kolonou (mrtvá doba).

Kvantitativní analytické metody nejsou zapotřebí, nezbytné je pouze stanovení elučních dob.

1.5 KRITERIA JAKOSTI

1.5.1 **Opakovatelnost**

Metoda třepací lahve

S cílem zaručit správnost hodnoty rozdělovacího koeficientu se provedou opakovaná stanovení při třech různých zkušebních podmínkách, přičemž lze měnit jak množství dané látky, tak poměr objemů obou rozpouštědel. Dekadické logaritmy stanovených hodnot rozdělovacího koeficientu by měly ležet v rozmezí ± 0,3.

Metoda HPLC

S cílem zvýšit důvěryhodnost měření musí být provedena opakovaná stanovení. Hodnoty log P získané z jednotlivých měření by měly ležet v rozmezí ± 0,1.

1.5.2. **Citlivost**

Metoda třepací lahve

Měřicí rozsah metody je určen mezí detekce analytické metody. Ta by měla umožnit stanovení hodnot log P_{ow} v oblasti od - 2 do 4 (pokud to podmínky dovolí, lze tuto oblast rozšířit až do hodnoty log P_{ow} do 5) není-li koncentrace rozpuštěné látky v žádné z fází vyšší než 0,01 mol/l.

Metoda HPLC

Metoda HPLC umožňuje stanovení rozdělovacích koeficientů v rozsahu log P_{ow} od 0 do 6.

Obvykle je možné určit rozdělovací koeficient dané látky s přesností ± 1 řádu vzhledem k hodnotě získané metodou třepací lahve. Typické korelace lze nalézt v literatuře (4, 5, 6, 7, 8). Vyšší přesnosti lze obvykle dosáhnout, je-li korelační závislost založena na referenčních látkách podobné struktury (9).

▼B

1.5.3 **Specifičnost**

Metoda třepací lahve

Nernstův rozdělovací zákon platí pro zředěné roztoky jen při konstantní teplotě, konstantním tlaku a pH. Platí pouze pro čistou látku rozdělenou mezi dvě čistá rozpouštědla. Je-li současně v jedné nebo obou fázích přítomno více rozpuštěných látek, může tím být výsledek ovlivněn.

Disociace nebo asociace rozpuštěných molekul vede k odchylkám od Nernstova rozdělovacího zákona. Tyto odchylky se projevují tím, že se rozdělovací koeficient stává závislým na koncentraci roztoku.

V důsledku existujících mnohonásobných rozdělovacích rovnovah by tato metoda neměla být použita bez korekcí na disociovatelné sloučeniny. Pro tyto sloučeniny by mělo být zváženo použití pufračních roztoků namísto vody; pH pufračního roztoku by se mělo lišit od pK_a látky nejméně o 1, přičemž se zohlední význam tohoto pH s ohledem na životní prostředí.

1.6 POPIS METODY

1.6.1 **Předběžný odhad rozdělovacího koeficientu**

Hodnotu rozdělovacího koeficientu lze nejlépe odhadnout na základě výpočtu (viz doplněk 1) nebo popřípadě z poměru rozpustností zkoušené látky v čistých rozpouštědlech (10).

1.6.2 **Metoda třepací lahve**

1.6.2.1 *Příprava*

n-oktanol: stanovení rozdělovacího koeficientu by mělo být provedeno s n-oktanolem čistoty p.a.

Voda: měla by být použita destilovaná voda nebo redestilovaná voda ve skleněné nebo křemenné aparatuře. V případě potřeby by měly být u disociovatelných látek použity místo vody pufrační roztoky.

Poznámka:
Neměla by být použita voda pocházející přímo z měniče iontů.

1.6.2.1.1 Předběžné nasycení rozpouštědel

Před stanovením rozdělovacího koeficientu se fáze rozpouštědlového systému vzájemně nasytí třepáním při teplotě experimentu. K dosažení tohoto cíle je vhodné 24 hodin třepat na mechanické třepačce ve dvou velkých zásobních lahvích vysoce čistý n-oktanol nebo vysoce čistou vodu, obojí s dostatečným množstvím druhého rozpouštědla, a poté nechat rozpouštědla stát tak dlouho, dokud se obě fáze neoddělí a dokud není dosaženo nasycení.

▼B

1.6.2.1.2 Příprava zkoušky

Celkový objem dvoufázového systému by měl téměř naplňovat zkušební nádobu. Tím se zamezí ztrátám látek v důsledku odpařování. Poměry objemů a množství látek, které mají být použity, jsou dány:

— předběžným odhadem rozdělovacího koeficientu (viz výše),

— minimálním množstvím zkoušené látky nezbytným pro postup analýzy a

— omezením maximální koncentrace v každé fázi na 0,01 mol/l.

Provedou se tři zkoušky. Při první se použije vypočtený poměr objemů n-oktanolu a vody; při druhé se tento poměr dělí dvěma a při třetí se tento poměr násobí dvěma (např. 1:1, 1:2, 2:1).

1.6.2.1.3 Zkoušená látka

Připraví se zásobní roztok v n-oktanolu předem nasyceném vodou. Koncentrace tohoto zásobního roztoku by měla být před jeho použitím ke stanovení rozdělovacího koeficientu přesně stanovena. Tento roztok by měl být uchováván za podmínek, které zajistí jeho stálost.

1.6.2.2 *Zkušební podmínky*

Zkušební teplota by měla být konstantní (±1 °C) a měla by ležet v rozmezí 20–25 °C.

1.6.2.3 *Postup měření*

1.6.2.3.1 Ustavení rovnováhy rozdělení

Pro každou ze zkušebních podmínek by měly být připraveny dvě zkušební nádoby obsahující potřebná přesně odměřená množství obou rozpouštědel spolu s nezbytným množstvím zásobního roztoku.

Fáze n-oktanolu je nutné odměřit objemově. Zkušební nádoby by měly být umístěny do vhodné třepačky, nebo by měly být třepány ručně. Při použití centrifugační kyvety spočívá doporučený postup v tom, že se kyveta rychle otáčí kolem své příčné osy o 180°, takže případný zachycený vzduch stoupá vzhůru oběma fázemi. Ze zkušenosti vyplývá, že k ustavení rovnovážného rozdělení obvykle stačí 50 takových otočení. Pro jistotu se doporučuje 100 otočení během pěti minut.

1.6.2.3.2 Oddělení fází

V případě potřeby lze oddělení fází provést odstředěním směsi. Odstředění by mělo být provedeno laboratorní odstředivkou udržovanou při laboratorní teplotě, nebo, je-li použita odstředivka bez regulace teploty, by měly být centrifugační kyvety za účelem ustavení rovnováhy udržovány alespoň jednu hodinu před analýzou při zkušební teplotě.

▼B

1.6.2.4 *Analýza*

Za účelem stanovení rozdělovacího koeficientu je nutné stanovit koncentrace zkoušené látky v obou fázích. To lze provést odebráním alikvotního podílu každé z obou fází z každé kyvety a pro každou zkušební podmínku a jejich analýzou zvoleným postupem. Celkové množství látky přítomné v obou fázích by mělo být vypočteno a porovnáno s původně dodaným množstvím látky.

Odběr vzorku z vodné fáze je nutné provést postupem minimalizujícím riziko znečištění stopami n-oktanolu: k odběru vzorků vodné fáze lze použít skleněnou injekční stříkačku s vyměnitelnou jehlou. Stříkačka se nejprve částečně naplní vzduchem. Vzduch se při průchodu jehly vrstvou n-oktanolu opatrně vypudí. Do stříkačky se natáhne dostatečný objem vodné fáze. Obsah stříkačky lze poté použít jako vzorek vodné fáze. Stříkačka se z roztoku rychle vytáhne a jehla se sejme. Koncentrace v obou od sebe oddělených fázích by měla být stanovena nejlépe metodou, která je specifická pro danou látku. Příklady možných vhodných analytických metod jsou:

— fotometrické metody,

— plynová chromatografie,

— vysokoúčinná kapalinová chromatografie.

1.6.3 **Metoda HPLC**

1.6.3.1 *Příprava*

Aparatura

Nezbytným vybavením je kapalinový chromatograf vybavený bezpulzním čerpadlem a vhodným detekčním zařízením. Doporučuje se používat nástřikový ventil se vstřikovacími smyčkami. Přítomnost polárních skupin ve stacionární fázi může závažně zhoršit účinnost kolony HPLC. Stacionární fáze by proto měla mít minimální podíl polárních skupin (11). Lze použít komerční mikročásticové náplně s reversními fázemi nebo hotové kolony s náplní. Mezi nástřikem a analytickou kolonou může být umístěna ochranná předkolona.

Mobilní fáze

K přípravě elučního rozpouštědla se použije methanol čistoty pro HPLC a voda čistoty pro HPLC, které se před použitím odplyní. Měla by být provedena isokratická eluce. Doporučuje se použít směsi methanol-voda s minimálním obsahem vody 25 %. Obvykle vyhovuje pro eluci sloučenin o log P = 6 během jedné hodiny při průtokové rychlosti 1 ml/min směs methanol-voda 3:1 (obj.). U sloučenin s vysokou hodnotou log P může být nutné zkrátit eluční dobu (stejně tak u referenčních látek) snížením polarity mobilní fáze nebo délky kolony.

Látky s velmi nízkou rozpustností v n-oktanolu mají tendenci při použití metody HPLC vykazovat abnormálně nízké hodnoty P_{ow}; píky těchto sloučenin někdy doprovázejí čelo rozpouštědla. Je to pravděpodobně způsobeno tím, že proces rozdělení je příliš pomalý, než aby bylo dosaženo rovnováhy za dobu, po kterou obvykle trvá dělení metodou HPLC. Pro dosažení spolehlivé hodnoty může být v takovém případě účinné snížení průtokové rychlosti nebo snížení poměru methanol-voda.

▼B

Zkoušená i referenční látka by měly být rozpustné v mobilní fázi v dostatečných koncentracích umožňujících jejich detekci. Pouze ve výjimečných případech mohou být u směsi methanol-voda použita aditiva, neboť aditiva mění vlastnosti kolony. V případě chromatogramů získaných při použití aditiv, musí být použita samostatná kolona téhož typu. Nevyhovuje-li směs methanol-voda, lze použít směsi jiných organických rozpouštědel s vodou, např. ethanol-voda nebo acetonitril-voda.

Pro disociovatelné látky je kritické pH eluentu. Mělo by ležet v pracovní oblasti pH kolony, která je obvykle 2 až 8. Doporučuje se použití pufračních roztoků. Je nezbytné dbát na to, aby nedošlo ke srážení solí a narušení kolony, ke kterému dochází u některých směsí organické fáze s pufračním roztokem. Měření pomocí HPLC se stacionárními fázemi na bázi oxidu křemičitého při pH vyšším než 8 se nedoporučuje, neboť použití alkalické mobilní fáze může způsobit rychlé narušení činnosti kolony.

Rozpouštěné látky

Referenční sloučeniny by měly mít nejvyšší dostupnou čistotu. Sloučeniny, které se mají používat pro zkoušení nebo kalibraci, se pokud možno rozpustí v mobilní fázi.

Zkušební podmínky

Teplota by během měření neměla kolísat o více než ± 2 K.

1.6.3.2 **Měření**

Výpočet mrtvé doby t_o

Mrtvou dobu t_o je možné stanovit buď pomocí homologické řady (např. nalkylmethylketonů) nebo nezadržovaných organických sloučenin (např. thiomočoviny nebo formamidu). Pro výpočet mrtvé doby t_o s použitím homologické řady se nastříkne sada alespoň sedmi členů homologické řady a stanoví se příslušné retenční časy. Neupravené retenční časy t_r (n_c + 1) se vynesou jako funkce t_r (n_c) a stanoví se absolutní člen a a směrnice b regresní rovnice:

$$t_{r(n_c+1)} = a + bt_{r(n_c)}$$

(n_c = počet atomů uhlíku). Mrtvá doba t_o je dána vztahem:

$$t_o = a/(1 - b)$$

▼B

Kalibrační křivka

Následujícím krokem je sestrojení korelační závislosti hodnot log k na log P pro příslušné referenční sloučeniny. V praxi se současně nastříkne soubor 5 až 10 standardních referenčních sloučenin, jejichž log P leží v očekávané oblasti, a stanoví se retenční časy, nejlépe zapisovacím integrátorem napojeným na detekční systém. Vypočtou se příslušné logaritmy kapacitních faktorů, log k, a vynesou se jako funkce hodnot log P stanovených metodou třepací lahve. Kalibrace se provádí v pravidelných intervalech nejméně jednou denně, aby bylo možné zohlednit případné změny činnosti kolony.

Stanovení kapacitního faktoru zkoušeně látky

Zkoušená látka se nastříkne v co nejmenším množství mobilní fáze. Stanoví se retenční čas (dvakrát), umožňující výpočet kapacitního faktoru k. Z korelační křivky referenčních sloučenin je možné interpolací získat rozdělovací koeficient zkoušené látky. U velmi nízkých a velmi vysokých rozdělovacích koeficientů je nutná extrapolace. V těchto případech je nutno věnovat zvláštní pozornost intervalům spolehlivosti regresní křivky.

2. **DATA**

Metoda třepací lahve

Spolehlivost stanovených hodnot P je možné prověřit srovnáním středních hodnot z opakovaných stanovení s celkovou střední hodnotou.

3. **ZPRÁVY**

Protokol o zkoušce má pokud možno obsahovat tyto údaje:

— přesná specifikace látky (identifikace a nečistoty)

— nejsou-li metody použitelné (např. u povrchově aktivní látky), měla by být uvedena vypočtená hodnota nebo odhad založený na individuálních rozpustnostech látky v n-oktanolu a ve vodě,

— všechny informace a poznámky, které mají význam pro interpretaci výsledků, zvláště s ohledem na nečistoty a fyzikální stav látky.

Pro metodu třepací lahve:

— výsledek předběžného odhadu, pokud existuje,

— teplotu stanovení,

— údaje o analytických postupech použitých ke stanovení koncentrací,

— dobu a rychlost odstřeďování, pokud se použilo,

▼B

— koncentrace naměřené při každém stanovení v obou fázích (tzn. uvede se celkem 12 koncentrací),

— hmotnost zkoušené látky, objem každé fáze použité v každé zkušební nádobě a vypočtené celkové množství zkoušené látky, obsažené v jednotlivých fázích po dosažení rovnováhy,

— vypočtené hodnoty rozdělovacího koeficientu (P) a střední hodnotu je nutné uvést pro každý soubor zkušebních podmínek, stejně tak střední hodnotu ze všech stanovení. Pokud existují náznaky závislosti rozdělovacího koeficientu na koncentraci, mělo by to být uvedeno ve zprávě,

— měla by být uvedena směrodatná odchylka jednotlivých hodnot P od střední hodnoty,

— měl by být také uveden dekadický logaritmus střední hodnoty P ze všech stanovení,

— vypočtená teoretická hodnota P_{ow} byla-li stanovena nebo je-li naměřená hodnota > 10^4,

— pH použité vody a vodné fáze během experimentu,

— pokud byly použity pufry, zdůvodnění jejich použití místo vody, jejich složení, koncentrace a pH, pH vodné fáze před a po experimentu.

Pro metodu HPLC:

— výsledek předběžného odhadu, pokud existuje,

— zkoušená látka a referenční látky, jejich čistota,

— teplotní rozmezí při stanoveních,

— pH, při kterém se prováděla stanovení,

— podrobnosti o analytické a ochranné koloně, o mobilní fázi a o způsobu detekce

— retenční data a hodnoty log P z literatury pro referenční sloučeniny použité ke kalibraci,

— podrobnosti o proložené regresní přímce (log k versus log P),

— průměrná retenční data a interpolovaná hodnota log P pro zkušební sloučeninu,

— popis zařízení a pracovních podmínek,

— eluční křivky,

— množství zkoušené látky a referenčních látek zavedených do kolony,

— mrtvý čas a způsob jeho měření.

▼B

4. **LITERATURA**

1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 107, rozhodnutí Rady C(81) 30 v konečném znění.

2) C. Hansch and A.J. Leo, Substituent Constants for Correlation Analysis in Chemistry and Biology, John Wiley, New York 1979.

3) Log P and Parameter Database, A tool for the quantitative prediction of bioactivity (C. Hansch, chairman, A.J. Leo, dir.) -Available from Pomona College Medical Chemistry Project 1982, Pomona College, Claremont, California 91711.

4) L. Renberg, G. Sundström and K. Sundh-Nygärd, Chemosphere, 1980, vol. 80, 683.

5) H. Ellgehausen, C. D'Hondt and R. Fuerer, Pestic. Sci., 1981, vol. 12, 219 (1981).

6) B. McDuffie, Chemosphere, 1981, vol. 10, 73.

7) W.E. Hammers et al., J. Chromatogr., 1982, vol. 247, 1.

8) J.E. Haky and A.M. Young, J. Liq. Chromat, 1984, vol. 7, 675.

9) S. Fujisawa and E. Masuhara, J. Biomed. Mat. Res., 1981, vol. 15, 787.

10) O. Jubermann, Verteilen und Extrahieren, in Methoden der Organischen Chemie (Houben Weyl), Allgemeine Laboratoriumpraxis (edited by E. Muller), Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1958, Band I/1, 223–339.

11) R.F. Rekker and H.M. de Kort, Euro. J. Med. Chem., 1979, vol. 14, 479.

12) A. Leo, C. Hansch and D. Elkins, Partition coefficients and their uses. Chem. Rev., 1971, vol. 71, 525.

13) R.F. Rekker, The Hydrophobic Fragmental Constant, Elsevier, Amsterdam, 1977.

14) NF T 20-043 AFNOR (1985). Chemical prqducts for industrial use – Determination of partition coefficient – Flask shaking method.

15) C.V. Eadsforth and P. Moser, Chemosphere, 1983, vol. 12, 1459.

16) A. Leo, C. Hansch and D. Elkins, Chem. Rev., 1971, vol. 71, 525.

17) C. Hansch, A. Leo, S.H. Unger, K.H. Kim, D. Nikaitani and E.J. Lien, J. Med. Chem., 1973, vol. 16, 1207.

18) W.B. Neely, D.R. Branson and G.E. Blau, Environ. Sci. Technol., 1974, vol. 8, 1113.

19) D.S. Brown and E.W. Flagg, J. Environ. Qual, 1981, vol. 10, 382.

20) J.K. Seydel and K.J. Schaper, Chemische Struktur und biologische Aktivität von WirkstofFen, Verlag Chemie, Weinheim, New York 1979.

▼B

21) R. Franke, Theoretical Drug Design Methods, Elsevier, Amsterdam 1984,

22) Y.C. Martin, Quantitative Drug Design, Marcel Dekker, New York, Basel 1978.

23) N.S. Nirrlees, S.J. Noulton, C.T. Murphy, P.J. Taylor; J. Med. Chem., 1976, vol. 19, 615.

▼B

Doplněk 1

Metody výpočtu nebo odhadu

ÚVOD

Obecný úvod do výpočtových metod, data a příklady jsou uvedeny v příručce Handbook of Chemical Property Estimation Methods (a).

Vypočtené hodnoty $P_{o/v}$ lze použít:

— k rozhodnutí, která z experimentálních metod je vhodná (rozsah u třepací lahve: log $P_{o/v}$: –2 až 4, rozsah u HPLC: log $P_{o/v}$: 0 až 6),

— k volbě vhodných zkušebních podmínek (např. referenčních látek pro postupy HPLC, poměr objemů n-oktanol/voda pro metodu třepací lahve),

— jako vnitřní laboratorní kontrolu možných experimentálních chyb,

— k získání odhadu $P_{o/v}$ případech, kdy zkušební metody nelze z technických důvodů použít.

METODA ODHADU

Předběžný odhad rozdělovacího koeficientu

Hodnotu rozdělovacího koeficientu je možné odhadnout s použitím rozpustnosti zkoušené látky v čistých rozpouštědlech:

$$P_{odhad} = \frac{\text{nasycení}_{\text{oktan-1-ol}}}{\text{nasycení}_{\text{voda}}}$$

VÝPOČTOVÉ METODY

Podstata výpočtových metod

Všechny výpočtové metody jsou založeny na formálním dělení molekul do vhodných podstruktur, pro něž jsou známy spolehlivé hodnoty přírůstků log $P_{o/v}$.Hodnota log $P_{o/v}$ celé molekuly se poté vypočte jako součet hodnot pro příslušné fragmenty plus součet korekčních členů pro intramolekulární interakce.

Existují seznamy konstant fragmentů a korekčních členů (b, c, d, e). Některé se pravidelně aktualizují (b).

Kritéria jakosti

Spolehlivost výpočtové metody obecně klesá s rostoucí složitostí zkoumané sloučeniny. V případě jednoduchých molekul s nízkou molekulovou hmotností a jednou nebo dvěma funkčními skupinami lze očekávat, že odchylky hodnot log $P_{o/v}$ získaných různými fragmentačními metodami od naměřené hodnoty budou v rozmezí od 0,1 do 0,3. U složitějších molekul může být rozpětí chyby větší. Závisí to na spolehlivosti a dostupnosti konstant pro fragmenty a rovněž na schopnosti zjistit intramolekulární interakce (např. vodíkové vazby) a na správném používání korekčních členů (což není obtížné při použití počítačového programu CLOGP-3) (b). V případě disociujících látek je důležité správně zohlednit náboj nebo stupeň disociace.

▼B

Postupy výpočtu

Hanschova π-metoda

Původní konstanta hydrofobnosti substituentu *n,* zavedená Fujitou et al. (f) je definována jako

$$\pi_x = \log P_{o/v} (PhX) - \log P_{o/v} (PhH)$$

kde $P_{o/v}$ (PhX) je rozdělovací koeficient aromatického derivátu a $P_{o/v}$ (PhH) rozdělovací koeficient výchozí sloučeniny

(např. $\pi_{Cl} = \log P_{o/v} (C_6H_5Cl) - \log P_{o/v} (C_6H_6) = 2{,}84 - 2{,}13 = 0{,}71$).

rozdělovací koeficient výchozí sloučeniny Ze své definice je π-metoda použitelná především u aromatických substituentů. Hodnoty π byly pro velký počet substituentů uspořádány do tabulek (b, c, d). Používají se k výpočtu log $P_{o/v}$ aromatických molekul nebo substruktur.

Rekkerova metoda

Podle Rekkera (g) se hodnota log $P_{o/v}$ vypočte takto:

$$\log P_{ow} = \sum_i a_i f_i + \sum_j (\text{interakční člen})$$

kde f_i představuje konstanty různých molekulárních fragmentů a a_i četnost jejich výskytu ve vyšetřované molekule. Korekční členy je možné vyjádřit jako souhrnný násobek jediné konstanty C_m (tzv. „magické konstanty“). Konstanty pro molekulární fragmenty f_i a C_m byly stanoveny ze seznamu 1 054 experimentálních hodnot $P_{o/v}$ (pro 825 sloučenin) pomocí vícenásobné regresní analýzy (c, h). Interakční členy se určí podle stanovených pravidel popsaných v literatuře (e, h, i).

Hanschova-Leova metoda

Podle Hansche a Lea (c) se hodnota log $P_{o/v}$ vypočte z výrazu:

$$\log P_{ow} = \sum_i a_i f_i + \sum_j b_j F_j$$

kde f_i představuje konstanty různých molekulárních fragmentů, F_j korekční členy a_i, b_j odpovídající četnosti výskytů. Na základě experimentálních hodnot $P_{o/v}$ byl pokusně sestaven seznam hodnot pro atomové a skupinové fragmenty a seznam korekčních členů F_j (tzv. „faktorů“). Korekční členy byly setříděny do několika různých tříd (a, c). Zohlednění všech pravidel a korekčních členů je poměrně složité a časově náročné. Byly vyvinuty sady softwaru (b).

Kombinovaná metoda

Výpočet log $P_{o/v}$ složitých molekul lze značně zdokonalit, jestliže se molekula rozdělí do větších podstruktur, pro něž existují spolehlivé hodnoty pocházející buď z tabulek (b, c), nebo z vlastních měření. Tyto fragmenty (např. heterocykly, antrachinon, azobenzen) lze poté kombinovat s Hanschovými π-hodnotami nebo s Rekkerovými nebo Leovými konstantami pro fragmenty.

Poznámky

i) Výpočetní metody lze použít pro částečně nebo úplně disociované sloučeniny pouze tehdy, lze-li vzít v úvahu nezbytné korekční faktory.

▼B

ii) Pokud lze předpokládat přítomnost intramolekulárních vodíkových vazeb, je nutné přičíst odpovídající korekční členy (přibližně 0,6 až 1,0 logaritmu hodnot $P_{o/v}$) (a). O přítomnosti těchto vazeb lze usuzovat z prostorových modelů nebo ze spektroskopických dat molekuly.

iii) Může-li existovat několik tautomerních forem, měla by být jako základ pro výpočet použita nejpravděpodobnější forma.

iv) Pečlivě by měly být sledovány přepracované seznamy konstant fragmentů.

Protokol o zkoušce

Při použití výpočtové metody nebo metody odhadu by měl protokol o zkoušce pokud možno obsahovat tyto údaje:

— popis látky (směs, nečistoty atd.),

— známky přítomnosti intramolekulárních vodíkových vazeb, disociace, nábojů a dalších neobvyklých efektů (např. tautomerie),

— popis výpočtové metody,

— označení nebo uvedení databáze,

— zvláštnosti při volbě fragmentů,

— vyčerpávající dokumentaci výpočtů.

LITERATURA

a) W.J. Lyman, W.F. Reehl and D.H. Rosenblatt (ed.), Handbook of Chemical Property Estimation Methods, McGraw-Hill, New York, 1983.

b) Pomona College, Medicinal Chemistry Project, Claremont, California 91711, USA, Log P Database and Med. Chem. Software (Program CLOGP-3).

c) C. Hansch, A.J. Leo, Substituent Constants for Correlation Analysis in Chemistry and Biology, John Wiley, New York, 1979.

d) A. Leo, C. Hansch, D. Elkins, Chem. Rev., 1971, vol. 71, 525.

e) R.F. Rekker, H.M. de Kort, Eur. J. Med. Chem. -Chill. Ther. 1979, vol. 14, 479.

f) T. Fujita, J. Iwasa and C. Hansch, J. Amer. Chem. Soc, 1964, vol. 86, 5175.

g) R.F. Rekker, The Hydrophobic Fragmental Constant, Pharmacochemistry Library, Elsevier, New York, 1977,vol 1.

h) C.V. Eadsforth, P. Moser, Chemosphere, 1983, vol. 12, 1459.

i) R.A. Scherrer, ACS, American Chemical Society, Washington D.C., 1984, Symposium Series 255, p. 225.

▼B

Doplněk 2

Doporučené referenční látky pro metodu HPLC

Číslo	referenční látka	log P_{ow}	pKa
1	butan2on	0,3	
2	4acetylpyridin	0,5	
3	anilin	0,9	
4	acetanilid	1,0	
5	benzylalkohol	1,1	
6	4-methoxyfenol	1,3	pKa = 10,26
7	kyselina fenoxyoctová	1,4	pKa = 3,12
8	fenol	1,5	pKa = 9,92
9	2,4dinitrofenol	1,5	pKa = 3,96
10	benzonitril	1,6	
11	fenylacetonitril	1,6	
12	4methylbenzylalkohol	1,6	
13	acetofenon	1,7	
14	2nitrofenol	1,8	pKa = 7,17
15	kyselina 3nitrobenzoová	1,8	pKa = 3,47
16	4chloranilin	1,8	pKa = 4,15
17	nitroben	1,9	
18	3fenylpropan2ol	1,9	
19	kyselina benzoová	1,9	pKa = 4,19
20	pkresol	1,9	pKa = 10,17
21	kyselina skořicová	2,1	pKa = 3,89 cis 4,44 trans
22	anisol	2,1	
23	methylbenzoát	2,1	
24	benzen	2,1	
25	kyselina 3mehylbenzoová	2,4	pKa = 4,27
26	4chlorfenol	2,4	pKa = 9,1
27	trichlorethylen	2,4	
28	atrazin	2,6	
29	ethylbenzoát	2,6	
30	2,6dichlorbenzonitril	2,6	
31	kyselina 3chlorbenzoová	2,7	pKa = 3,82
32	toluen	2,7	
33	naftalenlol	2,7	pKa = 9,34
34	2,3dichloranilin	2,8	
35	chlorbenzen	2,8	
36	allyfenylether	2,9	
37	brombenzen	3,0	

▼B

Číslo	referenční látka	log P_{ow}	pKa
38	ethylbenzen	3,2	
39	benzofenon	3,2	
40	4fenylfenol	3,2	pKa = 9,54
41	thymol	3,3	
42	l,4dichlorbenzen	3,4	
43	difenylamin	3,4	pKa = 0,79
44	naftalen	3,6	
45	fenylbenzoát	3,6	
46	isopropylbenzen	3,7	
47	2,4,6trichlorfenol	3,7	pKa = 6
48	bifenyl	4,0	
49	benzylbenzoát	4,0	
50	2,4dinitro6selebutylfenol	4,1	
51	l,2,4trichlorbenzen	4,2	
52	kyselina dodekanová	4,2	
53	difenylether	4,2	
54	nbutylbenzcn	4,5	
55	fenanthren	4,5	
56	fluoranthen	4,7	
57	dibenzyl	4,8	
58	2,6difenylpyrídin	4,9	
59	trifenylamin	5,7	
60	DDT	6,2	
	Jiné referenční látkys nízkou hodnotou log P_{ow}		
1	kyselina nikotinová	- 0,7	

▼B

A.9 BOD VZPLANUTÍ

1. METODA

1.1 ÚVOD

Před provedením této zkoušky je vhodné mít k dispozici předběžné informace o hořlavosti látky. Zkušební postup je použitelný pro kapaliny, jejichž páry lze zapálit zdroji zapálení. Zkušební metody uvedené v tomto textu jsou spolehlivé pouze v rozsahu bodu vzplanutí, který je specifikován v jednotlivých metodách.

Při výběru metody, která má být použita, by mělo být zváženo, zda nemůže dojít k chemických reakcím mezi látkou a zkušebním kelímkem.

1.2 DEFINICE A JEDNOTKY

Bod vzplanutí je nejnižší teplota přepočtená k tlaku 101,325 kPa, při které kapalina uvolňuje za podmínek definovaných ve zkušební metodě páry v takovém množství, že se z nich ve zkušební nádobce vytvoří hořlavá směs se vzduchem.

Jednotky teploty: ^{o}C

$t = T - 273,15$

(t je ve ^{o}C a T je v K)

1.3 REFERENČNÍ LÁTKY

Při vyšetřování nové látky není nutné vždy používat referenční látky. Měly by v první řadě sloužit k občasné kontrole provedení metody a ke vzájemnému porovnávání výsledků získaných jinými metodami.

1.4 PODSTATA METODY

Látka se vpraví do zkušební nádobky, ve které je zahřívána nebo chlazena na zkušební teplotu podle postupu popsaného v dané zkušební metodě. Zkoušky vzplanutí se provádějí za účelem zjištění, zda vzorek vzplane či nevzplane při zkušební teplotě.

1.5 KRITÉRIA JAKOSTI

1.5.1 **Opakovatelnost**

Opakovatelnost se mění v závislosti na rozpětí bodu vzplanutí a použité zkušební metodě; maximální tolerance je 2 ^{o}C.

1.5.2 **Citlivost**

Citlivost závisí na použité zkušební metodě.

1.5.3 **Specifičnost**

Specifičnost některých metod je omezena na určitý rozsah bodu vzplanutí a závisí na vlastnostech látky (např. na vysoké viskozitě).

▼B

1.6 POPIS METODY

1.6.1 **Příprava**

Vzorek zkoušené látky se vloží do zkušebního zařízení podle bodů 1.6.3.1 a/nebo 1.6.3.2.

Kvůli bezpečnosti se doporučuje, aby byla v případě toxických látek nebo látek s vysokým energetickým potenciálem použita metoda, při níž se pracuje s malým množství vzorku, přibližně 2 cm.

1.6.2 **Zkušební podmínky**

Je-li to v souladu s podmínkami bezpečnosti, umístí se zkušební zařízení na místo, kde nedochází k nadměrnému proudění vzduchu.

1.6.3 **Provedení zkoušky**

1.6.3.1 *Rovnovážná metoda*

Viz ISO 1516, ISO 3680, ISO 1523, ISO 3679.

1.6.3.2 *Nerovnovážná metoda*

Zkušební zařízení podle Abela:

Viz BS 2000 – část 170, NF M07-011, NF T66-009.

Zkušební zařízení podle Abela-Penskyho:

Viz EN 57, DIN 51755 – část 1 (pro teploty od 5 do 65 ^{o}C), DIN 51755 – část 2 (pro teploty pod 5 ^{o}C), NF M07-036.

Zkušební zařízení TAG:

Viz ASTM D 56.

Zkušební zařízení podle Penskyho-Martense:

Viz ISO 2719, EN 11, DIN 51758, ASTM D 93, BS 2000-34 a NF M 07-019.

Poznámky:

Pokud se hodnota bodu vzplanutí stanovená nerovnovážnou metodou podle bodu 1.6.3.2 nachází v rozmezí 0 ± 2 ^{o}C, 21 ± 2 ^{o}C nebo 55 ± 2 ^{o}C, měla by být potvrzena rovnovážnou metodou pomocí stejného zkušebního zařízení.

Pro oznámení mohou být použity pouze ty metody, kterými lze bod vzplanutí stanovit.

Ke stanovení bodu vzplanutí viskózních kapalin obsahujících rozpouštědla (barvy, lepidla apod.) mohou být použity pouze zkušební zařízení a zkušební metody vhodné pro stanovení bodu vzplanutí viskózních kapalin.

Viz ISO 3679, ISO 3680, ISO 1523 a DIN 53213 – část 1.

▼B

2. **DATA**

3. **ZPRÁVY**

Protokol o zkoušce má pokud možno obsahovat tyto údaje:

— přesná specifikace látky (identifikace a nečistoty),

— odkaz na použitou metodu a na všechny případné odchylky,

— výsledky a všechny další poznámky, které mají význam pro interpretaci výsledků.

4. **LITERATURA**

Není uvedena.

▼B

A.10 HOŘLAVOST (PEVNÉ LÁTKY)

1. METODA

1.1 ÚVOD

Před provedením této zkoušky je vhodné mít k dispozici předběžné informace o možných výbušných vlastnostech látky.

Tato zkouška by měla být použita pouze pro práškové, zrnité nebo pastovité látky.

Aby se mezi vysoce hořlavé látky nezahrnovaly všechny látky, které lze zapálit, nýbrž pouze ty, které hoří rychle nebo jejichž chování je při hoření nějakým způsobem zvláště nebezpečné, jsou za vysoce hořlavé považovány jen ty látky, u nichž rychlost hoření překročí určitou mezní hodnotu.

Zvláště nebezpečné může být hoření doutnáním, šíří-li se kovovým prachem, a to pro jeho obtížné hašení. Kovové prachy se považují za vysoce hořlavé, pokud podporují šíření doutnáním celou hmotou za specifikovanou dobu.

1.2 DEFINICE A JEDNOTKY

Doba hoření se vyjadřuje v sekundách.

1.3 REFERENČNÍ LÁTKY

Nejsou specifikovány.

1.4 PODSTATA METODY

Látka se zformuje do tvaru neporušeného pásku nebo prachové housenky o délce přibližně 250 mm a provede se předběžná screeningová zkouška s cílem stanovit, zda nastane po zapálení plamenem plynového hořáku šíření plamenem nebo doutnáním. Pokud se hoření za předepsanou dobu rozšíří na více než 200 mm délky prachové housenky, provede se úplná zkouška pro stanovení rychlosti hoření.

1.5 KRITÉRIA JAKOSTI

Nejsou stanovena.

▼B

1.6 POPIS METODY

1.6.1 **Předběžná screeningová zkouška**

Látka se na nehořlavé, neporézní a málo tepelně vodivé podkladové desce zformuje do tvaru neporušeného pásku nebo prachové housenky o délce přibližně 250 mm, šířce 20 mm a výšce 10 mm. Na jeden konec prachové housenky se působí plamenem plynového hořáku (o minimálním průměru 5 mm), dokud se prach nevznítí, nebo maximálně 2 minuty (5 minut u prachů kovů nebo kovových slitin). Zjišťuje se, zda se hoření rozšíří na 200 mm délky prachové housenky v průběhu zkušební doby 4 minuty (nebo 40 minut u kovových prachů). Jestliže se látka nevznítí a hoření se buď plamenem, nebo doutnáním nerozšíří na 200 mm délky prachové housenky do zkušební doby 4 minuty (nebo 40 minut u kovových prachů), nepovažuje se látka za vysoce hořlavou a další zkouška se nepožaduje. Jestliže se látka zapálí a hoření se rozšíří plamenem na 200 mm délky prachové housenky za zkušební dobu méně než 4 minuty (nebo 40 minut u kovových prachů), provede se postup uvedený níže (bod 1.6.2 dále).

1.6.2 **Zkouška rychlosti hoření**

1.6.2.1 *Příprava*

Práškovité nebo zrnité látky se volně nasypou do formy s trojúhelníkovým příčným průřezem o délce 250 mm o vnitřní výšce 10 mm a šířce 20 mm. Na obě podélné strany formy se upevní 2 kovové desky se základnou jako bočnice, které přečnívají o 2 mm nad horní okraj trojúhelníkové formy (obrázek). Forma se poté třikrát spustí z výšky 2 cm na pevný povrch. Podle potřeby se forma doplní. Bočnice se sejmou a přebytek látky se seškrábne. Na horní část formy se položí nehořlavá, neporézní a málo tepelně vodivá deska, sestava se převrátí a forma se odstraní.

Pastovité látky se rozetřou na nehořlavou, neporézní a málo tepelně vodivou desku do tvaru provazce o délce 250 mm a příčném průřezu přibližně 1 cm.

1.6.2.2 *Zkušební podmínky*

V případě látky, která je citlivá na vlhkost, se zkouška provede co nejrychleji po vyjmutí látky z nádoby.

1.6.2.3 *Provedení zkoušky*

Zformovaný vzorek se umístí v digestoři kolmo na směr odtahu.

Rychlost proudění odsávaného vzduchu by měla stačit k zamezení úniku dýmu do laboratoře a neměla by se v průběhu zkoušky měnit. Kolem zkušebního zařízení se postaví ochranné clony proti nadměrnému proudění vzduchu.

K zapálení zformovaného zkoušeného vzorku na jeho jednom konci se použije plamen plynového hořáku o průměru minimálně 5 mm. Po vyhoření 80 mm délky zformovaného zkoušeného vzorku se měří rychlost hoření na dalších 100 mm.

▼B

Zkouška se provede šestkrát, vždy s pomocí čisté a vychladlé desky, pokud není pozorován pozitivní výsledek dříve.

2. **DATA**

Pro vyhodnocení jsou důležité doba hoření z předběžné screeningové zkoušky (1.6.1) a nejkratší doba hoření ze šesti zkoušek (1.6.2.3).

3. **ZPRÁVY**

3.1 PROTOKOL O ZKOUŠCE

Protokol o zkoušce má pokud možno obsahovat tyto údaje:

— přesná specifikace látky (identifikace a nečistoty),

— popis zkoušené látky, její fyzikální stav, včetně obsahu vlhkosti,

— výsledky předběžné screeningové zkoušky a zkoušky rychlosti hoření, je-li provedena,

— všechny další poznámky, které mají význam pro interpretaci výsledků.

3.2 INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

Práškovité, zrnité nebo pastovité látky se považují za vysoce hořlavé, je-li doba hoření v každé zkoušce provedené podle zkušebního postupu popsaného v bodě 1.6.2 menší než 45 sekund. Prach kovů nebo kovových slitin se považuje za vysoce hořlavý, pokud jej lze zapálit a plamen nebo reakční zóna se rozšíří po celém zkoušeném vzorku za 10 minut nebo za kratší dobu.

4. **LITERATURA**

NF T 20-042 (SEPT 85). Chemical products for industrial use. Determination of the flammability of solids.

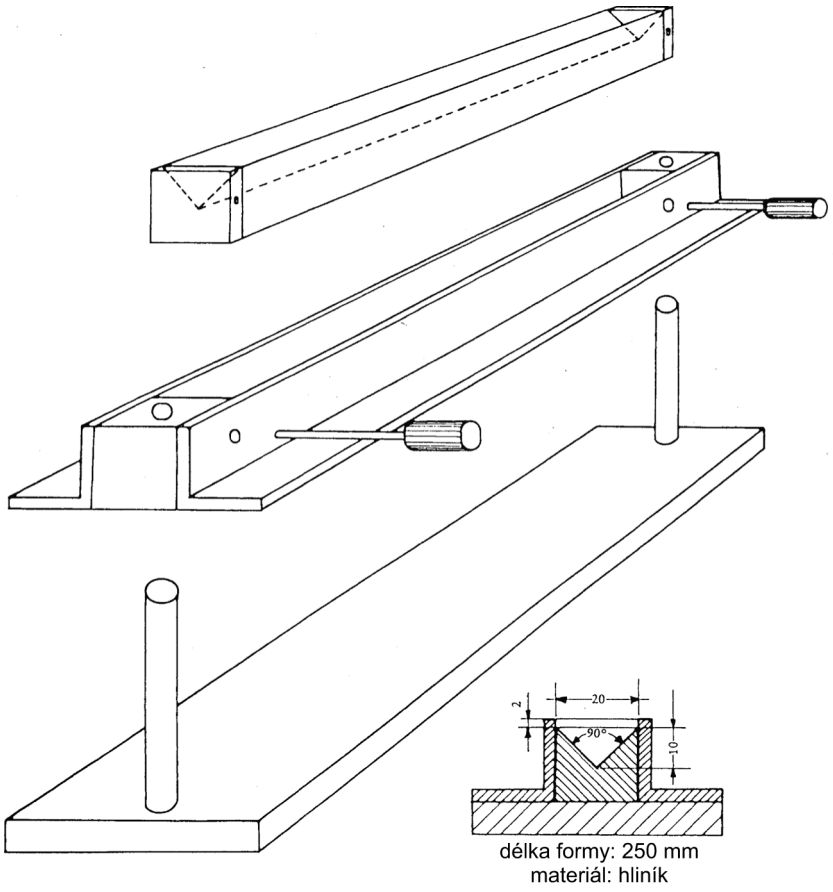
▼B

Doplněk

Obrázek

Forma a příslušenství pro přípravu zkoušeného vzorku

(Všechny rozměry jsou v milimetrech)



▼B

A.11 HOŘLAVOST PLYNŮ

1. METODA

1.1 ÚVOD

Tato metoda umožňuje stanovit, zda jsou plyny ve směsi se vzduchem při laboratorní teplotě (přibližně 20 °C) a atmosférickém tlaku hořlavé, a jsou-li hořlavé, v jakém rozmezí koncentrací. Směsi se vzduchem, u nichž se postupně zvyšuje koncentrace zkušebního plynu, jsou zapalovány elektrickou jiskrou a sleduje se, zda dojde k zapálení.

1.2 DEFINICE A JEDNOTKY

Oblast hořlavosti je rozpětí koncentrace mezi dolní a horní mezí výbušnosti. Dolní a horní meze výbušnosti jsou takové mezní koncentrace hořlavého plynu ve směsi se vzduchem, za nimiž nedojde k šíření plamene.

1.3 REFERENČNÍ LÁTKY

Nejsou specifikovány.

1.4 PODSTATA METODY

Koncentrace plynu ve vzduchu je postupně zvyšována a v každém stupni se směs zapaluje elektrickou jiskrou.

1.5 KRITÉRIA JAKOSTI

Nejsou stanovena.

1.6. POPIS METODY

1.6.1 **Aparatura**

Zkušební nádobu tvoří svislý skleněný válec s vnitřním průměrem nejméně 50 mm a výškou nejméně 300 mm. Zapalovací elektrody jsou od sebe vzdáleny 3 až 5 mm a jsou umístěny ve výšce 60 mm nad dnem válce. Válec je opatřen přetlakovou bezpečnostní pojistkou. Aparatura musí být opatřena krytem, aby se zamezilo jakémukoli poškození výbuchem.

Jako zdroj zapálení se používá statický indukční výboj trvající 0,5 sekundy generovaný vysokonapěťovým transformátorem o výstupním napětí od 10 kV do 15 kV (maximální příkon je 300 W). Příklad vhodné aparatury je popsán v literatuře (2).

1.6.2 **Zkušební podmínky**

Zkouška musí být provedena při laboratorní teplotě (přibližně 20 °C).

▼B

1.6.3 **Provedení zkoušky**

Pomocí dávkovacích čerpadel se do skleněného válce vhání směs plynu se vzduchem o známé koncentraci. Vyvolá se jiskra a sleduje se, zda se plamen oddělí od zdroje zapálení a zda se samovolně šíří. Koncentrace plynu se postupně zvyšuje o 1 %, dokud nedojde k výše popsanému zapálení.

Jestliže z chemické struktury plynu vyplývá, že by mohl být nehořlavý, a lze-li vypočítat stechiometrické složení směsi se vzduchem, postačuje zkoušet směsi pouze v rozmezí od koncentrace o 10 % nižší, než je stechiometrické složení, do koncentrace o 10 % vyšší, než je stechiometrické složení, a to postupně po 1 %.

2. **DATA**

Výskyt šíření plamene je jediná relevantní informace pro stanovení této vlastnosti.

3. **ZPRÁVY**

Protokol o zkoušce má pokud možno obsahovat tyto údaje:

— přesná specifikace látky (identifikace a nečistoty),

— popis použité aparatury s rozměry,

— teplota, při které byla zkouška provedena,

— zkušební koncentrace a získané výsledky,

— výsledek zkoušky: nehořlavý plyn nebo vysoce hořlavý plyn,

— jestliže byl učiněn závěr, že je plyn nehořlavý, uvede se koncentrační rozpětí, které bylo zkoušeno v krocích po 1 %,

— musí být uvedeny všechny informace a poznámky, které jsou důležité pro interpretaci výsledků.

4. **LITERATURA**

1) NF T 20-041 (SEPT 85). Chemical products for industrial use. Determination of the flammability of gases.

2) W.Berthold, D.Conrad, T.Grewer, H.Grosse- einer Standard-Apparatur zur Messung von Explosionsgrenzen'. Chem.-Ing.- Tech. 1984, vol. 56, 2, 126–127. Wortmann, T.Redeker und H.Schacke. 'Entwicklung.

▼B

A.12 HOŘLAVOST (PŘI STYKU S VODOU)

1. METODA

1.1 ÚVOD

Tuto zkušební metodu lze použít pro zjištění, zda reakce látky s vodou nebo vzdušnou vlhkostí vede k vývinu nebezpečného množství plynu nebo plynů, které mohou být vysoce hořlavé.

Tuto zkušební metodu lze použít pro pevné látky a pro kapaliny. Nelze ji použít pro látky, které se spontánně vznítí ve styku se vzduchem.

1.2 DEFINICE A JEDNOTKY

Vysoce hořlavé látky: látky, které při kontaktu s vodou nebo vzdušnou vlhkostí uvolňují vysoce hořlavé plyny v nebezpečném množství rychlostí nejméně 1 litr na kg látky za hodinu.

1.3 PODSTATA METODY

Látka je zkoušena postupně, jak je uvedeno níže; dojde-li v některém stupni ke vznícení, není další zkoušení potřebné. Je-li známo, že látka s vodou nereaguje prudce, pokračuje se čtvrtým stupněm (bod 1.3.4).

1.3.1 **Stupeň 1**

Zkoušená látka se vnese do vaničky s destilovanou vodou o teplotě 20 °C a sleduje se, zda se uvolňovaný plyn vznítí, či nikoli.

1.3.2 **Stupeň 2**

Zkoušená látka se položí na filtrační papír plovoucí v misce s destilovanou vodou o teplotě 20 °C na vodní hladině a sleduje se, zda se uvolňovaný plyn vznítí, či nikoli. Filtrační papír slouží pouze k tomu, aby byla látka položena na jedno místo a tím se zvýšila možnost vznícení.

1.3.3 **Stupeň 3**

Zkoušená látka se zformuje do tvaru hranice o výšce přibližně 2 cm a průměru 3 cm. Přidá se do ní několik kapek vody a sleduje se, zda se uvolňovaný plyn vznítí, či nikoli.

1.3.4 **Stupeň 4**

Zkoušená látka se smíchá s destilovanou vodou o teplotě 20 °C a v jednohodinových intervalech se měří rychlost vývinu plynu po dobu 7 hodin. Je-li po sedmi hodinách rychlost vývinu plynu nepravidelná nebo narůstá, doba měření by se měla prodloužit na maximálně pět dnů. Zkoušku lze přerušit, jestliže rychlost vývinu plynu v průběhu měření převýší 1 litr na kg látky za hodinu.

▼B

1.4 REFERENČNÍ LÁTKY

Nejsou specifikovány.

1.5 KRITÉRIA JAKOSTI

Nejsou stanovena.

1.6 POPIS METOD

1.6.1 **Stupeň 1**

1.6.1.1 *Zkušební podmínky*

Zkouška se provede při laboratorní teplotě (přibližně 20 °C).

1.6.1.2 *Provedení zkoušky*

Malé množství zkoušené látky (přibližně o průměru 2 mm) se vnese do misky s destilovanou vodou. Sleduje se, i) zda se uvolňuje nějaký plyn a ii) zda dojde k jeho vznícení. Dojde-li ke vznícení, nejsou další zkoušky potřebné, neboť látka je považována za nebezpečnou.

1.6.2 **Stupeň 2**

1.6.2.1 *Aparatura*

Ve vhodné nádobě, např. v odpařovací misce o průměru přibližně 100 mm se na hladinu destilované vody umístí filtrační papír.

1.6.2.2 *Zkušební podmínky*

Zkouška se provede při laboratorní teplotě (přibližně 20 °C).

1.6.2.3 *Provedení zkoušky*

Malé množství zkoušené látky (přibližně o průměru 2 mm) se umístí do středu filtračního papíru. Sleduje se, i) zda se uvolňuje nějaký plyn a ii) zda dojde k jeho vznícení. Dojde-li ke vznícení, nejsou další zkoušky potřebné, neboť látka je považována za nebezpečnou.

1.6.3 **Stupeň 3**

1.6.3.1 *Zkušební podmínky*

Zkouška se provede při laboratorní teplotě (přibližně 20 °C).

1.6.3.2 *Provedení zkoušky*

Zkoušená látka se zformuje do tvaru hranice o výšce přibližně 2 cm a průměru 3 cm s jamkou v horní části. Do jamky se přidá několik kapek vody a sleduje se, i) zda se uvolňuje nějaký plyn a ii) zda dojde k jeho vznícení. Dojde-li ke vznícení, nejsou další zkoušky potřebné, neboť látka je považována za nebezpečnou.

▼B

1.6.4 **Stupeň 4**

1.6.4.1 *Aparatura*

Aparatura se sestaví způsobem uvedeným na obrázku.

1.6.4.2 *Zkušební podmínky*

Nádoba se zkoušenou látkou se prohlédne, zda neobsahuje prach o velikosti částic < 500 um. Tvoří-li prach více než 1 % hmot. celkového množství nebo drobí-li se vzorek, veškerá látka se před zkoušením rozemele na prach, aby se zmenšila velikost částic během skladování a manipulace; v opačném případě se látka zkouší v původním stavu. Zkouška by měla být provedena při laboratorní teplotě (přibližně 20 ^{o}C) a atmosférickém tlaku.

1.6.4.3 *Provedení zkoušky*

Přikapávací nálevka aparatury se naplní 10 až 20 ml vody a do Erlenmeyerovy baňky se vpraví 10 g látky. Objem uvolňovaného plynu se měří jakýmkoli vhodným způsobem. Kohout přikapávací nálevky se otevře, aby voda natekla do Erlenmeyerovy baňky, a současně se spustí stopky. Objem vzniklého plynu se měří každou hodinu po dobu sedmi hodin. Je-li vývin plynu během této doby nepravidelný nebo narůstá-li na konci této doby rychlost vývinu, prodlouží se doba měření na maximálně pět dnů. Překročí-li rychlost vývinu plynu v průběhu měření 1 litr na kg látky za hodinu, může být zkouška přerušena. Zkouška se provede třikrát.

Není-li chemická identifikace plynu známa, měl by být analyzován. Obsahuje-li plyn vysoce hořlavé složky a není-li známo, zda není celá směs vysoce hořlavá, připraví se směs stejného složení a provede se zkouška podle metody A.11.

2. **DATA**

Látka se považuje za nebezpečnou, jestliže:

— na kterémkoli stupni zkušebního postupu dojde k jejímu samovolnému vznícení,

nebo

— dojde-li k vývinu hořlavého plynu rychlostí vyšší než 1 litr na kg látky za hodinu.

3. **ZPRÁVY**

Protokol o zkoušce má pokud možno obsahovat tyto údaje:

— přesná specifikace látky (identifikace a nečistoty),

— podrobnosti o jakékoli počáteční přípravě látky,

▼B

— výsledky zkoušek (stupně 1, 2, 3 a 4),

— chemická identifikace uvolňovaného plynu,

— rychlost vývinu plynu, pokud se provádí stupeň 4 (1.6.4),

— všechny další poznámky, které mají význam pro interpretaci výsledků.

4. **LITERATURA**

1) Recommendations on the transport of dangerous goods, test and criteria, 1990, United Nations, New York.

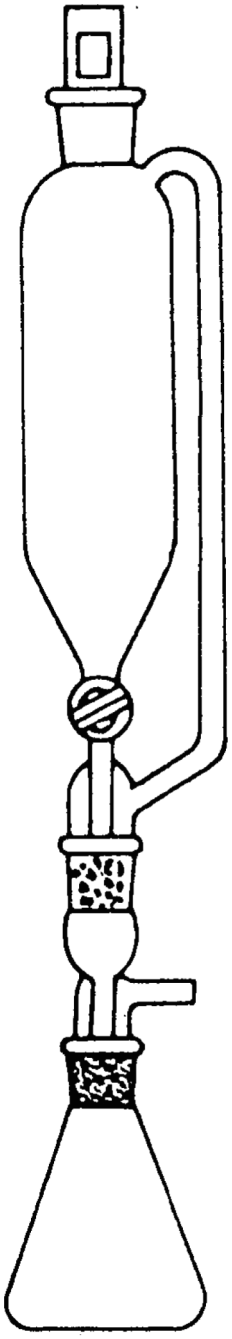
2) NF T 20-040 (SEPT 85). Chemical products for industrial use. Determination of the flammability of gases formed by the hydrolysis of solid and liquid products.

▼B

Doplněk

Obrázek

Aparatura



▼B

A.13 PYROFORICKÉ VLASTNOSTI PEVNÝCH LÁTEK A KAPALIN

1. METODA

1.1 ÚVOD

Zkušební postup je použitelný pro pevné látky nebo kapaliny, které se již v malých množstvích samovolně vznítí krátce poté, co při laboratorní teplotě (přibližně 20 °C) přijdou do styku se vzduchem.

Tato metoda se nevztahuje na látky, které se na vzduchu při laboratorní teplotě nebo při zvýšené teplotě vznítí teprve po několika hodinách nebo dnech.

1.2 DEFINICE A JEDNOTKY

Látky mají pyroforické vlastnosti, pokud se samovolně vznítí nebo vykazují zuhelnatění za podmínek, které jsou popsány v bodě 1.6.

Může být nezbytné provést zkoušku teploty samozápalu podle metody A.15. Bod samozápalu (kapaliny a plyny).

1.3 REFERENČNÍ LÁTKY

Nejsou specifikovány.

1.4 PODSTATA METODY

Pevná nebo kapalná látka se nanese na inertní nosič a uvede se při teplotě okolí na dobu pěti minut do styku se vzduchem. Pokud se kapaliny nevznítí, jsou absorbovány do filtračního papíru a vystaví se působení vzduchu po dobu pěti minut při teplotě okolí (přibližně 20 °C). Pokud se pevná látka nebo kapalina vznítí nebo pokud kapalina zapálí či zuhelnatí filtrační papír, považuje se za pyroforickou.

1.5 KRITÉRIA JAKOSTI

Opakovatelnost: vzhledem k závažnosti z hlediska bezpečnosti stačí jediný pozitivní výsledek k tomu, aby byla látka považována za pyroforickou.

1.6 POPIS METODY

1.6.1 **Aparatura**

Porcelánový kelímek o průměru přibližně 10 cm se při laboratorní teplotě (přibližně 20 °C) naplní do výšky asi 5 mm infuzoriovou hlinkou.

Poznámka:

Infuzoriová hlinka nebo jiná srovnatelná běžně dosažitelná inertní látka se považuje za reprezentativní materiál pro zeminu, do které může zkoušená látka proniknout v případě havárie.

Pro zkoušení kapalin, které se při kontaktu se vzduchem na inertním nosiči samovolně nevznítí, se požaduje suchý filtrační papír.

▼B

1.6.2 **Provedení zkoušky**

a) *Práškovité pevné látky*

1 až 2 cm^3 práškovité látky, která má být zkoušena, se sype z výšky přibližně 1 m na nehořlavý povrch a sleduje se, zda se látka při pádu nebo v průběhu dalších pěti minut po dopadu vznítí.

Zkouška se provede šestkrát, pokud ke vznícení nedojde dříve.

b) *Kapaliny*

Přibližně 5 cm^3 kapaliny, která má být zkoušena, se nalije do připraveného porcelánového kelímku a sleduje se, zda se v průběhu pěti minut vznítí.

Pokud při šesti zkouškách nedojde ke vznícení, provede se tato zkouška:

0,5 ml zkoušeného vzorku se vpraví pomocí injekční stříkačky na zprohýbaný filtrační papír a sleduje se, zda do 5 minut od přidání kapaliny dojde ke vznícení nebo zuhelnatění filtračního papíru. Zkouška se provede třikrát, nedojde-li ke vznícení nebo zuhelnatění dříve.

2. **DATA**

2.1 ZPRACOVÁNÍ VÝSLEDKŮ

Zkoušky lze přerušit, jakmile je dosaženo pozitivního výsledku v kterékoli zkoušce.

2.2 VYHODNOCENÍ

Jestliže se látka v průběhu 5 minut po nanesení na inertní nosič a vystavení působení vzduchu vznítí nebo pokud kapalná látka zuhelnatí či zapálí filtrační papír do pěti minut po nanesení a vystavení vzduchu, považuje se za pyroforickou.

3. **ZPRÁVY**

Protokol o zkoušce má pokud možno obsahovat tyto údaje:

— přesná specifikace látky (identifikace a nečistoty),

— výsledky zkoušek,

— všechny další poznámky, které mají význam pro interpretaci výsledků.

4. **LITERATURA**

1) NF T 20-039 (SEPT 85). Chemical products for industrial use. Determination of the spontaneous flammability of solids and liquids.

2) Recommendations on the Transport of Dangerous Goods, Test and criteria, 1990, United Nations, New York.

▼B

A.14 VÝBUŠNÉ VLASTNOSTI

1. METODA

1.1 ÚVOD

Tato metoda umožňuje stanovit, zda u pevné nebo pastovité látky existuje nebezpečí výbuchu, je-li podrobena působení plamene (citlivost na působení tepla), nárazu nebo tření (citlivost na mechanické podněty), a zda u kapalné látky existuje nebezpečí výbuchu, je-li podrobena působení plamene nebo nárazu.

Metoda sestává ze tří částí:

a) zkouška citlivosti na působení tepla (1);

b) zkouška mechanické citlivosti na náraz (1);

c) zkouška mechanické citlivosti na tření (1).

Metoda poskytuje data pro stanovení pravděpodobnosti vyvolání výbuchu určitými běžnými podněty. Metoda neslouží ke zjištění, zda je látka schopna vybuchnout za jakýchkoli podmínek.

Metoda je vhodná pro zjištění, zda u látky existuje nebezpečí výbuchu (citlivost na působení tepla a mechanická citlivost) za určitých podmínek specifikovaných ve směrnici. Je založena na řadě typů zařízení, která jsou široce používána v mezinárodním měřítku (1) a která obvykle poskytují vypovídající výsledky. Připouští se, že tato metoda není definitivní. Lze použít jiné než specifikované zařízení, za předpokladu, že je mezinárodně uznané a že lze výsledky vhodným způsobem srovnat s výsledky poskytnutými specifikovaným zařízením.

Zkouška nemusí být provedena, jestliže z dostupných termodynamických informací (např. ze slučovacího tepla nebo disociačního tepla) a/nebo z nepřítomnosti určitých reakčních skupin (2) ve struktuře s jistotou vyplývá, že látka nemá schopnost rychle se rozkládat za vývoje plynů nebo za uvolňování tepla (tzn. materiál nepředstavuje žádné riziko výbuchu). Zkouška mechanické citlivosti na tření se nevyžaduje u kapalin.

1.2 DEFINICE A JEDNOTKY

Výbušná látka:

Látka, která může vybuchnout působením plamene nebo která je citlivá na náraz nebo tření ve specifikovaném zařízení (nebo je mechanicky citlivější než 1,3-dinitrobenzen v alternativním zařízení).

1.3 REFERENČNÍ LÁTKY

1,3-dinitrobenzen, technický krystalický výrobek, prosetý na sítu o velikosti oka 0,5 mm, pro metody citlivosti na tření a na náraz.

Perhydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazin (označovaný jako RDX nebo hexogen nebo cyklonit – CAS 121-82-4) rekrystalizovaný z vodného cyklohexanonu, prosetý za mokra na sítě 250 μm a zachycený na sítě 150 μm, sušený 4 hodiny při 103 ± 2 °C pro druhou sérii zkoušek citlivosti na tření a na náraz.

▼B

1.4 PODSTATA METODY

Pro zjištění bezpečných podmínek pro provedení tří zkoušek citlivosti jsou nezbytné předběžné zkoušky.

1.4.1 **Zkoušky bezpečného zacházení (3)**

Z bezpečnostních důvodů se před provedením hlavních zkoušek podrobí velmi malé neuzavřené vzorky látky (přibližně 10 mg) zahřívání v plameni plynového hořáku, nárazu v jakémkoli vhodném zařízení a tření za použití paličky proti podložce nebo jiného zařízení pro zkoušení citlivosti natření. Účelem předběžných zkoušek je zjistit, zda je látka tak citlivá a výbušná, že by měly být předepsané zkoušky citlivosti, zvláště zkouška citlivosti na působení tepla, prováděny za zvláštních bezpečnostních opatření, aby nedošlo k poranění osoby provádějící zkoušky.

1.4.2 **Citlivost na působení tepla**

Metoda spočívá v zahřívání látky v ocelové trubce uzavřené clonami s různými průměry otvorů s cílem zjistit, zda může za podmínek intenzivního zahřívání a při definovaném utěsnění vybuchnout.

1.4.3 **Mechanická citlivost (na náraz)**

Metoda spočívá ve vystavení látky nárazu specifikovaným závažím puštěným ze specifikované výšky.

1.4.4 **Mechanická citlivost (na tření)**

Metoda spočívá ve vystavení pevných nebo pastovitých látek tření mezi standardními povrchy za specifikovaných podmínek zatížení a vzájemného pohybu.

1.5 KRITÉRIA JAKOSTI

Nejsou stanovena.

1.6 POPIS METODY

1.6.1 **Citlivost na působení tepla (na působení plamene)**

1.6.1.1 *Zařízení*

Zařízení je tvořeno ocelovou trubkou na jedno použití s opakovaně použitelným uzavíracím zařízením (obrázek 1), instalovanou v ohřívacím a ochranném zařízení. Každá trubka je hlubokotažená z ocelového plechu (viz doplněk) a má vnitřní průměr 24 mm, délku 75 mm a tloušťku stěny 0,5 mm. Na otevřeném konci trubky je příruba sloužící k uzavření trubky sestavou clony. Sestava je tvořena clonou se středovým otvorem odolnou vůči tlaku, připevněnou k trubce pomocí dvoudílného šroubového spoje (matice a závitové příruby). Matice a závitová příruba jsou zhotoveny z chrommanganové oceli (viz doplněk), která je do 800 °C nejiskřivá. Clony mají tloušťku 6 mm, jsou vyrobeny ze žáruvzdorné oceli a tvoří řadu podle velikosti otvorů.

▼B

1.6.1.2 *Zkušební podmínky*

Látka se obvykle zkouší ve stavu, v jakém byla obdržena, ačkoliv v některých případech, např. je-li lisovaná, litá nebo jiným způsobem zhutněná, může být nezbytné ji před provedením zkoušky rozdrtit.

U pevných látek se hmotnost látky, která má být použita v každé zkoušce, stanoví zkouškou ve dvou etapách. Zvážená trubka se naplní 9 cm látky a látka se po celém průřezu trubky stlačí silou 80 N. Z bezpečnostních důvodů nebo v případech, kdy může stlačováním dojít ke změně fyzikální formy vzorku, lze použít jiný způsob plnění, například je-li látka velmi citlivá na tření, není vhodné ji stlačovat. Je-li látka stlačitelná, přidá se a stlačuje další množství látky, dokud není trubka zaplněna do úrovně 55 mm od horního okraje. Stanoví se celkové množství látky použité pro naplnění do úrovně 55 mm od horního okraje a přidají se další dva podíly látky, přičemž se každý stlačí silou 80 N. Látka se poté podle potřeby buď přidá a stlačí, nebo se odebere tak, aby byla trubka naplněna do úrovně 15 mm od horního okraje. Provede se druhá zkouška, přičemž se začne s třetinou hmotnosti po stlačení zjištěné v první etapě. Přidají se další dva podíly, stlačí se silou 80 N a podle potřeby se látka přidá nebo odebere do úrovně 15 mm od horního okraje trubky. Množství pevné látky zjištěné ve druhé etapě se použije pro každý pokus; naplnění se provede se třemi stejnými množstvími a každé z nich se stlačí na objem 9 cm bez ohledu na potřebnou sílu (pro usnadnění lze k tomuto účelu použít rozpěrné kroužky).

Kapaliny a gely se naplní do trubky do výšky 60 mm, přičemž je třeba věnovat zvláštní pozornost gelům, aby se v nich netvořily dutiny. Na trubku se zdola navleče závitová příruba, vloží se vhodná clona a po nanesení maziva na bázi disulfidu molybdeničitého se matice utáhne. Je důležité se přesvědčit, zda nějaká látka nezůstala zachycena mezi přírubou a clonou nebo v závitech.

K zahřívání se použije propan odebíraný z průmyslové tlakové lahve s regulátorem tlaku (60 až 70 mbar) přes průtokoměr a rovnoměrně rozdělený rozdělovacím potrubím do čtyř hořáků (ověří se vizuálně pozorováním plamenů hořáků). Hořáky se umístí kolem zkušební komory, jak je znázorněno na obrázku 1. Čtyři hořáky mají celkovou spotřebu přibližně asi 3,2 litru propanu za minutu. Lze použít jiné palivo a hořáky, avšak rychlost ohřevu musí být taková, jak je uvedeno na obrázku 3. Rychlost ohřevu se musí u všech zařízení pravidelně kontrolovat za použití trubek naplněných dibutylftalátem, jak je znázorněno na obrázku 3.

1.6.1.3 *Provedení zkoušek*

Každá zkouška se provádí do roztržení trubky nebo dokud doba ohřevu nedosáhne 5 minut. Výsledek zkoušky, při níž došlo k roztržení trubky na tři nebo více úlomků, z nichž některé mohou být vzájemně spojeny úzkými proužky kovu, jak je znázorněno na obrázku 2, se hodnotí jako výbuch. Výsledek zkoušky, při níž vzniklo méně úlomků nebo k roztržení nedošlo, se nehodnotí jako výbuch.

▼B

Nejprve se provede série tří zkoušek s clonou o průměru otvoru 6,0 mm, a pokud nedojde k výbuchu, provede se druhá série tří zkoušek s clonou o průměru otvoru 2,0 mm. Dojde-li k výbuchu u kterékoli zkušební série, nevyžadují se další zkoušky.

1.6.1.4 *Hodnocení*

Výsledek zkoušky se považuje za pozitivní, dojde-li k výbuchu při jedné z výše uvedených zkušebních sérií.

1.6.2 **Mechanická citlivost (na náraz)**

1.6.2.1 *Zařízení (obrázek 4)*

Základními částmi typických zařízení s padacím kladivem je blok z lité oceli s podstavcem, kovadlina, sloup, vodicí lišty, padací závaží, uvolňovací zařízení a držák vzorku. Ocelová kovadlina o průměru 100 mm a výšce 70 mm je přišroubována k horní straně bloku z lité oceli o délce 230 mm, šířce 250 mm a výšce 200 mm se základovou litinovou deskou o délce 450 mm, šířce 450 mm a výšce 60 mm. Sloup tvořený bezešvou taženou ocelovou trubkou je připevněn držákem přišroubovaným na zadní stranu bloku z lité oceli. Čtyři šrouby ukotvují zařízení k betonovému bloku o rozměrech 60 × 60 × 60 cm takovým způsobem, že jsou vodicí lišty dokonale svislé a padací závaží padá volně. Používá se závaží o hmotnosti 5 a 10 kg z pevné oceli. Úderová hlava každého závaží je z tvrzené oceli HRC 60 až 63 a má minimální průměr 25 mm.

Zkoušený vzorek se uzavře do zkušebního zařízení tvořeného dvěma plnými souosými válci umístěnými nad sebou a vodicím pouzdrem tvořeným dutým ocelovým válcem. Plné ocelové válce o průměru 10 (– 0,003, – 0,005) mm a výšce 10 mm mají vyleštěné plochy, zakulacené hrany (s poloměrem zakřivení 0,5 mm) a tvrdost HRC 58 až 65. Dutý válec musí mít vnější průměr 16 mm, vyleštěný vyvrtaný otvor o průměru 10 (+ 0,005, + 0,010) mm a výšku 13 mm. Sestavené zkušební zařízení se umístí na výměnnou ocelovou mezipodložku (o průměru 26 mm a výšce 26 mm), která je vystředěna kroužkem s otvory pro odvod dýmů.

1.6.2.2 *Zkušební podmínky*

Objem vzorku by měl být 40 mm^3 nebo by měl být vhodný pro alternativní zařízení. Pevné látky se zkoušejí v suchém stavu a připravují se tímto způsobem:

a) práškové látky se prosejí sítem (o velikosti oka 0,5 mm); ke zkoušení se použije veškerý podíl, který projde sítem;

b) lisované, lité nebo jiným způsobem zhutněné látky se rozdrtí na malé kousky a prosejí; ke zkoušení se použije prosetý podíl o velikosti částic od 0,5 do 1 mm, který by měl být reprezentativní pro původní látku.

Látky dodávané obvykle ve formě pasty se zkoušejí pokud možno v suchém stavu nebo po odstranění maximálního možného množství ředidla. Kapalné látky se zkoušejí při mezeře 1 mm mezi horním a dolním ocelovým válcem.

▼B

1.6.2.3 *Provedení zkoušek*

Provede se série šesti zkoušek spuštěním závaží o hmotnosti 10 kg z výšky 0,40 m (40 J). Dojde-li během těchto šesti zkoušek při 40 J k výbuchu, musí se provést další série šesti zkoušek spuštěním závaží o hmotnosti 5 kg z výšky 0,15 m (7,5 J). U jiných zařízení se vzorek porovnává se zvolenou referenční látkou za použití stanoveného postupu (např. technikou up-and-down atd).

1.6.2.4 *Hodnocení*

Výsledek zkoušky se považuje za pozitivní, jestliže dojde k výbuchu (vzplanutí nebo třesk jsou rovnocenné výbuchu) alespoň jednou při kterékoli zkoušce se specifikovaným zařízením nebo je-li vzorek citlivější než 1,3-dinitrobenzen nebo RDX v alternativní zkoušce citlivosti na náraz.

1.6.3 **Mechanická citlivost (na tření)**

1.6.3.1 *Zařízení (obrázek 5)*

Třecí zařízení je tvořeno základovou deskou z lité oceli, na které je upevněno třecí zařízení. To je tvořeno nepohyblivým porcelánovým kolíkem a pohyblivou porcelánovou destičkou. Porcelánová destička je upevněna na saních vedených dvěma vodicími lištami. Saně jsou připojeny k elektromotoru ojnicí, excentrickou vačkou a vhodným ozubeným převodem tak, že porcelánová destička vykonává pod porcelánovým kolíkem pohyb tam a zpět na dráze o délce 10 mm. Porcelánový kolík lze zatížit silou buď 120 N, nebo 360 N.

Rovné porcelánové destičky jsou vyrobeny z bílého technického porcelánu (o drsnosti 9 až 32 um) a mají délku 25 mm, šířku 25 mm a výšku 5 mm. Válcový porcelánový kolík je rovněž vyroben z bílého technického porcelánu, má délku 15 mm, průměr 10 mm a zdrsněné kulové plochy s poloměrem zakřivení 10 mm.

1.6.3.2 *Zkušební podmínky*

Objem vzorku by měl být 10 mm^3 nebo by měl být vhodný pro alternativní zařízení.

Pevné látky se zkoušejí v suchém stavu a připravují se tímto způsobem:

a) práškové látky se prosejí sítem (o velikosti oka 0,5 mm); ke zkoušení se použije veškerý podíl, který projde sítem;

b) lisované, lité nebo jiným způsobem zhutněné látky se rozdrtí na malé kousky a prosejí; ke zkoušení se použije prosetý podíl o velikosti částic < 0,5 mm.

Látky dodávané obvykle ve formě pasty se zkoušejí pokud možno v suchém stavu. Nelze-li látku připravit v suchém stavu, zkouší se pasta (po odstranění maximálního možného množství ředidla) ve formě proužku o tloušťce 0,5 mm, šířce 2 mm a délce 10 mm připraveného v tvarovací formě.

▼B

1.6.3.3 *Provedení zkoušek*

Porcelánový kolík se přiloží na zkoušený vzorek a zatíží se. Při provádění zkoušky musí být rýhy v porcelánové destičce orientovány příčně ke směru pohybu. Je nutné dbát na to, aby kolík spočíval na vzorku, aby pod kolíkem leželo dostatečné množství zkoušeného materiálu a také aby se destička pohybovala pod kolíkem správně. U pastovitých látek se pro nanesení látky na destičku používá měrka o tloušťce 0,5 mm s otvorem 2 × 10 mm. Porcelánová destička se musí pohybovat pod porcelánovým kolíkem po dráze 10 mm tam a zpět za 0,44 s. Každá část povrchu destičky a kolíku se smí použít pouze jednou; dva konce každého kolíku slouží pro dva pokusy a každá ze dvou stran destičky slouží pro tři pokusy.

Série šesti zkoušek se provede se zatížením 360 N. Získá-li se během těchto šesti zkoušek pozitivní výsledek, musí se provést další série šesti zkoušek se zatížením 120 N. U jiných zařízení se vzorek porovnává se zvolenou referenční látkou za použití stanoveného postupu (např. technikou up-and-down atd).

1.6.3.4 *Hodnocení*

Výsledek zkoušky se považuje za pozitivní, jestliže dojde k výbuchu (praskání, třesk nebo vzplanutí jsou rovnocenné výbuchu) alespoň jednou při kterékoli zkoušce se specifikovaným zařízením pro stanovení citlivosti na tření nebo splňuje-li ekvivalentní kritéria alternativní zkoušky citlivosti na tření.

2. **DATA**

Látka se v zásadě považuje ve smyslu této směrnice za nebezpečnou z hlediska výbuchu, jestliže jsou získány pozitivní výsledky ve zkoušce citlivosti na působení tepla, ve zkoušce citlivosti na náraz nebo na tření.

3. **ZPRÁVY**

3.1 PROTOKOL O ZKOUŠCE

Protokol o zkoušce má pokud možno obsahovat tyto údaje:

— identifikace zkoušené látky, její složení, čistota, obsah vlhkosti atd.,

— fyzikální forma vzorku, zda se vzorek drtil, mlel nebo prosíval,

— údaje zjištěné při zkoušce citlivosti na působení tepla (např. hmotnost vzorku a počet úlomků atd.),

— pozorované jevy při zkoušce mechanické citlivosti (např. tvorba značného množství dýmu nebo úplný rozklad bez třesku, plameny, jiskry, třesk, praskání atd.),

— výsledky každého typu zkoušky,

— bylo-li použito alternativní zařízení, musí být uvedeno vědecké zdůvodnění použití a důkaz srovnatelnosti výsledků získaných se specifikovaným zařízením a výsledků získaných s rovnocenným zařízením,

▼B

— všechny užitečné poznámky, například odkaz na zkoušky podobných látek, které by mohly mít význam pro správné hodnocení výsledků,

— všechny další poznámky, které mají význam pro interpretaci výsledků.

3.2 INTERPRETACE A VYHODNOCENÍ VÝSLEDKŮ

V protokolu o zkoušce by měly být uvedeny všechny výsledky, které jsou považovány za chybné, anomální nebo nereprezentativní. Má-li být kterýkoli z těchto výsledků vyloučen, mělo by být uvedeno vysvětlení a výsledky jakéhokoli alternativního nebo doplňkového zkoušení. Pokud nelze anomální výsledek vysvětlit, musí být přijat tak, jak byl dosažen, a musí být použit k odpovídající klasifikaci látky.

4. **LITERATURA**

1) Recommendations on the Transport of Dangerous Goods: Tests and criteria, 1990, United Nations, New York.

2) Bretherick, L., Handbook of Reactive Chemical Hazards, 4th edition, Butterworths, London, ISBN 0-750-60103-5, 1990.

3) Koenen, H., Ide, K.H. and Swart, K.H., Explosivstoffe, 1961, vol.3, 6–13 and 30–42.

(4) NF T 20-038 (Sept. 85). Chemical products for industrial use -Determination of explosion risk.

▼B

Doplněk

příklad materiálové specifikace pro zkoušku citlivosti na působení tepla (viz DIN 1623)

1) Trubka: materiálová specifikace č. 1.0336.505 g

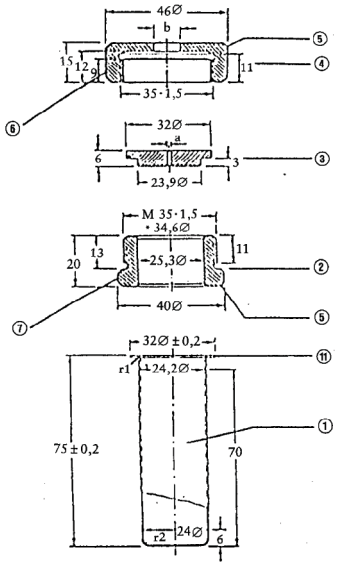
2) Clona s otvorem: materiálová specifikace č. 1.4873

3) Závitová příruba a matice: materiálová specifikace č. 1.3817

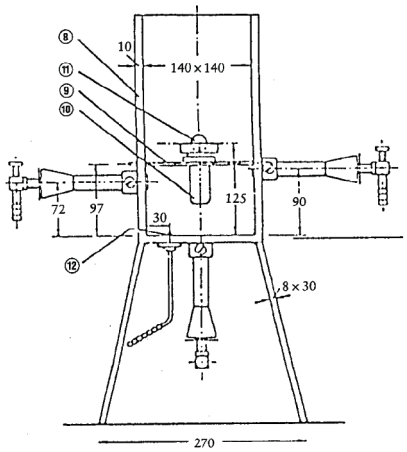
Obrázek 1

Zařízení pro zkoušku citlivosti na působení tepla

(všechny rozměry v mm)



Obr. 1a Ocelová trubka a příslušenství



Obr. 1b Ohřívací ochranné zařízení

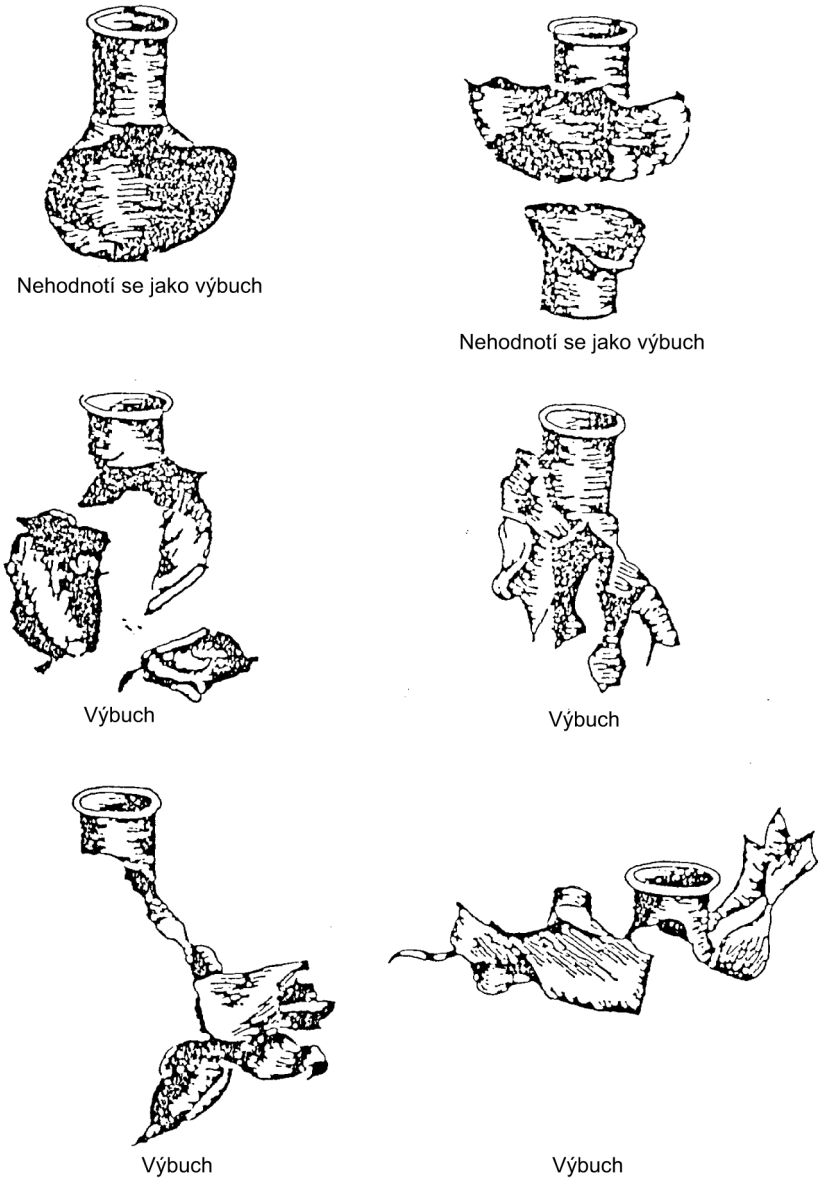
1. Trubka
1a. Vnější příruba
2. Prstenec se závitem (závit s nízkým třením)
3. Clona s otvorem o průměru a = 2,0 nebo 6,0 mm
4. Matice s otvorem o průměru b = 10 mm
5. Zkosená hrana
6. Dvě rovné plošky pro klíč 41
7. Dvě rovné plošky pro klíč 36
8. Ochranný kryt odolný vůči střepinám
9. Dvě opěrné tyče pro trubku
10. Sestavená trubka
11. Poloha zadního hořáku: ostatní hořáky jsou vidět
12. Zapalovací hořáček

▼B

Obrázek 2

Zkouška citlivosti na působení tepla

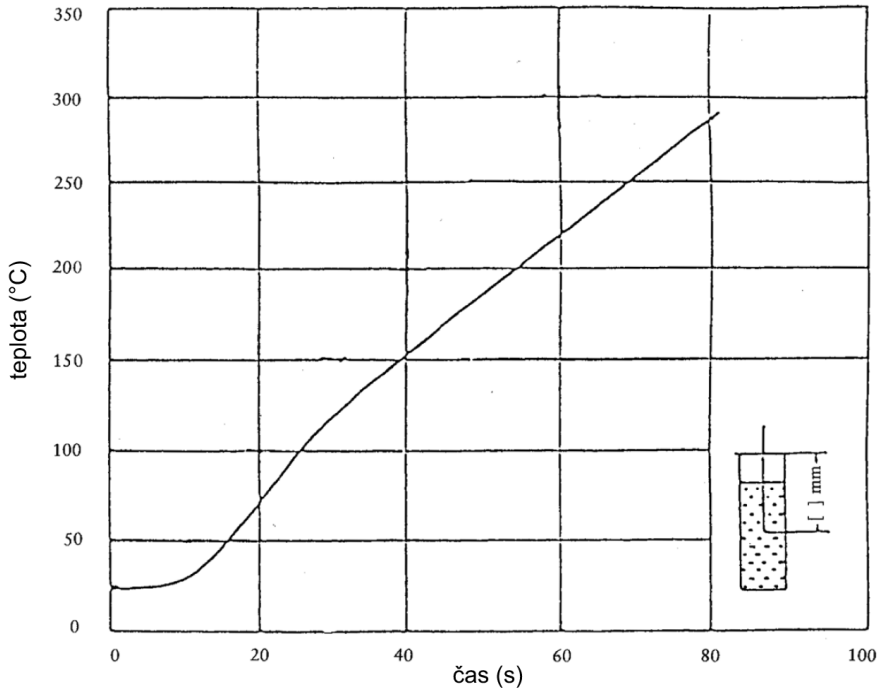
(příklady roztržení trubky)



▼B

Obrázek 3

Kalibrace rychlosti ohřevu pro zkoušku citlivosti na působení tepla



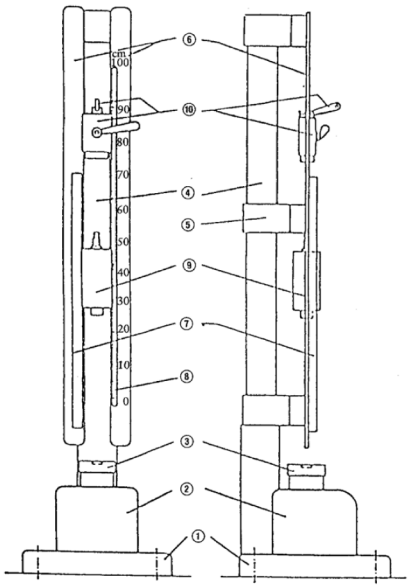
Křivka závislosti teploty na čase získaná při zahřívání dibutyl-ftalátu (27 cm^3) v uzavřené trubce (s clonou 1,5 mm) při průtoku propanu 3,2 litry za minutu. Teplota byla měřena chromel/alumelovým termočlánkem o průměru 1 mm, zapouzdřeným v korozivzdorné oceli a umístěným 43 mm pod okrajem trubky. Rychlost zahřívání mezi 135 °C a 285 °C by měla být 185 až 215 K/min.

▼B

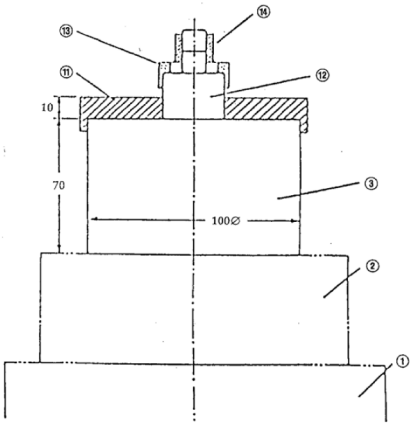
Obrázek 4

Zařízení pro zkoušku citlivosti na mráz

(všechny rozměry v mm)



Obr. 4a Padací kladivo, čelní a boční celkový pohled



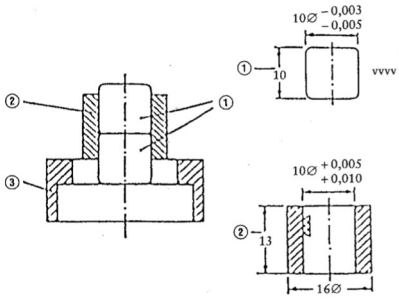
Obr. 4b Padací kladivo, spodní část

1. Základová deska 450 × 450 × 60
2. Blok z oceli 230 × 250 × 200
3. Kovadlina, průměr 100 × 70
4. Sloup
5. Střední nosník
6. Dvě vodicí lišty
7. Ozubená tyč
8. Měřítko
9. Padací kladivo
10. Zadržovací a uvolňovací zařízení
11. Středicí objímka
12. (Výměnná) mezipodložka o půměru 26 × 26
13. Středicí kroužek s otvory
14. Nárazové zařízení

▼B

Obrázek 4

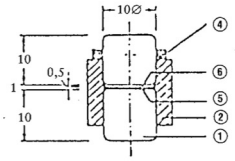
Pokračování

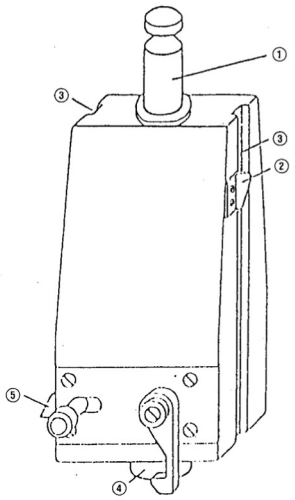


Obr. 4c Zařízení pro zkoušku citlivosti práškových a pastových látek na náraz

Obr. 4d Zařízení pro zkoušku citlivosti kapalných látek na náraz

1. Ocelové válečky
2. Vodicí pouzdro pro ocelové válečky
3. Středicí kroužek s otvory
   a) svislý řez
   b) průřez
4. Pryžový prstenec
5. Kapalná látka (40 mm^3)
6. Prostor bez kapaliny





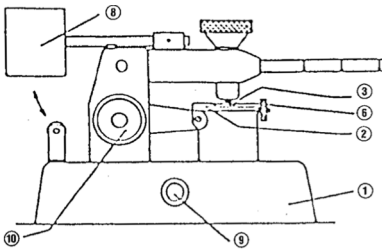
Obr. 4e Kladivo (závaží 5 kg)

1. Upínací čep
2. Polohová značka
3. Vodicí drážky
4. Úderník
5. Aretační zařízení

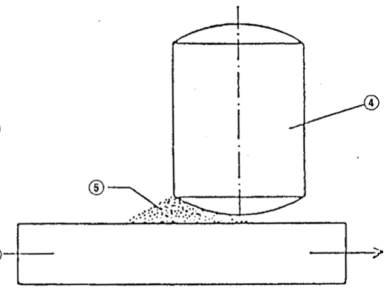
▼B

Obrázek 5

Zařízení pro zkoušku citlivosti na tření



Obr. 5a Třecí zařízení, boční a půdorysný pohled



Obr. 5b Výchozí poloha válečku a vzorku

1. Ocelový podstavec
2. Pohyblivé sáně
3. Porcelánová destička, 25 × 25 × 25 mm, upevněná na saních
4. Upevněný porcelánový kolík 10 × 15 mm
5. Zkoušený vzorek, přibližně 10 mm^3
6. Držák kolíku
7. Zatěžovací rameno
8. Protižávaží
9. Kolečko pro nastavení saní do výchozí polohy
10. Směr k elektromotoru

▼B

A.15 BOD SAMOZÁPALU (KAPALINY A PLYNY)

METODA

1.1 ÚVOD

Výbušné látky a látky, které se spontánně vznítí při styku se vzduchem při teplotě okolí, by neměly být předmětem této zkoušky. Zkušební postup je použitelný pro plyny, kapaliny a páry, které se mohou za přítomnosti vzduchu vznítit na horkém povrchu.

Bod samozápalu může být značně snížen vlivem katalytických nečistot, materiálu povrchu nebo většího objemu zkušební nádoby.

1.2 DEFINICE A JEDNOTKY

Míra schopnosti látky samovolně se vznítit se vyjadřuje teplotou samozápalu. Bod samozápalu je nejnižší teplota, při které se zkoušená látka smíchaná se vzduchem za podmínek stanovených v této zkušební metodě vznítí.

1.3 REFERENČNÍ LÁTKY

Referenční látky jsou uvedeny v normách (viz 1.6.3). Měly by především sloužit k občasné kontrole provedení metody a ke vzájemnému porovnávání výsledků získaných jinými metodami.

1.4 PODSTATA METODY

Metodou se stanoví minimální teplota vnitřního povrchu uzavřeného prostoru, která způsobí vznícení plynu, páry nebo kapaliny vpravených do tohoto prostoru.

1.5 KRITÉRIA JAKOSTI

Opakovatelnost se mění v závislosti na rozpětí bodů samozápalu a na použité zkušební metodě.

Citlivost a specifičnost závisejí na použité zkušební metodě.

1.6 POPIS METODY

1.6.1 **Aparatura**

Aparatura je popsána v metodě uvedené v bodě 1.6.3.

1.6.2 **Zkušební podmínky**

Vzorek zkoušené látky se zkouší metodou uvedenou v bodě 1.6.3.

1.6.3 **Provedení zkoušky**

Viz IEC 79-4, DIN 51794, ASTM-E 659-78, BS 4056, NF T 20-037.

▼B

2. **DATA**

Zaznamená se zkušební teplota, atmosférický tlak, množství použitého zkoušeného vzorku a časová prodleva před vznícením.

3. **ZPRÁVY**

Protokol o zkoušce má pokud možno obsahovat tyto údaje:

— přesná specifikace látky (identifikace a nečistoty),

— použité množství vzorku, atmosférický tlak,

— použitá aparatura,

— výsledky měření (zkušební teploty, výsledky týkající se vznícení, příslušná časová prodleva),

— všechny další poznámky, které mají význam pro interpretaci výsledků.

4. **LITERATURA**

Není uvedena.

▼B

A.16 RELATIVNÍ TEPLOTA SAMOZÁPALU PEVNÝCH LÁTEK

1. METODA

1.1 ÚVOD

Výbušné látky a látky, které se spontánně vznítí při styku se vzduchem při teplotě okolí, by neměly být předmětem této zkoušky.

Účelem této zkoušky je poskytnout předběžnou informaci o schopnosti pevných látek samovolně se vznítit za zvýšených teplot.

Pokud teplo uvolňované buď reakcí látky s kyslíkem, nebo exotermním rozkladem není dostatečně rychle odváděno do okolí, nastává samovolné zahřívání látky, které může vést až k jejímu samozápalu. K samozápalu tedy dojde, je-li rychlost vývinu tepla vyšší než rychlost odvádění tepla.

Zkušební postup je užitečný jako předběžná screeningová zkouška pro pevné látky. Z hlediska složité povahy vznícení a hoření pevných látek by měl být bod samozápalu stanovený touto metodou použit pouze ke srovnávacím účelům.

1.2 DEFINICE A JEDNOTKY

Bod samozápalu získaný touto metodou je minimální teplota okolí látky vyjádřená ve ^{o}C, při které se určité množství látky za definovaných podmínek vznítí.

1.3 REFERENČNÍ LÁTKA

Žádná.

1.4 PODSTATA METODY

Určité množství vzorku zkoušené látky se za teploty okolí vloží do pece; zatímco se teplota pece zvyšuje rychlostí 0,5^{o}C/min na 400 ^{o}C nebo do bodu tání vzorku, je-li nižší, zaznamenává se křivka závislosti teploty ve středu zkoušeného vzorku na čase. Pro účely této zkoušky se za bod samozápalu látky považuje teplota pece, při které dosáhne teplota zkoušeného vzorku samovolným zahříváním 400 ^{o}C.

1.5 KRITÉRIA JAKOSTI

Žádná.

1.6 POPIS METODY

1.6.1 **Aparatura**

1.6.1.1 *Pec*

Laboratorní pec (o obsahu přibližně 2 litry) vybavená programovatelnou regulací teploty, přirozenou cirkulací vzduchu a pojistným přetlakovým zařízením. Aby se předešlo možnému riziku výbuchu, nesmí přijít rozkladné plyny do styku s elektrickými topnými elementy.

▼B

1.6.1.2 *Krychle z drátěného pletiva*

Podle šablony na obrázku 1 se vystřihne kus z drátěného korozi vzdorného pletiva o velikosti otvorů 0,045 mm. Vystřižený kus se složí do formy nahoře otevřené krychle a zajistí se drátkem.

1.6.1.3 *Termočlánky*

Vhodné termočlánky.

1.6.1.4 *Zapisovač*

Jakýkoli dvoukanálový zapisovač kalibrovaný pro teploty od 0 °C do 600 °C nebo jim odpovídající napětí.

1.6.2 **Zkušební podmínky**

Látky se zkouší ve stavu, v jakém byly obdrženy.

1.6.3 **Provedení zkoušky**

Drátěná krychle se naplní zkoušenou látkou, jemně se poklepe a přidá se tolik látky, aby byla krychle zcela naplněna. Krychle se poté při laboratorní teplotě zavěsí do středu pece. Jeden termočlánek se umístí do středu krychle a druhý mezi krychli a stěnu pece pro záznam teploty pece.

Teploty pece a vzorku se nepřetržitě zaznamenávají, zatímco se teplota pece plynule zvyšuje rychlostí 0,5°C/min až do teploty 400 °C nebo do bodu tání vzorku, je-li nižší.

Když se látka vznítí, termočlánky zaznamenají velmi prudký nárůst teploty nad teplotou pece.

2. **DATA**

Pro hodnocení je důležitá teplota pece, při které dosáhla teplota vzorku samovolným zahříváním 400 °C (viz obrázek 2).

3. **ZPRÁVY**

Protokol o zkoušce má pokud možno obsahovat tyto údaje:

— popis zkoušené látky,

— výsledky měřeni včetně křivky závislosti teploty na čase,

— všechny další poznámky, které mají význam pro interpretaci výsledků.

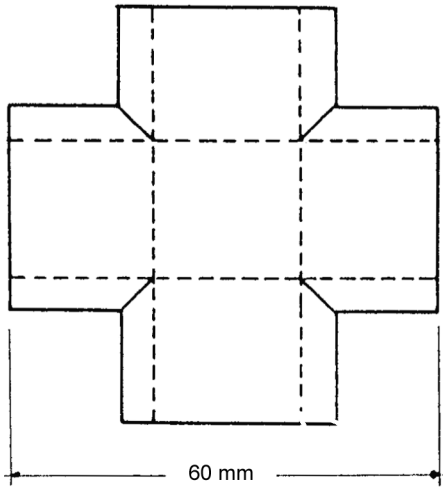
4. **LITERATURA**

NF T 20-036 (September 85). Chemical products for industrial use. Determination of the relative temperature of the spontaneous flammability of solids.

▼B

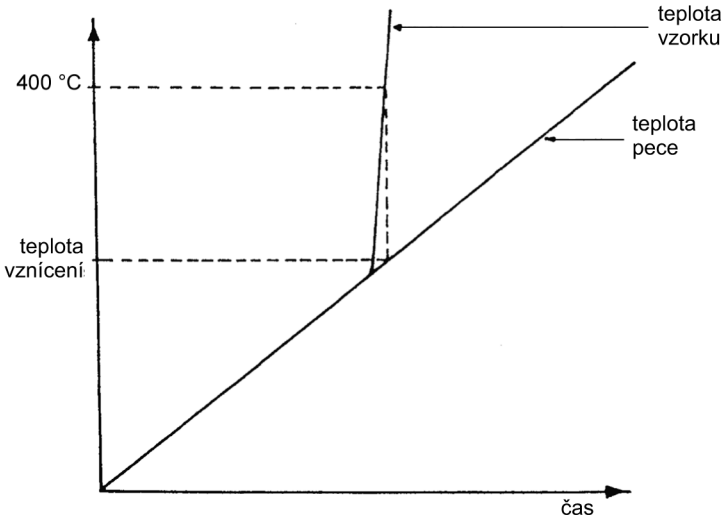
Obrázek 1

Šablona krychle o délce strany 20 mm



Obrázek 2

Typická křivka závislosti teploty na čase



▼B

A.17 OXIDAČNÍ VLASTNOSTI (PEVNÉ LÁTKY)

1. METODA

1.1 ÚVOD

Před provedením této zkoušky je vhodné mít předběžné informace o možných výbušných vlastnostech látky.

Tato zkouška není použitelná pro kapaliny, plyny, výbušné nebo vysoce hořlavé látky nebo pro organické peroxidy.

Zkouška se neprovádí, jestliže ze strukturního vzorce bez pochyby vyplývá, že tato látka nemá schopnost exotermně reagovat s hořlavým materiálem.

Ke zjištění, zda by se zkouška neměla provádět za speciálních bezpečnostních opatření, je třeba provést předběžnou zkoušku.

1.2 DEFINICE A JEDNOTKY

Doba hoření: doba reakce v sekundách potřebná k průchodu reakční zóny prachovou housenkou podle postupu popsaného v bodě 1.6.

Rychlost hoření: vyjadřuje se v mm/s.

Maximální rychlost hoření: nejvyšší hodnota rychlosti hoření, která byla naměřena pro směsi obsahující 10 až 90 % hmot. oxidující látky.

1.3 REFERENČNÍ LÁTKA

Pro zkoušku a pro předběžnou zkoušku se jako referenční látka používá dusičnan barnatý čistoty p.a.

Referenční směsí je směs dusičnanu barnatého a práškové celulosy připravená podle bodu 1.6, která má maximální rychlost hoření (obvykle jde o směs obsahující 60 % hmot. dusičnanu barnatého).

1.4 PODSTATA METODY

V zájmu bezpečnosti se provede předběžná zkouška. Jestliže předběžná zkouška jasně prokáže, že látka má oxidační vlastnosti, žádné další zkoušky se nevyžadují. Není-li tomu tak, podrobí se látka úplné zkoušce.

Při úplné zkoušce se látka, která má být zkoušena, a definovaná hořlavá látka smísí v různých poměrech. Každá směs je poté upravena do tvaru prachové housenky a ta se na jednom konci zapálí. Stanovená maximální rychlost hoření se porovná s maximální rychlostí hoření referenční směsi.

1.5 KRITERIA JAKOSTI

Vhodná je každá technika mletí a mísení, pro niž se neliší maximální rychlosti hoření v šesti samostatných zkouškách od aritmetického průměru o více než 10 %.

▼B

1.6 POPIS METODY

1.6.1 **Příprava**

1.6.1.1 *Zkoušená látka*

Velikost částic zkoušeného vzorku se sníží na < 0,125 mm následujícím postupem: zkoušená látka se proseje, podíl zachycený na sítě se drtí a celý postup se opakuje, dokud celá zkoušená dávka neprojde sítem.

Lze použít jakoukoli techniku mletí a prosévání, která vyhoví kritériím jakosti.

Před přípravou směsi se látka suší při 105 °C do konstantní hmotnosti. Pokud se zkoušená látka rozkládá při teplotě nižší než 105 °C, musí se látka sušit při vhodné nižší teplotě.

1.6.1.2 *Hořlavá látka*

Jako hořlavá látka se používá prášková celulosa. Doporučuje se typ celulosy používaný pro chromatografii na tenké vrstvě nebo pro sloupcovou chromatografii. Jako vhodný se prokázal typ, který má délku více než 85 % vláken od 0,020 mm a 0,075 mm. Celulosový prášek se proseje sítem o velikosti oka 0,125 mm. V průběhu zkoušky se používá tatáž šarže celulosy.

Před přípravou směsi se prášková celulosa suší při 105 °C do konstantní hmotnosti.

Pokud se při předběžné zkoušce použije dřevitá moučka, připraví se z měkkého dřeva shromážděním podílu, který projde sítem o velikosti oka 1,6 mm, důkladným promícháním a následným sušením čtyři hodiny při teplotě 105 °C ve vrstvě o tloušťce nepřesahující 25 mm. Ochladí se a do okamžiku použití, ke kterému by mělo dojít nejlépe do 24 hodin, se uchovává v co nejvíce naplněné vzduchotěsné nádobě.

1.6.1.3 *Zdroj zapálení*

Jako zdroj zapálení se použije plamen plynového hořáku (o minimálním průměru 5 mm). Použije-li se jiný zdroj zapálení (např. při zkoušce v inertní atmosféře), uvede se popis a zdůvodnění.

1.6.2 **Provedení zkoušky**

Poznámka:

Směsi oxidantů a celulosy nebo dřevité moučky se musí považovat za potenciálně výbušné a musí se s nimi zacházet s náležitou opatrností.

1.6.2.1 *Předběžná zkouška*

Vysušená látka se důkladně promíchá s vysušenou celulosou nebo dřevitou moučkou v poměru 2 hmotnostní díly zkoušené látky a 1 hmotnostní díl celulosy nebo dřevité moučky a směs se upraví do tvaru malého kužele o rozměrech 3,5 cm (průměr základny) × 2,5 cm (výška) naplněním bez pěchování do kuželové formy (např. do laboratorní skleněné nálevky s utěsněným stonkem).

▼B

Zkoušený vzorek se položí na chladnou, nehořlavou, neporézní a málo tepelně vodivou podkladovou desku. Zkouška se provede v digestoři podle bodu 1.6.2.2.

Zdroj zapálení se přiloží ke kuželu. Sleduje se a zaznamená se prudkost a doba trvání výsledné reakce.

Látka se považuje za oxidující, je-li reakce prudká.

V případě, že výsledek vzbuzuje pochybnosti, je nezbytné vykonat úplnou níže popsanou zkoušku s prachovou housenkou.

1.6.2.2 *Zkouška s prachovou housenkou*

Připraví se směsi oxidantu s celulosou obsahující 10 až 90 % hmot. oxidantu, po 10 % přírůstcích. Přesnější hodnota maximální rychlosti hoření se v mezních případech získá použitím mezilehlé směsi oxidantu s celulosou.

Zkoušený vzorek se upraví pomocí formy. Kovová forma je 250 mm dlouhá a má trojúhelníkový příčný průřez o vnitřní výšce 10 mm a šířce 20 mm. Na obě podélné strany formy se upevní dvě kovové desky se základnou jako bočnice, které přečnívají o 2 mm nad horní okraj trojúhelníkové formy (obrázek). Forma se bez zhutnění naplní mírným přebytkem směsi. Po spuštění formy z výšky 2 cm na pevný povrch se přebytek látky seškrábne stěrkou. Bočnice se odstraní a zbývající prášek se uhladí válečkem. Na horní část formy se položí nehořlavá, neporézní a málo tepelně vodivá deska, sestava se převrátí a forma odstraní.

Zkoušený vzorek se umístí v digestoři kolmo na směr odtahu.

Rychlost proudění odsávaného vzduchu by měla stačit k zamezení úniku dýmu do laboratoře a neměla by se v průběhu zkoušky měnit. Kolem zkušebního zařízení by se měly postavit ochranné clony proti nadměrnému proudění vzduchu.

Zkouška se provede co nejrychleji s ohledem na hygroskopičnost celulosy a některých zkoušených látek.

Jeden konec prachové housenky se zapálí plamenem hořáku.

Poté, co reakční zóna dosáhne vzdálenosti 30 mm, měří se doba, za kterou se reakce rozšíří na vzdálenost 200 mm.

Zkouška se provede s referenční látkou a alespoň jednou s každou z řady směsí zkoušené látky s celulosou.

Pokud se zjistí, že maximální rychlost hoření je značně vyšší, než rychlost hoření referenční směsi, lze zkoušku ukončit; v opačném případě se zkouška opakuje pětkrát s každou ze tří směsí s nejvyššími rychlostmi hoření.

▼B

Existuje-li podezření, že je výsledek falešně pozitivní, opakuje se zkouška s inertní látkou se stejnou velikostí částic, např. s křemelinou, namísto celulosy. Směs zkoušené látky s celulosou s nejvyšší rychlostí hoření by měla být eventuálně znovu zkoušena v inertní atmosféře (s obsahem kyslíku < 2 % obj.).

2. **DATA**

Z bezpečnostních důvodů se považuje za charakteristickou oxidační vlastnost zkoušené látky maximální rychlost hoření, nikoli průměrná hodnota.

Pro vyhodnocení je důležitá nejvyšší hodnota rychlosti hoření zjištěná v šesti zkouškách dané směsi.

Do grafu se vynesou nejvyšší hodnoty rychlosti hoření pro každou směs proti koncentraci oxidantu. Z grafu se odečte nejvyšší rychlost hoření.

Šest hodnot rychlosti hoření naměřených pro směs s maximální rychlostí hoření se nesmí lišit od aritmetického průměru o více než 10 %; v opačném případě se musí zlepšit technika drcení a mísení.

Naměřená maximální rychlost hoření se porovná s maximální rychlostí hoření referenční směsi (viz 1.3).

Provedou-li se zkoušky v inertní atmosféře, porovná se maximální rychlost reakce s rychlostí naměřenou pro referenční směs v inertní atmosféře.

3. **ZPRÁVA**

3.1 PROTOKOL O ZKOUŠCE

Protokol o zkoušce má pokud možno obsahovat tyto údaje:

— identifikace zkoušené látky, její složení, čistota, vlhkost atd.,

— jakákoli úprava zkoušeného vzorku (např. drcení, sušení),

— zdroj zapálení použitý při zkouškách,

— výsledky měření,

— charakter reakce (např. vzplanutí na povrchu, hoření v celé hmotě, jakékoli informace o produktech hoření atd.),

— všechny další poznámky, které mají význam pro interpretaci výsledků, včetně popisu prudkosti reakce (hoření plamenem, jiskření, uvolňování dýmu, pomalé doutnání atd.) a přibližné doby trvání předběžné bezpečnostní/screeningové zkoušky jak pro zkoušenou, tak pro referenční látku,

— výsledky ze zkoušek s inertní látkou, pokud byly prováděny,

— výsledky ze zkoušek v inertní atmosféře, pokud byly prováděny.

▼B

3.2 INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

Látka je považována za oxidující, je-li:

a) při předběžné zkoušce zjištěna prudká reakce;

b) při úplné zkoušce maximální rychlost hoření zkoušených směsí vyšší nebo stejná jako maximální rychlost hoření referenční směsi celulosy a dusičnanu barnatého.

S cílem vyloučit falešně pozitivní výsledky by měly být vzaty v úvahu také výsledky získané při zkoušení látky ve směsi s inertním materiálem a/nebo při zkoušce v inertní atmosféře.

4. **LITERATURA**

NF T 20-035 (SEPT 85). Chemical products for industrial use. Determination of the oxidizing properties of solids.

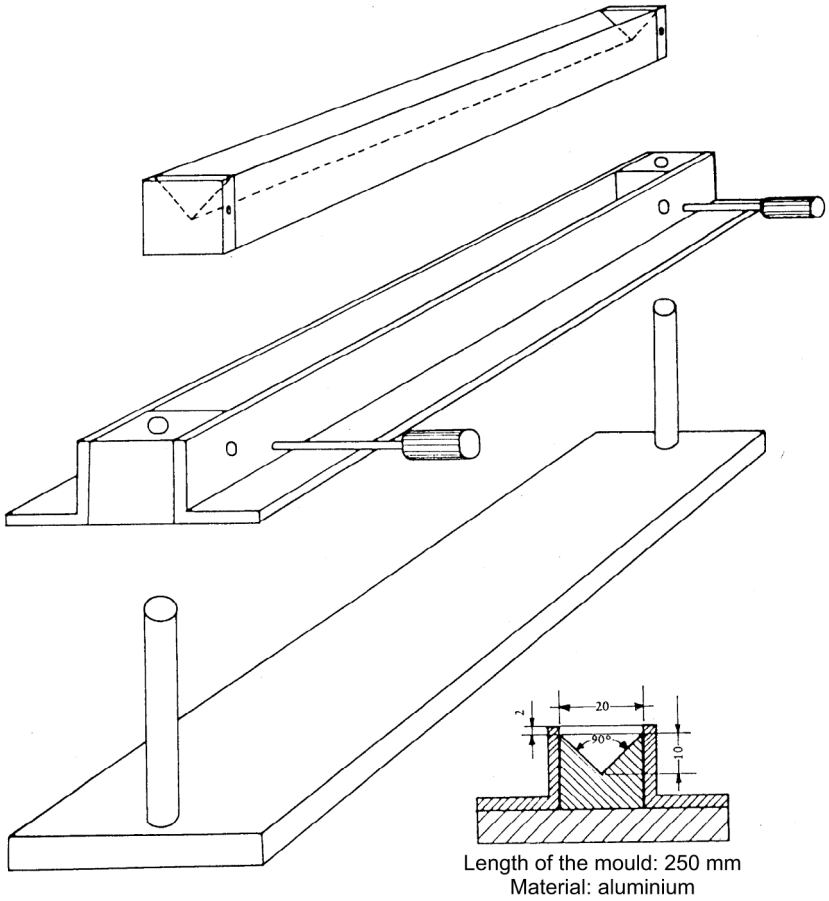
▼B

Doplněk

Obrázek

Forma a příslušenství pro přípravu zkoušeného vzorku ve tvaru prachové housenky

(všechny rozměry jsou v milimetrech)



▼B

A.18 POČETNĚ PRŮMĚRNÁ MOLEKULOVÁ HMOTNOST A DISTRIBUCE MOLEKULOVÉ HMOTNOSTI POLYMERŮ

1. METODA

Tato gelově permeační chromatografická metoda je replikou metody OECD TG 118 (1996). Základní principy a další technické informace jsou uvedeny v odkaze (1).

1.1 ÚVOD

Vlastnosti polymerů jsou tak rozdílné, že není možné popsat jedinou metodu a přesně stanovit podmínky separace a hodnocení, které by pokryly všechny eventuality a specifika vyskytující se při separaci polymerů. Zejména pro složité polymerní systémy není gelově permeační chromatografie (GPC) vždy vhodná. Není-li GPC použitelná, může být molekulová hmotnost stanovena jinými metodami (viz příloha). V takových případech by měly být uvedeny veškeré podrobnosti a zdůvodnění použité metody.

Popsaná metoda je založena na normě DIN 55672 (1). Podrobné informace o provádění experimentů a o hodnocení údajů lze nalézt v uvedené normě DIN. V případě, že jsou nezbytné úpravy experimentálních podmínek, musí být změny zdůvodněny. Mohou být použity jiné normy, jsou-li na ně uvedeny úplné odkazy. V popsané metodě jsou ke kalibraci použity vzorky polystyrenu o známé polydisperzitě a metoda může být upravena tak, aby byla vhodná pro určité polymery, např. ve vodě rozpustné polymery a polymery s dlouhými větvemi.

1.2 DEFINICE A JEDNOTKY

Početně průměrná molekulová hmotnost M_na hmotnostně průměrná molekulová hmotnost M_w se stanoví pomocí těchto rovnic:

$$M_n = \frac{\sum_{i=1}^{n} H_i}{\sum_{i=1}^{n} H_i/M_i} \qquad M_w = \frac{\sum_{i=1}^{n} H_i \times M_i}{\sum_{i=1}^{n} H_i}$$

kde:

H_i je výška signálu detektoru nad základní čarou pro retenční objem V_i,

M_i je molekulová hmotnost frakce polymeru s retenčním objemem V_i a

n je počet údajů.

Šířka distribuce molekulové hmotnosti, která je mírou polydisperzity systému, je dána poměrem M_w/M_n.

▼B

1.3 REFERENČNÍ LÁTKY

Vzhledem k tomu, že GPC je relativní metoda, musí být provedena kalibrace. k tomuto účelu se obvykle používá lineární polystyrenový standard s úzkou distribucí se známými průměrnými molekulovými hmotnostmi M_n a M_w a se známou distribucí molekulové hmotnosti. Kalibrační křivka může být pro stanovení molekulové hmotnosti neznámého vzorku použita pouze tehdy, byly-li podmínky separace vzorku a standardů identické.

Stanovený vztah mezi molekulovou hmotností a elučním objemem je platný pouze za specifických podmínek určitého experimentu. Podmínky zahrnují především teplotu, rozpouštědlo (nebo směs rozpouštědel), chromatografické podmínky a separační kolonu nebo systém kolon.

Molekulové hmotnosti stanovené tímto způsobem jsou relativními hodnotami a označují se jako „molekulové hmotnosti ekvivalentní polystyrenu“. To znamená, že se molekulová hmotnost bude v závislosti na strukturních a chemických rozdílech mezi vzorkem a standardem od absolutní hodnoty více či méně lišit. Použijí-li se jiné standardy, např. poly(ethylenglykol), poly(ethylenoxid), poly(methyl-methakrylát), poly(akrylová kyselina), musí být použití zdůvodněno.

1.4 PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

Distribuce molekulové hmotnosti vzorku i průměrné molekulové hmotnosti (M_n, M_w) lze stanovit metodou GPC. GPC je speciální typ kapalinové chromatografie, při němž se vzorek dělí podle hydrodynamických objemů jednotlivých složek (2).

Separace probíhá při průchodu vzorku kolonou naplněnou porézním materiálem, obvykle organickým gelem. Malé molekuly proniknou do pórů, zatímco velké molekuly nikoli. Průchod velkých molekul je tedy kratší a jsou eluovány nejdříve. Středně velké molekuly pronikají do některých pórů a jsou eluovány později. Nejmenší molekuly se středním hydrodynamickým poloměrem menším než velikost pórů gelu pronikají do všech pórů. Tyto molekuly jsou eluovány nakonec.

V ideálním případě závisí separace pouze na velikosti molekul, ale v praxi je obtížné vyhnout se alespoň některým rušivým adsorpčním jevům. Nestejnoměrné plnění kolony a mrtvé objemy mohou situaci zhoršit (2).

Detekce se provádí například měřením indexu lomu nebo UV absorpce a výsledkem je jednoduchá distribuční křivka. Má-li být však křivce přiřazena skutečná molekulová hmotnost, je nezbytné kalibrovat kolonu polymery se známou molekulovou hmotností a v ideálním případě v podstatě podobnou strukturou, např. různými polystyrenovými standardy. Křivka má zpravidla gaussovský tvar, někdy deformovaný prodloužením na straně nízké molekulové hmotnosti, přičemž svislá osa udává hmotnostní zlomek různých molekulových hmotností a na vodorovné ose je vynesen logaritmus molekulové hmotnosti.

▼B

1.5 KRITÉRIA JAKOSTI

Opakovatelnost (relativní směrodatná odchylka: RSD) elučního objemu by měla být lepší než 0,3 %. Je-li chromatogram hodnocen v závislosti na čase a neodpovídá výše uvedenému kritériu (1), musí být požadovaná opakovatelnost zajištěna korekcí vnitřním standardem. Polydisperzity jsou závislé na molekulových hmotnostech standardů. V případě polystyrenových standardů jsou typickými hodnotami:

$M_p < 2\,000$	$M_w/M_n < 1{,}20$
$2\,000 \leq M_p \leq 10^6$	$M_w/M_n < 1{,}05$
$M_p > 10^6$	$M_w/M_n < 1{,}20$

(M_p je molekulová hmotnost standardu odpovídající maximu píku)

1.6 POPIS ZKUŠEBNÍ METODY

1.6.1 **Příprava standardních roztoků polystyrenu**

Polystyrenové standardy se rozpustí opatrným mícháním ve zvoleném eluentu. Při přípravě roztoků se musí zohlednit doporučení výrobce.

Koncentrace zvolených standardů závisí na různých faktorech, např. na vstřikovaném objemu, viskozitě roztoku a citlivosti analytického detektoru. Maximální vstřikovaný objem musí být přizpůsoben délce kolony, aby nedošlo k přesycení. Typické vstřikované objemy pro analytickou separaci pomocí GPC s kolonou o rozměrech 30 cm × 7,8 mm jsou obvykle 40 až 100 µl. Větší objemy jsou možné, ale neměly by překročit 250 µl. Optimální poměr mezi vstřikovaným objemem a koncentrací musí být stanoven před vlastní kalibrací kolony.

1.6.2 **Příprava roztoku vzorku**

Stejné požadavky platí v zásadě pro přípravu roztoků vzorku. Vzorek se opatrným třepáním rozpustí ve vhodném rozpouštědle, např. v tetrahydrofuranu (THF). V žádném případě by neměl být rozpuštěn pomocí ultrazvukové lázně. Je-li to nezbytné, přečistí se roztok vzorku filtrací přes membránový filtr o velikosti pórů 0,2 až 2 um.

Přítomnost nerozpuštěných částic musí být zaznamenána v závěrečném protokolu, neboť mohou pocházet z frakcí s vysokou molekulovou hmotností. Pro stanovení hmotnostní koncentrace nerozpuštěných částic vyjádřené v procentech by měla být použita vhodná metoda. Roztoky by měly být použity do 24 hodin.

1.6.3 **Přístroje a pomůcky**

— zásobník rozpouštědla,

— odplynovací zařízení (podle potřeby),

— dávkovací čerpadlo,

▼B

— tlumič rázů (podle potřeby),

— vstřikovací systém,

— chromatografické kolony,

— detektor,

— průtokoměr (podle potřeby),

— zapisovač,

— nádoba na odpad.

Musí být zajištěno, aby byl systém GPC inertní k použitým rozpouštědlům (např. použitím ocelových kapilár pro THF).

1.6.4 **Vstřikování a systém dávkování rozpouštědla**

Určený objem roztoku vzorku se vnese na kolonu buď dávkovačem, nebo ručně v ostře ohraničené zóně. Příliš rychlý pohyb pístu vzad nebo vpřed (při ručním vnesení) může způsobit změny v pozorované distribuci molekulové hmotnosti. Dávkovač rozpouštědla by pokud možno neměl působit rázy a v ideálním případě by měl být opatřen tlumičem rázů. Průtok je řádově 1 ml/min.

1.6.5 **Kolona**

Podle typu vzorku se k charakterizaci polymeru použije jednoduchá kolona nebo několik za sebou řazených kolon. Komerčně je dostupná řada porézních materiálů definovaných vlastností (např. velikost pórů, vylučovací meze). Výběr separačního gelu nebo délky kolony závisí jak na vlastnostech vzorku (hydrodynamický objem, distribuce molekulové hmotnosti), tak na specifických podmínkách separace, jako jsou rozpouštědlo, teplota a průtok (1, 2, 3).

1.6.6 **Teoretická patra**

Použitá kolona nebo kombinace kolon musí být charakterizována počtem teoretických pater. Při použití THF jako eluentu to zahrnuje vnesení roztoku ethylbenzenu nebo jiné vhodné nepolární rozpuštěné látky na kolonu známé délky. Počet teoretických pater je dán touto rovnicí:

$$N = 5{,}54 \left(\frac{V_e}{W_{1/2}} \right)^2 \qquad \text{nebo} \qquad N = 16 \left(\frac{V_e}{W} \right)^2$$

kde,

N = je počet pater v maximu,

V_e = je eluční objem píku,

▼B

W = šířka píku na základní čáře,

$W_{1/2}$ = šířka píku v polovině výšky.

1.6.7 **Separační účinnost**

Vedle počtu teoretických pater, který je veličinou určující šířku pásu, hraje roh také separační účinnost, která se stanoví ze strmosti kalibrační křivky. Separační účinnost kolony se získá z tohoto vztahu

$$\frac{V_{e,M_x} - V_{e,(10M_x)}}{\text{plocha průřezu kolony}} \geq 6{,}0 \left[\frac{cm^3}{cm^2}\right]$$

kde,

$V_{e,\ M_x}$ = je eluční objem pro polystyren s molekulovou hmotností M_x,

$V_{e,(10.M_x)}$ = je eluční objem pro polystyren s 10krát větší molekulovou hmotností.

Rozlišení systému je obecně definováno tímto vztahem:

$$R_{1,2} = 2 \times \frac{V_{e1} - V_{e2}}{W_1 + W_2} \times \frac{1}{\log_{10}(M_2/M_1)}$$

kde,

V_{e1}, V_{e2} = Jsou eluční objemy dvou standardů polystyrenu v maximu píku,

W_1, W_2 = jsou šířky píků na základní čáře,

M_1, M_2 = jsou molekulové hmotnosti odpovídající maximu píků (měly by se lišit faktorem 10).

Hodnota R pro kolonový systém by měla být větší než 1,7 (4).

1.6.8 **Rozpouštědla**

Všechna rozpouštědla musí mít vysokou čistotu (v případě THF 99,5 % čistotu). Zásobník rozpouštědla (v případě potřeby pod inertní atmosférou) musí být dostatečně velký pro kalibraci kolony a pro několik analýz vzorku. Z rozpouštědla musí být před jeho dopravou čerpadlem na kolonu odstraněny plyny.

1.6.9 **Kontrola teploty**

Teplota kritických vnitřních součástí (vstřikovací smyčky, kolon, detektoru a veden) by měla být konstantní a měla by být v souladu s volbou rozpouštědla.

▼B

1.6.10 **Detektor**

Detektor slouží ke kvantitativnímu zaznamenávání koncentrace vzorku eluovaného z kolony. Nemá-li dojít ke zbytečnému rozšíření píků, musí být objem kyvety detektoru co nejmenší. Neměl by být větší než 10 μl, s výjimkou detektorů k měření rozptylu světla a viskozity. k detekci se obvykle používá diferenciálního refraktometru. Vyžadují-li to však specifické vlastnosti vzorku nebo elučního rozpouštědla, lze použít jiné typy detektorů, např. UV/vis, IR detektory a viskozitní detektory atd.

2. ÚDAJE A PŘEDKLÁDANÍ ZPRAV

2.1 ÚDAJE

Pokud jde o podrobná kritéria hodnocení a o požadavky týkající se registrace a zpracování údajů, měla by být použita norma DIN (1).

Pro každý vzorek musí být provedeny dva nezávislé experimenty. Analýzy musí být provedeny samostatně.

Pro každé měření musí být uvedeny hodnoty M_n, M_w, M_w/M_n a M_p. Je nezbytné výslovně uvést, že naměřené hodnoty jsou relativními hodnotami odpovídajícími molekulové hmotnosti použitého standardu.

Po stanovení retenčních objemů nebo retenčních časů (případně korigovaných za použití vnitřního standardu) se proti těmto veličinám vynesou do grafu hodnoty log M_p (přičemž M_p je výška maxima píku kalibračního standardu). Pro jeden řád hodnot molekulové hmotnosti jsou nezbytné alespoň dva kalibrační body a pro celou křivku, která by měla pokrýt odhadovanou molekulovou hmotnost vzorku, se požaduje alespoň pět naměřených bodů. Poslední bod kalibrační křivky na straně nízkých molekulových hmotností se určí hexylbenzenem nebo jiným vhodným nepolárním rozpouštědlem. Početně a hmotnostně průměrné molekulové hmotnosti se obecně určí elektronickým zpracováním údajů založeným na rovnicích v bodě 1.2. Při manuálním zpracování údajů do číselné formy lze použít metodu ASTM D 3536-91 (3).

Distribuční křivka musí být znázorněna ve formě tabulky nebo graficky (diferenciální četnost nebo kumulativní četnost v procentech proti log M). V grafickém znázornění by měl mít jeden řád molekulové hmotnosti délku 4 cm a výška maxima píku by měla být asi 8 cm. U integrálních distribučních křivek by měla být vzdálenost mezi 0 a 100 % na ose přibližně 10 cm.

2.2 PROTOKOL O ZKOUŠCE

Protokol o zkoušce musí obsahovat tyto informace:

2.2.1 **Zkoušená látka:**

— dostupné informace o zkoušené látce (identifikace, přísady, nečistoty),

▼B

— popis zpracování vzorku, pozorované skutečnosti, problémy.

2.2.2 **Přístrojové vybavení:**

— zásobník eluentu, inertní plyn, odplynění eluentu, složení eluentu, nečistoty,

— dávkovací čerpadlo, tlumič rázů, vstřikovací systém,

— separační kolony (výrobce, všechny informace o charakteristikách kolon, jako jsou velikost pórů, druh separačního materiálu atd., počet, délka a pořadí použitých kolon),

— počet teoretických pater kolony (nebo kombinace kolon), separační účinnost (rozlišení systému),

— informace o symetrii pík,

— teplota kolony, způsob řízení teploty,

— detektor (princip měření, typ, objem kyvety),

— průtokoměr, je-li použit (výrobce, princip měření),

— systém pro záznam a zpracování údajů (hardware a software).

2.2.3 **Kalibrace systému:**

— podrobný popis metody použité pro sestrojení kalibrační křivky,

— informace o kritériích jakosti této metody (např. korelační koeficient, součet čtverců chyb atd.),

— informace o všech extrapolacích, předpokladech a aproximacích provedených během experimentálního postupu a při hodnocení a zpracování údajů,

— všechny naměřené hodnoty použité při konstrukci kalibrační křivky musí být dokumentovány v tabulce, která musí pro každý kalibrační bod obsahovat tyto informace:

— název vzorku,

— výrobce vzorku,

— charakteristické hodnoty standardů M_p, M_n, M_w, M_w/M_n, jak jsou poskytnuty výrobcem nebo jak jsou zjištěny z následných měření, společně s podrobnostmi o metodě stanovení,

— vstříknutý objem a vstříknutá koncentrace,

▼B

— hodnota M_p použitá po kalibraci

— eluční objem nebo korigovaný retenční čas měřený v maximu píku,

— hodnota M_p vypočtená pro maximum píku,

— chyba vypočtené hodnoty M_p a kalibrační hodnoty M_p vyjádřená v procentech.

2.2.4 **Hodnocení:**

— hodnocení vlivu času: metody použité pro zajištění požadované reprodukovatelnosti (metoda korekce, vnitřní standard atd.),

— informace o tom, zda bylo hodnocení provedeno na základě elučního objemu nebo retenčního času.

— informace o mezích hodnocení v případě, že pík nebyl úplně analyzován,

— popis metody vyrovnávání křivek, bylo-li použito,

— příprava a postupy předúpravy vzorku,

— popřípadě přítomnost nerozpuštěných částic,

— vstříknutý objem (μl) a vstříknutá koncentrace (mg/ml),

— pozorované skutečnosti, které vedou k odchylkám od ideálních charakteristik metody GPC,

— podrobný popis všech změn zkušebních postupů,

— podrobnosti o rozsahu chyb,

— jakékoli další informace a pozorování relevantní pro interpretaci výsledků.

3. **LITERATURA**

1) DIN 55672 (1995) GelpermeationsChromatographie (GPC) mit Tetrahydrofuran (THF) als Elutionsmittel, Teil 1.

2) Yau, W.W., Kirkland, J.J., and Bly, D.D. eds, (1979). Modern Size Exclusion Liquid Chromatography, J. Wiley and Sons.

3) ASTM D 3536-91, (1991). Standard Test Method for Molecular Weight Averages and Molecular Weight Distribution by Liquid Exclusion Chromatography (Gel Permeation Chromatography-GPC). American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.

4) ASTM D 5296-92, (1992). Standard Test Method for Molecular Weight Averages and Molecular Weight Distribution of Polystyrene by High Performance Size-Exclusion Chromatography. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.

▼B

Doplněk

Příklady jiných metod stanovení početně průměrné molekulové hmotnosti (M_n) polymerů

Gelově permeační chromatografie (GPC) je preferovanou metodou stanovení M_n, zejména tehdy, je-li k dispozici sada standardů, jejichž struktura je srovnatelná se strukturou polymeru. Vyskytnou-li se praktické obtíže při použití GPC nebo očekává-li se, že látka nevyhoví regulativním kritériím na M_n, (což je třeba potvrdit), jsou k dispozici alternativní metody, jako jsou:

1. **Využití koligativních vlastností**

1.1 Ebulioskopie/kryoskopie:

spočívá v měření zvýšení bodu varu (ebulioskopie) nebo snížení bodu tuhnutí (kryoskopie) rozpouštědla po přidání polymeru. Metoda je založena na skutečnosti, že vliv rozpuštěného polymeru na bod varu nebo bod tuhnutí závisí na molekulové hmotnosti polymeru (1, 2).

Použitelnost: $M_n < 20\,000$.

1.2 Snížení tlaku par:

spočívá v měření tlaku par zvolené referenční kapaliny před přidáním a po přidání známého množství polymeru (1, 2).

Použitelnost: $M_n < 20\,000$ (teoretická; v praxi však má omezený význam).

1.3 Membránová osmometrie:

spočívá na principu osmózy, tj. přirozené snahy molekul rozpouštědla proniknout polopropustnou membránou ze zředěného do koncentrovaného roztoku a dosáhnout rovnováhy. Při zkoušce je koncentrace zředěného roztoku nulová, zatímco koncentrovaný roztok obsahuje polymer. Pronikáním rozpouštědla membránou dochází ke tlakovému rozdílu, který závisí na koncentraci a molekulové hmotnosti polymeru (1, 3, 4).

Použitelnost: M_n od 20 000 do 200 000.

1.4 Osmometrie v parní fázi:

spočívá ve srovnání rychlosti vypařování aerosolu čistého rozpouštědla s alespoň třemi aerosoly obsahujícími polymer v různých koncentracích (1, 5, 6).

Použitelnost: $M_n < 20\,000$.

▼B

2. **Analýza koncových skupin**

Použití této metody vyžaduje znalost jak celkové struktury polymeru, tak povahy koncových skupin řetězce (které musí být odlišitelné od hlavního řetězce například metodou NMR nebo titrací nebo derivatizací). Stanovení počtu koncových skupin polymeru může vést k hodnotě molekulové hmotnosti (7, 8, 9).

Použitelnost: M_n až do 50 000 (s klesající spolehlivostí).

3. **Literatura**

1) Billmeyer, F.W. Jr., (1984). Textbook of Polymer Science, 3rd Edn., John Wiley, New York.

2) Glover, CA., (1975). Absolute Colligative Property Methods. Chapter 4. In: Polymer Molecular Weights, Part I P.E. Slade, Jr. ed., Marcel Dekker, New York.

3) ASTM D 3750-79, (1979). Standard Practice for Determination of Number-Average Molecular Weight of Polymers by Membrane Osmometry. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.

4) Coll, H. (1989). membrane Osmometry. In: Determination of Molecular Weight, A.R. Cooper ed., J. Wiley and Sons, pp. 25–52.

5) ASTM 3592-77, (1977). Standard Recommended Practice for Determination of Molecular Weight by Vapour Pressure, American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.

6) Morris, C.E.M., (1989). Vapour Pressure osmometry. In: Determinationn of Molecular Weight, A.R. Cooper ed., John Wiley and Sons.

7) Schröder, E., Müller, G., and Arndt, K-F., (1989). Polymer Characterisation, Carl Hanser Verlag, Munich.

8) Garmon, R.G., (1975). End-Group Determinations, Chapter 3 In: Polymer Molecular Weights, Part I, P.E. Slade, Jr. ed. Marcel Dekker, New York.

9) Amiya, S., et al. (1990). Pure and Applied Chemistry, 62, 2139-2146.

▼B

A.19 OBSAH NÍZKOMOLEKULÁRNÍCH LÁTEK V POLYMERECH

1. METODA

Tato gelově permeační chromatografická metoda je replikou metody OECD TG 119 (1996). Základní principy a další technické informace jsou uvedeny v odkazech.

1.1 ÚVOD

Vlastnosti polymerů jsou tak rozdílné, že není možné popsat jedinou metodu a přesně stanovit podmínky separace a hodnocení, které by pokryly všechny eventuality a specifika vyskytující se při separaci polymerů. Zejména pro složité polymerní systémy není gelově permeační chromatografie (GPC) vždy vhodná. Není-li GPC použitelná, může být molekulová hmotnost stanovena jinými metodami (viz příloha). V takových případech by měly být uvedeny veškeré podrobnosti a zdůvodnění použité metody.

Popsaná metoda je založena na normě DIN 55672 (1). Podrobné informace o provádění experimentů a o hodnocení údajů lze nalézt v uvedené normě DIN. V případě, že jsou nezbytné úpravy experimentálních podmínek, musí být změny zdůvodněny. Mohou být použity jiné normy, jsou-li na ně uvedeny úplné odkazy. V popsané metodě jsou ke kalibraci použity vzorky polystyrenu o známé polydisperzitě a metoda může být upravena tak, aby byla vhodná pro určité polymery, např. ve vodě rozpustné polymery a polymery s dlouhými větvemi.

1.2 DEFINICE A JEDNOTKY

Nízká molekulová hmotnost je konvenčně definována jako molekulová hmotnost pod 1 000.

Početně průměrná molekulová hmotnost M_n a hmotnostně průměrná molekulová hmotnost M_w se stanoví pomocí těchto rovnic:

$$M_n = \frac{\sum_{i=1}^{n} H_i}{\sum_{i=1}^{n} H_i/M_i} \qquad M_w = \frac{\sum_{i=1}^{n} H_i \times M_i}{\sum_{i=1}^{n} H_i}$$

kde,

H_i = je výška signálu detektoru nad základní čarou pro retenční objem V_i,

M_i = je molekulová hmotnost frakce polymeru pro retenční objem V_i a n je počet údajů.

Šířka distribuce molekulové hmotnosti, která je mírou polydisperzity systému, je dána poměrem M_w/M_n.

▼B

1.3 REFERENČNÍ LÁTKY

Vzhledem k tomu, že GPC je relativní metoda, musí být provedena kalibrace. K tomuto účelu se obvykle používá lineární polystyrenový standard s úzkou distribucí se známými průměrnými molekulovými hmotnostmi M_n a M_w a se známou distribucí molekulové hmotnosti. Kalibrační křivka může být pro stanovení molekulové hmotnosti neznámého vzorku použita pouze tehdy, byly-li podmínky separace vzorku a standardů identické.

Stanovený vztah mezi molekulovou hmotností a elučním objemem je platný pouze za specifických podmínek určitého experimentu. Podmínky zahrnují především teplotu, rozpouštědlo (nebo směs rozpouštědel), chromatografické podmínky a separační kolonu nebo systém kolon.

Molekulové hmotnosti stanovené tímto způsobem jsou relativními hodnotami a označují se jako „molekulové hmotnosti ekvivalentní polystyrenu“. To znamená, že se molekulová hmotnost bude v závislosti na strukturních a chemických rozdílech mezi vzorkem a standardem od absolutní hodnoty více či méně lišit. Použijí-li se jiné standardy, např. poly(ethylenglykol), poly(ethylenoxid), poly(methyl-methakrylát), poly (akrylová kyselina), musí být použití zdůvodněno.

1.4 PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

Distribuce molekulové hmotnosti vzorku i průměrné molekulové hmotnosti (M_n, M_w) lze stanovit metodou GPC. GPC je speciální typ kapalinové chromatografie, při němž se vzorek dělí podle hydrodynamických objemů jednotlivých složek (2).

Separace probíhá při průchodu vzorku kolonou naplněnou porézním materiálem, obvykle organickým gelem. Malé molekuly proniknou do pórů, zatímco velké molekuly nikoliv. Průchod velkých molekul je tedy kratší a jsou eluovány nejdříve. Středně velké molekuly pronikají do některých pórů a jsou eluovány později. Nejmenší molekuly se středním hydrodynamickým poloměrem menším než velikost pórů gelu pronikají do všech pórů. Tyto molekuly jsou eluovány nakonec.

V ideálním případě závisí separace pouze na velikosti molekul, ale v praxi je obtížné vyhnout se alespoň některým rušivým adsorpčním jevům. Nestejnoměrné plnění kolony a mrtvé objemy mohou situaci zhoršit (2).

Detekce se provádí například měřením indexu lomu nebo UV absorpce a výsledkem je jednoduchá distribuční křivka. Má-li být však křivce přiřazena skutečná molekulová hmotnost, je nezbytné kalibrovat kolonu polymery se známou molekulovou hmotností a v ideálním případě v podstatě podobnou strukturou, např. různé polystyrenové standardy. Křivka má zpravidla gaussovský tvar, někdy deformovaný prodloužením na straně nízké molekulové hmotnosti, přičemž svislá osa udává hmotnostní zlomek různých molekulových hmotností a na vodorovné ose je vynesen logaritmus molekulové hmotnosti.

▼B

Obsah molekul o nízké hmotnosti se odečte z této kalibrační křivky. Výpočet může být správný pouze tehdy, je-li odezva nízkomolekulárních látek hmotnostně ekvivalentní polymeru jako celku.

1.5 KRITERIA JAKOSTI

Opakovatelnost (relativní směrodatná odchylka: RSD) elučního objemu by měla být lepší než 0,3 %. Je-li chromatogram hodnocen v závislosti na čase a neodpovídá výše uvedenému kritériu (1), musí být požadovaná opakovatelnost zajištěna korekcí vnitřním standardem. Polydisperzity jsou závislé na molekulových hmotnostech standardů. V případě polystyrenových standardů jsou typickými hodnotami:

$M_p < 2\,000$	$M_w/M_n < 1{,}20$
$2\,000 \leq M_p < 10^6$	$M_w/M_n < 1{,}05$
$M_p > 10^6$	$M_w/M_n < 1{,}20$

(M_p je molekulová hmotnost standardu odpovídající maximu píku)

1.6 POPIS ZKUŠEBNÍ METODY

1.6.1 **Příprava standardních roztoků polystyrenu**

Polystyrenové standardy se rozpustí opatrným mícháním ve zvoleném eluentu. Při přípravě roztoků se musí zohlednit doporučení výrobce.

Koncentrace zvolených standardů závisí na různých faktorech, např. na vstřikovaném objemu, viskozitě roztoku a citlivosti analytického detektoru. Maximální vstřikovaný objem musí být přizpůsoben délce kolony, aby nedošlo k přesycení. Typické vstřikované objemy pro analytickou separaci pomocí GPC s kolonou o rozměrech 30 × 7,8 mm jsou obvykle 40 až 100 µl. Větší objemy jsou možné, ale neměly by překročit 250 µl. Optimální poměr mezi vstřikovaným objemem a koncentrací musí být stanoven před vlastní kalibrací kolony.

1.6.2 **Příprava roztoku vzorku**

Stejné požadavky platí v zásadě pro přípravu roztoků vzorku. Vzorek se opatrným třepáním rozpustí ve vhodném rozpouštědle, např. v tetrahydrofuranu (THF). V žádném případě by neměl být rozpuštěn pomocí ultrazvukové lázně. Je-li to nezbytné, přečistí se roztok vzorku filtrací přes membránový filtr o velikosti pórů 0,2 až 2 um.

Přítomnost nerozpuštěných částic musí být zaznamenána v závěrečném protokolu, neboť mohou pocházet z frakcí s vysokou molekulovou hmotností. Pro stanovení hmotnostní koncentrace nerozpuštěných částic vyjádřené v procentech by měla být použita vhodná metoda. Roztoky by měly být použity do 24 hodin.

▼B

1.6.3 **Korekce na obsah nečistot a přísad**

Korekce obsahu frakce s M < 1 000 v důsledku příspěvku od přítomných nepolymerních specifických složek (např. nečistot a/nebo přísad) je obvykle nezbytná, není-li naměřený obsah < 1 %. Dosáhne se toho přímou analýzou roztoku polymeru nebo eluátu GPC.

V případech, kdy je eluát po průchodu kolonou pro další analýzu příliš zředěný, musí být zkoncentrován. Může být nezbytné odpařit eluát do sucha a opět jej rozpustit. Zkoncentrování eluátu musí být provedeno za podmínek, při nichž je zajištěno, že nedojde ke změnám v eluátu. Zpracování eluátu po GPC závisí na analytické metodě použité ke kvantitativnímu stanovení.

1.6.4 **Přístroje a pomůcky**

Aparatura pro GPC sestává z těchto částí:

— zásobník rozpouštědla,

— odplynovací zařízení (podle potřeby),

— dávkovací čerpadlo,

— tlumič rázů (podle potřeby),

— vstřikovací systém,

— chromatografické kolony,

— detektor,

— průtokoměr (podle potřeby),

— zapisovač,

— nádoba na odpad.

Musí být zajištěno, aby byl systém GPC inertní k použitým rozpouštědlům (např. použitím ocelových kapilár pro THF).

1.6.5 **Vstřikování a systém dávkování rozpouštědla**

Určený objem roztoku vzorku se vnese na kolonu buď dávkovačem nebo ručně v ostře ohraničené zóně. Příliš rychlý pohyb pístu vzad nebo vpřed (při ručním vnesení) může způsobit změny v pozorované distribuci molekulové hmotnosti. Dávkovač rozpouštědla by pokud možno neměl působit rázy a v ideálním případě by měl být opatřen tlumičem rázů. Průtok je řádově 1 ml/min.

1.6.6 **Kolona**

Podle typu vzorku se k charakterizaci polymeru použije jednoduchá kolona nebo několik za sebou řazených kolon. Komerčně je dostupná řada porézních materiálů definovaných vlastností (např. velikost pórů, vylučovací meze). Výběr separačního gelu nebo délky kolony závisí jak na vlastnostech vzorku (hydrodynamický objem, distribuce molekulové hmotnosti), tak na specifických podmínkách separace, jako jsou rozpouštědlo, teplota a průtok (1, 2, 3).

▼B

1.6.7 **Teoretická patra**

Použitá kolona nebo kombinace kolon musí být charakterizována počtem teoretických pater. Při použití THF jako eluentu to zahrnuje vnesení roztoku ethylbenzenu nebo jiné vhodné nepolární rozpuštěné látky na kolonu známé délky. Počet teoretických pater je dán touto rovnicí:

$$N = 5{,}54\left(\frac{V_e}{W_{1/2}}\right)^2 \qquad \text{nebo} \qquad N = 16\left(\frac{V_e}{W}\right)^2$$

kde,

N = je počet pater v maximu,

V_e = je eluční objem píku,

W = šířka píku na základní čáře,

$W_{1/2}$ = šířka píku v polovině výšky.

1.6.8 **Separační účinnost**

Vedle počtu teoretických pater, který je veličinou určující šířku pásu, hraje roh také separační účinnost, která se stanoví ze strmosti kalibrační křivky. Separační účinnost kolony se získá z tohoto vztahu:

$$\frac{V_{e,M_x} - V_{e,(10M_x)}}{\text{plocha průřezu kolony}} \geq 6{,}0\left[\frac{cm^3}{cm^2}\right]$$

kde,

$V_{e,\ M_x}$ = je eluční objem pro polystyren s molekulovou hmotností M_x

$Ve_{,(10.M_x)}$ = je eluční objem pro polystyren s 10krát větší molekulovou hmotností. Rozlišení systému je obecně definováno tímto vztahem:

kde,

$$R_{1,2} = 2 \times \frac{V_{e1} - V_{e2}}{W_1 + W_2} \times \frac{1}{\log_{10}(M_2/M_1)}$$

kde,

V_{e1}, V_{e2} = jsou eluční objemy dvou standardů polystyrenu v maximu píku,

W_1, W_2 = jsou šířky píků na základní čáře,

M_1, M_2 = jsou molekulové hmotnosti odpovídající maximu píků (měly by se lišit faktorem 10).

Hodnota R pro kolonový systém by měla být větší než 1,7 (4).

▼B

1.6.9 **Rozpouštědla**

Všechna rozpouštědla musí mít vysokou čistotu (v případě THF 99,5 % čistotu). Zásobník rozpouštědla (v případě potřeby pod inertní atmosférou) musí být dostatečně velký pro kalibraci kolony a pro několik analýz vzorku. Z rozpouštědla musí být před jeho dopravou čerpadlem na kolonu odstraněny plyny.

1.6.10 **Kontrola teploty**

Teplota kritických vnitřních součástí (vstřikovací smyčky, kolon, detektoru a vedení) by měla být konstantní a měla by být v souladu s volbou rozpouštědla.

1.6.11 **Detektor**

Detektor slouží ke kvantitativnímu zaznamenávání koncentrace vzorku eluovaného z kolony. Nemá-li dojít ke zbytečnému rozšíření píků, musí být objem kyvety detektoru co nejmenší. Neměl by být větší než 10 µl, s výjimkou detektorů k měření rozptylu světla a viskozity. K detekci se obvykle používá diferenciálního refraktometru. Vyžadují-li to však specifické vlastnosti vzorku nebo elučního rozpouštědla, lze použít jiné typy detektorů, např. UV/vis, IR detektory a viskozitní detektory atd.

2. **ÚDAJE A PŘEDKLÁDÁNÍ ZPRÁV**

2.1 ÚDAJE

Pokud jde o podrobná kritéria hodnocení a o požadavky týkající se registrace a zpracování údajů, měla by být použita norma DIN (1).

Pro každý vzorek musí být provedeny dva nezávislé experimenty. Analýzy musí být provedeny samostatně. Ve všech případech je důležité stanovit také údaje ze slepých pokusů zpracovaných za stejných podmínek jako vzorek.

Je nezbytné výslovně uvést, že naměřené hodnoty jsou relativními hodnotami odpovídajícími molekulové hmotnosti použitého standardu.

Po stanovení retenčních objemů nebo retenčních časů (případně korigovaných za použití vnitřního standardu) se proti těmto veličinám vynesou do grafu hodnoty log M_p (přičemž M_p je výška maxima píku kalibračního standardu). Pro jeden řád hodnot molekulové hmotnosti jsou nezbytné alespoň dva kalibrační body a pro celou křivku, která by měla pokrýt odhadovanou molekulovou hmotnost vzorku, se požaduje alespoň pět naměřených bodů. Poslední bod kalibrační křivky na straně nízkých molekulových hmotností se určí hexylbenzenem nebo jiným vhodným nepolárním rozpouštědlem. Při stanovení se část křivky odpovídající molekulovým hmotnostem nižším než 1 000 podle potřeby koriguje na nečistoty a přísady. Eluční křivky se obvykle hodnotí pomocí elektronického zpracování údajů. Při manuálním zpracování údajů do číselné formy lze použít metodu ASTM D 3536-91 (3).

▼B

Jestliže je v koloně zachycen nerozpustný polymer, je jeho molekulová hmotnost pravděpodobně vyšší než molekulová hmotnost rozpuštěné frakce, a pokud by tato skutečnost nebyla zohledněna, došlo by k nadhodnocení obsahu molekul o nízké hmotnosti. Návod na korigování obsahu molekul o nízké hmotnosti na obsah nerozpuštěného polymeru je uveden v příloze.

Distribuční křivka musí být znázorněna ve formě tabulky nebo graficky (diferenciální četnost nebo kumulativní četnost v procentech proti log M). V grafickém znázornění by měl mít jeden řád molekulové hmotnosti délku 4 cm a výška maxima píku by měla být asi 8 cm. U integrálních distribučních křivek by měla být vzdálenost mezi 0 a 100 % na ose přibližně 10 cm.

2.2 PROTOKOL O ZKOUŠCE

Protokol o zkoušce musí obsahovat tyto informace:

2.2.1 **Zkoušená látka:**

— dostupné informace o zkoušené látce (identifikace, přísady, nečistoty),

— popis zpracování vzorku, pozorované skutečnosti, problémy.

2.2.2 **Přístrojové vybavení:**

— zásobník eluentu, inertní plyn, odplynění eluentu, složení eluentu, nečistoty,

— dávkovací čerpadlo, tlumič rázů, vstřikovací systém,

— separační kolony (výrobce, všechny informace o charakteristikách kolon, jako jsou velikost pórů, druh separačního materiálu atd., počet, délka a pořadí použitých kolon),

— počet teoretických pater kolony (nebo kombinace kolon), separační účinnost (rozlišení systému),

— informace o symetrii píků,

— teplota kolony, způsob řízení teploty,

— detektor (princip měření, typ, objem kyvety),

— průtokoměr, je-li použit (výrobce, princip měření),

— systém pro záznam a zpracování údajů (hardware a software).

2.2.3 **Kalibrace systému:**

— podrobný popis metody použité pro sestrojení kalibrační křivky,

▼B

— informace o kritériích jakosti této metody (např. korelační koeficient, součet čtverců chyb atd.),

— informace o všech extrapolacích, předpokladech a aproximacích provedených během experimentálního postupu a při hodnocení a zpracování údajů,

— všechny naměřené hodnoty použité při konstrukci kalibrační křivky musí být dokumentovány v tabulce, která musí pro každý kalibrační bod obsahovat tyto informace:

— název vzorku,

— výrobce vzorku,

— charakteristické hodnoty standardů M_p, M_n, M_w, M_w/M_n, jak jsou poskytnuty výrobcem nebo jak jsou zjištěny z následných měření, společně s podrobnostmi o metodě stanovení,

— vstříknutý objem a vstříknutá koncentrace,

— hodnota M_p použitá po kalibraci

— eluční objem nebo korigovaný retenční čas měřený v maximu píku,

— hodnota M_p vypočtená pro maximum píku,

— chyba vypočtené hodnoty M_p a kalibrační hodnoty M_p vyjádřená v procentech.

2.2.4 **Informace o obsahu podílu s nízkou molekulovou hmotností v polymeru:**

— popis metod použitých v analýze a způsobu, jakým byly experimenty provedeny,

— informace o obsahu podílu s nízkou molekulovou hmotností vyjádřeném v hmotnostních procentech celkového vzorku,

— informace o nečistotách, přísadách a jiných nepolymerních podílech vyjádřených v hmotnostních procentech celkového vzorku.

2.2.5 **Hodnocení:**

— hodnocení vlivu času: metody použité pro zajištění požadované reprodukovatelnosti (metoda korekce, vnitřní standard atd.),

— informace o tom, zda bylo hodnocení provedeno na základě elučního objemu nebo retenčního času,

— informace o mezích hodnocení v případě, že pík nebyl úplně analyzován,

— popis metody vyrovnávání křivek, bylo-li použito,

— příprava a postupy předúpravy vzorku,

— popřípadě přítomnost nerozpuštěných částic,

▼B

— vstříknutý objem (μl) a vstříknutá koncentrace (mg/ml),

— pozorované skutečnosti, které vedou k odchylkám od ideálních charakteristik metody GPC,

— podrobný popis všech změn zkušebních postupů,

— podrobnosti o rozsahu chyb,

— jakékoli další informace a pozorování relevantní pro interpretaci výsledků.

3. **LITERATURA**

1) DIN 55672 (1995) Gelpermeationschromatographie (GPC) mit Tetrahydrofuran (THF) als Elutionsmittel, Teil 1.

2) Yau, W.W., Kirkland, J.J., and Bly, D.D. eds. (1979). Modern Size Exclusion Liquid Chromatography, J. Wiley and Sons.

3) ASTM D 3536-91, (1991). Standard Test method for Molecular Weight Averages and Molecular Weight Distribution by Liquid Exclusion Chromatography (Gel Permeation Chromatography-GPC). American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.

4) ASTM D 5296-92, (1992). Standard Test method for Molecular Weight Averages and Molecular Weight Distribution of Polystyrene by High Performance Size-Exclusion Chromatography. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.

▼B

Doplněk

Korekce obsahu nízkomolekulárních látek na přítomnost nerozpuštěného polymeru

Je-li ve vzorku přítomen nerozpuštěný polymer, dochází ke ztrátě hmotnosti během analýzy GPC. Nerozpuštěné polymery jsou nevratně zachyceny v koloně nebo na filtru při filtraci vzorku, zatímco rozpustný podíl vzorku kolonou projde. V případě, že lze odhadnout nebo změřit přírůstek indexu lomu (dn/dc) polymeru, lze odhadnout ztrátu hmotnosti vzorku na koloně. V takovém případě se korekce provede pomocí externí kalibrace standardními materiály o známé koncentraci a známé hodnotě dn/dc, čímž se kalibruje refraktometr. V příkladě uvedeném dále je jako standard použit poly(methyl-methakrylát) (PMMA).

Při externí kalibraci pro analýzu polyakrylátů se analyzuje metodou GPC standard PMMA známé koncentrace v tetrahydrofuranu a výsledné údaje se použijí pro nalezení konstanty refraktometru podle rovnice:

$$K = R/(C \times V \times dn/dc)$$

kde:

K = je konstanta refraktometru (μV/s/ml),

R = je odečet pro standard PMMA (μV/s),

C = je koncentrace standardu PMMA (mg/ml),

V = je vstříknutý objem (ml) a

dn/dc = je přírůstek indexu lomu pro PMMA v tetrahydrofuranu (ml/mg).

Pro standard PMMA jsou typické tyto údaje:

R = 2 937 891

C = 1,07 mg/ml

V = 0,1 ml

dn/dc = 9×10^{-5} ml/mg

Výsledná hodnota $K = 3{,}05 \times 10^{11}$ se poté použije pro výpočet teoretické odezvy detektoru v případě, že detektorem prošlo 100 % vstříknutého polymeru.

▼B

A.20 CHOVÁNÍ POLYMERŮ PŘI ROZPOUŠTĚNÍ NEBO EXTRAKCI VE VODĚ

1. METODA

Popsaná metoda je replikou revidované verze metody OECD TG 120 (1997). Další technické informace jsou uvedeny v odkaze (1).

1.1 ÚVOD

U určitých polymerů, např. emulzních polymerů, může být před použitím dále popsané metody nezbytná předúprava. Tato metoda není použitelná pro kapalné polymery a pro polymery, které za zkušebních podmínek reagují s vodou.

Není-li metoda použitelná nebo proveditelná, je možné zkoumat chování polymerů při rozpouštění a extrakci jinými metodami. V takových případech by měly být uvedeny všechny podrobnosti použité metody a její zdůvodnění.

1.2 REFERENČNÍ LÁTKY

Nejsou.

1.3 PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

Chování polymerů při rozpouštění nebo extrakci ve vodném prostředí se zjišťuje baňkovou metodou (viz A.6 Rozpustnost ve vodě, baňková metoda) s úpravou uvedenou dále.

1.4 KRITÉRIA JAKOSTI

Nejsou.

1.5 POPIS ZKUŠEBNÍ METODY

1.5.1 **Přístroje a pomůcky**

Pro provedení metody je nezbytné toto zařízení:

— drticí zařízení, např. mlýnek pro přípravu částic o známé velikosti,

— třepačka s možností řízení teploty,

— membránový filtrační systém,

— vhodné analytické vybavení,

— normalizovaná síta.

1.5.2 **Příprava vzorku**

Reprezentativní vzorek musí být nejdříve omezen za použití vhodného síta na velikost částic 0,125 až 0,25 mm. Kvůli stálosti vzorku nebo kvůli procesu drcení může být nezbytné chlazení. Kaučukovité materiály mohou být drceny při teplotě kapalného dusíku (1).

Pokud není možné dosáhnout požadované velikosti částic, je třeba přijmout taková opatření, aby byla velikost částic zmenšena co nejvíce; výsledky by měly být zaznamenány. Ve zprávě je nezbytné uvést, jak byl rozdrcený vzorek uchován do provedení zkoušky.

▼B

1.5.3 **Postup**

Do každé ze tří nádob opatřených skleněnými zátkami se naváží po 10 g zkoušené látky a přidá se po 1 000 ml vody. Ukáže-li se zpracování 10 g polymeru neschůdným, mělo by být použito nejbližší vyšší množství, které lze zpracovat, a objem vody by měl být podle toho upraven.

Nádoby se těsně zazátkují a poté se třepou při 20 °C. Měla by být použita třepačka nebo míchačka schopná pracovat při konstantní teplotě. Po 24 hodinách se obsah každé nádoby odstředí nebo zfiltruje a v čiré vodné fázi se vhodnou analytickou metodou stanoví koncentrace polymeru. Nejsou-li k dispozici vhodné analytické metody pro vodnou fázi, lze celkovou rozpustnost nebo extrahovatelnost zhodnotit z hmotnosti sušiny na filtru nebo odstředěné sraženiny.

Obvykle je nezbytné kvantitativně rozlišit nečistoty a přísady na jedné straně a nízkomolekulární podíly na druhé straně. V případě gravimetrického stanovení je také důležité provést slepý pokus bez použití zkoušené látky s cílem zohlednit zbytky pocházející z experimentálního postupu.

Chování při rozpouštění nebo extrakci polymerů ve vodě při 37 °C a pH 2 a 9 může být stanoveno způsobem popsaným v případě provádění experimentu při 20 °C. Hodnot pH lze dosáhnout přidáním buď vhodných pufrů, nebo vhodných kyselin nebo zásad, např. kyseliny chlorovodíkové, kyseliny octové, hydroxidu sodného nebo draselného analytické čistoty nebo NH_3.

V závislosti na použité metodě by měla být provedena jedna nebo dvě zkoušky. Jsou-li k dispozici dostatečně specifické metody pro přímou analýzu vodné fáze na obsah polymeru, měla by stačit jedna zkouška, jak je uvedena výše. Nejsou-li však takové metody k dispozici a zjištění chování polymeru při rozpouštění nebo extrakci je omezeno na nepřímou analýzu stanovením celkového obsahu organického uhlíku (TOC) ve vodném extraktu, měla by být provedena dodatečná zkouška. Tato dodatečná zkouška by měla být rovněž provedena třikrát, přičemž se použije 10krát menší množství vzorků polymeru a stejné množství vody jako v první zkoušce.

1.5.4 **Analýza**

1.5.4.1 *Zkouška s jednou velikostí vzorku*

Metody pro přímou analýzu složek polymeru ve vodné fázi mohou být k dispozici. V opačném případě lze také zvážit nepřímou analýzu rozpuštěných nebo extrahovaných složek polymeru stanovením celkového obsahu rozpustných složek a provedením korekce na obsah nepolymerních složek.

Analýza vodné fáze na obsah celkového polymerního podílu je možná:

buď dostatečně citlivou metodou, např.

— stanovením celkového obsahu organického uhlíku (TOC) rozkladem persíranem nebo dichromanem za vzniku CO_2 a následnou IR analýzou nebo chemickou analýzou,

▼B

— atomovou absorpční spektrometrií (AAS) nebo jejím protějškem spektrometrií s indukčně vázaným plazmatem (ICP) pro silikonové polymery nebo polymery obsahující kov,

— UV absorpcí nebo spektrofluorimetrií pro aromatické polymery,

— kapalinovou chromatografií s hmotovým spektrometrem (LC-MS) pro nízkomolekulární vzorky,

nebo vakuovým odpařením vodného extraktu do sucha a spektroskopickou (IR nebo UV atd.) nebo AAS/ICP analýzou zbytku.

Není-li analýza vodné fáze jako takové možná, měl by být vodný extrakt extrahován organickým rozpouštědlem nemísitelným s vodou, např. chlorovaným uhlovodíkem. Rozpouštědlo se poté odpaří a zbytek se analyzuje způsobem popsaným výše pro obsah polymeru. Jakékoli složky, které jsou identifikovány jako nečistoty nebo přísady, se odečtou, aby byl stanoven stupeň rozpustnosti samotného polymeru.

Jsou-li přítomna relativně velká množství takových materiálů, může být nezbytné analyzovat zbytek například HPLC nebo GC, aby se odlišily nečistoty z přítomného monomeru nebo deriváty monomeru a aby tak mohl být stanoven skutečný obsah monomeru nebo jeho derivátů.

V některých případech může být postačující pouhé odpaření organického rozpouštědla do sucha a zvážení suchého zbytku.

1.5.4.2 *Zkouška se dvěma různými velikostmi vzorku*

Všechny vodné extrakty se analyzují na celkový obsah organického uhlíku (TOC).

Provede se gravimetrické stanovení nerozpuštěného nebo ne extrahovaného podílu vzorku. Zůstávají-li po odstředění nebo filtraci obsahu každé nádoby usazeny na stěnách nádoby zbytky polymeru, měla by být nádoba oplachována filtrátem, dokud není vyčištěna od všech viditelných zbytků. Poté se filtrát opět odstředí nebo zfiltruje. Zbytky, které zůstanou na filtru nebo v centrifugační kyvetě, se vysuší ve vakuu při 40 °C a zváží. Sušení se provádí do konstantní hmotnosti.

2. **ÚDAJE**

2.1 ZKOUŠKA S JEDNOU VELIKOSTÍ VZORKU

Pro každou ze tří nádob by měly být uvedeny jednotlivé výsledky a průměrné hodnoty vyjádřené v jednotkách hmotnosti vztažené na objem roztoku (obvykle mg/l) nebo v jednotkách hmotnosti vztažené na hmotnost vzorku polymeru (obvykle mg/g). Kromě toho by měla být uvedena ztráta hmotnosti vzorku (vypočtená jako hmotnost rozpuštěné látky dělená hmotností výchozího vzorku). Měly by být vypočteny relativní směrodatné odchylky (RSD). Měly by být uvedeny jednotlivé hodnoty pro celkovou látku (polymer + hlavní přísady atd.) a pro samotný polymer (tj. po odečtení příspěvku od těchto přísad).

▼B

2.2 ZKOUŠKA SE DVĚMA RŮZNÝMI VELIKOSTMI VZORKU

Pro každý experiment by měly být uvedeny jednotlivé hodnoty TOC ve vodných extraktech obou trojích experimentů a průměrné hodnoty vyjádřené v jednotkách hmotnosti vztažené na objem roztoku (obvykle mg C/l) a rovněž v jednotkách hmotnosti vztažené na hmotnost výchozího vzorku (obvykle mg C/g).

Není-li mezi výsledky pro vysoké a nízké poměry vzorek/voda rozdíl, může to znamenat, že všechny extrahovatelné složky byly skutečně vyextrahovány. V takovém případě obvykle nebývá přímá analýza nezbytná.

Měly by být uvedeny jednotlivé hmotnosti zbytků vyjádřené v procentech počátečních hmotností vzorků. Měly by být vypočteny průměrné hodnoty za celý experiment. Rozdíly mezi 100 % a zjištěnými hodnotami v procentech představují množství rozpustného a extrahovatelného materiálu v původním vzorku vyjádřené v procentech.

3. **ZPRÁVY**

3.1 PROTOKOL O ZKOUŠCE

Protokol o zkoušce musí obsahovat tyto informace:

3.1.1 **Zkoušená látka:**

— dostupné informace o zkoušené látce (identifikace, přísady, nečistoty, obsah podílu o nízké molekulové hmotnosti).

3.1.2 **Experimentální podmínky:**

— popis použitých postupů a experimentálních podmínek,

— popis analytických a detekčních metod.

3.1.3 **Výsledky:**

— výsledky rozpustnosti nebo extrahovatelnosti v mg/l; jednotlivé a střední hodnoty pro extrakční zkoušky v různých roztocích, rozepsané podle obsahu polymeru, nečistot, přísad atd.,

— výsledky rozpustnosti nebo extrahovatelnosti v mg/g polymeru,

— hodnoty TOC ve vodných extraktech, hmotnost rozpuštěné látky a vypočtené procentuální hodnoty (pokud byly stanoveny),

— hodnota pH každého vzorku,

— informace o hodnotách získaných při slepém pokusu,

— podle potřeby upozornění na chemickou nestálost zkoušené látky během zkušebních postupů a analytických postupů,

— všechny informace, které jsou důležité pro interpretaci výsledků.

4. **LITERATURA**

1) DIN 53733 (1976) Zerkleinerung von Kunststofferzeugnissen für Prüfzwecke.

▼B

A.21 OXIDAČNÍ VLASTNOSTI (KAPALINY)

1. METODA

1.1 ÚVOD

Tato zkušební metoda slouží ke stanovení schopnosti kapalné látky zvyšovat rychlost hoření nebo intenzitu hoření hořlavé látky nebo vytvářet směs s hořlavou látkou, která se po důkladném promísení samovolně vznítí. Je založena na zkoušce OSN pro kapaliny podporující hoření (1) a je jí rovnocenná. Vzhledem k tomu, že tato metoda A.21 byla v prvé řadě zavedena s ohledem na požadavky směrnice nařízení (ES) č. 1907/2006, vyžaduje se srovnání pouze s jednou referenční látkou. Další zkoušení a srovnávání s dalšími referenčními látkami bude nutné, mají-li být výsledky zkoušky použity pro jiné účely ([1]).

Tato zkouška nemusí být prováděna, pokud je z rozboru strukturního vzorce zcela nepochybné, že látka nemůže s jiným hořlavým materiálem reagovat exotermicky.

Před prováděním zkoušky je užitečné mít předběžné informace o možných výbušných vlastnostech látky.

Tato zkouška není použitelná pro pevné látky, plyny, výbušné nebo vysoce hořlavé látky nebo organické peroxidy.

Tato zkouška nemusí být prováděna, pokud jsou pro danou látku již k dispozici výsledky zkoušky OSN pro kapaliny podporující hoření (1).

1.2 DEFINICE A JEDNOTKY

Průměrnou dobou nárůstu tlaku se rozumí průměr naměřených časových hodnot, v jejichž průběhu dojde v testované směsi k nárůstu tlaku z 690 kPa na 2 070 kPa nad atmosférický tlak.

1.3 REFERENČNÍ LÁTKA

Jako referenční látka se použije 65 % (hmot.) vodný roztok kyseliny dusičné p.a. ([2]).

([1]) Např. pro účely předpisů OSN pro přepravu.
([2]) Koncentrace kyseliny by měla být před zkoušením stanovena titrací.

▼B

Pokud experimentátor předpokládá, že výsledky zkoušky mohou být případně použity pro jiné účely ([1]), je vhodné použít více referenčních látek ([1]).

1.4 PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

Zkoušená kapalina se smísí v poměru 1:1 (hmot.) s vláknitou celulosou a vpraví se do tlakové nádoby. Pokud dojde při mísení nebo plnění k samovolnému vznícení, není třeba ve zkoušce pokračovat.

Pokud k samovolnému vznícení nedojde, provede se celá zkouška. Směs se zahřívá v tlakové nádobě a měří se průměrná doba, za kterou dojde k nárůstu tlaku z 690 kPa na 2 070 kPa nad atmosférický tlak. Tato hodnota se porovná s průměrnou dobou pro směs referenční látky (referenčních látek) a celulosy v poměru 1:1.

1.5 KRITÉRIA JAKOSTI

V sérii pěti zkoušek jedné látky by neměl být rozdíl jednotlivých výsledků a aritmetického průměru větší než 30 %. Výsledky, které se liší od aritmetického průměru o více než 30 % se nepoužijí, proces mísení a plnění se zlepší a zkoušení zopakuje.

1.6 POPIS METODY

1.6.1 **Příprava**

1.6.1.1 *Hořlavá látka*

Jako hořlavý materiál se použije usušená vláknitá celulosa s délkou vlákna od 50 do 250 μm a středním průměrem 25 μm ([2]). Suší se ve vrstvě o tloušťce nejvýše 25 mm 4 hodiny při 105 °C do konstantní hmotnosti a uchovává se v exsikátoru nad vysoušedlem až do vychladnutí a samotného použití. Obsah vlhkosti ve vysušené celulose by měl být nižší než 0,5 %, vztaženo na suchou látku ([3]). Aby bylo této hodnoty dosaženo, doba sušení se podle potřeby prodlouží ([4]). Pro celou zkoušku se použije tatáž šarže celulosy.

([1]) Např. v odkazu 1 se používají 50 % (hmot.) kyselina chloristá a 40 % (hmot.) chlorečnan sodný

([2]) Např. prášková celulosa Whatman Column Chromatographic Cellulose Powder CF 11, katalogové číslo 4021 050.

([3]) Potvrzeno např. titrací podle Karla Fishera

([4]) Tohoto obsahu vlhkosti lze také dosáhnout např. zahříváním při 105 °C za vakua po dobu 24 hodin.

▼B

1.6.1.2 *Zkušební zařízení*

1.6.1.2.1 Tlaková nádoba

Zkouška vyžaduje použití tlakové nádoby. Nádobou je ocelový tlakový válec o délce 89 mm a vnějším průměru 60 mm (viz obrázek 1). Válec je na dvou protilehlých stranách opracován do plochy (v těchto místech je průměr nádobky 50 mm), aby byla usnadněna manipulace při nasazování zažehovací a ventilační zátky. Nádoba má vrtání o světlosti 20 mm a na obou koncích je do hloubky 19 mm rozšířena a opatřena závitem, aby do ní mohla být zavedena trubka odpovídající 1" British Standard Pipe (BSP) nebo jejímu metrickému ekvivalentu. Ve vzdálenosti 35 mm od jednoho konce a v úhlu 90° k nezploštělým stěnám je do válcové stěny tlakové nádoby našroubováno boční rameno pro odvod tlaku. Otvor pro toto rameno je vyvrtán do hloubky 12 mm a opatřen závitem tak, aby vyhovoval závitu 1/2" BSP (nebo metrickému ekvivalentu) na konci bočního ramene. V případě potřeby se inertním těsněním zajistí plynotěsnost. Boční rameno přesahuje těleso nádoby o 55 mm a je v něm vyvrtaný kanál o průměru 6 mm. Konec bočního ramene je uvnitř rozšířen a opatřen závitem pro membránové čidlo tlaku. Lze použít jakékoli měřidlo tlaku, které je odolné proti horkým plynům a produktům rozkladu a na nárůst tlaku z 690 na 2 070 kPa reaguje nejpozději do 5 ms.

Konec tlakové nádobky vzdálenější od bočního ramene je opatřen zažehovací zátkou se dvěma elektrodami, přičemž jedna je od zátky izolovaná a druhá je přes zátku uzemněná. Druhý konec tlakové nádoby je uzavřen průtržným diskem (průtržný tlak přibližně 2 200 kPa), který je přidržován zátkou s vrtáním o světlosti 20 mm. V případě potřeby se inertním těsněním zajistí plynotěsnost zažehovací zátky. Podstavec (obrázek 2) drží sestavu během používání ve správné poloze. Skládá se obvykle ze základny z měkké oceli o rozměrech 235 mm × 184 mm × 6 mm a ze 185 mm dlouhého dutého hranolu o rozměrech 70 mm × 70 mm × 4 mm.

Dvě protilehlé strany tělesa jsou vyříznuty tak, aby vznikl podstavec ve tvaru 86 mm dlouhého hranolu na dvou plochých nožičkách. Konce těchto plochých nožiček jsou seříznuty v úhlu 60° vzhledem k horizontální rovině a jsou přivařeny k podstavci. Na horním konci hranolu je vykrojení o šířce 22 mm a hloubce 46 mm, do něhož zapadne boční rameno tlakové nádoby, poté co je do držáku – zažehovací zátkou napřed – zasazena tlaková nádobka. Na vnitřní nižší stranu hranolového držáku je přivařen distanční ocelový kus o šířce 30 mm a tloušťce 6 mm. Tlakovou nádobu na místě zajišťují dva 7 mm postranní křídlové šrouby umístěné v otvorech na protější straně. Na boční díl dna hranolového držáku jsou navařeny dva 12 mm široké a 6 mm silné ocelové pásky, které podepírají tlakovou nádobu zespodu.

▼B

1.6.1.2.2 Zážehový systém

Zážehový systém se skládá z Ni/Cr drátu o délce 25 m, průměru 0,6 mm a odporu 3,85 Ω/m. Drát se pomocí tyčinky o průměru 5 mm navine do tvaru cívky a připojí k elektrodám v zážehové zátce. Dvě možné podoby cívky jsou uvedeny na obrázku 3. Vzdálenost spodní strany nádoby a zážehové cívky by měla být 20 mm. Pokud nelze elektrody nastavit, měly by být konce zážehového drátu mezi cívkou a dnem tlakové nádoby izolovány keramickým pláštěm. Drát se zahřívá konstantním stejnosměrným proudem nejméně 10 A.

1.6.2 **Provedení zkoušky** ([1])

Zařízení vybavené snímačem tlaku a zahřívacím systémem, avšak bez průtržného disku, se vloží do stojanu zážehovou zátkou dolů. Ve skleněné kádince se pomocí skleněného míchadla smíchá 2,5 g kapaliny, která má být zkoušena, s 2,5 g usušené celulosy ([2]). Z bezpečnostních důvodů by měl stát experimentátor při mísení za ochranným štítem. Pokud se směs při mísení nebo plnění vznítí, není třeba ve zkoušce pokračovat. Směs se přidává do tlakové nádoby po malých dávkách a je pěchována poklepem, přičemž je třeba zajistit, aby směs obklopovala zážehovou cívku a byla s ní v těsném kontaktu. Je důležité, aby při plnění nedošlo k deformaci cívky, neboť by to vedlo k chybným výsledkům ([3]). Do tlakové nádoby se vloží průtržný disk a zašroubuje se přidržovací zátka. Naplněná nádoba se vloží do stojanu pro provedení zkoušky průtlakovým diskem nahoru a sestava se umístí do vhodné pancéřované digestoře nebo spalovací komory. Vnější svorky zážehové zátky se připojí ke zdroji napájení o proudu 10 A. Od zahájení mísení do vpuštění proudu do cívky by nemělo uplynout více než 10 minut.

Signál snímače tlaku se zaznamenává vhodným systémem, který umožňuje jak hodnocení, tak trvalý záznam časového průběhu tlaku (např. zapisovač přechodových dějů). Směs se zahřívá do doby, než se roztrhne průtržný disk, nebo po dobu 60 sekund. Pokud se průtržný disk neroztrhne, je třeba před opatrným rozebráním zařízení nechat směs vychladnout, přičemž je třeba dávat pozor na případné zvyšování tlaku. Provede se pět pokusů se zkoušenou a referenční látkou (referenčními látkami). Zaznamená se doba, za kterou dojde k nárůstu tlaku z 690 kPa na 2 070 kPa nad atmosférický tlak. Vypočte se průměrná doba vzestupu tlaku.

V některých případech může látka vykazovat nárůst tlaku (příliš vysoký nebo příliš nízký), který necharakterizuje oxidační vlastnosti látky, a to v důsledku chemické reakce. V takových případech může být nezbytné opakovat zkoušku s inertní látkou, např. s křemelinou (infuzoriovou hlinkou), namísto celulosy, aby se vyjasnil typ reakce.

([1]) Směsi oxidujících látek musí být považovány za látky s možným nebezpečím výbuchu a musí s nimi být nakládáno opatrně.

([2]) V praxi toho lze dosáhnout přípravou směsi látky a celulosy v poměru 1:1 v množství větším než je nezbytné pro pokus; 5 ± 0,1 g takové směsi se poté vpraví do tlakové nádoby. Směs se připravuje čerstvá pro každý pokus.

([3]) Zejména se nesmějí dotýkat sousední závity cívky.

▼B

2. **ÚDAJE**

Doba nárůstu tlaku u zkoušené látky a u referenční látky (referenčních látek). Doba nárůstu tlaku při zkoušce s inertní látkou, provádí-li se.

2.1 ZPRACOVÁNÍ VÝSLEDKŮ

Vypočte se průměrná doba nárůstu tlaku u zkoušené látky a u referenční látky (referenčních látek).

Vypočte se průměrná doba nárůstu tlaku při zkoušce s inertní látkou, provádí-li se.

Příklady výsledků jsou uvedeny v tabulce 1.

Tabulka 1

Příklady výsledků [a]

Látka [b]	Průměrná doba nárůstu tlaku pro směs s celulosou v poměru 1:1 (ms)
Dichroman amonný, nasycený vodný roztok	20 800
Dusičnan vápenatý, nasycený vodný roztok	6 700
Dusičnan železitý, nasycený vodný roztok	4 133
Chloristan lithný, nasycený vodný roztok	1 686
Chloristan horečnatý, nasycený vodný roztok	777
Dusičnan nikelnatý, nasycený vodný roztok	6 250
Kyselina dusičná, 65 %	4 767 [c]
Kyselina chloristá, 50 %	121 [c]
Kyselina chloristá, 55 %	59
Dusičnan draselný, 30 % vodný roztok	26 690
Dusičnan stříbrný, nasycený vodný roztok	[d]
Chlorečnan sodný, 40 % vodný roztok	2 555 [c]
Dusičnan sodný, 45 % vodný roztok	4 133
Inertní látka	
Voda: celulosa	[d]

[a] Klasifikace pro přepravu podle ustanovení OSN je uvedena v literatuře (1).
[b] Nasycený roztok se připraví při 20 °C.
[c] Střední hodnota z mezilaboratorních porovnávacích pokusů.
[d] Maximální tlak 2 070 kPa nebyl dosažen.

▼B

3. **ZPRÁVA**

3.1 PROTOKOL O ZKOUŠCE

Protokol o zkoušce by měl obsahovat tyto údaje:

— druh, složení, čistotu atd. zkoušené látky,

— koncentraci zkoušené látky,

— postup sušení použité celulosy,

— vlhkost použité celulosy,

— výsledky měření,

— výsledky zkoušek s inertní látkou, byly-li provedeny,

— vypočtené průměrné doby nárůstu tlaku,

— jakékoli odchylky od této metody s uvedením důvodů,

— všechny další doplňující informace nebo poznámky důležité pro interpretaci výsledků.

3.2 INTERPRETACE VÝSLEDKŮ ([1])

Hodnocení výsledků se zakládá na těchto skutečnostech:

a) na tom, zda došlo k samovolnému vznícení směsi zkoušené látky a celulosy,

b) a na porovnání průměrné doby nárůstu tlaku z 690 kPa na 2 070 kPa s dobou, kterou vykazuje referenční látka (referenční látky).

Kapalina se považuje za oxidující, pokud:

a) se směs látky a celulosy v poměru 1:1 (hmot.) samovolně vznítí, nebo

b) je průměrná doba nárůstu tlaku směsi látky a celulosy v poměru 1:1 (hmot.) rovna průměrné době nárůstu tlaku směsi 65 % (hmot.) vodného roztoku kyseliny dusičné a celulosy nebo kratší.

S cílem vyhnout se falešně pozitivnímu výsledku je při analýze výsledků potřeba zohlednit také výsledky zkoušení látky s inertním materiálem.

([1]) Interpretace výsledků získaných za použití více refernečních látek podle předpisů OSN je popsána v literatuře (1).

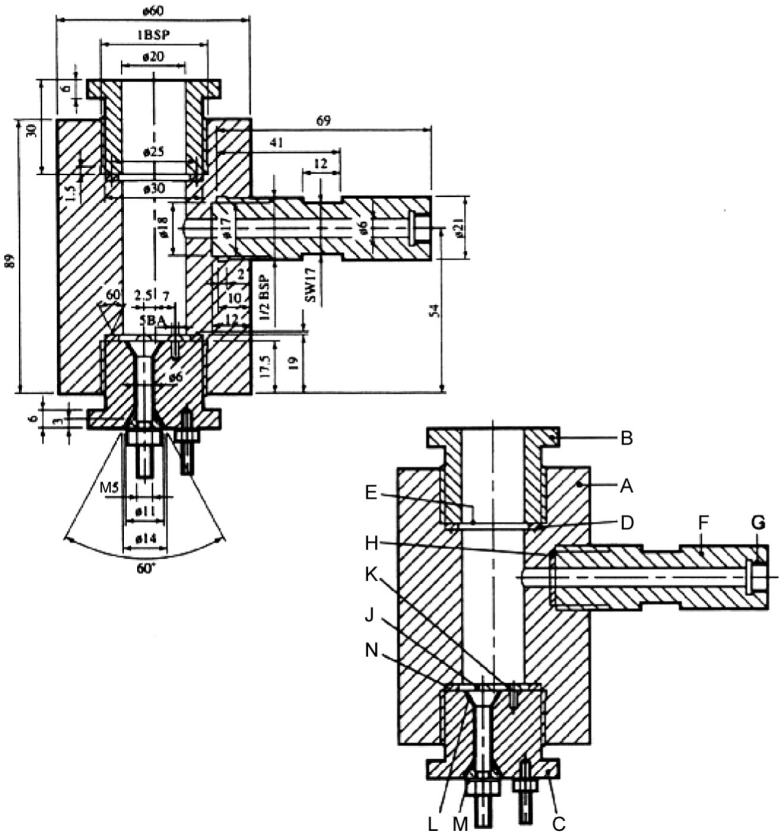
▼B

4. **LITERATURA**

1) Recommendations on the Transport of Dangerous Goods, Manual of Tests and Criteria. 3rd revised edition. UN Publication No: ST/SG/AC. 10/11/Rev. 3, 1999, page 342. Test O.2: Test for oxidizing liquids.

Obrázek 1

Tlaková nádoba

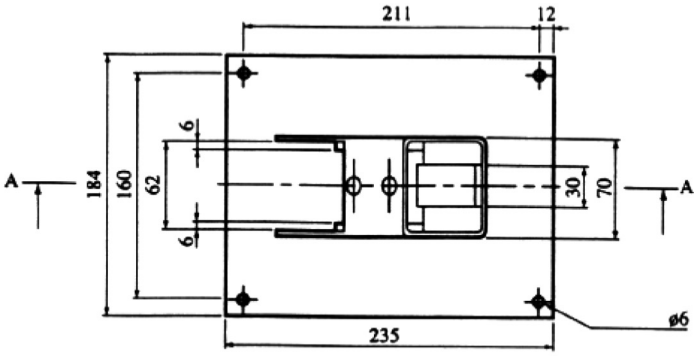


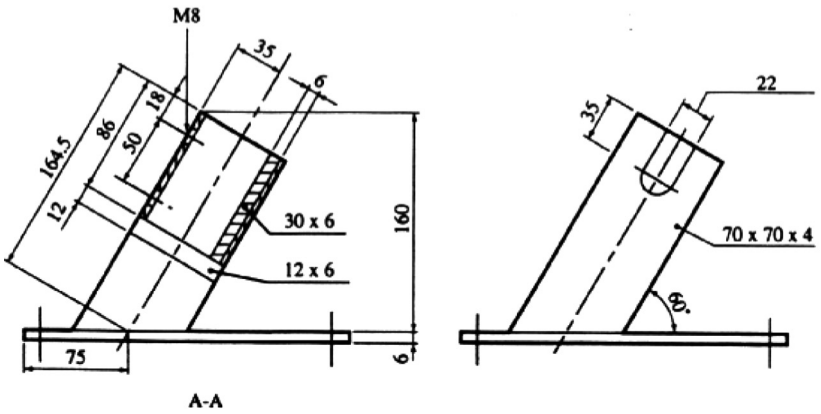
(A)Těleso tlakové nádoby	(B) Zátka přidržující průtržný disk	(C) Zažehovací zátka
(D) Těsnění z měkkého olova	(E) Průtržný disk	(F) Boční rameno
(G) Čelo čidla tlaku	(H) Těsnění	(J)Izolovaná elektroda
(K) Uzemněná elektroda	(L) Izolace	(M) Ocelový kužel
(N) Těsnicí spára		

▼B

Obrázek 2

Podstavec

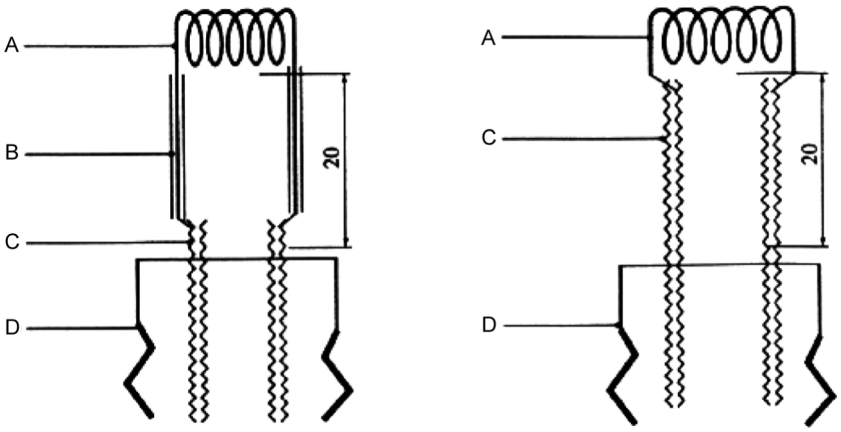




Obrázek 3

Zážehový systém

(A) Zážehová cívka (B) Izolace (C) Elektrody (D) Zážehová zátka



Poznámka: může být použito kterékoli z těchto dvou uspořádání.

▼M1

A.22 DÉLKOVĚ VÁŽENÝ STŘEDNÍ GEOMETRICKÝ PRŮMĚR VLÁKEN

1. METODA

1.1 ÚVOD

Tato metoda popisuje postup měření délkově váženého středního geometrického průměru (DVGSP) umělých minerálních vláken (UMV). Jelikož DVGSP statistického souboru bude s pravděpodobností 95 % mezi hladinami významnosti 95 % (DVGSP ± dvě střední směrodatné chyby) vzorku, ohlášená hodnota (testová hodnota) bude nižší hladina významnosti 95 % vzorku (tj. DVGSP – 2 dvě střední směrodatné chyby). Metoda je založena na aktualizaci (červen 1994) návrhu průmyslového postupu HSE (Výkonný výbor pro zdraví a bezpečnost) dohodnutého na schůzce HSE a ECFIA (Evropská asociace odvětví keramických vláken) v Chesteru dne 26. září 1993 a vyvinutého druhou mezilaboratorní zkouškou (1, 2). Tato měřicí metoda může být použita pro charakterizaci průměru vláken sypkých látek či výrobků obsahujících UMV, včetně vysokotavných keramických vláken (VKV), umělých skelných vláken (USV), krystalických a polykrystalických vláken.

Délkové vážení je způsobem kompenzace vlivu rozlomení dlouhých vláken při odběru vzorků či při manipulaci s vlákny na rozložení jejich průměru. Pro měření rozložení velikosti průměrů UMV jsou použita geometrická statistická data (geometrický průměr), jelikož tyto průměry obvykle mají rozložení velikosti blížící se normálnímu.

Měření délky a průměru je jak únavné, tak dlouhé, ovšem pokud se měří pouze ta vlákna, která se dotýkají nekonečně tenké čáry na zorném poli rastrovacího elektronového mikroskopu, pak je pravděpodobnost výběru daného vlákna přímo úměrná jeho délce. Jelikož tím se zohledňuje délka při délkově vážených výpočtech, jediné vyžadované měření je měření průměru a DVGSP-2SE může být vypočten uvedeným způsobem.

1.2 DEFINICE

Částice: objekt s poměrem délky k šířce menším než 3:1.

Vlákno: objekt s poměrem délky k šířce (charakteristický poměr) nejméně 3:1.

1.3 PLATNOST A OMEZENÍ

Metoda je určena pro pohled na rozdělení průměrů o středním průměru mezi 0,5 μm a 6 μm. Větší průměry mohou být měřeny pomocí menších zvětšení rastrového elektronového mikroskopu, ale tato metoda bude stále více limitována vzhledem k rozdělení jemných vláken a je-li střední průměr menší než 0,5 μm, doporučujeme měření transmisním elektronovým mikroskopem (TEM).

▼M1

1.4 Princip měřicí metody

Z vláknové pokrývky či z volných sypkých vláken se odebere několik reprezentativních jádrových vzorků. Sypká vlákna jsou délkově omezena pomocí procesu drcení a reprezentativní podíl vzorku se rozpustí ve vodě. Poměrné podíly se vyloučí a přefiltrují přes polykarbonátový filtr o rozměrech pórů 0,2 μm a připraví se na pozorování pomocí technik rastrovacího elektronového mikroskopu (SEM). Průměry vláken se měří při zvětšení obrazovky × 10 000 nebo vyšším ([1]) pomocí čárové zadržovací metody, aby se získal nezaujatý odhad středního průměru. Vypočte se nižší hladina významnosti 95 % (na základě jednostranného testu), a tím se získá odhad nejnižších hodnot geometrického středního průměru vláken materiálu.

1.5 Popis měřicí metody

1.5.1 **Bezpečnostní opatření**

Je nutno minimalizovat vystavení osob zvířeným vláknům a při manipulaci se suchými vlákny je nutno používat digestoř či suchou skříň. Je nutno periodicky provádět monitoring osobní expozice pro určení efektivity kontrolních metod. Při manipulaci s UMV je nutno nosit jednorázové rukavice pro omezení podráždění kůže a pro zabránění křížové kontaminaci.

1.5.2 **Přístroje/zařízení**

— lis a lisovadla (schopná vyvinout tlak 10 MPa),

— polykarbonátové filtry s kapilárními póry o velikosti 0,2 μm (průměr 25 mm),

— membránový filtr z esteru buničiny o rozměru pórů 5 μm jako filtr záložní,

— skleněný filtrační přístroj (či použitelné filtrační systémy) pro filtry o průměru 25 cm (např. skleněná mikroanalytická sada Millipore typ XX10 025 00),

— čerstvá voda destilovaná přes filtr o rozměru pórů 0,2 μm pro odstranění mikroorganismů,

— katodový rozprašovač s anodou ze zlata či ze zlata/palladia,

— rastrovací elektronový mikroskop schopný rozlišení až 10 nm a pracující při zvětšení × 10 000,

— různé: stěrky, skalpel typu 24, pinzeta, tubusy SEM, uhlíkové lepidlo či uhlíková lepicí páska, stříbrná tyčinka,

— ultrazvuková sonda či ultrazvuková lázeň na desce laboratorního stolu,

— odběrač vzorků sedimentu či korkovrt pro odebírání jádrových vzorků z pokrývky UMV.

([1]) Tato hodnota zvětšení je uvedena pro vlákna o průměru 3 μm, pro vlákna o průměru 6 μm je vhodnější zvětšení × 5 000.

▼**M1**

1.5.3 **Postup měření**

1.5.3.1 *Odběr vzorků*

U pokrývek a roun se používá odběrač vzorků velikosti 25 mm či korkovrt pro odebírání vzorků z řezu. Vzorky by měly být rovnoměrně rozprostřeny po šířce a z malé délky pokrývky, nebo by měly být odebrány z náhodných ploch, je-li k dispozici pokrývka o velké délce. Stejné zařízení může být použito pro odběr náhodných vzorků z volných vláken. Je-li to možné, mělo by být odebráno šest vzorků tak, aby byly zohledněny prostorové odchylky v sypkém materiálu.

Těchto šest jádrových vzorků je nutno rozdrtit v lisovadle o průměru 50 mm tlakem 10 MPa. Materiál se rozmíchá stěrkou a znovu se stlačí tlakem 10 MPa. Poté se materiál vyjme z lisovadla a umístí v utěsněné skleněné láhvi.

1.5.3.2 *Příprava vzorku*

Je-li to nutné, organické pojivo může být odstraněno umístěním vláken do pece o teplotě 450 °C po dobu jedné hodiny.

Vytvarujte vzorek do kužele a rozčtvrťte jej (to by mělo být provedeno uvnitř prachové skříně).

Přidejte stěrkou malé množství vzorku (< 0,5 g) do 100 ml čerstvé destilované vody, která byla přefiltrována přes membránový filtr 0,2 μm (je možno použít jiný zdroj velmi čisté vody, ukáže-li se být uspokojivý). Řádně rozmíchejte vzorek pomocí ultrazvukové sondy provozované s výkonem 100 W a vyladěné tak, aby se objevila kavitace (není-li sonda k dispozici, postupujte takto: opakovaně vzorek protřepte a otočte jej na dobu 30 sekund; po dobu pěti minut vystavte vzorek ultrazvuku v ultrazvukové lázni; poté opět několikrát protřepte a otočte vzorek po dobu dalších 30 sekund).

Ihned po promíchání vláken odeberte několik poměrných dílů (např. tři poměrné části o 3, 6 a 10 ml) pomocí široké pipety (o objemu 2–5 ml).

Vakuově přefiltrujte každý poměrný díl přes polykarbonátový filtr 0,2 μm s pomocí podpůrného filtru MEC o velikosti pórů 5 μm pomocí skleněného filtračního tunelu 25 mm s válcovou nádrží. Přibližně 5 ml filtrované destilované vody by mělo být umístěno do tunelu a poměrný díl by měl být pomalu pipetován do vody, okraj pipety se drží pod prohnutou čočkou. Po pipetování musí být pipeta a nádrž řádně propláchnuta, jelikož tenká vlákna mají snahu ulpívat dále na povrchu.

Opatrně odstraňte filtr a oddělte jej od podpůrného filtru před jeho umístěním do obalu za účelem jeho vysušení.

▼M1

Uřízněte čtvrtinu či polovinu filtrované části filtrovaného depozitu pomocí skalpelu typu 24 trhnutím. Opatrně připojte odříznutou část k bloku SEM pomocí lepící uhlíkové pásky či uhlíkového lepidla. Je nutno použít alespoň na třech místech stříbrnou tyčinku pro zlepšení elektrického kontaktu na okrajích filtru a bloku. Je-li lepidlo/stříbrná tyčinka suchá, katodově rozprašte cca 50 nm zlata či zlata/palladia na povrch depozitu.

1.5.3.3 *Kalibrace a provoz SEM*

1.5.3.3.1 Kalibrace

Kalibrace SEM by měla být zkontrolována minimálně jednou za týden (ideálně jednou denně) pomocí certifikované kalibrační mřížky. Kalibrace musí být kontrolována vůči certifikovanému standardu a není-li naměřená hodnota (SEM) v rozsahu ±2 % hodnoty certifikované, potom musí být kalibrace SEM seřízena a znovu zkontrolována.

SEM by měl být schopen rozlišit alespoň minimální viditelný průměr 0,2 μm pomocí reálné vzorkovací matice při zvětšení × 2 000.

1.5.3.3.2 Provoz

SEM by měl být provozován při zvětšení 10 000 ([1]) za podmínek, které dávají dobré rozlišení při přijatelném snímku při pomalých snímacích rychlostech např. 5 sekund na rámec. I když se provozní požadavky různých SEM mohou lišit, obecně by mělo být použito urychlovací napětí 5–10 keV s nastavením malé velikosti bodu a krátkou pracovní vzdáleností; tím se získá nejlepší viditelnost a rozlišení s materiály o relativně nízkých atomových hmotnostech. Při provádění lineárního příčného pohybu musí být použit sklon 0° pro minimalizaci přeostření, nebo má-li SEM eucentrickou fázi, musí být použita eucentrická pracovní vzdálenost. Menší zvětšení může být použito, neobsahuje-li materiál vlákna o malých průměrech a průměry vláken jsou velké (> 5 μm)

1.5.3.4 *Třídění dle rozměrů*

1.5.3.4.1 Pozorování při malém zvětšení pro vyhodnocení vzorku

Zpočátku by měl být vzorek pozorován při malém zvětšení pro ujištění se o rozdrcení velkých vláken a pro vyhodnocení hustoty vláken. V případě velkého rozdrcení je doporučeno připravit nový vzorek.

Kvůli statistické přesnosti je nezbytné změřit minimální počet vláken a může se zdát být výhodná vysoká hustota vláken, jelikož pozorováním prázdných polí ztrácíme čas a nijak k analýze nepřispíváme. Ovšem při přetížení filtru je obtížné změřit všechna měřitelná vlákna a jelikož malá vlákna mohou být zakryta vlákny většími, mohou být vynechána.

([1]) U vláken 3 μm viz předchozí poznámka.

▼**M1**

Je-li hustota vláken větší než 150 vláken na milimetr lineárního příčného posuvu, může dojít k nežádoucímu vlivu nadhodnocení DVGSP. Na druhé straně malá koncentrace vláken zvyšuje dobu analýzy a často je nákladově efektivní připravit vzorek v hustotou vlákna blíže hodnotě optimální, než zůstat u počítání vláken o menších koncentracích. optimální hustota vláken by měla dávat průměrně jedno či dvě počítatelná vlákna na pole z záběru o zvětšení 5 000. Nicméně optimální hustota bude záviset na velikosti (průměru) vláken, takže je nezbytné, aby obsluha používala odborný úsudek za účelem rozhodnutí, zda je hustota vláken blízko hodnotě optimální či nikoliv.

1.5.3.4.2 Délkové vážení průměrů vláken

Pouze ta vlákna, která se dotýkají (nebo kříží) (nekonečně) tenkou čáru nakreslenou na obrazovce SEM, se započítávají. Z tohoto důvodu je přes střed obrazovky nakreslena horizontální (či vertikální) čára.

Alternativně může být ve středu obrazovky umístěn jediný bod a zahájí se spojité snímání v jednom směru přes filtr. Každé vlákno o charakteristickém poměru větším než 3:1 dotýkající se při procházející tímto bodem má změřený a zaznamenaný průměr.

1.5.3.4.3 Třídění vláken

Doporučuje se měření minimálně 300 vláken. Každé vlákno je měřeno pouze jednou v bodě průsečíku s čárou či bodem nakresleným na snímku (nebo blízko průsečíku, jsou-li okraje vlákna zakrytá). Jestliže se objeví vlákna s nerovnoměrným průřezem, je nutno použít měření reprezentující střední průměr vlákna. Je nutno dbát na definování okraje a měřit nejkratší vzdálenost mezi okraji vlákna. Třídění může být prováděno on-line, nebo off-line na uložených snímcích či fotografiích. Doporučeny jsou poloautomatické snímkovací měřicí systémy, které stahují data přímo do tabulky, jelikož šetří čas, eliminují chyby v přepisech a mohou být zautomatizovány výpočty.

Konce dlouhých vláken by měla být zkontrolovány při malém zvětšení, aby bylo zajištěno, že se nepřesunou zpět do měřicího zorného pole a že budou měřeny pouze jednou.

2. **DATA**

2.1 NAKLÁDÁNÍ S VÝSLEDKY

Průměry vláken obvykle nemají normální rozdělení. Ovšem provedením logaritmické transformace je možno získat rozdělení, které se blíží normálnímu.

Vypočtěte aritmetický průměr (střední (mean) lnD) a standardní odchylku (SD_{lnD}) logaritmem o základu e hodnoty (lnD) průměrů vláken (D).

$$\text{mean lnD} = \frac{\sum \text{lnD}}{n} \qquad (1)$$

▼**M1**

$$SD_{lnD} = \sqrt{\frac{\Sigma(lnD - \text{mean } lnD)^2}{n - 1}} \quad (2)$$

Standardní odchylka je dělena druhou odmocninou počtu měření (n), čímž získáme střední směrodatnou chybu (SE_{lnD}).

$$SE_{lnD} = \frac{SD}{\sqrt{n}} \quad (3)$$

Odečtěte od průměrné hodnoty dvojnásobek střední směrodatné chyby a vypočtěte exponenciál této hodnoty (průměr mínus dvě střední směrodatné chyby), což dává střední geometrickou hodnotu mínus dvě geometrické směrodatné chyby.

$$LWGMD - 2SE = e^{(\text{mean } lnD - 2SE_{lnd})} \quad (4)$$

3. **ZPRÁVY**

ZPRÁVA O MĚŘENÍ

Zpráva o měření by měla obsahovat minimálně tyto informace:

— hodnotu DVGSP-2SE,

— veškeré odchylky a zejména ty, které mohou mít vliv na přesnost výsledků, s patřičným odůvodněním.

4. **LITERATURA**

(1) B. Tylee SOP MF 240. Health and Safety Executive. Únor 1999.

(2) G. Burdett and G. Revell. Development of a standard method to measure the length-weigthed geometric mean fibre diameter: Results of the Second inter-laboratory exchange. IR/L/MF/94/07. Projekt R42.75 HPD. Health and Safety Executive. Research and Laboratory Services Division. 1994.

▼M4

A.23 ROZDĚLOVACÍ KOEFICIENT (OKTAN-1-OL/VODA): METODA POMALÉHO MÍCHÁNÍ

ÚVOD

1. Tato zkušební metoda odpovídá Pokynům OECD pro zkoušení (TG) č. 123 (2006). Metodou pomalého míchání byly přesně stanoveny hodnoty rozdělovacího koeficientu oktan-1-ol/voda (P_{ow}) až po hodnotu log P_{ow} = 8,2 (1). Proto je vhodným experimentálním postupem pro přímé stanovení P_{ow} vysoce hydrofobních látek.

2. Dalšími metodami stanovení rozdělovacího koeficientu oktan-1-ol/voda (P_{ow}) jsou metoda „třepací lahve“ (2) a stanovení P_{ow} z retenčního chování při reverzní fázi HPLC (3). Při metodě „třepací lahve“ může dojít k artefaktům v důsledku přenosu mikrokapiček oktanolu do vodné fáze. Při vzrůstajících hodnotách P_{ow} vede přítomnost těchto kapiček ve vodné fázi k zvyšujícímu se nadhodnocení odhadu koncentrace zkoušené chemické látky ve vodě. Proto je její použití omezeno na látky s log P_{ow} < 4. Druhá metoda závisí na spolehlivosti údajů přímo stanovených hodnot P_{ow}, které se používají ke kalibraci vztahu mezi retenčním chováním při HPLC a naměřenými hodnotami P_{ow}. Pro stanovení rozdělovacích koeficientů oktan-1-ol/voda u ionizovatelných látek byla k dispozici pracovní verze pokynů OECD (4), ta se však již nemá nadále používat.

3. Tato zkušební metoda byla vyvinuta v Nizozemsku. Přesnost zde popisovaných metod byla validována a optimalizována ve validační studii mezilaboratorních testů, které se zúčastnilo 15 laboratoří (5).

VÝCHOZÍ ÚVAHY

Význam a použití

4. U inertních organických látek byl zjištěn velmi významný vztah mezi rozdělovacími koeficienty oktan-1-ol/voda (P_{ow}) a jejich bioakumulací v rybách. Dále bylo prokázáno, že P_{ow} koreluje s toxicitou pro ryby a rovněž se sorpcí chemických látek na pevné látky, např. půdu a sedimenty. V literatuře je uveden rozsáhlý přehled těchto vztahů (6).

5. Byla stanovena široká škála vztahů mezi rozdělovacím koeficientem oktan-1-ol/voda a dalšími vlastnostmi látek s významem pro environmentální toxikologii a chemii. V důsledku toho se stal rozdělovací koeficient oktan-1-ol/voda klíčovým parametrem při posuzování rizik chemických látek pro životní prostředí a rovněž při odhadu osudu chemických látek v životním prostředí.

Oblast použití

6. Má se za to, že experiment používající pomalé míchání omezuje tvorbu mikrokapiček z kapiček oktan-1-olu ve vodné fázi. Proto nedochází k nadhodnocení odhadu koncentrace zkoušené chemické látky ve vodné fázi v důsledku molekul zkoušené chemické látky asociovaných na tyto kapičky. Metoda pomalého míchání je proto vhodná zejména k stanovení P_{ow} u látek s předpokládanou hodnotou log P_{ow} = 5 a vyšší, u nichž má metoda třepací lahve (2) tendenci vést k chybným výsledkům.

▼M4

DEFINICE A JEDNOTKY

7. Rozdělovací koeficient látky pro rozdělení mezi vodu a lipofilní rozpouštědlo (oktan-1-ol) charakterizuje rovnovážný stav distribuce chemické látky mezi těmito dvěma fázemi. Rozdělovací koeficient oktan-1-ol/voda (P_{ow}) je definován jako poměr rovnovážných koncentrací zkoušené chemické látky v oktan-1-olu nasyceném vodou (C_o) a ve vodě nasycené oktan-1-olem (C_w).

$$P_{OW} = C_O/C_W$$

Protože se jedná o podíl dvou koncentrací, je bezrozměrný. Nejčastěji se udává jako dekadický logaritmus (log P_{ow}). Hodnota P_{ow} závisí na teplotě a vykazované údaje by měly zahrnovat i teplotu měření.

PODSTATA METODY

8. Pro stanovení rozdělovacího koeficientu se musí vzájemně ekvilibrovat voda, oktan-1-ol a zkoušená chemická látka při konstantní teplotě. Poté se stanoví koncentrace zkoušené chemické látky v obou fázích.

9. Potíže při provádění experimentu spojené s tvorbou mikrokapiček během experimentu používajícího metodu třepací lahve lze omezit zde navrhovanou metodou pomalého míchání. Při experimentu používajícím metodu pomalého míchání se rovnováhy mezi vodou, oktan-1-olem a zkoušenou chemickou látkou dosáhne v termostatovaném míchaném reaktoru. Výměna mezi fázemi je urychlena mícháním. Při míchání dochází jen k omezeným turbulencím, což zlepšuje výměnu mezi oktan-1-olem a vodou bez současné tvorby mikrokapiček (1).

POUŽITELNOST ZKOUŠKY

10. Protože přítomnost jiných látek než zkoušené chemické látky může ovlivnit aktivitní koeficient zkoušené chemické látky, měla by se ověřit čistota zkoušené chemické látky. Pro stanovení rozdělovacího koeficientu oktan-1-ol/voda by se měla použít látka o nejvyšší čistotě, která je komerčně dostupná.

11. Tato metoda se používá u čistých látek, které nedisociují ani neasociují a nejsou výrazně povrchově aktivní. U takových látek a směsí je možné metodu použít ke stanovení rozdělovacího koeficientu oktan-1-ol/voda. Pokud se tato metoda používá u směsí, jsou stanovené rozdělovací koeficienty oktan-1-ol/voda podmíněné a závisejí na chemickém složení zkoušené směsi a na složení elektrolytu použitého jako vodná fáze. Pokud se podniknou doplňující kroky, lze tuto metodu použít rovněž pro disociující nebo asociující sloučeniny (odstavec 12).

12. Vzhledem k mnohonásobným rovnovážným stavům ve vodě a oktan-1-olu při rozdělování disociujících látek, jako jsou organické kyseliny a fenoly, organické báze a látky na organokovové sloučeniny, je rozdělovací koeficient oktan-1-ol/voda podmíněnou konstantou, která výrazně závisí na složení elektrolytu (7)(8). Stanovení rozdělovacího koeficientu oktan-1-ol/voda proto vyžaduje, aby bylo pH a složení elektrolytu v experimentu regulované a aby se zaznamenalo. Při hodnocení těchto rozdělovacích koeficientů je třeba vycházet z odborného posudku. S pomocí hodnoty disociační(ch) konstant(y) se musí zvolit vhodné hodnoty pH, aby se stanovil rozdělovací koeficient pro každý ionizační stav. Při zkoušení organokovových sloučenin se musí použít nekomplexující pufry (8). Vezmou-li se v úvahu stávající znalosti z oblasti chemie vodných roztoků (konstanty stability komplexu, disociační konstanty), měly by se zvolit experimentální podmínky takovým způsobem, aby bylo možno odhadnout, jaké formy vytvoří zkoušená chemická látka ve vodné fázi. Iontová síla by měla být ve všech experimentech identická díky použití základního elektrolytu.

▼M4

13. Provádění této zkoušky může být problemetické v případě látek s nízkou rozpustností ve vodě nebo vysokým P_{ow}, protože jejich koncentrace ve vodě je tak nízká, že je obtížné ji přesně stanovit. Tato zkušební metoda uvádí pokyny, jak tento problém řešit.

INFORMACE O ZKOUŠENÉ CHEMICKÉ LÁTCE

14. Chemická činidla by měla mít analytickou nebo vyšší čistotu. Doporučuje se použít neznačené zkoušené chemické látky se známým chemickým složením a pokud možno o čistotě alespoň 99 % nebo radioizotopově značené zkoušené chemické látky se známým chemickým složením a radiochemickou čistotou. V případě značek s krátkým eliminačním poločasem by se měly provést korekce na rozpad. V případě radioizotopově značených zkoušených látek by se měla použít chemická specifická analytická metoda k zajištění toho, aby naměřená radioaktivita přímo souvisela se zkoušenou chemickou látkou.

15. Odhad hodnoty log P_{ow} lze vypočítat pomocí komerčně dostupného softwaru pro odhad hodnoty log P_{ow} nebo použitím podílu rozpustností v obou rozpouštědlech.

16. Před provedením experimentu používajícím pomalé míchání k stanovení hodnoty P_{ow} je třeba mít k dispozici následující informace o zkoušené chemické látce:

a) strukturní vzorec;

b) vhodné analytické metody k stanovení koncentrace látky ve vodě a oktan-1-olu;

c) disociační konstanta (konstanty) ionizovatelných látek (Pokyny OECD 112 (9));

d) rozpustnost ve vodě (10);

e) abiotická hydrolýza (11);

f) snadná biologická rozložitelnost (12);

g) tlak par (13).

POPIS METODY

Vybavení a aparatura

17. Je třeba standardní laboratorní vybavení, zejména:

— magnetické míchačky a magnetické míchací tyčinky s teflonovým povlakem k míchání vodné fáze,

— analytické přístroje vhodné k stanovení koncentrace zkoušené chemické látky v předpokládaném rozmezí koncentrací,

— míchací nádoba s kohoutem v dolní části. V závislosti na odhadované hodnotě log P_{ow} a mezi stanovitelnosti (LOD) zkoušené sloučeniny se musí zvážit použití reakční nádoby stejného tvaru o objemu větším než jeden litr, aby bylo možno získat dostatečný objem vody pro chemickou extrakci a analýzu. Koncentrace ve vodném extraktu tak budou vyšší a tím bude i k analytické stanovení spolehlivější. V příloze 1 naleznete tabulku, v níž jsou uvedeny odhady minimálního potřebného objemu, LOD sloučeniny, její odhadované hodnoty log P_{ow} a její rozpustnost ve vodě. Tabulka je založena na vztahu mezi hodnotou log P_{ow} a poměrem rozpustností v oktanolu a ve vodě, jak jej uvádí Pinsuwan*et al.* (14):

$$\log P_{OW} = 0,\ 88 \log SR + 0,\ 41$$

▼M4

kde

$SR = S_{oct}/S_w$ (v jednotkách molární koncentrace),

a na vztahu pro odhad rozpustnosti ve vodě, jak jej uvádí Lyman (15). Hodnoty rozpustnosti ve vodě vypočítané podle rovnice uvedené v příloze 1 se musí považovat za první odhad. Je třeba poznamenat, že uživatel může k získání odhadu rozpustnosti ve vodě použít bez omezení jakýkoli vztah, o němž se má za to, že lépe vyjadřuje vztah mezi hydrofobicitou a rozpustností. Například u sloučenin v pevném skupenství se doporučuje zahrnout do odhadu rozpustnosti bod tání. V případě, že se použije pozměněný vzorec, je třeba se ujistit, že vzorec pro výpočet rozpustnosti v oktanolu i nadále platí. V dodatku 2 je uveden schematický nákres míchací nádoby se skleněným pláštěm o objemu asi jeden litr. Proporce nádoby uvedené v dodatku 2 se osvědčily jako vhodné a měly by se zachovat i při použití aparatury jiné velikosti,

— během experimentu používajícího pomalé míchání je nezbytné udržovat konstantní teplotu.

18. Nádoby by měly být vyrobeny z inertního materiálu, aby byla adsorpce na povrch nádoby zanedbatelná.

Příprava roztoků ke zkoušce

19. Stanovení hodnoty P_{ow} by se mělo provádět s oktan-1-olem o nejvyšší čistotě, který je komerčně dostupný (nejméně 99 %). Doporučuje se přečištění oktan-1-olu extrakcí kyselinou, zásadou a vodou s následným vysušením. Kromě toho se může oktan-1-ol přečistit destilací. Purifikovaný oktan-1-ol se použije k přípravě standardních roztoků zkoušené chemické látky. Při stanovení hodnoty P_{ow} by se měla používat voda destilovaná ve skleněné nebo křemenné aparatuře nebo získaná z purifikačního systému nebo se může použít voda v čistotě pro HPLC. U destilované vody je nutná filtrace přes 0,22μm filtr a měly by se zahrnout slepé pokusy za účelem ověření, že koncentrované extrakty neobsahují žádné nečistoty, které by mohly interferovat se zkoušenou chemickou látkou. Používá-li se filtr ze skleněných vláken, měl by se vyčistit vystavením teplotě 400 °C po dobu nejméně tří hodin.

20. Obě rozpouštědla se před experimentem vzájemně nasytí tím, že uvedením do rovnovážného stavu v dostatečně velké nádobě. Dosáhne se toho pomalým mícháním tohoto dvoufázového systému po dobu dvou dnů.

21. Zvolí se vhodná koncentrace zkoušené chemické látky a látka se rozpustí v oktan-1-olu (nasyceném vodou). Rozdělovací koeficient oktan-1-ol/voda se musí stanovit v ředěných roztocích látky v oktan-1-olu a vodě. Proto by koncentrace zkoušené chemické látky neměla přesáhnout 70 % její rozpustnosti, přičemž maximální koncentrace v každé fázi by měla být 0,1 M (1). Roztoky oktan-1-olu použité v experimentu nesmějí obsahovat suspendované pevné částečky zkoušené chemické látky.

22. Vhodné množství zkoušené chemické látky se rozpustí v oktan-1-olu (nasyceném vodou). Pokud je odhadovaná hodnota log P_{ow} větší než pět, je třeba pečlivě zajistit, aby roztoky oktan-1-olu používané v experimentu neobsahovaly suspendované pevné částečky zkoušené chemické látky. K tomu je třeba použít u chemických látek s odhadovanou hodnotou log $P_{ow} > 5$ tento postup:

— zkoušená chemická látka se rozpustí v oktan-1-olu (nasyceném vodou),

▼M4

— roztok se nechá po dostatečně dlouhou dobu ustálit, aby se suspendovaná pevná látka usadila. V průběhu usazování se sleduje koncentrace zkoušené chemické látky,

— poté, co naměřené koncentrace látky v roztoku oktan-1-olu dosáhnou stálých hodnot, naředí se zásobní roztok vhodným objemem oktan-1-olu,

— koncentrace ředěného zásobního roztoku se změří. Jestliže naměřená koncentrace odpovídá ředění, může se naředěný zásobní roztok použít v experimentu s pomalým mícháním.

Extrakce a analýza vzorků

23. Stanovení zkoušené chemické látky by se mělo provádět validovanou analytickou metodou. Experimentátoři musí podat důkaz o tom, že se koncentrace látky v oktan-1-olové fázi nasycené vodou a rovněž ve vodné fázi nasycené oktan-1-olem během experimentu nacházejí nad mezí stanovitelnosti použitých analytických postupů. V případě, že jsou nutné extrakční metody, musí se před experimentem stanovit analyticky výtěžky zkoušené chemické látky z vodné fáze a z oktan-1-olové fáze. Analytický signál se musí korigovat s ohledem na slepé vzorky a je třeba zajistit, aby se jeden vzorek nemohl kontaminovat analytem z jiného vzorku.

24. Před analýzou bude pravděpodobně nutné provést extrakci vodné fáze organickým rozpouštědlem a zakoncentrování extraktu, protože koncentrace hydrofobních zkoušených látek ve vodné fázi je poměrně nízká. Ze stejného důvodu je nezbytné snížit případné koncentrace slepých vzorků. Proto je třeba použít rozpouštědla o vysoké čistotě, nejlépe rozpouštědla pro analýzu reziduí. Kromě toho může použití předem pečlivě vyčištěného(např. umytím v rozpouštědle nebo pečením při zvýšené teplotě) skla pomoci zabránit křížové kontaminaci.

25. Odhad hodnoty log P_{ow} lze získat pomocí programu pro odhady nebo na základě odborného posudku. Je-li tato hodnota vyšší než šest, je třeba pečlivě sledovat korekce na slepé vzorky a případnou kontaminaci analytu. Podobně, přesáhne-li odhadovaná hodnota log P_{ow} šest, je povinné použití náhradního standardu pro korekci na výtěžnost, aby bylo možné dosáhnout vysokých faktorů zakoncentrování. K odhadu hodnoty log P_{ow} je komerčně dostupná řada počítačových programů ([1]), např. Clog P (16), KOWWIN (17), ProLogP (18) a ACD log P (19). V literatuře (20–22) jsou uvedeny popisy metod odhadu.

26. Pomocí schválených metod se určí meze stanovitelnosti (LOQ) zkoušené chemické látky v oktan-1-olu a vodě. Na základě empirie lze mezní hodnotu kvantitativní stanovitelnosti dané metody určit jako koncentraci látky ve vodě nebo oktan-1-olu, při které je poměr signálu k šumu deset. Měla by se zvolit vhodná metoda extrakce a předběžného zakoncentrování a také by se měly specifikovat analyticky výtěžky. Zvolí se vhodný faktor zakoncentrování, aby se při analytickém stanovení získal signál požadované velikosti.

([1]) Tyto informace jsou poskytovány pouze pro potřebu uživatelů. Mohou se použít i jiné rovnocenné počítačové programy, pokud lze prokázat, že vedou ke stejným výsledkům.

▼M4

27. Na základě parametrů analytické metody a očekávaných hodnot koncentrace se určí přibližná velikost vzorku nezbytného pro přesné stanovení koncentrace sloučeniny. Vodné vzorky by neměly být příliš malé, protože by analytický signál nemusel být dostatečný. Zároveň by neměly být vodné vzorky příliš velké, aby celkové množství vody stačilo na minimální počet požadovaných analýz (n = 5). V dodatku 1 je uvedeno, že minimální objem vzorku závisí na objemu nádoby, mezi stanovitelnosti zkoušené chemické látky (LOD) a na rozpustnosti zkoušené chemické látky.

28. Kvantifikace zkoušené chemické látky se provádí porovnáním s kalibračními křivkami příslušné sloučeniny. Koncentrace v analyzovaných vzorcích musí být doplněny koncentracemi standardů v závorkách.

29. U zkoušených látek s odhadovanou hodnotou log P_{ow} větší než šest je třeba přidat k vodnému vzorku před extrakcí náhradní standard za účelem registrace ztrát během extrakce a zakoncentrování vodných vzorků. Pro přesnou korekci na výtěžnost musí mít náhradní standardy vlastnosti velmi podobné vlastnostem zkoušené chemické látky nebo identické vlastnosti. K tomuto účelu se přednostně používají (stabilní) izotopově značené analogy dotčených látek (například značené deuteriem nebo izotopy ^{13}C). Není-li možno použít značení stabilními izotopy, tj. ^{13}C nebo ^{2}H, mělo by se prokázat pomocí spolehlivých údajů z literatury, že jsou fyzikálně-chemické vlastnosti náhradního standardu velmi podobné vlastnostem zkoušené chemické látky. Během extrakce typu kapalina-kapalina v případě vodné fáze mohou vznikat emulze. Lze je omezit přidáním soli a ponecháním emulze, aby se přes noc usadila. Je třeba uvést metody použité pro extrakci a předběžné zakoncentrování vzorků.

30. Vzorky odebrané z oktan-1-olové fáze se mohou před analýzou v případě potřeby naředit vhodným rozpouštědlem. Dále se použití náhradních standardů pro korekci na výtěžnost doporučuje u látek, u nichž experimenty stanovující výtěžnost prokázaly vysoký stupeň rozptylu v těchto experimentech (relativní směrodatná odchylka > 10 %).

31. Je třeba uvést podrobnosti o analytické metodě. To zahrnuje metodu extrakce, faktory zakoncentrování a ředění, parametry přístrojů, kalibrační postup, kalibrační rozpětí, analytický výtěžek zkoušené chemické látky z vody, přidání náhradních standardů pro korekci na výtěžnost, hodnoty slepých vzorků, meze stanovitelnosti a meze kvantitativní stanovitelnosti.

Provedení zkoušky

Optimální poměry objemu oktan-1-olu/vody

32. Při volbě objemu vody a oktan-1-olu je třeba vzít v potaz mez stanovitelnosti (LOQ) v oktan-1-olu a vodě, koncentrační faktory použité u vodných vzorků, objemy vzorků odebíraných z oktan-1-olu a vody a očekávané koncentrace. Z experimentálních důvodů by se měl zvolit takový objem oktan-1-olu v systému pomalého míchání, aby byla vrstva oktan-1-olu dostatečně silná (> 0,5 cm), a umožnila tak odběr vzorků z oktan-1-olové fáze bez jejího porušení.

33. Obvyklé poměry mezi fázemi používané pro stanovení sloučenin s hodnotou log P_{ow} = 4,5 a vyšší činí 20–50 ml oktan-1-olu a 950–980 ml vody v nádobě o objemu jeden litr.

▼M4

Zkušební podmínky

34. Reakční nádoba se v průběhu zkoušky termostatuje, aby nedocházelo ke kolísání teploty o více než 1 °C. Stanovení by se mělo provádět při teplotě 25 °C.

35. Experimentální systém by měl být chráněn před denním světlem buď prováděním experimentu v tmavé komoře, nebo zakrytím reakční nádoby hliníkovou fólií.

36. Experiment by se měl provádět v (co možná nejvíce) bezprašném prostředí.

37. Systém oktan-1-ol–voda se míchá až do dosažení rovnovážného stavu. V zkušebním experimentu se stanoví doba, za jakou dojde k ustavení rovnováhy, provedením experimentu s pomalým mícháním a odebíráním vzorků vody a oktan-1-olu v pravidelných intervalech. Časy odběru jednotlivých vzorků by měly být navzájem odděleny intervalem alespoň pěti hodin.

38. Každé stanovení P_{ow} se musí provést pomocí nejméně tří nezávislých experimentů s pomalým mícháním.

Stanovení doby ustavení rovnováhy

39. Předpokládá se, že rovnovážného stavu je dosaženo, když regrese podílu koncentrací v oktan-1-olu/vodě v závislosti na čase v časovém rozmezí čtyř časových bodů vede ke směrnici, která se při hladině p = 0,05 výrazně neliší od nuly. Minimální doba nutná k ustavení rovnováhy, než lze zahájit odběr vzorků, je jeden den. Dle empirického pravidla lze u látek s odhadovanou hodnotou log P_{ow} menší než pět zahájit odběr vzorků během druhého a třetího dne. U hydrofobnějších látek může být nutné tuto dobu ekvilibrace prodloužit. Sloučenina s hodnotou log P_{ow} 8,23 (dekachlorobifenyl) stačilo k dosažení rovnováhy 144 hodin. Rovnováha se stanoví pomocí opakovaného odběru vzorků z jedné nádoby.

Zahájení experimentu

40. Na začátku experimentu se reakční nádoby naplní oktan-1-olem nasyceným vodou. Je třeba vyčkat dostatečnou dobu, aby se dosáhlo teploty termostatování.

41. Požadované množství zkoušené chemické látky (rozpuštěné v potřebném objemu oktan-1-olu nasyceného vodou) se opatrně přidá do reakční nádoby. Tento krok je kritický, neboť je nutno zabránit turbulentnímu promíchání obou fází. Proto se oktan-1-olová fáze se pipetuje pomalu proti stěně experimentální nádoby v blízkosti povrchu vody. oktan-1-olová fáze poté steče po skleněné stěně a vytvoří vrstvičku nad vodnou fází. Vždy by se mělo zabránit přímé dekantaci oktan-1-olu do nádoby, kapičky oktan-1-olu by neměly padat přímo do vody.

42. Po zahájení míchání by se měla pomalu zvyšovat rychlost míchání. Nelze-li míchací motory vhodně nastavit, mělo by se zvážit použití transformátoru. Rychlost míchání by se měla nastavit tak, aby se v místě fázového rozhraní vody a oktan-1-olu vytvořil vír o hloubce 0,5 až maximálně 2,5 cm. Rychlost míchání by se měla snížit, jestliže hloubka víru překročí 2,5 cm. Jinak se mohou z kapiček oktan-1-olu ve vodě vytvořit mikrokapičky, což vede k přecenění odhadu koncentrace zkoušené chemické látky ve vodě. Tato maximální rychlost míchání 2,5 cm se doporučuje na základě výsledků validační studie mezilaboratorních testů (5). Jedná se o kompromis mezi rychlým dosažením rovnováhy a omezením tvorby mikrokapiček oktan-1-olu.

▼M4

Odběr a zpracování vzorků

43. Před odběrem vzorků by se měla míchačka vypnout a vyčkat, až ustane pohyb kapaliny. Po dokončení odběru vzorků se míchačka opět pomalu spustí způsobem popsaným výše a rychlost míchání se postupně zvýší.

44. Vzorky vodné fáze se odebírají z uzavíracího kohoutu ve spodní části reakční nádoby. Vždy je třeba vylít mrtvý objem vody, který zůstává v kohoutcích (přibližně 5 ml u nádoby vyobrazené v dodatku 2). Voda v kohoutcích se nemíchá, a proto není v rovnováze s hlavním objemem vody v nádobě. Zaznamená se objem vodných vzorků. Při stanovování látkové bilance je nutné vzít v úvahu množství zkoušené chemické látky obsažené ve vylité vodě. Ztráty odparem by se měly minimalizovat tím, že se voda nechá pomalu vtékat do dělící nálevky tak, aby se při tom nenarušila vrstva voda/oktan-1-ol.

45. Oktan-1-olové vzorky se získají odebráním malého množství (asi 100 μl) oktan-1-olové vrstvy pomocí 100mikrolitrové sklo-kovové stříkačky. Je třeba dát pozor, aby se nenarušila hranice mezi fázemi. Objem odebraného vzorku se zaznamená. Malé množství stačí, neboť oktan-1-klový vzorek se bude ředit.

46. Vzorky není vhodné zbytečně převádět. Proto by se měl objem vzorku stanovit gravimetricky. V případě vodných vzorků toho lze dosáhnout soustředěním vodného vzorku do dělící nálevky, která již obsahuje požadovaný objem rozpouštědla.

ÚDAJE A JEJICH PŘEDKLÁDÁNÍ

47. V souladu se stávající zkušební metodou se P_{ow} stanoví provedením tří experimentů používajících pomalé míchání (tři experimentální jednotky) se studovanou sloučeninou za identických podmínek. Regrese použitá k prokázání dosažení rovnovážného stavu by měla vycházet z výsledků alespoň čtyř stanovení C_o/C_w po sobě jdoucích časových bodech. To umožňuje vypočítat rozptyl jako měřítko neurčitosti průměrné hodnoty získané u každé experimentální jednotky.

48. P_{ow} lze charakterizovat rozptylem údajů získaných pro každou experimentální jednotku. Tato informace se použije k výpočtu P_{ow} jako váženého průměru výsledků jednotlivých experimentálních jednotek. Provede se to tak, že se převrácená hodnota rozptylu výsledků experimentálních jednotek použije jako váha. Údaje s velkou variabilitou (vyjádřenou jako rozptyl), a tedy s nižší spolehlivostí, pak budou mít menší vliv na výsledek než údaje s nízkou variabilitou.

49. Analogicky se vypočítá vážená směrodatná odchylka. Ta charakterizuje opakovatelnost měření P_{ow}. Nízká hodnota vážené směrodatné odchylky naznačuje, že stanovení P_{ow} bylo v rámci jedné laboratoře vysoce opakovatelné. Formální statistické zpracování údajů je uvedeno níže.

▼M4

Zpracování výsledků

Prokázání dosažení rovnovážného stavu

50. Pro každý čas odběru vzorku se vypočítá logaritmus podílu koncentrace zkoušené chemické látky v oktan-1-olu a vodě (log (C_o/C_w)). Dosažení chemické rovnováhy se prokáže z grafu závislosti tohoto podílu na čase. Plato v grafu, které prochází alespoň čtyřmi po sobě jdoucími časovými body, dokazuje, že bylo dosaženo rovnovážného stavu a že sloučenina je skutečně rozpuštěna v oktan-1-olu. Pokud tomu tak není, je třeba ve zkoušce pokračovat, dokud se směrnice čtyř po sobě jdoucích bodů nebude jen málo odlišovat od nuly při hladině p = 0,05, což dokazuje, že hodnota log C_o/C_w nezávisí na čase.

Výpočet log P_{ow}

51. Hodnota log P_{ow} experimentální jednotky se vypočítá jako vážený průměr log C_o/C_w pro tu část křivky závislosti log C_o/C_w na čase, pro niž bylo prokázáno dosažení rovnovážného stavu. Vážený průměr se vypočítá tak, že se jako váha údajů použije převrácená hodnota rozptylu, takže vliv údajů na konečný výsledek je nepřímo úměrný neurčitosti údajů.

Průměrná hodnota log P_{ow}

52. Průměrná hodnota log P_{ow} různých experimentálních jednotek se vypočítá jako průměr výsledků jednotlivých experimentálních jednotek vážený jejich příslušnými rozptyly.

Výpočet se provádí takto:

$$\log P_{OW,Av} = (\Sigma w_i \times \log P_{OW,i}) \times (\Sigma w_i)^{-1}$$

kde:

$\log P_{ow,i}$ = hodnota log P_{ow} jednotlivé experimentální jednotky i;

$\log P_{ow,Av}$ = hodnota váženého průměru jednotlivých stanovení log P_{ow};

w_i = statistická váha přidělená hodnotě log P_{ow} experimentální jednotky i.

Jako w_i se použije reciproká hodnota rozptylu log $P_{ow,i} w_i = \text{var}(\log P_{OW,i})^{-1}$

53. Chyba průměru log P_{ow} se odhadne jako opakovatelnost log C_o/C_w stanoveného během rovnovážné fáze v jednotlivých experimentálních jednotkách. Vyjadřuje se jako vážená směrodatná odchylka log $P_{ow,Av}$ ($\sigma_{\log Pow,Av}$), která je zase měřítkem chyby spojené s log $P_{ow,Av}$. Váženou směrodatnou odchylku σσlze vypočítat z váženého rozptylu ($var_{\log P_{ow,Av}}$) ($var_{\log Pow,Av}$) takto:

$$\text{var}_{\log Pow,Av} = (\Sigma w_i \times (\log P_{OW,i} - \log P_{OW,Av})^2) \times (\Sigma w_i \times (n-1))^{-1}$$

$$\sigma_{\log Pow,Av} = (\text{var}_{\log Pow,Av})^{0,5}$$

Písmeno „n“ označuje počet experimentálních jednotek.

▼M4

Protokol o zkoušce

54. Protokol o zkoušce by měl obsahovat tyto údaje:

Zkoušená chemická látka:

— obecný název, chemický název, číslo CAS, strukturní vzorec (určující polohu značky, pokud se používá radioizotopově značkovaná látka) a příslušné fyzikálně-chemické vlastnosti (viz odstavec 17),

— čistota (nečistoty) zkoušené chemické látky,

— čistota značky u značených chemických látek a molární aktivitu (je-li to vhodné),

— předběžný odhad hodnoty log P_{ow} a rovněž metodu použitou k jejímu odvození.

Zkušební podmínky:

— data provedení studií,

— teplota během experimentu,

— objemy oktan-1-olu a vody na začátku zkoušky,

— objemy odebraných vzorků oktan-1-olu a vody,

— zbylé objemy oktan-1-olu a vody ve zkušebních nádobách,

— popis použitého laboratorního nádobí a podmínek míchání (rozměry míchací tyčinky a zkušební nádoby, výška víru v mm a rychlost míchání, je-li k dispozici),

— analytické metody použité k stanovení zkoušené chemické látky a mez kvantitativní stanovitelnosti dané metody,

— časy odběru vzorků,

— pH vodné fáze a použité pufry, jestliže je pH upraveno s ohledem na ionizovatelné molekuly,

— počet opakování.

Výsledky:

— opakovatelnost a citlivost použitých analytických metod,

— stanovené koncentrace zkoušené chemické látky v oktan-1-olu a vodě v závislosti na čase,

— vyjádření látkové bilance,

— teplota a směrodatná odchylka teplotního rozmezí během experimentu,

— regrese podílu koncentrací v závislosti na čase,

— průměrná hodnota log $P_{ow,Av}$ a její směrodatná odchylka,

— diskuse a interpretace výsledků,

▼**M4**

— příklady naměřených údajů z reprezentativní analýzy (všechny naměřené údaje musí být uloženy v souladu se zásadami správné laboratorní praxe), včetně výtěžků náhrad a počtu ředění použitých při kalibraci (spolu s kritérii pro korelační koeficient kalibrační křivky) a výsledky zajištění kvality/kontroly kvality (QA/QC),

— případně validační zpráva o postupu zkoušky (uvede se v literatuře).

LITERATURA:

1) De Bruijn JHM, Busser F, Seinen W, Hermens J. (1989). Determination of octanol/water partition coefficients with the 'slow-stirring' method. Environ. Toxicol. Chem. 8: 499-512.

2) Kapitola A.8 této přílohy, Rozdělovací koeficient.

3) Kapitola A.8 této přílohy, Rozdělovací koeficient.

4) OECD (2000). OECD Draft Guideline for the Testing of Chemicals: 122 Partition Coefficient (n-Octanol/Water): pH-Metric Method for Ionisable Substances. Paris.

5) Tolls J (2002). Partition Coefficient 1-Octanol/Water (Pow) Slow-Stirring Method for Highly Hydrophobic Chemicals, Validation Report. RIVM contract-Nrs 602730 M/602700/01.

6) Boethling RS, Mackay D (eds.) (2000). Handbook of property estimation methods for chemicals. Lewis Publishers Boca Raton, FL, USA.

7) Schwarzenbach RP, Gschwend PM, Imboden DM (1993). Environmental Organic Chemistry. Wiley, New York, NY.

8) Arnold CG, Widenhaupt A, David MM, Müller SR, Haderlein SB, Schwarzenbach RP (1997). Aqueous speciation and 1-octanol-water partitioning of tributyl- and triphenyltin: effect of pH and ion composition. *Environ. Sci. Technol.* 31: 2596-2602.

9) OECD (1981) OECD Guidelines for the Testing of Chemicals: 112 Dissociation Constants in Water. Paris.

10) Kapitola A.6 této přílohy, Rozpustnost ve vodě.

11) Kapitola C.7 této přílohy, Rozklad – Abiotický rozklad – hydrolýza jako funkce pH.

12) Kapitola C.4 – část II–VII (metoda A až F) této přílohy, Stanovení „snadné" biologické rozložitelnosti.

13) Kapitola A.4 této přílohy, Tlak par.

14) Pinsuwan S, Li A and Yalkowsky S.H. (1995). Correlation of octanol/water solubility ratios and partition coefficients, *J. Chem. Eng. Data.* 40: 623-626.

15) Lyman WJ (1990). Solubility in water. In: Handbook of Chemical Property Estimation Methods: Environmental Behavior of Organic Compounds, Lyman WJ, Reehl WF, Rosenblatt DH, Eds. American Chemical Society, Washington, DC, 2-1 to 2-52.

16) Leo A, Weininger D (1989). Medchem Software Manual. Daylight Chemical Information Systems, Irvine, CA.

17) Meylan W (1993). SRC-LOGKOW for Windows. SRC, Syracuse, N.Y.

18) Compudrug L (1992). ProLogP. Compudrug, Ltd, Budapest.

19) ACD. ACD logP; Advanced Chemistry Development: Toronto, Ontario M5H 3V9, Canada, 2001.

▼**M4**

20) Lyman WJ (1990). Octanol/water partition coefficient. In Lyman WJ, Reehl WF, Rosenblatt DH, eds, *Handbook of chemical property estimation*, American Chemical Society, Washington, D.C.

21) Rekker RF, de Kort HM (1979). The hydrophobic fragmental constant: An extension to a 1 000 data point set. *Eur. J. Med. Chem. Chim. Ther.* 14: 479-488.

22) Jübermann O (1958). Houben-Weyl, ed, *Methoden der Organischen Chemie*: 386-390.

▼M4

Dodatek 1

Tabulka pro výpočet minimálních objemů vody nutných k detekci zkoušených látek o různých hodnotách log P_{ow} ve vodné fázi

Předpoklady:

— Maximální objem jednotlivých podílů = 10 % celkového objemu; 5 podílů = 50 % celkového objemu.

— Koncentrace zkoušených látek = 0,7 × rozpustnost v každé z fází. V případě nižších koncentrací budou potřeba větší objemy.

— Objem použitý ke stanovení meze stanovitelnosti (LOD) = 100 ml.

— log P_{ow} oproti log S_w a log P_{ow} oproti SR (S_o/S_w) vhodně vyjadřují vztahy zkoušených chemických látek.

Odhad S_w

log P_{ow}	rovnice	log S_w	S_w (mg/l)
4	$(-)0{,}922 \times \log P_{ow} + 4{,}184$	0,496	3,133E+00
4,5	$(-)0{,}922 \times \log P_{ow} + 4{,}184$	0,035	1,084E+00
5	$(-)0{,}922 \times \log P_{ow} + 4{,}184$	– 0,426	3,750E-01
5,5	$(-)0{,}922 \times \log P_{ow} + 4{,}184$	– 0,887	1,297E-01
6	$(-)0{,}922 \times \log P_{ow} + 4{,}184$	– 1,348	4,487E-02
6,5	$(-)0{,}922 \times \log P_{ow} + 4{,}184$	– 1,809	1,552E-02
7	$(-)0{,}922 \times \log P_{ow} + 4{,}184$	– 2,270	5,370E-03
7,5	$(-)0{,}922 \times \log P_{ow} + 4{,}184$	– 2,731	1,858E-03
8	$(-)0{,}922 \times \log P_{ow} + 4{,}184$	– 3,192	6,427E-04

Odhad S_o

log P_{ow}	rovnice	S_o (mg/l)
4	$\log P_{ow} = 0{,}88 \log SR + 0{,}41$	3,763E+04
4,5	$\log P_{ow} = 0{,}88 \log SR + 0{,}42$	4,816E+04
5	$\log P_{ow} = 0{,}88 \log SR + 0{,}43$	6,165E+04
5,5	$\log P_{ow} = 0{,}88 \log SR + 0{,}44$	7,890E+04
6	$\log P_{ow} = 0{,}88 \log SR + 0{,}45$	1,010E+05
6,5	$\log P_{ow} = 0{,}88 \log SR + 0{,}46$	1,293E+05
7	$\log P_{ow} = 0{,}88 \log SR + 0{,}47$	1,654E+05
7,5	$\log P_{ow} = 0{,}88 \log SR + 0{,}48$	2,117E+05
8	$\log P_{ow} = 0{,}88 \log SR + 0{,}49$	2,710E+05

▼**M4**

Celková hmotnost m zkoušené chemické látky (mg)	m_o/m_w	m_w (mg)	C_w (mg/l)	m_o (mg)	C_o (mg/l)
1 319	526	2,5017	2,6333	1 317	26 333
1 686	1 664	1,0127	1,0660	1 685	33 709
2 158	5 263	0,4099	0,4315	2 157	43 149
2 762	16 644	0,1659	0,1747	2 762	55 230
3 535	52 632	0,0672	0,0707	3 535	70 691
4 524	1664 36	0,0272	0,0286	4 524	90 480
5 790	5263 16	0,0110	0,0116	5 790	115 807
7 411	1 664 357	0,0045	0,0047	7 411	148 223
9 486	5 263 158	0,0018	0,0019	9 486	189 713

Výpočet objemů

Minimální požadovaný objem vodné fáze při jednotlivých koncentracich LOD

log P_{ow}	LOD (mikrogramy/l)→	0,001	0,01	0,10	1,00	10
4		0,04	0,38	3,80	38	380
4,5		0,09	0,94	9,38	94	938
5		0,23	2,32	23,18	232	2 318
5,5		0,57	5,73	57,26	573	5 726
6		1,41	14,15	141	1 415	14 146
6,5		3,50	34,95	350	3 495	34 950
7		8,64	86,35	864	8 635	86 351
7,5		21,33	213	2 133	21 335	213 346
8		52,71	527	5 271	52 711	527 111
Objem použitý pro LOD (l)	0,1					

Legenda k výpočtům:

Představuje < 10 % celkového objemu vodné fáze, ekvilibrační nádoba o objemu 1 litr.

Představuje < 10 % celkového objemu vodné fáze, ekvilibrační nádoba o objemu 2 litry.

Představuje < 10 % celkového objemu vodné fáze, ekvilibrační nádoba o objemu 5 litrů.

Představuje < 10 % celkového objemu vodné fáze, ekvilibrační nádoba o objemu 10 litrů.

Přesahuje 10 % objemu, a to i u ekvilibrační nádoby o objemu 10 litrů.

▼M4

Přehled požadovaných objemů v závislosti na rozpustnosti ve vodě a log P_{ow}

Minimální požadovaný objem fáze H_2O při každé koncentraci LOD (ml)

log P_{ow}	S_w (mg/l)	LOD (mikrogramy/l)→	0,001	0,01	0,10	1,00	10
4	10		0,01	0,12	1,19	11,90	118,99
	5		0,02	0,24	2,38	23,80	237,97
	3		0,04	0,40	3,97	39,66	396,62
	1		0,12	1,19	11,90	118,99	1 189,86
4,5	5		0,02	0,20	2,03	20,34	203,37
	2		0,05	0,51	5,08	50,84	508,42
	1		0,10	1,02	10,17	101,68	1 016,83
	0,5		0,20	2,03	20,34	203,37	2 033,67
5	1		0,09	0,87	8,69	86,90	869,01
	0,5		0,17	1,74	17,38	173,80	1 738,02
	0,375		0,23	2,32	23,18	231,75	2 317,53
	0,2		0,43	4,35	43,45	434,51	4 345,05
5,5	0,4		0,19	1,86	18,57	185,68	1 856,79
	0,2		0,37	3,71	37,14	371,36	3 713,59
	0,1		0,74	7,43	74,27	742,72	7 427,17
	0,05		1,49	14,85	148,54	1 485,43	14 854,35
6	0,1		0,63	6,35	63,48	634,80	6 347,95
	0,05		1,27	12,70	126,96	1 269,59	12 695,91
	0,025		2,54	25,39	253,92	2 539,18	25 391,82
	0,0125		5,08	50,78	507,84	5 078,36	50 783,64
6,5	0,025		2,17	21,70	217,02	2 170,25	21 702,46
	0,0125		4,34	43,40	434,05	4 340,49	43 404,93
	0,006		9,04	90,43	904,27	9 042,69	90 426,93
	0,003		18,09	180,85	1 808,54	18 085,39	180 853,86
7	0,006		7,73	77,29	772,89	7 728,85	77 288,50
	0,003		15,46	154,58	1 545,77	15 457,70	154 577,01
	0,0015		23,19	231,87	2 318,66	23 186,55	231 865,51
	0,001		46,37	463,73	4 637,31	46 373,10	463 731,03
7,5	0,002		19,82	198,18	1 981,77	19 817,73	198 177,33
	0,001		39,64	396,35	3 963,55	39 635,47	396 354,66
	0,0005		79,27	792,71	7 927,09	79 270,93	792 709,32

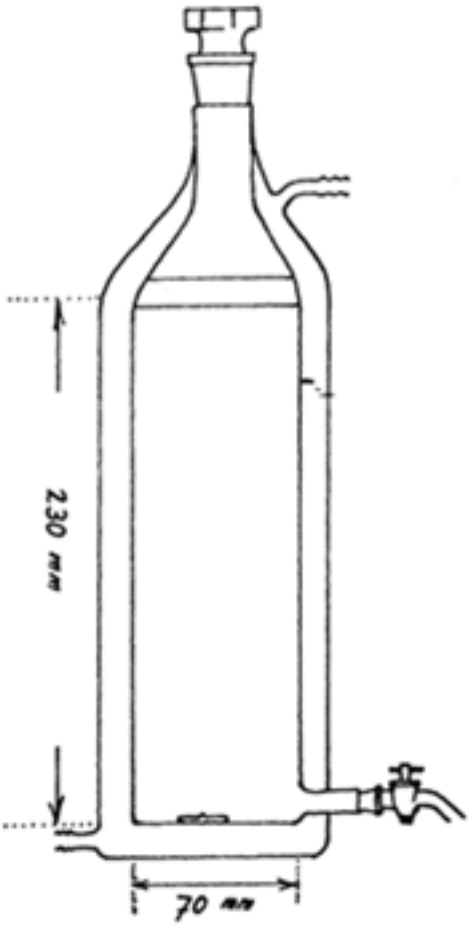
▼**M4**

log P_{ow}	S_w (mg/l)	LOD (mikrogramy/l)→	0,001	0,01	0,10	1,00	10
	0,00025		158,54	1 585,42	15 854,19	158 541,86	1 585 418,63
8	0,001		33,88	338,77	3 387,68	33 876,77	338 767,72
	0,0005		67,75	677,54	6 775,35	67 753,54	677 535,44
	0,00025		135,51	1 355,07	13 550,71	135 507,09	1 355 070,89
	0,000125		271,01	2 710,14	27 101,42	271 014,18	2 710 141,77
Objem použitý pro LOD (l)		0,1					

▼**M4**

Dodatek 2

Příklad nádoby se skleněným pláštěm pro experiment používající metodu pomalého míchání k stanovení P_{ow}



▼**M6**

A.24 ROZDĚLOVACÍ KOEFICIENT (N-OKTANOL/VODA), METODA VYSOKOÚČINNÉ KAPALINOVÉ CHROMATOGRAFIE (HPLC)

ÚVOD

Tato zkušební metoda je rovnocenná Pokynu OECD pro zkoušení (TG) 117 (2004).

1. Rozdělovací koeficient (P) je definován jako poměr rovnovážných koncentrací rozpuštěné látky v dvoufázovém systému tvořeném dvěma prakticky nemísitelnými rozpouštědly. V případě n-oktanolu a vody platí:

$$P_{ow} = \frac{C_n - \text{octanol}}{C_{\text{water}}}$$

Rozdělovací koeficient jako podíl dvou koncentrací je bezrozměrná veličina a obvykle se uvádí jeho dekadický logaritmus.

2. P_{ow} je klíčový parametr při studiu chování chemických látek v životním prostředí. Byl zjištěn vysoce významný vztah mezi P_{ow} neionizované formy látek a jejich bioakumulací u ryb. Bylo rovněž ukázáno, že P_{ow} je účinný parametr v odhadech adsorpce na půdě a sedimentech a při stanovení kvantitativních vztahů mezi strukturou a aktivitou v širokém rozsahu biologických účinků.

3. Původní návrh této zkušební metody vycházel z článku autorů C. V. Eadsfortha a P. Mosera (1). Vývoj zkušební metody a srovnávací zkoušky OECD mezi laboratořemi byly koordinovány centrálním úřadem pro životní prostředí (Umweltbundesamt) Spolkové republiky Německo během roku 1986 (2).

VÝCHOZÍ ÚVAHY

4. Hodnoty log P_{ow} v rozsahu – 2 až 4 (někdy až 5 a více) [1] mohou být experimentálně stanoveny metodou třepací lahve (Shake-Flask) (kapitola A.8 této přílohy, Pokyn OECD pro zkoušení 107). Metoda HPLC pokrývá log P_{ow} v rozsahu 0 až 6 (1, 2, 3, 4, 5). Tato metoda může vyžadovat odhad P_{ow} pro přiřazení vhodných referenčních látek a podporu jakýchkoli závěrů vyvozených z dat získaných zkouškou. Výpočtové metody jsou stručně probrány v dodatku této zkušební metody. HPLC provozní režim je izokratický.

5. Hodnoty P_{ow} závisejí na podmínkách prostředí, jakými jsou teplota, pH, iontová síla atd., a ty je třeba v experimentu definovat, aby byla zajištěna správná interpretace údajů P_{ow}. U ionizovatelných látek může být k dispozici jiná metoda (např. návrh pokynu OECD k metodě měření pH ionizovaných látek (6)) a lze ji použít jako alternativní metodu. Ačkoli tento návrh pokynu OECD může být vhodný pro stanovení P_{ow} těchto ionizovatelných látek, v některých případech je vhodnější použít metodu HPLC při pH odpovídajícím přírodnímu prostředí (viz odstavec 9).

[1] Horní mez je dána potřebou dosáhnout kompletní separace fází po ustavení rozdělovací rovnováhy a před tím, než jsou vzorky odebrány pro analytické stanovení. Při pečlivém provedení může být horní mez posunuta k vyšším hodnotám P_{ow}.

▼**M6**

PODSTATA METODY

6. HPLC na reverzní fázi se provádí v analytických kolonách plněných komerčně dostupnou pevnou fází obsahující dlouhé uhlovodíkové řetězce (např. C_8, C_{18}) chemicky vázané na oxid křemičitý.

7. Chemická látka nastříknutá do takové kolony se rozděluje mezi mobilní rozpouštědlovou fázi a uhlovodíkovou stacionární fázi, jak se působením mobilní fáze pohybuje kolonou. Látky jsou zadržovány úměrně jejich rozdělovacímu koeficientu uhlovodík-voda, přičemž hydrofilní látky se vymývají jako první a lipofilní látky jako poslední. Retenční čas je popsán kapacitním faktorem k daným výrazem:

$$k = \frac{t_R - t_0}{t_0}$$

kde t_R je retenční čas zkoušené látky a t_0 je mrtvý čas, tj. průměrná doba, kterou potřebuje molekula rozpouštědla, aby prošla kolonou. Kvantitativní analytické metody nejsou zapotřebí, nezbytné je pouze stanovení retenčních časů.

8. Rozdělovací koeficient oktanol/voda zkoušené látky se dá vypočítat tak, že experimentálně stanovíme její kapacitní faktor *k* a ten pak dosadíme do následující rovnice:

$$\log P_{ow} = a + b \times \log k$$

kde

a, b = lineární regresní koeficienty.

Tato rovnice se získá lineární regresí logaritmu rozdělovacích koeficientů oktanol/voda referenčních látek proti logaritmu kapacitních faktorů referenčních látek.

9. Metoda HPLC na reverzní fázi umožňuje odhad rozdělovacích koeficientů v rozsahu log P_{ow} od 0 do 6, ale ve výjimečných případech lze rozsah rozšířit tak, že pokrývá i log P_{ow} od 6 do 10. To může vyžadovat modifikaci mobilní fáze (3). Metoda se nedá aplikovat na silné kyseliny a zásady, komplexní sloučeniny kovů, látky reagující s eluentem nebo povrchově aktivní činidla. Měření lze provádět na ionizovatelných látkách pouze v jejich neionizované formě (volné kyseliny nebo volné zásady) použitím vhodného pufru s pH nižším než pK_a volné kyseliny nebo vyšším než pK_a volné zásady. Popřípadě může být k dispozici metoda měření pH pro zkoušení ionizovatelných látek (6), kterou lze použít jako alternativní metodu (6). Jestliže je hodnota log P_{ow} stanovena pro použití ke klasifikaci nebezpečí pro životní prostředí nebo hodnocení environmentálních rizik, je třeba zkoušku provádět v rozsahu pH příslušném pro přírodní prostředí, tj. v rozsahu pH 5,0–9.

10. V některých případech mohou nečistoty znesnadnit interpretaci výsledků vzhledem k nejistému přiřazení píků. U směsí, výsledkem jejichž analýzy je nerozlišený pás, je třeba uvést horní a dolní mez log P_{ow}, a procentuální podíl ploch píků pro každý log P_{ow}. U směsí, které jsou skupinou homologů, je třeba rovněž uvést vážený průměr log P_{ow} (7) vypočítaný na základě jednotlivých hodnot P_{ow} a odpovídajících procentuálních podílů ploch (8). Ve výpočtu je třeba brát v úvahu všechny píky, které přispívají k celkové ploše píků 5 nebo více procenty (9):

▼**M6**

$$\textit{vážený průměr} \log P_{ow} = \frac{\sum_i (\log P_{owi})(\textit{plocha \%})}{\textit{celková plocha píku}} = \frac{\sum (\log P_{owi})(\textit{plocha \\%}_i)}{\sum_i \textit{plocha \%}}$$

Vážený průměr log P_{ow} je platný pouze pro látky nebo směsi (např. tálové oleje) skládající se z homologů (např. série alkanů). Při měření směsí lze užitečné výsledy získat za předpokladu, že použitý analytický detektor má stejnou citlivost vůči všem látkám ve směsi a lze je dostatečně rozlišit.

INFORMACE O ZKOUŠENÉ LÁTCE

11. Před použitím metody musí být známa disociační konstanta, strukturní vzorec a rozpustnost v mobilní fázi. Užitečné budou rovněž informace o hydrolýze.

KRITÉRIA KVALITY

12. Aby se zvýšila spolehlivost měření, musí být provedena opakovaná stanovení.

— Opakovatelnost: Hodnoty log P_{ow} získané z opakovaných měření za identických podmínek a za použití stejného souboru referenčních látek by měly spadat do rozmezí + 0,1 log.

— Reprodukovatelnost: Jsou-li měření opakována s odlišným souborem referenčních látek, výsledky se mohou lišit. Korelační koeficient R vztahu mezi log k a log P_{ow} pro soubor zkoušených látek je obvykle okolo 0,9, což odpovídá rozdělovacímu koeficientu oktanol/voda log P_{ow} + 0,5 log.

13. Zkouška mezilaboratorního srovnání ukázala, že pomocí metody HPLC lze hodnoty log P_{ow} získat s přesností + 0,5 jednotek pro rozdělovací koeficienty získané metodou třepací lahve (2). V literatuře lze nalézt další srovnání (4, 5, 10, 11, 12). Nejpřesnější výsledky poskytují korelační grafy založené na referenčních látkách, které mají podobnou strukturu (13).

REFERENČNÍ LÁTKY

14. Pro korelaci měřeného kapacitního faktoru k látky s jejím P_{ow} je třeba stanovit kalibrační graf s použitím alespoň 6 bodů (viz odstavec 24). Vhodné referenční látky zvolí uživatel. Referenční látky by v zásadě měly mít hodnoty log P_{ow} v rozsahu, který zahrnuje log P_{ow} zkoušené chemické látky, tzn. alespoň jedna referenční látka by měla mít P_{ow} nad hodnotou zkoušené látky a jiná P_{ow} pod touto hodnotou. Extrapolaci je možné použít pouze ve výjimečných případech. Je vhodnější, aby tyto referenční látky byly svou strukturou podobné zkoušené látce. Hodnoty log P_{ow} referenčních látek použitých pro kalibraci by měly vycházet ze spolehlivých experimentálních údajů. Avšak u látek s vysokým log P_{ow} (obvykle více než 4) je možné použít vypočítané hodnoty, pokud nejsou k dispozici spolehlivé experimentální údaje. Jestliže se použijí extrapolované hodnoty, je třeba uvést mezní hodnotu.

15. V literatuře jsou dostupné rozsáhlé seznamy hodnot P_{ow} pro mnoho skupin chemických látek (14, 15). Jestliže nejsou k dispozici data o rozdělovacích koeficientech látek s podobnou strukturou, je možné použít obecnější kalibraci stanovenou s jinými referenčními látkami. Tabulka 1 uvádí doporučené referenční látky a jejich hodnoty P_{ow}. V případě ionizovatelných látek platí uvedené hodnoty pro neionizovanou formu. Věrohodnost a kvalita hodnot byly prověřeny mezilaboratorní srovnávací zkouškou.

▼**M6**

Tabulka 1

Doporučené referenční látky

	Číslo CAS	Referenční látka	log P_{ow}	pK_a
1	78-93-3	2-butanon (methylethylketon)	0,3	
2	1122-54-9	4-acetylpyridin	0,5	
3	62-53-3	anilin	0,9	
4	103-84-4	acetanilid	1,0	
5	100-51-6	benzylalkohol	1,1	
6	150-76-5	4-methoxyfenol	1,3	pKa = 10,26
7	122-59-8	kyselina fenoxyoctová	1,4	pKa = 3,12
8	108-95-2	fenol	1,5	pKa = 9,92
9	51-28-5	2,4-dinitrofenol	1,5	pKa = 3,96
10	100-47-0	benzonitril	1,6	
11	140-29-4	fenylacetonitril	1,6	
12	589-18-4	4-methylbenzylalkohol	1,6	
13	98-86-2	acetofenon	1,7	
14	88-75-5	2-nitrofenol	1,8	pKa = 7,17
15	121-92-6	kyselina 3-nitrobenzoová	1,8	pKa = 3,47
16	106-47-8	4-chloranilin	1,8	pKa = 4,15
17	98-95-3	nitrobenzen	1,9	
18	104-54-1	skořicový alkohol	1,9	
19	65-85-0	kyselina benzoová	1,9	pKa = 4,19
20	106-44-5	p-kresol	1,9	pKa = 10,17
21	140-10-3 (trans)	kyselina skořicová	2,1	pKa = 3,89 (cis) *4*,44 (trans)
22	100-66-3	anisol	2,1	
23	93-58-3	methylbenzoát	2,1	
24	71-43-2	benzen	2,1	
25	99-04-7	kyselina 3-methylbenzoová	2,4	pKa = 4,27
26	106-48-9	4-chlorfenol	2,4	pKa = 9,1
27	79-01-6	trichlorethylen	2,4	
28	1912-24-9	atrazin	2,6	
29	93-89-0	ethylbenzoát	2,6	

▼**M6**

	Číslo CAS	Referenční látka	log P_{ow}	pK_a
30	1194-65-6	2,6-dichlorbenzonitril	2,6	
31	535-80-8	kyselina 3-chlorbenzoová	2,7	pKa = 3,82
32	108-88-3	toluen	2,7	
33	90-15-3	1-naftol	2,7	pKa = 9,34
34	608-27-5	2,3-dichloranilin	2,8	
35	108-90-7	chlorbenzen	2,8	
36	1746-13-0	allyl-fenyl-ether	2,9	
37	108-86-1	brombenzen	3,0	
38	100-41-4	ethylbenzen	3,2	
39	119-61-9	benzofenon	3,2	
40	92-69-3	4-fenylfenol	3,2	pKa = 9,54
41	89-83-8	thymol	3,3	
42	106-46-7	1,4-dichlorbenzen	3,4	
43	122-39-4	difenylamin	3,4	pKa = 0,79
44	91-20-3	naftalen	3,6	
45	93-99-2	fenylbenzoát	3,6	
46	98-82-8	izopropylbenzen	3,7	
47	88-06-2	2,4,6-trichlorfenol	3,7	pKa = 6
48	92-52-4	bifenyl	4,0	
49	120-51-4	benzylbenzoát	4,0	
50	88-85-7	2,4-dinitro-6-sek-butylfenol	4,1	
51	120-82-1	l,2,4-trichlorbenzen	4,2	
52	143-07-7	kyselina dodekanová	4,2	pKa = 5,3
53	101-84-8	difenylether	4,2	
54	85-01-8	fenantren	4,5	
55	104-51-8	n-butylbenzen	4,6	
56	103-29-7	dibenzyl	4,8	
57	3558-69-8	2,6-difenylpyridin	4,9	
58	206-44-0	fluoranten	5,1	
59	603-34-9	trifenylamin	5,7	
60	50-29-3	DDT	6,5	

▼M6

POPIS METODY

Předběžný odhad rozdělovacího koeficientu

16. V případě potřeby lze rozdělovací koeficient zkoušené látky nejlépe odhadnout na základě výpočtu (viz dodatek) nebo popřípadě z poměru rozpustností zkoušené látky v čistých rozpouštědlech.

Přístroje a pomůcky

17. Nezbytným vybavením je kapalinový chromatograf vybavený nízkopulzním čerpadlem a vhodným detekčním systémem. UV detektor pracující na vlnové délce 210 nm nebo RI detektor jsou použitelné pro širokou škálu chemických skupin. Přítomnost polárních skupin ve stacionární fázi může významně zhoršit účinnost kolony HPLC. Stacionární fáze by proto měly mít minimální podíl polárních skupin (16). Lze použít komerční mikročásticové náplně s reverzními fázemi nebo hotové kolony s náplní. Mezi nástřikem a analytickou kolonou může být umístěna ochranná předkolona.

Mobilní fáze

18. K přípravě elučního rozpouštědla, které je třeba před použitím odplynit, se užije metanol čistoty pro HPLC a destilovaná nebo deionizovaná voda. Měla by být provedena izokratická eluce. Doporučuje se použít směs metanol-voda s minimálním obsahem vody 25 %. Směs 3:1 (obj.) metanol-voda je obvykle vyhovující pro vymývání látek s log P = 6 během hodiny při průtokové rychlosti 1 ml/min. U látek s log P vyšším než 6 může být nezbytné zkrátit eluční dobu (rovněž u referenčních látek) snížením polarity mobilní fáze nebo délky kolony.

19. Zkoušené i referenční látky musí být rozpustné v mobilní fázi v dostatečné koncentraci, aby byla umožněna jejich detekce. Aditiva se mohou použít se směsí metanol-voda pouze ve výjimečných případech, neboť mění vlastnosti kolony. V těchto případech je třeba ověřit, zda retenční časy zkoušené a referenční látky nejsou ovlivněny. Jestliže směs metanol-voda není vhodná, je možné použít jiné směsi organických rozpouštědel a vody, např. etanol-voda, acetonitril-voda nebo izopropylalkohol (2-propanol)-voda.

20. Pro ionizovatelné látky je kritické pH eluentu. Mělo by se nacházet v pracovní oblasti pH kolony, obvykle mezi 2 and 8. Doporučuje se použitít pufračních roztoků. Je třeba dbát na to, aby se nedošlo ke srážení solí a narušení kolony, k čemuž dochází u některých směsí organické fáze s pufračním roztokem. Měření pomocí HPLC se stacionárními fázemi na bázi oxidu křemičitého se obvykle nedoporučuje při pH vyšším než 8, neboť použití alkalické mobilní fáze může způsobit rychlé narušení činnosti kolony.

Rozpouštěné látky

21. Zkoušené a referenční látky musí být dostatečně čisté, aby bylo možno přiřadit píky v chromatogramech příslušným látkám. Látky, které se mají používat ke zkoušení nebo kalibraci, se pokud možno rozpustí v mobilní fázi. Jestliže se k rozpuštění zkoušené a referenční látky použije jiné rozpouštědlo než mobilní fáze, je třeba použít mobilní fázi ke konečnému zředění před nástřikem.

Zkušební podmínky

22. Teplota by během měření neměla kolísat o více než ± 1 °C.

▼M6

Stanovení mrtvého času t_0

23. Mrtvý čas t_0 je možné měřit použitím nezadržovaných organických látek (např. thiomočovina nebo formamid). Přesnější mrtvý čas lze získat ze změřených retenčních časů nebo užitím souboru přibližně sedmi členů homologické řady (např. n-alkylmethylketonů) (17). Retenční časy t_R (n_C + 1) se vynesou jako funkce t_R (n_C), kde n_C je počet atomů uhlíku. Tak se získá přímka t_R (n_C + 1) = A t_R (n_C) + (1 – A)t_0, kde A = k(n_C + 1)/k(n_C) je konstantní. Mrtvý čas t_0 se získá z úseku (1 – A)t_0 a směrnice A.

Regresní rovnice

24. Dalším krokem je sestrojení korelační závislosti hodnot log k na log P pro vhodné referenční látky s hodnotami log P blízkými hodnotám očekávaným pro zkoušenou chemickou látku. V praxi se současně nastříkne 6 až 10 referenčních látek. Retenční časy se stanoví nejlépe pomocí zapisovacího integrátoru napojeného na detekční systém. Odpovídající logaritmy kapacitních faktorů log k se vynesou jako funkce log P. Regresní rovnice se stanoví v pravidelných intervalech, alespoň jednou denně, aby bylo možno zohlednit případné změny činnosti kolony.

STANOVENÍ P_{OW} ZKOUŠENÉ LÁTKY

25. Zkoušená chemická látka se nastříkne v nejmenších detekovatelných množstvích. Retenční čas se stanovuje zdvojeným měřením. Rozdělovací koeficient zkoušené látky se získá interpolací vypočítaného kapacitního faktoru na kalibračním grafu. U velmi nízkých a velmi vysokých rozdělovacích koeficientů je nutná extrapolace. Zejména v těchto případech je třeba věnovat pozornost intervalům spolehlivosti regresní přímky. Jestliže je retenční čas vzorku mimo rozsah retenčních časů stanovených pro standardy, je třeba uvést mezní hodnotu.

ÚDAJE A PŘEDKLÁDÁNÍ ZPRÁV

Závěrečná zpráva

26. V závěrečné zprávě musí být obsaženy následující údaje:

— předběžný odhad rozdělovacího koeficientu, odhadnuté hodnoty a použitá metoda, jsou-li stanoveny; byla-li použita výpočtová metoda, její úplný popis, včetně identifikace databáze a podrobné informace o výběru fragmentů,

— zkoušené a referenční látky: čistota, strukturní vzorec a číslo CAS,

— popis zařízení a pracovních podmínek: analytická kolona, ochranná předkolona,

— mobilní fáze, detekční systém, teplotní rozsah, pH,

— eluční profily (chromatogramy),

— mrtvý čas a metoda jeho měření,

— retenční data a hodnoty log P_{ow} z literatury pro referenční látky použité ke kalibraci,

— charakteristiky proložené regresní přímky (log k versus log P_{ow}) a korelační koeficient přímky, včetně intervalů spolehlivosti,

▼**M6**

— průměrné retenční údaje a interpolovaná hodnota log P_{ow} pro zkoušenou látku,

— v případě směsi: chromatogram elučního profilu s uvedenými hraničními hodnotami,

— poměr hodnot log P_{ow} k procentuálnímu podílu plochy píku log P_{ow},

— výpočet použitím regresní přímky,

— popřípadě vypočítané vážené průměrné hodnoty log P_{ow}.

LITERATURA

1) C.V. Eadsforth and P. Moser. (1983). Assessment of Reverse Phase Chromatographic Methods for Determining Partition Coefficients. Chemosphere. 12, 1459.

2) W. Klein, W. Kördel, M. Weiss and H.J. Poremski. (1988). Updating of the OECD Test Guideline 107 Partition Coefficient n-Octanol-Water, OECD Laboratory Intercomparison Test on the HPLC Method. Chemosphere. 17, 361.

3) C.V. Eadsforth. (1986). Application of Reverse H.P.L.C. for the Determination of Partition Coefficient. Pesticide Science. 17, 311.

4) H. Ellgehausen, C. D'Hondt and R. Fuerer (1981). Reversed-phase chromatography as a general method for determining octan-1-ol/water partition coefficients. Pesticide. Science. 12, 219.

5) B. McDuffie (1981). Estimation of Octanol Water Partition Coefficients for Organic Pollutants Using Reverse Phase High Pressure Liquid Chromatography. Chemosphere. 10, 73.

6) OECD (2000). Guideline for Testing of Chemicals – Partition Coefficient (n-octanol/water): pH-metric Method for Ionisable Substances. Draft Guideline, November 2000.

7) OSPAR (1995). „Harmonised Offshore Chemicals Notification Format (HOCFN) 1995“, Oslo and Paris Conventions for the Prevention of Marine Pollution Programmes and Measures Committee (PRAM), Annex 10, Oviedo, 20–24 February 1995.

8) M. Thatcher, M. Robinson, L. R. Henriquez and C. C. Karman. (1999). An User Guide for the Evaluation of Chemicals Used and Discharged Offshore, A CIN Revised CHARM III Report 1999. Version 1.0, 3. August.

9) E. A. Vik, S. Bakke and K. Bansal. (1998). Partitioning of Chemicals. Important Factors in Exposure Assessment of Offshore Discharges. Environmental Modelling & Software Vol. 13, pp. 529-537.

10) L.O. Renberg, S.G. Sundstroem and K. Sundh-Nygård. (1980). Partition coefficients of organic chemicals derived from reversed-phase thin-layer chromatography. Evaluation of methods and application on phosphate esters, polychlorinated paraffins and some PCB-substitutes. Chemosphere. 9, 683.

11) W.E. Hammers, G.J.Meurs and C.L. De-Ligny. (1982). Correlations between liquid chromatographic capacity ratio data on Lichrosorb RP-18 and partition coefficients in the octanol-water system. J. Chromatography 247, 1.

12) J.E. Haky and A.M. Young. (1984). Evaluation of a simple HPLC correlation method for the estimation of the octanol-water partition coefficients of organic compounds. J. Liq. Chromatography. 7, 675.

13) S. Fujisawa and E. Masuhara. (1981). Determination of Partition Coefficients of Acrylates Methacrylates and Vinyl Monomers Using High Performance Liquid Chromatography. Journal of Biomedical Materials Research. 15, 787.

▼**M6**

14) C. Hansch and A. J. Leo. (1979). Substituent Constants for Correlation Analysis in Chemistry and Biology. John Willey, New York.

15) C. Hansch, chairman; A.J. Leo, dir. (1982). Log P and Parameter Database: A tool for the quantitative prediction of bioactivity – Available from Pomona College Medical Chemistry Project, Pomona College, Claremont, California 91711.

16) R. F. Rekker, H. M. de Kort. (1979). The hydrophobic fragmental constant: An extension to a 1 000 data point set. Eur. J. Med. Chem. – Chim. Ther. 14, 479.

17) G.E. Berendsen, P.J. Schoenmakers, L. de Galan, G. Vigh, Z. Varga-Puchony, and J. Inczédy. (1980). On determination of hold-up time in reversed-phase liquid chromatography. J. Liq. Chromato. 3, 1669.

▼M6

Dodatek

Metody výpočtu P_{ow}

ÚVOD

1. Tento dodatek obsahuje krátký úvod k výpočtu P_{ow}. Další informace jsou uvedeny v učebnicích (1, 2).

2. Vypočítané hodnoty P_{ow} se použijí pro:

— rozhodnutí, která experimentální metoda se použije: metoda Shake Flask (třepací lahev) pro log P_{ow} mezi – 2 a 4; HPLC metoda pro log P_{ow} mezi 0 a 6;

— volbu podmínek použitých v HPLC (referenční látky, poměr metanol/voda);

— prověření věrohodnosti hodnot získaných experimentálními metodami;

— zjištění odhadu v případě, kdy experimentální metody nelze použít.

Podstata výpočtových metod

3. Výpočtové metody navržené zde jsou založeny na teoretické fragmentaci molekuly na vhodné podstruktury, pro které jsou známy spolehlivé hodnoty přírůstků log P_{ow}. Hodnota log P_{ow} se vypočte jako součet hodnot pro příslušné fragmenty a korekčních členů pro intramolekulární interakce. Seznamy fragmentových konstant a korekčních členů lze nalézt v literatuře (1, 2, 3, 4, 5, 6). Některé se pravidelně aktualizují (3).

Spolehlivost vypočítaných hodnot

4. Spolehlivost výpočtových metod obecně klesá s rostoucí složitostí studované chemické látky. V případě jednoduchých molekul s nízkou molekulovou hmotností a jednou nebo dvěma funkčními skupinami lze očekávat, že odchylky hodnot log P_{ow} získaných různými fragmentačními metodami od naměřených hodnot budou v rozmezí od 0,1 do 0,3. Rozpětí chyby bude záviset na spolehlivosti použitých fragmentových konstant, schopnosti zjistit intramolekulární interakce (např. vodíkové vazby) a správném použití korekčních členů. V případě ionizujících látek se musí brát v úvahu náboj a ionizační stupeň (10).

π-metoda Fujity-Hansche

5. Konstanta hydrofobnosti substituentu π původně zavedená Fujitou a kol. (7) je definována jako:

$$^{\pi}X = \log P_{ow}\ (PhX) - \log P_{ow}\ (PhH)$$

kde PhX je aromatický derivát a PhH výchozí látka.

$$\begin{aligned} \text{např.}\quad ^{\pi}Cl &= \log P_{ow}\ (C_6H_5Cl) - \log P_{ow}\ (C_6H_6) \\ &= 2{,}84 - 2{,}13 \\ &= 0{,}71 \end{aligned}$$

π-metoda je primárně důležitá u aromatických látek. π-hodnoty pro velký počet substituentů lze nalézt v literatuře (4, 5).

Rekkerova metoda

6. Při použití Rekkerovy metody (8) se hodnota log P_{ow} vypočítá podle vzorce:

$$Log\ P_{ow} = \sum_i a_i f_i + \sum_j (\text{interakční členy})$$

▼M6

kde a_i je číslo vyjadřující, kolikrát se daný fragment vyskytuje v molekule, a f_i je přírůstek log P_{ow} fragmentu. Interakční členy je možné vyjádřit jako souhrnný násobek jediné konstanty C_m (tzv. „magické konstanty“). Fragmentové konstanty f_i a C_m byly stanoveny ze seznamu 1 054 experimentálních hodnot P_{ow} pro 825 látek pomocí vícenásobné regresní analýzy (6, 8). Stanovení interakčních členů se provede podle stanovených pravidel (6, 8, 9).

Hansch-Leova metoda

7. Při použití Hansch-Leovy metody (4) se hodnota log P_{ow} vypočítá podle vzorce:

$$\text{Log } P_{ow} = \sum_i a_i f_i + \sum_j b_j F_j$$

kde f_i je fragmentová konstanta, F_j korekční člen (faktor), a_i a b_j odpovídající četnosti výskytu. Seznamy atomových a skupinových fragmentových hodnot a korekčních členů F_j byly získány metodou pokusu a omylu z experimentálních hodnot P_{ow}. Korekční členy byly rozděleny do několika různých tříd (1, 4). Byla vyvinuta sada programů, které berou v úvahu všechna pravidla a korekční členy (3).

KOMBINOVANÁ METODA

8. Výpočet log P_{ow} složitých molekul lze značně zdokonalit, jestliže se molekula rozdělí do větších podstruktur, pro něž existují spolehlivé hodnoty log P_{ow} pocházející buď z tabulek (3, 4), nebo z existujících měření. Tyto fragmenty (např. heterocykly, antrachinon, azobenzen) lze poté kombinovat s Hanschovými π-hodnotami nebo s Rekkerovými či Leovými fragmentovými konstantami.

Poznámky

i) Výpočetní metody lze použít pro částečně nebo úplně ionizované látky pouze tehdy, jsou-li zohledněny nezbytné korekční faktory.

ii) Jestliže je možné předpokládat existenci intramolekulárních vodíkových vazeb, musí být přičteny odpovídající korekční členy (přibližně + 0,6 až + 1,0 log P_{ow}) (1). Přítomnost takových vazeb mohou naznačit stereo modely nebo spektroskopické údaje.

iii) Může-li existovat několik tautomerních forem, měla by být jako základ pro výpočet použita nejpravděpodobnější forma.

iv) Pečlivě by měly být sledovány přepracované seznamy fragmentových konstant.

LITERATURA O VÝPOČTOVÝCH METODÁCH

1) W.J. Lyman, W.F. Reehl and D.H. Rosenblatt (ed.). Handbook of Chemical Property Estimation Methods, McGraw-Hill, New York (1982).

2) W.J. Dunn, J.H. Block and R.S. Pearlman (ed.). Partition Coefficient, Determination and Estimation, Pergamon Press, Elmsford (New York) and Oxford (1986).

3) Pomona College, Medicinal Chemistry Project, Claremont, California 91711, USA, Log P Database and Med. Chem. Software (Program CLOGP-3).

4) C. Hansch and A.J. Leo. Substituent Constants for Correlation Analysis in Chemistry and Biology, John Wiley, New York (1979).

▼**M6**

5) Leo, C. Hansch and D. Elkins. (1971) Partition coefficients and their uses. *Chemical. Reviews*. 71, 525.

6) R. F. Rekker, H. M. de Kort. (1979). The hydrophobic fragmental constant: An extension to a 1 000 data point set. *Eur. J. Med. Chem*. – *Chim. Ther.* 14, 479.

7) Toshio Fujita, Junkichi Iwasa & Corwin Hansch (1964). A New Substituent Constant, π, Derived from Partition Coefficients. *J. Amer. Chem. Soc*. 86, 5175.

8) R.F. Rekker. The Hydrophobic Fragmental Constant, Pharmacochemistry Library, Vol. 1, Elsevier, New York (1977).

9) C.V. Eadsforth and P. Moser. (1983). Assessment of Reverse Phase Chromatographic Methods for Determining Partition Coefficients. *Chemosphere.* 12, 1459.

10) R.A. Scherrer. ACS – Symposium Series 255, p. 225, American Chemical Society, Washington, D.C. (1984).

▼M7

A.25 DISOCIAČNÍ KONSTANTY VE VODĚ (TITRAČNÍ METODA – SPEKTROFOTOMETRICKÁ METODA – KONDUKTOMETRICKÁ METODA)

ÚVOD

Tato zkušební metoda je rovnocenná Pokynu OECD pro zkoušení (TG) č. 112 (1981).

Předpoklady

— Vhodná analytická metoda

— Rozpustnost ve vodě

Pomocné informace

— Strukturní vzorec

— Elektrická vodivost v případě konduktometrické metody

Použití metody

— Všechny zkušební metody lze provádět s čistými nebo běžně obchodovanými látkami. Měly by být zváženy možné účinky nečistot na výsledky.

— Titrační metoda není vhodná pro látky s nízkou rozpustností (viz zkušební roztoky níže).

— Spektrofotometrickou metodu lze použít pouze u látek, které mají v disociované a nedisociované formě zřetelně různá absorpční spektra UV/VIS. Tato metoda může být rovněž vhodná pro látky s nízkou rozpustností a pro nekyselé/bazické disociace, např. komplexotvorné.

— V případech, kdy platí Onsagerova rovnice, lze použít konduktometrickou metodu, a to i při dosti nízkých koncentracích, a dokonce i v případech nekyselé/bazické rovnováhy.

Podklady pro metodu

Tato zkušební metoda je založena na metodách uvedených v odkazech v oddíle „Literatura“ a na předběžném návrhu dokumentu Návod pro oznamování před výrobou, EPA, 18. srpna 1978.

METODA – ÚVOD, ÚČEL, ROZSAH, RELEVANTNOST, POUŽITÍ A OMEZENÍ ZKOUŠKY

Disociace látky ve vodě má význam pro posuzování jejího dopadu na životní prostředí. Závisí na ní forma látky, což určuje její chování a přepravu. Může ovlivňovat absorpci chemické látky do půdy a sedimentů a adsorpci do biologických buněk.

Definice a jednotky

Disociace je reverzibilní rozdělení molekuly na dvě nebo více chemických látek, které mohou mít charakter iontů. Tento proces obecně vyjadřuje rovnice

$$RX \rightleftharpoons R^{+} + X^{-}$$

a koncentrační rovnovážná konstanta určující reakci je

$$K = \frac{[R^{+}][X^{-}]}{[RX]}$$

Například v konkrétním případě, kde R je vodík (látkou je kyselina), je tato konstanta

▼M7

$$K_\alpha = [H^+] \cdot \frac{[X^-]}{[HX]}$$

nebo

$$pK_\alpha = pH - \log\frac{[X^-]}{[HX]}$$

Referenční látky

Následující referenční látky není nutné používat vždy při zkoušení nové chemické látky. Jsou uvedeny především proto, aby bylo možné čas od času provést kalibraci metody a aby bylo možné porovnat výsledky v případě, že se použije jiná metoda.

	pK_a ([1])	Teplota v°C
p-nitrofenol	7,15	25 ([1])
kyselina benzoová	4,12	20
p-chloranilin	3,93	20

([1]) Pro teplotu 20 °C není hodnota k dispozici, ale lze předpokládat, že variabilita výsledků měření je vyšší než závislost na teplotě, již lze očekávat.

Bylo by užitečné mít látku s několika hodnotami pK, jak je uvedeno níže v oddíle „Princip zkušební metody“. Takovou látkou by mohla být:

kyselina citronová	pK_a (8)	Teplota v °C
	1) 3,14	20
	2) 4,77	20
	3) 6,39	20

Princip zkušební metody

Popisovaný chemický proces je celkově jen mírně závislý na teplotě v teplotním rozpětí, které je běžné v životním prostředí. Ke stanovení disociační konstanty je nutné změřit koncentrace disociované a nedisociované formy chemické látky. Příslušnou konstantu lze stanovit na základě znalosti stechiometrie disociační reakce uvedené výše v oddíle „Definice a jednotky“. V konkrétním případě popsaném v této zkušební metodě se látka chová jako kyselina nebo jako zásada a stanovení se nejpohodlněji provede určením relativních koncentrací iontové a neiontové formy látky a pH roztoku. Vztah mezi těmito pojmy popisuje rovnice pro výpočet pK_a v oddíle „Definice a jednotky“ výše. Některé látky vykazují více než jednu disociační konstantu a lze odvodit obdobné rovnice. Některé z metod zde popsaných jsou vhodné také pro nekyselé/bazické disociace.

Kritéria kvality

Opakovatelnost

Stanovení disociační konstanty by se mělo provést opakovaně (minimálně tři stanovení) s tolerancí ± 0,1 log.

POPIS ZKUŠEBNÍCH POSTUPŮ

Existují dvě základní metody pro stanovení pK_a. Jedna zahrnuje titraci známého množství látky se standardní kyselinou nebo případně zásadou; druhá zahrnuje stanovení relativní koncentrace ionizované a neionizované formy a její závislosti na pH.

▼M7

Příprava

Metody založené na těchto zásadách lze rozdělit na titrační, spektrofotometrické a konduktometrické.

Zkušební roztoky

Při titrační metodě a konduktometrické metodě by chemická látka měla být rozpuštěna v destilované vodě. Při spektrofotometrické a jiných metodách se používají pufrované roztoky. Koncentrace zkoušené chemické látky by neměla přesahovat 0,01 M nebo polovinu saturační koncentrace, podle toho, která z hodnot je nižší, a pro přípravu roztoku by měla být použita nejčistší dostupná forma látky. Je-li látka jen mírně rozpustná, může být před přípravou výše uvedených koncentrací rozpuštěna v malém množství rozpouštědla mísitelného s vodou.

Roztoky by měly být za využití Tyndallova jevu zkontrolovány na přítomnost emulzí, zejména pokud byl použit kosolvent pro zvýšení rozpustnosti. Použijí-li se pufrované roztoky, neměla by koncentrace pufru přesáhnout 0,05 M.

Podmínky zkoušky

Teplota

Teplota by měla být regulována s přesností nejméně ± 1°C. Stanovení by se mělo provádět při 20 °C.

Existuje-li podezření na významnou závislost na teplotě, mělo by být stanovení prováděno alespoň při dvou jiných teplotách. Teplotní intervaly by v tomto případě měly být 10 °C a regulace teploty ± 0,1 °C.

Analýzy

Metoda bude určována povahou látky, která se testuje. Musí být dostatečně citlivá, aby umožňovala stanovení různých druhů chemických látek při každé koncentraci zkušebního roztoku.

Provedení zkoušky

Titrační metoda

Zkušební roztok se testuje titrací se standardním roztokem zásady nebo případně kyseliny, přičemž po každém přidání titračního roztoku se změří pH. Před dosažením bodu ekvivalence by měl být roztok přidán v rostoucích objemech alespoň desetkrát. Je-li rovnováhy dosaženo dostatečně rychle, může se použít záznamový potenciometr. Pro tuto metodu musí být přesně známo celkové množství látky a její koncentrace. Je nutné vyloučit oxid uhličitý. Podrobnosti postupu, preventivní opatření a výpočet jsou uvedeny ve standardních zkouškách, např. v položkách (1), (2), (3) a (4) seznamu literatury.

Spektrofotometrická metoda

Vlnová délka se zjistí, pokud ionizovaná a neionizovaná forma látky má znatelně rozdílné absorpční koeficienty. Absorpční spektrum UV/VIS se zjistí z roztoků o konstantní koncentraci za takové hodnoty pH, kde je látka v podstatě neionizovaná, kde je plně ionizovaná a při několika mezilehlých hodnotách pH. Toho lze dosáhnout buď přidáním podílů koncentrované kyseliny (zásady) do poměrně velkého objemu roztoku látky v mnohosložkovém pufru, nejprve při vysoké (nízké) hodnotě pH (viz položka 5 seznamu literatury), anebo přidáním stejných objemů zásobního roztoku látky např. ve vodě nebo v methanolu ke konstantním objemům různých pufrovaných roztoků, jež pokrývají žádoucí rozpětí hodnot pH. Z hodnot pH a hodnot absorbance při zvolené vlnové délce se vypočítá dostatečný počet hodnot pK_a za použití alespoň 5 hodnot pH, kdy je látka ionizována z nejméně 10 % a z méně než 90 %. Další podrobnosti o zkoušce a metoda výpočtu jsou uvedeny v odborné literatuře (1).

▼M7

Konduktometrická metoda

Pomocí elektrického článku o nízké, známé článkové konstantě se změří vodivost přibližně 0,1 M roztoku látky ve vodivostní vodě. Změří se rovněž vodivost několika přesně připravených zředění tohoto roztoku. Koncentrace se pokaždé sníží na polovinu a celá série by měla pokrývat koncentrace nejméně v rozsahu jednoho řádu. Mezní vodivost při nekonečném zředění se zjistí provedením obdobného pokusu se sodnou solí a extrapolací. Míru disociace pak lze vypočítat z vodivosti každého roztoku pomocí Onsagerovy rovnice, a disociační konstantu je tedy možné vypočítat pomocí Ostwaldova zřeďovacího zákona jako $K = \alpha^2C/(1 - \alpha)$, kde C je koncentrace v molech na litr a α je disociovaná frakce. Je nutné vyloučit CO_2. Další podrobnosti o zkoušce a metoda výpočtu jsou uvedeny v normách a odborné literatuře (1), (6) a (7).

ÚDAJE A PŘEDKLÁDÁNÍ ZPRÁV

Zpracování výsledků

Titrační metoda

Vypočítá se pK_a pro 10 měřených bodů na titrační křivce. Vypočítá se střední hodnota těchto hodnot pK_a a směrodatná odchylka. Měl by být přiložen graf závislosti hodnot pH na objemu standardní zásady nebo kyseliny spolu s vyjádřením v tabulce.

Spektrofotometrická metoda

Hodnoty absorbance a pH v každém spektru se uvedou v tabulce. Z mezilehlých údajů ve spektrech se vypočítá alespoň pět hodnot pK_a a vypočte se rovněž střední hodnota těchto výsledků a směrodatná odchylka.

Konduktometrická metoda

Vypočítá se ekvivalentní vodivost Λ pro každou koncentraci kyseliny a pro každou koncentraci směsi jednoho ekvivalentu kyseliny plus 0,98 ekvivalentu hydroxidu sodného bez uhličitanů. Přebytek kyseliny má zabránit přebytku OH^- v důsledku hydrolýzy. Hodnota $1/\Lambda$ se vynese do grafu v závislosti na $\sqrt{C}$ a hodnotu Λ_o soli lze stanovit extrapolací na nulovou koncentraci.

Hodnotu Λ_o kyseliny lze vypočítat pomocí hodnot H^+ a Na^+ uvedených v odborné literatuře. Hodnotu pK_a je možné vypočítat z $\alpha = \Lambda_i / \Lambda_o$ a $K_a = \alpha^2C/(1 - \alpha)$ pro každou koncentraci. Přesnější hodnoty Ka lze získat provedením úprav na mobilitu a aktivitu. Měla by se vypočítat střední hodnota a směrodatné odchylky z hodnot pK_a.

Závěrečná zpráva

Předložit by se měly všechny naměřené údaje a vypočítané hodnoty pK_a spolu s metodou výpočtu (nejlépe ve formě tabulky, jak se doporučuje v položce seznamu literatury (1)) a stejně tak i výše popsané statistické parametry. U titračních metod by měly být uvedeny podrobnosti o standardizaci titračních roztoků.

U spektrofotometrické metody by měla být předložena všechna spektra. U konduktometrické metody by měly být uvedeny podrobnosti týkající se stanovení článkové konstanty. Měly by se uvést informace o použitém postupu, analytických metodách a povaze všech použitých pufrů.

Měla by se uvést zkušební teplota (teploty).

LITERATURA

1) Albert, A. & Sergeant, E.P.: Ionization Constants of Acids and Bases, Wiley, Inc., New York, 1962.

▼**M7**

2) Nelson, N.H. & Faust, S.D.: Acidic dissociation constants of selected aquatic herbicides, Env. Sci. Tech. 3, II, s. 1186–1188 (1969).

3) ASTM D 1293 – Annual ASTM Standards, Philadelphia, 1974.

4) Standard Method 242. APHA/AWWA/WPCF, Standard Methods for the Examination of Water and Waste Water, 14th Edition, American Public Health Association, Washington, D.C., 1976.

5) Clark, J. & Cunliffe, A.E.: Rapid spectrophotometric measurement of ionisation constants in aqueous solution. Chem. Ind. (London) 281, (March 1973).

6) ASTM D 1125 – Annual ASTM Standards, Philadelphia, 1974.

7) Standard Method 205 – APHA/AWWA/NPCF (viz výše (4)).

8) Handbook of Chemistry and Physics, 60th ed. CRC-Press, Boca Raton, Florida, 33431 (1980).

▼B

ČÁST B: METODY STANOVENÍ TOXICITY A JINÝCH ÚČINKŮ NA ZDRAVÍ

OBSAH

OBECNÝ ÚVOD

B.1.a AKUTNÍ ORÁLNÍ TOXICITA – METODA FIXNÍ DÁVKY

B.1.b AKUTNÍ ORÁLNÍ TOXICITA – METODA STANOVENÍ TŘÍDY AKUTNÍ TOXICITY

B.2 AKUTNÍ INHALAČNÍ TOXICITA

B.3 AKUTNÍ TOXICITA (DERMÁLNÍ)

B.4 AKUTNÍ DRÁŽDIVÉ A LEPTAVÉ ÚČINKY NA KŮŽI

B.5 AKUTNÍ DRÁŽDIVÉ/LEPTAVÉ ÚČINKY NA OČI

B.6 SENZIBILIZACE KŮŽE

B.7 STUDIE ORÁLNÍ TOXICITY U HLODAVCŮ – 28DENNÍ OPAKOVANÁ APLIKACE

B.8 SUBAKUTNÍ INHALAČNÍ TOXICITA: 28DENNÍ STUDIE

B.9 DERMÁLNÍ TOXICITA (28DENNÍ OPAKOVANÁ APLIKACE)

B.10 ZKOUŠKA NA CHROMOZÓMOVÉ ABERACE U SAVCŮ *IN VITRO*

B.11 ZKOUŠKA NA CHROMOZÓMOVÉ ABERACE V BUŇKÁCH KOSTNÍ DŘENĚ SAVCŮ

B.12 MIKRONUKLEUS TEST V SAVČÍCH ERYTROCYTECH

B.13/14 MUTAGENITA – ZKOUŠKA NA REVERZNÍ MUTACE S BAKTERIEMI

B.17 ZKOUŠKA NA GENOVÉ MUTACE V BUŇKÁCH SAVCŮ *IN VITRO* S POUŽITÍM GENŮ HPRT A XPRT

B.21 ZKOUŠKY NA TRANSFORMACE SAVČÍCH BUNĚK *IN VITRO*

B.22 DOMINANTNÍ LETÁLNÍ ZKOUŠKA NA HLODAVCÍCH

▼B

B.23	ZKOUŠKA NA CHROMOZOMOVÉ ABERACE VE SPERMATOGONIÍCH SAVCŮ
B.25	ZKOUŠKA NA DĚDIČNOU TRANSLOKACI U MYŠÍ
B.26	ZKOUŠKA SUBCHRONICKÉ ORÁLNÍ STUDIE ORÁLNÍ TOXICITY NA HLODAVCÍCH (90DENNÍ OPAKOVANÁ INHALAČNÍ EXPOZICE NA HLODAVCÍCH)
B.27	ZKOUŠKA SUBCHRONICKÉ ORÁLNÍ TOXICITY STUDIE ORÁLNÍ TOXICITY NA NEHLODAVCÍCH (90DENNÍ OPAKOVANÁ APLIKACE)
B.28	STUDIE SUBCHRONICKÉ DERMÁLNÍ TOXICITY (90DENNÍ OPAKOVANÁ KOŽNÍ APLIKACE NA HLODAVCÍCH)
B.29	SUBCHRONICKÁ INHALAČNÍ TOXICITA: 90DENNÍ STUDIE
B.30	STUDIE CHRONICKÉ TOXICITY
B.31	STUDIE PRENATÁLNÍ VÝVOJOVÉ TOXICITY
B.32	STUDIE KARCINOGENITY
B.33	KOMBINOVANÉ STUDIE CHRONICKÉ TOXICITY A KARCINOGENITY
B.34	JEDNOGENERAČNÍ ZKOUŠKA TOXICITY PRO REPRODUKCI
B.35	DVOUGENERAČNÍ STUDIE REPRODUKČNÍ TOXICITY
B.36	TOXIKOKINETIKA
B.37	POZDNÍ NEUROTOXICITA ORGANICKÝCH SLOUČENIN FOSFORU PO AKUTNÍ EXPOZICI
B.38	POZDNÍ NEUROTOXICITA ORGANICKÝCH SLOUČENIN FOSFORU – 28DENNÍ OPAKOVANÁ EXPOZICE
B.39	ZKOUŠKA NA NEPLÁNOVANOU SYNTÉZU DNA (UDS) V JATERNÍCH BUŇKÁCH SAVCŮ *IN VIVO*
B.40	LEPTAVÉ ÚČINKY NA KŮŽI *IN VITRO*: ZKUŠEBNÍ METODA TRANSKUTÁNNÍHO ELEKTRICKÉHO ODPORU (TER)
B.40.a	LEPTAVÉ ÚČINKY NA KŮŽI *IN VITRO*: ZKUŠEBNÍ METODA ZA POUŽITÍ REKONSTRUOVANÉ LIDSKÉ EPIDERMIS (RhE)
B.41	ZKOUŠKA FOTOTOXICITY 3T3 NRU *IN VITRO*
B.42	SENZIBILIZACE KŮŽE: ZKOUŠKA S VYŠETŘENÍM LOKÁLNÍCH LYMFATICKÝCH UZLIN

▼B

B.43 ZKOUŠKA NEUROTOXICITY NA HLODAVCÍCH

B.44 ABSORPCE KŮŽÍ: METODA *IN VIVO*

B.45 ABSORPCE KŮŽÍ: METODA *IN VITRO*

B.46 DRÁŽDĚNÍ KŮŽE *IN VITRO*: ZKUŠEBNÍ METODA ZA POUŽITÍ REKONSTRUOVANÉ LIDSKÉ *EPIDERMIS*

B.47 ZKUŠEBNÍ METODA VYUŽÍVAJÍCÍ ZÁKAL A PROPUSTNOST ROHOVKY SKOTU PRO IDENTIFIKACI I) CHEMICKÝCH LÁTEK VYVOLÁVAJÍCÍCH VÁŽNÉ POŠKOZENÍ OČÍ A II) CHEMICKÝCH LÁTEK, KTERÉ NENÍ NUTNÉ KLASIFIKOVAT JAKO LÁTKY MAJÍCÍ DRÁŽDIVÉ ÚČINKY NA OČI NEBO VYVOLÁVAJÍCÍ VÁŽNÉ POŠKOZENÍ OČÍ

B.48 ZKUŠEBNÍ METODA ODDĚLENÉHO KUŘECÍHO OKA PRO ZJIŠŤOVÁNÍ I) CHEMICKÝCH LÁTEK VYVOLÁVAJÍCÍCH VÁŽNÉ POŠKOZENÍ OČÍ A II) CHEMICKÝCH LÁTEK, KTERÉ NENÍ NUTNÉ KLASIFIKOVAT JAKO LÁTKY MAJÍCÍ DRÁŽDIVÉ ÚČINKY NA OČI NEBO VYVOLÁVAJÍCÍ VÁŽNÉ POŠKOZENÍ OČÍ

B.49 MIKRONUKLEUS TEST V SAVČÍCH BUŇKÁCH IN VITRO

B.50 SENZIBILIZACE KŮŽE: ZKOUŠKA S VYŠETŘENÍM LOKÁLNÍCH LYMFATICKÝCH UZLIN: DA

B.51 SENZIBILIZACE KŮŽE: ZKOUŠKA S VYŠETŘENÍM LOKÁLNÍCH LYMFATICKÝCH UZLIN: BRDU-ELISA

B.52 AKUTNÍ INHALAČNÍ TOXICITA – METODA STANOVENÍ TŘÍDY AKUTNÍ TOXICITY

B.53 STUDIE VÝVOJOVÉ NEUROTOXICITY

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

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

B.56 ROZŠÍŘENÁ JEDNOGENERAČNÍ STUDIE TOXICITY PRO REPRODUKCI

B.57 ZKOUŠKA STEROIDOGENEZE H295R

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

B.59 SENZIBILIZACE KŮŽE *IN CHEMICO*: ZKOUŠKA PŘÍMÉ REAKTIVITY PEPTIDŮ (DPRA)

B.60 SENZIBILIZACE KŮŽE *IN VITRO*: ZKUŠEBNÍ METODA S VYŠETŘENÍM LUCIFERÁZY ARE-NRF2

B.61 ZKUŠEBNÍ METODA PRŮNIKU FLUORESCEINU KE ZJIŠŤOVÁNÍ LÁTEK S LEPTAVÝMI A SILNĚ DRÁŽDIVÝMI ÚČINKY NA OČI

B.62 ALKALICKÝ KOMETOVÝ TEST *IN VIVO* NA SAVCÍCH

▼B

B.63 SCREENINGOVÁ ZKOUŠKA NA REPRODUKČNÍ/VÝVOJOVOU TOXICITU

B.64 KOMBINOVANÁ STUDIE TOXICITY PO OPAKOVANÝCH DÁVKÁCH SE SCREENINGOVOU ZKOUŠKOU NA REPRODUKČNÍ/VÝVOJOVOU TOXICITU

B.65 ZKUŠEBNÍ METODA S VYUŽITÍM MEMBRÁNOVÉ BARIÉRY *IN VITRO* PRO LEPTAVÉ ÚČINKY NA KŮŽI

B.66 ZKOUŠKY *IN VITRO* FORMOU STABILNĚ TRANSFEKOVANÉ TRANSAKTIVACE SLOUŽÍCÍ K DETEKCI AGONISTŮ A ANTAGONISTŮ ESTROGENOVÝCH RECEPTORŮ

B.67 ZKOUŠKA NA GENOVÉ MUTACE V BUŇKÁCH SAVCŮ *IN VITRO* S POUŽITÍM GENU THYMIDINKINÁZY

B.68 ZKUŠEBNÍ METODA VYUŽÍVAJÍCÍ KRÁTKODOBOU EXPOZICI IN VITRO PRO IDENTIFIKACI i) CHEMICKÝCH LÁTEK VYVOLÁVAJÍCÍCH VÁŽNÉ POŠKOZENÍ OČÍ A ii) CHEMICKÝCH LÁTEK, KTERÉ NENÍ NUTNÉ KLASIFIKOVAT JAKO LÁTKY MAJÍCÍ DRÁŽDIVÉ ÚČINKY NA OČI NEBO VYVOLÁVAJÍCÍ VÁŽNÉ POŠKOZENÍ OČÍ

B.69 ZKUŠEBNÍ METODA S POUŽITÍM REKONSTRUOVANÉHO EPITELU PODOBNÉHO LIDSKÉ ROHOVCE (RhCE) PRO STANOVENÍ CHEMICKÝCH LÁTEK, KTERÉ NEVYŽADUJÍ KLASIFIKACI A OZNAČENÍ JAKO LÁTKY MAJÍCÍ DRÁŽDIVÉ ÚČINKY NA OČI NEBO VYVOLÁVAJÍCÍ VÁŽNÉ POŠKOZENÍ OČÍ

B.70 ZKOUŠKA *IN VITRO* S VYUŽITÍM REKOMBINANTNÍCH ESTROGENOVÝCH RECEPTORŮ NA DETEKCI CHEMICKÝCH LÁTEK S VAZEBNOU AFINITOU NA ER

B.71 ANALÝZY SENZIBILIZACE KŮŽE *IN VITRO* ZAMĚŘENÉ NA KLÍČOVOU UDÁLOST AKTIVACE DENDRITICKÝCH BUNĚK V DRÁZE NEŽÁDOUCÍCH ÚČINKŮ (AOP) VEDOUCÍCH K SENZIBILIZACI KŮŽE

▼B

OBECNÝ ÚVOD

A. **CHARAKTERIZACE ZKOUŠENÉ LÁTKY**

Složení zkoušené látky, včetně hlavních nečistot, a její relevantní fyzikálně-chemické vlastnosti, včetně stálosti, by měly být známy před zahájením jakékoli studie toxicity.

Fyzikálně-chemické vlastnosti zkoušené látky poskytují důležité informace pro výběr způsobu podávání, pro návrh každé jednotlivé studie a pro manipulaci se zkoušenou látkou a její uchovávání.

Zahájení studie by měl předcházet vývoj analytické metody pro kvalitativní a kvantitativní stanovení zkoušené látky (pokud možno včetně hlavních nečistot) v dávkovacím médiu a v biologickém materiálu.

Veškeré informace týkající se identifikace, fyzikálně-chemických vlastností, čistoty a chování zkoušené látky by měly být obsaženy v protokolu o zkoušce.

B. **PÉČE O ZVÍŘATA**

Při zkoušení toxicity jsou důležité přísná kontrola podmínek prostředí a správná péče o zvířata.

i) *Podmínky chovu*

Podmínky chovu v prostorech nebo klecích pro pokusná zvířata by měly vyhovovat testovacím druhům. Pro potkany, myši a morčata jsou vhodnými podmínkami teplota místnosti 22 ± 3 °C a relativní vlhkost 30 až 70 %; pro králíky se doporučuje teplota 20 ± 3 °C a relativní vlhkost 30 až 70 %.

Některé experimentální techniky jsou zvláště citlivé na vliv teploty a v takových případech jsou v popisu zkušební metody uvedeny podrobnosti o vhodných podmínkách. Při všech sledováních toxických účinků by měly být zaznamenávány údaje o teplotě a vlhkosti a měly by být zahrnuty do závěrečné zprávy o studii.

Osvětlení by mělo být umělé a mělo by se střídat 12 hodin světla a 12 hodin tmy. Podrobnosti o světelném režimu by měly zaznamenány a uvedeny v konečné zprávě studie.

Není-li v metodě uvedeno jinak, měla by být zvířata chována jednotlivě nebo umístěna v klecích po malých skupinách stejného pohlaví; jsou-li zvířata v klecích po skupinách, nemělo by být chováno v jedné kleci více než pět zvířat.

Ve zprávách o experimentech na zvířatech je důležité uvést typ použité klece a počet zvířat chovaných v každé kleci jak během expozice chemické látce, tak během kterékoli další doby pozorování.

▼B

ii) *Podmínky krmení*

Strava by měla splňovat veškeré požadavky výživy pro příslušný testovací druh. Pokud jsou zkoušené látky podávány v potravě, může být nutriční hodnota snížena interakcí látky s některou složkou potravy. Možnost takové reakce by měla být zohledněna při interpretaci výsledků zkoušky. Může být použita konvenční laboratorní strava s neomezeným přístupem k pitné vodě. Výběr potravy se může řídit potřebou zajistit vhodné přimíchání zkoušené látky, pokud je podávána touto metodou.

Příměsi v potravě, jejichž vliv na toxicitu je znám, nesmí být přítomny v koncentracích, ve kterých by se vliv projevil.

C. **ALTERNATIVNÍ ZKOUŠKY**

Vědeckým cílem Evropské unie je vývoj a validace alternativních metod, které mohou poskytnout stejnou úroveň informací jako současné zkoušky na zvířatech, při nichž se však použije méně zvířat, způsobí méně utrpení nebo se v nich použití zvířat zcela vypouští.

Hned po svém uvedení do praxe musí být tyto metody použity, kdykoli je to možné, pro charakterizaci nebezpečnosti a následnou klasifikaci a označování látek z hlediska jejich nebezpečnosti.

D. **HODNOCENÍ A INTERPRETACE**

Při hodnocení a interpretaci zkoušek musí být vzaty v úvahu určité meze, nakolik lze výsledky studií na zvířatech a *in vitro* extrapolovat na člověka, a proto lze pro potvrzení výsledků zkoušení použít poznatky o nepříznivých účincích na člověka, pokud jsou k dispozici.

E. **LITERATURA**

Tyto metody jsou většinou vyvinuty v rámci programu OECD pro zkušební pokyny a měly by být prováděny v souladu s principy správné laboratorní praxe, aby bylo zajištěno co nejširší „vzájemné uznávání údajů“.

Další podobnější informace lze získat v pokynech OECD a v příslušné literatuře publikované jinde.

▼B

B.1.a AKUTNÍ ORÁLNÍ TOXICITA – METODA FIXNÍ DÁVKY

1. METODA

Tato zkušební metoda je rovnocenná metodě OECD TG 420 (2001).

1.1 ÚVOD

Tradiční metody hodnocení akutní toxicity používají jako koncový bod uhynutí zvířat. V roce 1984 navrhla Britská toxikologická společnost nový přístup k testování akutní toxicity založený na podávání řady fixních dávek (1). Tento přístup jako koncový bod nepoužíval uhynutí zvířat, nýbrž se opíral o pozorování jasných příznaků toxicity u jedné z řady fixních dávek. Po provedení britských (2) a mezinárodních (3) validačních studií *in vivo* byl tento postup v roce 1992 přijat jako zkušební metoda. Následně byly pomocí matematických modelů v řadě studií (4, 5, 6) vyhodnoceny statistické vlastnosti metody fixní dávky. Studie *in vivo* a modelové studie společně prokázaly, že metoda je reprodukovatelná, vyžaduje méně zvířat, působí menší utrpení než tradiční metody a dokáže látky zařadit podobně jako jiné zkušební metody akutní toxicity.

Poučení týkající se výběru nejvhodnější zkušební metody k danému účelu obsahuje text Guidance Document on Acute Oral Toxicity Testing (7). V tomto dokumentu jsou také uvedeny doplňující informace o provádění a analýze zkušební metody B.1.a.

Podstatou metody je použití pouze středně toxických dávek v hlavní studii, dávky, u nichž se očekává, že budou letální, by neměly být podávány. Také není nutné podávat dávky, o nichž je známo, že v důsledku leptavých nebo výrazně dráždivých účinků vyvolávají značnou bolest a utrpení. Umírající zvířata nebo zvířata, která zjevně projevují příznaky bolesti nebo značného a přetrvávajícího utrpení, se humánně utratí a při analýze výsledků se hodnotí jako zvířata uhynulá při zkoušce. Kritéria rozhodování o utracení umírajících nebo značně trpících zvířat a poučení týkající se rozpoznání předvídatelného nebo blížícího se uhynutí jsou předmětem samostatného dokumentu (8).

Metoda poskytuje informace o nebezpečných vlastnostech a umožňuje zařazení a klasifikaci látky podle globálně harmonizovaného systému (GHS) klasifikace chemických látek, které způsobují akutní toxicitu (9).

Zkušební laboratoř by před provedením studie měla vzít v úvahu veškeré dostupné informace o zkoušené látce. Součástí těchto informací je totožnost a chemická struktura látky, výsledky jiných zkoušek toxicity dané látky, *in vitro* nebo *in vivo*, toxikologické údaje o strukturně příbuzných látkách a očekávané použití látky. Tyto informace jsou nezbytné k tomu, aby byli všichni zainteresovaní přesvědčeni, že zkouška má význam pro ochranu lidského zdraví a pomůže při výběru vhodné výchozí dávky.

▼B

1.2 DEFINICE

Akutní orální toxicita: nepříznivé účinky, které se projeví po orálním podání jedné dávky nebo více dávek látky během 24 hodin.

Opožděný úhyn: znamená, že zvíře během 48 hodin neuhyne ani nejeví známky umírání, ale uhyne později během čtrnáctidenní doby pozorování.

Dávka: množství podané zkoušené látky. Dávka se vyjadřuje jako hmotnost zkoušené látky na jednotku hmotnosti pokusného zvířete (např. mg/kg).

Zjevná toxicita: obecný pojem popisující zřetelné příznaky toxicity, které se projeví po podání zkoušené látky (příklady viz (3)), kdy při podání další vyšší fixní dávky lze u většiny pokusných zvířat očekávat značné bolesti a přetrvávající známky značného utrpení, stavu agónie (kritéria uvádí dokument Humane Endpoints Guidance (8)) nebo pravděpodobné uhynutí.

GHS: Globálně harmonizovaný systém klasifikace chemických látek a směsí. Společný projekt Organizace pro hospodářskou spolupráci a rozvoj (lidské zdraví a životní prostředí), Odborného výboru OSN pro přepravu nebezpečného zboží (fyzikálně-chemické vlastnosti) a Mezinárodní organizace práce (informace o nebezpečnosti) koordinovaný Meziorganizačním programem pro řádné nakládání s chemikáliemi (IOMC).

Blížící se uhynutí: stav agónie nebo uhynutí je očekáván před další plánovanou dobou pozorování. Příznaky svědčící o tomto stavu u hlodavců mohou zahrnovat křeče, polohu na boku, polohu vleže a třes (více podrobností viz text Humane Endpoint Guidance Document (8)).

LD_{50} (střední letální dávka): statisticky vypočtená jednotlivá dávka látky, u níž lze očekávat, že způsobí uhynutí 50 % zvířat, jimž byla podána orální cestou. Hodnota LD_{50} se vyjadřuje v hmotnosti zkoušené látky na jednotku hmotnosti pokusného zvířete (mg/kg).

Limitní dávka: označuje nejvyšší přípustnou dávku (2 000 nebo 5 000 mg/kg).

Stav agónie: označuje stav úhynu nebo neschopnost přežít, ani když je zvíře léčeno (více podrobností viz text Humane Endpoint Guidance Document (8)).

Předvídatelný úhyn: přítomnost klinických příznaků svědčících o smrti, přičemž doba úhynu je známá a předchází plánovanému ukončení zkoušky v budoucnosti, např. neschopnost dojít k vodě nebo potravě (více podrobností viz text Humane Endpoint Guidance Document (8)).

▼B

1.3 PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

Skupinám zvířat stejného pohlaví se postupně podá fixní dávka 5, 50, 300 a 2 000 mg/kg (výjimečně lze uvažovat o další fixní dávce 5 000 mg/kg, viz část 1.6.2). Výchozí úroveň dávky se zvolí na základě orientační studie jako dávka, u níž se očekává, že vyvolá některé příznaky toxicity, aniž způsobí závažné toxické účinky nebo úhyn. Klinické příznaky a stavy spojené s bolestí, utrpením a blížícím se úhynem jsou podrobně popsány v samostatném dokumentu OECD (8). Dalším skupinám zvířat mohou být podány vyšší nebo nižší fixní dávky podle přítomnosti nebo nepřítomnosti příznaků toxicity nebo uhynutí. Podle tohoto postupu se pokračuje, dokud nebude zjištěna dávka vyvolávající zřejmou toxicitu nebo není pozorováno více než jedno uhynutí, anebo pokud nejsou ani při nejvyšší dávce zjištěny žádné účinky nebo pokud dochází k úhynům při nejnižší dávce.

1.4 POPIS ZKUŠEBNÍ METODY

1.4.1 **Výběr druhu zvířat**

Upřednostňovaným druhem hlodavce je potkan, avšak lze použít i jiné druhy hlodavců. Obvykle se používají samice (7). Je to proto, že přehled literatury o konvenčních zkouškách LD_{50} ukazuje, že mezi pohlavími je obvykle malý rozdíl, pokud jde o citlivost, ale v případech, v nichž jsou rozdíly pozorovány, jsou samice obecně nepatrně citlivější (10). Pokud však poznatky o toxikologických nebo toxikokinetických vlastnostech strukturně příbuzných chemických látek naznačují, že citlivější jsou pravděpodobně samci, použije se toto pohlaví. Jestliže se zkouška provádí na samcích, je nutné podat náležité odůvodnění.

Použijí se mladá zdravá dospělá zvířata běžně užívaných laboratorních kmenů. Samice musí být nullipary a nesmí být březí. Každé zvíře musí být na začátku podávání látky 8 až 12 měsíců staré a jeho hmotnost by se měla pohybovat v intervalu ± 20 % střední hmotnosti zvířat, kterým byla podána předchozí dávka.

1.4.2 **Podmínky chovu a krmení**

Teplota v místnosti pro pokusná zvířata by měla být 22 °C (± 3 °C). Relativní vlhkost vzduchu by měla být minimálně 30 % a pokud možno nepřesáhnout 70 %, kromě doby úklidu místnosti, cílem by měla být hodnota 50–60 %. Osvětlení by mělo být umělé a mělo by se střídat 12 hodin světla a 12 hodin tmy. Ke krmení lze použít konvenční laboratorní stravu s neomezenou dodávkou pitné vody. Zvířata mohou být chována v klecích ve skupinách podle dávky, ale počet zvířat v kleci nesmí bránit nerušenému pozorování každého zvířete.

1.4.3 **Příprava zvířat**

Zvířata se náhodně vyberou, pro usnadnění individuální identifikace se označí, a chovají se v klecích minimálně pět dnů před začátkem podávání látky, aby se mohla přizpůsobit laboratorním podmínkám.

▼B

1.4.4 **Příprava dávek**

Zkoušená látka by obecně měla být při všech úrovních zkoušených dávek podávána v konstantním objemu pomocí úpravy koncentrace dávkovaného přípravku. V případech, kdy má být zkoušen kapalný koncový produkt nebo směs, může však být použití nezředěné zkoušené látky, tj. s konstantní koncentrací, pro hodnocení následného rizika této látky užitečnější a je vyžadováno některými kontrolními orgány. Ani v jednom případě nesmí být překročen maximální objem dávky. Maximální objem kapaliny, kterou lze jednorázově podat, závisí na velikosti pokusného zvířete. U hlodavců by objem obvykle neměl přesáhnout 1 ml na 100 g tělesné hmotnosti, avšak u vodních roztoků připadá v úvahu i dávka 2 ml na 100 g tělesné hmotnosti. S ohledem na složení dávkovaného přípravku se ve všech případech, kde je to možné, doporučuje použití vodného roztoku/suspenze/emulze, potom v pořadí podle preference použití roztoku/suspenze/emulze v oleji (např. v kukuřičném oleji) a nakonec případně roztoku v jiných vehikulech. U vehikul jiných než voda musí být známy toxikologické charakteristiky. Dávky musí být připraveny krátce před podáním, pokud není stálost přípravku během doby, kdy bude používán, známa a neukáže se jako přijatelná.

1.5 POSTUP

1.5.1 **Podávání dávek**

Zkoušená látka se podává sondou v jedné dávce pomocí žaludeční sondy nebo vhodné intubační kanyly. Pokud výjimečně není možné podat dávku najednou, lze ji podat po menších množstvích během nejvýše 24 hodin.

Před podáním zkoušené látky nemají zvířata dostávat potravu (např. potkanům by se neměla podávat přes noc, myším 3–4 hodiny), voda se však ponechává. Po uplynutí doby hladovění se zvířata zváží a podá se jim zkoušená látka. Po podání látky se zamezí přístupu k potravě na dalších 3–4 hodin u potkanů nebo 1–2 hodiny u myší. Podává-li se látka po částech v průběhu určité doby, může být podle délky období nezbytné poskytnout zvířatům potravu a vodu.

1.5.2 **Orientační studie**

Cílem orientační studie je umožnit výběr vhodné výchozí dávky pro hlavní studii. Zkoušená látka se podává jednotlivým zvířatům postupně podle vývojového diagramu v příloze 1. Orientační studie je ukončena, jakmile lze stanovit výchozí dávku pro hlavní studii (nebo pokud je při nejnižší fixní dávce pozorován úhyn).

Výchozí dávka orientační studie se zvolí z fixních dávek ve výši 5, 50, 300 a 2 000 mg/kg jako dávka, u níž se očekává, že vyvolá zřejmou toxicitu, přičemž toto očekávání je pokud možno založeno na důkazech z údajů získaných *in vivo* a *in vitro* ze stejné chemické látky a strukturně příbuzných látek. Pokud takové informace neexistují, výchozí dávka činí 300 mg/kg.

Mezi podáním dávky každému zvířeti se ponechá doba minimálně 24 hodin. Všechna zvířata se pozorují minimálně 14 dnů.

▼B

Ve výjimečných případech a pouze je-li to odůvodněno specifickými konkrétními předpisy, lze zvážit použití další nejvyšší úrovně dávky 5 000 mg/kg (viz dodatek 3). S ohledem na dobré zacházení se zvířaty se pokusy na zvířatech v rámci kategorie 5 GHS (2 000–5 000 mg/kg) nedoporučují a měly by se zvažovat pouze tehdy, pokud existuje velká pravděpodobnost, že výsledky takového pokusu mají přímý význam pro ochranu lidského zdraví, zdraví zvířat nebo životního prostředí.

V případech, kdy zvíře, u něhož je látka zkoušena v nejnižší fixní úrovni dávky (5 mg/kg), v orientační studii uhyne, obvykle se studie ukončí a látka přiřadí do kategorie 1 GHS (jak je uvedeno v příloze 1). Pokud je však vyžadováno další potvrzení klasifikace, může být proveden tento volitelný doplňkový postup: druhému zvířeti se podá dávka 5 mg/kg. Pokud toto druhé zvíře uhyne, bude kategorie 1 GHS potvrzena a studie okamžitě ukončena. Pokud druhé zvíře přežije, dávka 5 mg/kg se podá maximálně třem dalším zvířatům. Jelikož riziko úhynu bude vysoké, měla by být látka zvířatům podávána postupně, aby bylo zajištěno dobré zacházení se zvířaty. Časový interval mezi dávkami podanými jednotlivým zvířatům by měl být dostatečný na to, aby bylo možné stanovit, zda zvíře, jemuž byla látka podána dříve, pravděpodobně přežije. Pokud dojde k úhynu druhého zvířete, posloupnost podávání se okamžitě ukončí a látka nebude podána žádnému dalšímu zvířeti. Vzhledem k tomu, že výskyt druhého úhynu (bez ohledu na počet zvířat, na nichž byla látka v době ukončení zkoušena) spadá do výsledku A (2 anebo více úhynů), postupuje se podle pravidla klasifikace v příloze 2 s fixní dávkou 5 mg/kg (kategorie 1, pokud se vyskytnou dva a více úhynů nebo kategorie 2, pokud se nevyskytne více než 1 úhyn). Navíc je v příloze 4 uvedeno poučení týkající se klasifikace v rámci systému EU, dokud nebude zaveden nový globálně harmonizovaný systém (GHS).

1.5.3 **Hlavní studie**

1.5.3.1 *Počet zvířat a úrovně dávek*

Kroky, podle kterých se má postupovat po provedení zkoušek s výchozí úrovní dávky, jsou uvedeny ve vývojovém diagramu v příloze 2. Bude nutné zvolit jeden ze tří postupů: buď zkoušení ukončit a stanovit odpovídající klasifikační třídu nebezpečnosti, nebo provést zkoušky s vyšší fixní dávkou, nebo zkoušky s nižší fixní dávkou. S ohledem na ochranu zvířat se v hlavní studii znovu nepoužije úroveň dávky, která v orientační studii vedla k uhynutí (viz dodatek 2). Zkušenosti ukázaly, že nejpravděpodobnějším výsledkem u výchozí úrovně dávky bude, že látku lze klasifikovat bez nutnosti dalších zkoušek.

Obvykle se pro každou zkoumanou úroveň dávky použije celkem pět zvířat stejného pohlaví. Mezi těmito pěti zvířaty bude jedno zvíře z orientační studie, jemuž byla podána zvolená úroveň dávky, a další čtyři zvířata (kromě výjimečných případů, kdy úroveň dávky použité v hlavní studii nebyla součástí orientační studie).

Časový interval mezi podáváním jednotlivé výše dávky závisí na době nástupu, trvání a závažnosti příznaků toxicity. Expozice zvířat další dávce bude odložena, dokud nebude jisté, že zvířata, jimž byla podána předchozí dávka, přežila. Mezi jednotlivými dávkami se v případě potřeby doporučuje ponechat dobu 3 nebo 4 dnů, aby bylo umožněno pozorování zpožděné toxicity. Časový interval lze podle potřeby upravit, např. v případě neprůkazné reakce.

▼B

Při zvažování použití nejvyšší fixní dávky 5 000 mg/kg se postupuje podle metody popsané v příloze 3 (viz také 1.6.2).

1.5.3.2 *Limitní zkouška*

Limitní zkouška se používá především tehdy, má-li osoba provádějící zkoušku informace svědčící o tom, že zkoušený materiál je pravděpodobně netoxický, tj. je toxický pouze nad rámec regulačních limitních dávek. Informace o toxicitě zkoušeného materiálu lze získat ze znalostí o podobných zkoušených sloučeninách, směsích nebo produktech s ohledem na totožnost a procento složek, o nichž se ví, že jsou toxikologicky významné. V situacích, kdy existuje jen málo informací nebo vůbec žádné informace o toxicitě nebo kdy se očekává, že zkoušený materiál bude toxický, bude provedena hlavní zkouška.

Podle obvyklého postupu slouží jako limitní zkouška pro tyto pokyny výchozí dávka orientační studie 2 000 mg/kg (nebo výjimečně 5 000 mg/kg), po níž následuje podání této výše dávky dalším čtyřem zvířatům.

1.6 POZOROVÁNÍ

Po podání dávky se zvířata pozorují individuálně minimálně jednou během prvních 30 minut, pravidelně během prvních 24 hodin, přičemž zvláštní pozornost se věnuje prvním 4 hodinám, a poté denně po dobu 14 dnů kromě případů, kdy je nutné zvířata ze studie vyjmout a humánně utratit z důvodu dodržování pravidla dobrého zacházení se zvířaty, nebo je zjištěn jejich úhyn. Doba pozorování by však neměla být stanovena pevně. Bude stanovena podle toxických reakcí, doby jejich nástupu a délky fáze zotavení, a může tedy být podle potřeby prodloužena. Doba, kdy se příznaky toxicity objeví a vymizí, je důležitá zejména v případě tendence ke zpožděným příznakům toxicity (11). Veškerá pozorování se systematicky zaznamenávají, přičemž záznamy se vedou jednotlivě, pro každé zvíře.

Další pozorování budou nutná, jestliže zvířata dále vykazují příznaky toxicity. Pozorování zahrnují změny na kůži, na srsti, na očích, na sliznicích, a rovněž změny dýchání, krevního oběhu, změny funkce autonomní a centrální nervové soustavy, somatomotorické aktivity a chování. Pozornost je třeba věnovat třesu, křečím, slinění, průjmu, letargii, spánku a kómatu. Vezmou se v úvahu principy a kritéria shrnuté v textu Humane Endpoints Guidance Document (8). Zvířata ve stavu agónie a zvířata se známkami prudkých bolestí nebo s přetrvávajícími příznaky značného utrpení se humánně utratí. Pokud jsou zvířata z humánních důvodů utracena nebo je zjištěn jejich úhyn, je nutné dobu uhynutí zaznamenat co nejpřesněji.

1.6.1 **Tělesná hmotnost**

Hmotnost jednotlivých zvířat se stanoví krátce před podáním zkoušené látky a nejméně jednou týdně poté. Vypočítají se změny hmotnosti a zaznamenají se. Na konci zkoušky se zvířata, která přežila, zváží a poté humánně utratí.

▼B

1.6.2 **Patologie**

Všechna pokusná zvířata (včetně těch, která v průběhu zkoušky uhynula nebo byla utracena z důvodu dodržování pravidla dobrého zacházení se zvířaty) se pitvají. U každého zvířete se zaznamenají všechny makroskopické patologické nálezy. Lze také zvážit mikroskopické vyšetření orgánů, u nichž jsou patrné makroskopické patologie, u zvířat, která přežila 24 nebo více hodin po prvním podání dávky, protože mohou poskytnout užitečné informace.

2. **ÚDAJE**

Měly by být uvedeny údaje pro každé jednotlivé zvíře. Navíc by měly být všechny údaje shrnuty do tabulky, přičemž se u každé zkušební skupiny uvede počet použitých zvířat, počet zvířat vykazujících příznaky toxicity, počet zvířat uhynulých v průběhu zkoušky nebo utracených z humánních důvodů, doba uhynutí jednotlivých zvířat, popis, časový průběh a vratnost toxických účinků a pitevní nálezy.

3. **ZPRÁVY**

3.1 PROTOKOL O ZKOUŠCE

Protokol o zkoušce musí obsahovat následující informace:

Zkoušená látka:

— fyzikální povaha, čistota a tam, kde je to podstatné, fyzikálně-chemické vlastnosti (včetně izomerizace),

— identifikační údaje, včetně čísla CAS.

Vehikulum (je-li použito):

— zdůvodnění výběru vehikula, pokud není použita voda.

Pokusná zvířata:

— použitý druh/kmen,

— mikrobiologický stav zvířat, je-li znám,

— počet, stáří a pohlaví zvířat (případně včetně zdůvodnění použití samců místo samic),

— původ, podmínky chovu, strava atd.

Zkušební podmínky:

— podrobné údaje o složení zkoušené látky, včetně podrobností o fyzikální formě podávaného materiálu,

— podrobné údaje o způsobu podání zkoušené látky, včetně objemu dávek a době podávání,

— podrobné údaje o stravě a kvalitě vody (včetně druhu/zdroje stravy, zdroje vody),

— zdůvodnění výběru výchozí dávky.

▼B

Výsledky:

— údaje o reakcích každého zvířete a o výši jeho dávky (tj. počet zvířat vykazujících příznaky toxicity, včetně uhynutí, povahy, závažnosti a trvání účinků), ve formě tabulky,

— údaje o tělesné hmotnosti a jejích změnách ve formě tabulky,

— hmotnosti jednotlivých zvířat v den podání dávky, poté v týdenních intervalech a v čase úhynu nebo utracení,

— datum a doba úhynu, pokud předchází plánovanému usmrcení,

— časový průběh nástupu příznaků toxicity u každého zvířete, a zda byly vratné,

— pitevní a histopatologické nálezy pro každé zvíře, pokud jsou k dispozici.

Diskuse a interpretace výsledků.

Závěry.

4. **LITERATURA**

1) British Toxicology Society Working Party on Toxicity (1984). Special report: a new approach to the classification of substances and preparations on the basis of their acute toxicity. Human Toxicol., 3, 85–92.

2) Van den Heuvel, M.J., Dayan, A.D. and Shillaker, R.O. (1987). Evaluation of the BTS approach to the testing of substances and preparations for their acute toxicity. Human Toxicol., 6, 279–291.

3) Van den Heuvel, M.J., Clark, D.G., Fielder, R.J., Koundakjian, P.P., Oliver, G.J.A., Pelling, D., Tomlinson, N.J. and Walker, A.P. (1990). The international validation of a fixed-dose procedure as an alternative to the classical LD_{50} test. Fd. Chem. Toxicol. 28, 469–482.

4) Whitehead, A. and Curnow, R.N. (1992). Statistical evaluation of the fixed-dose procedure. Fd. Chem. Toxicol., 30, 313–324.

5) Stallard, N. and Whitehead, A. (1995). Reducing numbers in the fixed-dose procedure. Human Exptl. Toxicol. 14, 315–323. Human Exptl. Toxicol.

6) Stallard, N., Whitehead, A. and Ridgeway, P. (2002). Statistical evaluation of the revised fixed dose procedure. Hum. Exp. Toxicol., 21, 183–196.

7) OECD (2001). Guidance Document on Acute Oral Toxicity Testing. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment N. 24. Paris

8) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment N. 19.

▼B

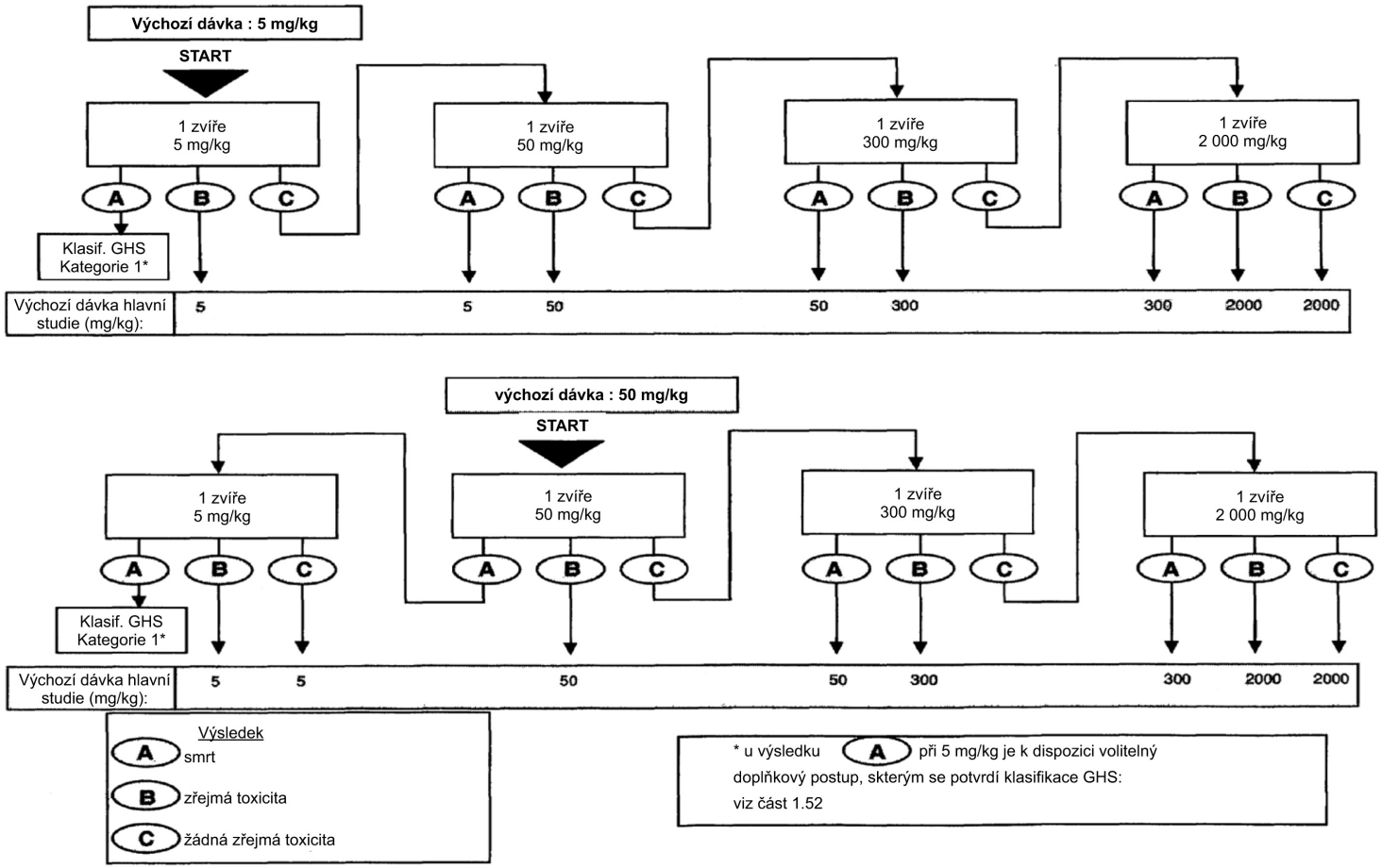
9) OECD (1998). Harmonised Integrated Hazard Classification for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals in November 1998, Part 2, p.11 [http://webnet1.oecd.org/oecd/pages/home/displaygeneral/0,3380,EN-documents-521-14-no-24-no-0,FF.html].

10) Lipnick, R.L., Cotruvo, J.A., Hill, R.N., Bruce, R.D., Stitzel, K.A., Walker, A.P., Chu, I., Goddard, M., Segal, L., Springer, J.A. and Myers, R.C. (1995). Comparison of the Up-and-Down, Conventional LD_{50}, and Fixed-Dose Acute Toxicity Procedures. Fd. Chem. Toxicol. 33, 223–231.

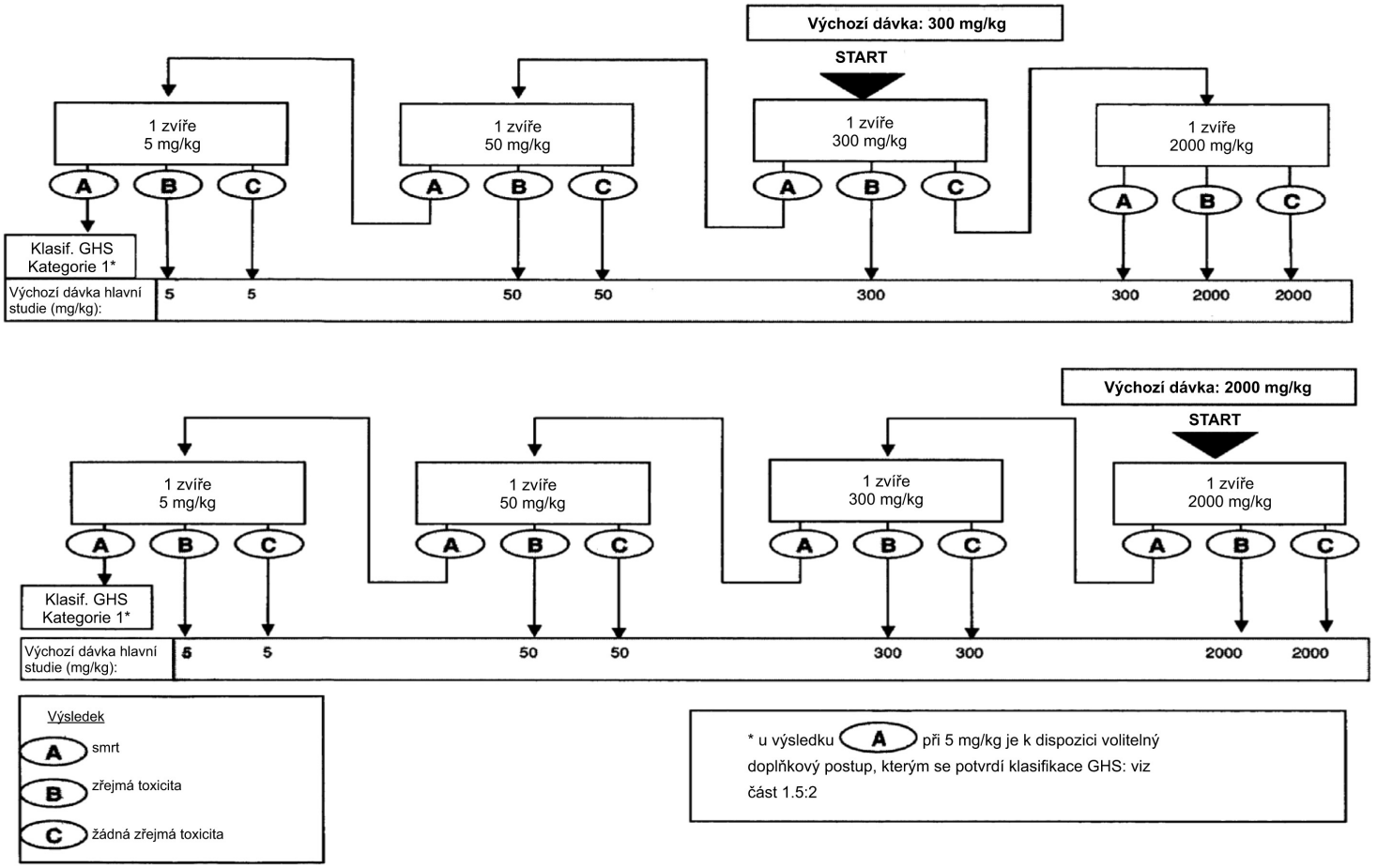
11) Chan P.K and A.W. Hayes (1994) Chapter 16 Acute Toxicity and Eye Irritation. In: Principles and Methods of Toxicology. 3rd Edition. A.W. Hayes, Editor. Raven Press, Ltd. New York, USA.

DODATEK 1

VÝVOJOVÝ DIAGRAM PRO ORIENTAČNÍ STUDII



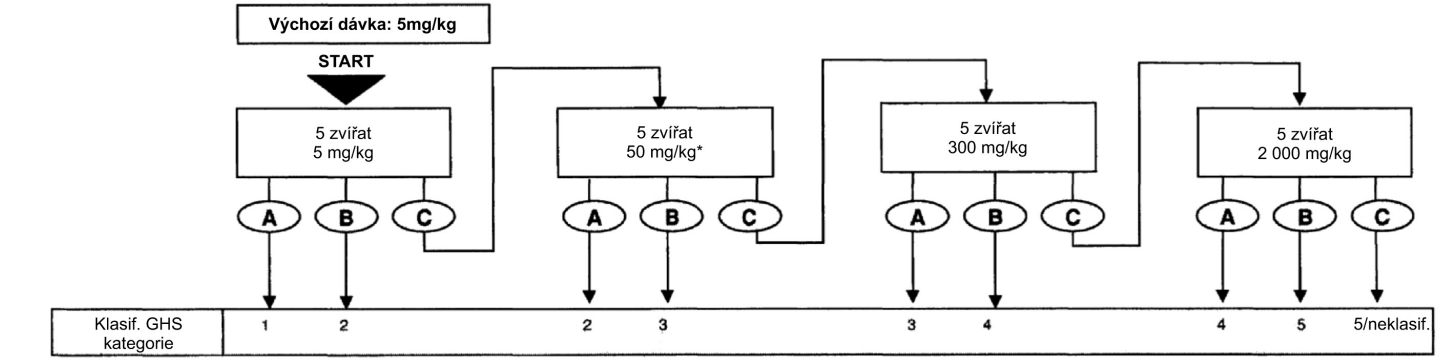
▼B

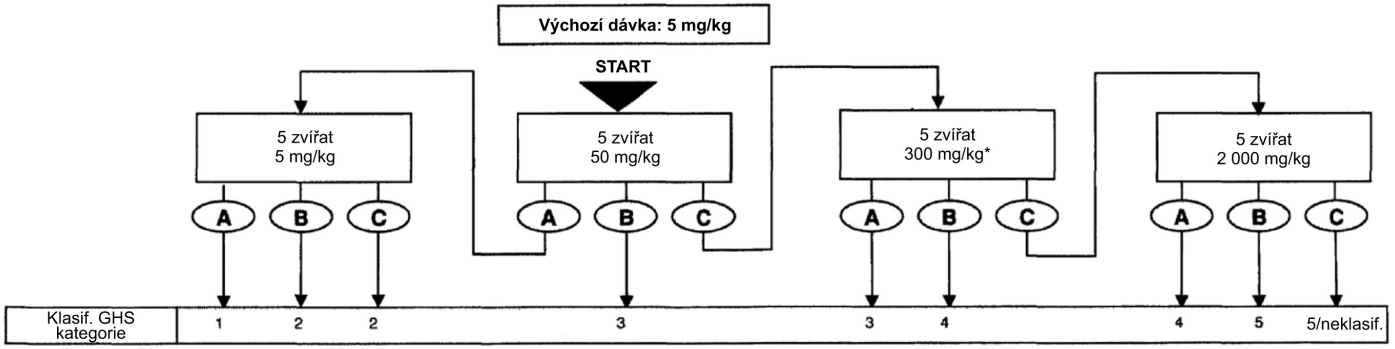

Výchozí dávka: 300 mg/kg
START
1 zvíře 5 mg/kg
1 zvíře 50 mg/kg
1 zvíře 300 mg/kg
1 zvíře 2000 mg/kg
A
B
C
Klasif. GHS Kategorie 1*
Výchozí dávka hlavní studie (mg/kg):
5
5
50
50
300
300
2000
2000
Výchozí dávka: 2000 mg/kg
START
1 zvíře 5 mg/kg
1 zvíře 50 mg/kg
1 zvíře 300 mg/kg
1 zvíře 2000 mg/kg
Klasif. GHS Kategorie 1*
Výchozí dávka hlavní studie (mg/kg):
5
5
50
50
300
300
2000
2000
Výsledek
A smrt
B zřejmá toxicita
C žádná zřejmá toxicita
* u výsledku A při 5 mg/kg je k dispozici volitelný doplňkový postup, kterým se potvrdí klasifikace GHS: viz část 1.5:2

▼B

DODATEK 2

VÝVOJOVÝ DIAGRAM PRO HLAVNÍ STUDII





Výsledek

A ≥ 2 uhynutí

B ≥ 1 se zřejmou toxicitou a/nebo 1 uhynutí

C žádná zřejmá toxicita ni uhynutí

Velikost skupiny

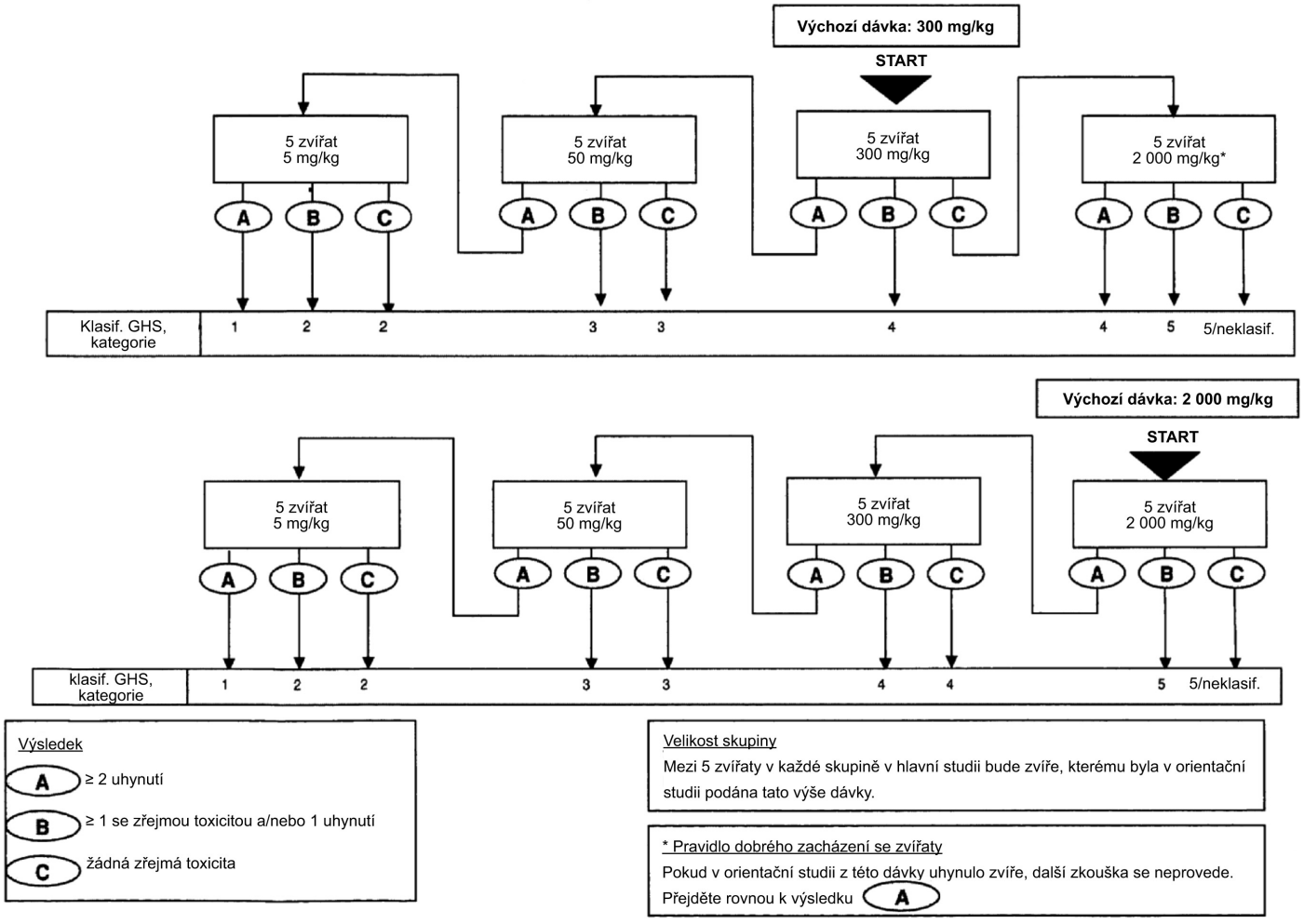
Mezi 5 zvířaty v každé skupině v hlavní studii bude zvíře, kterému byla v orientační studii podána tato výše dávky.

* Pravidlo dobrého zacházení se zvířaty

Pokud v orientační studii z této dávky uhynulo zvíře, další zkouška se neprovede. Přejděte rovnou k výsledku A

02008R0440 — CS — 16.10.2019 — 008.001 — 211

▼B


Výchozí dávka: 300 mg/kg
START
5 zvířat 5 mg/kg
5 zvířat 50 mg/kg
5 zvířat 300 mg/kg
5 zvířat 2 000 mg/kg*
A B C
Klasif. GHS, kategorie
1 2 2 3 3 4 4 5 5/neklasif.
Výchozí dávka: 2 000 mg/kg
START
5 zvířat 5 mg/kg
5 zvířat 50 mg/kg
5 zvířat 300 mg/kg
5 zvířat 2 000 mg/kg
A B C
klasif. GHS, kategorie
1 2 2 3 3 4 4 5 5/neklasif.
Výsledek
A ≥ 2 uhynutí
B ≥ 1 se zřejmou toxicitou a/nebo 1 uhynutí
C žádná zřejmá toxicita
Velikost skupiny
Mezi 5 zvířaty v každé skupině v hlavní studii bude zvíře, kterému byla v orientační studii podána tato výše dávky.
* Pravidlo dobrého zacházení se zvířaty
Pokud v orientační studii z této dávky uhynulo zvíře, další zkouška se neprovede.
Přejděte rovnou k výsledku A

▼B

DODATEK 3

KRITÉRIA KLASIFIKACE ZKOUŠENÝCH LÁTEK S OČEKÁVANÝMI HODNOTAMI LD_{50} PŘESAHUJÍCÍMI 2 000 MG/KG BEZ NUTNOSTI ZKOUŠENÍ

Kritéria pro kategorii nebezpečnosti 5 mají umožnit identifikaci zkoušených látek, u nichž je nebezpečí akutní toxicity nízké, avšak které mohou za určitých okolností pro citlivé jedince představovat nebezpečí. U těchto látek se předpokládá, že se jejich orální nebo dermální LD_{50} nebo LD_{50} ekvivalentních dávek podávaných jinými cestami pohybuje v rozmezí od 2 000 do 5 000 mg/kg. Zkoušené látky lze klasifikovat v kategorii nebezpečnosti definované jako 2 000 mg/kg < LD_{50} < 5 000 mg/kg (v GHS kategorie 5) v těchto případech:

a) pokud je do této kategorie zařazena podle některého ze způsobů zkoušení uvedeného v příloze 2, a to v závislosti na výskytech uhynutí;

b) pokud jsou již k dispozici spolehlivé důkazy naznačující, že LD_{50} se pohybuje v rozmezí hodnot kategorie 5, nebo pokud z jiných studií na zvířatech nebo z toxických účinků na člověka vyplývají akutní obavy o lidské zdraví;

c) pokud extrapolací, odhadem nebo měřením údajů není přiřazení do vyšší třídy nebezpečnosti odůvodněno a

— pokud jsou k dispozici spolehlivé informace naznačující významné toxické účinky na člověka, nebo

— pokud je během zkoušení orální cestou s dávkami nejvýše kategorie 4 pozorováno uhynutí, nebo

— v případech, kdy odborný posudek potvrdí závažné klinické příznaky toxicity při testování s dávkami nejvýše kategorie 4 s výjimkou průjmu, zježení srsti nebo rozcuchané srsti, nebo

— v případech, kdy odborný posudek potvrdí spolehlivé informace, které naznačují možnost závažných akutních účinků vyplývajících z jiných studií na zvířatech.

ZKOUŠENÍ V DÁVKÁCH PŘESAHUJÍCÍCH 2 000 MG/KG

Ve výjimečných případech, a pouze je-li to odůvodněno specifickými regulačními potřebami, lze zvážit použití další nejvyšší úrovně fixní dávky 5 000 mg/kg. S ohledem na zásadu dobrého zacházení se zvířaty se zkoušení s dávkami 5 000 mg/kg nedoporučuje, mělo by se zvažovat pouze v případě, že existuje velká pravděpodobnost, že výsledky takové zkoušky by měly přímý význam pro ochranu zvířat nebo lidského zdraví (9).

Orientační studie

Pravidla pro rozhodování, jimiž se řídí metoda postupného podávání dávek uvedená v příloze 1, se rozšíří tak, aby zahrnovala úroveň dávky 5 000 mg/kg. Pokud se v orientační studii použije výchozí dávka 5 000 mg/kg, výsledek A (úhyn) povede k nutnosti zkoušet na druhém zvířeti dávku 2 000 mg/kg. Výsledky B a C (zřejmá toxicita nebo žádná toxicita) umožní zvolit dávku 5 000 mg/kg za výchozí dávku hlavní studie. Podobně pokud se použije výchozí dávka jiná než 5 000 mg/kg, zkoušení pokračuje na úroveň 5 000 mg/kg v případě, že se při 2 000 mg/kg zjistí výsledky B nebo C. Následný výsledek A při 5 000 mg/kg bude vyžadovat výchozí dávku hlavní studie 2 000 mg/kg a výsledky B a C budou vyžadovat výchozí dávku v hlavní studii 5 000 mg/kg.

▼B

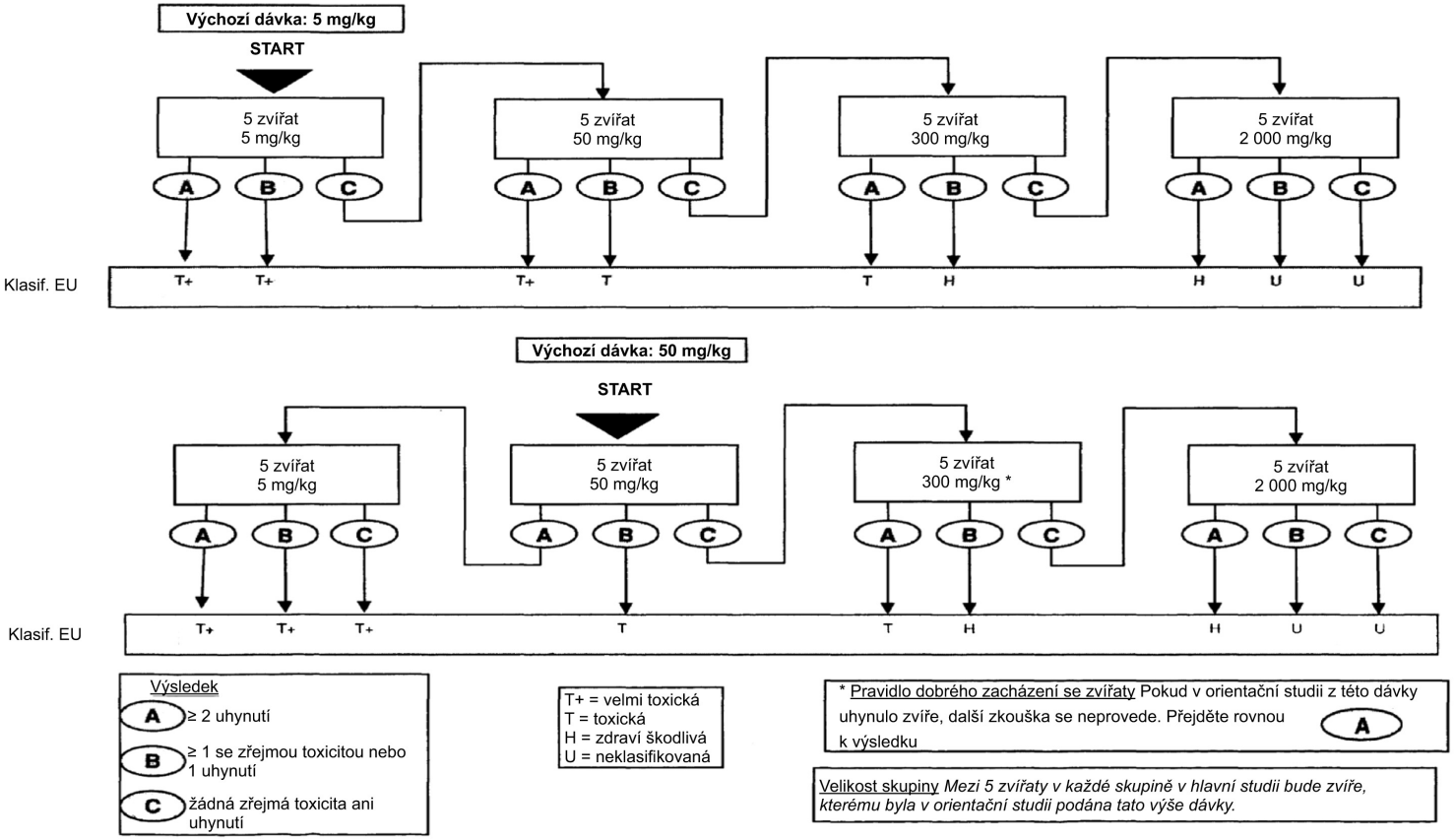
Hlavní studie

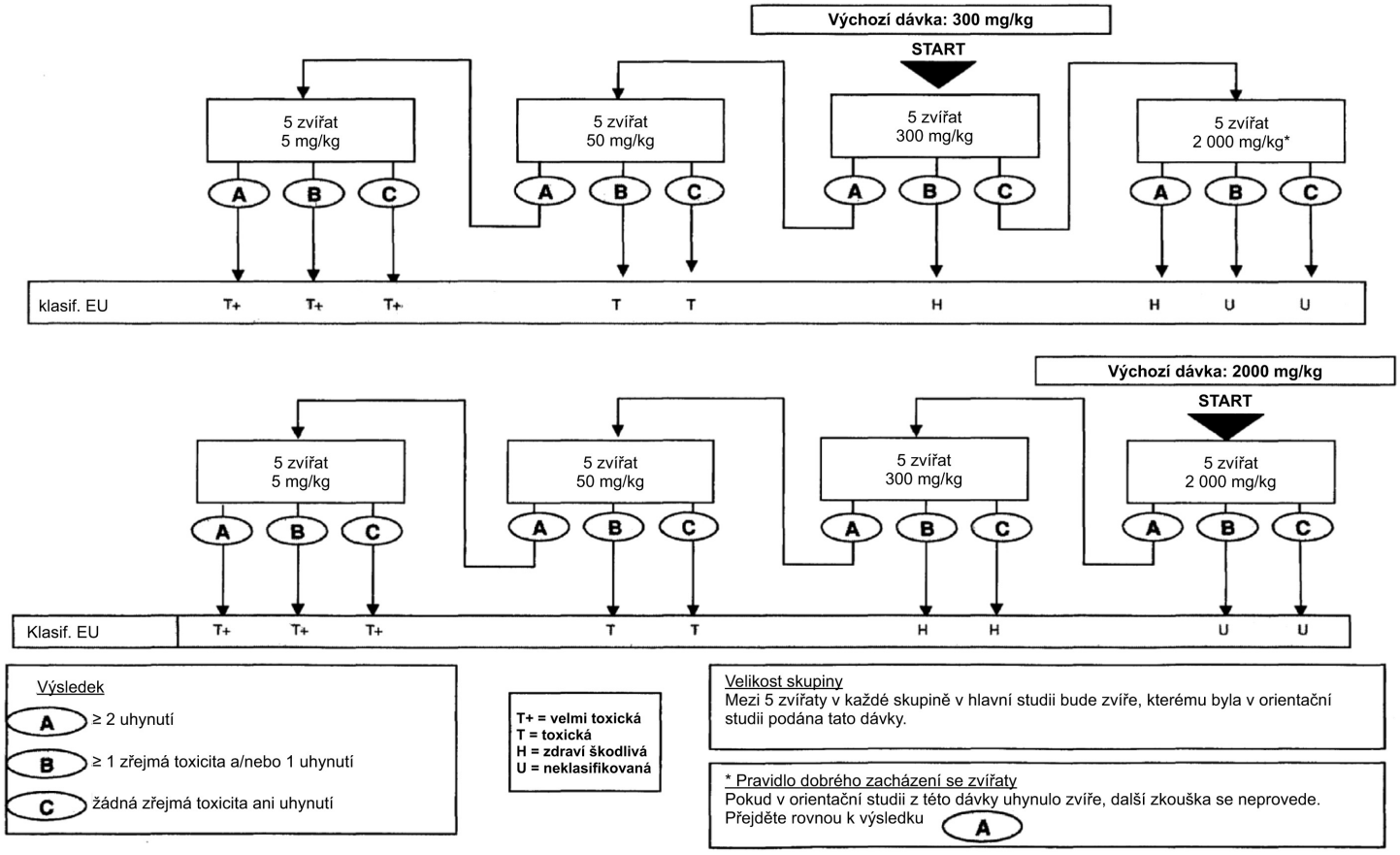
Pravidla pro rozhodování, jimiž se řídí metoda postupného podávání dávek uvedená v příloze 2, se rozšíří tak, aby zahrnovala úroveň dávky 5 000 mg/kg. Pokud se tedy v hlavní studii použije výchozí dávka 5 000 mg/kg, bude výsledek A (≥ 2 úhyny) vyžadovat zkoušení dávky 2 000 mg/kg na druhé skupině. Výsledek B (zřejmá toxicita a/nebo ≤ 1 úhyn) nebo C (žádná toxicita) povedou k tomu, že látka nebude podle GHS klasifikována. Podobně pokud se použije výchozí dávka jiná než 5 000 mg/kg, zkoušení pokračuje na úroveň 5 000 mg/kg v případě, že se při 2 000 mg/kg zjistí výsledek C. Následný výsledek A při 5 000 mg/kg povede k tomu, že se látka přiřadí do kategorie 5 GHS a na základě výsledku B nebo C látka nebude klasifikována.

DODATEK 4

ZKUŠEBNÍ METODA B.1.a

Pokyny ke klasifikaci podle systému EU pro přechodné období do plného zavedení globálně harmonizovaného systému klasifikace (GHS) (převzato z literatury (8))




Výchozí dávka: 300 mg/kg
START
5 zvířat 5 mg/kg
5 zvířat 50 mg/kg
5 zvířat 300 mg/kg
5 zvířat 2 000 mg/kg*
A B C
klasif. EU
T+ T+ T+ T T H H U U
Výchozí dávka: 2000 mg/kg
START
5 zvířat 5 mg/kg
5 zvířat 50 mg/kg
5 zvířat 300 mg/kg
5 zvířat 2 000 mg/kg
Klasif. EU
T+ T+ T+ T T H H U U
Výsledek
A ≥ 2 uhynutí
B ≥ 1 zřejmá toxicita a/nebo 1 uhynutí
C žádná zřejmá toxicita ani uhynutí
T+ = velmi toxická
T = toxická
H = zdraví škodlivá
U = neklasifikovaná
Velikost skupiny
Mezi 5 zvířaty v každé skupině v hlavní studii bude zvíře, kterému byla v orientační studii podána tato dávky.
* Pravidlo dobrého zacházení se zvířaty
Pokud v orientační studii z této dávky uhynulo zvíře, další zkouška se neprovede.
Přejděte rovnou k výsledku A

▼B

B.1.b AKUTNÍ ORÁLNÍ TOXICITA – METODA STANOVENÍ TŘÍDY AKUTNÍ TOXICITY

1. METODA

Tato zkušební metoda odpovídá metodě OECD TG 423 (2001).

1.1 ÚVOD

Metoda stanovení třídy akutní toxicity (1) stanovená v této zkoušce je metodou po krocích, přičemž u každého kroku se používají tři zvířata stejného pohlaví. V závislosti na úmrtnosti a/nebo stavu agónie zvířat lze o akutní toxicitě zkoušené látky rozhodnout průměrně na základě 2 až 4 kroků. Tato metoda je reprodukovatelná, vyžaduje méně zvířat a dokáže látky zařadit podobně jako jiné zkušební metody akutní toxicity. Metoda stanovení třídy akutní toxicity je založena na biometrickém hodnocení (2)(3)(4)(5) s fixními dávkami, přiměřeně oddělenými tak, aby umožnila zařazení látky pro účely klasifikace a posouzení nebezpečnosti. Metoda přijatá v roce 1996 byla podrobena rozsáhlým národním (6) mezinárodním (7) validačním studií *in vivo* pro srovnání s hodnotami LD_{50} získanými z literatury.

Obecný návod týkající se výběru nejvhodnější zkušební metody k danému účelu obsahuje text Guidance Document on Acute Oral Toxicity Testing (8). V tomto dokumentu jsou také uvedeny doplňující informace o provádění a analýze zkušební metody B.1.b.

Není nutné podávat zkoušené látky v dávkách, o nichž je známo, že v důsledku leptavých nebo výrazně dráždivých účinků vyvolávají značnou bolest a utrpení. Umírající zvířata nebo zvířata, která zjevně projevují příznaky bolesti nebo značného a přetrvávajícího utrpení, se humánně utratí a při interpretaci výsledků jsou hodnocena jako zvířata uhynulá při zkoušce. Kritéria rozhodování o utracení umírajících nebo značně trpících zvířat a poučení týkající se rozpoznání předvídatelného nebo blížícího se uhynutí jsou předmětem samostatného dokumentu (9).

Metoda využívá předem stanovených dávek a její výsledky umožňují látku zařadit a klasifikovat podle globálně harmonizovaného systému klasifikace chemických látek, které způsobují akutní toxicitu (10).

V zásadě tato metoda neslouží k vypočtení přesné hodnoty LD_{50}, ale umožňuje určit definované rozpětí expozice, při které se předpokládá letalita, neboť hlavním koncovým vyhodnocením této zkoušky zůstává uhynutí části zvířat. Metoda umožňuje stanovit hodnotu LD_{50}, pouze pokud alespoň dvě dávky vedou k mortalitě vyšší než 0 % a nižší než 100 %. Použití výběru předem stanovených dávek, bez ohledu na zkoušenou látku, u něhož se klasifikace explicitně váže k počtu zvířat pozorovaných v různých stavech, zvyšuje možnost konzistentního a opakovaného předávání zpráv mezi laboratořemi.

▼B

Zkušební laboratoř vezme před provedením studie v úvahu veškeré dostupné informace o zkoušené látce. Součástí těchto informací je totožnost a chemická struktura látky, její fyzikálně-chemické vlastnosti, výsledek jiných zkoušek toxicity dané látky *in vitro* nebo *in vivo*, toxikologické údaje o strukturně příbuzných látkách a očekávané použití látky. Tyto informace jsou nezbytné k tomu, aby byli všichni zainteresovaní přesvědčeni, že zkouška má význam pro ochranu lidského zdraví a pomůže při výběru nejvhodnější výchozí dávky.

1.2 DEFINICE

Akutní orální toxicita: se vztahuje na nepříznivé účinky, které se projeví po orálním podání jedné dávky nebo více dávek látky během 24 hodin.

Opožděný úhyn: znamená, že zvíře během 48 hodin neuhyne ani nejeví známky umírání, ale uhyne později během čtrnáctidenní doby pozorování.

Dávka: množství podané zkoušené látky. Dávka se vyjadřuje jako hmotnost zkoušené látky na jednotku hmotnosti pokusného zvířete (např. mg/kg).

GHS: globálně harmonizovaný systém klasifikace chemických látek a směsí. Společný projekt Organizace pro hospodářskou spolupráci a rozvoj (lidské zdraví a životní prostředí), Odborného výboru OSN pro přepravu nebezpečného zboží (fyzikálně-chemické vlastnosti) a Mezinárodní organizace práce (informace o nebezpečnosti) koordinovaný Meziorganizačním programem pro řádné nakládání s chemikáliemi (IOMC).

Blížící se uhynutí: stav agónie nebo uhynutí je očekáván před další plánovanou dobou pozorování. Příznaky svědčící o tomto stavu mohou u hlodavců zahrnovat křeče, polohu na boku, polohu vleže a třes (více podrobností viz text Humane Endpoint Guidance Document (9)).

LD_{50} (střední letální orální dávka): statisticky vypočtená jednotlivá dávka látky, u níž lze očekávat, že způsobí uhynutí 50 % zvířat, jimž byla podána orální cestou. Hodnota LD_{50} se vyjadřuje jako hmotnost zkoušené látky na jednotku hmotnosti pokusného zvířete (mg/kg).

Limitní dávka: označuje nejvyšší přípustnou dávku (2 000 nebo 5 000 mg/kg).

Stav agónie: označuje stav úhynu nebo neschopnost přežít, ani když je zvíře léčeno (více podrobností viz text Humane Endpoint Guidance Document (9)).

Předvídatelný úhyn: přítomnost klinických příznaků svědčících o smrti, přičemž doba úhynu je známa a předchází plánovanému ukončení zkoušky v budoucnosti, např. neschopnost dojít k vodě nebo potravě (více podrobností viz text Humane Endpoint Guidance Document (9)).

▼B

1.3 PODSTATA ZKOUŠKY

Podstatou zkoušky je, že se pomocí metody po krocích, využívající minimálního počtu zvířat u každého kroku, získají informace o akutní toxicitě zkoušené látky, které umožní její klasifikaci. Látka se skupině pokusných zvířat podává orálně v jedné ze stanovených dávek. Látka se zkouší metodou po krocích, přičemž u každého kroku se používají tři zvířata stejného pohlaví (obvykle samice). Přítomnost nebo nepřítomnost mortality vyvolané látkou u zvířat, jimž byla látka podána v jednom kroku, rozhodne o dalším kroku, tj.:

— není třeba žádné další zkoušení,

— podá se stejná dávka dalším třem zvířatům,

— látka se podá dalším třem zvířatům v nejbližší vyšší nebo nejbližší nižší úrovni dávky.

Podrobnosti postupu zkoušení jsou uvedeny v příloze 1. Metoda umožní rozhodnout s ohledem na zařazení zkoušené látky do jedné z řady tříd toxicity definovaných fixními hraničními hodnotami LD_{50}.

1.4 POPIS METODY

1.4.1 **Výběr druhu zvířat**

Upřednostňovaným druhem hlodavce je potkan, avšak lze použít i jiné druhy hlodavců. Obvykle se používají samice (9). Je to proto, že přehled literatury o konvenčních zkouškách LD_{50} ukazuje, že ačkoliv je mezi pohlavími obvykle malý rozdíl, pokud jde o citlivost, jsou samice v případech, ve kterých jsou rozdíly pozorovány, obecně nepatrně citlivější (11). Pokud však poznatky o toxikologických nebo toxikokinetických vlastnostech strukturně příbuzných chemických látek naznačují, že citlivější jsou pravděpodobně samci, použije se toto pohlaví. Jestliže se zkouška provádí na samcích, je nutné podat náležité odůvodnění.

Použijí se mladá zdravá dospělá zvířata běžně užívaných laboratorních kmenů. Samice musí být nullipary a nesmí být březí. Každé zvíře musí být na začátku podávání látky 8 až 12 měsíců staré a jeho hmotnost by se měla pohybovat v intervalu ±20 % střední hmotnosti zvířat, kterým byla podána předchozí dávka.

1.4.2 **Podmínky chovu a krmení**

Teplota v místnosti pro pokusná zvířata by měla být 22 °C (± 3 °C), relativní vlhkost vzduchu by měla být minimálně 30 % a pokud možno nepřesáhnout 70 %, kromě doby úklidu místnosti, cílem by měla být hodnota 50–60 %. Osvětlení by mělo být umělé a mělo by se střídat 12 hodin světla a 12 hodin tmy. Ke krmení lze použít konvenční laboratorní stravu s neomezenou dodávkou pitné vody. Zvířata mohou být chována v klecích ve skupinách podle dávky, ale počet zvířat v kleci nesmí bránit nerušenému pozorování každého zvířete.

▼B

1.4.3 **Příprava zvířat**

Zvířata se náhodně vyberou, pro usnadnění individuální identifikace se označí a chovají se v klecích minimálně pět dnů před podáním látky, aby se mohla přizpůsobit laboratorním podmínkám.

1.4.4 **Příprava dávek**

Zkoušená látka by obecně měla být při všech úrovních zkoušených dávek podávána v konstantním objemu pomocí úpravy koncentrace dávkovaného přípravku. V případech, kdy má být zkoušen kapalný koncový produkt nebo směs, může však být použití nezředěné zkoušené látky, tj. s konstantní koncentrací, pro hodnocení následného rizika této látky užitečnější a je vyžadováno některými kontrolními orgány. Ani v jednom případě nesmí být překročen maximální objem dávky. Maximální objem kapaliny, kterou lze jednorázově podat, závisí na velikosti pokusného zvířete. U hlodavců by objem obvykle neměl přesáhnout 1 ml na 100 g tělesné hmotnosti, avšak u vodních roztoků připadá v úvahu i dávka 2 ml na 100 g tělesné hmotnosti. S ohledem na složení dávkovaného přípravku se ve všech případech, kde je to možné, doporučuje použití vodného roztoku/suspenze/emulze, potom v pořadí podle preference použití roztoku/suspenze/emulze v oleji (např. v kukuřičném oleji) a nakonec případně roztoku v jiných vehikulech. U vehikul jiných než voda musí být známy toxikologické charakteristiky. Dávky musí být připraveny krátce před podáním, pokud není stálost přípravku během doby, kdy bude používán, známa a neukáže se jako přijatelná.

1.5 POSTUP

1.5.1 **Podávání dávek**

Zkoušená látka se podává sondou v jedné dávce pomocí žaludeční sondy nebo vhodné intubační kanyly. Pokud výjimečně není možné podat dávku najednou, lze ji podat po menších množstvích během nejvýše 24 hodin.

Před podáním zkoušené látky nemají zvířata dostávat potravu (např. potkanům by se neměla podávat přes noc, myším 3–4 hodiny), voda se však ponechává. Po uplynutí doby hladovění se zvířata zváží a podá se jim zkoušená látka. Po podání látky se zamezí přístupu k potravě na další 3–4 hodiny u potkanů nebo 1–2 hodiny u myší. Podává-li se látka po částech v průběhu určité doby, může být podle délky období nezbytné poskytnout zvířatům potravu a vodu.

1.5.2 **Počet zvířat a úrovně dávek**

V každém kroku se používají tři zvířata. Dávka, která bude použita jako výchozí, se zvolí z jedné ze čtyř fixních úrovní: 5, 50, 300 a 2 000 mg/kg tělesné hmotnosti. Výchozí dávka by měla být taková, která nejpravděpodobněji vyvolá uhynutí některých zvířat, jimž bude podána. Postup, který je nutno u každé výchozí dávky dodržet, je popsán ve vývojových diagramech v příloze 1. V příloze 4 jsou uvedeny pokyny týkající se klasifikace v rámci systému EU do doby, než bude zaveden nový globálně harmonizovaný systém (GHS).

▼B

Pokud dostupné informace naznačují, že při nejvyšší úrovni výchozí dávky (2 000 mg/kg tělesné hmotnosti) je úmrtnost nepravděpodobná, je nutné provést limitní zkoušku. Pokud nejsou o látce, která má být zkoušena, k dispozici žádné informace, doporučuje se, z důvodů dodržování pravidla dobrého zacházení se zvířaty, použít výchozí dávku 300 mg/kg tělesné hmotnosti.

Časový interval mezi experimentálními skupinami závisí na době nástupu, trvání a závažnosti příznaků toxicity. Podání další dávky bude odloženo, dokud nebude jisté, že zvířata, jimž byla podána předchozí dávka, přežila.

Ve výjimečných případech a pouze je-li to odůvodněno specifickými konkrétními předpisy, lze zvážit použití další nejvyšší úrovně dávky 5 000 mg/kg tělesné hmotnosti (viz dodatek 2). S ohledem na zásadu dobrého zacházení se zvířaty se pokusy na zvířatech v rámci kategorie 5 GHS (2 000–5 000 mg/kg) nedoporučují a měly by se zvažovat pouze tehdy, pokud existuje velká pravděpodobnost, že výsledky takové zkoušky budou mít přímý význam pro ochranu lidského zdraví, zdraví zvířat nebo životního prostředí.

1.5.3 **Limitní zkouška**

Limitní zkouška se používá především tehdy, má-li osoba provádějící zkoušku informace svědčící o tom, že zkoušený materiál je pravděpodobně netoxický, tj. je toxický pouze nad rámec regulačních limitních dávek. Informace o toxicitě zkoušeného materiálu lze získat ze znalostí o podobných zkoušených sloučeninách, směsích nebo produktech s ohledem na totožnost a procento složek, o nichž se ví, že jsou toxikologicky významné. V situacích, kdy existuje jen málo informací nebo vůbec žádné informace o toxicitě nebo kdy se očekává, že zkoušený materiál bude toxický, bude provedena hlavní zkouška.

Limitní zkoušku s jednou úrovní dávky 2 000 mg/kg tělesné hmotnosti lze provést na šesti zvířatech (tři zvířata na jeden krok). Výjimečně lze na třech zvířatech provést limitní zkoušku s jednou úrovní dávky 5 000 mg/kg (viz dodatek 2). Projeví-li se úmrtnost vyvolaná zkoušenou látkou, budou další zkoušky uskutečněny s nejbližší nižší úrovní dávky.

1.6 POZOROVÁNÍ

Po podání dávky se zvířata pozorují individuálně minimálně jednou během prvních 30 minut, pravidelně během prvních 24 hodin, přičemž zvláštní pozornost se věnuje prvním 4 hodinám, a poté denně po dobu 14 dnů kromě případů, kdy je nutné zvířata ze studie vyjmout a humánně utratit z důvodu dodržování pravidla dobrého zacházení se zvířaty, nebo je zjištěn jejich úhyn. Doba pozorování by však neměla být stanovena pevně. Bude stanovena podle toxických reakcí, doby jejich nástupu a délky fáze zotavení, a může tedy být podle potřeby prodloužena. Doba, kdy se příznaky toxicity objeví a vymizí, je důležitá zejména v případě tendence ke zpožděným příznakům toxicity (12). Veškerá pozorování se systematicky zaznamenávají, přičemž záznamy se vedou pro každé zvíře jednotlivě.

▼B

Další pozorování budou nutná, jestliže zvířata dále vykazují příznaky toxicity. Pozorování zahrnují změny na kůži, na srsti, na očích, na sliznicích, a rovněž změny dýchání, krevního oběhu, změny funkce autonomní a centrální nervové soustavy, somatomotorické aktivity a chování. Pozornost je třeba věnovat třesu, křečím, slinění, průjmu, letargii, spánku a kómatu. Vezmou se v úvahu principy a kritéria shrnuté v textu Humane Endpoints Guidance Document (9). Zvířata ve stavu agónie a zvířata se známkami prudkých bolestí nebo s přetrvávajícími příznaky značného utrpení se humánně utratí. Pokud jsou zvířata z humánních důvodů utracena nebo je zjištěn jejich úhyn, je nutné dobu uhynutí zaznamenat co nejpřesněji.

1.6.1 **Tělesná hmotnost**

Hmotnost jednotlivých zvířat se stanoví krátce před podáním zkoušené látky a nejméně jednou týdně poté. Vypočítají se změny hmotnosti a zaznamenají se. Na konci zkoušky se zvířata, která přežila, zváží a humánně utratí.

1.6.2 **Patologie**

Všechna pokusná zvířata (včetně těch, která v průběhu zkoušky uhynula nebo byla utracena z důvodu dodržování pravidla dobrého zacházení se zvířaty) se pitvají. U každého zvířete se zaznamenají všechny makroskopické patologické nálezy. Lze také zvážit mikroskopické vyšetření orgánů, u nichž jsou patrné makroskopické patologie, u zvířat, která přežila 24 nebo více hodin, protože mohou poskytnout užitečné informace.

2. **DATA**

Měly by být uvedeny údaje pro každé jednotlivé zvíře. Navíc by měly být všechny údaje shrnuty do tabulky, přičemž se u každé zkušební skupiny uvede počet použitých zvířat, počet zvířat vykazujících příznaky toxicity, počet zvířat uhynulých v průběhu zkoušky nebo utracených z humánních důvodů, doba uhynutí jednotlivých zvířat, popis, časový průběh a vratnost toxických účinků a pitevní nálezy.

3. **ZPRÁVY**

3.1 **Protokol o zkoušce**

Protokol o zkoušce musí pokud možno obsahovat následující informace:

Zkoušená látka:

— fyzikální povaha, čistota a tam, kde je to podstatné, fyzikálněchemické vlastnosti (včetně izomerizace),

— identifikační údaje, včetně čísla CAS.

Vehikulum (je-li použito):

— zdůvodnění výběru vehikula, pokud není použita voda.

Pokusná zvířata:

— použitý druh/kmen,

▼B

— mikrobiologický stav zvířat, je-li znám,

— počet, stáří a pohlaví zvířat (případně včetně zdůvodnění použití samců místo samic),

— původ, podmínky chovu, strava atd.

Zkušební podmínky:

— podrobné údaje o složení zkoušené látky, včetně podrobností o fyzikální formě podávaného materiálu,

— podrobné údaje o způsobu podání zkoušené látky, včetně objemu dávek a době podávání,

— podrobné údaje o stravě a kvalitě vody (včetně druhu/zdroje stravy, zdroje vody),

— zdůvodnění výběru výchozí dávky.

Výsledky:

— údaje ve formě tabulky o reakcích každého zvířete a o výši jeho dávky (tj. počet zvířat vykazujících příznaky toxicity, včetně uhynutí, povahy, závažnosti a trvání účinků),

— údaje o tělesné hmotnosti a jejích změnách ve formě tabulky,

— hmotnosti jednotlivých zvířat v den podání dávky, poté v týdenních intervalech a v čase úhynu nebo utracení,

— datum a doba úhynu, pokud předchází plánovanému usmrcení,

— časový průběh nástupu příznaků toxicity u každého zvířete, a zda byly vratné,

— pitevní a histopatologické nálezy pro každé zvíře, pokud jsou k dispozici.

Diskuse a interpretace výsledků.

Závěry.

4. **LITERATURA**

1) Roll R., Höfer-Bosse Th. And Kayser D. (1986). New Perspectives in Acute Toxicity Testing of Chemicals. Toxicol. Lett., Suppl. 31, 86

2) Roll R., Riebschläger M., Mischke U. and Kayser D. (1989). Neue Wege zur Bestimmung der akuten Toxizität von Chemikalien. Bundesgesundheitsblatt 32, 336–341.

3) Diener W., Sichha L., Mischke U., Kayser D. and Schlede E. (1994). The Biometric Evaluation of the Acute-Toxic-Class Method (Oral). Arch. Toxicol. 68, 559–610

4) Diener W., Mischke U., Kayser D. and Schlede E. (1995). The Biometric Evaluation of the OECD Modified Version of the Acute-Toxic-Class Method (Oral). Arch. Toxicol. 69, 729–734.

5) Diener W., and Schlede E. (1999) Acute Toxicity Class Methods: Alterations to LD/LC_{50} Tests. ALTEX 16, 129–134

6) Schlede E., Mischke U., Roll R. and Kayser D. (1992). A National Validation Study of the Acute-Toxic- Class Method – An Alternative to the LD_{50} Test. Arch. Toxicol. 66, 455–470.

▼B

7) Schlede E., Mischke U., Diener W. and Kayser D. (1994). The International Validation Study of the Acute-Toxic-Class Method (Oral). Arch. Toxicol. 69, 659–670.

8) OECD (2001) Guidance Document on Acute Oral Toxicity Testing. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment N. 24. Paris.

9) OECD (2000) Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment N 19.

10) OECD (1998) Harmonized Integrated Hazard Classification System For Human Health And Environmental Effects Of Chemical Substances as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals in November 1998, Part 2, p. 11 [http://webnet1.oecd.org/oecd/pages/home/displaygeneral/0,3380,EN-documents-521-14-no-24-no-0,FF.html].

11) Lipnick R L, Cotruvo, J A, Hill R N, Bruce R D, Stitzel k A, Walker A P, Chu I; Goddard M, Segal L, Springer J A and Myers R C (1995) Comparison of the Up-and Down, Conventional LD_{50}, and Fixed Dose Acute Toxicity Procedures. Fd. Chem. Toxicol 33, 223–231.

12) Chan P.K. and A.W. Hayes. (1994). Chap. 16. Acute Toxicity and Eye Irritancy. *Principles and Methods of Toxicology*. Third Edition. A.W. Hayes, Editor. Raven Press, Ltd., New York, USA.

▼B

DODATEK 1

POSTUP, KTERÝ MÁ BÝT U KAŽDÉ Z VÝCHOZÍCH DÁVEK DODRŽEN

OBECNÉ POZNÁMKY

Systém zkoušení u každé výchozí dávky obsažený v této příloze nastiňuje postup, který je třeba sledovat.

— Dodatek 1A: výchozí dávka je 5 mg na kg tělesné hmotnosti.

— Dodatek 1B: výchozí dávka je 50 mg na kg tělesné hmotnosti.

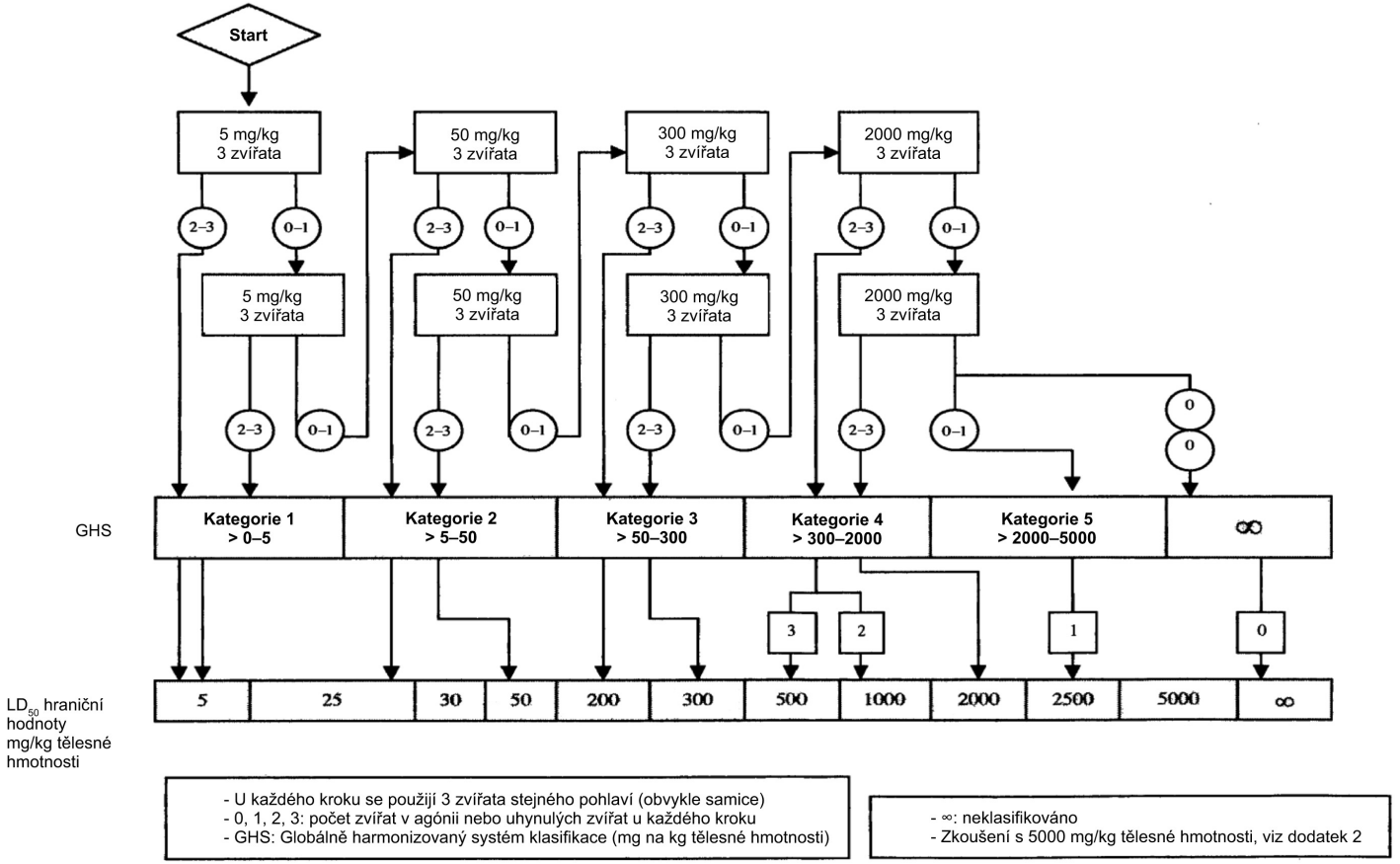
— Dodatek 1C: výchozí dávka je: 300 mg na kg tělesné hmotnosti.

— Dodatek 1D: výchozí dávka je: 2 000 mg na kg tělesné hmotnosti.

Postup zkoušení se řídí naznačenými šipkami v závislosti na počtu humánně utracených nebo uhynulých zvířat.

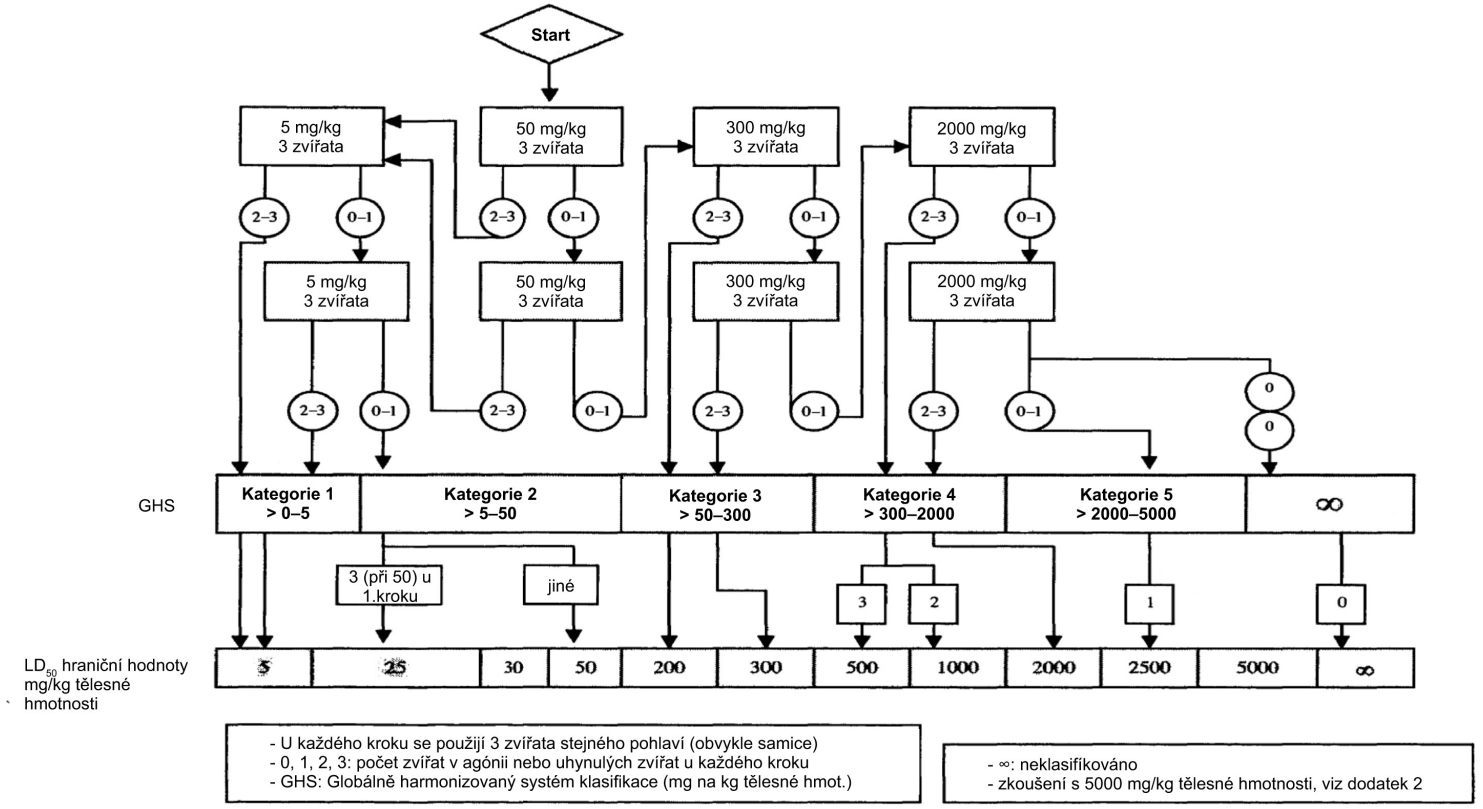
Dodatek 1A

POSTUP ZKOUŠENÍ S VÝCHOZÍ DÁVKOU 5 MG NA KG TĚLESNÉ HMOTNOSTI



Dodatek 1B

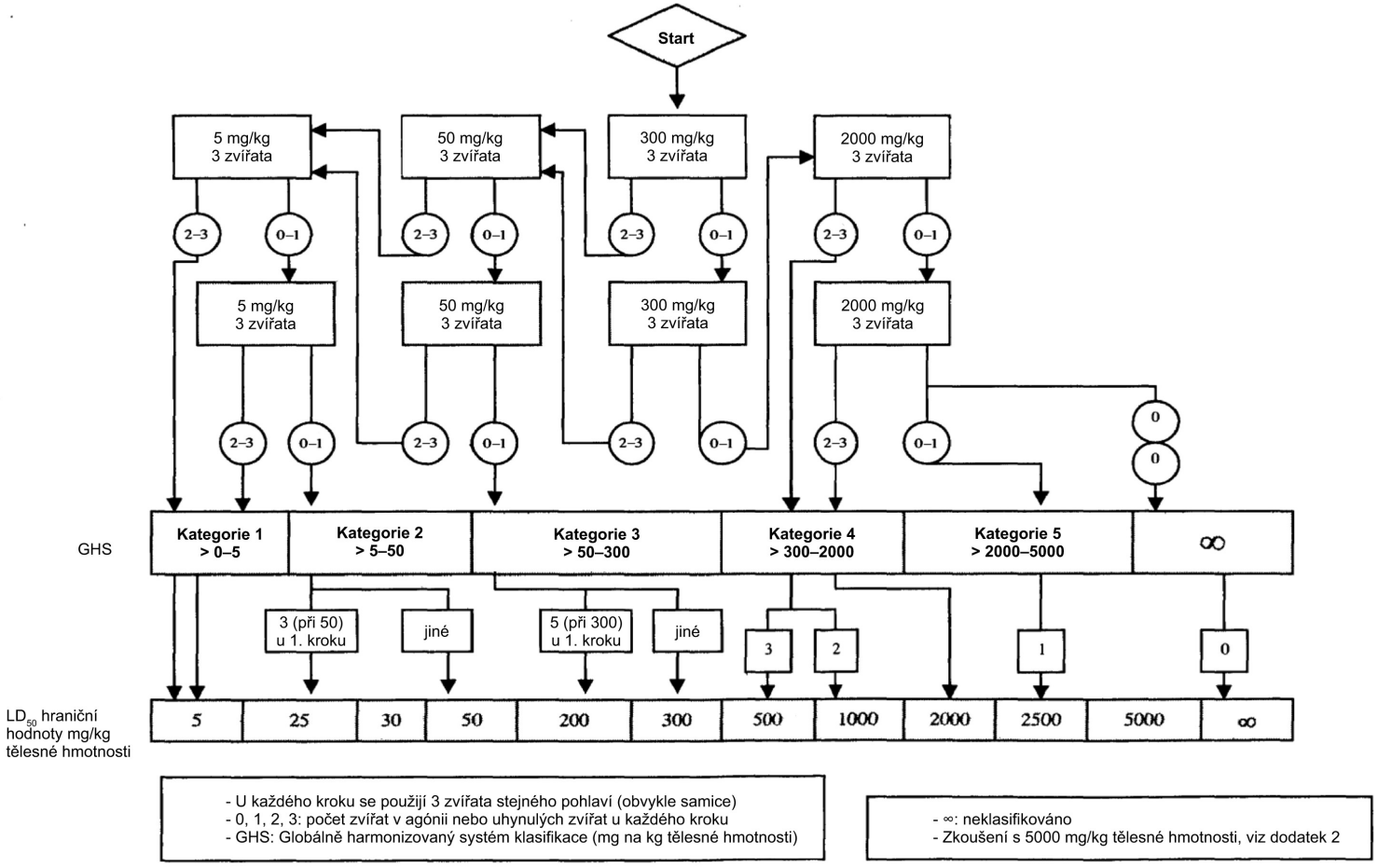
POSTUP ZKOUŠENÍ S VÝCHOZÍ DÁVKOU 50 MG NA KG TĚLESNÉ HMOTNOSTI



02008R0440 — CS — 16.10.2019 — 008.001 — 227

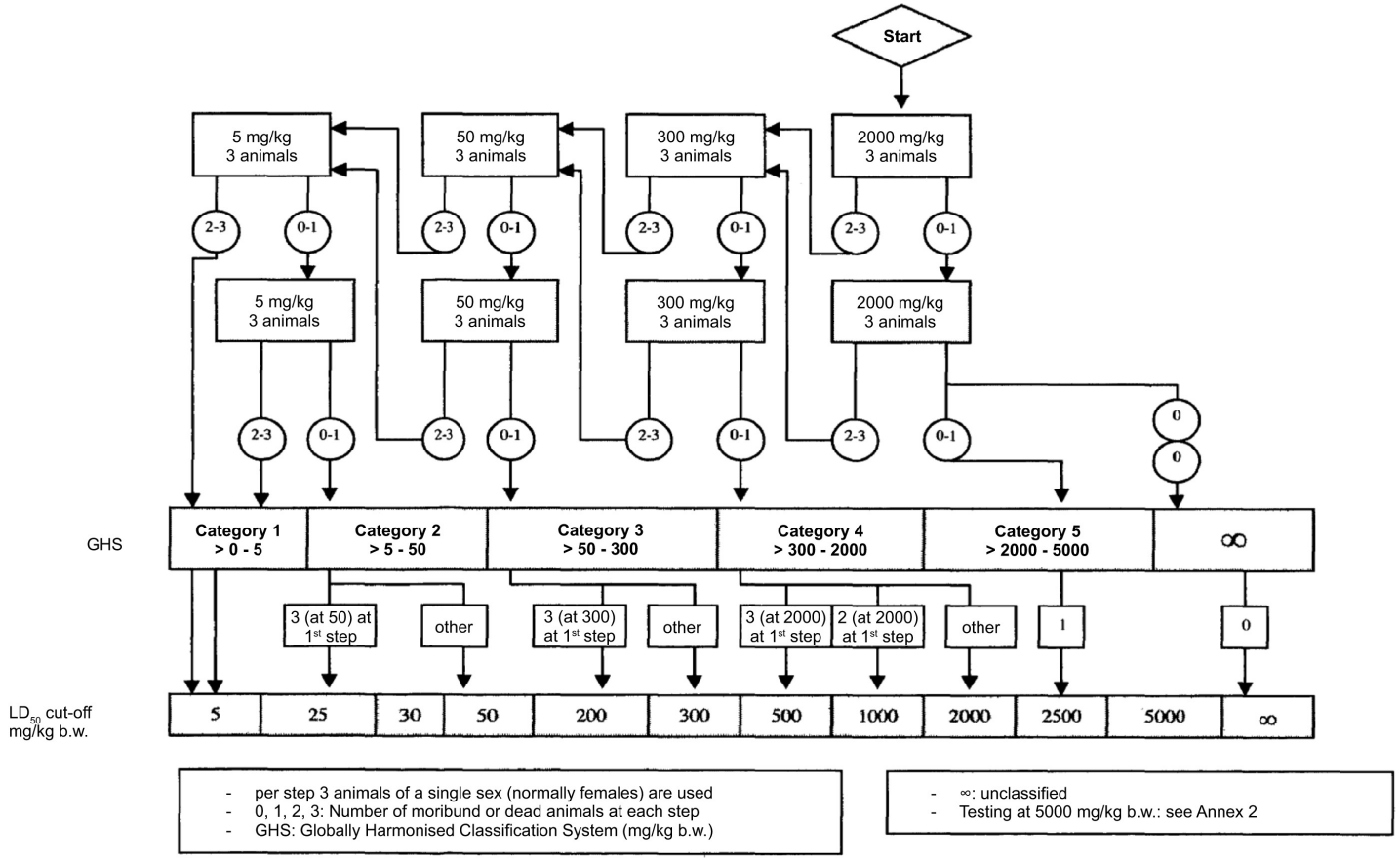
Dodatek 1C

POSTUP ZKOUŠENÍ S VÝCHOZÍ DÁVKOU 300 MG NA KG TĚLESNÉ HMOTNOSTI



Dodatek 1D

POSTUP ZKOUŠENÍ S VÝCHOZÍ DÁVKOU 2 000 MG NA KG TĚLESNÉ HMOTNOSTI



▼B

DODATEK 2

KRITÉRIA KLASIFIKACE ZKOUŠENÝCH LÁTEK S OČEKÁVANÝMI HODNOTAMI LD_{50} PŘESAHUJÍCÍMI 2 000 MG/KG BEZ NUTNOSTI ZKOUŠENÍ

Kritéria pro kategorii nebezpečnosti 5 mají umožnit identifikaci zkoušených látek, u nichž je nebezpečí akutní toxicity relativně nízké, avšak které mohou za určitých okolností pro citlivé jedince představovat nebezpečí. U těchto látek se předpokládá, že se jejich orální nebo dermální LD_{50} nebo LD_{50} ekvivalentních dávek podávaných jinými cestami pohybuje v rozmezí od 2 000 do 5 000 mg/kg. Zkoušenou látku lze klasifikovat v kategorii nebezpečnosti definované jako 2 000 mg/kg < LD_{50} < 5 000 mg/kg v těchto případech (v GHS kategorie 5):

a) pokud je do této kategorie zařazena podle některého ze systémů zkoušení uvedeného v příloze 1a–1d, v závislosti na výskytech uhynutí;

b) pokud jsou již k dispozici spolehlivé důkazy naznačující, že LD_{50} se pohybuje v rozmezí hodnot kategorie 5, nebo pokud z jiných studií na zvířatech nebo toxických účinků na člověka vyplývají akutní obavy o lidské zdraví;

c) pokud extrapolací, odhadem nebo měřením údajů není přiřazení do vyšší třídy nebezpečnosti odůvodněno a

   — pokud jsou k dispozici spolehlivé informace naznačující závažné toxické účinky na člověka, nebo

   — pokud je během zkoušení orální cestou do hodnot kategorie 4 pozorováno uhynutí, nebo

   — v případech, kdy odborný posudek potvrdí závažné klinické příznaky toxicity při testování do hodnot kategorie 4 s výjimkou průjmu, zježení srsti nebo rozcuchané srsti, nebo

   — v případech, kdy odborný posudek potvrdí spolehlivé informace, které naznačují možnost závažných akutních účinků vyplývajících z jiných studií na zvířatech.

ZKOUŠENÍ V DÁVKÁCH PŘESAHUJÍCÍCH 2 000 MG/KG

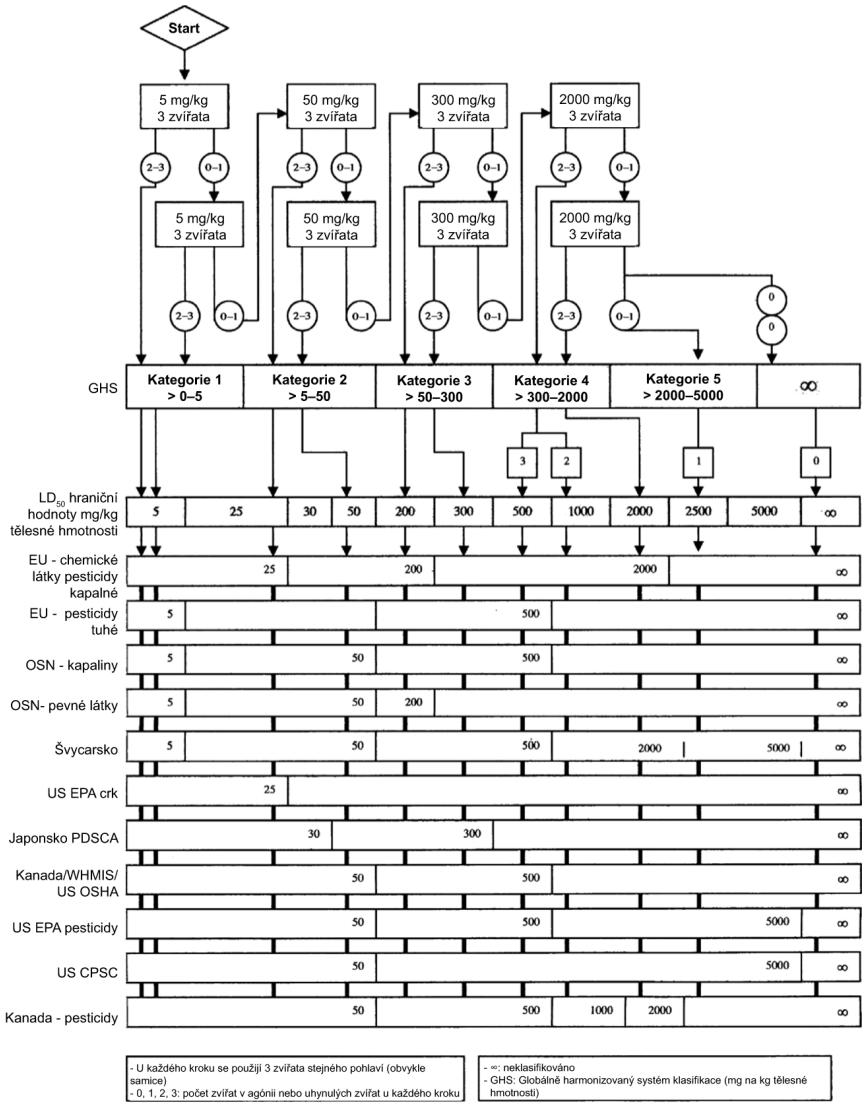
S ohledem na nutnost dodržování zásady dobrého zacházení se zvířaty se zkoušení na zvířatech v kategorii 5 (5 000 mg/kg) nedoporučuje a mělo by se zvažovat pouze v případě, že existuje velká pravděpodobnost, že výsledky takové zkoušky mají přímý význam pro ochranu lidského zdraví nebo zdraví zvířat (10). S vyššími úrovněmi dávek se žádné další zkoušky neprovedou.

Pokud je vyžadováno zkoušení s dávkou 5 000 mg/kg, vyžaduje se pouze jeden krok (tj. tři zvířata). Pokud první zvíře, jemuž byla podána dávka, uhyne, pokračuje podávání s úrovní 2 000 mg/kg podle vývojového diagramu v příloze 1. Pokud první zvíře přežije, podá se dávka dalším dvěma zvířatům. Pokud uhyne pouze jedno zvíře ze tří, očekává se, že hodnota LD_{50} přesáhne 5 000 mg/kg. Pokud uhynou obě zvířata, pokračuje se podáním dávky 2 000 mg/kg.

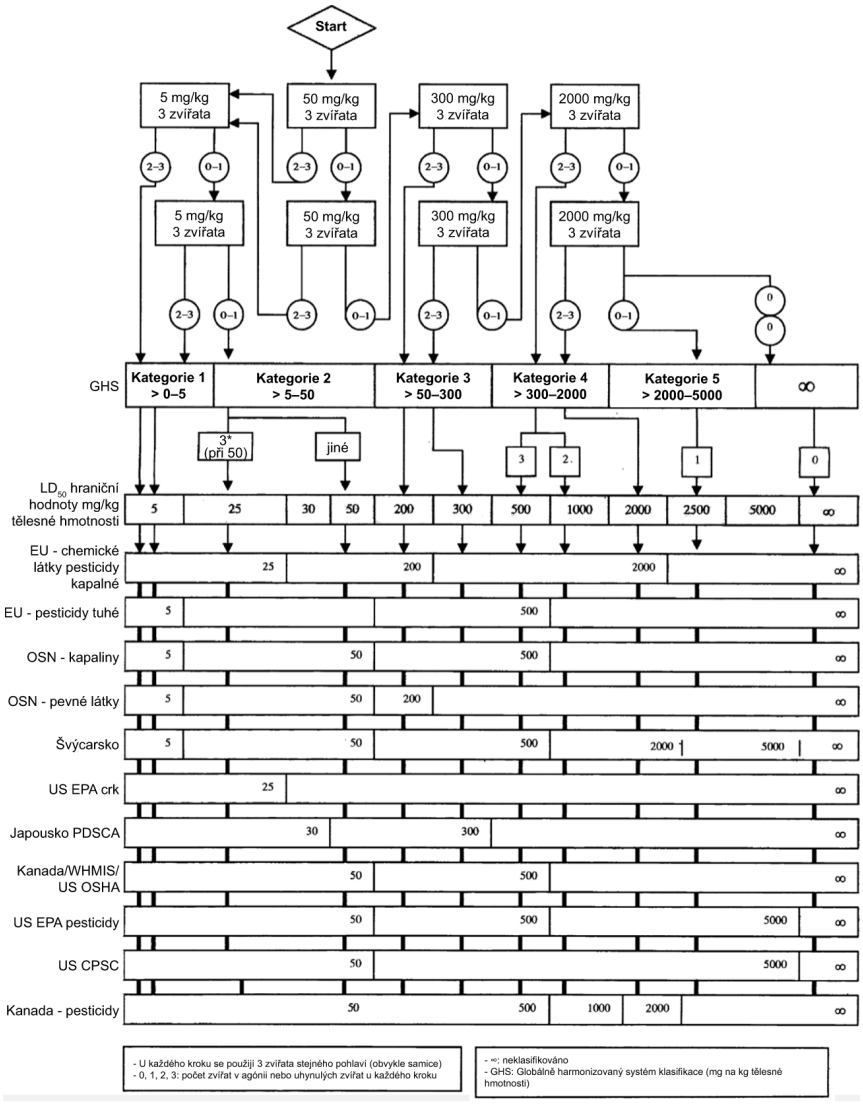
▼B

DODATEK 3

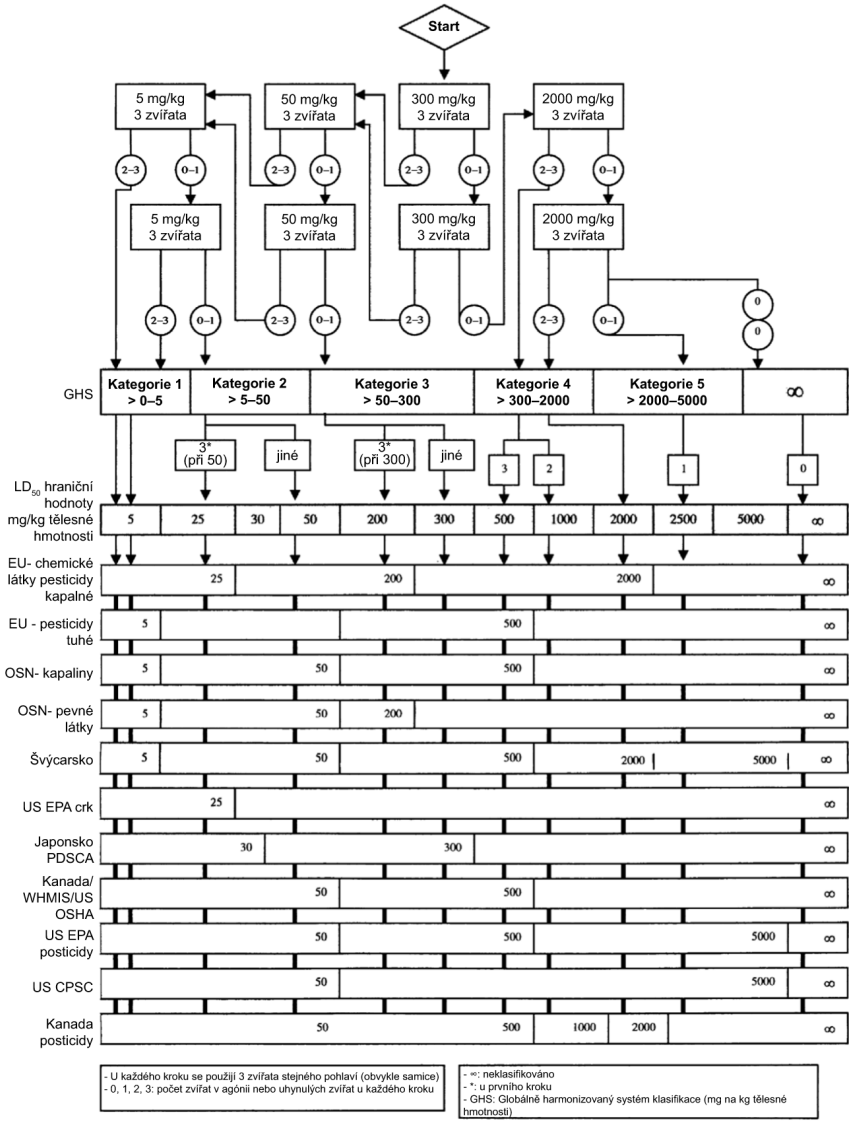
METODA ZKOUŠENÍ B.1.b: Pokyny ke klasifikaci podle systému EU pro přechodné období do plného zavedení globálně harmonizovaného systému klasifikace (GHS) (převzato z literatury (8))



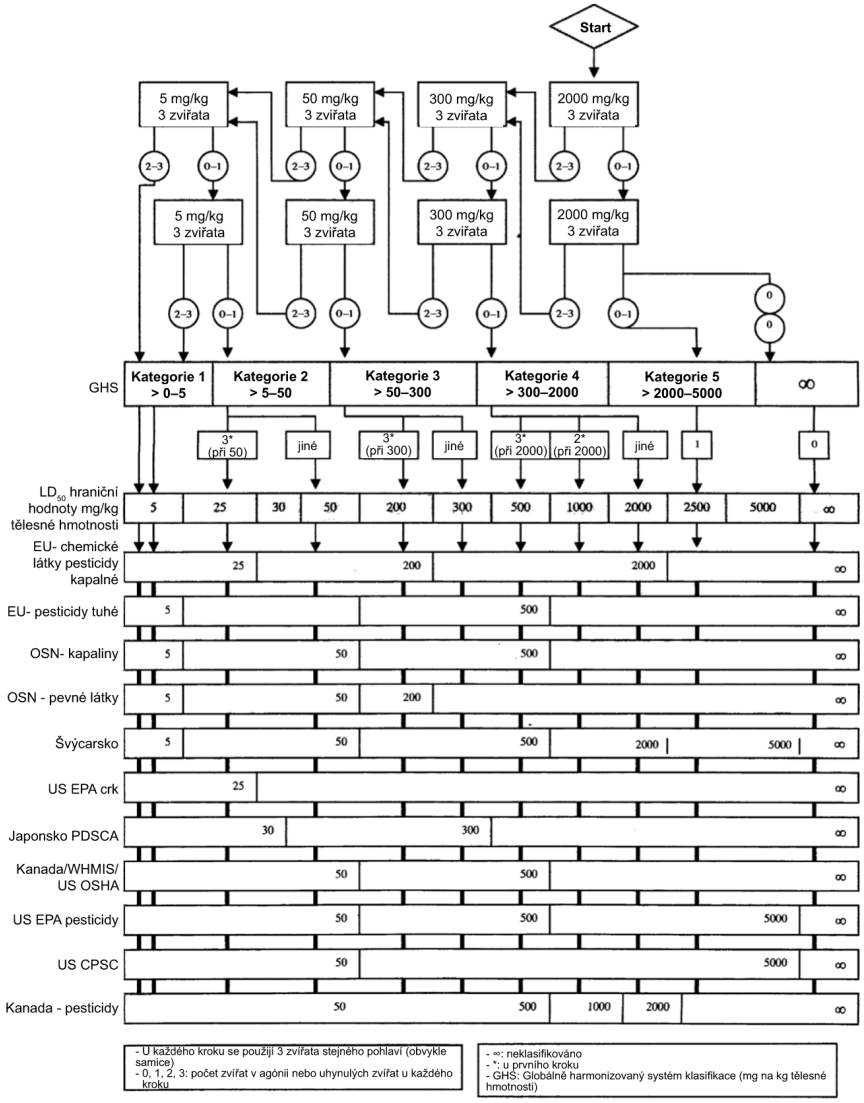
▼B


Start
5 mg/kg 3 zvířata
50 mg/kg 3 zvířata
300 mg/kg 3 zvířata
2000 mg/kg 3 zvířata
2–3
0–1
0
GHS
Kategorie 1 > 0–5
Kategorie 2 > 5–50
Kategorie 3 > 50–300
Kategorie 4 > 300–2000
Kategorie 5 > 2000–5000
∞
3* (při 50)
jiné
3
2
1
0
LD50 hraniční hodnoty mg/kg tělesné hmotnosti
5
25
30
50
200
300
500
1000
2000
2500
5000
EU - chemické látky pesticidy kapalné
EU - pesticidy tuhé
OSN - kapaliny
OSN - pevné látky
Švýcarsko
US EPA crk
Japousko PDSCA
Kanada/WHMIS/ US OSHA
US EPA pesticidy
US CPSC
Kanada - pesticidy
- U každého kroku se použiji 3 zvířata stejného pohlaví (obvykle samice)
- 0, 1, 2, 3: počet zvířat v agónii nebo uhynulých zvířat u každého kroku
- ∞: neklasifikováno
- GHS: Globálně harmonizovaný systém klasifikace (mg na kg tělesné hmotnosti)

▼B


Start
5 mg/kg 3 zvířata
50 mg/kg 3 zvířata
300 mg/kg 3 zvířata
2000 mg/kg 3 zvířata
2–3
0–1
0
GHS
Kategorie 1 > 0–5
Kategorie 2 > 5–50
Kategorie 3 > 50–300
Kategorie 4 > 300–2000
Kategorie 5 > 2000–5000
∞
3* (při 50)
jiné
3* (při 300)
jiné
3
2
1
0
LD50 hraniční hodnoty mg/kg tělesné hmotnosti
5 25 30 50 200 300 500 1000 2000 2500 5000 ∞
EU- chemické látky pesticidy kapalné
EU - pesticidy tuhé
OSN- kapaliny
OSN- pevné látky
Švýcarsko
US EPA crk
Japonsko PDSCA
Kanada/ WHMIS/US OSHA
US EPA posticidy
US CPSC
Kanada posticidy
- U každého kroku se použijí 3 zvířata stejného pohlaví (obvykle samice)
- 0, 1, 2, 3: počet zvířat v agónii nebo uhynulých zvířat u každého kroku
- ∞: neklasifikováno
- *: u prvního kroku
- GHS: Globálně harmonizovaný systém klasifikace (mg na kg tělesné hmotnosti)

▼B


Start
5 mg/kg 3 zvířata
50 mg/kg 3 zvířata
300 mg/kg 3 zvířata
2000 mg/kg 3 zvířata
2–3
0–1
0
GHS
Kategorie 1 > 0–5
Kategorie 2 > 5–50
Kategorie 3 > 50–300
Kategorie 4 > 300–2000
Kategorie 5 > 2000–5000
∞
3* (při 50)
jiné
3* (při 300)
3* (při 2000)
2* (při 2000)
1
LD50 hraniční hodnoty mg/kg tělesné hmotnosti
5 25 30 50 200 300 500 1000 2000 2500 5000 ∞
EU- chemické látky pesticidy kapalné
EU- pesticidy tuhé
OSN- kapaliny
OSN - pevné látky
Švýcarsko
US EPA crk
Japonsko PDSCA
Kanada/WHMIS/ US OSHA
US EPA pesticidy
US CPSC
Kanada - pesticidy
- U každého kroku se použijí 3 zvířata stejného pohlaví (obvykle samice)
- 0, 1, 2, 3: počet zvířat v agónii nebo uhynulých zvířat u každého kroku
- ∞: neklasifikováno
- *: u prvního kroku
- GHS: Globálně harmonizovaný systém klasifikace (mg na kg tělesné hmotnosti)

▼M4

B.2 AKUTNÍ INHALAČNÍ TOXICITA

ÚVOD

1. Tato zkušební metoda odpovídá Pokynům OECD pro zkoušení (TG) 403 (2009) (1). Původní Pokyny pro zkoušení 403 (TG 403) akutní inhalační toxicity byly schváleny v roce 1981. Revidovaná verze zkušební metody B.2 (odpovídá revidované verzi TG 403) popisovaná v této kapitole byla navržena tak, aby byla flexibilnější, omezila použití zvířat a splňovala regulační potřeby. Revidovaná verze zkušební metody uvádí dva typy studií: tradiční protokol LC_{50} a protokol koncentrace krát čas (C × t). Hlavními vlastnostmi této zkušební metody jsou schopnost poskytnout vztah mezi koncentrací a odezvou v rozmezí od neletálních až po letální výsledky, který umožňuje odvodit medián letální koncentrace (LC_{50}), prahovou hodnotu neletální koncentrace (např. LC01) a směrnici a určit možnou citlivost pohlaví. Protokol C × t by se měl použít v případě specifické regulační nebo vědecké potřeby, která vyžaduje zkoušky na zvířatech po několik časových období, např. pro účely plánování reakcí na nouzové situace [např. odvození hodnot směrodatných úrovní akutní expozice (AEGL), pokynů pro plánování reakce na nouzové situace (ERPG;) nebo prahových úrovní akutní expozice (AETL) nebo pro plánování využití půdy.

2. Pokyny k provádění a interpretaci studií používajících tuto zkušební metodu naleznete v Pokynech k zkouškám akutní inhalační toxicity (GD 39) (2).

3. Definice použité v kontextu této zkušební metody naleznete na konci této kapitoly a v GD 39 (2).

4. Tato zkušební metoda umožňuje chemickou charakterizaci a kvantitativní posouzení rizik a umožňuje rozdělit a klasifikovat zkoušené chemické látky podle nařízení (ES) č. 1272/2008 (3). Dokument GD 39 (2) uvádí pokyny pro výběr vhodné zkušební metody pro akutní zkoušky. Požadují-li se pouze informace o klasifikaci a označení, doporučuje se obvykle kapitola B.52 této přílohy (4) [viz GD 39 (2)]. Zkušební metoda B.2 není výslovně určena pro zkoušky speciálních materiálů, jako jsou špatně rozpustné kompozitní vláknové nebo izometrické částicové materiály či průmyslově vyráběné nanomateriály.

VÝCHOZÍ ÚVAHY

5. Zkušební laboratoř by měla dříve, než začne uvažovat o provedení zkoušek v souladu s touto zkušební metodou, vzít v úvahu veškeré dostupné informace o zkoušené chemické látce, včetně stávajících studií (např. kapitola B.52 této přílohy (4)), jejichž výsledky by podpořily neprovádění dalších zkoušek, aby se minimalizovalo použití zvířat. Při výběru nejvhodnějších druhů, kmenů, pohlaví, způsobu expozice a vhodných zkušebních koncentrací mohou pomoci informace o identitě, chemické struktuře a fyzikálně-chemických vlastnostech zkoušené chemické látky, výsledcích jakýchkoli testů toxicity *in vitro* nebo *in vivo*, předpokládaných použitích a potenciální expozici u člověka, jakož i dostupné údaje (Q)SAR a toxikologické údaje o strukturně příbuzných látkách [viz GD 39 (2)].

▼M4

6. Zkouškám žíravých a/nebo dráždivých chemických látek při koncentracích, které podle očekávání způsobí intenzivní bolest a/nebo utrpení, by se mělo v co možná nejvyšší míře zabránit. Potenciál žíravosti/dráždivosti by se měl vyhodnotit na základě odborného posouzení informací získaných na základě zkušeností s účinky na člověka a zvířata (např. údaje ze studií s opakovanou dávkou provedených při nežíravých/dráždivých koncentracích), stávající údaje *in vitro* (např. z kapitol B.40, (5), B.40 BIS (6) této přílohy nebo OECD TG 435 (7)), hodnoty pH, informace o podobných látkách nebo jakékoli další relevantní údaje, za účelem prozkoumání, zda je možno od dalších zkoušek upustit. Pro specifické regulační potřeby (např. pro účely plánování reakce na nouzové situace) lze tuto zkušební metodu použít k expozici zvířat těmto materiálům, poněvadž vedoucímu studie nebo vedoucímu výzkumného týmu zajišťuje kontrolu nad výběrem cílových koncentrací. Cílové koncentrace by však neměly vyvolat intenzivní dráždivé/žíravé účinky, zároveň by však měly být dostačující k prodloužení křivky závislosti odezvy na koncentraci k hodnotám, které umožní splnit regulační a vědecký účel této zkoušky. Tyto koncentrace by se měly volit případ od případu a mělo by se poskytnout zdůvodnění zvolené koncentrace [viz GD 39 (2)].

PODSTATA ZKOUŠKY

7. Tato revidovaná zkušební metoda B.2 byla navržena tak, aby umožnila získat dostatečné informace o akutní toxicitě zkoušené chemické látky pro její klasifikaci a poskytovala údaje o letalitě (např. $LC_{50,}$ LC_{01} a směrnici) pro obě pohlaví, které jsou potřebné pro kvantitativní posouzení rizik. Tato zkušební metoda nabízí dva způsoby, jak informace získat. Prvním je tradiční protokol, v němž jsou skupiny zvířat vystaveny mezní koncentraci (limitní zkouška) nebo sérii koncentrací v postupu prováděném po krocích po předem stanovenou dobu, obvykle 4 hodiny. Pro specifické regulační účely mohou být použity i jiné doby trvání expozice. Druhým je protokol ($C \times t$), v němž jsou skupiny zvířat vystaveny jedné koncentraci (mezní koncentrace) nebo sérii několika koncentrací po různě dlouhou dobu.

8. Umírající zvířata nebo zvířata, která zjevně projevují příznaky bolesti nebo značného a přetrvávajícího utrpení, by se měla humánně utratit a při analýze výsledků se hodnotí jako zvířata uhynulá při zkoušce. Kritéria rozhodování o utracení umírajících nebo značně trpících zvířat a pokyny týkající se rozpoznání předvídatelného nebo blížícího se uhynutí jsou předmětem pokynů OECD č. 19 o humánních parametrech (8).

POPIS METODY

Výběr zvířecích druhů

9. Měla by se použít mladá zdravá dospělá zvířata běžně používaných laboratorních plemen. Upřednostňovaným druhem je potkan, a pokud se použijí jiné druhy, mělo by se uvést odůvodnění.

Příprava zvířat

10. Samice musí být nullipary a nesmí být březí. V den expozice by mělo jít o mladé dospělé jedince ve stáří 8 až 12 týdnů a jejich tělesná hmotnost by se u obou pohlaví měla pohybovat v rozmezí ± 20 % průměrné hmotnosti dříve exponovaných zvířat stejného stáří. Zvířata jsou náhodně vybrána a označena pro potřeby individuální identifikace. Zvířata se umístí do klecí nejméně 5 dnů před začátkem studie, aby si mohla zvyknout na laboratorní podmínky. Zvířata by se také měla nechat po krátkou dobu před zahájením zkoušky zvyknout na zkušební zařízení, neboť to sníží stres způsobený novým prostředím.

▼M4

Zvířecí chov

11. Teplota v experimentální místnosti, v níž se zvířata chovají, by měla být 22 ± 3 °C. Relativní vlhkost by se měla ideálně udržovat v rozmezí 30 až 70 %, což nemusí být proveditelné, používá-li se jako nosič voda. Před expozicí a po ní by se měla zvířata držet v klecích rozdělena do skupin podle pohlaví a koncentrace, avšak počet zvířat v jedné kleci by neměl bránit jasnému pozorování každého zvířete a měl by minimalizovat ztráty v důsledku kanibalismu nebo bojů. Jsou-li zvířata vystavena látce pouze nazální cestou, může být nutné je nechat zvyknout si na omezující trubičky. Zkumavky omezující pohyb by neměly zvířatům způsobovat přílišný fyzický, termální nebo imobilizační stres. Omezení může ovlivnit fyziologické cílové parametry, jako je tělesná teplota (hypertermie) a/nebo respirační objem za minutu. Jsou-li k dispozici obecné údaje, které prokazují, že k takovým změnám nedochází ve značné míře, není předběžná adaptace na omezující trubičky nutná. Zvířata, jež jsou vystavena aerosolu celým tělem, by se měla držet během expozice odděleně, aby se zabránilo pronikání zkoušeného aerosolu z jejich těla do srsti ostatních zvířat v kleci. Mohou se používat konvenční a certifikovaná laboratorní krmiva, vyjma období expozice, spolu s neomezeným množstvím pitné vody z vodovodu. Osvětlení by mělo být umělé a mělo by se střídat 12 hodin světla a 12 hodin tmy.

Inhalační komory

12. Při výběru inhalační komory by se měla zvážit povaha zkoušené chemické látky a cíl zkoušky. Upřednostňuje se expozice pouze nazální cestou (přičemž pod pojmem nazální se rozumí i expozice hlavy, nosu nebo tlamy) Expozice pouze nazální cestou se obvykle upřednostňuje ve studiích kapalných nebo pevných aerosolů a par, které mohou kondenzací vytvářet aerosoly. Speciálních cílů studie lze snáze dosáhnout, použije-li se celotělová expozice, avšak tato skutečnost by se měla zdůvodnit ve zprávě o studii. Pro zajištění stability atmosféry v komoře pro celotělovou expozici by neměl celkový objem zaplněný pokusnými zvířaty přesáhnout 5 % objemu komory. Principy techniky expozice pouze nazální cestou a celotělové expozice a jejich konkrétní výhody a nevýhody jsou popsány v dokumentu GD 39 (2).

PODMÍNKY EXPOZICE

Podání koncentrací

13. Expozice pouze nazální cestou mohou u potkanů trvat jakoukoli dobu až po 6 hodin. U myší by expozice pouze nazální cestou neměla obvykle přesáhnout 4 hodiny. Jsou-li nutné studie s delší dobou expozice, mělo by se uvést zdůvodnění [viz GD 39 (2)]. Zvířata vystavená aerosolům v komorách pro celotělovou expozici by se měla držet odděleně, aby se zabránilo pozření zkoušené chemické látky při vzájemné péči o srst s ostatními zvířaty v kleci. Během expozice by se mělo pozastavit krmení zvířat. Během celotělové expozice je možno zvířatům podávat vodu.

14. Zvířata jsou vystavena zkoušené chemické látce ve formě plynu, páry, aerosolu nebo jejich směsi. Skupenství látky, které se má zkoušet, závisí na fyzikálně-chemických vlastnostech zkoušené chemické látky, zvolené koncentraci a/nebo fyzické formě, v níž se bude zkoušená chemická látka s největší pravděpodobností nacházet při manipulaci a používání. Hygroskopické a chemicky reaktivní zkoušené chemické látky by se měly zkoušet v podmínkách suchého vzduchu. Je třeba dbát na to, aby nevznikly explozivní koncentrace.

▼M4

Distribuce velikosti částic

15. U všech aerosolů a par, které mohou kondenzací vytvořit aerosoly by se měla stanovit velikost částic. Aby byla možná expozice všech důležitých částí dýchací soustavy, doporučují se aerosoly s hodnotami hmotnostního mediánu aerodynamických průměrů (MMAD) v rozmezí od 1 do 4 μm a s geometrickou směrodatnou odchylkou (σ_g) v intervalu 1,5 až 3,0 (2) (9) (10). Přestože by se mělo vynaložit dostatečné úsilí k splnění tohoto standardu, není-li to možné, je třeba poskytnout odborný posudek. Například kovové výpary mohou být menší než je tento standard a nabité částice, vlákna a hygroskopické materiály (které ve vlhkém prostředí dýchacích cest nabývají na velikosti) mohou být naopak větší.

Příprava zkoušené chemické látky na nosiči

16. K dosažení vhodné koncentrace a velikosti částic zkoušené chemické látky v ovzduší lze použít nosič. Zpravidla by se měla dávat přednost vodě. Částicový materiál se může zpracovat mechanickými postupy, aby se dosáhlo požadované distribuce velikosti částic, avšak mělo by se zajistit, aby nedošlo k rozkladu nebo přeměně zkoušené chemické látky. Pokud lze předpokládat, že by mechanické postupy mohly změnit chemické složení zkoušené chemické látky (např. intenzivní mletí spojené s třením extrémně zvyšuje teplotu), mělo by se složení zkoušené chemické látky analyticky ověřit. Je třeba dostatečně dbát na to, aby se zkoušená chemická látka nekontaminovala. Nedrolivé zrnité materiály, které jsou záměrně zformulovány tak, aby je nebylo možno vdechnout, není třeba zkoušet. K prokázání skutečnosti, že při manipulaci se zrnitým materiálem nevznikají vdechovatelné částice, by se měla použít zkouška otěru. Pokud při zkoušce otěru vzniknou vdechovatelné částice, měla by se provést zkouška inhalační toxicity.

Kontrolní zvířata

17. Souběžná negativní kontrolní skupina (vystavená pouze vzduchu) není nutná. Používá-li se k vytvoření zkušební atmosféry jiný nosič než voda, měla by se kontrolní skupina s nosičem použít pouze tehdy, nejsou-li k dispozici dřívější údaje o inhalační toxicitě nosiče. Jestliže studie toxicity zkoušené chemické látky formulované na nosiči neodhalí žádnou toxicitu, vyplývá z toho, že nosič je při zkoušené koncentraci netoxický, a kontrola s nosičem tudíž není nutná.

MONITOROVÁNÍ PODMÍNEK EXPOZICE

Proudění vzduchu komorou

18. Proudění vzduchu komorou by se mělo pečlivě řídit, neustále sledovat a zaznamenávat alespoň v hodinových intervalech při každé expozici. Monitorování koncentrace (nebo stability) látky ve zkušební atmosféře je nedílnou součástí měření všech dynamických parametrů a poskytuje nepřímý prostředek k řízení všech důležitých parametrů generování dynamické atmosféry. V komorách určených k expozici pouze nazální cestou by se měl brát zvláštní ohled na to, aby se zamezilo opětovnému vdechování, v případech, kdy proudění vzduchu expozičním systémem není dostačující k zajištění dynamického proudění zkušební chemické atmosféry. Existují předepsané metodiky, které lze použít k prokázání skutečnosti, že za vybraných provozních podmínek nedochází k opětovnému vdechování (2) (11). Koncentrace kyslíku by měla být alespoň 19 % a koncentrace oxidu uhličitého by neměla přesáhnout 1 %. Pokud se předpokládá, že se takový standard nedodrží, měly by se koncentrace kyslíku a oxidu uhličitého měřit.

▼M4

Teplota a relativní vlhkost v komoře

19. Teplota v komoře by se měla udržovat na 22 ± 3 °C. Relativní vlhkost v zóně, kde zvířata dýchají, jak při expozici pouze nazální cestou, tak při celotělové expozici, by se měla sledovat a zaznamenat alespoň třikrát při době expozice až 4 hodiny a každou hodinu při kratších expozicích. Relativní vlhkost by se měla v ideálním případě udržovat v rozmezí 30 až 70 %, ale může se stát, že se nepodaří takovou hodnotu dosáhnout (např. při zkoušení směsí na bázi vody) nebo nebude měřitelná v důsledku interference zkoušené chemické látky se zkušební metodou.

Zkoušená chemická látka: Nominální koncentrace

20. Pokud to je proveditelné, měla by se vypočítat a zaznamenat nominální koncentrace zkoušené chemické látky v expoziční komoře. Nominální koncentrace je hmotnost generované zkoušené chemické látky vydělená celkovým objemem vzduchu procházejícím komorovým systémem. Nominální koncentrace se nepoužívá k charakterizaci expozice zvířat, avšak porovnání nominální koncentrace a skutečné koncentrace je ukazatelem výkonnosti zkušebního systému při generování zkušební atmosféry, a tudíž ji lze použít k odhalení problémů při generování.

Zkoušená chemická látka: Skutečná koncentrace

21. Skutečná koncentrace je koncentrace zkoušené chemické látky v inhalační komoře v zóně, kde zvířata dýchají. Skutečné koncentrace lze změřit specifickými metodami (např. přímý odběr vzorků, adsorpční metody nebo metody založené na chemické reakci a následná analytická charakterizace) nebo nespecifickými metodami, jako je vážková analýza (gravimetrie). Použití gravimetrie je přípustné pouze u práškových aerosolů obsahujících jedinou složku nebo u aerosolů z kapalin s nízkou těkavostí a mělo by se podložit příslušnou specifickou charakterizací zkoušené chemické látky před provedením studie. Koncentraci práškového aerosolu sestávajícího z více složek lze rovněž stanovit gravimetricky. Vyžaduje to však analytické údaje, které prokazují, že složení materiálu ve vzduchu je podobné složení výchozího materiálu. Nejsou-li tyto informace k dispozici, může být nutné provádět během studie v pravidelných intervalech opakovanou analýzu zkoušené chemické látky (ideálně ve formě, v níž se šíří vzduchem). U látek ve formě aerosolu, které se mohou vypařovat nebo sublimovat, by se mělo prokázat, že byly vybranou metodou zachyceny všechny fáze. Ve zprávě o studii by se měly uvést cílové, nominální a skutečné koncentrace, avšak k výpočtu hodnot letální koncentrace ve statistických analýzách se použijí pouze skutečné koncentrace.

22. Měla by se použít pokud možno jedna šarže zkoušené chemické látky a zkoušený vzorek by se měl skladovat za takových podmínek, aby se uchoval čistý, homogenní a stabilní. Před zahájením studie by se měla provést charakterizace zkoušené chemické látky, včetně určení její čistoty a, je-li to technicky proveditelné, identity a množství identifikovaných příměsí a nečistot. Je možné to prokázat mimo jiné těmito údaji: retenční čas a relativní plocha píku, molekulová hmotnost určená hmotnostní spektroskopií nebo plynovou chromatografií nebo jiné odhady. Přestože určení identity zkoušeného vzorku není povinností laboratoře provádějící zkoušku, je vhodné alespoň do jisté míry ověřit popis látky poskytnutý zadavatelem (např. pokud jde o barvu, fyzikální povahu apod.).

23. Expoziční atmosféra by se měla udržovat co nejstálejší a měla by se monitorovat buď nepřetržitě, nebo v pravidelných intervalech v závislosti na analytické metodě. Používá-li se odběr vzorků v pravidelných intervalech, měly by se vzorky atmosféry v komoře odebrat ve čtyřhodinové studii alespoň dvakrát. Není-li to v důsledku omezené rychlosti proudění vzduchu nebo nízké koncentrace možné, může se během celého období expozice odebrat jeden vzorek. Objeví-li se výrazné výkyvy mezi jednotlivými

▼M4

vzorky, měly by se u dalších zkoušených koncentrací použít čtyři vzorky na každou expozici. Koncentrace stanovená v jednotlivých vzorcích atmosféry v komoře by se neměla lišit od průměrné koncentrace o více než ± 10 % u plynů a par či o více než ± 20 % u kapalných nebo pevných aerosolů. Měla by se vypočítat a zaznamenat doba potřebná k dosažení rovnovážného stavu v komoře (t_{95}). Doba expozice zahrnuje i dobu, během níž je zkoušená chemická látka generována, a ta bere v úvahu dobu nutnou k dosažení t_{95}. Pokyny k výpočtu t_{95} jsou uvedeny v dokumentu GD 39 (2).

24. U vysoce komplexních směsí složených z plynů/par a aerosolů (např. atmosféry obsahující produkty spalování a zkoušené chemické látky vystřikované z účelových výrobků/zařízení pro koncové použití) se může každá fáze chovat v inhalační komoře odlišně, proto by se pro každou fázi (plyn/pára a aerosol) měla zvolit alespoň jedna indikační látka (analyt), obvykle hlavní účinná látka ve směsi. Je-li zkoušenou chemickou látkou směs, měla by se uvést i analytická koncentrace směsi, nikoliv pouze účinné látky nebo složky (analytu). Další informace týkající se skutečných koncentrací naleznete v dokumentu GD 39 (2).

Zkoušená chemická látka: Distribuce velikosti částic

25. Distribuce velikosti částic aerosolů by se měla během čtyřhodinové expozice stanovit alespoň dvakrát pomocí kaskádového impaktoru nebo jiného přístroje, např. aerodynamického spektrometru částic. Je-li možno prokázat shodu výsledků získaných pomocí kaskádového impaktoru nebo jiného přístroje, může se tento jiný přístroj používat v průběhu celé studie. Vedle primárního přístroje by se měl použít ještě druhý přístroj, např. gravimetrický filtr nebo impinger/promývačka plynu, k ověření účinnosti záchytu primárním přístrojem. Hmotnostní koncentrace získaná analýzou velikosti částic by měla ležet v přiměřeném rozmezí hmotnostní koncentrace získané vážkovou analýzou [viz dokument GD 39 (2)]. Je-li možné v časné fázi studie prokázat jejich rovnocennost, lze od dalších potvrzujících měření upustit. Z důvodu zajištění dobrých životních podmínek zvířat by se měly podniknout kroky k minimalizaci neprůkazných údajů, které mohou vést k nutnosti opakovat expozici. U par by se mělo provést měření velikosti částic, pokud existuje možnost, že kondenzace páry povede ke vzniku aerosolu nebo pokud jsou v parách detekovány částice s potenciálem pro tvorbu smíšených fází (viz odstavec 15).

POSTUP

26. Níže jsou popsány dva typy studie: tradiční protokol a protokol C × t. Oba protokoly mohou zahrnovat orientační studii, hlavní studii a/nebo limitní zkoušku (tradiční protokol) nebo zkoušku při mezní koncentraci (C × t). Je-li známo, že jedno pohlaví je citlivější, může se vedoucí studie rozhodnout provést tyto studie pouze u citlivého pohlaví. Jsou-li k expozici pouze nazální cestou použity jiné druhy hlodavců než potkani, je možno upravit maximální doby expozice za účelem minimalizace druhově specifického utrpení. Před zahájením zkoušky je třeba zvážit veškeré dostupné údaje, aby se minimalizovalo použití zvířat. Například použitím údajů získaných podle kapitoly B.52 této přílohy (4) je možné se provádění orientační studie vyhnout a může se jimi rovněž prokázat, zda je jedno pohlaví citlivější [viz GD 39 (2)].

▼M4

TRADIČNÍ PROTOKOL

Obecné úvahy: Tradiční protokol

27. V tradiční studii se skupiny zvířat vystaví zkoušené chemické látce po fixně dané časové období (obvykle 4 hodiny) buď v komoře pro expozici pouze nazální cestou nebo v komoře pro celotělovou expozici. Zvířata jsou vystavena buď mezní koncentraci (limitní zkouška) nebo alespoň třem koncentracím v postupných krocích (hlavní studie). Hlavní studii může předcházet studie orientační, pokud již nejsou o zkoušené chemické látce k dispozici nějaké informace, např. údaje z dříve provedené studie B.52 [viz dokument GD 39 (2)].

Orientační studie: Tradiční protokol

28. Orientační studie se používá k odhadu účinnosti zkoušené chemické látky, zjištění rozdílů v citlivosti jednotlivých pohlaví a k výběru úrovně expoziční koncentrace pro hlavní studii nebo limitní zkoušku. Při výběru úrovní koncentrací pro orientační studii by se měly použít veškeré dostupné informace, včetně dostupných údajů (Q)SAR a údajů o podobných chemických látkách. Každé koncentraci by se měli vystavit maximálně tři samci a tři samice (k stanovení rozdílu mezi pohlavími se obvykle používají od každého pohlaví 3 jedinci). Orientační studie může používat pouze jedinou koncentraci, avšak v případě potřeby je možné vyzkoušet více koncentrací. Orientační studie by neměla zkoušet tolik zvířat a koncentrací, aby připomínala hlavní studii. Namísto orientační studie je možné použít dříve provedenou studii B.52 (4) [viz dokument GD 39 (2)].

Limitní zkouška: Tradiční protokol

29. Limitní zkouška se používá v případě, že je o zkoušené chemické látce známo, že je prakticky netoxická, tj. vyvolává toxickou reakci pouze při koncentraci vyšší, než je regulační mezní koncentrace, nebo se to o ní předpokládá. Při limitní zkoušce se vystavuje jedna skupina tří samců a tří samic zkoušené chemické látce o mezní koncentraci. Informace o toxicitě zkoušené chemické látky lze získat ze znalostí o podobných zkoušených chemických látkách, vezme-li se v úvahu identita a procento složek, o nichž se ví, že jsou toxikologicky významné. V situacích, kdy existuje jen málo informací nebo vůbec žádné informace o toxicitě nebo kdy se očekává, že zkoušená chemická látka bude toxická, by se měla provést hlavní zkouška.

30. Volba mezních koncentrací obvykle závisí na regulačních požadavcích. Používá-li se nařízení (ES) č. 1272/2008, činí mezní koncentrace pro plyny 20 000 ppm, pro páry 20 mg/l a pro aerosoly 5 mg/l (nebo maximální dosažitelná koncentrace) (3). Generovat mezní koncentrace některých zkoušených chemických látek může být technicky náročné, zejména ve formě par nebo aerosolů. Při zkoušení aerosolů by mělo být primárním cílem dosažení vdechovatelné velikosti částic (MMAD = 1–4 μm). U většiny zkoušených chemických látek je toho možno dosáhnout při koncentraci 2 mg/l. Zkoušení aerosolů při koncentracích větších než 2 mg/l by se mělo provádět pouze, pokud je možné dosáhnout vdechovatelné velikosti částic [viz dokument GD 39 (2)]. Nařízení (ES) č. 1272/2008 nedoporučuje zkoušky při koncentracích přesahujících mezní koncentraci z důvodů zajištění šetrného zacházení se zvířaty. O mezní koncentraci by se mělo uvažovat pouze v případě, že existuje velká pravděpodobnost, že výsledky takové zkoušky budou mít přímý význam pro ochranu lidského zdraví (3) a že se ve zprávě o studii uvede zdůvodnění. V případě potenciálně výbušných zkoušených chemických látek je třeba zajistit, aby nedošlo k explozi. Aby se zamezilo zbytečnému použití zvířat, měla by se před limitní zkouškou provést jedna zkouška bez zvířat, kterou se zjistí, zda lze v komoře dosáhnout podmínek pro limitní zkoušku.

▼M4

31. Pokud je při mezní koncentraci pozorována mortalita či umírání, mohou výsledky limitní zkoušky sloužit jako orientační studie pro další zkoušky při jiných koncentracích (viz hlavní studie). Jestliže fyzikální nebo chemické vlastnosti zkoušené chemické látky znemožňují dosažení mezní koncentrace, měla by se zkoušet maximální dosažitelná koncentrace. Pokud při maximální dosažitelné koncentraci dojde k letalitě menší než 50 %, nejsou nutné žádné další zkoušky. Nelze-li dosáhnout mezní koncentrace, měly by se ve zprávě o studii uvést vysvětlující a podpůrné údaje. Jestliže maximální dosažitelná koncentrace páry nevyvolává toxicitu, může být zapotřebí generovat zkoušenou chemickou látku ve formě kapalného aerosolu.

Hlavní studie: Tradiční protokol

32. Hlavní studie se obvykle provádí s použitím pěti samců a pěti samic (nebo 5 zvířat citlivého pohlaví, je-li známo) pro každou koncentraci s tím, že se zkouší nejméně tři různé koncentrace. Zvolené koncentrace by měly být dostatečné, aby statistická analýza byla průkazná. Časový interval mezi exponovanými skupinami závisí na době nástupu, trvání a závažnosti příznaků toxicity. S expozicí zvířat další úrovni koncentrace by se mělo vyčkat, dokud není dostatečná jistota, že dříve zkoušená zvířata přežila. To vedoucímu studie umožní upravit cílovou koncentraci pro další exponovanou skupinu. U inhalačních studií to však nemusí být vždy praktické, v důsledku závislosti na sofistikovaných technologiích, a tak by expozice zvířat na další úrovni koncentrace měla vycházet z předchozích zkušeností a vědeckého úsudku. Při zkouškách směsí je třeba nahlédnout do dokumentu GD 39 (2).

PROTOKOL KONCENTRACE × ČAS (C × T)

Obecné úvahy: Protokol C × t

33. Při hodnocení inhalační toxicity se jako alternativa k tradičnímu protokolu může zvážit stupňovaná studie C × t (12) (13) (14). Tento přístup umožňuje vystavit zvířata zkoušené chemické látce na různých úrovních koncentrace a po několik časových období. Zkouška se provádí v komoře pro expozici pouze nazální cestou (celotělové komory nejsou pro tento protokol vhodné). Schéma postupu v dodatku 1 objasňuje tento protokol. Simulační analýzy prokázaly, že tradiční protokol i protokol C × t jsou oba schopny vést k průkazným hodnotám LC_{50}, avšak protokol C × t je obecně lepší pro získání průkazných hodnot LC_{01} a LC_{10} (15).

34. Simulační analýza prokázala, že použití dvou zvířat na každý interval C × t (jedno od každého pohlaví při použití obou pohlaví nebo dva jedinci citlivějšího pohlaví) může být obvykle dostačující při zkoušení 4 koncentrací a 5 dob expozice v hlavní studii. Za určitých okolností se může vedoucí studie rozhodnout použít dva potkany od každého pohlaví na každý interval C × t (15). Použití 2 zvířat od každého pohlaví pro každou koncentraci a časový bod může snížit zkreslení a variabilitu odhadů, zvýšit míru úspěšnosti odhadu a zlepšit pokrytí intervalu spolehlivosti. Nicméně v případě, kdy jsou údaje pro odhad nedostatečné (při použití jednoho zvířete od každého pohlaví nebo dvou zvířat citlivějšího pohlaví) může stačit rovněž 5. expoziční koncentrace. Další pokyny ohledně počtu zvířat a koncentrací, které se mají použít ve studii C × t, naleznete v dokumentu GD 39 (2).

▼M4

Orientační studie: Protokol C × t

35. Orientační studie se používá k odhadu účinnosti zkoušené chemické látky a k pomoci při výběru úrovní expoziční koncentrace pro hlavní studii. K výběru vhodné výchozí koncentrace pro hlavní studii a k minimalizaci počtu použitých zvířat může být zapotřebí provést orientační studii s použitím až tří zvířat/pohlaví/koncentrací [podrobnosti viz dodatek III dokumentu GD 39 (2)]. K stanovení rozdílu mezi pohlavími může být třeba použití tří zvířat od každého pohlaví. Tato zvířata by se měla vystavit látce po jedinou dobu trvání, obvykle 240 min. Schopnost generovat příslušnou zkušební atmosféru by se měla posoudit během předběžných technických zkoušek bez zvířat. Jsou-li k dispozici údaje o mortalitě ze studie B.52, není obvykle nutné provádět orientační studii. Při výběru první cílové koncentrace ve studii B.2 by měl vedoucí studie vzít v úvahu vzorce mortality pozorované v dostupných studiích B.52 (4) u obou pohlaví a při všech zkoušených koncentracích [viz dokument GD 39 (2)].

Počáteční koncentrace: Protokol C × t

36. Počáteční koncentrace (expoziční cyklus I) (dodatek 1) bude buď mezní koncentrace, nebo koncentrace zvolená vedoucím studie na základě orientační studie. Skupiny s jedním zvířetem od každého pohlaví jsou vystaveny této koncentraci po různě dlouhou dobu (např. 15, 30, 60, 120, nebo 240 minut), takže celkový počet zvířat je 10 (tomu se říká expoziční cyklus I) (dodatek 1).

37. Volba mezních koncentrací obvykle závisí na regulačních požadavcích. Používá-li se nařízení (ES) č. 1272/2008, činí mezní koncentrace pro plyny 20 000 ppm, pro páry 20 mg/l a pro aerosoly 5 mg/l (nebo maximální dosažitelná koncentrace) (3). Generovat mezní koncentrace některých zkoušených chemických látek může být technicky náročné, zejména ve formě par nebo aerosolů. Při zkoušení aerosolů by mělo být cílem dosažení vdechovatelné velikosti částic (tj. MMAD = 1–4 μm) při mezní koncentraci 2 mg/l. Toho je možné dosáhnout u většiny zkoušených chemických látek. Zkoušení aerosolů při koncentracích větších než 2 mg/l by se mělo provádět pouze, pokud je možné dosáhnout vdechovatelné velikosti částic [viz dokument GD 39 (2)]. Nařízení (ES) č. 1272/2008 odrazuje od zkoušek při koncentracích přesahujících mezní koncentraci z důvodů zajištění dobrých životních podmínek zvířat. O zkoušce při koncentraci převyšující mezní koncentraci by se mělo uvažovat pouze v případě, že existuje velká pravděpodobnost, že výsledky takové zkoušky budou mít přímý význam pro ochranu lidského zdraví (3) a že se ve zprávě o studii uvede zdůvodnění. V případě potenciálně výbušných zkoušených chemických látek je třeba dbát na to, aby nedošlo k explozi. Aby se zamezilo zbytečnému použití zvířat, měla by se před zkouškou při počáteční koncentraci provést jedna zkouška bez zvířat, aby se zajistilo, že lze v komoře dosáhnout podmínek pro tuto koncentraci.

38. Pokud se při počáteční koncentraci pozoruje mortalita či agonie, mohou výsledky při této koncentraci sloužit jako výchozí bod pro další zkoušky při jiných koncentracích (viz hlavní studie). Jestliže fyzikální nebo chemické vlastnosti zkoušené chemické látky znemožňují dosažení mezní koncentrace, měla by se testovat maximální dosažitelná koncentrace. Pokud při maximální dosažitelné koncentraci dojde k letalitě menší než 50 %, nejsou nutné žádné další zkoušky. Nelze-li dosáhnout mezní koncentrace, měly by se ve zprávě o studii uvést vysvětlující a podpůrné údaje. Jestliže maximální dosažitelná koncentrace páry nemá toxické účinky, může být zapotřebí generovat zkoušenou chemickou látku ve formě kapalného aerosolu.

▼M4

Hlavní studie: Protokol C × t

39. Počáteční koncentrace (Expoziční cyklus I) (Dodatek 1) zkoušená v hlavní studii bude buď mezní koncentrace, nebo koncentrace zvolená vedoucím studie na základě orientační studie. Jestliže byla během expozičního cyklu I nebo po ní pozorována mortalita, bude minimální expozice (C × t), která vede k mortalitě, použita jako vodítko k určení koncentrace a délek expozice pro expoziční cyklus II. Každý následující expoziční cyklus bude záviset na předcházejícím expozičním cyklu (viz dodatek 1).

40. U mnoha zkoušených chemických látek budou výsledky získané při počáteční koncentraci spolu s třemi dalšími expozičními cykly se souřadnicovou sítí o menším časovém kroku (tj. geometrické odstupňování dob expozice určené násobkem, jímž se liší po sobě jdoucí periody, obvykle √2) dostačující k stanovení vztahu mezi C × t a mortalitou (15), avšak může být užitečné použít i 5. expoziční koncentraci [viz dodatek 1 a dokument GD 39 (2)]. Matematické zpracování výsledků protokolu C × t naleznete v dodatku 1.

POZOROVÁNÍ

41. Během období expozice by se měla zvířata často klinicky sledovat. Po expozici by se měla provést klinická pozorování alespoň dvakrát v den expozice nebo častěji, pokud to naznačuje reakci zvířat na expozici, a poté alespoň jednou denně po dobu celkem 14 dní. Délka období sledování není stanovená pevně, ale měla by se určit na základě povahy a doby nástupu klinických příznaků a délky období zotavení. Doba, kdy se příznaky toxicity objeví a vymizí, je důležitá zejména v případě tendence ke zpožděným příznakům toxicity. Veškerá pozorování se systematicky zaznamenávají, přičemž záznamy se vedou pro každé zvíře jednotlivě. Umírající zvířata a zvířata se známkami prudkých bolestí nebo s přetrvávajícími příznaky značného utrpení by se měla humánně utratit z důvodu zajištění dobrých životních podmínek zvířat. Při vyšetřování klinických příznaků toxicity je třeba dbát na to, aby se počáteční špatný stav a přechodné respirační změny v důsledku postupu expozice neinterpretovaly mylně jako toxicita spojená se zkoušenou chemickou látkou, která by vyžadovala předčasné utracení zvířat. Měly by se vzít v úvahu principy a kritéria shrnuté v pokynech o humánních parametrech (GD 19) (7). Pokud jsou zvířata z humánních důvodů utracena nebo je zjištěn jejich úhyn, je nutné dobu uhynutí zaznamenat co nejpřesněji.

42. Pozorování v kleci se soustřeďují na změny na kůži, na srsti, na očích, na sliznicích a rovněž změny dýchání, krevního oběhu, změny funkce autonomní a centrální nervové soustavy, somatomotorické aktivity a chování. Je-li to možné, měly by se zaznamenat jakékoli rozdíly mezi místními a systémovými účinky. Pozornost je třeba věnovat třesu, křečím, slinění, průjmu, letargii, spánku a kómatu. Měření rektální teploty může poskytnout podpůrné důkazy pro reflexní bradypnoe nebo hypo/hypertermii spojenou s expozicí nebo držením v kleci.

Tělesné hmotnosti

43. Hmotnosti jednotlivých zvířat by se měly zaznamenat jednou během období aklimatizace, v den expozice před expozicí (den 0), a minimálně v den 1, 3 a 7 (a poté jednou týdně) a v době uhynutí nebo utracení, pokud k němu dojde po dni 1. Tělesná hmotnost je uznávána jako zásadní ukazatel toxicity, a proto by se měla zvířata vykazující přetrvávající úbytek hmotnosti ≥ 20 % v porovnání s hodnotami před studií pečlivě sledovat. Na konci období po expozici se zvířata, která přežila, zváží a humánně utratí.

▼M4

Patologie

44. Všechna pokusná zvířata, včetně těch, která v průběhu zkoušky uhynula nebo byla utracena z důvodu zajištění dobrého zacházení se zvířaty, by se měla podrobit pitvě. Není-li možné pitvu provést ihned po objevení uhynulého zvířete, mělo by se zvíře uchovávat v chladicím boxu (nikoli zmrazené) při teplotách dostatečně nízkých k minimalizaci autolýzy. Pitvy by se měly provést co možná nejdříve, obvykle během jednoho nebo dvou dnů. U každého zvířete by se měly zaznamenat všechny makroskopické patologické nálezy, přičemž se věnuje zvláštní pozornost jakýmkoli nálezům v dýchacích cestách.

45. Je možné zvážit další vyšetření zahrnutá a priori v návrhu za účelem zvětšení interpretační hodnoty studie, např. měření hmotnosti plic přeživších potkanů a/nebo poskytnutí důkazů o podráždění pomocí mikroskopického vyšetření dýchacích cest. Mezi vyšetřované orgány mohou patřit také ty, které vykazují makroskopické patologické známky u zvířat přežívajících po 24 či více hodin a orgány, o nichž je známo nebo se očekává, že budou postiženy. Mikroskopické vyšetření celých dýchacích cest může poskytnout užitečné informace u zkoušených chemických látek, které reagují s vodou, například u kyselin a hygroskopických zkoušených látek.

ÚDAJE A JEJICH PŘEDKLÁDÁNÍ

Údaje

46. Měly by se uvést údaje o tělesné hmotnosti a pitevních nálezech pro každé jednotlivé zvíře. Údaje z klinického sledování by se měly shrnout do tabulky, přičemž se u každé zkušební skupiny uvede počet použitých zvířat, počet zvířat vykazujících příznaky toxicity, počet zvířat uhynulých v průběhu zkoušky nebo utracených z humánních důvodů, doba uhynutí jednotlivých zvířat, popis, časový průběh a vratnost toxických účinků a pitevní nálezy.

Protokol o zkoušce

47. Protokol o zkoušce by měl obsahovat následující informace:

Pokusná zvířata a podmínky chovu

— popis podmínek v klecích uvádějící: počet (nebo změnu počtu) zvířat v každé kleci, materiál podestýlky, teplotu a relativní vlhkost prostředí, světelné období a druh stravy,

— použitý druh/kmen a odůvodnění použití jiného druhu než potkan,

— počet, stáří a pohlaví zvířat,

— metoda randomizace,

— podrobné údaje o kvalitě krmení a vody (včetně druhu/zdroje stravy, zdroje vody),

— popis jakékoliv přípravy před zkouškou včetně krmení, karantény a léčby onemocnění.

▼M4

Zkoušená chemická látka

— fyzikální povaha, čistota a tam, kde je to podstatné, fyzikálně-chemické vlastnosti (včetně izomerizace),

— identifikační údaje a číslo v registru Chemical Abstract Services (CAS), je-li známo.

Nosič

— zdůvodnění použití nosiče a zdůvodnění výběru nosiče (pokud se nepoužije voda),

— historické nebo současné údaje prokazující, že nosič neovlivňuje výsledek studie.

Inhalační komora

— popis inhalační komory včetně jejích rozměrů a objemu,

— zdroj a popis zařízení použitého pro expozici zvířat a rovněž pro generování atmosféry,

— zařízení pro měření teploty, vlhkosti, velikosti částic a skutečné koncentrace,

— zdroj vzduchu a úprava dodávaného/odsávaného vzduchu a systém použitý pro klimatizaci,

— metody použité ke kalibraci zařízení k zajištění homogenní zkušební atmosféry,

— rozdíl tlaků (kladný nebo záporný),

— počet expozičních otvorů v každé komoře (nazální expozice), umístění zvířat v systému (celotělová expozice),

— homogenita/stabilita zkušební atmosféry v čase,

— umístění teplotních čidel, čidel vlhkosti a odběr vzorků zkušební atmosféry z komory,

— průtokové rychlosti vzduchu, průtoková rychlost vzduchu/expoziční otvor (nazální expozice) nebo množství zvířat/komora (celotělová expozice),

— informace o zařízení použitém k měření kyslíku a oxidu uhličitého, používá-li se,

— doba nutná k dosažení rovnovážného stavu v inhalační komoře (t_{95})

— počet výměn objemu vzduchu za hodinu,

— měřicí přístroje (používají-li se).

Údaje o expozici

— zdůvodnění volby cílové koncentrace v hlavní studii,

— nominální koncentrace (celková hmotnost zkoušené chemické látky generované do inhalační komory vydělená objemem vzduchu prošlým komorou),

— skutečné koncentrace zkoušené chemické látky naměřené v dýchací zóně zvířat. U směsí, které vytvářejí heterogenní fyzikální formy (plyny, páry, aerosoly), je možné analyzovat každou zvlášť,

▼M4

— veškeré koncentrace látky ve vzduchu by se měly uvádět v hmotnostních jednotkách (např. mg/l, mg/m^3, atd.), v závorce je možné uvést také hodnotu v objemových jednotkách (např. ppm, ppb, atd.),

— distribuce velikosti částic, hmotnostní medián aerodynamického průměru (MMAD) a geometrická směrodatná odchylka (σ_g), včetně metod jejich výpočtu. Měly by se uvést jednotlivé analýzy velikosti částic.

Zkušební podmínky

— podrobné údaje o přípravě zkoušené chemické látky včetně postupů použitých k snížení velikosti částic pevných látek nebo k přípravě roztoků zkoušené chemické látky. V případě, kdy mohly mechanické postupy změnit chemické složení zkoušené chemické látky, uveďte také výsledky analýz ověřujících složení zkoušené chemické látky,

— popis (nejlépe včetně nákresu) zařízení použitého ke generování zkušební atmosféry k expozici zvířat zkušební atmosféře,

— podrobné údaje o použité chemické analytické metodě a validaci metody (včetně účinnosti výtěžnosti zkoušené chemické látky ze vzorkovaného média),

— zdůvodnění výběru zkoušených koncentrací.

Výsledky

— tabulka s údaji o teplotě, vlhkosti a průtoku vzduchu v komoře,

— tabulka s údaji o nominální a skutečné koncentraci v komoře,

— tabulka s údaji o velikosti částic včetně údajů o odběru analytických vzorků, distribuce velikosti částic a výpočtů MMAD a σ_g,

— tabulka s údaji o odezvě a úrovni koncentrace u každého zvířete (tj. zvířata vykazující příznaky toxicity včetně mortality, charakter, závažnost, doba nástupu a trvání účinků),

— hmotnosti jednotlivých zvířat ve studii, datum a čas uhynutí, pokud k němu došlo před plánovaným utracením, časový průběh nástupu příznaků toxicity a zda byly vratné u každého zvířete,

— pitevní a histopatologické nálezy pro každé zvíře, pokud jsou k dispozici,

— odhady letality (např. LC_{50}, LD_{01}) včetně 95 % intervalů spolehlivosti a směrnice (pokud ji lze metodou hodnocení získat),

— statistická závislost včetně odhadu exponentu n (protokol C × t). Měl by se uvést název použitého statistického softwaru.

▼M4

Diskuse a interpretace výsledků

— Měl by se klást zvláštní důraz na popis metod použitých ke splnění kritérií této zkušební metody, např. mezní koncentrace nebo velikost částic.

— Je třeba zabývat se vdechovatelností částic s ohledem na celkové nálezy, zejména pokud nebylo možno splnit kritéria pro velikost částic.

— Mělo by se uvést vysvětlení, pokud bylo nutno humánně utratit zvířata trpící bolestí nebo vykazující známky intenzivního a přetrvávajícího utrpení na základě kritérií uvedených v pokynech OECD o humánních parametrech (8).

— Bylo-li ve prospěch této zkušební metody B.2 přerušeno provádění zkoušky podle kapitoly B.52 této přílohy (4), mělo by se uvést zdůvodnění.

— V celkovém hodnocení studie by se měla popsat konzistentnost metod použitých k stanovení nominálních a skutečných koncentrací a vztah mezi aktuální a skutečnou koncentrací.

— Měla by se uvést pravděpodobná příčina úhynu a převládající mechanismus účinku (systémový nebo místní).

LITERATURA:

1) OECD (2009). Acute Inhalation Toxicity Testing. OECD Guideline for Testing of Chemicals No. 403, OECD, Paris. Dostupné na: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

2) OECD (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 39, OECD, Paris. Dostupné na: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

3) Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1272/2008 ze dne 16. prosince 2008 o klasifikaci, označování a balení látek a směsí, o změně a zrušení směrnic 67/548/EHS a 1999/45/ES a o změně nařízení (ES) č. 1907/2006, Úř. věst. L 353, 31.12.2008, s. 1.

4) Kapitola B.52 této přílohy, Akutní inhalační toxicita – metoda stanovení třídy akutní toxicity (ATC).

5) Kapitola B.40 této přílohy, Leptavé účinky na kůži in vitro: Zkouška transkutánního elektrického odporu (TER).

6) Kapitola B.40bis této přílohy, Leptavé účinky na kůži in vitro: Zkouška pomocí modelu lidské kůže.

7) OECD (2005), In Vitro Membrane Barrier Test Method For Skin Corrosion.. OECD Guideline for Testing of Chemicals No. 425, OECD, Paris. Dostupné na: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

8) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs a. s. Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 19, OECD, Paris. Dostupné na: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

9) SOT (1992). Technical Committee of the Inhalation Specialty Section, Society of Toxicology (SOT). Recommendations for the Conduct of Acute Inhalation Limit Tests. Fund. Appl. Toxicol. 18: 321-327.

10) Phalen RF (2009). Inhalation Studies: Foundations and Techniques. (2nd Edition) Informa Healthcare, New York.

▼**M4**

11) Pauluhn J and Thiel A (2007). A Simple Approach to Validation of Directed-Flow Nose-Only Inhalation Chambers. J. Appl. Toxicol. 27: 160-167.

12) Zwart JHE, Arts JM, ten Berge WF, Appelman LM (1992). Alternative Acute Inhalation Toxicity Testing by Determination of the Concentration-Time-Mortality Relationship: Experimental Comparison with Standard LC50 Testing. Reg. Toxicol. Pharmacol. 15: 278-290.

13) Zwart JHE, Arts JM, Klokman-Houweling ED, Schoen ED (1990). Determination of Concentration-Time-Mortality Relationships to Replace LC50 Values. Inhal. Toxicol. 2: 105-117.

14) Ten Berge WF and Zwart A (1989). More Efficient Use of Animals in Acute Inhalation Toxicity Testing. J. Haz. Mat. 21: 65-71.

15) OECD (2009). Performance Assessment: Comparison of 403 and C × t Protocols via Simulation and for Selected Real Data Sets. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 104, OECD, Paris. Dostupné na: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

16) Finney DJ (1977). Probit Analysis, 3rd ed. Cambridge University Press, London/New York.

DEFINICE

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

▼M4

Dodatek 1

Protokol C × t

1. Při hodnocení inhalační toxicity se jako alternativa k tradičnímu protokolu může použít vícestupňová studie C × t (12) (13) (14). Přednostně by se měla provádět v případě, kdy je pro specifické regulační nebo vědecké účely třeba provést zkoušky na zvířatech po několik časových období např. pro účely plánování reakce na nouzové situace nebo plánování využití půdy. Tento postup obvykle začíná zkouškou při mezní koncentraci (expoziční cyklus I), při níž se zvířata vystaví zkoušené chemické látce po pět různě dlouhých časových období (např. 15, 30, 60, 120 a 240 min.), takže se v rámci jediného expozičního cyklu získají údaje z několika různých časových období (viz obrázek 1). Používá-li se nařízení (ES) č. 1272/2008, činí mezní koncentrace pro plyny 20 000 ppm, pro páry 20 mg/l a pro aerosoly 5 mg/l. Tyto úrovně se smí překročit, pouze pokud je pro specifické regulační nebo vědecké účely třeba provést zkoušky na těchto úrovních (viz odstavec 37 v hlavním textu kapitoly B.2).

2. V situacích, kdy je k dispozici pouze málo informací o toxicitě zkoušené chemické látky nebo informace zcela chybí, měla by se provést orientační studie, v níž se obvykle po dobu 240 minut vystaví maximálně 3 zvířata od každého pohlaví cílovým koncentracím, které vybral vedoucí studie.

3. Jestliže se během expozičního cyklu I zkouší mezní koncentrace a je pozorována mortalita menší než 50 %, není třeba provádět žádné další zkoušky. Existuje-li regulační nebo vědecká potřeba stanovit vztah mezi koncentrací/časem/odezvou při vyšších úrovních, než je uvedená mezní koncentrace, měla by se další expozice provést při vyšší úrovni, například při dvojnásobku mezní koncentrace (tj. 2L na obrázku 1).

4. Jestliže je při mezní koncentraci pozorována toxicita, je třeba provést další zkoušky (hlavní studii). Tyto další expozice se provádějí buď při nižších koncentracích (na obrázku 1: expoziční cykly II, III nebo IV), nebo při vyšších koncentracích po kratší časová období (na obrázku 1: expoziční cyklus IV), přičemž tato časová období jsou upravena a není mezi nimi velký časový odstup.

5. Zkouška (počáteční koncentrace a dalších koncentrací) se provádí za použití 1 zvířete od každého pohlaví pro každou koncentraci/časový bod nebo se 2 zvířaty citlivějšího pohlaví pro každou koncentraci/časový bod. Za určitých okolností se může vedoucí studie rozhodnout použít 2 potkany od každého pohlaví pro každou koncentraci/časový bod (nebo 4 zvířata citlivějšího pohlaví pro každou koncentraci/časový bod) (15). Použití 2 zvířat od každého pohlaví pro každou koncentraci/časový bod většinou sníží zkreslení a variabilitu odhadů, zvýší míru úspěšnosti odhadu a zlepší pokrytí intervalu spolehlivosti týkajícího se zde popsaného protokolu. Další podrobnosti jsou uvedeny v dokumentu GD 39 (2).

6. V ideálním případě se každý expoziční cyklus provede během jednoho dne. To dává možnost vyčkat s další expozicí, dokud není dostatečná jistota, že zvířata přežila, a vedoucímu studie to umožňuje upravit cílové koncentrace a doby expozice pro další expoziční cyklus. Doporučuje se zahájit každý expoziční cyklus skupinou, která bude látce vystavena po nejdelší dobu, např. se začne skupinou s 240minutovou expozicí, po ní následuje skupina s 120minutovou expozicí atd. Jestliže například zvířata v 240 minutové skupině po 90 minutách umírají nebo vykazují závažné příznaky toxicity (např. extrémní změny v dechovém vzorci jako třeba namáhavé dýchání), nemělo by smysl vystavovat další skupinu 120 minutové expozici, neboť mortalita by pravděpodobně činila 100 %. Vedoucí studie by měl proto pro takovou koncentraci zvolit kratší dobu expozice (např. 90, 65, 45, 33 a 25 minut).

▼M4

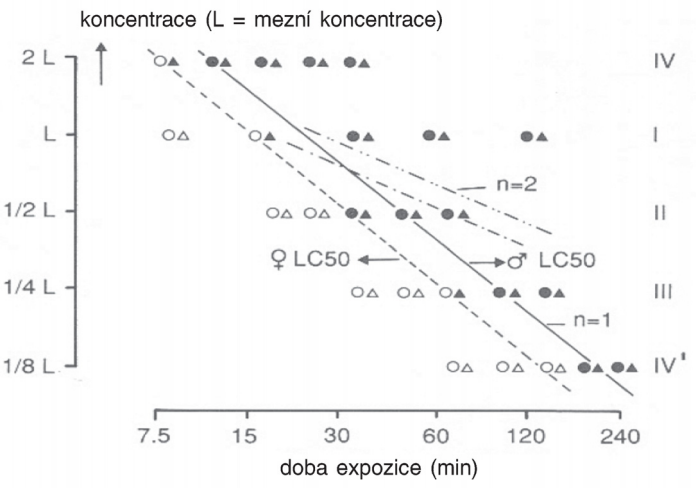
7. Koncentrace látky v komoře by se měla často měřit, aby se stanovil časem vážený průměr koncentrace pro každé trvání expozice. Kdykoli je to možné, měl by se v statistické analýze použít čas uhynutí každého zvířete (místo trvání expozice).

8. Výsledky prvních čtyř expozičních cyklů by se měly přezkoumat, aby se zjistily chybějící údaje na křivce závislosti koncentrace na čase (viz obrázek 1). V případě, že není dostatek údajů, lze provést další expozici (5. koncentrace). Koncentrace a doba expozice pro 5. expozici by se měly zvolit tak, aby pokryly tyto chybějící údaje.

9. Všechny expoziční cykly (včetně prvního expozičního cyklu) se použijí k výpočtu vztahu mezi koncentrací, časem a odezvou pomocí statistické analýzy (16). Je-li to možné, měly by se pro každý interval C × t použít časem vážené průměrné hodnoty koncentrace a doby expozice do uhynutí (dojde-li během expozice k uhynutí).

Obrázek 1

Hypotetické znázornění vztahu mezi koncentrací–časem–mortalitou u potkanů



Prázdné značky = zvířata, která přežila; plné značky = uhynulá zvířata

Trojúhelníčky = samice; kroužky = samci

Plná čára = hodnoty LC_{50} (rozmezí 7,5–240 min) pro samce, pokud n = 1

Přerušovaná čára = hodnoty LC_{50} (rozmezí 7,5–240 min) pro samice, pokud n = 1

Čerchované čáry = hypotetické hodnoty LC_{50} pro samce a samice, pokud n = 2 (12).

Slovníček pojmů

Koncentrace:

Doba expozice:

▼M4

10. Níže je uveden příklad postupu prováděného po krocích:

Expoziční cyklus I – zkouška při mezní koncentraci (viz obrázek 1)

— Jedno zvíře od každého pohlaví pro každou koncentraci / časový bod, celkem deset zvířat ([a])

— Cílová koncentrace ([b]) = mezní koncentrace.

— Vystavte pět skupin zvířat této cílové koncentraci po dobu 15, 30, 60, 120 a 240 minut.

↓

Expoziční cyklus II ([c]) – hlavní studie

— Jedno zvíře od každého pohlaví pro každou koncentraci/časový bod, celkem deset zvířat.

— Pět skupin zvířat vystavte nižší koncentraci ([d]) (1/2L) po dobu expozice o něco delší (koeficient odstupňování √2, viz obrázek 1).

↓

Expoziční cyklus III – hlavní studie

— Jedno zvíře od každého pohlaví pro každou koncentraci/časový bod, celkem deset zvířat.

— Pět skupin zvířat vystavte nižší koncentraci ([d]) (1/4L) po dobu expozice o něco delší (koeficient odstupňování √2, viz obrázek 1).

↓

Expoziční cyklus IV' – hlavní studie

— Jedno zvíře od každého pohlaví pro každou koncentraci/časový bod, celkem deset zvířat.

— Pět skupin zvířat vystavte nižší koncentraci ([d]) (1/8L) po dobu expozice o něco delší (koeficient odstupňování √2, viz obrázek 1).

↓ nebo

([a]) Nejsou-li k dispozici žádné informace o citlivosti jednotlivých pohlaví, použijí se potkani obou pohlaví, *tj.* 1 zvíře od každého pohlaví pro každou koncentraci. Pokud ze stávajících informací vyplývá, nebo pokud vyjde najevo během tohoto expozičního cyklu, že je jedno pohlaví citlivější, použije se během následujících zkoušek deset zvířat citlivějšího pohlaví (dvě zvířata pro každou koncentraci / časový bod) na každé úrovni koncentrace..

([b]) Používá-li se nařízení (ES) č. 1272/2008, činí mezní koncentrace pro plyny 20 000 ppm, pro páry 20 mg/l a pro aerosoly 5 mg/l. V případě očekávané toxicity nebo na základě výsledků orientační studie by se měly zvolit nižší počáteční koncentrace. Pro regulační nebo vědecké účely se mohou použít vyšší koncentrace.

([c]) V ideálním případě by se mělo s expozicí zvířat další úrovni koncentrace vyčkat, dokud není dostatečná jistota, že dříve exponovaná zvířata přežila. To umožní vedoucímu studie upravit cílovou koncentraci a doby expozice pro další expoziční cyklus.

([d]) Minimální dávka (koncentrace × čas), která vedla k mortalitě v průběhu zkoušky při počáteční koncentraci (první expoziční cyklus) se použije jako vodítko pro stanovení další kombinace koncentrace a dob expozice. Koncentrace se obvykle sníží na polovinu (1/2L) a zvířata se vystaví koncentraci v novém časovém rozmezí s kratším krokem s použitím geometrického dělení dob expozice faktorem 1,4 (√2; viz odkaz 11), které je rozloženo kolem doby odpovídající minimální úrovni letální dávky (čas × koncentrace) pozorované během první expozice. Na tomto obrázku (obrázek 1) byla mortalita při expozičním cyklu I poprvé pozorována při 15 minutách; doby expozice během expozičního cyklu II jsou proto rozmístěny okolo 30 minut a činí 15, 21 30, 42 a 60 min. Po prvních dvou expozicích se důrazně doporučuje vynést údaje do grafu podobně jako na výše uvedeném obrázku a zkontrolovat, zda má vztah mezi koncentrací a časem úhel 45 stupňů (n = 1) nebo zda je vztah mezi koncentrací–časem–odezvou méně strmý (např. n = 2) nebo strmější (např. n = 0,8). V posledně jmenovaném případě se důrazně doporučuje upravit příslušným způsobem další koncentrace a doby trvání expozice.

▼M4

Expoziční cyklus IV – hlavní studie

— Jedno zvíře od každého pohlaví pro každou koncentraci/časový bod, celkem deset zvířat.

— Pět skupin zvířat vystavte vyšší koncentraci (e) (2L) po dobu expozice o něco kratší (koeficient odstupňování √2, viz obrázek 1).

Matematické zpracování výsledků protokolu C × t

11. Postupem C × t provedeným se 4 nebo 5 expozičními koncentracemi a pěti různými dobami expozice se získá 20 nebo 25 bodů. Z těchto bodů lze pomocí statistické analýzy vypočítat vztah C × t (16):

Rovnice 1:

$$Probit(P) = b_0 + b_1 ln\ C + b_2 ln\ t$$

kde C = koncentrace, t = doba expozice nebo

Rovnice 2:

$$Odezva = f(C^n t)$$

kde $n = b_1/b_2$.

Pomocí rovnice 1 lze vypočítat hodnotu LC_{50} pro dané časové období (např. 4 hodiny, 1 hodina, 30 minut nebo jakékoli časové období v rozmezí zkoušených časových období) za použití P = 5 (50 % odezva). Haberův zákon však lze použít, pouze pokud n = 1. Hodnotu LC_{01} lze vypočítat za použití P = 2,67.

(e) V určitých případech může být nutné zvýšit koncentraci (2L) v novém časovém rozmezí s ještě kratším krokem s použitím geometrického dělení dob expozice faktorem 1,4 (√2), které je rozloženo kolem doby odpovídající minimální úrovni letální koncentrace pozorované během první expozice. Minimální doba expozice by měla být pokud možno delší než 5 minut, maximální doba expozice by neměla přesáhnout 8 hodin.

▼B

B.3 AKUTNÍ TOXICITA (DERMÁLNÍ)

1. METODA

1.1 ÚVOD

Viz obecný úvod, část B (A).

1.2 DEFINICE

Viz obecný úvod, část B (B).

1.3 REFERENČNÍ LÁTKY

Žádné.

1.4 PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

Zkoušená látka se nanáší na kůži v odstupňovaných dávkách několika skupinám pokusných zvířat, a to každé skupině jedna úroveň dávky. Následně se pozorují a zaznamenávají účinky a případy uhynutí. Zvířata, která v průběhu zkoušky uhynula, i zvířata, která do konce zkoušky přežila, se pitvají.

Je třeba humánně utratit zvířata vykazující závažné a přetrvávající známky utrpení; nesmějí se podávat zkoušené látky, o nichž je známo, že způsobují zřetelnou bolest a utrpení v důsledku žíravých a dráždivých vlastností látky.

1.5 KRITÉRIA JAKOSTI

Nejsou stanovena.

1.6 POPIS METODY

1.6.1 **Příprava**

Nejméně pět dnů před zkouškou jsou zvířata chována v takových podmínkách chovu a krmení, v jakých budou během zkoušky. Před zkouškou se provede náhodný výběr zdravých mladých dospělých zvířat, která se přiřadí do jednotlivých experimentálních skupin. Asi 24 hodin před zahájením zkoušky se zvířatům ostříhá nebo oholí srst na zádech. Při stříhání nebo holení srsti je třeba dbát na to, aby se neporanila kůže, což by mohlo změnit její prostupnost. Pro aplikaci zkoušené látky se připraví nejméně 10 % povrchu těla. Při zkouškách pevných látek, které mohou být podle potřeby rozetřeny na prach, se zkoušená látka dostatečně navlhčí vodou nebo podle potřeby vhodným vehikulem, aby se zajistil dobrý styk s kůží. Při výběru vehikula se bere v úvahu jeho vliv na průnik zkoušené látky kůží. Kapalné zkoušené látky se zpravidla aplikují neředěné.

1.6.2 **Zkušební podmínky**

1.6.2.1 *Pokusná zvířata*

Mohou být použiti dospělí potkani nebo králíci. Lze použít i jiné živočišné druhy, ale jejich použití musí být zdůvodněno. Použijí se běžně používané laboratorní kmeny. Na začátku zkoušky by nemělo rozpětí odchylek hmotností použitých zvířat u obou pohlaví (pro každé pohlaví zvlášť) překročit ± 20 % příslušné střední hodnoty.

▼B

1.6.2.2 *Počet a pohlaví*

Pro každou úroveň dávky se použije nejméně pět zvířat. Mají být stejného pohlaví. Použijí-li se samice, musí být nullipary a nesmí být březí. Jsou-li k dispozici informace, že jedno z pohlaví je výrazně citlivější, použijí se zvířata tohoto pohlaví.

Poznámka: Používají-li se v akutních zkouškách toxicity zvířata vyšších druhů, než jsou hlodavci, měl by se použít menší počet zvířat. Dávky je třeba pečlivě volit a je třeba zajistit, aby nebyla překročena úroveň středně toxických dávek. V takových zkouškách by neměly být podávány letální dávky zkoušené látky.

1.6.2.3 *Úrovně dávek*

Počet úrovní dávek má být dostatečný, nejméně tři, a mají být vhodně odstupňovány, aby vznikly zkušební skupiny se zřetelným rozsahem toxických účinků a mortality. Při rozhodování o úrovních dávek by měly být vzaty v úvahu všechny dráždivé nebo žíravé účinky zkoušené látky. Získaná data by měla být dostatečná pro sestrojení závislosti dávka-odezva, a pokud je to možné, měla by umožnit přijatelné stanovení LD_{50}.

1.6.2.4 *Limitní zkouška*

Lze provést limitní zkoušku s jednou dávkou nejméně 2 000 mg/kg tělesné hmotnosti na skupinách pěti samců a pěti samic, a to za použití výše popsaných postupů. Pokud podaná látka způsobí uhynutí, je třeba uvážit provedení úplné studie.

1.6.2.5 *Doba pozorování*

Doba pozorování by měla být nejméně 14 dní. Doba pozorování by však neměla být stanovena pevně. Měla by být stanovena podle toxických reakcí, jejich rychlosti vývoje a délky fáze zotavení; může tedy být podle potřeby prodloužena. Doba, kdy se příznaky toxicity objeví a vymizí, a doba uhynutí jsou důležité zejména v případě tendence ke zpožděné mortalitě.

1.6.3 **Postup**

Zvířata se chovají jednotlivě v klecích. Zkoušená látka se nanese rovnoměrně na plochu, která činí asi 10 % celkového povrchu těla. V případě vysoce toxických látek může být tato plocha menší; co největší část této plochy by se však měla pokrýt co nejslabší a nejstejnoměrnější vrstvou.

Zkoušená látka se po expoziční dobu 24 hodin udržuje ve styku s kůží pomocí porézního mulového obvazu a nedráždivé náplasti. Zkušební plocha se dále vhodným způsobem překryje, aby se mulový obvaz a zkoušená látka fixovaly a aby zvířata zkoušenou látku nepožila. K zamezení požití látky je možno použít i prostředků pro omezení volnosti pohybu, úplné znehybnění však nelze doporučit.

▼B

Po uplynutí doby expozice se odstraní zbytky zkoušené látky, pokud možno vodou nebo jiným vhodným způsobem očištění kůže.

Pozorování by se měla současně systematicky zaznamenávat. Záznamy se vedou pro každé jednotlivé zvíře. Během prvního dne se provádějí pozorování často. Nejméně jednou každý pracovní den se provádějí pečlivá klinická vyšetření, další pozorování se provádějí denně, přičemž se učiní odpovídající opatření pro minimalizaci ztrát zvířat ve studii, např. pitvou nebo zmrazením uhynulých zvířat nebo izolací či utracením slabých nebo umírajících zvířat.

Pozorování zahrnují změny na kůži, na srsti, na očích, na sliznicích, a rovněž změny dýchání, krevního oběhu, změny funkce autonomní a centrální nervové soustavy, somatomotorické aktivity a chování. Zvláštní pozornost je třeba věnovat tremoru, křečím, slinění, průjmu, letargii, spánku a kómatu. Doba uhynutí se zaznamená co nejpřesněji. Zvířata, která v průběhu zkoušky uhynula, i zvířata, která do konce zkoušky přežila, se pitvají. Zaznamenají se všechny makroskopické patologické nálezy. V případě potřeby se odeberou tkáně pro histopatologické vyšetření.

Posouzení toxicity u druhého pohlaví

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

2. **ÚDAJE**

Data se shrnou do tabulky, přičemž se pro každou zkušební skupinu uvede počet zvířat na počátku zkoušky, doba uhynutí jednotlivých zvířat, počet zvířat s jinými příznaky toxicity, popis toxických účinků a pitevní nálezy. Hmotnost jednotlivých zvířat se stanoví a zaznamená krátce před aplikací zkoušené látky, poté v týdenních intervalech a v době uhynutí. Změny hmotnosti je třeba stanovit a zaznamenat, přežívají-li zvířata déle než jeden den. Zvířata, která byla humánním způsobem utracena s ohledem na utrpení a bolest vyvolané podanou látkou, se zaznamenávají jako uhynutí vyvolaná látkou. LD_{50} se vypočte pomocí uznávané metody.

Vyhodnocení dat by mělo zahrnovat také vztah, pokud existuje, mezi expozicí zvířat zkoušené látce a výskytem a závažností všech abnormalit, včetně změn chování, klinických symptomů, makroskopických lézí, změn tělesné hmotnosti, mortality a ostatních toxikologických účinků.

3. **ZPRÁVY**

3.1 PROTOKOL O ZKOUŠCE

Protokol o zkoušce má pokud možno obsahovat tyto údaje:

▼B

— živočišný druh, kmen, původ, podmínky chovu, strava atd.,

— zkušební podmínky (včetně způsobu očištění kůže a typu obvazu: okluzivní nebo neokluzivní),

— úrovně dávek (včetně vehikula, pokud se použije) a koncentrace,

— pohlaví zvířat, jimž byla látka podána,

— údaje o odezvě podle pohlaví a podle úrovně dávky, a to ve formě tabulky (tj. počet uhynulých zvířat nebo počet zvířat, která byla v průběhu zkoušky utracena, počet zvířat s příznaky toxicity, počet exponovaných zvířat),

— doba uhynutí po podání zkoušené látky, důvody a kritéria pro humánní utracení zvířat,

— všechna pozorování,

— hodnota LD_{50} pro pohlaví, u něhož byla provedena úplná studie, a to pro 14denní pozorování (s uvedením metody stanovení),

— 95 % interval spolehlivosti pro LC_{50} (lze-li jej vypočítat),

— křivka závislosti mortality na dávce a její směrnice, pokud to metoda stanovení umožňuje,

— pitevní nálezy,

— všechny histopatologické nálezy,

— výsledky všech zkoušek na druhém pohlaví,

— rozbor výsledků (zvláštní pozornost je třeba věnovat vlivu, který by mohlo mít humánní utracení zvířat během zkoušky na vypočtenou hodnotu LC_{50}),

— interpretace výsledků.

3.2 HODNOCENÍ A INTERPRETACE

Viz obecný úvod, část B (D).

4. **LITERATURA**

Viz obecný úvod, část B (E).

▼M8

B.4 AKUTNÍ DRÁŽDIVÉ A LEPTAVÉ ÚČINKY NA KŮŽI

ÚVOD

1. Tato zkušební metoda je rovnocenná Pokynu OECD pro zkoušení (TG) 404 (2015). Pokyny OECD pro zkoušení chemických látek jsou pravidelně přezkoumávány s cílem zajistit, aby odrážely nejlepší dostupné vědecké poznatky. Při přezkumu Pokynu OECD pro zkoušení č. 404 byla zvláštní pozornost věnována možným zlepšením v oblasti dobrého zacházení se zvířaty a vyhodnocování veškerých existujících informací o zkoušené chemické látce s cílem vyhnout se zkouškám na laboratorních zvířatech, které nejsou nutné. Aktualizovaná verze Pokynu OECD pro zkoušení č. 404 (původně přijatého v roce 1981, revidovaného v letech1992, 2002 a 2015) obsahuje odkaz na pokyny k integrovanému přístupu ke zkouškám a posuzování (IATA) dráždivých/leptavých účinků na kůži (1) a navrhuje pro zkoušení dráždivých a leptavých účinků na kůži modulový přístup. Integrované přístupy ke zkouškám a posuzování popisují několik modulů obsahujících informační zdroje a analytické nástroje a i) poskytují návod na integraci a používání stávajících údajů ze zkoušek a dalších údajů pro posouzení potenciálu dráždivých a leptavých účinků chemických látek na kůži a ii) a navrhují přístup, když je nutné další zkoušení (1). Navíc se v případě potřeby v počáteční zkoušce *in vivo* doporučuje v tomto pokynu namísto současného aplikování postupná aplikace tří testovacích náplastí.

2. Definice dráždivých a leptavých účinků na kůži jsou uvedeny v dodatku této zkušební metody.

VÝCHOZÍ ÚVAHY

3. V zájmu spolehlivého vědeckého přístupu a dobrého zacházení se zvířaty by se zkoušky *in vivo* neměly provádět, dokud nebyly všechny dostupné údaje, významné pro potenciální leptavé nebo dráždivé účinky zkoušené chemické látky, vyhodnoceny na základě analýzy průkaznosti výsledků, jak se uvádí v pokynech k integrovanému přístupu ke zkouškám a posuzování dráždivých/leptavých účinků na kůži, tj. ve třech částech tohoto pokynu a v příslušných modulech (1). Stručně řečeno, podle části 1 se stávající údaje hodnotí v sedmi modulech zahrnujících údaje o účincích na člověka, údaje *in vivo*, údaje *in vitro*, údaje o fyzikálně chemických vlastnostech (například pH, zejména silná kyselost nebo zásaditost) a jiné než zkušební metody. Podle části 2 se provádí analýza průkaznosti výsledků. Je-li tato analýza stále neprůkazná, je třeba provést další zkoušení podle části 3, přičemž se začíná metodami *in vitro* a zkoušení *in vivo* se používá až jako poslední možnost. Tato analýza by tedy měla snížit potřebu zkoušek leptavých nebo dráždivých účinků na kůži metodou *in vivo* u zkoušených chemických látek, u nichž již existují dostatečné důkazy z jiných studií, pokud jde o tyto dvě sledované vlastnosti.

PRINCIP ZKOUŠKY IN VIVO

4. Chemická látka, která má být zkoušena, se v jedné dávce nanese na kůži pokusného zvířete; oblasti neexponované kůže pokusného zvířete slouží jako kontrola. Ve stanovených intervalech se určí, vyhodnotí a následně popíše stupeň dráždivých/leptavých účinků, aby bylo možno provést úplné posouzení účinků. Doba studie by měla být dostatečně dlouhá, aby bylo možné zhodnotit vratnost nebo nevratnost pozorovaných účinků.

▼M8

5. Zvířata, která v jakékoli fázi zkoušky vykazují přetrvávající příznaky značného utrpení a/nebo bolesti, se humánně utratí a zkoušená chemická látka se odpovídajícím způsobem vyhodnotí. Kritéria rozhodování o humánním usmrcení umírajících a značně trpících zvířat lze nalézt v samostatných pokynech OECD (2).

PŘÍPRAVA NA ZKOUŠKU IN VIVO

Výběr zvířecích druhů

6. Upřednostňovaným laboratorním zvířetem je albín králíka, používají se zdravá mladá dospělá zvířata. Použití jiného druhu by mělo být zdůvodněno.

Příprava zvířat

7. Asi 24 hodin před zahájením zkoušky se zvířatům ostříhá srst na zádech. Je třeba dbát na to, aby se kůže neporanila. Smějí se použít pouze zvířata se zdravou, neporaněnou kůží.

8. Některé kmeny králíka mají plošky husté srsti, které jsou v některých obdobích roku výraznější. Na takových oblastech husté srsti by se zkouška provádět neměla.

Podmínky chovu a krmení

9. Zvířata se chovají samostatně. Teplota v místnosti pro pokusná zvířata by měla být u králíků 20 °C (± 3 °C). Ačkoli by relativní vlhkost vzduchu měla být minimálně 30 % a pokud možno by kromě doby úklidu místnosti neměla přesáhnout 70 %, cílem by měla být hodnota 50–60 %. Osvětlení by mělo být umělé a mělo by se střídat 12 hodin světla a 12 hodin tmy. Ke krmení lze použít konvenční laboratorní stravu s neomezeným přísunem pitné vody.

ZKUŠEBNÍ POSTUP

Aplikace zkoušené chemické látky

10. Zkoušená chemická látka se nanese na malou plochu kůže (asi 6 cm^2) a pokryje se plátkem mulu s nedráždivou náplastí. V případech, kdy přímá aplikace není možná (např. kapaliny nebo některé pasty), by se měla zkoušená chemická látka nejprve nanést na plátek mulu, který se následně přiloží na kůži. Po dobu trvání expozice je třeba přidržovat plátek volně na kůži vhodným semiokluzivním obvazem. Pokud se zkoušená chemická látka nanáší na mul, měl by být na kůži připevněn tak, aby se zajistil dobrý kontakt s kůží a rovnoměrné rozložení zkoušené chemické látky na kůži. Je třeba zabránit tomu, aby se zvíře dostalo k mulu a zkoušenou chemickou látku požilo nebo vdechlo.

11. Kapalné zkoušené chemické látky se zpravidla aplikují neředěné. Při zkouškách pevných látek (které mohou být případně rozetřeny na prach) se zkoušená chemická látka navlhčí co nejmenším množstvím vody (v případě potřeby jiným vhodným vehikulem), aby se zajistil dostatečný kontakt s kůží. Pokud se používají jiná vehikula než voda, měl by být potenciální vliv vehikula na dráždivé účinky zkoušené chemické látky na kůži pouze minimální.

12. Po uplynutí doby expozice, která je obvykle 4 hodiny, se odstraní zbytky zkoušené chemické látky, pokud možno vodou nebo vhodným rozpouštědlem, aniž by došlo k ovlivnění odezvy nebo celistvosti kůže.

▼M8

Úroveň dávek

13. Na testovací místo se nanese 0,5 ml kapaliny nebo 0,5 g pevné látky nebo pasty.

Počáteční zkouška (zkouška dráždivých/leptavých účinků na kůži *in vivo* s použitím jednoho zvířete)

14. Pokud byla na základě analýzy průkaznosti výsledků nebo na základě předchozího zkoušení *in vitro* zkoušená chemická látka posouzena jako žíravá, dráždivá nebo neklasifikovaná, není žádné další zkoušení *in vivo* obvykle nutné. Avšak v případech, kdy je opodstatněné získat doplňující údaje, provede se zkouška *in vivo* nejprve na jednom zvířeti a s použitím následujícího přístupu. Zvířeti se postupně přiloží tři testovací náplasti. První náplast se odstraní po třech minutách. Pokud není pozorována závažná kožní reakce, přiloží se na jiné místo druhá náplast a po jedné hodině se odstraní. Pokud pozorování v této fázi naznačují, že expozici lze bez porušení zásady humánního zacházení prodloužit na čtyři hodiny, přiloží se třetí náplast, která se po čtyřech hodinách odstraní, a vyhodnotí se odezva.

15. Pokud je po některé ze tří následných expozic pozorován leptavý účinek, zkouška se okamžitě ukončí. Pokud po odstranění třetí náplasti není leptavý účinek pozorován, zvíře se pozoruje po dobu 14 dnů, pokud se u něj poleptání kůže neprojeví dříve.

16. V takových případech, kdy se u zkoušené chemické látky nepředpokládá, že vyvolá leptavé účinky, ale může být dráždivá, by se měla jednomu zvířeti přiložit jedna náplast na čtyři hodiny.

Potvrzující zkouška (zkouška dráždivých účinků na kůži *in vivo* s dalšími zvířaty)

17. Pokud během počáteční zkoušky není pozorován leptavý účinek, měla by se dráždivá nebo negativní reakce potvrdit nejvýše na dvou dalších zvířatech, u každého s jednou náplastí a dobou expozice 4 hodiny. Pokud je během počáteční zkoušky pozorován dráždivý účinek, lze potvrzující zkoušku provést postupně, nebo exponováním dvou dalších zvířat současně. Ve výjimečném případě, kdy se počáteční zkouška neprovádí, lze dvěma nebo třem zvířatům přiložit jednu náplast, která se po čtyřech hodinách odstraní. Jestliže se použijí dvě zvířata a u obou se projeví stejná reakce, není žádné další zkoušení nutné. Jinak se zkouší také třetí zvíře. Neurčité reakce je možné zhodnotit na dalších zvířatech.

Doba pozorování

18. Doba studie by měla být dostatečně dlouhá, aby bylo možné plně zhodnotit vratnost pozorovaných účinků. Zkouška by však měla být ukončena kdykoliv v okamžiku, kdy zvíře vykazuje přetrvávající příznaky značné bolesti nebo utrpení. Za účelem určení vratnosti účinků by se zvířata měla pozorovat 14 dnů po odstranění náplastí. Pokud je vratnost pozorována před uplynutím 14 dnů, zkouška se v tomto okamžiku ukončí.

Klinická pozorování a hodnocení reakcí kůže

19. Všechna zvířata se pozorují na příznaky erytému a edému, reakce kůže se hodnotí po 60 min a dále po 24, 48 a 72 hodinách po odstranění náplasti. V počáteční zkoušce na jednom zvířeti se po odstranění náplasti okamžitě vyšetří také testované místo. Kožní reakce se vyhodnotí a zaznamenají podle stupnice v níže uvedené tabulce. Pokud se objeví poškození kůže, které po 72 hodinách nelze označit za dráždivé nebo leptavé účinky, může být nezbytné pokračovat v pozorování až do 14. dne kvůli stanovení vratnosti

▼M8

účinků. Kromě pozorování dráždivých účinků by měly být důkladně popsány a zaznamenány veškeré místní toxické účinky, jako je odtučnění kůže a jakékoli systémové nežádoucí účinky (např. vliv na klinické příznaky toxicity a tělesnou hmotnost). K objasnění neurčitých reakcí se zváží histopatologické vyšetření.

20. Hodnocení reakcí kůže je nevyhnutelně subjektivní. S cílem podporovat harmonizaci hodnocení reakcí kůže a napomáhat zkušebním laboratořím a těm, kdo provádějí a interpretují pozorování, musí být zaměstnanci provádějící pozorování odpovídajícím způsobem kvalifikováni pro práci s používaným systémem vyhodnocování (viz níže uvedená tabulka). Jako pomůcku lze použít ilustrované pokyny pro hodnocení dráždivých účinků na kůži a jiných lézí (3).

ÚDAJE A PŘEDKLÁDÁNÍ ZPRÁV

21. Výsledky studie se shrnou do tabulky uvedené v závěrečné zprávě. Měly by zpracovávat všechny položky uvedené v odstavci 24.

Vyhodnocení výsledků

22. Stupně dráždivých účinků na kůži se zhodnotí ve spojení s povahou a závažností lézí a jejich vratností nebo nevratností. Jednotlivé stupně nepředstavují absolutní měřítko dráždivých vlastností látky, neboť se hodnotí také jiné účinky zkoušené látky. Jednotlivé stupně by spíše měly být považovány za referenční hodnoty, které je nutno zhodnotit společně s dalšími pozorováními vyplývajícími ze studie.

23. Při hodnocení dráždivých reakcí se zohlední vratnost kožních lézí. Pokud do ukončení čtrnáctidenní doby pozorování přetrvávají reakce jako alopecie (na omezené ploše), hyperkeratóza, hyperplazie a šupinatění, považuje se zkoušená chemická látka za dráždivou.

Závěrečná Zpráva

24. Závěrečná zpráva musí obsahovat tyto údaje:

Odůvodnění zkoušení in vivo:

— analýza průkaznosti výsledků údajů z dřívějších zkoušek, včetně výsledků strategie postupného zkoušení, s posouzením závažnosti důkazů,

— popis relevantních údajů z předchozích zkoušek,

— údaje získané v každé fázi strategie zkoušení,

— popis provedených zkoušek *in vitro*, včetně podrobných údajů o postupech a o výsledcích získaných se zkoušenými/referenčními látkami,

— analýza závažnosti důkazů odůvodňující provedení studie *in vivo*.

Zkoušená chemická látka:

— jednosložková látka: chemická identifikace, např. název podle IUPAC nebo CAS, číslo CAS, kód SMILES nebo InChI, strukturní vzorec, čistota, případně chemická identita nečistot, je-li to prakticky možné, atd.,

▼**M8**

— vícesložková látka, směs a látky s neznámým nebo proměnlivým složením, komplexní reakční produkty nebo biologické materiály (UVCB): charakterizované pokud možno chemickou identitou (viz výše), kvantitativním výskytem a relevantními fyzikálně-chemickými vlastnostmi složek,

— fyzický vzhled, rozpustnost ve vodě a další relevantní fyzikálně-chemické vlastnosti,

— zdroj, číslo šarže, jsou-li k dispozici,

— případně ošetření zkoušených chemických/kontrolních látek před zkoušením (např. zahřátí, mletí),

— stabilita zkoušené chemické látky, datum použitelnosti nebo datum opětovné analýzy, je-li známo,

— podmínky skladování.

Vehikulum:

— identifikace, koncentrace (podle potřeby), použitý objem,

— zdůvodnění výběru vehikula.

Pokusná zvířata:

— použitý druh/kmen, zdůvodnění použití jiných zvířat, není-li použit albinotický králík,

— počet zvířat každého pohlaví,

— hmotnosti jednotlivých zvířat na začátku a na konci zkoušky,

— stáří na začátku studie,

— původ zvířat, podmínky chovu, strava atd.

Zkušební podmínky:

— technika přípravy oblasti kůže, na kterou se nanese náplast;

— podrobné údaje o materiálech použitých na náplasti a technice aplikování náplastí,

— podrobné údaje o přípravě zkoušené chemické látky, jejím nanesení a odstranění.

Výsledky:

— údaje o stupni odezvy na dráždivé nebo leptavé účinky u každého zvířete v každém okamžiku měření,

— popis všech pozorovaných lézí,

— podrobný popis povahy a stupně pozorovaných dráždivých nebo leptavých účinků a případné histopatologické nálezy,

— popis jiných místních (např. odtučnění kůže) a systémových účinků vedle dráždivých nebo leptavých účinků na kůži.

▼**M8**

Diskuse o výsledcích

Závěry

LITERATURA

(1) OECD (2014). Guidance document on Integrated Approaches to Testing and Assessment for Skin Irritation/Corrosion. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (No 203), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(2) OECD (1998) Harmonized Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances, as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals, November 1998.

(3) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 19), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

▼**M8**

Tabulka

Hodnocení kožních reakcí

Tvorba erytému a příškvaru

Žádný erytém…	0
Velmi slabý erytém (sotva patrný)…	1
Zřetelně viditelný erytém…	2
Mírný až výrazný erytém…	3
Těžký erytém (silné zrudnutí) nebo tvorba příškvaru znemožňující posouzení erytému…	4

Maximálně možné: 4

Tvorba edému

Žádný edém…	0
Velmi lehký edém (sotva patrný)…	1
Lehký edém (okraje jsou patrné, plocha je ohraničena zřetelným vyvýšením)…	2
Mírný edém (okraje vyvýšeny asi o 1 mm)…	3
Výrazný edém (zduření více než 1 mm a otok přesahující hranice exponované plochy)…	4

Maximálně možné: 4

Pro objasnění neurčitých reakcí lze provést histopatologické vyšetření.

▼**M8**

Dodatek

DEFINICE

Chemická látka je látka nebo směs.

Dráždivé účinky na kůži znamenají vyvolání vratných změn na kůži do 4 hodin po aplikaci zkoušené chemické látky.

Leptavé účinky na kůži znamenají vyvolání nevratného poškození kůže; zejména viditelné, do koria zasahující nekrózy pokožky, do čtyř hodin po aplikaci zkoušené chemické látky. Typickými reakcemi na poleptání jsou vředy, krvácení, krvavé strupy a v závěru čtrnáctidenního pozorování ztráta barvy v důsledku vyblednutí kůže, úplná ložiska alopecie a jizvy. K vyhodnocení sporných lézí by se měla uvážit histopatologie.

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

▼M7

B.5 AKUTNÍ DRÁŽDIVÉ/LEPTAVÉ ÚČINKY NA OČI

ÚVOD

Tato metoda je rovnocenná metodě Pokynu OECD pro zkoušení (TG) 405 (2012). Pokyny OECD pro zkoušení chemických látek jsou pravidelně přezkoumávány s cílem zajistit, aby odrážely nejlepší dostupné vědecké poznatky. Při předchozích přezkumech těchto pokynů pro zkoušení byla zvýšená pozornost věnována možným zlepšením, jichž lze dosáhnout vyhodnocováním veškerých existujících informací o zkoušené chemické látce s cílem vyhnout se nadbytečným zkouškám na laboratorních zvířatech a zohlednit tak zásadu dobrého zacházení se zvířaty. Pokyn pro zkoušení (TG) 405 (přijatý v roce 1981 a aktualizovaný v letech 1987, 2002 a 2012) obsahuje doporučení, aby byla před provedením popsané zkoušky akutních dráždivých/leptavých účinků na oči *in vivo* provedena analýza závažnosti důkazů (1) u existujících relevantních údajů. Pokud nejsou dostatečné údaje k dispozici, doporučuje se získat je pomocí metody postupného zkoušení (2) (3). Strategie zkoušení zahrnuje provedení validovaných a uznaných zkoušek *in vitro* a je popsána v doplňku této zkušební metody. Pro účely nařízení (ES) č. 1907/2006 o registraci, hodnocení, povolování a omezování chemických látek (REACH) ([1]) je v příslušném pokynu agentury ECHA uvedena rovněž integrovaná strategie zkoušení (21). Zkoušky na zvířatech by se měly provádět pouze v případě, kdy bylo po posouzení dostupných alternativních metod zjištěno, že tyto zkoušky jsou nezbytné a že použití takových zkoušek je přiměřené. V době přípravy této aktualizované zkušební metody existují případy, kdy použití této zkušební metody je stále nezbytné nebo je podle některých legislativních přístupů vyžadováno.

Poslední aktualizace se zaměřila hlavně na použití analgetik a anestetik, aniž by to ovlivnilo základní koncept a strukturu TG 405. Výbor ICCVAM ([2]) a nezávislá mezinárodní vědecká komise pro odbornou revizi posoudily užitečnost a omezení běžného používání topických anestetik, systémových analgetik a humánních opatření při zkouškách bezpečnosti chemických látek z hlediska jejich dráždivých účinků na oči *in vivo* (12). Přezkum dospěl k závěru, že použití topických anestetik a systémových analgetik by mohlo z větší části nebo zcela zamezit bolestem a utrpení, aniž by ovlivnilo výsledek zkoušky, a bylo doporučeno, aby tyto látky byly vždy používány. Tato zkušební metoda bere tento posudek v úvahu. Při testování akutních dráždivých a leptavých účinků na oči by se topická anestetika, systémová analgetika a humánní opatření měly používat rutinně. Výjimky z jejich použití by měly být zdůvodněny. Vylepšení popsaná v této metodě podstatně sníží bolest a utrpení zvířat nebo jim zamezí ve většině zkušebních situací, kdy je testování bezpečnosti pro oči *in vivo* stále nezbytné.

Vyvážené preventivní zmírňování bolesti by mělo zahrnovat i) běžné podávání topických anestetik (např. proparacain nebo tetracain) a systémových analgetik (např. buprenorfin) před expozicí, ii) rutinní plán systémové analgezie (např. buprenorfin a meloxicam) v postexpoziční době, iii) plánované prohlídky, sledování a zaznamenávání klinických příznaků bolesti a/nebo utrpení u zvířat a iv) plánované prohlídky, sledování a zaznamenávání povahy, závažnosti a progrese veškerých poškození očí. Další podrobnosti jsou uvedeny v níže

([1]) Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1907/2006 ze dne 18. prosince 2006 o registraci, hodnocení, povolování a omezování chemických látek, o zřízení Evropské agentury pro chemické látky, o změně směrnice 1999/45/ES a o zrušení nařízení Rady (EHS) č. 793/93, nařízení Komise (ES) č. 1488/94, směrnice Rady 76/769/EHS a směrnic Komise 91/155/EHS, 93/67/EHS, 93/105/ES a 2000/21/ES. Úř. věst. L 304, 22.11.2007, s. 1.

([2]) *Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods* (Meziagenturní koordinační výbor pro validaci alternativních metod), USA.

▼M7

popsaných aktualizovaných postupech. Po podání zkoušené chemické látky by další topická anestetika ani analgetika neměla být podávána, aby nedošlo k ovlivnění studie. Analgetika s protizánětlivým působením (např. meloxicam) by neměla být aplikována lokálně a použité dávky by neměly systémově ovlivňovat účinky na oči.

Definice jsou uvedeny v dodatku této zkušební metody.

VÝCHOZÍ ÚVAHY

V zájmu spolehlivého vědeckého přístupu a dobrého zacházení se zvířaty by se ke zkouškám *in vivo* nemělo přistupovat, dokud nebyly všechny dostupné údaje významné pro možné leptavé/dráždivé účinky chemické látky na oči vyhodnoceny na základě analýzy závažnosti důkazů. Takové údaje zahrnují důkazy získané z existujících studií na lidech a/nebo laboratorních zvířatech, důkazy leptavých/dráždivých účinků na oči jedné nebo více strukturně příbuzných látek nebo směsí těchto látek, údaje dokládající vysokou kyselost nebo zásaditost chemické látky (4) (5) a výsledky validovaných a uznaných zkoušek leptavých účinků na kůži a leptavých a dráždivých účinků na oči *in vitro* nebo *ex vivo* (6) (13) (14) (15) (16) (17). Tyto studie mohly být vypracovány před analýzou závažnosti důkazů nebo na základě zjištění této analýzy.

U některých chemických látek může taková analýza naznačovat nutnost provedení studií možných leptavých/dráždivých účinků chemické látky na oči *in vivo*. Ve všech takových případech by před zvážením použití oční zkoušky *in vivo* měla být přednostně nejprve provedena studie leptavých účinků chemické látky na kůži *in vitro* a/nebo *in vivo* a vyhodnocena v souladu se strategií postupného zkoušení uvedenou v rámci zkušební metody B.4 (7), nebo v souladu se strategií integrovaného zkoušení, která je popsána v pokynech agentury ECHA (21).

Strategie postupného zkoušení, která zahrnuje provedení validovaných zkoušek leptavých/dráždivých účinků na oči *in vitro* a *ex vivo*, je popsána v doplňku této zkušební metody a pro účely nařízení REACH v pokynech agentury ECHA (21). Doporučuje se, aby se podle této strategie zkoušení postupovalo před prováděním zkoušek *in vivo*. U nových chemických látek se doporučuje metoda zkoušení po krocích, díky které lze získat vědecky spolehlivé údaje o leptavých/dráždivých účincích chemické látky. U existujících chemických látek, o jejichž leptavých/dráždivých účincích na kůži a oči není k dispozici dostatek údajů, lze tuto strategii využít pro doplnění chybějících informací. Použití jiné strategie nebo postupu zkoušení nebo rozhodnutí nepoužít metodu zkoušení po krocích musí být odůvodněno.

PRINCIP ZKOUŠKY *IN VIVO*

Po předchozím ošetření systémovým analgetikem a zavedení vhodného topického anestetika se chemická látka, která má být zkoušena, nanese v jedné dávce na jedno oko pokusného zvířete, přičemž neexponované oko slouží jako kontrola. V předem určených intervalech se na základě lézí spojivky, rohovky a duhovky vyhodnotí stupeň dráždivých/leptavých účinků na oči. Popíší se také jiné účinky na oko a nežádoucí systémové účinky, aby bylo možno provést úplné posouzení účinků. Doba studie by měla být dostatečně dlouhá, aby bylo možné zhodnotit vratnost nebo nevratnost účinků.

Zvířata, která v jakékoli fázi zkoušky vykazují příznaky značného utrpení a/nebo bolesti nebo léze odpovídající humánním ukazatelům popsaným v této zkušební metodě (viz odstavec 26), se humánně utratí a chemická látka se odpovídajícím způsobem vyhodnotí. Kritéria rozhodování o humánním usmrcení umírajících a značně trpících zvířat lze nalézt v pokynech OECD (8).

▼M7

PŘÍPRAVA NA ZKOUŠKU *IN VIVO*

Výběr druhů

Upřednostňovaným laboratorním zvířetem je albinotický králík; používají se zdravá mladá dospělá zvířata. Použití jiných kmenů nebo druhů je třeba zdůvodnit.

Příprava zvířat

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

Podmínky chovu a krmení

Zvířata by měla být chována samostatně. Teplota v místnosti pro pokusná zvířata by měla být u králíků 20 °C (± 3 °C). Ačkoli by relativní vlhkost vzduchu měla být minimálně 30 % a pokud možno by kromě doby úklidu místnosti neměla přesáhnout 70 %, cílem by měla být hodnota 50–60 %. Osvětlení by mělo být umělé a mělo by se střídat 12 hodin světla a 12 hodin tmy. Je třeba se vyvarovat nadměrné intenzity světla. Ke krmení lze použít konvenční laboratorní stravu s neomezeným přísunem pitné vody.

POSTUP ZKOUŠKY

Použití topických anestetik a systémových analgetik

K zamezení nebo minimalizaci bolesti a utrpení při postupech zkoušení bezpečnosti pro oči se doporučují následující postupy. Lze je nahradit alternativními postupy, u nichž bylo zjištěno, že stejně dobře nebo lépe zamezují nebo zbavují bolesti a utrpení.

— Šedesát minut před aplikací zkoušené chemické látky se podkožní injekcí podá buprenorfin v koncentraci 0,01 mg/kg, aby bylo dosaženo terapeutické úrovně systémové analgezie. U buprenorfinu nebo jiných podobných opioidních analgetik podávaných systémově není známo a neočekává se, že by změnily oční reakce (12).

— Pět minut před aplikací zkoušené chemické látky se do každého oka aplikují jedna nebo dvě kapky topického očního anestetika (např. 0,5 % proparakain hydrochlorid nebo 0,5 % tetrakain hydrochlorid). Aby se zamezilo možnému ovlivnění studie, doporučuje se topické anestetikum, jež neobsahuje konzervační přípravky. Oko zvířete, které není exponováno zkoušené chemické látce, ale je ošetřeno topickým anestetikem, slouží jako kontrola. Předpokládá-li se, že zkoušená chemická látka způsobuje značnou bolest a utrpení, neměla by být běžně zkoušena *in vivo*. V případě pochybností, nebo je-li zkoušení nezbytné, by se mělo dbát na doplňkovou aplikaci topického anestetika v pětiminutových intervalech před aplikací zkoušené chemické látky. Uživatelé by si měli být vědomi toho, že vícenásobná aplikace topických anestetik by potenciálně mohla způsobit mírné zvýšení závažnosti účinků a/nebo prodloužení času potřebného k vymizení chemicky indukovaných lézí.

— Osm hodin po aplikaci zkoušené chemické látky se subkutánní injekcí podá buprenorfin v koncentraci 0,01 mg/kg a meloxicam v koncentraci 0,5 mg/kg k zajištění trvalé terapeutické úrovně systémové analgezie. Neexistují žádné údaje potvrzující, že meloxicam má, je-li podáván subkutánně jednou denně, protizánětlivé účinky na oči, avšak neměl by se podávat dříve než 8 hodin po aplikaci zkoušené chemické látky, aby se zabránilo případnému ovlivnění studie (12).

— Po počátečních 8 hodinách po expozici zkoušené chemické látce by buprenorfin v koncentraci 0,01 mg/kg měl být aplikován subkutánně každých 12 hodin spolu s podáváním meloxicamu v koncentraci 0,5 mg/kg subkutánně každých 24 hodin, dokud oční léze nezmizí a nebudou přítomny žádné

▼M7

klinické příznaky bolesti a utrpení. K dispozici jsou analgetické přípravky s prodlouženým uvolňováním, jejichž použití by mohlo být zváženo ke snížení frekvence dávkování analgetik.

— Pokud předběžná analgezie a topické anestezie nejsou dostačující, je třeba ihned po aplikaci zkoušené chemické látky přikročit k „záchrannému“ tišení bolesti. Jestliže zvíře během zkoušky vykazuje známky bolesti a utrpení, měla by být okamžitě podána „záchranná“ dávka buprenorfinu 0,03 mg/kg subkutánně a opakována v případě potřeby každých 8 hodin, namísto 0,01 mg/kg subkutánně každých 12 hodin. Melixicam 0,5 mg/kg by měl být podáván subkutánně každých 24 hodin spolu se „záchrannou“ dávkou buprenorfinu, avšak ne dříve než minimálně 8 hodin po aplikaci zkoušené chemické látky.

Aplikace zkoušené chemické látky

Zkoušená chemická látka se aplikuje každému zvířeti do spojivkového vaku jednoho oka tak, že se spodní víčko lehce odchlípne od oční bulvy. Víčka se pak asi na jednu sekundu lehce přidrží u sebe, aby nedošlo ke ztrátě látky. Druhé oko, na které se látka neaplikuje, slouží jako kontrola.

Výplach

Oči pokusných zvířat se do 24 hodin po instilaci zkoušené chemické látky nevyplachují, s výjimkou pevných látek (viz odstavec 18) a okamžitých leptavých nebo dráždivých účinků. Po 24 hodinách je možné v případě potřeby oči vypláchnout.

Použití satelitní skupiny zvířat k vyšetření vlivu výplachu očí se nedoporučuje, pokud to není vědecky odůvodněno. Je-li satelitní skupina nezbytná, použijí se dva králíci. Podmínky výplachu se podrobně zdokumentují, např. doba výplachu, složení a teplota promývacího roztoku, trvání, objem a rychlost aplikace.

Úroveň dávek

1) *Zkoušení kapalin*

Při zkoušení kapalin se použije dávka 0,1 ml. K instilaci chemické látky přímo do oka by se neměly používat aerosolové rozstřikovače s čerpadlem. Před instilací 0,1 ml do oka by se měla tekutina z rozstřikovače vypudit a shromáždit do nádobky.

2) *Zkoušení pevných látek*

Při zkoušení pevných látek, past a chemických látek obsahujících částice se použije objem 0,1 ml nebo hmotnost nejvýše 100 mg. Zkoušená chemická látka se rozdrtí na jemný prášek. Objem pevného materiálu se stanoví až po opatrném zhutnění, např. poklepáním odměrnou nádobkou. Pokud nebyla zkoušená pevná chemická látka odstraněna z oka pokusného zvířete pomocí fyziologických mechanismů do doby prvního pozorování po 1 hodině po aplikaci, lze oko vypláchnout fyziologickým roztokem nebo destilovanou vodou.

3) *Zkoušení aerosolů*

Před instilací látek do oka se doporučuje zachytit látky obsažené v rozstřikovačích nebo aerosolech do nádobky. Jedinou výjimkou jsou chemické látky obsažené v aerosolové nádobce pod tlakem, které z důvodu odpařování zachytit nelze. V takových případech se oko podrží otevřené a chemická látka se do oka aplikuje přímým vstříknutím trvajícím jednu sekundu ze vzdálenosti 10 cm. Vzdálenost se může lišit podle tlaku v rozprašovači a jeho obsahu. Je třeba dbát na to, aby nedošlo k poškození oka tlakem z rozprašovače. Případně bude nutné vyhodnotit možnost „mechanického“ poškození oka v důsledku rozprašovacího tlaku.

▼M7

Odhad dávky z aerosolu lze provést simulací zkoušky takto: látka se nastříká na odvažovací papír otvorem o velikosti králičího oka, který se nachází bezprostředně před papírem. Na základě zvýšení hmotnosti papíru se odhadne množství látky, která se vstříkne do oka. U těkavých chemických látek lze dávku odhadnout pomocí zvážení odběrové nádobky před odstraněním zkoušené chemické látky a po jejím odstranění.

Počáteční zkouška (zkouška dráždivých/leptavých účinků na oči *in vivo* na jednom zvířeti)

Důrazně se doporučuje, aby se zkouška *in vivo* provedla zpočátku na jednom zvířeti (viz doplněk této zkušební metody: „Strategie postupného zkoušení dráždivých a leptavých účinků na oči“). Na základě pozorování by mělo být možné určit závažnost a vratnost předtím, než se přejde k potvrzující zkoušce na druhém zvířeti.

Pokud výsledky této zkoušky naznačují, že chemická látka má leptavé nebo vysoce dráždivé účinky na oči při použití popsaného postupu, další zkoušení dráždivých účinků na oči se neprovádí.

Potvrzující zkouška (zkouška dráždivých účinků na oči *in vivo* na dalších zvířatech)

Pokud během počáteční zkoušky není pozorován leptavý nebo silně dráždivý účinek, měla by se dráždivá nebo negativní reakce potvrdit na maximálně dalších dvou zvířatech. Pokud je během počáteční zkoušky pozorován dráždivý účinek, doporučuje se, doporučuje se provést potvrzující zkoušku metodou postupného zkoušení vždy na jednom zvířeti spíše než exponováním dalších dvou zvířat současně. Pokud se u druhého zvířete projeví leptavé nebo silně dráždivé účinky, ve zkoušce se nepokračuje. Pokud výsledky u druhého zvířete jsou dostačující a umožňují stanovit kategorii nebezpečnosti, žádné další zkoušení se neprovádí.

Doba pozorování

Doba pozorování by měla být dostatečně dlouhá, aby bylo možné plně zhodnotit míru a vratnost pozorovaných účinků. Zkouška by však měla být ukončena vždy, pokud zvíře vykazuje příznaky značné bolesti nebo utrpení (8). Za účelem určení vratnosti účinků by se zvířata měla obvykle pozorovat 21 dnů po podání zkoušené chemické látky. Pokud je vratnost pozorována před uplynutím 21 dnů, zkouška se v tomto okamžiku ukončí.

Klinická pozorování a hodnocení očních reakcí

Oči by měly být komplexně zhodnoceny na přítomnost či nepřítomnost očních lézí hodinu po aplikaci zkoušené chemické látky a poté alespoň jednou denně. Zvířata by měla být pozorována v prvních třech dnech několikrát denně, aby se zajistilo, že rozhodnutí o utracení budou přijata včas. U zkušebních zvířat by se měly alespoň dvakrát denně po celou dobu studie pravidelně hodnotit na klinické příznaky bolesti a/nebo utrpení (např. opakované škrábání nebo tření oka, nadměrné mrkání, nadměrné slzení) (9) (10) (11) v minimálně šestihodinových nebo v případě potřeby i delších intervalech mezi jednotlivými pozorováními. Je nezbytné i) náležitě posoudit, zda jsou u zvířat patrné známky bolesti a utrpení, aby bylo možno přijmout podložená rozhodnutí, zda je nutné zvýšit dávkování analgetik, a ii) posoudit, zda jsou u zvířat patrné stanovené humánní ukazatele, aby bylo možné přijmout informované rozhodnutí, zda je nutné je humánně utratit, či nikoli, a zajistit, že tato rozhodnutí budou přijata včas. Běžně by se mělo používat zbarvení fluoresceinem a v případě potřeby (např. při posuzování hloubky poškození v případě zvředovatění rohovky) se jako pomůcka při detekci a měření poškození oka a při hodnocení, zda bylo dosaženo stanovených konečných ukazatelů pro humánní utracení,

▼M7

‚použije ruční štěrbinová lampa. Pro ilustraci lze pořídit digitální fotografie pozorovaných lézí a vést trvalý záznam o rozsahu poškození očí. Jakmile se získají konečné informace, nemělo by zkoušení na zvířatech probíhat déle, než je nezbytné. Zvířata se známkami značných bolesti nebo utrpení se neprodleně humánně utratí a chemická látka se odpovídajícím způsobem vyhodnotí.

Humánně se utratí ta zvířata, u nichž došlo po instilaci k těmto očním lézím (popis stupňů lézí viz tabulka 1): perforace rohovky nebo výrazné zvředovatění rohovky včetně stafylomu; krev v přední komoře oční; zákal rohovky stupně 4; absence reakce na osvit (reakce duhovky stupně 2) přetrvávající 72 hodin; zvředovatění spojivkové membrány; nekróza spojivek nebo slzné žlázy; nebo odlupování nekrotické hmoty. Tento postup je dán nevratností takových lézí. Dále se doporučuje použít následující oční léze jako humánní koncové ukazatele pro ukončení studií před uplynutím plánované 21denní doby pozorování. Tyto léze jsou považovány za předpověď závažných dráždivých nebo leptavých poškození a poškození, u nichž se neočekává plná vratnost před ukončením 21denní doby pozorování: značná hloubka poškození (např. zvředovatění rohovky zasahující dále než do povrchových vrstev stromatu), poškození limbu > 50 % (doložené vyblednutím spojivkové tkáně) a silná infekce očí (výtok hnisu). Za užitečné kritérium, jež může ovlivnit klinické rozhodnutí o předčasném ukončení studie, lze také považovat kombinaci vaskularizace povrchu rohovky (tj. pannus, povrchový zánět rohovky), oblastí zbarvených fluoresceinem, které se na základě každodenního posuzování v čase nezmenšují, a/nebo nedostatečné reepitelizace 5 dní po aplikaci zkoušené chemické látky. Jednotlivě však tyto nálezy nejsou dostatečným důvodem k ukončení studie. Jakmile jsou zjištěny závažné účinky na oči, je třeba se obrátit na praktického nebo kvalifikovaného laboratorního veterinárního lékaře nebo osobu odborně způsobilou k identifikaci klinických lézí, aby se provedlo klinické vyšetření, jež stanoví, zda je nutné v důsledku kombinace těchto účinků studii předčasně ukončit. Stupně očních reakcí (spojivek, rohovky a duhovky) by měly být zjišťovány a zaznamenávány po 1, 24, 48 a 72 hodinách od aplikace zkoušené chemické látky (tabulka 1). Zvířata, u nichž oční léze nevzniknou, nelze utratit dříve než 3 dny po instilaci. Zvířata s očními lézemi, které nejsou závažné, se pozorují, dokud léze nevymizí, nebo po 21 dnů, po jejichž uplynutí se studie ukončí. Pozorování, jejichž cílem je stanovit stav lézí a jejich vratnost či nevratnost, by měla být prováděna a zaznamenávána minimálně po 1 hodině, 24 hodinách, 48 hodinách, 72 hodinách, 7 dnech, 14 dnech a 21 dnech. V nezbytných případech by se pozorování mělo provádět častěji s cílem určit, zda by pokusná zvířata měla být z humánních důvodů utracena nebo kvůli negativním výsledkům ze studie vyjmuta.

Při každém vyšetření by měly být zaznamenány stupně očních lézí (tabulka 1). Zaznamenány by měly být také jakékoli další oční léze (např. zánět, zbarvení, změny v přední komoře oční) nebo nepříznivé systémové účinky.

Vyšetřování reakcí lze usnadnit použitím binokulární lupy, ruční štěrbinové lampy, očního mikroskopu nebo jiných vhodných zařízení. Po zaznamenání pozorování po 24 hodin mohou být oči zvířat dále vyšetřeny fluoresceinem.

Hodnocení reakcí očí je nevyhnutelně subjektivní. S cílem podporovat harmonizaci hodnocení reakcí očí a napomoci zkušebním laboratořím a těm, kdo provádějí a interpretují pozorování, musí být zaměstnanci provádějící pozorování odpovídajícím způsobem kvalifikováni pro práci s používaným systémem vyhodnocování.

▼M7

ÚDAJE A PŘEDKLÁDÁNÍ ZPRÁV

Vyhodnocení výsledků

Stupně dráždivých účinků na oči se zhodnotí ve spojení s povahou a stupněm závažnosti lézí a jejich vratností nebo nevratností. Jednotlivé stupně nepředstavují absolutní měřítko dráždivých vlastností chemické látky, neboť se hodnotí také jiné účinky zkoušené chemické látky. Jednotlivé stupně by spíše měly být považovány za referenční hodnoty, které jsou smysluplné, pouze pokud se opírají o úplný popis a hodnocení veškerých pozorování.

Závěrečná zpráva

Závěrečná zpráva by měla obsahovat tyto informace:

Odůvodnění zkoušení in vivo: analýza závažnosti důkazů u výsledků z dřívějších zkoušek, včetně výsledků strategie postupného zkoušení.

— popis relevantních údajů z předchozích zkoušek,

— údaje získané v každém kroku strategie zkoušení,

— popis provedených zkoušek *in vitro* včetně podrobných údajů o postupech a o výsledcích získaných se zkoušenými/referenčními chemickými látkami,

— popis provedené studie dráždivých/leptavých účinků na kůži *in vivo*, včetně získaných výsledků,

— analýza závažnosti důkazů odůvodňující provedení studie *in vivo*.

Zkoušená chemická látka:

— identifikační údaje (např. chemický název a, jsou-li k dispozici, číslo CAS, čistota, známé nečistoty, zdroj, číslo šarže),

— fyzikální povaha a fyzikálně-chemické vlastnosti (např. hodnota pH, těkavost, rozpustnost, stabilita, reaktivita s vodou),

— v případě směsi by mělo být identifikováno její složení včetně identifikačních údajů jejích složek (např. chemické názvy a, jsou-li k dispozici, čísla CAS) a jejich koncentrace,

— aplikovaná dávka.

Vehikulum:

— identifikace, koncentrace (podle potřeby), použitý objem,

— zdůvodnění výběru vehikula.

Pokusná zvířata:

— použitý druh/kmen, zdůvodnění použití jiných zvířat, není-li použit albinotický králík,

— stáří každého zvířete na začátku studie,

— počet zvířat každého pohlaví ve zkušebních a kontrolních skupinách (je-li to nutné),

— hmotnosti jednotlivých zvířat na začátku a na konci zkoušky,

— původ, podmínky chovu, strava atd.

▼M7

Anestetika a analgetika:

— dávky a doby podání topických anestetik a systémových analgetik,

— je-li použito lokální anestetikum, jeho identifikace, čistota, typ a možná interakce se zkoušenou chemickou látkou.

Výsledky:

— popis metody vyhodnocení dráždivosti při každém pozorování (např. ruční štěrbinová lampa, biomikroskop, fluorescein),

— údaje ve formě tabulky o reakcích na dráždivé nebo leptavé účinky u jednotlivých zvířat při každém pozorování až do vyjmutí každého zvířete ze zkoušky,

— podrobný popis stupně a charakteru pozorovaných dráždivých nebo leptavých účinků,

— popis všech dalších pozorovaných očních lézí (např. vaskularizace, tvorba zánětu rohovky, srůst sousedních tkání, zbarvení),

— popis místních a systémových nepříznivých účinků mimo oči, záznam o klinických příznacích bolesti a utrpení, digitální fotografie a případné histopatologické nálezy.

Diskuse o výsledcích.

Interpretace výsledků

Extrapolace výsledků studií dráždivých účinků na oči laboratorních zvířat na člověka je platná jen v omezené míře. Albinotický králík je ve většině případů na dráždivé a leptavé látky citlivější než člověk.

Je třeba dbát na to, aby byla při interpretaci údajů vyloučena dráždivost pramenící ze sekundární infekce.

LITERATURA

1) Barratt, M.D., *et al.* (1995), The Integrated Use of Alternative Approaches for Predicting Toxic Hazard, ECVAM Workshop Report 8, ATLA 23, 410-429.

2) de Silva, O., et al. (1997), Evaluation of Eye Irritation Potential: Statistical Analysis and Tier Testing Strategies, Food Chem. Toxicol 35, 159-164.

3) Worth A.P. and Fentem J.H. (1999), A general approach for evaluating stepwise testing strategies ATLA 27, 161-177.

4) Young, J.R., et al. (1988), Classification as Corrosive or Irritant to Skin of Preparations Containing Acidic or Alkaline Substance Without Testing on Animals, Toxicol. In Vitro, 2, 19-26.

5) Neun, D.J. (1993), Effects of Alkalinity on the Eye Irritation Potential of Solutions Prepared at a Single pH, J. Toxicol. Cut. Ocular Toxicol. 12, 227-231.

6) Fentem, J.H., et al. (1998), The ECVAM international validation study on in vitro tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team, Toxicology in vitro 12, s. 483-524.

7) Kapitola B.4 této přílohy, *Akutní dráždivé/leptavé účinky na kůži*.

▼**M7**

8) OECD (2000), Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. OECD Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 19. (http://www.oecd.org/ehs/test/monos.htm).

9) Wright EM, Marcella KL, Woodson JF. (1985), Animal pain: evaluation and control, Lab Animal, May/June, 20-36.

10) National Research Council (NRC) (2008), Recognition and Alleviation of Distress in Laboratory Animals, Washington, DC: The National Academies Press.

11) National Research Council (NRC) (2009), Recognition and Alleviation of Pain in Laboratory Animals, Washington, DC: The National Academies Press.

12) ICCVAM (2010), ICCVAM Test Method Evaluation Report: Recommendations for Routine Use of Topical Anesthetics, Systemic Analgesics, and Humane Endpoints to Avoid or Minimize Pain and Distress in Ocular Safety Testing, NIH Publication No. 10-7514, Research Triangle Park, NC, USA: National Institute of Environmental Health Sciences.

http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/OcuAnest- TMER.htm

13) Kapitola B.40 této přílohy, *Akutní dráždivé/leptavé účinky na kůži. zkouška transkutánního elektrického odporu (TER)*.

14) Kapitola B.40a této přílohy, *Leptavé účinky na kůži in vitro: zkouška pomocí modelu lidské kůže*.

15) OECD (2006), Test No. 435: In vitro Membrane Barrier Test Method for Skin corrosion, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Paris.

16) Kapitola B.47 této přílohy, Zkušební metoda pro zákal a propustnost rohovky u skotu pro zjišťování i) chemických látek vyvolávajících vážné poškození očí a ii) chemických látek, které není nutné klasifikovat jako látky mající dráždivé účinky na oči nebo vyvolávající vážné poškození očí.

17) Kapitola B.48 této přílohy, Zkušební metoda odděleného kuřecího oka pro zjišťování i) chemických látek vyvolávajících vážné poškození očí a ii) chemických látek, které není nutné klasifikovat jako látky mající dráždivé účinky na oči nebo vyvolávající vážné poškození očí.

18) U.S. EPA (2003), Label Review Manual: 3rd Edition, EPA737-B-96-001, Washington, DC: U.S., Environmental Protection Agency.

19) UN (2011), United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Third revised edition, UN New York and Geneva. United Nations Publications.

20) Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1272/2008 ze dne 16. prosince 2008 o klasifikaci, označování a balení látek a směsí, o změně a zrušení směrnic 67/548/EHS a 1999/45/ES a o změně nařízení (ES) č. 1907/2006. Úřední věstník Evropské unie L 535, s. 1–1355.

21) Agentura ECHA, ECHA Guidance on information requirements and chemical safety assessment, Chapter R.7a: Endpoint specific guidance.

http://echa.europa.eu/documents/10162/13632/information_requirements_r7a_en.pdf

▼M7

Tabulka 1

Stupnice očních lézí

Rohovka	Stupeň
Zákal: stupeň hustoty (vyšetří se nejvíce zakalené oblasti) (*)	
Žádné zvředovatění ani zákal	0
Rozptýlené nebo difúzní oblasti zákalu (jiné než slabé zastření normálního lesku), detaily duhovky jasně viditelné	1
Snadno identifikovatelná průhledná oblast, detaily duhovky lehce zastřené	2
Přítomnost zóny opalescence, detaily duhovky nejsou viditelné, velikost zornice stěží rozeznatelná	3
Úplná neprůhlednost rohovky, duhovka je zcela neviditelná	4
Maximální možná hodnota: 4	
Duhovka	
Normální	0
Výrazně prohloubené řasy, městnání, otok, střední překrvení kolem rohovky nebo překrvení při zánětu; rohovka reaguje na světlo (zpožděná reakce je považována za účinek)	1
Krvácení, makroskopické poškození nebo bez reakce na světlo	2
Maximální možná hodnota: 2	
Spojivky	
Zčervenání (podle nejzávažnější změny pozorované na víčkové nebo bulbární spojivce, kromě rohovky a duhovky)	
Normální	0
Některé krevní cévy hyperemické (překrvené)	1
Difúzní, rudá barva, jednotlivé cévy nesnadno rozeznatelné	2
Difúzní temně rudá barva	3
Maximální možná hodnota: 3	
Chemóza	
Otoky (týká se víček a/nebo slzných žláz)	
Normální	0
Slabě abnormální otok	1
Patrný otok, s částečným obrácením víček	2
Otok způsobující uzavření víček zhruba na polovinu	3
Otok způsobující uzavření víček více než na polovinu	4
Maximální možná hodnota: 4	

(*) Zaznamená se oblast zákalu rohovky.

▼M7

Dodatek

DEFINICE

Kyselá/alkalická rezerva: U acidních přípravků je to množství (v g) hydroxidu sodného/100 g přípravku, které je nutné k dosažení konkrétní hodnoty pH. U alkalických přípravků je to množství (v g) hydroxidu sodného odpovídající g kyseliny sírové/100 g přípravku, které je nutné k dosažení konkrétní hodnoty pH (Young *et al*. (1988)).

Chemická látka: Chemická substance nebo směs.

Nedráždivé látky: Látky, jež nejsou klasifikovány jako látky s dráždivými účinky na oči kategorie I, II, nebo III EPA; nebo jako látky s dráždivými účinky na oči kategorie 1, 2, 2A nebo 2B GHS; nebo jako kategorie 1 nebo 2 EU (17) (18) (19).

Látka s leptavými účinky na oči: a) Chemická látka, která způsobuje nevratné poškození oční tkáně; b) chemické látky, jež jsou klasifikovány jako látky s dráždivými účinky na oči kategorie 1 GHS nebo látky s dráždivými účinky na oči kategorie I EPA nebo kategorie 1 EU (17) (18) (19).

Látka s dráždivými účinky na oči: a) Chemická látka, která vyvolává vratnou změnu v oku; b) chemické látky, jež jsou klasifikovány jako látky s dráždivými účinky na oči kategorie II nebo III EPA; nebo látky s dráždivými účinky na oči kategorie 2, 2A nebo 2B GHS; nebo kategorie 2 EU (17) (18) (19).

Látka se silně dráždivými účinky na oči: a) Chemická látka, která způsobuje poškození oční tkáně, které nezmizí do 21 dnů od aplikace, nebo způsobuje závažné fyzické zhoršení vidění; b) chemické látky, jež jsou klasifikovány jako látky s dráždivými účinky na oči kategorie 1 GHS nebo látky s dráždivými účinky na oči kategorie I EPA nebo kategorie 1 EU (17) (18) (19).

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

Postupný přístup: Strategie postupného zkoušení, kde se všechny existující informace o zkoušené chemické látce přezkoumávají ve stanoveném pořadí s použitím hodnocení závažnosti důkazů na každém stupni, aby se zjistilo, zda jsou k dispozici dostačující informace pro rozhodnutí o klasifikaci nebezpečnosti, než se postoupí do dalšího stupně. Pokud lze potenciál dráždivých účinků zkoušené látky určit na základě existujících informací, další zkoušení není nutné. Jestliže potenciál dráždivých účinků zkoušené látky nelze určit na základě existujících informací, použije se postupný přístup zkoušení na zvířatech po krocích, dokud se nestanoví jednoznačná klasifikace.

Závažnost důkazů (postup): Silné a slabé stránky souboru informací se použijí jako základ pro vyvození závěrů, které z jednotlivých údajů nemusí být zjevné.

▼M7

DOPLNĚK ZKUŠEBNÍ METODY B.5 ([1])

STRATEGIE POSTUPNÉHO ZKOUŠENÍ DRÁŽDIVÝCH A LEPTAVÝCH ÚČINKŮ NA OČI

Obecné informace

V zájmu spolehlivého vědeckého přístupu a dobrého zacházení se zvířaty je důležité vyhýbat se zbytečnému používání zvířat a minimalizovat jakékoli zkoušky, které u zvířat pravděpodobně vyvolají závažné reakce. Veškeré informace týkající se potenciálních dráždivých/leptavých účinků chemické látky na oči by se měly zhodnotit před zvažováním zkoušení *in vivo*. Může již existovat dostatek důkazů pro klasifikaci zkoušené chemické látky podle jejích potenciálních dráždivých nebo leptavých účinků na oči, aniž by bylo nutné provádět zkoušky na laboratorních zvířatech. Proto využití analýzy závažnosti důkazů a strategie postupného zkoušení sníží potřebu provádět zkoušení *in vivo*, zejména pokud chemická látka pravděpodobně vyvolá závažné reakce.

Doporučuje se, aby se stávající informace týkající se dráždivých a leptavých účinků chemické látky na oči zhodnotily pomocí analýzy závažnosti důkazů, na jejímž základě se rozhodne o tom, zda by se k lepší charakteristice tohoto potenciálu měly provést další studie, jiné než oční studie *in vivo*. Jsou-li nutné další studie, doporučuje se využít strategie postupného zkoušení a jejím prostřednictvím získat relevantní experimentální údaje. U látek, které doposud nebyly zkoušeny, by se měla strategie postupného zkoušení využít k získání údajů, které jsou nezbytné k vyhodnocení jejich leptavých nebo dráždivých účinků na oči. Původní strategie zkoušení popsaná v tomto doplňku byla vypracována na semináři OECD (1). Následně byla tato strategie potvrzena a rozpracována v Harmonizovaném integrovaném systému klasifikace nebezpečnosti chemických látek pro lidské zdraví a jejich vlivu na životní prostředí, který schválilo 28. společné zasedání Výboru pro chemické látky a Pracovní skupiny pro chemické látky v listopadu 1998 (2) a aktualizovala skupina odborníků OECD v roce 2011.

Ačkoliv tato strategie zkoušení není nedílnou součástí zkušební metody B.5, vyjadřuje doporučovaný postup stanovení dráždivých/leptavých účinků na oči. Tento postup představuje nejlepší praktický i etický standard pro zkoušení dráždivých/leptavých účinků na oči *in vivo*. Zkušební metoda obsahuje pokyny pro provádění zkoušky *in vivo* a shrnuje faktory, kterým je nutno před zvažováním takové zkoušky věnovat pozornost. Strategie postupného zkoušení představuje přístup posuzování stávajících údajů o dráždivých a leptavých účincích chemických látek na oči a odstupňovaný přístup k získávání relevantních údajů o chemických látkách, u kterých je nutné provést další studie, nebo u nichž žádné studie nebyly doposud provedeny. Zkušební strategie zahrnuje provedení validovaných a uznaných zkoušek *in vitro* a *ex vivo* a poté, za specifických okolností, provedení studie zkušební metodou B.4 (3) (4).

Popis strategie zkoušení po krocích

Před zahájením zkoušek v rámci strategie postupného zkoušení (viz obrázek) se vyhodnotí veškeré dostupné informace, aby se mohlo rozhodnout o nutnosti provést zkoušku na očích *in vivo*. Ačkoliv lze podstatné informace získat z vyhodnocení jednotlivých parametrů (např. extrémní hodnota pH), stávající

([1]) K použití integrované strategie zkoušení dráždivých účinků na oči podle nařízení REACH viz též pokyny vydané agenturou ECHA *Guidance on information requirements and chemical safety assessment, Chapter R.7a: Endpoint specific guidance* (Pokyny ohledně požadavků na informace a pro posouzení chemické bezpečnosti, kapitola R.7a: Pokyny pro jednotlivé ukazatele) http://echa.europa.eu/documents/10162/13632/information_requirements_r7a_en.pdf

▼M7

informace by se měly hodnotit jako celek. Všechny relevantní údaje o účincích zkoušené chemické látky a jejích strukturních obdob se vyhodnotí na základě rozhodnutí založeného na posouzení závažnosti důkazů a toto rozhodnutí se zdůvodní. Zvláštní důraz by měl být kladen na již existující údaje o účincích chemické látky na člověka a na zvířata a dále na výsledky zkoušení *in vitro* nebo *ex vivo*. Studie žíravých chemických látek *in vivo* by se měly provádět co nejméně. Mezi faktory uvedené ve strategii zkoušení patří:

Hodnocení existujících údajů o účincích látky na člověka a/nebo na zvířata a/nebo údajů z validovaných a mezinárodně uznaných metod *in vitro* (krok 1).

Nejprve je nutné vzít v úvahu existující údaje o účincích na člověka, např. klinické studie a studie nemocí z povolání, záznamy subjektů hodnocení a/nebo údaje o zkouškách na zvířatech získané z očních studií a/nebo údaje z validovaných a mezinárodně uznaných metod zkoušení dráždivých/leptavých účinků na oči *in vitro*, protože z těchto dat lze získat informace přímo se vztahující k účinkům na oči. Poté se zhodnotí dostupné údaje ze studií na lidech a/nebo na zvířatech zabývajících se leptavými/dráždivými účinky na kůži a/nebo ze studií leptavých účinků na kůži *in vitro* provedených validovanými a mezinárodně uznanými metodami. Chemické látky, jejichž leptavé nebo vysoce dráždivé účinky na oči jsou známy, se do očí zvířat neaplikují. To platí rovněž pro chemické látky vykazující leptavé nebo dráždivé účinky na kůži; takové látky se považují za látky s leptavými a/nebo dráždivými účinky rovněž na oči. Chemické látky, o nichž byly v předchozích očních studiích získány dostatečné důkazy, že jsou nežíravé a nedráždivé, se v očních studiích *in vivo* také nezkoušejí.

Analýza vztahů mezi strukturou a biologickou aktivitou (SAR) (krok 2).

Vezmou se v úvahu výsledky zkoušek strukturně příbuzných chemických látek, jsou-li k dispozici. Pokud jsou k dispozici dostatečné údaje o účincích strukturně příbuzných látek nebo jejich směsí na člověka a/nebo zvířata naznačující, že mají potenciál leptavých/dráždivých účinků na oči, lze předpokládat, že zkoušená chemická látka vyvolá stejné reakce. V takových případech není nutné tuto chemickou látku zkoušet. Negativní údaje získané ze studií strukturně příbuzných látek nebo jejich směsí nezakládají podle strategie postupného zkoušení dostatečný důkaz nežíravosti/nedráždivosti látky. Ke stanovení potenciálu leptavých/dráždivých účinků na kůži a oči by měly být použity validované a uznané postupy vycházející z analýzy SAR.

Fyzikálně-chemické vlastnosti a chemická reaktivita (krok 3).

Chemické látky vykazující extrémní hodnoty pH jako $\leq 2{,}0$ nebo $\geq 11{,}5$ mohou mít silné místní účinky. Pokud se leptavé nebo dráždivé účinky látky na oči stanoví na základě extrémních hodnot pH, lze také vzít v úvahu kyselou/alkalickou rezervu (pufrační kapacitu) (5) (6) (7). Pokud lze podle pufrační kapacity soudit, že chemická látka zřejmě nemá leptavé účinky na oči (tj. chemické látky s extrémní hodnotou pH a nízkou kyselou/alkalickou rezervou), musí tento předpoklad potvrdit další zkoušky, pokud možno s využitím validované a uznané zkoušky *in vitro* nebo *ex vivo* (viz odstavec 10).

Zvážení dalších existujících informací (krok 4).

V této fázi se vyhodnotí veškeré dostupné informace o systémové toxicitě dermální cestou. Vezme se v úvahu také akutní dermální toxicita zkoušené chemické látky. Pokud se u zkoušené chemické látky ukázalo, že je při podání dermální cestou vysoce toxická, není nutné zkoušet ji na oku. Ačkoliv mezi akutní dermální toxicitou a dráždivými/leptavými účinky na oči nemusí nutně

▼M7

existovat souvislost, lze se domnívat, že pokud je látka při podání dermální cestou vysoce toxická, bude vysokou toxicitu vykazovat také při instilaci do oka. Takové údaje lze posoudit také mezi kroky 2 a 3.

Posouzení leptavých účinků chemické látky na kůži, je-li vyžadováno také pro účely regulace (krok 5).

Potenciál leptavých a silně dráždivých účinků na kůži by měl být nejprve vyhodnocen podle zkušební metody B.4 (4) a jejího doplňku (8), a to včetně použití validovaných a mezinárodně uznaných metod *in vitro* zkoušení leptavých účinků na kůži (9) (10) (11). Ukáže-li se, že chemická látka vyvolává leptavé nebo silně dráždivé účinky na kůži, lze mít také za to, že má leptavé nebo silně dráždivé účinky na oči. Další zkoušení by tak nebylo nutné. Pokud chemická látka leptavé nebo silně dráždivé účinky na kůži nemá, oční zkouška *in vitro* nebo *ex vivo* se provede.

Výsledky zkoušek *in vitro* nebo *ex vivo* (krok 6).

Chemické látky, které vykazovaly leptavé nebo silně dráždivé vlastnosti ve zkoušce *in vitro* nebo *ex vivo* (12) (13), která byla validována a mezinárodně uznána pro hodnocení výlučně leptavých/dráždivých účinků na oči, není nutné zkoušet na zvířatech. Lze předpokládat, že takové chemické látky vyvolají ve zkoušce *in vivo* podobné závažné účinky. Nejsou-li validované a uznané zkoušky *in vitro* / *ex vivo* k dispozici, krok 6 se přeskočí a přejde se přímo ke kroku 7.

Zkouška *in vivo* na králících (kroky 7 a 8).

Oční zkoušení *in vivo* se zahájí počáteční zkouškou na jednom zvířeti. Pokud výsledky této zkoušky naznačují, že chemická látka má silně dráždivé nebo leptavé účinky na oči, další zkoušení se neprovádí. Pokud zkouška žádné leptavé nebo silně dráždivé účinky neodhalí, provede se potvrzující zkouška na dvou dalších zvířatech. Podle výsledků potvrzující zkoušky mohou být nutné další zkoušky (viz zkušební metoda B.5).

▼M7

STRATEGIE ZKOUŠENÍ A HODNOCENÍ DRÁŽDIVÝCH/LEPTAVÝCH ÚČINKŮ NA OČI

	Aktivita	Nález	Závěr
1	Existující údaje o účincích látky na lidské nebo zvířecí oči a/nebo údaje z validovaných a mezinárodně uznaných metod *in vitro*	Závažné poškození očí	Dominantní ukazatel; považována za žíravou pro oči. Není nutné zkoušet.
		Dráždivá pro oči	Dominantní ukazatel; považována za dráždivou pro oči. Není nutné zkoušet.
		Nežíravá nebo nedráždivá pro oči	Dominantní ukazatel; považována za nedráždivou a nežíravou pro oči. Není nutné zkoušet.
	Existující údaje o leptavých účincích na lidskou a/nebo zvířecí kůži a/nebo údaje z validovaných a mezinárodně uznaných metod *in vitro*	Leptavé účinky na kůži	Předpoklad leptavých účinků na oči. Není nutné zkoušet.
	Existující údaje o silně dráždivých účincích na lidskou a/nebo zvířecí kůži a/nebo údaje z validovaných a mezinárodně uznaných metod *in vitro*	Silně dráždivé účinky na kůži	Předpoklad dráždivých účinků na oči. Není nutné zkoušet.
	↓		
	Nejsou k dispozici žádné informace, nebo informace nejsou přesvědčivé		
	↓		
2	Proveďte hodnocení leptavých/dráždivých účinků na oči podle analýzy SAR	Předpoklad závažného poškození očí	Předpoklad žíravosti pro oči. Není nutné zkoušet.
		Předpoklad dráždivých účinků na oči	Předpoklad dráždivosti pro oči. Není nutné zkoušet.
	Zvažte hodnocení leptavých účinků na kůži podle analýzy SAR	Předpoklad leptavých účinků na kůži	Předpoklad žíravosti pro oči. Není nutné zkoušet.
	↓		
	Nelze stanovit žádné předpoklady, nebo jsou předpoklady nepřesvědčivé nebo negativní		
	↓		
3	Změřte hodnotu pH (pufrační kapacita, je-li významná)	pH ≤ 2 nebo ≥ 11,5 (s vysokou pufrační kapacitou, pokud je významná)	Předpoklad žíravosti pro oči. Není nutné zkoušet.
	↓		
	2 < pH < 11,5, nebo pH ≤ 2,0 nebo ≥ 11,5 s nízkou/žádnou pufrační kapacitou, pokud je významná		
	↓		
4	Posuďte systémovou toxicitu dermální cestou	Vysoce toxické při koncentracích, které by byly zkoušeny na očích.	Chemická látka by byla pro zkoušení příliš toxická. Není nutné zkoušet.

▼M7

	Aktivita	Nález	Závěr
	↓		
	Takové informace nejsou k dispozici, nebo látka není vysoce toxická		
	↓		
5	Experimentálně vyhodnoťte potenciál žíravých účinků na kůži podle strategie zkoušení uvedené v kapitole B.4 této přílohy, je-li to vyžadováno také pro účely regulace.	Leptavé nebo silně dráždivé účinky	Předpoklad leptavých účinků na oči. Není třeba žádné další zkoušení.
	↓		
	Chemická látka není žíravá ani silně dráždivá pro kůži		
	↓		
6	Proveďte validovanou a uznanou zkoušku (zkoušky) účinků na oči *in vitro* nebo *ex vivo*	Leptavé nebo silně dráždivé účinky	Předpoklad leptavých nebo silně dráždivých účinků na oči, pokud lze provedenou zkoušku použít k identifikaci látek s leptavými / silně dráždivými účinky a chemická látka se nachází v oblasti použitelnosti zkoušky. Není třeba žádné další zkoušení.
		Dráždivé účinky	Předpoklad dráždivých účinků na oči, pokud lze provedenou zkoušku (zkoušky) použít ke správné identifikaci látek s leptavými, silně dráždivými a dráždivými účinky na oči a chemická látka se nachází v oblasti použitelnosti zkoušky. Není třeba žádné další zkoušení.
		Bez dráždivých účinků	Předpoklad nedráždivosti pro oči, pokud lze provedenou zkoušku (zkoušky) použít ke správné identifikaci látek bez dráždivých účinků, pokud lze tyto látky spolehlivě odlišit od chemických látek, které jsou látkami s dráždivými, silně dráždivými nebo leptavými účinky na oči, a pokud se chemická látka nachází v oblasti použitelnosti zkoušky. Není třeba žádné další zkoušení.
	↓		
	Validovanou a uznanou zkoušku (zkoušky) účinků na oči in vitro nebo ex vivo nelze k vyvození závěru použít		
	↓		

▼M7

	Aktivita	Nález	Závěr
7	Proveďte počáteční oční zkoušku na králících *in vivo* na jednom zvířeti	Závažné poškození očí	Považována za dráždivou pro oči. Není třeba žádné další zkoušení.
	↓		
	Žádné výrazné poškození, nebo žádná odezva		
	↓		
8	Proveďte potvrzující zkoušku na jednom nebo dalších dvou zvířatech	Žíravá nebo dráždivá	Považována za žíravou nebo dráždivou pro oči. Není třeba žádné další zkoušení.
		Nežíravá nebo nedráždivá	Považována za nedráždivou a nežíravou pro oči. Není třeba žádné další zkoušení.

LITERATURA

1) OECD (1996) OECD Test Guidelines Programme: Final Report of the OECD Workshop on Harmonization of Validation and Acceptance Criteria for Alternative Toxicological Test Methods. Held in Solna, Sweden, 22 – 24 January 1996 (http://www.oecd.org/ehs/test/background.htm).

2) OECD (1998) Harmonized Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances, as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals, November 1998 (http://www.oecd.org/ehs/Class/HCL6.htm).

3) Worth, A.P. and Fentem J.H. (1999). A General Approach for Evaluating Stepwise Testing Strategies. ATLA 27, 161-177.

4) Kapitola B.4 této přílohy, Akutní dráždivé/leptavé účinky na kůži.

5) Young, J.R., How, M.J., Walker, A.P., Worth W.M.H. (1988) Classification as Corrosive or Irritant to Skin of Preparations Containing Acidic or Alkaline Substance Without Testing on Animals. Toxicol. Chem. *In Vitro*, 2, 19-26.

6) Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Edsail, D.J., Holzhutter, H.G. and Liebsch, M. (1998) The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team. Toxicology *in vitro* 12, s. 483 – 524.

7) Neun, D.J. (1993) Effects of Alkalinity on the Eye Irritation Potential of Solutions Prepared at a Single pH. J. Toxicol. Cut. Ocular Toxicol. 12, 227-231.

8) Doplněk kapitoly B.4 této přílohy, Strategie postupného zkoušení dráždivých a leptavých účinků na kůži.

9) Kapitola B.40 této přílohy, Leptavé účinky na kůži *in vitro*: zkouška transkutánního elektrického odporu (TER).

10) Kapitola B.40a této přílohy, Leptavé účinky na kůži *in vitro*: zkouška pomocí modelu lidské kůže.

11) OECD (2006), *Test No. 435: In vitro Membrane Barrier Test Method for Skin corrosion*, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Paris.

▼**M7**

12) Kapitola B.47 této přílohy, *Zkušební metoda pro zákal a propustnost rohovky u skotu pro zjišťování i) chemických látek vyvolávajících vážné poškození očí a ii) chemických látek, které není nutné klasifikovat jako látky mající dráždivé účinky na oči nebo vyvolávající vážné poškození očí.*

13) Kapitola B.48 této přílohy, *Zkušební metoda odděleného kuřecího oka pro zjišťování i) chemických látek vyvolávajících vážné poškození očí a ii) chemických látek, které není nutné klasifikovat jako látky mající dráždivé účinky na oči nebo vyvolávající vážné poškození očí.*

▼B

B.6 SENZIBILIZACE KŮŽE

1. **METODA**

1.1 ÚVOD

Poznámky:

Citlivost zkoušek a jejich schopnost zjistit látky s možným senzibilizačním účinkem na lidskou kůži mají v systému klasifikace toxicity v oblasti veřejného zdraví velký význam.

Neexistuje jediná zkušební metoda, která by vhodným způsobem identifikovala všechny látky s potenciálním senzibilizačním účinkem na lidskou kůži a která by byla relevantní pro všechny látky.

Při výběru zkoušky musí být zváženy faktory, jako jsou fyzikální vlastnosti látky, včetně schopnosti pronikat kůží.

Byly vyvinuty dva typy zkoušek na morčatech: zkoušky s adjuvanty, ve kterých je alergický stav umocněn rozpuštěním nebo suspendováním zkoušené látky ve Freundově kompletním adjuvantu (FCA), a zkoušky bez adjuvantů.

Zkoušky s adjuvantem jsou pravděpodobně přesnější v předpovědi pravděpodobného senzibilizačního účinku na lidskou kůži než metody bez použití Freundova kompletního adjuvantu, a proto se jim dává přednost.

Maximalizační zkouška na morčatech (Guinea Pig Maximisation Test – GPMT) je velmi rozšířená zkouška s adjuvantem. Ačkoli lze použít několik dalších metod pro zjištění schopnosti látky vyvolat senzibilizační reakci kůže, je zkouška GMPT upřednostňovanou technikou s adjuvantem.

U mnoha skupin chemických látek jsou zkoušky bez adjuvantu (dává se přednost Bühlerově zkoušce) považovány za méně citlivé.

V určitých případech lze zdůvodnit Bühlerovu zkoušku s povrchovou aplikací spíše než intradermální injekci používanou v maximalizační zkoušce na morčatech. Pro použití Bühlerovy zkoušky by mělo být uvedeno vědecké zdůvodnění.

V této metodě jsou popsány maximalizační zkoušky na morčatech (GPMT) a Bühlerova zkouška. Jiné metody lze použít za předpokladu, že jsou spolehlivě validované a odborně odůvodněné.

Pokud je z uznávané screeningové zkoušky získán pozitivní výsledek, může být zkoušená látka označena za potenciální senzibilizátor a nemusí být nezbytné provést další zkoušku na morčatech. Jestliže však má taková zkouška negativní výsledek, musí být zkouška na morčatech provedena za použití postupu popsaného v této zkušební metodě.

Viz také obecný úvod, část B.

▼B

1.2 DEFINICE

Senzibilizace kůže: (alergická kontaktní dermatitida) je imunologicky zprostředkovaná kožní reakce na látku. U člověka mohou být reakce charakterizovány svěděním, zarudnutím kůže, otoky, pupenci, puchýřky, bulami nebo jejich kombinací. U jiných živočišných druhů se mohou reakce lišit a může být zjištěno pouze zarudnutí kůže nebo otok.

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

Indukční období: období nejméně jednoho týdne po indukční expozici, během něhož se může rozvinout stav přecitlivělosti.

Provokační expozice: experimentální expozice subjektu dříve vystaveného zkoušené látce po indukčním období s cílem stanovit, zda je reakce subjektu přecitlivělá.

1.3 REFERENČNÍ LÁTKY

Citlivost a spolehlivost použité zkušební metody by měla být posouzena každých šest měsíců za použití látek, o kterých je známo, že mají mírné až středně silné senzibilizační účinky na kůži.

U správně provedené zkoušky vyvolávají mírné/střední senzibilizátory zpravidla nejméně 30 % reakci při metodě s adjuvanty a nejméně 15 % reakci při metodě bez adjuvantů.

Přednostně jsou používány tyto látky:

Čísla CAS	Čísla EINECS	Názvy podle EINECS	Obecné názvy
101-86-0	202-983-3	α-hexylcinnamaldehyd	α-hexylcinnamaldehyd
149-30-4	205-736-8	2sulfanylbenzothiazol	kaptax
94-09-7	202-303-5	benzokain	nordkain

Za určitých okolností mohou být při dostatečném zdůvodnění použity jiné kontrolní látky splňující výše uvedená kritéria.

1.4 PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

Pokusným zvířatům je nejdříve aplikována zkoušená látka intradermálními injekcemi a/nebo epidermální aplikací (indukční expozice). Po období klidu 10 až 14 dnů (indukční období), v průběhu kterého se může rozvinout imunitní reakce, je zvířatům aplikována provokační dávka. Rozsah a stupeň kožní reakce pokusných zvířat na provokační expozici je porovnáván s rozsahem a stupněm reakce u kontrolních zvířat, která podstoupí negativní expozici v průběhu indukce a je jim aplikována provokační dávka.

1.5 POPIS ZKUŠEBNÍCH METOD

Pokud je považováno za nezbytné odstranit zkoušenou látku, použije se voda nebo vhodné rozpouštědlo, aniž by se změnila stávající reakce nebo integrita pokožky.

▼B

1.5.1 *Maximalizační zkouška na morčatech (GPMT)*

1.5.1.1 P ř í p r a v a

Zdravá mladá dospělá albinotická morčata se aklimatizují na laboratorní podmínky nejméně 5 dnů před zahájením zkoušky. Před zkouškou se provede náhodný výběr zvířat a zvířata se přiřadí do experimentálních a kontrolních skupin. Srst se odstraní stříháním, holením nebo chemickou depilací, v závislosti na použité zkušební metodě. Je třeba dbát na to, aby nedošlo k poškození kůže. Zvířata se zváží před zahájením zkoušky a na konci zkoušky.

1.5.1.2 Z k u š e b n í p o d m í n k y

1.5.1.2.1 Pokusná zvířata:

Použijí se běžně používané laboratorní kmeny albinotických morčat.

1.5.1.2.2 Počet a pohlaví

Použít lze samce i samice. Použité samice musí být nullipary a nesmí být březí.

Experimentální skupina se skládá nejméně z 10 zvířat a kontrolní skupina nejméně z 5 zvířat. Použije-li se méně než 20 experimentálních a 10 kontrolních morčat a není možné dojít k závěru, že je zkoušená látka senzibilizující, doporučuje se zkoušení na dalších zvířatech, aby byl celkový počet nejméně 20 experimentálních a 10 kontrolních zvířat.

1.5.1.2.3 Úrovně dávek

Koncentrace zkoušené látky použitá pro každou indukční expozici by měla být taková, aby ji zvířata systémově dobře snášela, a měla by být nejvyšší koncentrací vyvolávající mírné až střední podráždění kůže. Koncentrace použitá při provokační expozici by měla odpovídat nejvyšší dávce, která nevyvolává podráždění. V případě potřeby mohou být vhodné koncentrace stanoveny předběžnou studií na dvou nebo třech zvířatech. Pro tento účel by mělo být zváženo použití zvířat, kterým bylo podáno Freundovo kompletní adjuvans (FCA).

1.5.1.3 P o s t u p

1.5.1.3.1 Indukce

Den 0 – experimentální skupina

Tři dvojice intradermálních injekcí o objemu 0,1 ml se podají symetricky podle střední linie do lopatkové oblasti zbavené srsti.

Injekce 1: Freundovo kompletní adjuvans (FCA) smísené s vodou nebo fyziologickým roztokem v poměru 1: 1 obj.

Injekce 2: zkoušená látka ve vhodném vehikulu ve zvolené koncentraci.

Injekce 3: zkoušená látka ve zvolené koncentraci připravené ve směsi s FCA a vodou nebo fyziologickým roztokem v poměru 1: 1 obj.

Pro injekci 3 se látky rozpustné ve vodě rozpustí před smísením s FCA ve vodné fázi. Látky rozpustné v lipidech nebo nerozpustné látky se před smísením s vodnou fází suspendují v FCA. Konečná koncentrace zkoušené látky musí být stejná jako koncentrace použitá v injekci 2.

▼B

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

Den 0 – kontrolní skupina

Tři dvojice subkutánních injekcí o objemu 0,1 ml se podají na stejná místa jako u experimentálních zvířat.

Injekce 1: Freundovo kompletní adjuvans (FCA) smísené s vodou nebo fyziologickým roztokem v poměru 1: 1 obj.

Injekce 2: neředěné vehikulum.

Injekce 3: 50 % (m/V) směs vehikula se směsí FCA a vody nebo fyziologickém roztoku v poměru 1: 1 obj.

5.–7. den – experimentální a kontrolní skupiny

Přibližně dvacet čtyři hodin před povrchovou indukční aplikací, jestliže látka není dráždivá pro kůži, se po důkladném ostříhání a/nebo oholení nanese na zkušební plochu 0,5 ml 10 % natriumdodecylsulfátu ve vazelíně za účelem vyvolání místního podráždění.

6.–8. den – experimentální skupina

Zkušební plocha se opět zbaví srsti. Filtrační papír (2 × 4 cm) se plně napustí zkoušenou látkou ve vhodném vehikulu, přiloží se na zkušební plochu a udržuje se ve styku s kůží pomocí okluzivního obvazu po dobu 48 hodin. Výběr vehikula by měl být zdůvodněn. Pevné látky se jemně rozetřou a vpraví do vhodného vehikula. Kapaliny lze aplikovat přímo, je-li to vhodné.

6.–8. den – kontrolní skupina

Zkušební plocha se opět zbaví srsti. Na zkušební plochu se podobným způsobem nanese samotné vehikulum a udržuje se ve styku s kůží pomocí okluzivního plátku po dobu 48 hodin.

1.5.1.3.2 Provokace

20.–22. den – experimentální a kontrolní skupiny

Boky pokusných i kontrolních zvířat se zbaví srsti. Na jeden bok zvířete se aplikuje zkoušená látka v plátku nebo v komůrce a na druhý bok se může popřípadě umístit plátek nebo komůrka obsahující pouze vehikulum. Plátky se fixují ve styku s kůží pomocí okluzivního obvazu po dobu 24 hodin.

Pozorování a hodnocení: experimentální a kontrolní skupiny

— Přibližně 21 hodin po odstranění plátku se provokační plocha očistí, důkladně ostříhá a/nebo oholí a v případě potřeby depiluje,

— přibližně po 3 hodinách (přibližně 48 hodin od začátku aplikace provokační dávky) se pozoruje kožní reakce a zaznamená se podle stupnice uvedené v dodatku,

— přibližně 24 hodin po tomto pozorování se provede druhé pozorování (72 hodin) a opět se zaznamená reakce kůže.

Doporučuje se provádět pozorování „naslepo“ u pokusných i kontrolních zvířat.

Pokud je to nezbytné pro objasnění výsledků získaných při první provokaci, měla by být přibližně jeden týden po první provokaci zvážena druhá provokace (tj. opakovaná provokace), v případě potřeby s novou kontrolní skupinou. Opakovaná provokace může být provedena také na původní kontrolní skupině.

▼B

Pozorování a zaznamenávání všech kožních reakcí a neobvyklých nálezů, včetně systémových reakcí, které jsou důsledkem indukčních a provokačních postupů, by měla být prováděna podle stupnice Magnussona/Kligmana (viz dodatek). Pro objasnění nejasných reakcí mohou být provedeny jiné postupy, např. histopatologické vyšetření nebo měření tloušťky kožní řasy.

1.5.2 *Bühlerova zkouška*

1.5.2.1 P ř í p r a v a

Zdravá mladá dospělá albinotická morčata se aklimatizují na laboratorní podmínky nejméně 5 dnů před zahájením zkoušky. Před zkouškou se provede náhodný výběr zvířat a zvířata se přiřadí do experimentálních a kontrolních skupin. Srst se odstraní stříháním, holením nebo chemickou depilací, v závislosti na použité zkušební metodě. Je třeba dbát na to, aby nedošlo k poškození kůže. Zvířata se zváží před zahájením zkoušky a na konci zkoušky.

1.5.2.2 Z k u š e b n í p o d m í n k y

1.5.2.2.1 Pokusná zvířata

Používají se běžně používané laboratorní kmeny albinotických morčat.

1.5.2.2.2 Počet a pohlaví

Použít lze samce i samice. Použité samice musí být nullipary a nesmí být březí.

Experimentální skupina se skládá nejméně z 20 zvířat a kontrolní skupina nejméně z 10 zvířat.

1.5.2.2.3 Úrovně dávek

Koncentrace zkoušené látky použitá pro každou indukční expozici by měla být tou nejvyšší koncentrací, která vyvolá mírné, ne však silné podráždění kůže. Koncentrace použitá při provokační expozici by měla odpovídat nejvyšší koncentraci, která nevyvolává podráždění. V případě potřeby mohou být vhodné koncentrace stanoveny předběžným pokusem na dvou nebo třech zvířatech.

Pro zkoušené látky rozpustné ve vodě je vhodné používat jako vehikulum vodu nebo nedráždivé zředěné roztoky povrchově aktivní látky. Pro ostatní zkoušené látky se upřednostňuje roztok 80 % alkoholu ve vodě pro indukci a aceton pro provokaci.

1.5.2.3 P o s t u p

1.5.2.3.1 Indukce

Den 0 – experimentální skupina

Jeden bok se zbaví srsti (důkladně se ostříhá). Zkušební plátek by měl být důkladně napuštěn zkoušenou látkou ve vhodném vehikulu (výběr vehikula musí být zdůvodněn; tekuté zkoušené látky mohou být podle potřeby aplikovány neředěné).

Zkušební plátek se přiloží na zkušební plochu a po dobu 6 hodin se udržuje ve styku s kůží okluzivním plátkem nebo komůrkou a vhodným obvazem.

▼B

Systém s plátkem musí být okluzivní. Vhodný je bavlněný polštářek, může být kruhový nebo čtvercový, ale měl by mít velikost přibližně 4–6 cm^2. Pro zajištění okluze je vhodné použít vhodnou fixaci. Jsou-li použity obvazy, mohou být nezbytné dodatečné expozice.

Den 0 – kontrolní skupina

Jeden bok se zbaví srsti (důkladně se ostříhá). Na zkušební plochu se nanese vehikulum podobným způsobem jako u experimentální skupiny. Zkušební plátek se po dobu 6 hodin udržuje ve styku s kůží pomocí okluzivního plátku nebo komůrky a vhodného obvazu. Pokud je možné prokázat, že kontrolní skupina podrobená negativní expozici není nezbytná, lze použít neexponovanou kontrolní skupinu.

6.–8. a 13.–15. den – experimentální a kontrolní skupina

Provede se stejná aplikace jako v den 0 na stejnou zkušební plochu (v případě potřeby zbavenou srsti) na tentýž bok, a to 6.–8. den a opět 13.–15. den.

1.5.2.3.2 Provokace

27.–29. den – experimentální a kontrolní skupina

Neošetřený bok pokusných a kontrolních zvířat se zbaví srsti (důkladně se ostříhá). Okluzivní plátek nebo komůrka obsahující příslušné množství zkoušené látky v nejvyšší nedráždivé koncentraci se aplikuje na zadní část neošetřeného boku pokusných a kontrolních zvířat.

Na přední část neošetřeného boku pokusných a kontrolních zvířat se popřípadě aplikuje okluzivní plátek nebo komůrka jen s vehikulem. Plátky nebo komůrky se po dobu 6 hodin fixují ve styku s kůží pomocí vhodného obvazu.

1.5.2.3.3 Pozorování a hodnocení

— Přibližně 21 hodin po odstranění plátku se provokační plocha zbaví srsti,

— přibližně po třech hodinách (přibližně 30 hodin po aplikaci provokačního plátku) se pozorují kožní reakce a zaznamenají se podle stupnice uvedené v dodatku,

— přibližně 24 hodin po 30hodinovém pozorování (přibližně 54 hodin po aplikaci provokačního plátku) se opět pozorují kožní reakce a zaznamenají se.

Doporučuje se provádět pozorování „naslepo“ u pokusných i kontrolních zvířat.

Pokud je to nezbytné pro objasnění výsledků získaných při první provokaci, měla by být přibližně jeden týden po první provokaci zvážena druhá provokace (tj. opakovaná provokace), v případě potřeby s novou kontrolní skupinou. Opakovaná provokace může být provedena také na původní kontrolní skupině.

▼B

Pozorování a zaznamenávání všech kožních reakcí a neobvyklých nálezů, včetně systémových reakcí, které jsou důsledkem indukčních a provokačních postupů, by měla být prováděna podle stupnice Magnussona/Kligmana (viz dodatek). Pro objasnění nejasných reakcí mohou být provedeny jiné postupy, např. histopatologické vyšetření nebo měření tloušťky kožní řasy.

2. **ÚDAJE (GPMT A BÜHLEROVA ZKOUŠKA)**

Údaje se shrnou do tabulky, přičemž se pro každé zvíře uvedou kožní reakce při každém pozorování.

3. **ZPRÁVY (GPMT A BÜHLEROVA ZKOUŠKA)**

Pokud byla před zkouškou na morčatech provedena screeningová zkouška (např. zkouška ztluštění ucha u myší (MEST)), musí být s výsledky získanými se zkoušenými a referenčními látkami uveden popis této zkoušky nebo odkaz na tuto zkoušku, včetně podrobných informací o postupu.

Protokol o zkoušce (GMPT a Bühlerova zkouška)

Protokol o zkoušce má pokud možno obsahovat tyto údaje:

Pokusná zvířata:

— použitý kmen morčat,

— počet, stáří a pohlaví zvířat,

— původ, podmínky chovu, strava atd.,

— hmotnost jednotlivých zvířat na začátku zkoušky.

Zkušební podmínky:

— technika přípravy oblasti kůže, na kterou se nanese náplast,

— podrobné údaje o materiálech použitých na náplasti a technice aplikování náplastí,

— výsledek předběžné studie a závěr týkající se indukčních a provokačních koncentrací, které byly při zkoušce použity,

— podrobné údaje o přípravě, aplikaci a odstranění zkoušené látky,

— zdůvodnění volby vehikula,

— koncentrace vehikula a zkoušené látky použité pro indukční a provokační expozice a celkové množství látky použité pro indukci a provokaci.

Výsledky:

— souhrn výsledků poslední kontroly citlivosti a spolehlivosti (viz 1.3), včetně informací o použité látce, koncentraci a vehikulu,

▼B

— posuzování jednotlivých zvířat, včetně systému klasifikace,

— podrobný popis charakteru a stupně pozorovaných účinků,

— všechny histopatologické nálezy.

Rozbor výsledků.

Závěry.

4. **LITERATURA**

Metoda je analogická metodě OECD TG 406.

▼B

Dodatek

TABULKA

Stupnice Magnussona/Kligmana pro hodnocení kožních reakcí na provokační expozici

0 = žádná viditelná změna

1 = slabé nebo skvrnité zarudnutí kůže

2 = mírné a splývající zarudnutí kůže

3 = intenzivní zarudnutí a zduření kůže

▼M4

B.7 STUDIE ORÁLNÍ TOXICITY U HLODAVCŮ – 28DENNÍ OPAKOVANÁ APLIKACE

ÚVOD

1. Tato zkušební metoda odpovídá Pokynům OECD pro zkoušení (TG) 407 (2008). Původní Pokyny pro provádění testů 407 byly schváleny v roce 1981. V roce 1995 byla schválena revidovaná verze obsahující pokyny k získání dalších informací o zvířeti používaném ve studii, zejména o neurotoxicitě a imunotoxicitě.

2. V roce 1998 zahájila OECD činnost s vysokou prioritou, a sice revizi stávajících Pokynů pro provádění testů a vývoj nových Pokynů pro zkoušení určených ke screeningu a zkouškám potenciálních endokrinních disruptorů (8). Součástí této činnosti byla aktualizace stávajících pokynů OECD pro „studii orální toxicity u hlodavců – 28denní opakovaná aplikace“ (TG 407) doplněním parametrů vhodných k detekci endokrinního působení zkoušených chemických látek. Tento postup prošel rozsáhlým mezinárodním programem, při němž se zkoušela relevance a praktičnost těchto doplňujících parametrů, funkčnost těchto parametrů u chemických látek s (anti)estrogenním, (anti)androgenním a (anti)tyreoidálním působením, vnitrolaboratorní a mezilaboratorní reprodukovatelnost a interference nových parametrů s parametry požadovanými předchozími pokyny TG 407. Získá se velké množství údajů, které jsou shrnuty a podrobně vyhodnoceny v souhrnné zprávě OECD (9). Tato aktualizovaná zkušební metoda B.7 (odpovídající TG 407) je výsledkem zkušeností a výsledků shromážděných v rámci mezinárodního zkušebního programu. Tato zkušební metoda umožňuje zkoumat souvislosti mezi určitými endokrinními účinky a jinými toxikologickými účinky.

VÝCHOZÍ ÚVAHY A OMEZENÍ

3. Při posuzování a hodnocení toxických vlastností chemické látky lze po získání prvních informací o toxicitě ze zkoušek akutní toxicity pomocí opakované aplikace dávek stanovit orální toxicitu. Tato zkušební metoda je určena ke zkoumání účinků toxicity u velmi širokého spektra potenciálních cílových míst. Poskytuje informace o možných rizicích pro zdraví, které mohou pravděpodobně vzniknout při opakované expozici v relativně omezeném časovém období, včetně účinků na nervový, imunitní a endokrinní systém. S ohledem na tyto konkrétní cílové parametry by tato metoda měla identifikovat chemické látky s neurotoxickým potenciálem, které mohou vyžadovat jeho další důkladné prozkoumání, a chemické látky působící na štítnou žlázu. Rovněž může poskytnout údaje o chemických látkách, které působí na samčí a/nebo samičí pohlavní orgány u mladých dospělých zvířat, a mohou se pomocí ní zjistit imunologické účinky látek.

4. Výsledky této zkušební metody B.7 by se měly použít k identifikaci nebezpečnosti a posouzení rizik. Výsledky získané pro parametry související s endokrinním působením by se měly interpretovat v kontextu „koncepčního rámce OECD pro zkoušky a hodnocení chemických látek způsobujících endokrinní poruchy“ (11). Tato metoda se skládá ze základní studie toxicity po opakovaných dávkách, kterou lze použít u chemických látek, u nichž není důvod pro 90denní studii (např. když objem výroby nepřekračuje určité limity) nebo jako předběžnou studii k dlouhodobé studii. Expozice by měla trvat 28 dní.

▼M4

5. Mezinárodní program validace parametrů vhodných k potenciální detekci endokrinního působení zkoušené chemické látky ukázal, že kvalita údajů získaných touto zkušební metodou B.7 bude velmi záviset na zkušenostech laboratoře provádějící zkoušku. Týká se to konkrétně histopatologického určení cyklických změn v samičích pohlavních orgánech a stanovení hmotnosti malých orgánů závislých na hormonech, které se obtížně pitvají. Byly vyvinuty pokyny k histopatologickému vyšetření (19). K dispozici jsou na veřejných webových stránkách OECD věnovaných pokynům pro zkoušení (Test Guidelines). Mají za cíl pomoci patologům při vyšetřování a pomoci zvýšit citlivost rozborů. Byla nalezena řada různých parametrů svědčících o toxicitě pro endokrinní systém a tyto parametry byly začleněny do zkušební metody. Parametry, u nichž nebyl k dispozici dostatek údajů k ověření jejich použitelnosti nebo které vykazovaly pouze slabou průkaznost ve validačním programu hodnotícím jejich schopnost pomoci detekovat endokrinní disruptory, jsou navrženy jako volitelné cílové parametry (viz dodatek 2).

6. Na základě údajů získaných ve validačním postupu je nutné zdůraznit, že citlivost tohoto stanovení není dostatečná pro identifikaci všech látek s (anti)androgenními nebo (anti)estrogenními účinky (9). Tato zkušební metoda se neprovádí ve fázi života, v které je endokrinní systém nejcitlivější na poškození. Nicméně během validačního postupu tato metoda identifikovala látky, které slabě nebo silně ovlivňují funkci štítné žlázy a látky, které vykazují silný nebo středně silný endokrinní účinek prostřednictvím estrogenových nebo adrogenových receptorů, ve většině případů však byla neúspěšná při identifikaci endokrinně působících látek, které účinkují slabě na estrogenové nebo androgenové receptory. Nelze ji tudíž označit za screeningové stanovení endokrinního působení.

7. Nepřítomnost účinků souvisejících s těmito mechanismy působení proto nelze pokládat za důkaz nepřítomnosti účinků na endokrinní systém. Co se týká účinků zprostředkovaných endokrinní cestou, neměla by se tedy charakterizace látky zakládat pouze na výsledcích této zkušební metody, nýbrž by se měly tyto výsledky použít v rámci přístupu zvažování závažnosti důkazů, který používá všechny stávající údaje o chemické látce k charakterizaci jejího potenciálního endokrinního působení. Z tohoto důvodu by mělo regulační rozhodování o endokrinním působení (charakterizaci látky) vycházet z široké škály údajů, a nemělo by se opírat pouze o výsledky získané touto zkušební metodou.

8. Uznává se, že veškeré postupy používající zvířata musí splňovat místní normy péče o zvířata. Popisy péče a zacházení uvedené níže jsou minimálními standardy a budou nahrazeny místními předpisy, pokud ty jsou přísnější. Další pokyny o humánním zacházení se zvířaty poskytuje OECD (14).

9. Použité definice jsou uvedeny v dodatku 1.

PODSTATA ZKOUŠKY

10. Zkoušená chemická látka se denně orálně podává v odstupňovaných dávkách několika skupinám pokusných zvířat; každé skupině se podává jedna úroveň dávky po dobu 28 dnů. V průběhu období podávání se zvířata každý den pečlivě pozorují, aby se zjistily příznaky toxicity. Zvířata, která v průběhu zkoušky uhynula nebo byla utracena, se pitvají a na konci zkoušky se utratí zvířata, která přežila, a rovněž se pitvají. 28denní studie poskytuje informace o účincích opakované orální expozice a může se ukázat, že jsou třeba další dlouhodobé studie. Také může poskytnout informace o výběru koncentrací pro dlouhodobé studie. Údaje získané použitím

▼M4

této zkušební metody by měly umožnit charakterizaci toxicity zkoušené chemické látky, určení vztahu mezi dávkou a odezvou a stanovení hladiny bez pozorovaného nepříznivého účinku ((NOAEL).

POPIS METODY

Výběr zvířecích druhů

11. Dává se přednost potkanům, ale lze použít i jiný druh hlodavců. Jestliže se parametry uvedené v této zkušební metodě B.7 zkoumají u jiných druhů hlodavců, mělo by se podat podrobné zdůvodnění. Přestože je biologicky možné, že jiné druhy budou reagovat na toxické látky podobným způsobem jako potkan, použití menších druhů může vést ke zvýšené variabilitě v důsledku technické obtížnosti pitvy menších orgánů. V mezinárodním validačním programu detekce endokrinních disruptorů byl jediným použitým druhem potkan. Měla by se použít mladá zdravá dospělá zvířata běžně používaných laboratorních kmenů. Samice musí být nullipary a nesmí být březí. Podávání látky by mělo začít co nejdříve po odstavení a v každém případě dříve, než zvířata dosáhnou stáří devíti týdnů. Na začátku studie by měly být odchylky hmotnosti zvířat minimální a neměly by překročit ± 20 % průměrné hmotnosti pro každé pohlaví. Provádí-li se studie opakovaného orálního podávání látky jako předběžná studie pro dlouhodobou studii, měla by se v obou studiích použít nejlépe zvířata stejného kmene a stejného původu.

Umístění a krmení zvířat

12. Všechny postupy by měly splňovat místní standardy péče o laboratorní zvířata. Teplota v místnosti pro pokusná zvířata by měla být 22 °C (± 3 °C). Relativní vlhkost vzduchu by měla být minimálně 30 % a pokud možno nepřesáhnout 70 % kromě doby čištění místnosti. Cílem by měla být hodnota 50–60 %. Osvětlení by mělo být umělé a mělo by se střídat 12 hodin světla a 12 hodin tmy. Ke krmení lze použít konvenční laboratorní krmivo s neomezenou dodávkou pitné vody. Výběr krmiva může být ovlivněn potřebou zajistit vhodnou přísadu zkoušené chemické látky, podává-li se látka tímto způsobem. Zvířata by měla být chována v malých skupinkách stejného pohlaví. Je-li to vědecky odůvodněné, mohou být zvířata umístěna jednotlivě. Při chovu zvířat v klecích by v jedné kleci nemělo být umístěno více než pět zvířat.

13. Krmivo by se mělo pravidelně analyzovat, aby se zjistila přítomnost kontaminantů. Vzorek stravy by se měl uchovávat až do dokončení zprávy.

Příprava zvířat

14. Zdravá mladá dospělá zvířata se náhodně přiřadí do kontrolních a experimentálních skupin. Klece by měly být uspořádány tak, aby byl případný vliv jejich polohy minimalizován. Zvířata se jednoznačně identifikují a před započetím studie se nechají v laboratorních podmínkách alespoň pět dní aklimatizovat.

Příprava dávek

15. Zkoušená chemická látka se podává žaludeční sondou nebo v krmivu či v pitné vodě. Metoda orálního podání závisí na účelu studie a na fyzikálních/chemických/toxikokinetických vlastnostech zkoušeného materiálu.

▼M4

16. Zkoušená chemická látka se v případě potřeby rozpustí nebo suspenduje ve vhodném nosiči. Kdykoli je to možné, doporučuje se zvážit nejprve použití vodného roztoku/suspenze, poté použití olejového roztoku/emulze (např. kukuřičného oleje) a nakonec roztoku v jiných nosičích. U nosičů jiných než voda je nutné znát jejich toxické vlastnosti. Měla by se stanovit stabilita zkoušené chemické látky v daném nosiči.

POSTUP

Počet a pohlaví zvířat

17. Pro každou úroveň dávky by se mělo použít nejméně deset zvířat (pět samic a pět samců). Pokud se budou zvířata utrácet v průběhu studie, je nutno zvýšit celkový počet zvířat o počet zvířat, která budou utracena před ukončením studie. Mělo by se zvážit přidání další satelitní skupiny deseti zvířat (pět zvířat od každého pohlaví) do kontrolní skupiny a do skupiny s nejvyšší dávkou, aby se po dobu nejméně 14 dní po ukončení aplikace mohla sledovat vratnost, přetrvávání nebo opožděný nástup toxických účinků.

Dávkování

18. Obecně by se měly použít nejméně tři experimentální a jedna kontrolní skupina, ale pokud se na základě vyhodnocení jiných údajů neočekávají žádné účinky při dávce 1 000 mg/kg tělesné hmotnosti na den, může se provést limitní zkouška. Nejsou-li dostupné žádné vhodné údaje, může se provést předběžná studie (na zvířatech stejného kmene a původu) pro stanovení rozmezí dávek, které mají být použity. S výjimkou aplikace zkoušené chemické látky je třeba se zvířaty v kontrolní skupině zacházet stejným způsobem jako se zvířaty v experimentální skupině. Používá-li se pro usnadnění aplikace zkoušené chemické látky nosič, podává se kontrolní skupině nosič v nejvyšším použitém objemu.

19. Při výběru úrovní dávek by se měly vzít v úvahu veškeré existující údaje o toxických a (toxiko)kinetických vlastnostech, které jsou pro zkoušenou chemickou látku nebo příbuzné chemické látky dostupné. Nejvyšší úroveň dávky by se měla zvolit tak, aby vyvolala toxické účinky, ne však uhynutí nebo velké utrpení. Poté by se měla zvolit sestupná řada úrovní dávek, aby se prokázaly účinky související s dávkou a nepřítomnost nepříznivých účinků při nejnižší úrovni dávky (NOAEL). Pro nastavení sestupných úrovní dávek bývá optimální dvoj- až čtyřnásobný interval mezi dávkami a často je vhodnější přidat čtvrtou experimentální skupinu než použít velmi velké intervaly (odpovídající např. koeficientu většímu než 10).

20. V přítomnosti pozorované obecné toxicity (např. snížená tělesná hmotnost, účinky na játra, srdce, plíce nebo ledviny atd.) nebo jiných změn, které nemusí být odezvou na toxicitu (např. snížený příjem krmiva, zvětšení jater), je třeba pozorované účinky na imunitní, neurologické nebo endokrinní citlivé cílové parametry interpretovat obezřetně.

Limitní zkouška

21. Pokud zkouška provedená podle postupů popsaných v této studii při jedné dávce nejméně 1 000 mg na kg tělesné hmotnosti na den nebo v případě podávání v krmivu nebo v pitné vodě v odpovídající koncentraci (na základě stanovení tělesné hmotnosti) nevyvolá pozorovatelné toxické účinky a pokud se na základě údajů o chemických látkách s podobnou strukturou nepředpokládá toxicita, není úplná studie za použití tří úrovní dávek nutná. Limitní zkouška se použije s výjimkou případu, kdy údaje o expozici člověka naznačují, že je nezbytné použití vyšší úrovně dávek.

▼M4

Podávání dávek

22. Zkoušená chemická látka se zvířatům podává denně 7 dní v týdnu po dobu 28 dnů. Pokud se zkoušená chemická látka podává nitrožaludečně, podává se zvířatům v jediné dávce za použití žaludeční sondy nebo vhodné intubační kanyly. Maximální objem kapaliny, kterou lze jednorázově podat, závisí na velikosti pokusného zvířete. Toto množství by nemělo překročit 1 ml/100 g tělesné hmotnosti, s výjimkou vodných roztoků, kde lze použít 2 ml/100 g tělesné hmotnosti. Kromě dráždivých nebo žíravých chemických látek, u kterých se ve vyšších koncentracích stupňují účinky, by měly být rozdíly ve zkušebním objemu minimalizovány úpravou koncentrace tak, aby byl při všech úrovních dávek podáván konstantní objem.

23. U látek podávaných v krmivu nebo v pitné vodě je důležité zajistit, aby množství použité zkoušené chemické látky neovlivňovalo normální výživu nebo vodní rovnováhu. Podává-li se zkoušená chemická látka v krmivu, může se použít buď konstantní koncentrace (v ppm), nebo konstantní dávkování vzhledem k tělesné hmotnosti zvířete; použitá možnost musí být specifikována. U látky podávané prostřednictvím žaludeční sondy je třeba dávku podávat každý den přibližně ve stejnou dobu a alespoň jednou týdně ji přizpůsobit tak, aby se udržela konstantní úroveň dávky vzhledem k tělesné hmotnosti zvířete. Pokud se studie s opakovaným podáváním provádí jako předběžná studie k dlouhodobé studii, měla by se v obou studiích použít stejná krmivo.

Pozorování

24. Doba pozorování by měla být 28 dnů. Zvířata v satelitní skupině určená pro následná pozorování by měla být po dalších nejméně 14 dnů bez aplikace, aby se zachytil opožděný nástup, přetrvávání nebo zotavení se z toxických účinků.

25. Všeobecné klinické pozorování by se mělo provádět nejméně jednou denně, nejlépe ve stejnou dobu (stejné doby) a s uvážením doby očekávaného maxima účinku po podání látky. Měl by se zaznamenat zdravotní stav zvířat. Nejméně dvakrát denně se provede prohlídka všech zvířat za účelem zjištění morbidity a mortality.

26. Před expozicí látce a dále nejméně jednou týdně by se mělo provést důkladné klinické vyšetření všech zvířat (za účelem intraindividuálního porovnání). Toto pozorování by se mělo provádět mimo chovnou klec ve standardním pozorovacím prostoru a nejlépe pokaždé ve stejnou dobu. Pozorování by se měla pečlivě zaznamenávat, nejlépe za použití systému bodování explicitně definovaného ve zkušební laboratoři. Mělo by se usilovat o to, aby rozdíly ve zkušebních podmínkách byly co nejmenší a aby vyšetření prováděly nejlépe osoby, které nevědí, jakým testem zvířata procházejí. Vyšetření by mělo mimo jiné zahrnovat změny kůže, srsti, očí a sliznic, výskyt sekretů a exkretů a vegetativní funkce (slzení, zježení srsti, velikost zornic, nezvyklé dýchání). Zaznamenávat by se měly změny chůze, držení těla a reakce na manipulaci, dále přítomnost klonických a tonických pohybů, stereotypů v chování (např. nadměrného čištění nebo opakovaného kroužení) nebo bizarního chování (např. sebepoškozování, chůze pozpátku) (2).

27. Ve čtvrtém týdnu expozice látce by se měly vyšetřit reakce na různé smyslové podněty (2) (např. sluchové, zrakové, proprioceptivní), (3), (4), (5), síla úchopu (6) a motorická aktivita (7). Další informace o postupech, které lze použít, jsou uvedeny v příslušné literatuře. Místo postupů popsaných v této literatuře však lze použít také alternativní postupy.

▼M4

28. Pozorování funkčních poruch ve čtvrtém týdnu expozice látce lze případně vynechat, pokud je studie prováděna jako předběžná pro následnou subchronickou (90denní) studii. V takovém případě by se mělo pozorování funkčních poruch zahrnout do této dlouhodobé studie. Dostupnost údajů o pozorovaných funkčních poruchách ze studie opakovaného podávání dávky může na druhé straně usnadnit výběr úrovní dávek pro následnou subchronickou studii.

29. Pozorování funkčních poruch lze výjimečně vynechat u skupin, které vykazují příznaky toxicity v takové míře, že by při posuzování funkčního stavu vadily.

30. Při pitvě lze určit estrální cyklus všech samic (volitelné) odebráním vaginálních stěrů. Tato pozorování poskytnou informace ohledně fáze estrálního cyklu v čase utracení zvířete a pomohou při histologickém vyšetření tkání citlivých na estrogen [viz pokyny k histopatologickému vyšetření (19)].

Tělesná hmotnost a spotřeba krmiva/vody

31. Všechna zvířata by se měla nejméně jednou týdně zvážit. Měření spotřeby krmiva by se mělo provádět nejméně jednou týdně. Pokud se látka podává v pitné vodě, měla by se nejméně jednou týdně měřit také spotřeba vody.

Hematologická vyšetření

32. Na konci zkoušky by se měla provést tato hematologická vyšetření: stanovení hematokritu, koncentrace hemoglobinu, počtu erytrocytů, retikulocytů, celkového počtu a diferenciálního rozpočtu leukocytů a trombocytů a stanoví se protrombinový čas. Jestliže zkoušená chemická látka nebo její domnělé metabolity mají oxidační vlastnosti nebo existuje podezření, že je mají, měly by se stanovit také koncentrace methemoglobinu a Heinzových tělísek.

33. Krevní vzorky by se měly odebírat z určeného místa těsně před utracením zvířat nebo v jeho průběhu a měly by se skladovat za vhodných podmínek. Zvířata by se měla před utracením ponechat přes noc nalačno ([1]).

Biochemické vyšetření

34. Klinické biochemické analýzy za účelem vyšetření hlavních toxických účinků na tkáně, a zejména účinků na játra a ledviny, by se měly provést na krevních vzorcích odebraných všem zvířatům těsně před utracením nebo v jeho průběhu (kromě zvířat nalezených v agónii a/nebo utracených před dokončením studie). Vyšetření plazmy a séra obsahuje stanovení sodíku, draslíku, glukózy, celkového cholesterolu, močoviny, kreatininu, celkových bílkovin a albuminu, nejméně dvou enzymů indikujících účinky na jaterní buňky (jako je alaninaminotransferáza, aspartátaminotransferáza, alkalická fosfatáza, gama-glutamyltranspeptidáza a glutamátdehydrogenáza) a žlučových kyselin. Stanovení dalších enzymů (jaterního nebo jiného původu) a bilirubinu může za určitých okolností poskytnout užitečné informace.

35. Dále je možné v průběhu posledního týdne studie provést následující analýzy moči za použití časově definovaného sběru: vzhled, objem, osmolalita nebo specifická hmotnost, pH, bílkoviny, glukóza a krev/krvinky.

([1]) Pro řadu vyšetření séra a plazmy, zejména na glukózu, by bylo vhodné ponechat zvířata nalačno přes noc. Hlavním důvodem je, že u nehladovějících zvířat je vyšší variabilita výsledků, která by mohla maskovat jemné změny a ztížit interpretaci. Na druhé straně může mít hladovění přes noc vliv na celkový metabolismus zvířat a může narušit každodenní expozici zkoušené chemické látce, zejména ve studiích s podáváním látky v krmivu. Pokud se krev odebírá nalačno, měla by se klinická biochemická vyšetření provést až po pozorování funkčních poruch ve 4. týdnu studie.

▼M4

36. Dále by se mělo zvážit vyšetření sérových markerů celkového poškození tkání. Další vyšetření by se mělo provést, jestliže známé vlastnosti zkoušené chemické látky mohou (nebo existuje podezření, že mohou) ovlivnit související metabolické profily, včetně vápníku, fosfátů, triglyceridů, specifických hormonů a cholinesterázy. Tyto profily je třeba identifikovat pro chemické látky patřící do určitých tříd nebo případ od případu.

37. Přestože v mezinárodním hodnocení cílových parametrů týkajících se endokrinního působení nebylo možno prokázat jasnou výhodu stanovení tyreoidních hormonů (T3, T4) a TSH, může být užitečné uchovat vzorky plazmy či séra k změření T3, T4 a TSH (volitelné), existuje-li náznak působení na osu hypofýza–štítná žláza. Tyto vzorky je možno uchovat zmrazené na – 20 °C. Následující faktory mohou ovlivnit variabilitu a absolutní koncentrace stanovovaných hormonů:

— doba utracení vzhledem k diurnálním odchylkám v koncentracích hormonů,

— způsob utracení – mělo by se zabránit zbytečnému stresu zvířat, který může ovlivnit koncentrace hormonů,

— testovací soupravy pro stanovení hormonů, jejichž standardní křivky se mohou lišit.

Definitivní identifikace chemických látek působících na štítnou žlázu je spolehlivější, pokud se provede pomocí histopatologické analýzy spíše než stanovením hladin hormonů.

38. Vzorky plazmy určené speciálně k stanovení hormonů by se měly odebírat zhruba ve stejnou denní dobu. Doporučuje se, aby se zvážilo stanovení T3, T4 a TSH při nálezu histopatologických změn štítné žlázy. Číselné hodnoty získané při analýze koncentrací hormonů se u různých komerčních testovacích souprav liší. V důsledku toho nemusí být možné poskytnout kritéria účinnosti vycházející z jednotných historických údajů. Laboratoře by se měly snažit udržovat kontrolní koeficienty odchylky pod hodnotou 25 pro T3 a T4 a pod hodnotou 35 pro TSH. Všechny koncentrace je nutno uvádět v jednotkách ng/ml.

39. Pokud nejsou údaje o výchozích hodnotách z dřívějších pozorování dostatečné, mělo by se zvážit stanovení hematologických a klinických biochemických parametrů před začátkem podávání dávky nebo přednostně u skupiny zvířat nezahrnutých do experimentálních skupin.

PATOLOGIE

Makroskopická pitva

40. U všech zvířat zařazených do studie se provede celková, podrobná pitva, zahrnující pečlivé vyšetření vnějšího povrchu těla, všech otvorů a lebeční, hrudní a břišní dutiny a jejich obsahu. Játra, ledviny, nadledvinky, varlata, nadvarlata, prostata + semenné váčky s Cowperovými žlázami jako celek, brzlík, slezina, mozek a srdce všech zvířat (kromě zvířat nalezených umírajících a/nebo zvířat utracených před ukončením studie) by měly být zbaveny všech přirostlých tkání a co nejdříve po pitvě se ve vlhkém stavu zváží, aby nedošlo k vyschnutí. Při ořezávání přirostlých tkání z komplexu prostaty je třeba postupovat opatrně, aby se zabránilo propíchnutí semenných váčků naplněných tekutinou. Nebo je možné semenné váčky a prostatu odříznout a zvážit po fixaci.

▼M4

41. Kromě toho lze volitelně zvážit hned po sekci další dvě tkáně, aby se zabránilo jejich vyschnutí, a to párové vaječníky (vlhká hmotnost) a dělohu, včetně děložního hrdla (pokyny k odběru a přípravě děložních tkání k měření hmotnosti jsou uvedeny v OECD TG 440 (18)).

42. Hmotnost štítné žlázy (volitelné) lze stanovit po fixaci. Odříznutí by se mělo rovněž provádět velmi opatrně a teprve po fixaci, aby se zamezilo poškození tkáně. Poškození tkáně by mohlo narušit histopatologickou analýzu.

43. Následující tkáně by se měly konzervovat v nejvhodnějším fixačním médiu pro daný typ tkáně a zamýšlené následné histopatologické vyšetření (viz odstavec 47): všechny makroskopicky viditelné léze, mozek (reprezentativní oblasti zahrnující hemisféry, mozeček a most), mícha, oko, žaludek, tenké a tlusté střevo (včetně Peyerových plátů), játra, ledviny, nadledvinky, slezina, srdce, brzlík, štítná žláza, průdušnice a plíce (konzervované naplněním fixačním roztokem a následným ponořením), gonády (varlata a vaječníky), přídatné pohlavní orgány (děloha a hrdlo děložní, nadvarlata, prostata + semenné váčky s Cowperovými žlázami), vagina, močový měchýř, lymfatické uzliny (kromě nejproximálnější svodné uzliny by se měla odebrat ještě jedna uzlina dle laboratorních zkušeností (15)), periferní nerv (*n. ischiadicus* nebo *n. tibialis*) přednostně v blízkosti svalu, kosterní sval a kost, s kostní dření (řez nebo čerstvý nátěr z aspirované kostní dřeně). Doporučuje se fixovat varlata ponořením do Bouinova nebo modifikovaného Davidsonova fixačního média (16), (17). *Tunica albuginea* se musí jemně a mělce propíchnout jehlou na obou koncích orgánu, aby se umožnilo rychlé proniknutí fixativa. Na základě klinických nebo jiných nálezů může být nezbytné zkoumat i další tkáně. Konzervovat by se měly také všechny orgány považované na základě známých vlastností zkoušené chemické látky za možné cílové orgány.

44. Následující tkáně mohou poskytnout cenné svědectví o endokrinních účincích: gonády (vaječníky a varlata), přídatné pohlavní orgány (děloha včetně děložního hrdla, nadvarlata, semenné váčky s Cowperovými žlázami, dorzolaterální a ventrální prostata), vagina, hypofýza, samčí prsní žláza, štítná žláza a nadledvinka. Změny na samčích prsních žlázách nebyly dostatečně zdokumentovány, avšak tento parametr může být velmi citlivý na látky s estrogenním působením. Pozorování orgánů/tkání, které nejsou uvedeny v odstavci 43, jsou volitelná (viz dodatek 2).

45. Pokyny k histopatologickému vyšetření (19) podrobně popisují pitvu, fixaci, tvorbu řezů a histopatologické vyšetření endokrinních tkání.

46. V mezinárodním zkušebním programu byly získány určité důkazy, že mírné endokrinní účinky chemických látek s nízkou účinností ovlivňující homeostázu pohlavních hormonů lze identifikovat podle poruch synchronizace estrálního cyklu v různých tkáních a v menší míře tolik na základě klinicky zřejmých histopatologických změn samičích pohlavních orgánů. Přestože pro tyto účinky nebyl získán definitivní důkaz, doporučuje se, aby se důkazy možné asynchronie estrálního cyklu vzaly v úvahu při interpretaci histopatologických nálezů na vaječnících (folikulární, thekální a granulózní buňky), děloze, hrdle děložním a vagině. Pokud se pomocí poševních stěrů vyhodnotí také fáze cyklu, může se do tohoto srovnání zařadit.

▼M4

Histopatologické vyšetření

47. U všech zvířat kontrolní skupiny a skupiny, které byla podána vysoká dávka, by se mělo provést celkové histopatologické vyšetření uchovaných orgánů a tkání. Toto vyšetření by se mělo rozšířit i na zvířata všech ostatních dávkových skupin, pokud jsou u skupiny s vysokou dávkou pozorovány změny orgánů vyvolané zkoušenou dávkou.

48. Vyšetří se všechny makroskopické léze.

49. V případě použití satelitní skupiny by se mělo provést histopatologické vyšetření tkání a orgánů, na kterých byly pozorovány účinky u exponovaných skupin.

ÚDAJE A JEJICH PŘEDKLÁDÁNÍ

Údaje

50. Měly by se uvést údaje pro každé jednotlivé zvíře. Navíc by měly být všechny údaje shrnuty do tabulky, přičemž se uvede u každé experimentální skupiny počet zvířat na začátku zkoušky, počet zvířat nalezených uhynulých v průběhu zkoušky nebo utracených z humánních důvodů a dobu úmrtí nebo utracení, počet zvířat vykazujících příznaky toxicity, popis pozorovaných toxických příznaků, včetně doby nástupu, trvání a závažnosti každého toxického účinku, počet zvířat vykazujících léze, typ lézí, jejich závažnost a procento zvířat vykazujících jednotlivé typy léze.

51. Číselné výsledky by měly být pokud možno vyhodnoceny vhodnou a obecně uznávanou statistickou metodou. Srovnáním účinků v celém rozpětí dávkování by se mělo zamezit použití mnohonásobných t-testů. Statistické metody by se měly vybrat již při plánování studie.

52. Za účelem kontroly jakosti se navrhuje, aby se shromáždily dřívější kontrolní údaje a vypočítaly se koeficienty rozptylu pro číselné údaje, zejména pro parametry spojené s detekcí endokrinních disruptorů. Tyto údaje pak lze použít pro účely srovnání při hodnocení stávajících studií.

Protokol o zkoušce

53. Protokol o zkoušce musí obsahovat tyto údaje:

Zkoušená chemická látka:

— fyzikální povaha, čistota a fyzikálně-chemické vlastnosti,

— identifikační údaje.

Nosič (je-li použit):

— zdůvodnění výběru nosiče, pokud je jiný než voda.

Pokusná zvířata:

— použitý druh/kmen,

— počet, stáří a pohlaví zvířat,

— zdroj, podmínky chovu, krmivo atd.,

— hmotnosti jednotlivých zvířat na začátku zkoušky,

— zdůvodnění použití druhu, pokud je jiný než potkan.

Zkušební podmínky:

— zdůvodnění výběru úrovně dávky,

— podrobné údaje o použité formě zkoušené chemické látky/úpravě krmiva, o dosažené koncentraci, stabilitě a homogenitě přípravku,

▼**M4**

— podrobné údaje o podávání zkoušené chemické látky,

— popřípadě přepočet koncentrace zkoušené chemické látky v krmivu/pitné vodě (ppm) na skutečnou denní dávku (mg/kg tělesné hmotnosti/den),

— podrobné údaje o kvalitě krmiva a vody.

Volitelné zkoumané cílové parametry

— seznam volitelných zkoumaných cílových parametrů.

Výsledky:

— tělesná hmotnost a změny tělesné hmotnosti,

— spotřeba krmiva, popřípadě spotřeba vody,

— údaje o toxických reakcích podle pohlaví a úrovně dávky, včetně příznaků toxicity,

— povaha, závažnost a trvání klinických projevů (ať vratných, či nevratných),

— posouzení reaktivity na smyslové podněty, úchopové síly a motorické aktivity,

— hematologická vyšetření s příslušnými základními hodnotami (normami),

— klinická biochemická vyšetření s příslušnými výchozími hodnotami (normami),

— tělesná hmotnost při utracení a údaje o hmotnosti orgánů,

— pitevní nálezy,

— podrobný popis všech histopatologických nálezů,

— údaje o absorpci, jsou-li dostupné,

— popřípadě statistické zpracování výsledků.

Diskuse o výsledcích.

Závěry.

▼M4

Dodatek 1

DEFINICE

Androgenicita je schopnost chemické látky působit v organismu savců jako přirozený androgenní hormon (např. testosteron).

Antiandrogenicita je schopnost chemické látky potlačit v organismu savců působení přirozeného androgenního hormonu (např. testosteronu).

Antiestrogenicita je schopnost chemické látky potlačit v organismu savců působení přirozeného estrogenního hormonu (např. estradiolu 17ß).

Antityreoidální působení je schopnost chemické látky potlačit v organismu savců působení přirozeného hormonu štítné žlázy (např. T_3).

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

Dávka je podávané množství zkoušené chemické látky. Dávka se vyjadřuje jako hmotnost zkoušené chemické látky na jednotku tělesné hmotnosti zvířete za den (např. mg/kg tělesné hmotnosti/den) nebo jako konstantní koncentrace v krmivu.

Zřejmá toxicita je obecný termín popisující jasné příznaky toxicity po podání zkoušené chemické látky. Ty by měly být dostačující pro posouzení nebezpečnosti a měly by být takové, že při zvýšení podávané dávky lze očekávat rozvoj závažných toxických příznaků a pravděpodobnou mortalitu.

NOAEL je zkratka pro angl. „no-observed-adverse-effect level“. Je to nejvyšší úroveň dávky, při které nejsou pozorovány žádné nepříznivé účinky spojené se zkouškou.

Estrogenicita je schopnost chemické látky působit v organismu savců jako přirozený estrogenní hormon (např. estradiolu 17ß).

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

Tyreoidální působení je schopnost chemické látky působit jako přirozený hormon štítné žlázy (např. T_3) v savčím organismu.

Validace je vědecký postup určený k charakterizaci provozních požadavků a omezení zkušební metody a k prokázání její spolehlivosti a relevantnosti pro konkrétní účel.

▼M4

Dodatek 2

Cílové parametry doporučené k detekci endokrinních disruptorů (ED) v této zkušební metodě B.7

Povinné cílové parametry	Volitelné cílové parametry
Hmotnost	
— varlata	— vaječníky
— nadvarlata	— děloha včetně hrdla děložního
— nadledvinky	— štítná žláza
— prostata a semenné váčky s Cowperovými žlázami	
Histopatologické vyšetření	
— gonády:	— poševní stěry
— varlata a	— samčí prsní žlázy
— vaječníky	— hypofýza
— přídatné pohlavní orgány:	
— nadvarlata	
— prostata a semenné váčky s Cowperovými žlázami	
— děloha včetně hrdla děložního	
— nadledvinky	
— štítná žláza	
— pochva	
Měření hormonů	
	— hladiny cirkulujícího T3 a T4
	— hladina cirkulujícího TSH

LITERATURA:

1) OECD (Paris, 1992). Chairman's Report of the Meeting of the ad hoc Working Group of Experts on Systemic Short-term and (Delayed) Neurotoxicity.

2) IPCS (1986). Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals. Environmental Health Criteria Document No. 60.

3) Tupper DE, Wallace RB (1980). Utility of the Neurologic Examination in Rats. Acta Neurobiol. Exp. 40: 999-1003.

4) Gad SC (1982). A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. J. Toxicol Environ. Health 9: 691-704.

5) Moser VC, McDaniel KM, Phillips PM (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of Amitraz. Toxicol. Appl. Pharmacol. 108: 267-283.

6) Meyer OA, Tilson HA, Byrd WC, Riley MT (1979). A Method for the Routine Assessment of Fore- and Hindlimb Grip Strength of Rats and Mice. Neurobehav. Toxicol. 1: 233-236.

▼**M4**

7) Crofton KM, Howard JL, Moser VC, Gill MW, Reiter LW, Tilson HA, MacPhail RC (1991). Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. Neurotoxicol. Teratol. 13: 599-609.

8) OECD (1998). Report of the First Meeting of the OECD Endocrine Disrupter Testing and Assessment (EDTA) Task Force, 10th-11th March 1998, ENV/MC/CHEM/RA(98)5.

9) OECD. (2006). Report of the Validation of the Updated Test Guideline 407: Repeat Dose 28-day Oral Toxicity Study in Laboratory Rats. Series on Testing and Assessment No 59, ENV/JM/MONO(2006)26.

10) OECD (2002). Detailed Review Paper on the Appraisal of Test Methods for Sex Hormone Disrupting Chemicals. Series on Testing and Assessment No 21, ENV/JM/MONO(2002)8.

11) OECD (2012).Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals. http://www.oecd.org/document/58/0,3343,fr_2649_37407_2348794_1_1_1_37407,00.html

12) OECD (2006). Final Summary report of the meeting of the Validation Management Group for mammalian testing. ENV/JM/TG/EDTA/M(2006)2.

13) OECD. Draft Summary record of the meeting of the Task Force on Endocrine Disrupters Testing and Assessment. ENV/JM/TG/EDTA/M(2006)3.

14) OECD (2000). Guidance document on the recognition, assessment and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation. Series on Testing and Assessment No 19. ENV/JM/MONO(2000)7.

15) Haley P, Perry R, Ennulat D, Frame S, Johnson C, Lapointe J-M, Nyska A, Snyder PW, Walker D, Walter G (2005). STP Position Paper: Best Practice Guideline for the Routine Pathology Evaluation of the Immune System. Toxicol Pathol 33: 404-407.

16) Hess RA, Moore BJ (1993). Histological Methods for the Evaluation of the Testis. In: Methods in Reproductive Toxicology, Chapin RE and Heindel JJ (eds). Academic Press: San Diego, CA, pp. 52-85.

17) Latendresse JR, Warbrittion AR, Jonassen H, Creasy DM.(2002) Fixation of testes and eyes using a modified Davidson's fluid: comparison with Bouin's fluid and conventional Davidson's fluid. Toxicol. Pathol. 30, 524-533.

18) OECD (2007). OECD Guideline for Testing of Chemicals No 440: Uterotrophic Bioassay in Rodents: A short-term screening test for oestrogenic properties.

19) OECD (2009). Guidance Document 106 on Histologic evaluation of Endocrine and Reproductive Tests in Rodents ENV/JM/Mono(2009)11.

▼M4

B.8 SUBAKUTNÍ INHALAČNÍ TOXICITA: 28DENNÍ STUDIE

SHRNUTÍ

Tato revidovaná zkušební metoda B.8 byla navržena s cílem plně charakterizovat inhalační toxicitu zkoušené chemické látky po opakované expozici po omezené časové období (28 dnů) a získat údaje pro kvantitativní posouzení rizik inhalace. Skupiny alespoň 5 samců a 5 samic hlodavců se vystaví 6 hodin denně po dobu 28 dnů a) zkoušené chemické látce na třech nebo více úrovních koncentrace, b) filtrovanému vzduchu (negativní kontrola) a/nebo c) nosiči (kontrola s nosičem). Zvířata jsou obvykle exponována 5 dnů v týdnu, avšak expozice po 7 dnů v týdnu je rovněž povolena. Zkouška se vždy provádí se samci i samicemi, avšak jednotlivá pohlaví mohou být vystavena odlišným úrovním koncentrace, pokud je známo, že je jedno pohlaví citlivější vůči dané zkušební chemické látce. Tato metoda poskytuje vedoucímu studie možnost zařadit do zkoušky satelitní skupiny (k sledování vratnosti), bronchoalveolární laváž (BAL), neurologické testy a další klinická patologická a histopatologická vyšetření za účelem lepší charakterizace toxicity zkoušené chemické látky.

ÚVOD

1. Tato zkušební metoda odpovídá Pokynům OECD pro zkoušení 412 (2009). Původní Pokyny pro zkoušení 412 (TG 412) pro subakutní inhalační toxicitu byly schváleny v roce 1981 (1). Tato zkušební metoda B.8 (odpovídající revidovaným pokynům TG 412) byla aktualizována tak, aby odrážela stav vědeckého poznání a naplňovala stávající a budoucí regulační potřeby.

2. Tato metoda umožňuje charakterizaci nepříznivých účinků po opakované denní inhalační expozici zkoušené chemické látce po dobu 28 dnů. Údaje získané z 28denních studií subakutní inhalační toxicity lze použít ke kvantitativnímu posouzení rizik (pokud se po ní neprovádí 90denní studie subchronické inhalační toxicity (Kapitola B.29 této přílohy)). Tyto údaje mohou rovněž poskytovat informace pro výběr koncentrací pro dlouhodobější studie, jako je 90denní studie subchronické inhalační toxicity. Tato zkušební metoda není speciálně určena pro zkoušky nanomateriálů. Definice použité v kontextu této zkušební metody naleznete na konci této kapitoly a v Pokynech GD 39 (2).

VÝCHOZÍ ÚVAHY

3. Před zahájením této studie by měla laboratoř provádějící zkoušky vzít v úvahu veškeré dostupné informace o zkoušené chemické látce, aby se zvýšila kvalita studie a minimalizovalo použití zvířat. Mezi informace, které usnadňují výběr vhodných zkušebních koncentrací, patří identita zkoušené chemické látky, její chemická struktura a fyzikálně-chemické vlastnosti, výsledky jakýchkoli testů toxicity in vitro nebo in vivo, předpokládaná použití a možnost expozice lidí, dostupné údaje (Q)SAR a toxikologické údaje o strukturně příbuzných látkách a údaje odvozené ze zkoušek akutní inhalační toxicity. Očekává-li se nebo je-li v průběhu studie pozorována neurotoxicita, může se vedoucí studie rozhodnout zařadit vhodná vyšetření, například funkční pozorovací baterii (functional observational battery, FOB) a měření motorické aktivity. Přestože načasování expozic s ohledem na konkrétní vyšetření může být velmi důležité, nemělo by provádění těchto doplňkových činností narušovat základní plán studie.

▼M4

4. Roztoky žíravých nebo dráždivých zkoušených chemických látek lze testovat při koncentracích, které povedou k požadovanému stupni toxicity [viz GD 39 (2)]. Při vystavování zvířat těmto materiálům by však měly být cílové koncentrace dostatečně nízké, aby nezpůsobily výraznou bolest a utrpení, zároveň by však měly být dostačující k prodloužení křivky závislosti odezvy na koncentraci k hodnotám, které umožní splnit regulační a vědecký účel této zkoušky. Tyto koncentrace by se měly volit individuálně případ od případu, nejlépe na základě výsledků vhodně navržené studie ke stanovení dávkování, která poskytuje informace o kritickém cílovém parametru, prahu dráždivosti a době nástupu účinků (viz odstavce 11–13). Mělo by se uvést zdůvodnění výběru dané koncentrace.

5. Umírající zvířata nebo zvířata, která očividně trpí bolestí nebo vykazují známky závažného a přetrvávajícího stresu by se měla humánním způsobem utratit. Umírající zvířata se posuzují stejným způsobem jako zvířata, která při zkoušce uhynou. Kritéria rozhodování o utracení umírajících nebo značně trpících zvířat a pokyny týkající se rozpoznání předvídatelného nebo blížícího se uhynutí jsou předmětem Pokynů OECD o humánních cílových parametrech (3).

POPIS METODY

Výběr zvířecích druhů

6. Měli by se použít mladí zdraví dospělí hlodavci běžně používaných laboratorních kmenů. Nejvhodnějším druhem je potkan. Pokud se použijí jiné druhy, mělo by se uvést odůvodnění.

Příprava zvířat

7. Samice musí být nullipary a nesmí být březí. V den randomizace by mělo jít o mladé dospělé jedince staré 7 až 9 týdnů. Tělesná hmotnost by se měla pohybovat v rozmezí ± 20 % průměrné hmotnosti u každého pohlaví. Zvířata se náhodně vyberou, označí pro potřeby individuální identifikace a umístí do klecí nejméně 5 dnů před začátkem zkoušky, aby si mohla zvyknout na laboratorní podmínky.

Zvířecí chov

8. Zvířata by měla být individuálně označena, nejlépe pomocí subkutánních transpondérů, aby se usnadnila pozorování a zamezilo záměně. Teplota zkušební místnosti, v níž se uchovávají zvířata, by měla být 22 ± 3 °C. Relativní vlhkost by se měla udržovat optimálně v rozmezí 30 až 70 %, ačkoliv to nemusí být proveditelné, používá-li se jako nosič voda. Před expozicí a po ní by se měla zvířata držet v klecích rozdělena do skupin podle pohlaví a koncentrace, avšak počet zvířat v jedné kleci by neměl bránit jasnému pozorování každého zvířete a měl by minimalizovat ztráty v důsledku kanibalismu nebo bojů. Jsou-li zvířata vystavena látce pouze nazální cestou, může být nutné nechat je zvyknout si na zkumavky omezující pohyb. Zkumavky by neměly zvířatům způsobovat přílišný fyzický, termální nebo imobilizační stres. Omezení může ovlivnit fyziologické cílové parametry, jako je tělesná teplota (hypertermie) a/nebo respirační objem za minutu. Jsou-li k dispozici obecné údaje, které prokazují, že k takovým změnám nedochází ve značné míře, není předběžná adaptace na zkumavky omezující pohyb nutná. Zvířata, jež jsou vystavena aerosolu celým tělem, by se měla držet během expozice odděleně, aby se zabránilo pronikání zkoušeného aerosolu z jejich těla do srsti ostatních zvířat v kleci. Mohou se používat konvenční a certifikovaná laboratorní krmiva, kromě období expozice, podávaná s neomezeným množstvím pitné vody z vodovodu. Osvětlení by mělo být umělé a mělo by se střídat 12 hodin světla a 12 hodin tmy.

▼M4

Inhalační komory

9. Při výběru inhalační komory by se měla zvážit povaha zkoušené chemické látky a cíl zkoušky. Upřednostňuje se expozice pouze nazální cestou (přičemž tento termín zahrnuje i expozici hlavy, nosu a tlamy) Expozice pouze nazální cestou se obecně upřednostňuje u studií kapalných nebo pevných aerosolů a par, které mohou kondenzací vytvářet aerosoly. Speciálních cílů studie lze snáze dosáhnout, použije-li se celotělová expozice, avšak tato skutečnost by se měla zdůvodnit ve zprávě o studii. Pro zajištění stability atmosféry v komoře pro celotělovou expozici by neměl celkový objem zaplněný pokusnými zvířaty přesáhnout 5 % objemu komory. Principy techniky expozice pouze nazální cestou a celotělové expozice a jejich konkrétní výhody a nevýhody jsou popsány v dokumentu GD 39 (2).

STUDIE TOXICITY

Mezní koncentrace

10. Na rozdíl od akutních studií nejsou v 28denních studiích subakutní inhalační toxicity žádné definované mezní koncentrace. Maximální zkoušená koncentrace by měla zohledňovat: 1) maximální dosažitelnou koncentraci, 2) úroveň expozice člověka v „nejhorším případě“, 3) potřebu udržet dostatečný přívod kyslíku a/nebo 4) dobré životní podmínky zvířat. Chybí-li mezní hodnoty založené na skutečných údajích, mohou se použít akutní limity z nařízení (ES) č. 1272/2008 (13) (tj. maximálně 5 mg/l pro aerosoly, 20 mg/l pro páry a 20 000 ppm pro plyny), viz GD 39 (2). Pokud je při zkouškách plynů nebo vysoce těkavých chemických látek (např. chladicí prostředky) potřeba tyto limity překročit, mělo by se uvést zdůvodnění. Z mezní koncentrace by mělo být možné odvodit jednoznačnou toxicitu bez toho, aby byly zvířata vystavena nadměrnému stresu nebo aby byla ovlivněna délka jejich života.

Studie k stanovení rozsahu

11. Před zahájením hlavní studie může být nutné provést studii k stanovení rozsahu. Studie k stanovení rozsahu je komplexnější než orientační studie, protože není omezená na výběr koncentrace. Poznatky získané ve studii k stanovení rozsahu mohou vést k úspěšné hlavní studii. Studie k stanovení rozsahu může například poskytnout technické informace týkající se analytických metod, velikosti částic, odhalení toxických mechanismů, klinické patologie a histopatologických údajů a odhady koncentrací NOAEL a MTC v hlavní studii. Vedoucí studie se může rozhodnout použít studii ke stanovení rozsahu pro určení prahové hodnoty pro podráždění dýchacích cest (např. pomocí histopatologického vyšetření dýchacích cest, zkoušení plicních funkcí nebo bronchoalveolární laváže), horní hranice koncentrace, kterou zvířata snáší bez nadměrného stresu, a parametrů, které budou nejlépe charakterizovat toxicitu zkoušené chemické látky.

12. Studie ke stanovení rozsahu může obsahovat jednu nebo více úrovní koncentrace. Každé úrovni koncentrace by se měli vystavit maximálně tři samci a tři samice. Studie ke stanovení rozsahu by měla trvat minimálně 5 dní a obvykle ne déle než 14 dní. Ve zprávě o studii by se mělo uvést zdůvodnění výběru koncentrací pro hlavní studii. Cílem hlavní studie je ukázat vztah mezi koncentrací a odezvou založený na předpokládaném nejcitlivějším cílovém parametru. Nízká koncentrace by měla být v ideálním případě koncentrace, při níž nejsou pozorovány nepříznivé účinky, zatímco z vysoké koncentrace by mělo být možné odvodit jednoznačnou toxicitu, aniž by se zvířatům způsobil nadměrný stres nebo se ovlivnila délka jejich života (3).

▼M4

13. Při výběru úrovní koncentrace pro studii k stanovení rozsahu by se měly zvážit veškeré dostupné informace, včetně vztahů mezi strukturou a aktivitou a údajů o podobných chemických látkách (viz odstavec 3). Studie ke stanovení rozsahu může potvrdit/vyvrátit cílové parametry, které se považují z mechanistického hlediska za nejvíce citlivé, např. inhibice cholinesterázy organickými fosfáty, tvorba methemoglobinu v důsledku erytrocytotoxických látek, hormony štítné žlázy (T_3, T_4) u tyreotoxických látek, bílkoviny, LDH nebo neutrofily v bronchoalveolární laváži u neškodných špatně rozpustných částic nebo aerosolů dráždících plíce.

Hlavní studie

14. Hlavní studie subakutní toxicity se obvykle skládá ze tří úrovní koncentrace a rovněž zahrnuje souběžné negativní kontroly (se vzduchem) a/nebo dle potřeby kontroly s nosičem (viz odstavec 17). Při výběru vhodných úrovní expozice je třeba použít veškeré dostupné údaje, včetně výsledků studií systémové toxicity, metabolismu a kinetiky (zvláštní důraz by se měl klást na vyloučení vysokých úrovní koncentrace, které saturují kinetické procesy). Každá experimentální skupina obsahuje alespoň 10 hlodavců (5 samců a 5 samic), kteří jsou vystaveni zkoušené chemické látce každý den 6 hodin 5 dnů v týdnu po dobu 4 týdnů (celková doba trvání studie je 28 dní). Zvířata lze rovněž vystavit látce 7 dní v týdnu (např. při zkouškách inhalačních farmaceutik). Je-li známo, že je jedno pohlaví vůči dané zkoušené chemické látce citlivější, je možné vystavit jednotlivá pohlaví odlišným úrovním koncentrace, aby se optimalizoval vztah mezi koncentrací a odezvou, jak popisuje odstavec 15. Jsou-li k expozici pouze nazální cestou použity jiné druhy hlodavců než potkani, je možno upravit maximální doby expozice za účelem minimalizace druhově specifického utrpení. Použije-li se doba expozice kratší než 6 hodin/den nebo pokud je třeba provést studii celotělové expozice s dlouhou dobou expozice (např. 22 hodin/den), mělo by se uvést zdůvodnění [viz GD 39 (2)]. Během expozice by se mělo pozastavit krmení zvířat, jestliže doba expozice nepřesahuje 6 hodin. Během celotělové expozice je možno zvířatům podávat vodu.

15. Zvolené cílové koncentrace by měly vést k identifikaci cílového orgánu (cílových orgánů) a ukázat jasný vztah mezi koncentrací a odezvou:

— Vysoká úroveň koncentrace by měla mít toxické účinky, avšak neměla by způsobovat trvalé následky či letalitu, které by zabránily smysluplnému vyhodnocení.

— Střední úrovně koncentrací mezi mezními hodnotami by měly odstupňovány, aby se toxické účinky zvyšovaly od nízké po vysokou koncentraci.

— Nízká úroveň koncentrace by měla vyvolat malé nebo žádné příznaky toxicity.

Satelitní studie (k sledování vratnosti)

16. Satelitní studii (ke sledování vratnosti) je možné použít k pozorování vratnosti, přetrvávání nebo opožděného nástupu toxicity během dostatečně dlouhého období po expozici, nejméně však po 14 dnů. Skupiny v satelitní studii (ke sledování vratnosti) jsou složeny z pěti samců a pěti samic a jsou látce vystaveny současně s pokusnými zvířaty v hlavní studii. Skupiny v satelitní studii (ke sledování vratnosti) by se měly vystavit nejvyšší úrovni koncentrace zkoušené chemické látky a měly by se použít souběžné kontroly se vzduchem a/nebo s nosičem, dle potřeby (viz odstavec 17).

▼M4

Kontrolní zvířata

17. Se zvířaty v souběžné negativní (vzduch) kontrolní skupině by se mělo zacházet stejným způsobem jako se zvířaty v experimentální skupině až na to, že se namísto zkoušené chemické látce vystaví filtrovanému vzduchu. Pokud se ke generování zkušební atmosféry používá také voda nebo jiná látka, měla by se do studie namísto negativní kontroly se vzduchem zařadit kontrolní skupina s nosičem. Kdykoli je to možné, měla by se jako nosič použít voda. Použije-li se jako nosič voda, měla by se kontrolní zvířata vystavit vzduchu o stejné relativní vlhkosti jako experimentální skupiny. Výběr vhodného nosiče by se měl zakládat na vhodně provedené předběžné studii nebo na historických údajích. Není-li toxicita nosiče dobře známa, může se vedoucí studie rozhodnout použít jak negativní kontrolu (vzduch), tak kontrolu s nosičem, ale takový postup se rozhodně nedoporučuje. Jestliže historické údaje ukážou, že nosič není toxický, není třeba používat negativní (vzduch) kontrolní skupinu a měla by se použít pouze kontrolní skupina s nosičem. Jestliže předběžná studie zkoušené chemické látky formulované na nosiči neodhalí žádnou toxicitu, vyplývá z toho, že nosič je při zkoušené koncentraci netoxický a měla by se použít tato kontrola s nosičem.

PODMÍNKY EXPOZICE

Podávání koncentrací

18. Zvířata jsou vystavena zkoušené chemické látce ve formě plynu, páry, aerosolu nebo jejich směsi. Skupenství látky, které se má zkoušet, závisí na fyzikálně-chemických vlastnostech zkoušené chemické látky, zvolené koncentraci a/nebo fyzické formě, v níž se bude zkoušená chemická látka s největší pravděpodobností nacházet při manipulaci a používání. Hygroskopické a chemicky reaktivní zkoušené chemické látky by se měly zkoušet v podmínkách suchého vzduchu. Je třeba pečlivě zabránit vzniku explozivních koncentrací. Materiál složený z částic je možno podrobit mechanickým postupům na snížení velikosti částic. Další pokyny jsou uvedeny v dokumentu GD 39 (2).

Distribuce velikosti částic

19. U všech aerosolů a par, které mohou kondenzací vytvořit aerosoly, by se mělo provést stanovení rozměrů částic. Aby byla možná expozice všech důležitých částí dýchací soustavy, doporučují se aerosoly s hodnotami hmotnostního mediánu aerodynamického průměru (MMAD) v rozmezí 1 až 3 μm a s geometrickou směrodatnou odchylkou (σ_g) v rozmezí 1,5 až 3,0 (4). Přestože by se mělo vynaložit dostatečné úsilí k splnění této normy, není-li to možné, je třeba předložit odborný posudek. Například částice kovových výparů mohou být menší, než je tato norma, a nabité částice a vlákna ji mohou překračovat.

Příprava zkoušené chemické látky na nosiči

20. V ideálním případě by se měla zkoušená chemická látka testovat bez nosiče. Jestliže je nutno použít nosič k získání vhodné koncentrace a velikosti částic zkoušené chemické látky, měla by se přednostně použít voda. Kdykoli je zkoušená chemická látka v tomto nosiči rozpuštěna, měla by se prokázat její stabilita.

MONITOROVÁNÍ PODMÍNEK EXPOZICE

Proudění vzduchu komorou

21. Proudění vzduchu expoziční komorou by se mělo při každé expozici pečlivě kontrolovat, neustále monitorovat a zaznamenávat alespoň v hodinových intervalech. Monitorování koncentrace (nebo stability) látky ve zkušební atmosféře je nedílnou součástí měření všech dynamických parametrů a poskytuje nepřímý prostředek ke kontrole všech důležitých dynamických

▼M4

inhalačních parametrů. Monitoruje-li se koncentrace v reálném čase, je možno snížit frekvenci měření průtoku vzduchu komorou na jediné měření pro každou expozici za den. Zvláštní pozornost je třeba věnovat tomu, aby se zamezilo opětovnému vdechování látky v komorách s nazální cestou expozice. Koncentrace kyslíku by měla být alespoň 19 % a koncentrace oxidu uhličitého by neměla přesáhnout 1 %. Existuje-li důvod se domnívat, že tyto normy nelze splnit, měly by se koncentrace kyslíku a oxidu uhličitého měřit. Jestliže měření v první den expozice ukážou, že jsou úrovně těchto plynů správné, není třeba další měření provádět.

Teplota a relativní vlhkost v komoře

22. Teplota v komoře by se měla udržovat na 22 ± 3 °C. Relativní vlhkost v dýchací zóně zvířat, jak při expozici pouze nazální cestou, tak při celotělové expozici, by se měla nepřetržitě sledovat a zaznamenávat pokud možno nejméně v hodinových intervalech během každé expozice. Relativní vlhkost by se měla udržovat nejlépe v rozmezí 30 až 70 %, to však může být neproveditelné (např. při zkoušení směsí na bázi vody) nebo obtížně měřitelné v důsledku interference zkoušené chemické látky se zkušební metodou.

Zkoušená chemická látka: Nominální koncentrace

23. Je-li to možné, měla by se vypočítat a zaznamenat nominální koncentrace zkoušené chemické látky v expoziční komoře. Nominální koncentrace je hmotnost generované zkoušené chemické látky vydělená celkovým objemem vzduchu procházejícím systémem inhalační komory. Nominální koncentrace se nepoužívá k charakterizaci expozice zvířat, avšak porovnání nominální koncentrace a skutečné koncentrace je ukazatelem výkonnosti zkušebního systému při generování zkušební atmosféry, a tudíž ji lze použít k odhalení problémů při generování.

Zkoušená chemická látka: Skutečná koncentrace

24. Skutečná koncentrace je koncentrace zkoušené chemické látky ve vzorcích odebraných v dýchací zóně zvířat v inhalační komoře. Skutečné koncentrace lze změřit specifickými metodami (např. přímý odběr vzorků, adsorpční metody nebo metody založené na chemické reakci a následná analytická charakterizace) nebo nespecifickými metodami, jako je vážková analýza (gravimetrie). Použití gravimetrie je přípustné pouze u práškových aerosolů obsahujících jedinou složku nebo u aerosolů z kapalin s nízkou těkavostí a mělo by se podložit příslušnou specifickou charakterizací zkoušené chemické látky před provedením studie. Koncentraci práškového aerosolu sestávajícího z více složek lze rovněž stanovit gravimetricky. Vyžaduje to však analytické údaje, které prokazují, že složení materiálu rozptýleného ve vzduchu je podobné složení výchozího materiálu. Nejsou-li tyto informace k dispozici, je během studie nutné provádět v pravidelných intervalech opakovanou analýzu zkoušené chemické látky (ideálně ve vzdušné formě). U látek v aerosolové formě, které se mohou vypařovat nebo sublimovat, by se mělo prokázat, že byly vybranou metodou zachyceny všechny fáze.

25. Během celé studie by se měla používat pokud možno jedna šarže zkoušené chemické látky a zkoušený vzorek by se měl uchovávat za takových podmínek, aby zůstal čistý, homogenní a stabilní. Před zahájením studie by se měla provést charakterizace zkoušené chemické látky, včetně určení její čistoty a je-li to technicky proveditelné, její identity a množství identifikovaných příměsí a nečistot. Prokázat to lze mimo jiné těmito údaji: retenční čas a relativní plocha píku, molekulová hmotnost z hmotnostní spektroskopie nebo plynové chromatografie nebo jiné odhady. Přestože určení identity zkoušeného vzorku není povinností laboratoře provádějící zkoušku, je vhodné alespoň do určité míry ověřit popis látky poskytnutý zadavatelem (např. barvu, fyzikální vlastnosti atp.).

▼M4

26. Dle možností by se měla udržovat konstantní expoziční atmosféra. K prokázání stability podmínek expozice lze použít přístroj pro sledování v reálném čase, například fotometr pro aerosoly nebo analyzátor celkových uhlovodíků pro páry. Skutečné koncentrace v komoře by se měly měřit alespoň třikrát během každého dne expozice a pro každou úroveň expozice. Není-li to v důsledku omezené rychlosti proudění vzduchu nebo nízké koncentrace možné, je přípustné použít jeden vzorek pro každé období expozice. V ideálním případě by se měl tento vzorek odebírat po celou dobu expozice. Jednotlivé vzorky k stanovení koncentrace v komoře by se neměly lišit od průměrné hodnoty koncentrace v komoře o více než ± 10 % u plynů a par a o více než ± 20 % u kapalných nebo pevných aerosolů. Měla by se vypočítat a zaznamenat doba potřebná k dosažení rovnovážného stavu v komoře (t_{95}). Doba expozice zahrnuje i dobu, během níž je zkoušená chemická látka generována. Bere se při tom v úvahu doba nutná k dosažení rovnovážného stavu v komoře (t_{95}) a doba rozpadu. Pokyny k výpočtu t_{95} naleznete v dokumentu GD 39 (2).

27. U vysoce komplexních směsí složených z plynů/par a aerosolů (např. atmosféry obsahující produkty spalování a zkoušené chemické látky vystřikované z účelových výrobků/zařízení pro koncové použití) se může každá fáze chovat v inhalační komoře jinak. Proto by se pro každou fázi (plyn/pára a aerosol) měla zvolit alespoň jedna indikační látka (analyt), obvykle hlavní účinná látka ve směsi. Je-li zkoušená chemická látka směsí, měla by se uvést analytická koncentrace celkové směsi, a nikoliv pouze účinné látky nebo indikační látky (analytu). Další informace týkající se skutečných koncentrací naleznete v dokumentu GD 39 (2).

Zkoušená chemická látka: Distribuce velikosti částic

28. Distribuce velikosti částic aerosolů by se měla stanovit alespoň jednou týdně pro každou úroveň koncentrace pomocí kaskádového impaktoru nebo jiného přístroje, např. aerodynamického spektrometru částic (APS). Je-li možno prokázat shodu výsledků získaných pomocí kaskádového impaktoru a jiného přístroje, může se tento jiný přístroj používat v průběhu celé studie.

29. Kromě primárního přístroje by se měl použít ještě druhý přístroj, např. gravimetrický filtr nebo impinger/plynová promývačka, k ověření účinnosti záchytu primárním přístrojem. Hmotnostní koncentrace získaná analýzou velikosti částic by měla ležet v přiměřeném rozmezí hmotnostní koncentrace získané vážkovou analýzou [viz dokument GD 39 (2)]. Je-li možno v časné fázi studie prokázat u veškerých zkoušených koncentrací jejich rovnocennost, lze od dalších potvrzujících měření upustit. Z důvodu zajištění dobrých životních podmínek zvířat by se měly podniknout kroky k minimalizaci neprůkazných údajů, které mohou vést k nutnosti opakovat studii.

30. U par by se mělo provést měření velikosti částic, pokud existuje možnost, že kondenzace páry povede ke vzniku aerosolu nebo pokud jsou v parách detekovány částice s potenciálem pro tvorbu smíšených fází.

POZOROVÁNÍ

31. Zvířata by se měla klinicky sledovat před expozicí, během expozice i po expozici. Mohou být nutná častější pozorování v závislosti na reakci zvířat během expozice. Je-li pozorování zvířat znemožněno použitím zkumavek omezujících pohyb zvířat, špatným osvětlením v komorách pro celotělovou expozici nebo neprůhlednou atmosférou, měla by se zvířata pečlivě pozorovat po expozici. Pozorování před následujícím dnem expozice mohou vést k vyhodnocení případné reverzibility nebo exacerbace toxických účinků.

▼M4

32. Všechna sledování se zaznamenávají, přičemž záznamy se vedou pro každé zvíře zvlášť. Pokud jsou zvířata z humánních důvodů utracena nebo je zjištěn jejich úhyn, je třeba dobu uhynutí zaznamenat co nejpřesněji.

33. Pozorování v kleci by se měla zaměřit na změny kůže, srsti, očí, sliznic, a rovněž na změny dýchání, krevního oběhu, změny funkce nervové soustavy, somatomotorické aktivity a chování. Je třeba pozorně sledovat, zde se neobjeví tremor, křeče, slinění, průjmy, letargie, spánek a kóma. Měření rektální teploty může poskytnout podpůrné důkazy pro reflexní bradypnoe nebo hypo/hypertermii spojenou s expozicí nebo držením v kleci. Do protokolu studie je možno zahrnout doplňující vyšetření, například kinetiku, biomonitoring, plicní funkce, zadržování špatně rozpustných materiálů, které se hromadí v plicní tkáni a změny v chování.

TĚLESNÉ HMOTNOSTI

34. Tělesná hmotnost jednotlivých zvířat by se měla zaznamenat krátce před první expozicí (den 0), poté dvakrát týdně (například každý pátek a pondělí, aby se prokázalo zotavení po víkendu bez expozice, nebo v takovém časovém intervalu, který umožňuje posouzení systémové toxicity) a v čase uhynutí nebo utracení. Pokud se během prvních 2 týdnů neobjeví žádné účinky na tělesnou hmotnost, lze ji po zbytek studie měřit pouze jednou týdně. Zvířata v satelitní skupině (sledování reverzibility) (jsou-li použita) by se měla nadále vážit jednou týdně po celé období zotavování. Na konci studie by se měla všechna zvířata krátce před utracením zvážit, aby bylo možno provést nezkreslený výpočet podílů hmotnosti orgánů vůči tělesné hmotnosti.

SPOTŘEBA KRMIVA A VODY

35. Spotřeba krmiva by se měla měřit jednou týdně. Rovněž by se měla měřit spotřeba vody.

KLINICKÁ PATOLOGIE

36. Klinická patologická vyšetření by se měla provést u všech zvířat, včetně zvířat v kontrolní a satelitní (sledování reverzibility) skupině, když jsou utracena. Měl by se zaznamenat časový interval mezi koncem expozice a odběrem krve, zejména pokud je obnova příslušného cílového parametru rychlá. Odběr vzorků po ukončení expozice je indikován pro parametry s krátkým eliminačním poločasem v plazmě (např. COHb, CHE a MetHb).

37. Tabulka 1 uvádí klinické patologické parametry, které jsou obvykle vyžadovány ve všech toxikologických studiích. Analýza moči se běžně nevyžaduje, může se však provést, pokud se to považuje za vhodné na základě očekávané nebo pozorované toxicity. Vedoucí studie se může rozhodnout vyšetřit další parametry k lepší charakterizaci toxicity zkoušené chemické látky (např. cholinesteráza, lipidy, hormony, acidobazická rovnováha, methemoglobin nebo Heinzova tělíska, kreatinkináza, poměr myeloidní/erythroidní buňky, troponiny, vyšetření krevních plynů, laktátdehydrogenáza, sorbitoldehydrogenáza, glutamátdehydrogenáza a gamaglutamyltranspeptidáza).

▼M4

Tabulka 1

Standardní klinické patologické parametry

Hematologická vyšetření	
počet erytrocytů	celkový počet leukocytů
hematokrit	diferenciální rozpočet leukocytů
koncentrace hemoglobinu	počet trombocytů
průměrné množství hemoglobinu v erytrocytu	srážlivost (vyberte jednu z možností):
střední objem erytrocytu	— protrombinový čas
průměrná koncentrace hemoglobinu v erytrocytu	— koagulační čas
retikulocyty	— parciální tromboplastinový čas

Klinická biochemická vyšetření	
glukóza (*)	alaninaminotransferáza
celkový cholesterol	aspartátaminotransferáza
triglyceridy	alkalická fosfatáza
močovinový dusík v krvi	draslík
celkový bilirubin	sodík
kreatinin	vápník
celkový obsah proteinů	fosfor
albuminy	chloridy
globuliny	

Rozbor moči (volitelný)	
vzhled (barva a zákal)	celkový obsah proteinů
objem	glukóza
relativní hustota nebo osmolalita	krev/krvinky
pH	

(*) Dlouhé období lačnění může zkreslit výsledky měření glukózy u exponovaných zvířat oproti zvířatům kontrolním. Vedoucí studie by proto měl určit, zda je vhodné, aby zvířata lačnila. Používá-li se období lačnění, mělo by být vhodné pro daný použitý druh. U potkana to může být 16 h (lačnění přes noc). Stanovení glukózy nalačno lze provést po lačnění přes noc během posledního týdne expozice nebo po lačnění přes noc před pitvou (v tomto případě se provede společně se všemi ostatními klinickými patologickými parametry).

38. Existují-li důkazy o tom, že hlavním místem depozice a retence jsou dolní cesty dýchací (tj. alveoly), jako technika pro kvantitativní analýzu hypotetických parametrů závislosti účinku na dávce zaměřená na alveolitidu, plicní zánět a fosfolipidózu, může být zvolena bronchoalveolární laváž (BAL). Umožňuje vhodně vyšetřit změny ve vztazích dávka–odezva a čas–průběh při poškození plicních sklípků. V tekutině z BAL lze stanovit diferenciální rozpočet leukocytů, celkový obsah proteinů a laktátdehydrogenázu. Další parametry, jejichž analýzu je možno zvážit, jsou ty, které svědčí o lysozomálním poškození, fosfolipidóze, fibróze, zánětu z podráždění nebo alergickém zánětu, což může zahrnovat stanovení prozánětlivých cytokinů/chemokinů. Měření v tekutině BAL obecně doplňují výsledky histopatologických vyšetření, avšak nemohou je nahradit. Pokyny, jak provádět laváž plic, jsou uvedeny v dokumentu GD 39 (2).

▼**M4**

PITVA A HMOTNOSTI ORGÁNŮ

39. Všechna pokusná zvířata, včetně těch, která v průběhu zkoušky uhynula nebo byla utracena z důvodu ohleduplného zacházení se zvířaty, by se měla podrobit úplnému vykrvení (je-li proveditelné) a pitvě. Měla by se zaznamenat doba mezi koncem poslední expozice zvířete a jeho utracením. Není-li možno pitvu provést ihned po objevení uhynulého zvířete, mělo by se zvíře uchovávat v chladicím boxu (nikoli zmrazené) při teplotě dostatečně nízké k minimalizaci autolýzy. Pitvy by se měly provést co možná nejdříve, obvykle během jednoho nebo dvou dnů. U každého zvířete by se měly zaznamenat všechny makroskopické patologické nálezy, přičemž se věnuje zvláštní pozornost jakýmkoli nálezům v dýchacích cestách.

40. Tabulka 2 uvádí orgány a tkáně, které by se měly během pitvy konzervovat ve vhodném médiu pro histopatologické vyšetření. Uchovávání orgánů a tkání [uvedených v závorkách] a jakýchkoli dalších orgánů a tkání závisí na rozhodnutí vedoucího studie. Orgány uvedené **tučným** písmem by se měly co nejdříve po vyjmutí z těla zbavit přirostlých tkání a zvážit, než začnou vysychat. Štítná žláza a nadvarlata by se měly vážit pouze v případě potřeby, neboť artefakty z ořezávání přirostlých tkání mohou bránit histopatologickému vyšetření. Tkáně a orgány by se měly fixovat v 10 % pufrovaném formalínu nebo jiném vhodném fixativu ihned po provedení pitvy a ne později než 24–48 hodin před ořezáváním přirostlých tkání v závislosti na použitém fixativu.

Tabulka 2

Orgány a tkáně, které se během pitvy konzervují

Nadledvinky	Semenné váčky
Kostní dřeň (a/nebo čerstvý aspirát)	Mícha (krční, střední hrudní a bederní)
Mozek (zahrnující řezy mozkových hemisfér, mozečku a prodloužené míchy/Varolova mostu)	**Slezina**
	Žaludek
[Oči (sítnice, oční nerv) a oční víčka]	**Varlata**
	Brzlík
Srdce	Štítná žláza
Ledviny	Průdušnice (alespoň dvě úrovně zahrnující 1 podélný řez skrz *carinu tracheae* a 1 příčný řez)
Hrtan (3 úrovně, 1 úroveň by měla zahrnovat bázi *epiglottis*)	[Močový měchýř]
Játra	Děloha
Plíce (všechny laloky v jedné úrovni včetně hlavních bronchů)	Všechny makroskopicky viditelné léze
Lymfatické uzliny z oblasti plicního hilu, zejména v případě špatně rozpustných partikulárních zkoušených chemických látek. Pro podrobnější vyšetření a/nebo studie s imunologickým zaměřením lze uvažovat i o dalších lymfatických uzlinách, např. z oblasti mediastina, oblasti cervikální, submandibulární a aurikulární.	
Nosohltanové tkáně (alespoň 4 úrovně, 1 úroveň by měla zahrnovat *ductus nasopharyngeus* a lymfatickou tkáň nosní sliznice (NALT))	
Jícen	
[*Bulbus olfactorius*]	
Vaječníky	

▼M4

41. Plíce je třeba vyjmout bez poškození, zvážit a fixovat vhodným médiem při tlaku 20–30 cm vodního sloupce, aby se zachovala struktura plic (5). U všech laloků by se měly řezy odebrat na jedné úrovni, včetně hlavních bronchů, avšak provádí-li se plicní laváž, měly by se u nevyplachovaného laloku provést řezy na třech úrovních (nikoli sériové řezy).

42. Měly by se vyšetřit alespoň 4 úrovně tkání nosohltanu, z nichž jedna by měla zahrnovat *ductus nasopharyngeus* (5, 6, 7, 8, 9), aby bylo možno dostatečně vyšetřit dlaždicový, přechodný (respirační bez řasinek), respirační (řasinkový respirační) a čichový epitel a svodnou lymfatickou tkáň (NALT; 10, 11). Měly by se vyšetřit tři úrovně hrtanu a jedna z těchto úrovní by měla zahrnovat bázi příklopky hrtanové (12). Měly by se vyšetřit alespoň dvě úrovně průdušnice, a to tak, že jeden podélný řez se povede skrz *carina tracheae* v místě bifurkace a jeden příčný řez.

HISTOPATOLOGICKÉ VYŠETŘENÍ

43. Mělo by se provést histopatologické vyšetření všech orgánů a tkání uvedených v tabulce 2 u kontrolní skupiny a skupiny vystavené vysoké koncentraci látky a u všech zvířat, která uhynou nebo jsou utracena během studie. Zvláštní pozornost je třeba věnovat dýchacím cestám, cílovým orgánům a makroskopicky viditelným lézím. Orgány a tkáně, u nichž se objeví léze u skupiny zvířat vystavené vysoké koncentraci látky, by se měly vyšetřit ve všech skupinách. Vedoucí studie se může rozhodnout provést histopatologická vyšetření v dalších skupinách, aby se prokázala jasná odezva na koncentraci. V případě použití satelitní skupiny (sledování reverzibility) by se mělo provést histopatologické vyšetření všech tkání a orgánů, na kterých byly pozorovány účinky u exponovaných skupin. Pokud ve skupině s expozicí vysoké koncentraci látky příliš brzy uhyne velký počet zvířat nebo vzniknou jiné problémy, které by mohly zpochybnit významnost údajů, měla by se histopatologicky vyšetřit nejbližší nižší koncentrace. Měl by se učinit pokus porovnat makroskopicky viditelné změny s mikroskopickými nálezy.

ÚDAJE A JEJICH PŘEDKLÁDÁNÍ

Údaje

44. U každého zvířete by se měly uvést údaje o tělesné hmotnosti, spotřebě krmiva, klinické patologické údaje, údaje z pitvy, hmotnosti orgánů a histopatologické nálezy. Údaje z klinického sledování by se měly shrnout do tabulky, přičemž se u každé zkušební skupiny uvede počet použitých zvířat, počet zvířat vykazujících příznaky toxicity, počet zvířat uhynulých v průběhu zkoušky nebo utracených z humánních důvodů, čas uhynutí jednotlivých zvířat, popis, časový průběh a vratnost toxických účinků a pitevní nálezy. Všechny výsledky, kvantitativní a incidentální, by se měly vyhodnotit vhodnou statistickou metodou. Lze použít všeobecně uznávanou statistickou metodu. Statistické metody by se měly zvolit během vypracovávání návrhu studie.

Protokol o zkoušce

45. Protokol o zkoušce by měl obsahovat následující informace:

Pokusná zvířata a podmínky chovu

— popis podmínek v klecích uvádějící počet (nebo změnu počtu) zvířat v každé kleci, materiál podestýlky, teplotu a relativní vlhkost prostředí, délku světelné fáze a druh krmiva,

▼M4

— použitý druh/kmen a odůvodnění, pokud se použil jiný druh než potkan. Je možné uvést údaje ze zdroje a historické údaje, pokud se týkají zvířat, která byla exponována za podobných podmínek expozice, chovu a lačnění,

— počet, stáří a pohlaví zvířat,

— metoda randomizace,

— popis jakékoliv přípravy před zkouškou včetně krmiva, karantény a léčby onemocnění.

Zkoušená chemická látka

— fyzikální povaha, čistota a v případě potřeby fyzikálně-chemické vlastnosti (včetně izomerizace),

— identifikační údaje a registrační číslo CAS (Chemical Abstract Services), je-li známo.

Nosič

— zdůvodnění použití nosiče a zdůvodnění výběru nosiče (pokud je jiný než voda),

— historické nebo současné údaje prokazující, že nosič neovlivňuje výsledek studie.

Inhalační komora

— popis inhalační komory včetně objemu a nákresu,

— zdroj a popis zařízení použitého k expozici zvířat a rovněž pro generování atmosféry,

— zařízení k měření teploty, vlhkosti, velikosti částic a skutečné koncentrace,

— zdroj vzduchu a použitý klimatizační systém,

— metody použité ke kalibraci zařízení k zajištění homogenní zkušební atmosféry,

— rozdíl tlaků (kladný nebo záporný),

— počet expozičních otvorů v každé komoře (v případě nazální expozice), umístění zvířat v komoře (v případě celotělové expozice),

— stabilita zkušební atmosféry,

— umístění čidel ke snímání teploty a vlhkosti a odběr vzorků zkušební atmosféry v komoře,

— úprava dodávaného/odsávaného vzduchu,

— průtokové rychlosti vzduchu, průtoková rychlost vzduchu/expoziční otvor (nazální expozice) nebo množství zvířat/komora (celotělová expozice),

— doba nutná k dosažení rovnovážného stavu v inhalační komoře (t95),

— počet výměn objemu vzduchu za hodinu,

— měřicí přístroje (používají-li se).

Údaje o expozici

— zdůvodnění volby cílové koncentrace v hlavní studii,

▼M4

— nominální koncentrace (celková hmotnost zkoušené chemické látky generované do inhalační komory vydělená objemem vzduchu prošlým komorou),

— skutečné koncentrace zkoušené chemické látky naměřené v dýchací zóně zvířat. U směsí, které vytvářejí heterogenní fyzikální formy (plyny, páry, aerosoly), je možné analyzovat každou zvlášť,

— veškeré koncentrace látky ve vzduchu by se měly uvádět raději v hmotnostních jednotkách (mg/l, mg/m^3, atd.) než v objemových jednotkách (ppm, ppb atd.),

— distribuce velikosti částic, hmotnostní medián aerodynamického průměru (MMAD) a geometrická směrodatná odchylka (σ_g), včetně metod jejich výpočtu. Měly by se uvést jednotlivé analýzy velikosti částic.

Zkušební podmínky

— podrobné údaje o přípravě zkoušené chemické látky včetně postupů použitých ke snížení velikosti částic pevných látek nebo k přípravě roztoků zkoušené chemické látky,

— popis (pokud možno s nákresem) zařízení použitého ke generování zkušební atmosféry k expozici zvířat zkušební atmosféře,

— podrobné údaje o zařízení použitém k monitorování teploty a vlhkosti v komoře a proudění vzduchu komorou (tj. vývoj kalibrační křivky),

— podrobné údaje o zařízení použitém k odběru vzorků ke stanovení koncentrace látky v komoře a distribuce velikosti částic,

— podrobné údaje o použité chemické analytické metodě a validaci metody (včetně účinnosti výtěžnosti zkoušené chemické látky ze vzorkovaného média),

— metoda randomizace použitá k rozdělení zvířat do zkoušených a kontrolních skupin,

— podrobnosti o jakosti vody a krmiva (včetně druhu/zdroje krmiva, zdroje vody),

— zdůvodnění výběru zkoušených koncentrací.

Výsledky

— tabulka s údaji o teplotě, vlhkosti a průtoku vzduchu v komoře,

— tabulka s údaji o nominální a skutečné koncentraci v komoře,

— tabulka s údaji o velikosti částic včetně údajů o odběru analytických vzorků, distribuce velikosti částic a výpočtů MMAD a σ_g,

— tabulka s údaji o odezvě a úrovni koncentrace u každého zvířete (tj. zvířata vykazující příznaky toxicity včetně mortality, charakter, závažnost, doba nástupu a trvání účinků),

▼M4

— tabulka s údaji o tělesné hmotnosti jednotlivých zvířat,

— tabulka s údaji o spotřebě krmiva,

— tabulka s klinickými patologickými údaji,

— pitevní a histopatologické nálezy pro každé zvíře, pokud jsou k dispozici,

— tabulka se všemi dalšími měřenými parametry.

Diskuse a interpretace výsledků

— zvláštní důraz by se měl klást na popis metod použitých ke splnění kritérií této zkušební metody, např. mezní koncentrace nebo velikost částic,

— je třeba zabývat se vdechovatelností částic s ohledem na celkové nálezy, zejména pokud nebylo možné splnit kritéria pro velikost částic,

— v celkovém hodnocení studie by se měla uvést konzistentnost metod použitých ke stanovení nominálních a skutečných koncentrací a vztahu mezi aktuální a skutečnou koncentrací,

— měla by se uvést pravděpodobná příčina úhynu a převládající mechanismus účinku (systémový nebo lokální),

— mělo by se uvést vysvětlení, pokud bylo nutné humánně utratit zvířata trpící bolestí nebo vykazující známky intenzivního a přetrvávajícího utrpení, na základě kritérií uvedených v pokynech OECD o humánních parametrech (3),

— měl(y) by se určit cílový (cílové) orgán(y),

— měla by se stanovit hodnota NOAEL a LOAEL.

LITERATURA:

1) OECD (1981). Subchronic Inhalation Toxicity Testing, Original Test Guideline No 412, Environment Directorate, OECD, Paris.

2) OECD (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing, Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 39, ENV/JM/MONO(2009)28, OECD, Paris.

3) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation, Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris.

4) Whalan JE and Redden JC (1994). Interim Policy for Particle Size and Limit Concentration Issues in Inhalation Toxicity Studies. Office of Pesticide Programs, United States Environmental Protection Agency.

5) Dungworth DL, Tyler WS, Plopper CE (1985). Morphological Methods for Gross and Microscopic Pathology (Chapter 9) in Toxicology of Inhaled Material, Witschi, H.P. and Brain, J.D. (eds), Springer Verlag Heidelberg, pp. 229-258.

6) Young JT (1981). Histopathological examination of the rat nasal cavity. Fundam. Appl. Toxicol. 1: 309-312.

7) Harkema JR (1990). Comparative pathology of the nasal mucosa in laboratory animals exposed to inhaled irritants. Environ. Health Perspect. 85: 231-238.

▼**M4**

8) Woutersen RA, Garderen-Hoetmer A, van Slootweg PJ, Feron VJ (1994). Upper respiratory tract carcinogenesis in experimental animals and in humans. In: Waalkes MP and Ward JM (eds) Carcinogenesis. Target Organ Toxicology Series, Raven Press, New York, 215-263.

9) Mery S, Gross EA, Joyner DR, Godo M, Morgan KT (1994). Nasal diagrams: A tool for recording the distribution of nasal lesions in rats and mice. Toxicol. Pathol. 22: 353-372.

10) Kuper CF, Koornstra PJ, Hameleers DMH, Biewenga J, Spit BJ, Duijvestijn AM, Breda Vriesman van PJC, Sminia T (1992). The role of nasopharyngeal lymphoid tissue. Immunol. Today 13: 219-224.

11) Kuper CF, Arts JHE, Feron VJ (2003). Toxicity to nasal-associated lymphoid tissue. Toxicol. Lett. 140-141: 281-285.

12) Lewis DJ (1981). Mitotic Indices of Rat Laryngeal Epithelia. Journal of Anatomy 132(3): 419-428.

13) Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1272/2008 ze dne 16. prosince 2008 o klasifikaci, označování a balení látek a směsí, o změně a zrušení směrnic 67/548/EHS a 1999/45/ES a o změně nařízení (ES) č. 1907/2006, Úř. věst. L 353, 31.12.2008, s. 1.

▼**M4**

Dodatek 1

DEFINICE

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

▼B

B.9 **DERMÁLNÍ TOXICITA (28DENNÍ OPAKOVANÁ APLIKACE)**

1. **METODA**

1.1 ÚVOD

Viz obecný úvod, část B (A).

1.2 DEFINICE

Viz obecný úvod, část B (B).

1.3 REFERENČNÍ LÁTKY

Žádné.

1.4 PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

Zkoušená látka se denně po dobu 28 dní nanáší na kůži v odstupňovaných dávkách několika skupinám pokusných zvířat, a to každé skupině jedna úroveň dávky. Během doby aplikace se zvířata denně pozorují s cílem zjistit příznaky toxicity. Zvířata, která v průběhu zkoušky uhynula, i zvířata, která do konce zkoušky přežila, se pitvají.

1.5 KRITÉRIA JAKOSTI

Nejsou stanovena.

1.6 POPIS METODY

1.6.1 **Příprava**

Nejméně pět dní před zkouškou jsou zvířata chována v takových podmínkách chovu a krmení, v jakých budou během zkoušky. Před zkouškou se provede náhodný výběr zdravých mladých dospělých zvířat, která se přiřadí do experimentálních a kontrolních skupin. Krátce před zahájením zkoušky se zvířatům ostříhá srst na zádech. Vyholení srsti je rovněž možné, mělo by se však provést asi 24 hodin před zkouškou. Ostříhání nebo oholení je potřeba obvykle opakovat přibližně v týdenních intervalech. Při stříhání nebo holení srsti je třeba dbát na to, aby se neporanila kůže. Pro aplikaci zkoušené látky se připraví nejméně 10 % povrchu těla. Při rozhodování o velikosti připravované plochy kůže, která má být zbavena srsti, a o velikosti krycího obvazu je třeba vzít v úvahu hmotnost zvířat. Při zkouškách pevných látek, které mohou být podle potřeby rozetřeny na prach, se zkoušená látka dostatečně navlhčí vodou nebo podle potřeby vhodným vehikulem, aby se zajistil dobrý styk s kůží. Kapalné zkoušené látky se zpravidla aplikují neředěné. Aplikace se provádí pět až sedm dnů v týdnu.

1.6.2 **Zkušební podmínky**

1.6.2.1 *Pokusná zvířata*

Mohou být použiti dospělí potkani, králíci nebo morčata. Lze použít i jiné živočišné druhy, ale jejich použití musí být zdůvodněno.

▼B

Na začátku zkoušky by nemělo rozpětí odchylek hmotností použitých zvířat u obou pohlaví (pro každé pohlaví zvlášť) překročit ± 20 % příslušné střední hodnoty.

1.6.2.2 *Počet a pohlaví*

Pro každou úroveň dávek se použije nejméně 10 zvířat (pět samic a pět samců). Samice musí být nullipary a nesmí být březí. Pokud se plánuje usmrcování zvířat v průběhu studie, je nutno zvýšit celkový počet zvířat o počet zvířat, která budou usmrcena před koncem studie. Mimoto je možné exponovat po dobu 28 dnů satelitní skupinu 10 zvířat (pět zvířat každého pohlaví) vysokou dávkou a během následujících 14 dnů po podávání sledovat vratnost, trvání nebo zpožděný výskyt toxických účinků. Používá se také satelitní skupina 10 kontrolních zvířat (pět zvířat každého pohlaví).

1.6.2.3 *Úrovně dávek*

Použijí se nejméně tři úrovně dávek a kontrolní skupina nebo, je-li použito vehikulum, kontrolní skupina s vehikulem. Doba expozice by měla být nejméně šest hodin denně. Zkoušená látka by měla být aplikována každý den přibližně ve stejnou dobu a dávkování by mělo být pravidelně (týdně nebo každých čtrnáct dnů) přizpůsobeno, aby bylo konstantní vzhledem k tělesné hmotnosti zvířete. S výjimkou aplikace zkoušené látky se se zvířaty v kontrolní skupině zachází stejně jako se zvířaty v exponované skupině. Použije-li se pro usnadnění aplikace vehikulum, aplikuje se na kontrolní skupinu stejným způsobem a ve stejném množství, jako ve skupině, které se aplikuje nejvyšší dávka. Nejvyšší úroveň dávky by měla mít za následek toxické účinky, ale neměla by způsobit žádná uhynutí, nebo by měla mít za následek malý počet uhynutí. Nejnižší dávka by neměla vyvolat žádné známky toxicity. Je-li k dispozici použitelný odhad expozice člověka, měla by jej nejnižší úroveň překračovat. V ideálním případě by měla střední úroveň dávky vyvolat minimální pozorovatelné toxické účinky. Použije-li se více než jedna střední úroveň dávky, měly by se úrovně lišit tak, aby vyvolaly odstupňované toxické účinky. Ve skupinách s nízkou a střední úrovní dávky a v kontrolní skupině by měla být četnost uhynutí nízká, aby bylo možné provést smysluplné hodnocení výsledků.

Vede-li aplikace zkoušené látky k závažnému podráždění kůže, je třeba snížit koncentraci, což u vysoké úrovně dávky může vést k omezení nebo vyloučení ostatních toxických účinků. Došlo-li navíc k závažnému poškození kůže, je nutné zkoušku ukončit a provést ji znovu s nižšími koncentracemi.

1.6.2.4 *Limitní zkouška*

Nevyvolá-li při předběžné studii aplikace dávky 1 000 mg/kg nebo vyšší dávky, která odpovídá možné expozici člověka, je-li známa, žádné toxické účinky, není další zkoušení potřebné.

1.6.2.5 *Doba pozorování*

Zvířata se pozorují denně s cílem zaznamenat příznaky toxicity. Zaznamená se doba uhynutí a doba, kdy se známky toxicity objeví a vymizí.

▼B

1.6.3 **Postup**

Zvířata se chovají jednotlivě v klecích. Zvířatům se aplikuje zkoušená látka denně nejlépe 7 dní v týdnu po dobu 28 dnů. Zvířata ve všech satelitních skupinách určených pro následná pozorování by neměla být dalších 14 dnů exponována, aby se posoudilo zotavení z toxických účinků, nebo jejich přetrvávání. Doba expozice by měla být nejméně šest hodin denně.

Zkoušená látka se nanese rovnoměrně na plochu, která činí asi 10 % celkového povrchu těla. V případě vysoce toxických látek může být tato plocha menší; co největší část této plochy by se však měla pokrýt co nejslabší a nejstejnoměrnější vrstvou.

Během expozice se zkoušená látka udržuje ve styku s kůží pomocí porézního mulového obvazu a nedráždivé náplasti. Zkušební plocha se dále vhodným způsobem překryje, aby se mulový obvaz a zkoušená látka fixovaly a aby zvířata zkoušenou látku nepožila. K zamezení požití látky je možno použít i prostředků pro omezení volnosti pohybu, úplné znehybnění však nelze doporučit. Jako alternativní metody je možno použít „ochranného límce“.

Po uplynutí doby expozice se odstraní zbytky zkoušené látky, pokud možno vodou nebo jiným vhodným způsobem očištění kůže.

Všechna zvířata se pozorují denně a zaznamenávají se příznaky toxicity, včetně doby jejich nástupu, stupně a trvání. Pozorování zahrnují změny na kůži, na srsti, na očích, na sliznicích, a rovněž změny dýchání, krevního oběhu, změny funkce autonomní a centrální nervové soustavy, somatomotorické aktivity a chování. Každý týden se zvířata váží. Doporučuje se také, aby byla každý týden zjištěna spotřeba potravy. Pravidelné pozorování zvířat je nezbytné k tomu, aby se zajistilo, že u zvířat nedochází ke ztrátám, např. v důsledku kanibalismu, autolýzy tkání nebo chybného zařazení. Po ukončení studie se všechna přeživší zvířata z jiných než satelitních skupin pitvají. Zvířata v agónii a zvířata, která se trápí nebo trpí bolestí, se ihned vyřadí, humánně utratí a pitvají.

Na konci zkušebního období se u všech zvířat, včetně kontrolních, provedou tato vyšetření:

1) hematologické vyšetření: stanovit alespoň hematokrit, koncentraci hemoglobinu, počet erytrocytů, celkový a diferenciální počet leukocytů a srážlivost krve;

2) klinické biochemické vyšetření krve: stanovení alespoň jednoho parametru funkce jater a ledvin: alaninaminotransferasa v séru (dříve známá jako glutamátpyruváttransaminasa), aspartátaminotransferasa séra (dříve známá jako glutamátoxalacetáttransaminasa), močovinový dusík, albumin, kreatinin, celkový bilirubin a celkové bílkoviny v séru.

Mezi jiná stanovení, která mohou být potřebná pro úplné toxikologické hodnocení, patří stanovení vápníku, fosforu, chloridů, sodíku, draslíku, glukosy na lačno, analýza lipidů, hormonů, acidobasické rovnováhy, methemoglobinu, aktivity cholinesterasy.

▼B

Další biochemické analýzy mohou být v případě potřeby použity pro širší vyšetření pozorovaných účinků.

1.6.4 **Pitva**

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

1.6.5 **Histopatologické vyšetření**

U skupiny, které byla aplikována vysoká dávka, a u kontrolní skupiny se provede histologické vyšetření uchovaných orgánů a tkání. Orgány a tkáně, u nichž se ve skupině s nejvyšší koncentrací objeví poškození způsobená zkoušenou látkou, se podrobí histologickému vyšetření i u všech skupin s nižšími dávkami. U zvířat ze satelitní skupiny se provede histologické vyšetření se zvláštním důrazem na orgány a tkáně, na kterých byly pozorovány účinky u ostatních exponovaných skupin.

2. **ÚDAJE**

Data se shrnou do tabulky, přičemž se pro každou exponovanou skupinu uvede počet zvířat na začátku zkoušky a počet zvířat, která vykazují jednotlivé typy léze.

Všechny výsledky se zhodnotí vhodnou statistickou metodou. Lze použít jakoukoli uznanou statistickou metodu.

3. **ZPRÁVY**

3.1 PROTOKOL O ZKOUŠCE

Protokol o zkoušce má pokud možno obsahovat tyto údaje:

— údaje o zvířatech (druh, kmen, původ, podmínky chovu, strava atd.),

— zkušební podmínky (včetně typu obvazu: okluzivní nebo neokluzivní),

— úrovně dávek (včetně vehikula, pokud se použije) a koncentrace,

— dávka, při které nedochází k účinkům, pokud je to možné,

— údaje o toxických reakcích podle pohlaví a úrovně dávky,

— doba uhynutí během studie, nebo zda zvířata přežila do konce zkoušky,

— toxické a jiné účinky,

— doba pozorování každého neobvyklého příznaku a jeho další vývoj,

— údaje o spotřebě potravy a o tělesné hmotnosti,

— provedená hematologická vyšetření a výsledky,

▼B

— provedená klinická biochemická vyšetření a výsledky,

— pitevní nálezy,

— podrobný popis všech histopatologických nálezů,

— statistické zpracování výsledků, kde je to možné,

— diskuse a výsledky,

— interpretace výsledků.

3.2 HODNOCENÍ A INTERPRETACE

Viz obecný úvod, část B (D).

4. **LITERATURA**

Viz obecný úvod, část B (E).

▼M7

B.10 ZKOUŠKA NA CHROMOZÓMOVÉ ABERACE U SAVCŮ *IN VITRO*

ÚVOD

Tato zkušební metoda je rovnocenná pokynu OECD pro zkoušení (TG) č. 473 (2016). Je součástí série zkušebních metod v oblasti genetické toxikologie. Byl vypracován dokument OECD, který obsahuje stručné informace o zkoušení v oblasti genetické toxikologie a přehled posledních změn, které byly v těchto pokynech ke zkoušení provedeny (1).

Zkouška na chromozómové aberace u savců *in vitro* má identifikovat chemické látky, které způsobují strukturní chromozómové aberace v kultivovaných buňkách savců (2) (3) (4). Rozlišují se dva typy strukturních aberací: chromozómové a chromatidové. Při zkouškách na chromozómové aberace *in vitro* by mohla vzniknout polyploidie (včetně endoreduplikace). Aneugenní látky mohou vyvolat polyploidii, avšak z polyploidie samotné nevyplývá aneugenický potenciál a může prostě ukazovat na narušení buněčného cyklu nebo na cytotoxicitu (5). Tato zkouška není určena k měření aneuploidie. K detekci aneuploidie by bylo možné doporučit zkoušku na přítomnost mikrojader *in vitro* (6).

Ke zkoušce na chromozómové aberace *in vitro* mohou být použity stabilizované buněčné linie nebo primární buněčné kultury lidského původu nebo pocházející z hlodavců. Použité buňky by měly být vybrány na základě schopnosti růstu v kultuře, stálosti karyotypu (včetně počtu chromozómů) a spontánní četnosti výskytu chromozómových aberací (7). Údaje, které jsou v současné době k dispozici, neumožňují předkládat jednoznačná doporučení, avšak naznačují, že při hodnocení chemické nebezpečnosti je důležité zvážit stav *p53*, genetickou stálost (stálost karyotypu), reparační schopnost DNA a původ buněk (lidské *versus* pocházející z hlodavců) vybraných ke zkoušení. Uživatelům této zkušební metody se proto doporučuje, aby při detekování indukce chromozómových aberací zvážili vliv těchto i jiných buněčných charakteristik na vlastnosti buněčné linie.

Použité definice jsou uvedeny v dodatku 1.

VÝCHOZÍ ÚVAHY A OMEZENÍ

Zkoušky prováděné *in vitro* zpravidla vyžadují použití exogenního zdroje metabolické aktivace, pokud nejsou buňky metabolicky kompetentní s ohledem na zkoušené chemické látky. Systém exogenní metabolické aktivace zcela nenapodobuje podmínky *in vivo*. Je třeba se zcela vyvarovat podmínek, které by vedly k falešným pozitivním výsledkům, tj. k poškození chromozómů, jež není způsobeno přímou interakcí mezi zkoušenou chemickou látkou a chromozómy; takové podmínky zahrnují změny pH nebo osmolality (8) (9) (10), interakce se složkami média (11) (12) nebo nadměrné úrovně cytotoxicity (13) (14) (15) (16).

Tato zkouška se používá k odhalování chromozómových aberací, jež mohou být výsledkem klastogenního působení. Analýza indukce chromozómových aberací by se měla provádět pomocí buněk v metafázi. Je proto důležité, že buňky by měly dosáhnout mitózy jak v exponovaných, tak v neovlivněných kulturách. Při zkoušení vyráběných nanomateriálů mohou být potřebné určité úpravy metody, které však v této zkušební metodě nejsou popsány.

Před použitím této zkušební metody na směs za účelem získání údajů pro zamýšlené použití v právních předpisech by se mělo zvážit, zda tato metoda může pro tento účel poskytnout přiměřené výsledky, a pokud ano, proč je tomu tak. Takové úvahy nejsou nutné, pokud existuje právní požadavek na zkoušení dané směsi.

▼M7

PRINCIP ZKOUŠKY

Buněčné kultury lidského a savčího původu jsou vystaveny zkoušené chemické látce za přítomnosti exogenního zdroje metabolické aktivace i bez něho, pokud ovšem nejsou použity buňky s dostatečnou schopností metabolismu (viz odstavec 13). Ve vhodných předem stanovených intervalech po začátku expozice buněčných kultur zkoušené chemické látce se přidá látka zastavující metafázi (např. colcemid nebo kolchicin), buňky se shromáždí, obarví a u buněk v metafázi je mikroskopicky analyzována přítomnost chromozómových a chromatidových aberací.

POPIS METODY

Příprava

Buňky

Mohou být použity různé buněčné linie (např. vaječník křečka čínského (CHO), plíce křečka čínského V79, plíce křečka čínského (CHL/IU, TK6) nebo primární buněčné kultury včetně lymfocytů periferní krve člověka nebo jiných savců (7). Volba buněčných linií by měla být odborně zdůvodněna. Použijí-li se primární buňky, mělo by se vzhledem k ochraně pokusných zvířat, tam, kde je to možné, zvážit použití primárních buněk lidského původu. V takovém případě se odběr vzorků provede v souladu s etickými zásadami a předpisy platnými pro člověka. Lymfocyty periferní krve člověka by měly být získány od mladých (přibližně ve věku 18–35 let) nekuřáků, o nichž není známo, že by trpěli nemocemi nebo že by byli nedávno vystaveni genotoxickým činitelům (např. chemickým látkám, ionizujícímu záření) na úrovních, které by mohly zvýšit spontánní výskyt chromozómových aberací. Tím by se mělo zajistit, že spontánní výskyt chromozómových aberací bude nízký a stálý. Spontánní výskyt chromozómových aberací se s věkem zvyšuje a tento trend je více patrný u žen než u mužů (17) (18). Pokud se společně používají buňky pocházející od více než jednoho dárce, měl by být počet dárců uveden. Je nezbytné prokázat, že buňky se dělily od počátku ošetření zkoušenou chemickou látkou až do odběru buněk k analýze. Buněčné kultury jsou udržovány ve fázi exponenciálního růstu buněk (buněčné linie) nebo jsou stimulovány k dělení (primární kultury lymfocytů), aby bylo možné exponovat buňky v různých stadiích buněčného cyklu, protože citlivost stadií na zkoušené chemické látky nemusí být známa. Primární buňky, které k dělení potřebují stimulaci mitogenními látkami, během expozice zkoušené chemické látce již zpravidla nejsou dále synchronizovány (např. lidské lymfocyty po 48hodinové mitogenní stimulaci). Použití synchronizovaných buněk v průběhu expozice se nedoporučuje, avšak lze je akceptovat v odůvodněných případech.

Média a kultivační podmínky

Pro udržování kultur by mělo být použito vhodné kultivační médium a inkubační podmínky (kultivační nádoby, případně zvlhčená atmosféra s 5 % CO_2, inkubační teplota 37 °C). U buněčných linií by se měla pravidelně kontrolovat stabilita modální hodnoty počtu chromozómů a mělo by se zjišťovat, zda nejsou kontaminovány *mykoplasmaty* (7) (19). Pokud jsou kultury kontaminované nebo se modální hodnota počtu chromozómů změnila, neměly by se dotyčné kultury používat. Pro buněčné linie nebo primární kultury použité ve zkušební laboratoři by měla být stanovena normální délka buněčného cyklu, která by měla být v souladu s buněčnými charakteristikami uvedenými v literatuře (20).

Příprava kultur

Buněčné linie: buňky se pomnoží z kmenových kultur, nasadí se do kultivačního média v takové hustotě, aby u buněk v suspenzích nebo v monovrstvách pokračoval exponenciální růst až do sběru buněk (např. mělo by se zamezit konfluenci u buněk rostoucích v monovrstvách).

▼M7

Lymfocyty: krev ošetřená antikoagulantem (např. heparinem) nebo oddělené lymfocyty se kultivují (např. po dobu 48 hodin u lidských lymfocytů) za přítomnosti mitogenu [např. fytohemaglutinin (PHA) u lidských lymfocytů], aby se indukovalo dělení buněk před expozicí zkoušené chemické látce.

Metabolická aktivace

Při použití buněk, které mají nedostatečnou endogenní metabolickou schopnost, by se měly použít exogenní metabolizující systémy. Nejčastěji používaným systémem, který je standardně doporučován, pokud není zdůvodněno použití jiného systému, je postmitochondriální frakce (S9) doplněná kofaktory. Tato frakce se připravuje z jater hlodavců (zpravidla potkanů) exponovaných látkami indukujícími enzymy, jako je Aroclor 1254 (21) (22) (23) nebo kombinace fenobarbitalu a β-naftoflavonu (24) (25) (26) (27) (28) (29). Posledně jmenovaná kombinace není v rozporu se Stockholmskou úmluvou o perzistentních organických znečišťujících látkách (30) a bylo prokázáno, že je stejně účinná jako Aroclor 1254 pro indukování oxidáz se smíšenou funkcí (24) (25) (26) (28). Frakce S9 je v konečném testovacím médiu obvykle používána v koncentracích od 1 % do 2 % obj., ale koncentraci je možné zvýšit až na 10 %. V průběhu aplikace by se neměly používat látky, jež snižují mitotický index, zejména látky, které tvoří komplexy s vápníkem (31). Volbu typu a koncentrace systému exogenní metabolické aktivace nebo metabolického induktoru, který se použije, je třeba provádět s ohledem na typ zkoušených chemických látek

Příprava zkoušené chemické látky

Pevné zkoušené chemické látky by měly být před aplikací na buňky rozpuštěny ve vhodných rozpouštědlech a popřípadě zředěny (viz odstavec 23). Kapalné zkoušené látky mohou být přidány přímo k testovacímu systému a/nebo mohou být před aplikací zředěny. Plynné a těkavé zkoušené chemické látky by se měly zkoušet za použití vhodně upravených standardních protokolů, například prostřednictvím ošetření buněk v neprodyšně uzavřených kultivačních nádobách (32) (33) (34). Zkoušená chemická látka by měla být připravena bezprostředně před aplikací, pokud údaje o stálosti neprokazují možnost skladování.

Zkušební podmínky

Rozpouštědla

Rozpouštědlo by mělo být zvoleno tak, aby optimalizovalo rozpustnost zkoušené chemické látky, aniž by nepříznivě ovlivnilo provádění zkoušky, např. měnilo růst buněk, ovlivňovalo integritu zkoušené chemické látky, reagovalo s kultivačními nádobami, narušovalo systém metabolické aktivace. Doporučuje se pokud možno nejdříve zvážit použití vodného rozpouštědla (nebo kultivačního média). Dobře zavedenými rozpouštědly jsou například voda nebo dimethylsulfoxid. Podíl organických rozpouštědel by zpravidla neměl být větší než 1 % obj. a podíl vodných rozpouštědel (fyziologického roztoku nebo vody) v konečném expozičním médiu by neměl být větší než 10 % obj. Použijí-li se jiná než dobře zavedená rozpouštědla (např. ethanol nebo aceton), mělo by být jejich použití podloženo údaji o jejich kompatibilitě se zkoušenou chemickou látkou a zkušebním systémem a o tom, že nejsou v použité koncentraci genotoxické. Pokud takové podpůrné údaje neexistují, je důležité zařadit neexponované kontroly (viz dodatek 1) prokazující, že zvolené rozpouštědlo nevyvolává žádné škodlivé nebo klastogenní účinky.

Měření buněčné proliferace a cytotoxicity a volba expozičních koncentrací

Při stanovení nejvyšší koncentrace zkoušené chemické látky by neměly být použity koncentrace, které jsou schopny vyvolat falešnou pozitivní odpověď, jako např. koncentrace, jež vyvolávají nadměrnou cytotoxicitu (viz odstavec 22), srážení kultivačního média (viz odstavec 23) nebo zřetelné změny pH nebo osmolality (viz odstavec 5). Pokud zkoušená chemická látka v době jejího

▼M7

přidání způsobuje zřetelnou změnu hodnoty pH média, pH může být upraveno pufrováním konečného expozičního média tak, aby nedošlo k falešným pozitivním výsledkům a aby byly zachovány vhodné kultivační podmínky.

Provádí se měření buněčné proliferace, aby bylo zajištěno, že dostatečný počet ošetřených buněk prodělal během zkoušky mitózu a že expozice je prováděna při vhodných úrovních cytotoxicity (viz odstavce 18 a 22). Cytotoxicita by měla být stanovena v hlavním experimentu s metabolickou aktivací a bez ní za použití vhodných indikátorů buněčné smrti a růstu. Hodnocení cytotoxicity při předběžné zkoušce může být užitečné a může napomoci k lepšímu určení koncentrací, jež mají být použity při hlavní zkoušce, avšak předběžná zkouška není povinná. Pokud se provede, nemůže nahradit měření cytotoxicity při hlavním experimentu.

Vhodnými metodami pro posouzení cytotoxicity v cytogenetických zkouškách jsou relativní zdvojnásobení populace (RPD) nebo relativní nárůst počtu buněk (RICC) (13) (15) (35) (36) (55) (příslušné vzorce viz dodatek 2). V případě dlouhodobé expozice a dobách odběru delších než 1,5násobek normální délky buněčného cyklu po zahájení zkoušky (tj. celkově delších než trojnásobek délky buněčného cyklu) by použití RPD mohlo vést k podhodnocení cytotoxicity (37). Za těchto okolností měření RICC může být lepším ukazatelem nebo v případě použití RPD by hodnocení cytotoxicity po 1,5násobku normální délky buněčného cyklu mohlo být užitečné.

U lymfocytů v primárních kulturách je mírou cytotoxických/cytostatických účinků mitotický index (MI), avšak ten je ovlivněn tím, po jaké době od expozice se měří, použitým mitogenem a možným narušením buněčného cyklu. MI je však přijatelný, protože jiné metody stanovení cytotoxicity mohou být obtížné a nepraktické a nemusí platit pro cílovou populaci lymfocytů rostoucích v reakci na stimulaci pomocí PHA.

Ačkoli doporučenými parametry cytotoxicity jsou pro buněčné linie RICC a RPD a pro primární kulturu lymfocytů MI, mohly by další užitečné informace poskytnout i jiné ukazatele (např. integrita buněk, apoptóza, nekróza, buněčný cyklus).

Měly by se vyhodnotit nejméně tři zkušební koncentrace (nepočítaje v to kontroly s rozpouštědlem a pozitivní kontroly), které splňují kritéria přijatelnosti (vhodná cytotoxicita, počet buněk atd.). Bez ohledu na typy buněk (buněčné linie nebo primární kultury lymfocytů) mohou být pro každou zkušební koncentraci použity buď jednotlivé exponované kultury nebo replikáty.I když je doporučováno použití duplicitních kultur, jednu kulturu lze rovněž akceptovat za předpokladu, že v této jediné kultuře je hodnocen stejný celkový počet buněk jako v duplicitních kulturách. Použití jedné kultury je opodstatněné zejména v případě, že jsou posuzovány více než 3 koncentrace (viz odstavec 31). Výsledky získané z duplicitních nezávislých kultur při dané koncentraci lze pro účely analýzy údajů sloučit (38). U zkoušených látek, jež vykazují malou cytotoxicitu nebo nevykazují žádnou cytotoxicitu, budou obvykle vhodné přibližně dvojnásobné až trojnásobné intervaly koncentrací. V případě cytotoxicity by měly zvolené zkušební koncentrace pokrývat rozpětí od koncentrace vyvolávající cytotoxicitu, jak je popsáno v odstavci 22, po koncentrace, při nichž dochází ke střední a nízké cytotoxicitě nebo nedochází k žádné cytotoxicitě. Mnohé zkoušené chemické

▼M7

látky vykazují strmé křivky závislosti odezvy na koncentraci, a aby bylo možné získat údaje při nízké a střední cytotoxicitě nebo podrobně studovat závislost účinku na dávce, může být nezbytné zvolit menší rozdíly mezi jednotlivými koncentracemi a/nebo více než tři koncentrace (ať už pro jednu kulturu, nebo replikáty), zejména v případě kdy je požadován opakovaný experiment (viz odstavec 47).

Je-li maximální koncentrace odvozena od cytotoxicity, měla by být nejvyšší koncentrace zvolena tak, aby se dosáhlo 55 ± 5 % cytotoxicity za použití doporučených parametrů cytotoxicity (tj. snížení RICC a RPD u buněčných linií a snížení MI u primárních kultur lymfocytů na 45 ± 5 % u souběžné negativní kontroly). Je třeba dbát na to, aby byly interpretovány pouze ty pozitivní výsledky, které jsou vykazovány při vyšší hranici tohoto rozmezí cytotoxicity 55 ± 5 % (13).

V případě špatně rozpustných zkoušených chemických látek, které nejsou cytotoxické při koncentracích nižších, než je jejich rozpustnost, by nejvyšší analyzovaná koncentrace měla na konci expozice zkoušené chemické látce vyvolat zákal nebo sraženinu viditelnou pouhým okem nebo pomocí inverzního mikroskopu. Dokonce i v případech, kdy k výskytu cytotoxicity dochází při koncentracích vyšších, než je rozpustnost, se doporučuje testovat pouze při jedné koncentraci vyvolávající zákal nebo viditelné sraženiny, neboť sraženina může vést k falešným účinkům. Při koncentraci, kdy vzniká sraženina, je třeba dbát na to, aby sraženina nemohla ovlivňovat provádění zkoušky (např. barvení nebo hodnocení). Užitečné může být stanovit rozpustnost v kultivačním médiu před pokusem.

Není-li pozorována sraženina nebo omezení cytotoxicity, měla by nejvyšší zkušební koncentrace odpovídat 10 mM, 2 mg/ml nebo 2 µl/ml, podle toho, která z uvedených hodnot je nejnižší (39) (40) (41). Pokud u zkoušené chemické látky není stanoveno její složení, např. u látek s neznámým nebo proměnlivým složením, komplexních reakčních produktů nebo biologického materiálu (UVCB) (42), přírodního extraktu atd., může v případě nízké cytotoxicity být horní koncentrace vyšší (např. 5 mg/ml), aby se zvýšila koncentrace každé ze složek. Je však třeba poznamenat, že u humánních léčivých přípravků se tyto požadavky mohou lišit (43).

Kontroly

Pro každý časový interval sběru buněk by měly být použity souběžné negativní kontroly (viz odstavec 15) skládající se ze samotného rozpouštědla v kultivačním médiu a zpracované stejným způsobem jako exponované kultury.

Souběžné pozitivní kontroly jsou nutné pro prokázání schopnosti laboratoře identifikovat klastogeny za daných experimentálních podmínek a pro prokázání účinnosti exogenního systému metabolické aktivace, všude kde je to možné. Příklady pozitivních kontrol jsou uvedeny v tabulce 1 níže. V odůvodněných případech mohou být použity jiné pozitivní kontrolní chemické látky. Jelikož zkoušky na buňkách savců *in vitro* za účelem stanovení genetické toxicity jsou dostatečně standardizované, může se použití pozitivních kontrol omezit na experimenty s kontrolními klastogeny vyžadujícími metabolickou aktivaci. Pokud je provedena souběžně se zkouškou bez aktivace se stejnou dobou trvání expozice, tato jediná odpověď v pozitivní kontrole prokáže činnost metabolického aktivačního systému a citlivost testovacího systému. Dlouhodobá expozice (bez S9) by však měla mít svou vlastní pozitivní kontrolu, protože doba trvání expozice bude odlišná než při zkoušce za použití metabolické aktivace. Každá pozitivní kontrola by měla být použita při jedné nebo více koncentracích, u nichž se očekává, že poskytnou reprodukovatelný a detekovatelný nárůst oproti pozadí, čímž se prokáže citlivost testovacího systému (tj. aby byl účinek zřetelný, ale aby při odečtu nevyšla ihned najevo identita kódovaného preparátu), a reakce by neměla být narušena cytotoxicitou přesahující limitní hodnoty stanovené ve zkušební metodě.

▼M7

Tabulka 1.

Referenční chemické látky doporučené pro posouzení způsobilosti laboratoře a pro výběr pozitivních kontrol.

Kategorie	Chemická látka	Registrační číslo CAS
1. Klastogeny působící bez metabolické aktivace		
	methyl-methansulfonát	66-27-3
	mitomycin C	50-07-7
	4-nitrochinolin-1-oxid	56-57-5
	cytosin arabinosid	147-94-4
2. Klastogeny vyžadující metabolickou aktivaci		
	benzo[a]pyren	50-32-8
	cyklofosfamid	50-18-0

POSTUP

Expozice zkoušené chemické látce

Proliferující buňky se vystaví zkoušené chemické látce jak za přítomnosti metabolického aktivačního systému, tak bez něho.

Doba sběru buněk

Pro důkladné hodnocení, které by bylo zapotřebí pro vyvození závěru o negativním výsledku, by měly být splněny všechny tři následující zkušební podmínky za použití krátkodobé expozice s metabolickou aktivací a bez ní a dlouhodobé expozice bez metabolické aktivace (viz odstavce 43, 44 a 45):

— buňky by měly být vystaveny zkoušené chemické látce bez metabolické aktivace na dobu 3–6 hodin a měly by být odebrány po takové době od zahájení aplikace, která odpovídá 1,5násobku normální délky buněčného cyklu (18),

— buňky by měly být vystaveny zkoušené chemické látce s metabolickou aktivací na dobu 3–6 hodin a měly by být odebrány po takové době od zahájení aplikace, která odpovídá 1,5násobku normální délky buněčného cyklu (18),

— buňky by měly být vystaveny nepřetržité expozicí bez metabolické aktivace až do odběru v době, která odpovídá 1,5násobku normální délky buněčného cyklu. Určité chemické látky (např. analogy nukleosidů) lze snáze detekovat při dobách aplikace nebo odběru delších než 1,5násobek délky cyklu (24).

V případě, že kterékoli z výše uvedených experimentálních uspořádání vedlo k pozitivní odpovědi, nebude nutné zkoumat kterýkoli z ostatních režimů aplikace.

Příprava preparátů pro analýzu chromozómů

Do buněčné kultury se obvykle 1–3 hodiny před ukončení kultivace přidá colcemid nebo kolchicin. Pro přípravu preparátů pro analýzu chromozómů se každá buněčná kultura zpracovává zvlášť. Příprava preparátů pro analýzu chromozómů zahrnuje hypotonizaci buněk, fixaci a obarvení buněk. Na konci doby expozice v trvání 3–6 hodin se v monovrstvách mohou vyskytovat mitotické buňky (které se vyznačují okrouhlým tvarem a odchlipováním od povrchu). Jelikož lze tyto mitotické buňky snadno oddělit, mohou být při odstranění

▼M7

média obsahujícího zkoušenou chemickou látku ztraceny. Pokud v době sběru buněk existují důkazy podstatného nárůstu počtu mitotických buněk v porovnání s kontrolami, což pravděpodobně ukazuje na zastavení mitózy, pak by buňky měly být odebrány odstředěním a přidány zpět do kultur, aby se zabránilo ztrátě buněk, u nichž probíhá mitóza a mohou zde vznikat chromozómové aberace.

Analýza

Všechny preparáty, včetně pozitivních a negativních kontrol, by měly být před mikroskopickou analýzou chromozómových aberací nezávisle kódovány. Poněvadž při fixaci u částu buněk v metafázi často dochází ke ztrátě chromozómů, měly by tudíž vyšetřované buňky obsahovat centromery v počtu rovném modální hodnotě +/- 2.

Aby bylo možno vyhodnotit zkoušenou chemickou látku jako jasně negativní, u každé koncentrace a kontroly by mělo být hodnoceno alespoň 300 dobře rozprostřených metafází. Jsou-li využívány k replikám, mělo by být těchto 300 buněk rovnoměrně rozděleno mezi tyto kultury. Pokud je pro každou koncentraci použita jediná kultura (viz odstavec 21), mělo by být hodnoceno alespoň 300 dobře rozprostřených metafází v této jedné kultuře. Hodnocení 300 buněk má tu výhodu, že se zvyšuje statistická síla zkoušky a navíc budou zřídka pozorovány nulové hodnoty (předpokládá se, že pouze u 5 % buněk) (44). Počet hodnocených metafází lze snížit, je-li pozorován velký počet chromozómových aberací a zkoušená chemická látka je považována za jasně pozitivní.

Měly by být hodnoceny buňky se strukturními chromozómovými aberacemi včetně gapů a s vyloučením gapů. Zlomy a gapy jsou definovány v Dodatku 1 podle (45) (46). Chromatidové a chromozómové aberace by měly být zaznamenávány odděleně a klasifikovány podle podtypů (zlomy, výměny). Postupy používané v laboratoři by měly zajistit, aby analýzu chromozómových aberací prováděli dobře odborně připravení hodnotitelé a aby tato analýza byla případně podrobena odborné revizi.

Ačkoli je účelem zkoušky detekovat strukturní chromozómové aberace, je důležité zaznamenat četnost výskytu polyploidií a endoreduplikací, jsou-li tyto jevy pozorovány (viz odstavec 2).

Způsobilost laboratoře

Aby laboratoř prokázala dostatečnou zkušenost s testem před rutinním použitím, měla by provést sérii experimentů s referenčními pozitivními chemickými látkami, jež působí prostřednictvím různých mechanismů, a s různými negativními kontrolami (s použitím různých rozpouštědel/vehikul). Odpovědi těchto pozitivních a negativních kontrol by měly být v souladu s odbornou literaturou. Toto se nepoužije na laboratoře, které tuto zkušenost mají, tj. které mají k dispozici databázi historických údajů, jak je definována v odstavci 37.

U vybraných pozitivních chemických látek (viz tabulka 1 v odstavci 26) by měla být testována krátká a dlouhá expozice za nepřítomnosti metabolické aktivace a rovněž krátká expozice za přítomnosti metabolické aktivace, aby byla prokázána způsobilost pro detekci klastogenních chemických látek a stanovení účinnosti systému metabolické aktivace. Rozsah koncentrací by u vybraných chemických látek měl být zvolen tak, aby poskytl opakovatelná zvýšení účinku v jednotlivých koncentracích ve srovnání s úrovní pozadí, aby se tak prokázala citlivost a dynamické rozpětí testovacího systému.

▼M7

Historické kontrolní údaje

Laboratoř by měla stanovit:

— historické rozmezí a distribuci pozitivních kontrolních účinků,

— historické rozmezí a distribuci negativních kontrolních účinků (neexponovaných kultur, s rozpouštědlem).

Při prvním získávání údajů o historické distribuci negativních kontrol by měly být výsledky provedených negativních kontrol v souladu s publikovanými kontrolními údaji, pokud existují. S tím, jak je do distribuce kontrol přidáváno více údajů z experimentů, měly by aktuální negativní kontroly v ideálním případě spadat do 95 % rozmezí této distribuce (44) (47). Historická databáze negativních kontrol dané laboratoře by měla být vytvořena na základě nejméně 10 experimentů, nejlépe však by měla zahrnovat nejméně 20 experimentů provedených za srovnatelných zkušebních podmínek. V laboratořích by měly být uplatňovány metody řízení jakosti, jako např. kontrolní diagramy (např.C-charts nebo X-bar charts (48)), z nichž je patrné, jak proměnlivé jsou jejich údaje o pozitivních a negativních kontrolách a že metodika je v dané laboratoři „pod kontrolou“ (44). Další doporučení, jak získat a používat historické údaje (tj. kritéria pro zařazení údajů do historické databáze a jejich vyřazení a kritéria přijatelnosti pro daný experiment), lze najít v literatuře (47).

Jakékoli změny zkušebního protokolu by měly být zvažovány z hlediska jejich souladu se stávajícími historickými kontrolními databázemi laboratoře. Jakýkoli větší změna by měla vést k zavedení nové historické kontrolní databáze.

Údaje o negativních kontrolách by měly zahrnovat výskyt buněk s chromozómovými aberacemi z jedné kultury nebo ze souhrnu replikovaných kultur, jak je popsáno v odstavci 21. Výsledky aktuálních negativních kontrol by v ideálním případě měly spadat do 95 % rozmezí distribuce v historické databázi negativních kontrol laboratoře (44) (47). Pokud jsou údaje z aktuálních negativních kontrol mimo 95 % rozmezí, může být přijatelné je zahrnout do dosavadní distribuce kontrol, pokud tyto údaje nejsou mimořádně odlehlé a pokud existuje důkaz o tom, že testovací systém je „pod kontrolou“ (viz odstavec 37), a důkaz o tom, že nedošlo k technické nebo lidské chybě.

ÚDAJE A PŘEDKLÁDÁNÍ ZPRÁV

Vyjádření výsledků

Měl by se vyhodnotit procentuální podíl buněk se strukturními chromozómovými aberacemi. Chromatidové a chromozómové aberace klasifikované podle podtypů (zlomy, výměny) by měly být uvedeny odděleně spolu s jejich počty a četností v experimentálních a kontrolních kulturách. Gapy se zaznamenávají a uvádějí odděleně, ale nezahrnují se do celkové četnosti výskytu aberací. Zaznamená se procentuální podíl polyploidie a/nebo endoreduplikovaných buněk, pokud jsou pozorovány.

Měly by být zaznamenány výsledky souběžného stanovení cytotoxicity u všech exponovaných kultur a negativních a pozitivních kontrolních kultur v hlavních experimentech pro hodnocení aberací.

Měly by být uvedeny údaje pro jednotlivé kultury. Všechny údaje by měly být shrnuty ve formě tabulek.

Kritéria přijatelnosti

Přijetí zkoušky je založeno na následujících kritériích:

— souběžná negativní kontrola je považována za přijatelnou pro přidání do historické databáze negativních kontrol laboratoře, jak je popsáno v odstavci 39,

▼M7

— souběžné pozitivní kontroly (viz odstavec 26) by měly vyvolat odpovědi, které jsou slučitelné s odpověďmi uvedenými v historické databázi pozitivních kontrol, a měly by vyvolat statisticky významný nárůst v porovnání se souběžnou negativní kontrolou,

— měla by být splněna kritéria buněčné proliferace při kontrole s rozpouštědlem (odstavce 17 a 18),

— test je proveden za všech tří popsaných experimentálních uspořádání, pokud jedno z nich nevedlo k pozitivním výsledkům (viz odstavec 28),

— je analyzovatelný adekvátní počet buněk a koncentrací (odstavce 31 a 21),

— kritéria pro výběr nejvyšší koncentrace jsou v souladu s kritérii popsanými v odstavcích 22, 23 a 24.

Hodnocení a interpretace výsledků

Za předpokladu, že všechna kritéria přijatelnosti byla splněna, lze zkoušenou chemickou látku považovat za jasně pozitivní, pokud v některé ze zkoumaných experimentálních uspořádání (viz odstavec 28):

a) alespoň jedna ze zkušebních koncentrací vykazuje statisticky významný nárůst v porovnání se souběžnou negativní kontrolou;

b) pokud je prokázána závislost účinku na dávce pomocí vhodného statistického trend-testu;

c) pokud kterýkoli z výsledků je mimo distribuci historických údajů o negativních kontrolách (např. 95 % kontrolních limitů dle Poissonova rozdělení; viz odstavec 39).

Jsou-li splněna všechna tato kritéria, má se za to, že zkoušená chemická látka je schopna vyvolávat chromozómové aberace v kultivovaných savčích buňkách v tomto testovacím systému. Doporučení ohledně nejvhodnějších statistických metod lze najít v literatuře (49) (50) (51).

Za předpokladu, že byla splněna všechna kritéria přijatelnosti, lze zkoušenou chemickou látku považovat za jasně negativní, pokud za všech zkoumaných experimentálních uspořádání (viz odstavec 28):

a) žádná ze zkušebních koncentrací nevykazuje statisticky významný nárůst v porovnání se souběžnou negativní kontrolou;

b) hodnocení pomocí vhodného statistického trend-testu ukáže, že nedochází k nárůstu účinku v závislosti na koncentraci;

c) všechny výsledky spadají do rámce distribuce historických údajů o negativních kontrolách (např. 95 % kontrolních limitů dle Poissonova rozdělení; viz odstavec 39).

Pak se má za to, že zkoušená chemická látka není schopna vyvolávat chromozómové aberace v kultivovaných savčích buňkách v tomto testovacím systému.

Ověření jasně pozitivní či jasně negativní odpovědi se nepožaduje.

V případě, že odpověď není ani jasně negativní, ani jasně pozitivní, jak je popsáno výše, nebo s cílem napomoci při stanovení biologického významu výsledku, by měly být údaje vyhodnoceny na základě odborného posouzení a/nebo dalším šetřením. Užitečné by mohlo být hodnocení většího počtu buněk (je-li vhodné) nebo provedení opakovaného experimentu, případně s použitím upravených zkušebních podmínek (např. rozsah koncentrací, jiné podmínky metabolické aktivace (např. koncentrace S9 nebo původu S9)).

V ojedinělých případech dokonce ani po dalším šetření nebude možné na základě daného souboru údajů učinit závěr, zda jsou výsledky pozitivní či negativní, a proto bude učiněn závěr, že odpověď na zkoumanou chemickou látku je neurčitá.

▼M7

Nárůst počtu polyploidních buněk může znamenat, že zkoušená chemická látka má schopnost potlačit mitotické procesy a indukovat numerické chromozómové aberace (52). Nárůst počtu buněk s endoreduplikovanými chromozómy může znamenat, že zkoušené chemické látky mají schopnost potlačit progresi buněčného cyklu (53) (54) (viz odstavec 2). Výskyt polyploidních buněk a buněk s endoreduplikovanými chromozómy by se proto měl zaznamenat odděleně.

Závěrečná zpráva

Závěrečná zpráva by měla obsahovat tyto informace:

Zkoušená chemická látka:

— zdroj, číslo šarže a je-li k dispozici, datum použitelnosti,

— stabilita zkoušené chemické látky samotné, je-li známa,

— rozpustnost a stabilita zkoušené chemické látky v rozpouštědle, je-li známa,

— měření pH, případně osmolality a sraženiny v kultivačním médiu, do něhož byla přidána zkoušená chemická látka.

Jednosložková látka:

— fyzický vzhled, rozpustnost ve vodě a další důležité fyzikálně-chemické vlastnosti,

— chemická identifikace, jako např. název IUPAC nebo CAS, číslo CAS, kód SMILES nebo InChl, strukturní vzorec, čistota, případně chemická identita nečistot, je-li to prakticky proveditelné, atd.

Vícesložková látka, UVCB a směsi:

— charakterizovaná v co možná největší míře chemickou identitou (viz výše), kvantitativním zastoupením a důležitými fyzikálně-chemickými vlastnostmi složek.

Rozpouštědlo:

— zdůvodnění volby rozpouštědla,

— měl by se též uvést procentuální podíl rozpouštědla v konečném kultivačním médiu.

Buňky:

— typ a zdroj buněk,

— vlastnosti karyotypu a vhodnost použitého typu buněk,

— nepřítomnost mykoplasmat v případě buněčných linií,

— u buněčných linií informace o délce buněčného cyklu, době zdvojnásobení nebo proliferační index,

— pohlaví dárců krve, věk a další důležité informace o dárci, zda byla použita plná krev nebo separované lymfocyty, použitý mitogen,

— případně počet pasáží v případě buněčných linií,

— metody udržování buněčných kultur v případě buněčných linií,

— modální hodnota počtu chromozómů v případě buněčných linií.

▼**M7**

Zkušební podmínky:

— identifikace chemické látky zastavující metafázi, její koncentrace a délka expozice buněk,

— koncentrace zkoušené chemické látky vyjádřená jako konečná koncentrace v kultivačním médiu (např. v μg nebo mg/ml nebo mM kultivačního média),

— odůvodnění výběru koncentrací a počtu kultur, včetně např. údajů o cytotoxicitě a mezích rozpustnosti,

— složení média, případně koncentrace CO_2, vlhkost,

— koncentrace (a/nebo objem) rozpouštědla a zkoumané chemické látky přidaných do kultivačního média,

— inkubační teplota,

— inkubační doba,

— délka expozice,

— doba od expozice do odběru buněk k vyhodnocení,

— případně hustota buněk při nasazení,

— typ a složení použitého metabolického aktivačního systému (zdroj S9, metoda přípravy směsi S9, koncentrace nebo objem směsi S9 a S9 v konečném kultivačním médiu, kontroly jakosti S9),

— chemické látky použité v pozitivních a negativních kontrolách, konečné koncentrace pro jednotlivé podmínky expozice,

— metody přípravy preparátů a použitý postup barvení,

— kritéria přijatelnosti zkoušek,

— kritéria hodnocení aberací,

— počet analyzovaných metafází,

— metody měření cytotoxicity,

— jakékoli doplňkové informace týkající se cytotoxicity a použité metody,

— kritéria klasifikace studie na pozitivní, negativní nebo dvojznačnou,

— metody použité ke stanovení pH, osmolality a sraženiny.

Výsledky:

— počet exponovaných buněk a počet sklizených buněk v každé kultuře, jestliže byly použity buněčné linie,

— měření cytotoxicity, např. RPD, RICC, MI, případná další pozorování, existují-li,

— v případě buněčných linií informace o délce buněčného cyklu, době zdvojnásobení nebo proliferační index,

— známky srážení a doba k jejich stanovení,

▼**M7**

— definice aberací, včetně gapů,

— počet hodnocených buněk, počet buněk s chromozómovými aberacemi a typy chromozómových aberací zvlášť pro každou exponovanou a kontrolní kulturu, včetně gapů a s vyloučením gapů,

— změny ploidie (polyploidní buňky a buňky s endoreduplikovanými chromozómy, uvedené odděleně), byly-li pozorovány,

— pokud možno závislost odezvy na koncentraci,

— údaje o souběžné negativní (rozpouštědlo) a pozitivní kontrole (s koncentracemi a rozpouštědly),

— historické údaje o negativních (rozpouštědlo) a pozitivních kontrolách, s rozpětími, středními hodnotami a směrodatnými odchylkami a 95 % rozpětím distribuci, stejně jako počet údajů,

— statistické analýzy, případné p hodnoty.

Rozbor výsledků.

Závěry.

LITERATURA

1) OECD (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, No. 234, OECD, Paris.

2) Evans, H.J. (1976), „Cytological Methods for Detecting Chemical Mutagens“, in *Chemical Mutagens, Principles and Methods for their Detection*, Vol. 4, Hollaender, A. (ed.), Plenum Press, New York and London, s. 1-29.

3) Ishidate, M. Jr., T. Sofuni (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.

4) Galloway, S.M. *et al*. (1987), Chromosomal aberration and sister chromatid exchanges in Chinese hamster ovary cells: Evaluation of 108 chemicals, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 10/suppl. 10, s. 1-175.

5) Muehlbauer, P.A. *et al*. (2008), „Improving dose selection and identification of aneugens in the *in vitro* chromosome aberration test by integration of flow cytometry-based methods“, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 49/4, s. 318-327.

6) Kapitola B.49 této přílohy: *Zkouška na přítomnost mikrojader v buňkách savců in vitro.*

7) ILSI paper (draft), Lorge, E., M. Moore, J. Clements, M. O Donovan, F. Darroudi, M. Honma, A. Czich, J van Benthem, S. Galloway, V. Thybaud, B. Gollapudi, M. Aardema, J. Kim, D.J. Kirkland, Recommendations for good cell culture practices in genotoxicity testing.

8) Scott, D. *et al*. (1991), Genotoxicity under Extreme Culture Conditions. A report from ICPEMC Task Group 9, *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*, Vol.257/2, s. 147-204.

9) Morita, T. *et al*. (1992), Clastogenicity of Low pH to Various Cultured Mammalian Cells, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 268/2, s. 297-305.

10) Brusick, D. (1986), Genotoxic effects in cultured mammalian cells produced by low pH treatment conditions and increased ion concentrations, *Environmental and Molecular Mutagene*sis, Vol. 8/6, s. 789-886.

▼M7

11) Long, L.H. *et al*. (2007), Different cytotoxic and clastogenic effects of epigallocatechin gallate in various cell-culture media due to variable rates of its oxidation in the culture medium, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis,* Vol. 634/1-2, s. 177-183.

12) Nesslany, F. *et al*. (2008), Characterization of the Genotoxicity of Nitrilotriacetic Acid, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 49/6, s. 439-452.

13) Galloway, S. (2000), Cytotoxicity and chromosome aberrations *in vitro*: Experience in industry and the case for an upper limit on toxicity in the aberration assay, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 35/3, s. 191-201.

14) Kirkland, D. *et al*. (2005), Evaluation of the ability of a battery of three *in vitro* genotoxicity tests to discriminate rodent carcinogens and non-carcinogens. I: Sensitivity, specificity and relative predictivity, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 584/1-2, s. 1-256.

15) Greenwood, S. *et al*. (2004), Population doubling: a simple and more accurate estimation of cell growth suppression in the *in vitro* assay for chromosomal aberrations that reduces irrelevant positive results, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 43/1, s. 36-44.

16) Hilliard, C.A. *et al*. (1998), Chromosome aberrations *in vitro* related to cytotoxicity of nonmutagenic chemicals and metabolic poisons, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 31/4, s. 316-326.

17) Hedner K. *et al*. (1982), Sister chromatid exchanges and structural chromosomal aberrations in relation to age and sex, *Human Genetics*, Vol. 62, s. 305-309.

18) Ramsey M.J. *et al*. (1995), The effects of age and lifestyle factors on the accumulation of cytogenetic damage as measured by chromosome painting, *Mutation Research*, Vol. 338, s. 95-106.

19) Coecke S. *et al*. (2005), Guidance on Good Cell Culture Practice. A Report of the Second ECVAM Task Force on Good Cell Culture Practice, *ATLA*, Vol. 33/3, s. 261-287.

20) Henderson, L. *et al*. (1997), Industrial Genotoxicology Group collaborative trial to investigate cell cycle parameters in human lymphocyte cytogenetics studies, *Mutagenesis*, Vol.12/3, s.163-167.

21) Ames, B.N., J. McCann, E. Yamasaki (1975), Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian Microsome Mutagenicity Test, *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, Vol. 31/6, s. 347-363.

22) Maron, D.M., B.N. Ames (1983), Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test, *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, Vol. 113/3–4, s. 173-215.

23) Natarajan, A.T. *et al*. (1976), Cytogenetic Effects of Mutagens/Carcinogens after Activation in a Microsomal System *In Vitro*, I. Induction of Chromosomal Aberrations and Sister Chromatid Exchanges by Diethylnitrosamine (DEN) and Dimethylnitrosamine (DMN) in CHO Cells in the Presence of Rat-Liver Microsomes, *Mutation Res*earch, Vol. 37/1, s. 83-90.

24) Matsuoka, A., M. Hayashi, M. Jr. Ishidate (1979), Chromosomal Aberration Tests on 29 Chemicals Combined with S9 Mix *in vitro*, *Mutation Research/ Genetic Toxicology*, Vol. 66/3, s. 277-290.

25) Ong, T.-m. *et al*. (1980), Differential effects of cytochrome P450-inducers on promutagen activation capabilities and enzymatic activities of S-9 from rat liver, *Journal of Environmental Pathology and Toxicology,* Vol. 4/1, s. 55–65.

26) Elliot, B.M. *et al*. (1992), Report of UK Environmental Mutagen Society Working Party. Alternatives to Aroclor 1254-induced S9 in *in vitro* Genotoxicity Assays, *Mutagenesis*, Vol. 7/3, s. 175-177.

▼M7

27) Matsushima, T. *et al*. (1976), „A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems“, in *In Vitro Metabolic Activation in Mutagenesis Testing*, de Serres, F.J. *et al*. (eds.), Elsevier, North-Holland, s. 85-88.

28) Galloway, S.M. *et al*. (1994). Report from Working Group on *in vitro* Tests for Chromosomal Aberrations, *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, Vol. 312/3, s. 241-261.

29) Johnson, T.E., D.R. Umbenhauer, S.M. Galloway (1996), Human liver S-9 metabolic activation: proficiency in cytogenetic assays and comparison with phenobarbital/beta-naphthoflavone or Aroclor 1254 induced rat S-9, *Environmental and Molecular Mutagenesis,* Vol. 28/1, s. 51-59.

30) UNEP (2001), Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants, United Nations Environment Programme (UNEP). K dispozici na: http:// www.pops.int/.

31) Tucker, J.D., M.L. Christensen (1987), Effects of anticoagulants upon sister-chromatid exchanges, cell-cycle kinetics, and mitotic index in human peripheral lymphocytes, Mutation Research, Vol. 190/3, s. 225-8.

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

33) Zamora, P.O. et al. (1983), Evaluation of an Exposure System Using Cells Grown on Collagen Gels for Detecting Highly Volatile Mutagens in the CHO/HGPRT Mutation Assay, Environmental and Molecular Mutagenesis, Vol. 5/6, s. 795-801.

34) Asakura, M. et al. (2008), An improved system for exposure of cultured mammalian cells to gaseous compounds in the chromosomal aberration assay, Mutation Research, Vol. 652/2, s. 122-130.

35) Lorge, E. et al. (2008), Comparison of different methods for an accurate assessment of cytotoxicity in the in vitro micronucleus test. I. Theoretical aspects, Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, Vol. 655/1-2, s. 1-3.

36) Galloway, S. et al. (2011), Workshop summary: Top concentration for in vitro mammalian cell genotoxicity assays; and Report from working group on toxicity measures and top concentration for in vitro cytogenetics assays (chromosome aberrations and micronucleus), Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, Vol. 723/2, s. 77-83.

37) Honma, M. (2011), Cytotoxicity measurement in in vitro chromosome aberration test and micronucleus test, Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, Vol. 724/1–2, s. 86–87.

38) Richardson, C. et al. (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.

39) OECD (2014), Document supporting the WNT decision to implement revised criteria for the selection of the top concentration in the in vitro mammalian cell assays on genotoxicity (Test Guidelines 473, 476 and 487) ENV/JM/TG(2014)17. K dispozici na vyžádání.

40) Morita, T., M. Honma, K. Morikawa (2012), Effect of reducing the top concentration used in the in vitro chromosomal aberration test in CHL cells on the evaluation of industrial chemical genotoxicity, Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, Vol. 741/1–2, s. 32-56.

41) Brookmire, L., J.J. Chen, D.D. Levy (2013), Evaluation of the Highest Concentrations Used in the In Vitro Chromosome Aberrations Assay, Environmental and Molecular Muagenesis, Vol. 54/1, s. 36-43.

▼**M7**

42) EPA, Office of Chemical Safety and Pollution Prevention (2011), Chemical Substances of Unknown or Variable Composition, Complex Reaction Products and Biological Materials: UVCB Substances, http://www.epa.gov/opptintr/newchems/pubs/uvcb.txt.

43) USFDA (2012), International Conference on Harmonisation (ICH) Guidance S2 (R1) on Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended For Human Use. K dispozici na adrese: https://federalregister.gov/a/2012-13774.

44) OECD (2014), „Statistical analysis supporting the revision of the genotoxicity Test Guidelines, OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS)“, Series on Testing and Assessment, No. 198, OECD Publishing, Paris.

45) ISCN (2013), An International System for Human Cytogenetic Nomenclature, Schaffer, L.G., J. MacGowan-Gordon, M. Schmid (eds.), Karger Publishers Inc., Connecticut.

46) Scott, D. et al. (1990), „Metaphase chromosome aberration assays in vitro“, in Basic Mutagenicity Tests: UKEMS Recommended Procedures, Kirkland, D.J. (ed.), Cambridge University Press, Cambridge, s. 62-86.

47) Hayashi, M. et al. (2011), Compilation and use of genetic toxicity historical control Data, Mutation Research, Vol. 723/2, s. 87-90.

48) Ryan, T. P. (2000), Statistical Methods for Quality Improvement, 2nd Edition, John Wiley and Sons, New York.

49) Fleiss, J. L., B. Levin, M.C. Paik (2003), Statistical Methods for Rates and Proportions, 3rd ed., John Wiley & Sons, New York.

50) Galloway, S.M. et al. (1987), Chromosome aberration and sister chromatid exchanges in Chinese hamster ovary cells: Evaluation of 108 chemicals, Environmental and Molecular Mutagenesis, Vol. 10/suppl. 10, s. 1-175.

51) Richardson, C. et al. (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.

52) Warr, T.J., E.M. Parry, J.M. Parry (1993), A comparison of two in vitro mammalian cell cytogenetic assays for the detection of mitotic aneuploidy using 10 known or suspected aneugens, Mutation Research, Vol. 287/1, s. 29-46.

53) Locke-Huhle, C. (1983), Endoreduplication in Chinese hamster cells during alpha-radiation induced G2 arrest, Mutation Research, Vol. 119/3, s. 403-413.

54) Huang, Y., C. Change, J.E. Trosko (1983), Aphidicolin – induced endoreduplication in Chinese hamster cells, Cancer Research, Vol. 43/3, s. 1362-1364.

55) Soper, K.A., S.M. Galloway (1994), Cytotoxicity measurement in in vitro chromosome aberration test and micronucleus test, Mutation Research, Vol. 312, s. 139-149.

▼M7

Dodatek 1

DEFINICE

Aneuploidie: jakákoli odchylka od normálního diploidního (nebo haploidního) počtu chromozómů o jeden nebo více chromozómů, avšak nikoli o celou sadu (nebo více sad) chromozómů (polyploidie).

Apoptóza: programovaná buněčná smrt, která se vyznačuje řadou kroků vedoucích k rozpadu buněk na membránově vázané části, které jsou poté odstraněny fagocytózou nebo rozkladem.

Buněčná proliferace: zvyšování počtu buněk v důsledku jejich mitotického dělení.

Chemická látka: chemická substance nebo směs.

Chromatidový zlom: přerušení jedné chromatidy, při kterém dojde k jasnému odchýlení jedné z chromatid.

Chromatidový gap: oblast bez zabarvení (achromatická léze) jedné chromatidy, ve které existuje minimální přerušení chromatidy.

Chromatidová aberace: strukturní poškození chromozómu v podobě zlomu jedné chromatidy nebo zlomu a opětného spojení chromatid.

Chromozómová aberace: strukturní poškození chromozómu v podobě zlomu nebo zlomu a spojení obou chromatid v tomtéž místě.

Klastogen: jakákoli chemická látka, která způsobuje strukturní chromozómové aberace v populacích buněk nebo eukaryotických organismů.

Koncentrace: odkazuje na konečné koncentrace zkoušené chemické látky v kultivačním médiu.

Cytotoxicita: u zkoušek prováděných podle této zkušební metody s použitím buněčných linií se cytotoxicita vyjadřuje jako snížení relativního zdvojnásobení populace (RPD) nebo relativního nárůstu počtu buněk (RICC) u exponovaných buněk v porovnání s negativní kontrolou (viz odstavec 17 a dodatek 2). U zkoušek prováděných podle této zkušební metody s použitím primárních kultur lymfocytů se cytotoxicita vyjadřuje jako snížení mitotického indexu (MI) exponovaných buněk v porovnání s negativní kontrolou (viz odstavec 18 a dodatek 2).

Endoreduplikace: proces, při kterém v jádře po S-fázi replikace DNA nedojde k mitóze, nýbrž následuje další S-fáze. Výsledkem jsou chromozómy se 4, 8, 16 … chromatidami.

Genotoxický: obecný termín zahrnující všechny typy poškození DNA nebo chromozómů včetně jejich rozlámání, delecí, aduktů, modifikací a propojení nukleotidů, přestavby, genových mutací, chromozómových aberací a aneuploidie. Ne všechny druhy genotoxických účinků způsobují mutace nebo stálé poškození chromozómů.

Mitotický index (MI): podíl buněk, které se nacházejí v metafázi, z celkového počtu buněk v populaci; udává stupeň proliferace této populace.

Mitóza: proces dělení buněčného jádra, který se obvykle člení na profázi, prometafázi, metafázi, anafázi a telofázi.

Mutagenní: produkující dědičné změny sekvence (sekvencí) párů bází DNA v genech nebo struktury chromozómů (chromozómové aberace).

▼M7

Numerická aberace: odchylka počtu chromozómů od normálního počtu obvyklého u použitého typu buněk.

Polyploidie: numerické chromozómové aberace v buňkách nebo organismech, které se týkají celé sady (celých sad) chromozómů, na rozdíl od jednoho chromozómu nebo jednotlivých chromozómů (aneuploidie).

Stav p53: protein p53 se podílí na regulaci buněčného cyklu, apoptózy a reparace DNA. Buňky, jež mají nedostatek funkčního proteinu p53, nejsou schopny zastavovat buněčný cyklus nebo odstraňovat poškozené buňky prostřednictvím apoptózy nebo jiných mechanismů (např. indukcí reparace DNA) souvisejících s funkcemi p53 v reakci na poškození DNA, by teoreticky měly být náchylnější ke genovým mutacím nebo chromozómovým aberacím.

Relativní nárůst počtu buněk (RICC): zvýšení počtu buněk v chemicky ošetřených kulturách oproti zvýšení v neexponovaných kulturách, poměr vyjádřený v procentech.

Relativní zdvojnásobení populace (RPD): zvýšení počtu pozorovaných zdvojnásobení populace v chemicky ošetřených kulturách oproti zvýšení v neexponovaných kulturách, poměr vyjádřený v procentech.

S9 jaterní frakce: supernatant homogenátu jater po odstředění při 9 000 g, tj. surový jaterní extrakt.

S9 směs: směs S9 jaterní frakce a kofaktorů nezbytných pro metabolickou aktivitu enzymů.

Kontrola s rozpouštědlem: obecný termín k označení kontrolních kultur, ke kterým se přidává pouze rozpouštědlo používané k rozpuštění zkoušené chemické látky.

Strukturní aberace: mikroskopicky pozorovatelné změny struktury chromozómů při buněčném dělení ve stadiu metafáze; jeví se jako delece a fragmenty, intrachromozómální nebo interchromozómální změny.

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

Neexponované kontroly: kultury, které se neexponují (tj. ani chemické látce, ani rozpouštědlu), ale zpracovávají se souběžně stejným způsobem jako kultury, k nimž se se přidává zkoušená chemická látka.

▼M7

Dodatek 2

VZORCE PRO HODNOCENÍ CYTOTOXICITY

Mitotický index (MI):

$$\mathbf{MI}(\%) = \frac{\text{Počet mitotických buněk}}{\text{Celkový počet vyšetřených buněk}} \times 100$$

Doporučuje se použít **relativní nárůst počtu buněk (RICC = Relative Increase in Cell Counts)** nebo **relativní zdvojnásobení populace (RPD = Relative Population Doubling)**, jelikož oba tyto ukazatele zohledňují poměr buněčné populace, která se rozdělila.

$$\mathbf{RICC}(\%) = \frac{\text{(Nárůst počtu buněk vexponovaných kulturách(konečný-počáteční))}}{\text{(Nárůst počtu buněk vkontrolních kulturách(konečný-počáteční))}} \times 100$$

$$\mathbf{RPD}(\%) = \frac{\text{(Počet zdvojnásobení populace vexponovaných kulturách)}}{\text{(Počet zdvojnásobení populace vkontrolních kulturách)}} \times 100$$

kde:

Zdvojnásobení populace = [log (počet buněk po expozici ÷ počáteční počet buněk)] ÷ log 2.

Například hodnota 53 % RICC nebo RPD označuje 47 % cytotoxicity/cytostáze a 55 % cytotoxicity/cytostáze měřené pomocí MI znamená, že skutečný MI je 45 % kontroly.

V každém případě by měl být změřen počet buněk před expozicí a počet buněk v exponované kultuře a v negativní kontrolní kultuře.

V minulosti byl jako parametr cytotoxicity užíván RCC (tj. počet buněk v exponovaných kulturách / počet buněk v kontrolních kulturách), nyní se již nedoporučuje, protože může cytotoxicitu podhodnotit.

V negativních kontrolních kulturách by mělo být zdvojnásobení populace slučitelné s požadavkem na odběr buněk po takové době od aplikace, která odpovídá 1,5násobku normální délky buněčného cyklu, a mitotický index by měl být natolik vyšší, aby se získal dostatečný počet buněk v mitóze a aby bylo možné spolehlivě vypočítat snížení o 50 %.

▼M7

B.11 ZKOUŠKA NA CHROMOZÓMOVÉ ABERACE V BUŇKÁCH KOSTNÍ DŘENĚ SAVCŮ

ÚVOD

Tato zkušební metoda je rovnocenná Pokynu OECD pro zkoušení (TG) č. 475 (2016). Je součástí série zkušebních metod v oblasti genetické toxikologie. Byl vypracován dokument OECD, který obsahuje stručné informace o zkoušení v oblasti genetické toxikologie a přehled posledních změn, které byly v těchto pokynech ke zkoušení provedeny (1).

Zkouška na chromozómové aberace v buňkách kostní dřeně savců *in vivo* je zvláště významná k posouzení genotoxicity, neboť zde probíhá aktivní metabolismus *in vivo*, farmakokinetika a procesy reparace DNA, které přispívají k účinku testované látky, jakkoli mohou být různé u různých druhů. Zkouška *in vivo* je rovněž užitečná pro další výzkum genotoxicity zjištěné v systémech *in vitro*.

Zkouška na chromozómové aberace u savců *in vivo* je používána pro detekci strukturních chromozómových aberací indukovaných zkoušenou chemickou látkou v buňkách kostní dřeně savců, obvykle hlodavců (2) (3) (4) (5). Rozlišují se dva typy strukturních aberací – chromozómové a chromatidové. U většiny genotoxických chemických látek jsou indukované aberace chromatidového typu, avšak chromozómové aberace se rovněž vyskytují. Poškození chromozómů a související jevy jsou příčinou mnoha geneticky podmíněných chorob u člověka a existuje mnoho důkazů o tom, že pokud tyto léze a související jevy způsobují změny v onkogenech a v tumor-supresorových genech, mají podíl na indukci rakoviny u člověka a v experimentálních systémech. Při zkouškách na chromozómové aberace *in vivo* mohou vznikat polyploidie (včetně endoreduplikací). Z nárůstu polyploidie samotné však nevyplývá aneugenický potenciál a může prostě ukazovat na narušení buněčného cyklu nebo na cytotoxicitu. Tato zkouška není určena k detekci aneuploidie. Pro detekci aneuploidie *in vivo* a *in vitro* lze doporučit mikronukleus test v savčích erytrocytech *in vivo* (kapitola B.12 této přílohy) nebo zkoušku *in vitro* na přítomnost mikrojader v buňkách savců (kapitola B.49 této přílohy).

Definice použitých termínů jsou uvedeny v dodatku 1.

VÝCHOZÍ ÚVAHY

Při této zkoušce jsou běžně používáni hlodavci, avšak v některých případech, je-li to vědecky zdůvodněno, mohou být vhodné i jiné druhy. Cílovou tkání je v této zkoušce kostní dřeň, poněvadž je vysoce vaskularizovanou tkání a obsahuje populaci buněk s rychlým cyklem, které se snadno izolují a zpracovávají. Vědecké zdůvodnění použití jiných druhů než potkanů a myší by mělo být uvedeno ve zprávě. Jsou-li použity jiné druhy než hlodavci, doporučuje se detekci chromozómových aberací v buňkách kostní dřeně začlenit do jiné vhodné zkoušky toxicity.

Jestliže existuje důkaz o tom, že se zkoušená chemická látka (chemické látky) nebo reaktivní metabolit (metabolity) nedostanou do cílové tkáně, není vhodné tuto zkoušku použít.

Před použitím této zkušební metody na směs za účelem získání údajů pro zamýšlené použití v právních předpisech by se mělo zvážit, zda tato metoda může pro tento účel poskytnout přiměřené výsledky, a pokud ano, proč je tomu tak. Takové úvahy nejsou nutné, pokud existuje právní požadavek na zkoušení dané směsi.

▼M7

PRINCIP ZKUŠEBNÍ METODY

Zvířata se vhodným způsobem vystaví zkoušené chemické látce a ve vhodném okamžiku po expozici se humánně utratí. Před utracením se zvířatům podá látka zastavující metafázi (např. kolchicin nebo colcemid). Z buněk kostní dřeně se poté připraví preparáty chromozómů, obarví se a analyzují se chromozómové aberace buněk v metafázi.

OVĚŘENÍ ZPŮSOBILOSTI LABORATOŘE

Experimenty pro ověření způsobilosti

Aby bylo možné před zahájením rutinního zkoušení zjistit, zda laboratoř má s danou zkouškou dostatečné zkušenosti, měla by prokázat schopnost reprodukovat očekávané výsledky z publikovaných údajů (např. (6)), pokud jde o četnost chromozómových aberací, nejméně se dvěma pozitivními kontrolními chemickými látkami (včetně slabých reakcí indukovaných nízkými dávkami u pozitivních kontrol), např. látkami uvedenými v tabulce 1, a s kontrolami s kompatibilním vehikulem/rozpouštědlem (viz odstavec 22). Při těchto experimentech by se měly používat dávky, jež poskytují reprodukovatelné nárůsty v závislosti na dávce, a měly by prokázat citlivost a dynamické rozpětí zkušebního systému ve sledované tkáni (kostní dřeň) za použití hodnotící metody, jež má být v laboratoři uplatňována. Tento požadavek neplatí pro laboratoře, které tuto zkušenost mají, tj. které mají dostupnou databázi historických údajů, jak je definována v odstavcích 10–14.

Historické kontrolní údaje

V průběhu šetření způsobilosti by laboratoř měla stanovit:

— historické rozmezí a distribuci pozitivních kontrolních účinků a

— historické rozmezí a distribuci negativních kontrolních účinků.

Při prvním získávání údajů o dosavadní distribuci negativních kontrol by měly být výsledky provedených negativních kontrol v souladu s publikovanými kontrolními údaji, pokud existují. S tím, jak je do distribuce kontrol přidáváno více údajů z experimentů, měly by souběžné negativní kontroly v ideálním případě spadat do 95 % rozmezí této distribuce. Historická databáze negativních kontrol laboratoře by měla být statisticky robustní, aby byla zajištěna schopnost laboratoře posuzovat distribuci svých údajů o negativních kontrolách. V literatuře se doporučuje, že nezbytným minimem může být 10 experimentů, nejlépe však by databáze měla zahrnovat nejméně 20 experimentů provedených za srovnatelných zkušebních podmínek. V laboratořích by měly být uplatňovány metody řízení jakosti, jako např. kontrolní diagramy (např.C-charts nebo X-bar charts (7)), z nichž je patrné, jak proměnlivé jsou jejich údaje a že metodika je v dané laboratoři „pod kontrolou“. Další doporučení, jak získat a používat dosavadní údaje (tj. kritéria pro zařazení údajů do historické databáze a jejich vyřazení a kritéria přijatelnosti pro daný experiment), lze najít v literatuře (8).

Pokud laboratoř neprovedla dostatečný počet experimentů, aby mohla během ověření šetření způsobilosti (popsaného v odstavci 9) stanovit statisticky robustní distribuci negativních kontrol (viz odstavec 11), je přijatelné, aby distribuce byla stanovena během prvních rutinních zkoušek. Uplatňování tohoto přístupu by mělo vycházet z doporučení uvedených v literatuře (8) a výsledky negativních kontrol získané při těchto experimentech by měly zůstat v souladu s publikovanými údaji o negativních kontrolách.

▼M7

Jakékoli změny zkušebního protokolu by měly být zvažovány z hlediska jejich dopadu na výsledné údaje tak, aby zůstaly v souladu se stávající historickou kontrolní databází laboratoře. Pouze případy větších rozdílů ve zkušebním protokolu by měly vést k zavedení nové historické kontrolní databáze, přičemž její odlišnost od dřívější distribuce se stanoví na základě odborného posouzení (viz odstavec 11). V průběhu opětovného stanovení nemusí být k provedení aktuální zkoušky nutná úplná databáze negativních kontrol, pokud laboratoř prokáže, že hodnoty jejích souběžných negativních kontrol zůstávají v souladu s její předchozí databází nebo s odpovídajícími publikovanými údaji.

Údaje o negativních kontrolách by měly zahrnovat výskyt strukturních chromozómových aberací (s vyloučením gapů) u každého zvířete. Výsledky souběžných negativních kontrol by v ideálním případě měly být v 95 % rozmezí distribuce negativních kontrol v historické databázi laboratoře. Pokud jsou údaje ze souběžných negativních kontrol mimo 95 % rozmezí, může být přijatelné je zařadit mezi dosavadní distribuci kontrol, pokud tyto údaje nejsou mimořádně odlehlé a pokud existuje důkaz o tom, že testovací systém je „pod kontrolou“ (viz odstavec 11), a neexistuje důkaz o tom, že by došlo k technické nebo lidské chybě.

POPIS METODY

Příprava

Výběr druhu zvířat

Měly by být použity běžně používané laboratorní kmeny zdravých mladých pohlavně dospělých zvířat. Běžně je používán potkan, ale vhodná může být také myš. Použit může být i jakýkoli jiný vhodný druh savce, je-li ve zprávě poskytnuto vědecké zdůvodnění.

Podmínky chovu a krmení zvířat

Teplota v místnosti pro zvířata by u hlodavců měla být 22 °C (± 3 °C). Relativní vlhkost vzduchu by v ideálním případě měla být 50–60 %, ale minimálně 40 % a neměla by pokud možno přesáhnout 70 % kromě doby úklidu místnosti. Osvětlení by mělo být umělé a mělo by se střídat 12 hodin světla a 12 hodin tmy. Ke krmení lze použít konvenční laboratorní krmivo s neomezeným přísunem pitné vody. Výběr potravy může být ovlivněn nutností zajistit dostatečné mísení se zkoušenou látkou, je-li látka podávána touto cestou. Hlodavci by měli být chováni v malých skupinách (nejvýše po pěti v každé kleci) téhož pohlaví a se stejnou aplikací, pokud se nepředpokládá agresivní chování, přednostně v klecích s pevnou podlahou s vhodným obohacením životního prostředí. Zvířata mohou být umístěna v klecích individuálně, pouze je-li to vědecky odůvodněné.

Příprava zvířat

Obvykle se používají zdravá mladá dospělá zvířata (u hlodavců ideálně ve věku 6–10 týdnů na počátku expozice, ale přijatelná jsou i zvířata poněkud starší), která se náhodně přiřadí do kontrolních a experimentálních skupin. Jednotlivá zvířata se jednoznačně identifikují humánní, co nejméně invazivní metodou (např. kroužkováním, označením štítkem, pomocí mikročipu nebo biometrické identifikace, avšak nikoli nastřihnutím ucha nebo prstu dolní končetiny) a nechají se v laboratorních podmínkách alespoň pět dní aklimatizovat. Klece by měly být uspořádány tak, aby byl vliv umístění klecí minimalizován. Mělo by se zabránit vzájemné kontaminaci pozitivní kontroly a zkoušené chemické látky. V okamžiku zahájení studie by měla být odchylka v hmotnosti zvířat minimální a neměla by překročit ± 20 % střední hodnoty hmotnosti zvířat daného pohlaví.

Příprava dávek

Pevné zkoušené chemické látky by se měly rozpustit nebo suspendovat ve vhodných rozpouštědlech nebo vehikulech nebo by měly být přimíchány do potravy nebo pitné vody před podáním dávky zvířatům. Kapalné zkoušené chemické

▼M7

látky mohou být podávány přímo nebo mohou být před podáním zředěny. Pro účely expozice inhalací lze zkoušené chemické látky v závislosti na jejich fyzikálně-chemických vlastnostech podávat jako plyn, páru nebo pevný/kapalný aerosol. Měly by být použity čerstvě připravené zkoušené chemické látky, pokud údaje o stálosti neprokazují možnost skladování a nestanoví vhodné podmínky pro skladování.

Rozpouštědlo/vehikulum

Rozpouštědlo/vehikulum by nemělo mít při použitých hladinách dávek toxické účinky a mělo by být vyloučeno podezření, že reaguje se zkoušenou chemickou látkou. Jsou-li použita jiná než známá rozpouštědla/vehikula, mělo by být jejich zařazení podloženo referenčními údaji o jejich kompatibilitě. Doporučuje se pokud možno nejprve zvážit použití vodných rozpouštědel/vehikul. Jako příklad běžně používaných kompatibilních rozpouštědel/vehikul lze uvést vodu, fyziologický roztok, roztok methylcelulosy, roztok sodné soli karboxymethylcelulosy, olivový olej a kukuřičný olej. Neexistují-li historické nebo publikované kontrolní údaje prokazující, že zvolené atypické rozpouštědlo/vehikulum nevyvolává žádné strukturní aberace nebo jiné zhoubné účinky, měla by být provedena počáteční studie za účelem stanovení přijatelnosti kontroly s tímto rozpouštědlem/vehikulem.

Kontroly

Pozitivní kontroly

V každé zkoušce by měla být obvykle zařazena jedna skupina zvířat vystavených pozitivní kontrolní chemické látce. Od toho lze upustit, jestliže zkušební laboratoř prokázala způsobilost k provádění zkoušky a stanovila historické rozmezí pozitivních kontrol. Není-li zařazena souběžná pozitivní kontrolní skupina, měly by být v každém experimentu zařazeny hodnotící kontroly (fixované a neobarvené preparáty). Tyto hodnotící kontroly lze získat tak, že se do hodnocení studie zařadí vhodné referenční vzorky, které byly získány a uchovány ze samostatného experimentu s pozitivními kontrolami prováděného pravidelně (např. každých 6–18 měsíců) v laboratoři, kde se provádí daná zkouška, například během testování způsobilosti a poté pravidelně podle potřeby.

Chemické látky pro pozitivní kontrolu by měly spolehlivě vyvolat pozorovatelné zvýšení výskytu buněk se strukturními chromozómovými aberacemi nad spontánní úroveň. Dávky pozitivní kontroly by měly být zvoleny tak, aby byly účinky zřetelné, ale aby hodnotitel okamžitě nezjistil identitu kódovaného preparátu. Je přijatelné, aby látka v pozitivní kontrole byla podávána jiným způsobem než zkoušená chemická látka, podle odlišného harmonogramu expozice, a aby se odběr vzorků prováděl pouze v jediném okamžiku. Pro pozitivní kontrolu navíc může být vzato v úvahu použití chemických látek ze stejné chemické třídy, je-li to vhodné. Příklady pozitivních kontrolních chemických látek jsou uvedeny v tabulce 1.

Tabulka 1.

Příklady pozitivních kontrolních chemických látek

Chemická látka	Registrační číslo CAS
ethyl-methansulfonát	62-50-0
methyl-methansulfonát	66-27-3
1-ethyl-1-nitrosomočovina	759-73-9
mitomicyn C	50-07-7
cyklofosfamid (cyklofosfamid monohydrát)	50-18-0 (6055-19-2)
2,4,6-tris(aziridin-1-yl)- 1,3,5-triazin	51-18-3

▼M7

Negativní kontroly

V každém expozičním intervalu by měla být zařazena souběžná negativní kontrolní skupina zvířat, které jinak podstupují stejný proces jako exponované skupiny až na to, že nejsou vystavena zkoušené chemické látce. Používá-li se při podávání zkoušené chemické látky rozpouštědlo/vehikulum, měla by toto rozpouštědlo/vehikulum dostávat i kontrolní skupina. Pokud však dosavadní údaje o negativních kontrolách v různých intervalech expozice v dané zkušební laboratoři prokazují konzistentní údaje o variabilitě zvířat a četnosti buněk se strukturními aberacemi, může být pro negativní kontrolu nezbytný pouze jeden interval expozice. Je-li u negativních kontrol použit jediný odběr buněk, měl by se provést v prvním (nejkratším) intervalu expozice použitém ve studii.

POSTUP

Počet a pohlaví zvířat

Obecně je známo, že účinky zjištěné v mikronukleus testu jsou podobné u samců a samic (9) a předpokládá se, že tomu tak bude i u strukturních chromozómových aberací; většinu studií proto je možné provést s kterýmkoli z obou pohlaví. Existence údajů prokazujících významné rozdíly mezi samci a samicemi (např. rozdíly v systémové toxicitě, metabolismu, biologické dostupnosti, toxicita pro kostní dřeň atd. získané např. ve studii ke stanovení rozsahu) by byla důvodem pro použití zvířat obojího pohlaví. V tomto případě může být vhodné provést studii s oběma pohlavími, např. jako součást studie toxicity po opakovaných dávkách. V případě použití obou pohlaví by mohlo být vhodné použít faktoriálního uspořádání experimentu. Podrobnosti ohledně toho, jak analyzovat údaje získané při tomto uspořádání experimentu, jsou uvedeny v dodatku 2.

Velikost skupin při zahájení studie by měla být stanovena tak, aby poskytla minimálně pět analyzovatelných zvířat jednoho pohlaví, nebo každého pohlaví, jsou-li použita obě, z každé skupiny. Je-li expozice člověka chemickým látkám specifická pro určité pohlaví, jako je tomu například u některých léčivých přípravků, měla by být zkouška provedena se zvířaty odpovídajícího pohlaví. Určitým vodítkem pro maximální typické požadavky na počet zvířat může být, že studie s buňkami kostní dřeně při dvou odběrech se třemi skupinami exponovanými dávce jednou souběžnou negativní kontrolní skupinou plus jednou pozitivní kontrolní skupinou (každá skupina složena z pěti zvířat jednoho pohlaví) by vyžadovala 45 zvířat.

Dávkování

Jestliže se provádí předběžná studie pro stanovení rozsahu dávek, poněvadž nejsou k dispozici vhodné údaje, jež by mohly pomoci při stanovení dávek, pak by měla být provedena ve stejné laboratoři, se stejným druhem, kmenem, pohlavím a za stejného režimu expozice, které se použijí v hlavní studii (10). Cílem studie by mělo být zjistit maximální tolerovanou dávku, která je definována jako nejvyšší dávka, která bude po dobu trvání zkoušky tolerována bez příznaků toxicity omezující studii (např. vyvolání poklesu tělesné hmotnosti nebo cytotoxicity hematopoetického systému, avšak nikoli smrti nebo příznaků bolesti, utrpení nebo strádání, kdy je nezbytné zvířata humánně utratit (11)).

Nejvyšší dávku lze rovněž definovat jako dávku, která vyvolává určité známky toxicity pro kostní dřeň.

Výjimku z kritérií pro stanovení dávek mohou představovat chemické látky, jež vykazují saturaci toxikokinetických vlastností nebo indukují detoxifikační procesy, které mohou vést ke snížení expozice po dlouhodobé aplikaci a jež by měly být hodnoceny v každém jednotlivém případě.

Aby bylo možné získat informace o dávce a účinku, měla by úplná studie zahrnovat negativní kontrolní skupinu a minimálně tři úrovně dávek, které jsou zpravidla odstupňovány faktorem 2, avšak nepřevyšujícím 4. Pokud ve studii ke stanovení rozsahu dávek nebo na základě stávajících údajů zkoušená chemická

▼M7

látka nevyvolává toxicitu, měla by nejvyšší dávka při jednorázovém podávání odpovídat 2 000 mg/kg tělesné hmotnosti. Pokud však zkoušená chemická látka způsobuje toxicitu, měla by být největší podávanou dávkou maximální tolerovaná dávka a úrovně dávek by měly přednostně pokrývat rozmezí od maximální dávky až po dávku vyvolávající malou toxicitu nebo nevyvolávající žádnou toxicitu. Je-li toxicita pro cílovou tkáň (kostní dřeň) pozorována na všech testovaných úrovních dávek, doporučuje se další studie s netoxickými dávkami. Studie, jejichž cílem je úplnější charakteristika kvantitativních informací o dávce a účinku, mohou vyžadovat zařazení doplňkových skupin zvířat exponovaných dalším dávkám. Pro některé typy zkoušených chemických látek (např. humánních léčivých přípravků), na něž se vztahují specifické požadavky, se tyto limity mohou lišit.

Limitní zkouška

Pokud experimenty pro určení rozsahu dávek nebo stávající údaje získané u příbuzných kmenů zvířat naznačují, že aplikace limitní dávky (viz níže) nevyvolá pozorovatelné toxické účinky (ani pokles proliferace kostní dřeně nebo jiné příznaky cytotoxicity cílové tkáně), a není-li na základě studií genotoxicity *in vitro* nebo na základě údajů o látkách, které mají příbuznou strukturu, očekávána genotoxicita, nepovažuje se úplná studie se třemi úrovněmi dávek za nutnou, za předpokladu, že bylo prokázáno, že zkoušená chemická látka (látky) dosahuje (dosahují) cílové tkáně (kostní dřeně). V takových případech může být postačující jediná úroveň expozice v limitní dávce. Při delší než 14denní aplikaci je limitní dávka 1 000 mg/kg tělesné hmotnosti/den. Při 14denní a kratší aplikaci je limitní dávka 2 000 mg/kg tělesné hmotnosti/den.

Podávání dávek

Při plánování zkoušky by měl být zvážen předpokládaný způsob expozice člověka. Proto lze zvolit odůvodněné způsoby expozice např. stravou, v pitné vodě, lokálně, subkutánně, nitrožilně, orálně (pomocí žaludeční sondy), inhalací, intratracheálně nebo implantací. Způsob podávání by měl být v každém případě zvolen tak, aby zajistil odpovídající expozici cílové tkáně (tkání). Intraperitoneální injekce se obecně nedoporučují, protože se nejedná o předpokládaný způsob expozice člověka, a mohla by být použita pouze s konkrétním vědeckým zdůvodněním. Je-li zkoušená chemická látka přimíchána do potravy nebo pitné vody, zejména v případě jednorázové dávky, mělo by se dbát na to, aby prodleva mezi příjmem krmiva a vody a odběrem vzorku byla dostatečná, aby umožnila detekci účinků (viz odstavce 33–34). Maximální objem kapaliny, který může být najednou podán žaludeční sondou nebo injekčně, závisí na velikosti pokusného zvířete. Toto množství by obvykle nemělo překročit 1 ml/100 g tělesné hmotnosti, s výjimkou vodných roztoků, kde lze použít maximálně 2 ml/100 g tělesné hmotnosti. Použití objemů větších než tento by mělo být odůvodněno. Až na dráždivé a žíravé zkoušené chemické látky, které obvykle při vyšších koncentracích vykazují zesílené účinky, by měla být variabilita zkušebního objemu minimalizována nastavením koncentrace zajišťující podávání konstantního objemu v závislosti na tělesné hmotnosti při všech úrovních dávky.

Plán expozice

Zkoušené chemické látky jsou obvykle podávány jednorázově, ale mohou být podávány také ve dvou dávkách (tzn. dvě nebo více dávek v týž den v rozmezí ne více než 2–3 hodiny), aby bylo usnadněno podávání velkých objemů. Za těchto okolností, nebo je-li zkoušená chemická látka podávána inhalací, by měl být harmonogram odběru buněk stanoven na základě doby podání poslední dávky nebo ukončení expozice.

Pro tuto zkoušku je k dispozici málo údajů o vhodnosti protokolu s opakovanými dávkami. Avšak za situace, kdy je žádoucí integrovat tuto zkoušku se zkouškou toxicity po opakovaných dávkách, by se mělo dbát na to, aby nedošlo ke ztrátě mitotických buněk s poškozenými chromozómy, což může nastat u toxických

▼M7

dávek. Taková integrace je přijatelná, pokud nejvyšší dávka je větší než limitní dávka nebo je stejná (viz odstavec 29) a pokud je exponované skupině podávána limitní dávka po dobu trvání expozice. Je-li žádoucí integrace s jinými studiemi, měl by být za vhodnou zkoušku na chromozómových aberacích *in vivo* považován mikronukleus test (zkušební metoda B.12).

Vzorky kostní dřeně by měly být odebrány ve dvou různých intervalech od jednorázové aplikace. U hlodavců by se odběr měl provádět po takové době od aplikace, která odpovídá 1,5násobku normální délky buněčného cyklu (jenž trvá obvykle 12–18 hodin od expozice). Poněvadž doba nezbytná pro příjem a metabolismus zkoušené chemické látky (látek) a rovněž pro účinky na kinetiku buněčného cyklu může mít vliv na optimální časový interval pro detekci chromozómových aberací, doporučuje se provést další odběr po 24 hodinách od prvního odběru. V prvním intervalu expozice by měly být aplikovány všechny exponované skupiny a proveden odběr buněk. V dalším intervalu (intervalech) expozice je potřebné podat pouze nejvyšší dávku. Je-li na základě vědeckého odůvodnění aplikace rozložena do více než jednoho dne, měl by být odběr zpravidla proveden po takové době od poslední aplikace, která odpovídá 1,5násobku normální délky buněčného cyklu.

Po expozici a před odběrem vzorků se zvířatům intraperitoneálně podá vhodná dávka látky zastavující metafázi (např. colcemidu nebo kolchicinu) a po vhodné době se u nich odeberou vzorky. U myši je tato doba do odebrání vzorku přibližně 3–5 hodin a u potkana je to 2–5 hodin. Z kostní dřeně se odeberou buňky, zhotoví se nátěry, ty se fixují a obarví a buňky se analyzují se na chromozómové aberace (12).

Pozorování

Všeobecné klinické pozorování by se mělo provádět nejméně jednou denně, přednostně ve stejnou dobu (stejné doby) a s uvážením doby očekávaného maximálního účinku po podání látky. Nejméně dvakrát denně po dobu podávání dávek by měla být provedena prohlídka všech zvířat za účelem zjištění morbidity a mortality. Všechna zvířata by měla být zvážena na počátku studie, nejméně jednou týdně během studií s opakovanou dávkou a při utracení. Při studiích s alespoň týdenním trváním by se alespoň jednou týdně měla změřit spotřeba krmiva. Pokud je zkoušená chemická látka podávána v pitné vodě, měla by se spotřeba vody měřit při každé výměně vody a alespoň jednou týdně. Zvířata, která vykazují neletální indikátory nadměrné toxicity, by měla být humánně utracena před uplynutím doby zkoušky (11).

Expozice cílových tkání

Ve vhodnou dobu (vhodné doby) by měl být odebrán vzorek krve, aby mohlo být provedeno vyšetření hladiny zkoušené chemické látky v plazmě za účelem prokázání, že došlo k expozici kostní dřeně, pokud je to požadováno a pokud neexistují jiné údaje o expozici (viz odstavec 44).

Příprava kostní dřeně a chromozómů

Buňky kostní dřeně se získávají z femuru nebo tibie zvířat ihned po humánním utracení, hypotonizují se a fixují. Buňky v metafázi se poté zavedenými metodami nanesou na podložní sklíčka a obarví se (viz (3) (12)).

▼M7

Analýza

Všechny preparáty, včetně preparátů pozitivních a negativních kontrol, by měly být před analýzou označeny samostatným kódem určeným náhodným výběrem tak, aby hodnotiteli nebyly známy zkušební podmínky.

Jako měřítko cytotoxicity by měl být u všech exponovaných zvířat (včetně pozitivních kontrol), neexponovaných zvířat pro negativní kontrolu a zvířat pro negativní kontrolu s vehikulem/rozpouštědlem stanoven mitotický index, a to alespoň u 1 000 buněk na jedno zvíře.

U každého zvířete by mělo být analyzováno alespoň 200 metafází na strukturní chromozómové aberace včetně gapů a s vyloučením gapů (6), Pokud však z historické databáze negativních kontrol vyplývá, že střední četnost spontánního výskytu strukturních chromozómových aberací v dané laboratoři je < 1 %, mělo by se zvážit vyhodnocení dalších buněk. Chromatidové a chromozómové aberace by měly být zaznamenávány odděleně a klasifikovány podle podtypů (zlomy, výměny). Postupy používané v laboratoři by měly zajistit, aby analýzu chromozómových aberací prováděli dobře odborně připravení hodnotitelé a a aby tato analýza případně byla podrobena odborné revizi. Vzhledem k tomu, že při přípravě preparátů často dochází k poškození části buněk v metafázi s následnou ztrátou chromozómů, měly by vyšetřované buňky obsahovat centromery v počtu nejméně $2n \pm 2$, kde n je haploidní počet chromozómů pro daný druh.

ÚDAJE A PŘEDKLÁDÁNÍ ZPRÁV

Zpracování výsledků

Údaje pro jednotlivá zvířata by měly být zpracovány ve formě tabulky. U každého zvířete by měl být uveden mitotický index, počet hodnocených buněk v metafázi, počet aberací na každou buňku v metafázi a procentuální podíl buněk se strukturními chromozomovými aberacemi. Pro exponované a kontrolní skupiny by měly být uvedeny různé typy strukturních chromozómových aberací s jejich počtem a četností. Gapy, jakož i polyploidní buňky a buňky s endoreplikovanými chromozómy se zaznamenávají odděleně. Četnost výskytu gapů se zaznamenává, ale do analýzy celkové četnosti strukturních aberací se nezahrnuje. Neexistuje-li důkaz o rozdílu v odpovědi mezi pohlavími, mohou být pro účely statistické analýzy tyto údaje sloučeny. Uvedeny by měly být i údaje o toxicitě u zvířat a klinické příznaky.

Kritéria přijatelnosti

Přijatelnost zkoušky určují tato kritéria:

a) údaje o souběžné negativní kontrole jsou považovány za přijatelné pro přidání do historické kontrolní databáze laboratoře (viz odstavce 11–14);

b) souběžné pozitivní kontroly nebo hodnotící kontroly by měly vyvolat odpovědi, které jsou slučitelné s odpověďmi uvedenými v historické databázi pozitivních kontrol, a měly by vyvolat statisticky významný nárůst v porovnání s negativní kontrolou (viz odstavce 20–21);

c) byl analyzován přiměřený počet dávek a buněk;

d) kritéria pro výběr nejvyšší dávky jsou v souladu s kritérii popsanými v odstavcích 25–28.

Hodnocení a interpretace výsledků

Za předpokladu, že všechna kritéria přijatelnosti byla splněna, lze zkoušenou chemickou látku považovat za jasně pozitivní, pokud:

▼M7

a) alespoň jedna z exponovaných skupin vykazuje statisticky významné zvýšení výskytu buněk se strukturními chromozómovými aberacemi (s vyloučením gapů) v porovnání se souběžnou negativní kontrolou;

b) hodnocení pomocí vhodného statistického trend-testu alespoň v jednom čase odběru ukáže závislost tohoto nárůstu na dávce; a

c) všechny tyto výsledky jsou mimo distribuci dosavadních údajů o negativních kontrolách (např. 95 % rozmezí dle Poissonova rozdělení).

Je-li v určitém konkrétním čase odběru zkoumána pouze nejvyšší dávka, je zkoušená chemická látka považována za jasně pozitivní, pokud existuje statisticky významný nárůst v porovnání se souběžnou negativní kontrolou a výsledky jsou mimo distribuci dosavadních údajů o negativních kontrolách (např. 95 % rozmezí dle Poissonova rozdělení). Doporučení ohledně vhodných statistických metod lze najít v literatuře (13). Při provádění analýzy dávky a odezvy by měly být analyzovány alespoň tři skupiny exponované různé dávce. Při statistických testech by mělo být zvíře použito jako experimentální jednotka. Pozitivní výsledky zkoušky na chromozómové aberace znamenají, že zkoušená látka indukuje strukturální chromozómové aberace v kostní dřeni druhu zvířat použitého k testování.

Za předpokladu, že všechna kritéria přijatelnosti byla splněna, je zkoušená chemická látka považována za jasně negativní, pokud ve všech zkoumaných zkušebních podmínkách:

a) žádná z exponovaných skupin nevykazuje statisticky významné zvýšení výskytu buněk se strukturními chromozómovými aberacemi (s vyloučením gapů) v porovnání se souběžnou negativní kontrolou;

b) hodnocení pomocí vhodného statistického trend-testu v žádném čase odběru neukazuje nárůst v závislosti na dávce;

c) všechny výsledky spadají do rámce distribuce dosavadních údajů o negativních kontrolách (např. 95 % rozmezí dle Poissonova rozdělení); a

d) došlo k expozici kostní dřeně zkoušené chemické látce (látkám).

Doporučení ohledně nejvhodnějších statistických metod lze najít v literatuře (13). Důkazy o expozici kostní dřeně zkoušené chemické látce mohou zahrnovat pokles mitotického indexu nebo měření hladiny zkoušené chemické látky (látek) v plazmě nebo v krvi. V případě nitrožilního podání není důkazů o expozici zapotřebí. Alternativně mohou být k prokázání expozice kostní dřeně použity údaje o absorpci, distribuci, metabolismu a exkreci (ADME) získané při nezávislé studii za použití stejného způsobu expozice a se stejným druhem. Negativní výsledky znamenají, že zkoušená chemická látka za podmínek zkoušky neindukuje strukturní chromozómové aberace v kostní dřeni druhu zvířat použitého k testování.

Ověření jasně pozitivní či jasně negativní odpovědi se nepožaduje.

V případech, kdy odpověď není jasně negativní nebo pozitivní, a s cílem napomoci při stanovení biologického významu výsledku (např. slabý nebo okrajový nárůst), by měly být údaje vyhodnoceny na základě odborného posouzení a/nebo dalším vyšetřením u provedených experimentů. V některých případech by mohlo být užitečné analyzovat více buněk nebo provést opakovaný experiment za použití upravených zkušebních podmínek.

▼M7

V ojedinělých případech dokonce ani po dalším šetření nebude možné na základě daných údajů učinit závěr, zda zkoušená chemická látka přináší pozitivní či negativní výsledky, a proto bude učiněn závěr, že výsledek studie je neurčitý.

Četnost polyploidie a endoreduplikovaných metafází v celkovém počtu metafází by se měla zaznamenat odděleně. Nárůst počtu polyploidních buněk / endoreduplikovaných buněk může znamenat, že zkoušená chemická látka má schopnost potlačit mitotické procesy nebo progresi buněčného cyklu (viz odstavec 3).

Závěrečná zpráva

Závěrečná zpráva by měla obsahovat tyto informace:

Souhrn

Zkoušená chemická látka:

— zdroj, číslo šarže a je-li k dispozici, datum použitelnosti,

— stabilita zkoušené chemické látky, je-li známa.

Jednosložková látka:

— fyzický vzhled, rozpustnost ve vodě a další důležité fyzikálně-chemické vlastnosti,

— chemická identifikace, jako např. název IUPAC nebo CAS, číslo CAS, kód SMILES nebo InChI, strukturní vzorec, čistota, případně chemická identita nečistot, je-li to prakticky proveditelné, atd.

Vícesložková látka, UVCB a směsi:

— charakterizovaná v co možná největší míře chemickou identitou (viz výše), kvantitativním výskytem a důležitými fyzikálně-chemickými vlastnostmi složek.

Příprava zkoušené chemické látky:

— zdůvodnění volby vehikula,

— rozpustnost a stabilita zkoušené chemické látky v rozpouštědle/vehikulu, je-li známa,

— příprava potravy, pitné vody nebo inhalačních aplikačních forem,

— analytická stanovení aplikační formy (např. stabilita, homogenita, nominální koncentrace), jsou-li prováděna.

Pokusná zvířata:

— použitý druh/kmen a odůvodnění jeho použití,

— počet, stáří a pohlaví zvířat,

— zdroj, podmínky chovu, strava atd.,

— metoda jednoznačného označení zvířat,

— u krátkodobých studií: hmotnost jednotlivých zvířat na začátku a na konci zkoušky; u studií delších než jeden týden: hmotnosti jednotlivých zvířat během studie a spotřeba potravy. Mělo by být uvedeno rozpětí tělesné hmotnosti, střední hodnota a směrodatná odchylka pro každou skupinu.

▼**M7**

Zkušební podmínky:

— pozitivní a negativní (vehikulum/rozpouštědlo) kontroly,

— údaje ze studie pro zjištění rozsahu dávek, pokud byla provedena,

— zdůvodnění zvolených úrovní dávek,

— podrobné údaje o přípravě zkoušené chemické látky,

— podrobné údaje o podávání zkoušené chemické látky,

— zdůvodnění způsobu a trvání podávání,

— metody k ověření, že se zkoušená chemická látka (látky) dostala (dostaly) do obecné cirkulace nebo kostní dřeně,

— skutečná dávka (v mg/kg tělesné hmotnosti na den) vypočítaná z koncentrace zkoušené chemické látky v potravě / pitné vodě (v ppm) a ze spotřeby, je-li to relevantní,

— podrobné údaje o kvalitě krmiva a vody.

— způsob utracení,

— způsob analgezie (pokud se používá),

— podrobný popis harmonogramů aplikace a odběru vzorků a odůvodnění výběru,

— metody přípravy preparátů,

— metody stanovení toxicity,

— identita chemické látky zastavující metafázi, její koncentrace, dávka a čas podání před odběrem vzorků,

— postupy izolace a uchovávání vzorků,

— kritéria hodnocení aberací,

— počet buněk v metafázi analyzovaných u každého zvířete a počet buněk analyzovaných za účelem stanovení mitotického indexu,

— kritéria přijatelnosti studie,

— kritéria klasifikace studie na pozitivní, negativní nebo neprůkaznou.

Výsledky:

— stav zvířat před zkouškou a během zkoušky, včetně známek toxicity,

— mitotický index uvedený odděleně pro každé zvíře,

— typ a počet aberací a buněk s aberacemi uvedený odděleně pro každé zvíře,

— celkový počet aberací ve skupině se středními hodnotami a směrodatnými odchylkami,

— počet buněk s aberacemi ve skupině se středními hodnotami a směrodatnými odchylkami,

— změny ploidie, byly-li pozorovány, včetně četností polyploidie a/nebo endoreduplikovaných buněk,

▼M7

— podle možnosti závislost odpovědi na dávce,

— případné statistické analýzy a metoda,

— údaje dokládající, že došlo k expozici kostní dřeně,

— údaje o souběžných negativních a pozitivních kontrolách s rozpětími, středními hodnotami a směrodatnými odchylkami,

— dosavadní údaje o negativních a pozitivních kontrolách s rozpětími, středními hodnotami, směrodatnými odchylkami a 95 % rozmezí distribuce a rovněž časové období, na které se údaje vztahují, a počet pozorování,

— splněná kritéria pro pozitivní nebo negativní odpověď.

Rozbor výsledků.

Závěr.

Odkazy.

LITERATURA

1) OECD (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, No. 234, OECD, Paris.

2) Adler, I.D. (1984), „Cytogenetic Tests in Mammals“, in Mutagenicity Testing: A Practical Approach, Venittand, S., J.M. Parry (eds.), IRL Press, Washington, DC, s. 275-306.

3) Preston, R.J. et al. (1987), Mammalian in vivo cytogenetic assays. Analysis of chromosome aberrations in bone marrow cells, Mutation Research, Vol. 189/2, s. 157–165.

4) Richold, M. et al. (1990), „In Vivo Cytogenetics Assays“, in Basic Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report. Part I revised, Kirkland, D.J. (ed.), Cambridge University Press, Cambridge, s. 115-141.

5) Tice, R.R. et al. (1994), Report from the working group on the in vivo mammalian bone marrow chromosomal aberration test, Mutation Research, Vol. 312/3, s. 305-312.

6) Adler, I.D. et al. (1998), Recommendations for statistical designs of in vivo mutagenicity tests with regard to subsequent statistical analysis, Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, Vol. 417/1, s. 19-30.

7) Ryan, T.P. (2000), Statistical Methods for Quality Improvement, 2nd ed., John Wiley and Sons, New York.

8) Hayashi, M. et al. (2011), Compilation and use of genetic toxicity historical control data, Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, Vol. 723/2, s. 87-90.

9) Hayashi, M. et al. (1994), in vivo rodent erythrocyte micronucleus assay, Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects, Vol. 312/3, s. 293-304.

10) Fielder, R.J. et al. (1992), Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group. Dose setting in in vivo mutagenicity assays, Mutagenesis, Vol. 7/5, s. 313-319.

▼**M7**

11) OECD (2000), „Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation“, OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, N°19, OECD Publishing, Paris.

12) Pacchierotti, F., V. Stocchi (2013), Analysis of chromosome aberrations in somatic and germ cells of the mouse, Methods in Molecular Biology, Vol. 1044, s. 147-163.

13) Lovell, D.P. et al. (1989), „Statistical Analysis of in vivo Cytogenetic Assays“, in Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. UKEMS SubCommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing, Report, Part III, Kirkland, D.J. (ed.), Cambridge University Press, Cambridge, s. 184-232.

▼M7

Dodatek 1

DEFINICE

Aneuploidie: jakákoli odchylka od normálního diploidního (nebo haploidního) počtu chromozómů o jeden nebo více chromozómů, avšak nikoli o násobky celé sady (nebo více sad) chromozómů (*viz* polyploidie).

Centromera: oblast (oblasti) chromozómu, k níž (k nimž) se během dělení buněk připojí dělící vřeténko umožňující uspořádaný pohyb dceřiných chromozómů k pólům dceřiných buněk.

Chemická látka: chemická substance nebo směs.

Chromatidová aberace: strukturní poškození chromozómu v podobě zlomu jedné chromatidy nebo zlomu a opětného spojení chromatid.

Chromozómová aberace: strukturní poškození chromozómu v podobě zlomu nebo zlomu a spojení obou chromatid v tomtéž místě.

Endoreduplikace: proces, při kterém v jádře po S-fázi replikace DNA nedojde k mitóze, nýbrž následuje další S-fáze. Výsledkem jsou chromozómy se 4, 8, 16 … chromatidami.

Gap: achromatická léze menší než šířka jedné chromatidy a s minimálním přerušením chromatid.

Mitotický index: podíl počtu buněk, které se nacházejí v mitóze, z celkového počtu buněk v populaci, který je mírou proliferace této populace.

Numerická aberace: odchylka počtu chromozómů od normálního počtu obvyklého u použitého druhu zvířat (aneuploidie).

Polyploidie: numerická chromozómová aberace zahrnující odchylku počtu celých sad chromozómů, na rozdíl od odchylky počtu v části sady chromozómů (*viz* aneuploidie).

Strukturní chromozómové aberace: mikroskopicky pozorovatelné změny struktury chromozómů při buněčném dělení ve stadiu metafáze; jeví se jako delece a fragmenty, intrachromozómální nebo interchromozómální změny.

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

▼M7

Dodatek 2

FAKTORIÁLNÍ POKUS KE ZJIŠTĚNÍ ROZDÍLŮ MEZI POHLAVÍMI VE ZKOUŠCE NA CHROMOZÓMOVÉ ABERACE *IN VIVO*

Faktoriální pokus a jeho analýza

Při tomto pokusu se na každé úrovni koncentrace testuje minimálně 5 samců a 5 samic a výsledkem je uspořádání s použitím minimálně 40 zvířat (20 samců a 20 samic plus příslušné pozitivní kontroly).

Tento pokus, který je jedním z nejjednodušších faktoriálních pokusů, je rovnocenný dvoufaktorové analýze rozptylu, přičemž hlavními prvky jsou úroveň koncentrace a pohlaví. Údaje je možné analyzovat pomocí mnoha standardních statistických softwarových balíčků, např. SPSS, SAS, STATA, Genstat a také pomocí programu R.

Analýza dělí variabilitu v souboru údajů na variabilitu mezi pohlavími, variabilitu mezi úrovněmi koncentrace a variabilitu interakce mezi pohlavími a koncentracemi. Každý z těchto znaků se testuje oproti odhadu variability u replicitních zvířat ve skupinách zvířat stejného pohlaví, jimž je podávána stejná koncentrace látky. Veškeré podrobnosti základní metodiky jsou dostupné v mnoha standardních učebnicích statistiky (viz odkazy) a v „nápovědě“ statistických programů.

Analýza se provádí zkoumáním znaku interakce pohlaví x koncentrace v tabulce ANOVA ([1]). Neexistuje-li významný znak interakce, kombinované hodnoty za obě pohlaví nebo za všechny úrovně koncentrace poskytují validní statistické testy variability mezi úrovněmi založené na zkoumání kumulovaného znaku vnitroskupinové variability pomocí analýzy ANOVA.

Analýza pokračuje rozdělením odhadu variability mezi koncentracemi na kontrasty, což zajišťuje test na lineární a kvadratické kontrasty odpovědí na všech úrovních koncentrace. Pokud existuje významná interakce pohlaví x koncentrace, lze tento znak také rozdělit na lineární a kvadratický člen kontrastů interakce pohlaví. Pomocí těchto znaků se testuje, zda jsou odpovědi na koncentraci u obou pohlaví paralelní, nebo zda je odpověď u každého pohlaví odlišná.

Odhad kumulované vnitroskupinové variability může být použit k párovému testování rozdílu mezi středními hodnotami. Tato srovnání by mohla být provedena mezi středními hodnotami u obou pohlaví a mezi středními hodnotami u různých úrovní koncentrace, např. za účelem porovnání s úrovněmi negativní skupiny. V případech, kdy existuje významná interakce, lze provádět srovnání mezi středními hodnotami při různých koncentracích v rámci jednotlivých pohlaví nebo mezi středními hodnotami u pohlaví při stejné koncentraci.

Odkazy

Existuje množství učebnic statistiky, které se zabývají teorií, uspořádáním, metodikou, analýzou a interpretací faktoriálních pokusů od nejjednodušších dvoufaktorových analýz až po složitější formy používané v metodice experimentálního uspořádání. Následující seznam není vyčerpávající. V některých pracích jsou uvedeny vypracované příklady srovnatelných uspořádání, v některých případech i s kódem pro provádění analýz pomocí různých počítačových programů.

([1]) Statistikové, kteří používají metodu modelování, např. pomocí obecných lineárních modelů (GLM), mohou k této analýze přistupovat odlišným, byť srovnatelným způsobem, ale nebudou nutně odvozovat tradiční tabulku ANOVA, což se datuje zpět k algoritmickým postupům statistických výpočtů vyvinutým před érou počítačů.

▼**M7**

Box, G.E.P, Hunter, W.G. and Hunter, J.S. (1978). Statistics for Experimenters. An Introduction to Design, Data Analysis, and Model Building. New York: John Wiley & Sons.

Box G.E.P. & Draper, N.R. (1987). Empirical model-building and response surfaces. John Wiley & Sons Inc.

Doncaster, C.P. & Davey, A.J.H. (2007). Analysis of Variance and Covariance: How to Choose and Construct Models for the Life Sciences. Cambridge University Press.

Mead, R. (1990). The Design of Experiments. Statistical principles for practical application. Cambridge University Press.

Montgomery D.C. (1997). Design and Analysis of Experiments. John Wiley & Sons Inc.

Winer, B.J. (1971). Statistical Principles in Experimental Design. McGraw Hill.

Wu, C.F.J & Hamada, M.S. (2009). Experiments: Planning, Analysis and Optimization. John Wiley & Sons Inc.

▼M7

B.12 MIKRONUKLEUS TEST V SAVČÍCH ERYTROCYTECH

ÚVOD

Tato zkušební metoda je rovnocenná Pokynu OECD pro zkoušení (TG) č. 474 (2016). Je součástí série zkušebních metod v oblasti genetické toxikologie. Byl vypracován dokument OECD, který obsahuje stručné informace o zkoušení v oblasti genetické toxikologie a přehled posledních změn, které byly v těchto pokynech ke zkoušení provedeny (1).

Mikronukleus test v savčích erytrocytech *in vivo* je zvláště významný k posouzení genotoxicity, neboť zde probíhá aktivní metabolismus *in vivo*, farmakokinetika a procesy reparace DNA, které přispívají k účinku testované látky, jakkoli mohou být různé u různých druhů. Zkouška *in vivo* je rovněž užitečná pro další výzkum genotoxicity zjištěné v systémech *in vitro*.

Mikronukleus test v savčích erytrocytech *in vivo* je používán k detekci poškození chromozómů nebo mitotického aparátu erytroblastů, které je indukováno zkoušenou chemickou látkou. V tomto testu se hodnotí tvorba mikrojader v erytrocytech odebraných z kostní dřeně nebo z buněk periferní krve, obvykle hlodavců.

Účelem mikronukleus testu v savčích erytrocytech je identifikovat chemické látky, které způsobují cytogenetické poškození, jehož výsledkem je tvorba mikrojader obsahujících nereplikující se (lagging) chromozómové fragmenty nebo celé chromozómy.

Když se erytroblast kostní dřeně mění na nezralý erytrocyt (někdy též označovaný jako polychromatický erytrocyt nebo retikulocyt), hlavní jádro je vypuzeno a mikrojádra, která při tom mohou vzniknout, zůstávají v cytoplasmě. Zviditelnění nebo detekce mikrojader jsou v těchto buňkách usnadněny tím, že neobsahují hlavní jádro. Nárůst výskytu nezralých erytrocytů s mikrojádry v exponovaných zvířatech je známkou indukovaných strukturních nebo numerických chromozómových aberací.

Nově vytvořené erytrocyty s mikrojádry se zjišťují a kvantifikují obarvením a poté následuje buď vizuální hodnocení pomocí mikroskopu, nebo automatizovaná analýza. Počítání dostačujícího počtu nezralých erytrocytů v periferní krvi nebo kostní dřeni dospělých zvířat se značně usnadní použitím automatizovaného hodnotícího systému. Tyto systémy jsou přijatelnými alternativami manuálního hodnocení (2). Z komparativních studií vyplývá, že tyto metody, při nichž se používají vhodné kalibrační standardy, mohou zajistit lepší mezilaboratorní a vnitrolaboratorní reprodukovatelnost a větší citlivost než manuální hodnocení pomocí mikroskopu (3) (4). Automatizované systémy pro měření četnosti erytrocytů s mikrojádry zahrnují kromě jiného průtokové cytometry (5), platformy pro analýzu obrazu (6)(7) a laserové skenovací cytometry (8).

Ačkoli se to v rámci tohoto testu obvykle neprovádí, lze odlišit chromozómové fragmenty od celých chromozómů podle řady kritérií. Tato kritéria zahrnují identifikaci přítomnosti nebo nepřítomnosti kinetochoru nebo centromerické DNA, jež jsou obojí charakteristické pro neporušené chromozómy. Nepřítomnost kinetochoru nebo centromerické DNA naznačuje, že mikrojádro obsahuje pouze fragmenty chromozómů, zatímco jejich přítomnost ukazuje na ztrátu chromozómů.

Definice použitých termínů jsou uvedeny v dodatku 1.

▼M7

VÝCHOZÍ ÚVAHY

Cílovou tkání pro genetická poškození v tomto testu je kostní dřeň mladých dospělých hlodavců, protože v této tkáni vznikají erytrocyty. Detekce mikrojader v nezralých erytrocytech v periferní krvi je možná i u jiných druhů savců, u nichž byla prokázána dostatečná citlivost při detekci chemické látky, které v těchto buňkách způsobují strukturní nebo numerické chromozómové aberace (indukcí mikrojader v nezralých erytrocytech), a je-li uvedeno vědecké zdůvodnění. Hlavním konečným ukazatelem je četnost výskytu nezralých erytrocytů s mikrojádry. Četnost výskytu zralých erytrocytů, jež obsahují mikrojádra v periferní krvi, může být rovněž použita jako koncový ukazatel u druhů bez silné slezinné selekce proti buňkám s mikrojádry a jsou-li zvířata trvale exponována po dobu, jež přesahuje délku života erytrocytu u použitého druhu (např. 4 týdny nebo více u myši).

Jestliže existuje důkaz o tom, že se zkoušená chemická látka (chemické látky) nebo reaktivní metabolit (metabolity) nedostanou do cílové tkáně, není vhodné tuto zkoušku použít.

Před použitím této zkušební metody na směs za účelem získání údajů pro zamýšlené použití v právních předpisech by se mělo zvážit, zda tato metoda může pro tento účel poskytnout přiměřené výsledky, a pokud ano, proč je tomu tak. Takové úvahy nejsou nutné, pokud existuje právní požadavek na zkoušení dané směsi.

PRINCIP ZKUŠEBNÍ METODY

Zvířata se vhodným způsobem vystaví zkoušené chemické látce. Použije-li se kostní dřeň, zvířata se ve vhodném okamžiku po expozici humánně utratí, odebere se kostní dřeň, připraví se preparát a obarví se (9) (10) (11) (12) (13) (14) (15). Při použití periferní krve se krev ve vhodném okamžiku (vhodných okamžicích) po expozici odebere, připraví se preparát a obarví se (12) (16) (17) (18). Při akutní expozici je důležité zvolit takové časy odběru kostní dřeně nebo krve, kdy je možné detekovat indukci nezralých erytrocytů s mikrojádry související s expozicí. V případě odběru periferní krve musí též uplynout dostatek času, aby se tyto jevy mohly objevit v cirkulující krvi. Preparáty se analyzují na přítomnost mikrojader, a to vizualizací pomocí mikroskopu, analýzou obrazu, průtokovou cytometrií nebo laserovou skenovací cytometrií.

OVĚŘENÍ ZPŮSOBILOSTI LABORATOŘE

Experimenty pro ověření způsobilosti

Aby bylo možné před zahájením rutinního zkoušení zjistit, zda laboratoř má s danou zkouškou dostatečné zkušenosti, měla by prokázat schopnost reprodukovat očekávané výsledky z publikovaných údajů (17) (19) (20) (21) (22), pokud jde o četnost výskytu mikrojader, nejméně se dvěma pozitivními kontrolními chemickými látkami (včetně slabých odpovědí indukovaných nízkými dávkami u pozitivních kontrol), např. látkami uvedenými v tabulce 1, a s kontrolami s kompatibilním vehikulem/rozpouštědlem (viz odstavec 26). Při těchto experimentech by se měly používat dávky, jež poskytují reprodukovatelné nárůsty v závislosti na dávce, a měly by prokázat citlivost a dynamické rozpětí zkušebního systému ve sledované tkáni (kostní dřeni nebo periferní krvi) za použití hodnotící metody, jež má být v laboratoři uplatňována. Tento požadavek neplatí pro laboratoře, které tuto zkušenost mají, tj. které mají k dispozici historickou databázi, jak je definována v odstavci 14–18.

Historické kontrolní údaje

V průběhu šetření způsobilosti by laboratoř měla stanovit:

— historické rozmezí a distribuci pozitivních kontrolních účinků a

▼M7

— historické rozmezí a distribuci negativních kontrolních účinků.

Při prvním získávání údajů o dosavadní distribuci negativních kontrol by měly být výsledky provedených negativních kontrol v souladu s publikovanými kontrolními údaji, pokud existují. S tím, jak je do distribuce kontrol přidáváno více údajů z experimentů, měly by souběžné negativní kontroly v ideálním případě spadat do 95 % rozmezí této distribuce. Historická databáze negativních kontrol laboratoře by měla být statisticky robustní, aby byla zajištěna schopnost laboratoře posuzovat distribuci svých údajů o negativních kontrolách. V literatuře se doporučuje, že nezbytným minimem může být 10 experimentů, nejlépe však by databáze měla zahrnovat nejméně 20 experimentů provedených za srovnatelných zkušebních podmínek. V laboratořích by měly být uplatňovány metody řízení jakosti, jako např. kontrolní diagramy (např.C-charts nebo X-bar charts (23)), z nichž je patrné, jak proměnlivé jsou jejich údaje a že metodika je v dané laboratoři „pod kontrolou“. Další doporučení, jak získat a používat dosavadní údaje (tj. kritéria pro zařazení údajů do historické databáze a jejich vyřazení a kritéria přijatelnosti pro daný experiment), lze najít v literatuře (24).

Pokud laboratoř neprovedla dostatečný počet experimentů, aby mohla během šetření způsobilosti (popsaného v odstavci 13) stanovit statisticky robustní distribuci negativních kontrol (viz odstavec 15), je přijatelné, aby distribuce byla stanovena během prvních rutinních zkoušek. Uplatňování tohoto přístupu by mělo vycházet z doporučení uvedených v literatuře (24) a výsledky negativních kontrol získané při těchto experimentech by měly zůstat v souladu s publikovanými údaji o negativních kontrolách.

Jakékoli změny zkušebního protokolu by měly být zvažovány z hlediska jejich dopadu na výsledné údaje tak, aby zůstaly v souladu se stávající historickou kontrolní databází laboratoře. Pouze případy větších rozdílů ve zkušebním protokolu by měly vést k zavedení nové historické kontrolní databáze, přičemž její odlišnost od dřívější distribuce se stanoví na základě odborného posouzení (viz odstavec 15). V průběhu opětovného stanovení nemusí být k provedení aktuální zkoušky nutná úplná databáze negativních kontrol, pokud laboratoř prokáže, že hodnoty jejích souběžných negativních kontrol zůstávají v souladu s její předchozí databází nebo s odpovídajícími publikovanými údaji.

Údaje o negativních kontrolách by měly zahrnovat výskyt nezralých erytrocytů s mikrojádry u každého zvířete. Výsledky souběžných negativních kontrol by v ideálním případě měly být v 95 % rozmezí distribuce v historické databázi negativních kontrol laboratoře. Pokud jsou údaje ze souběžných negativních kontrol mimo 95 % rozmezí, může být přijatelné je zařadit mezi dosavadní distribuci kontrol, pokud tyto údaje nejsou mimořádně odlehlé a pokud existuje důkaz o tom, že testovací systém je „pod kontrolou“ (viz odstavec 15), a neexistuje důkaz o tom, že by došlo k technické nebo lidské chybě.

POPIS METODY

Příprava

Výběr druhu zvířat

Měly by být použity běžně používané laboratorní kmeny zdravých mladých pohlavně dospělých zvířat. Použít lze myši, potkany nebo jiné vhodné druhy savců. Při použití periferní krve se musí stanovit, že detekci indukovaných mikrojader u zvoleného druhu neohrozí odstraňování buněk s mikrojádry z krevního oběhu ve slezině. Toto bylo jasně prokázáno u periferní krve myši a potkana (2).

▼M7

Vědecké zdůvodnění použití jiných druhů než potkanů a myší by mělo být uvedeno ve zprávě. Jsou-li použity jiné druhy než hlodavci, doporučuje se měření indukovaných mikrojader začlenit do jiné vhodné zkoušky toxicity.

Podmínky chovu a krmení zvířat

Teplota v místnosti pro zvířata by u hlodavců měla být 22 °C (± 3 °C). Relativní vlhkost vzduchu by v ideálním případě měla být 50–60 %, ale minimálně 40 % a neměla by pokud možno přesáhnout 70 % kromě doby úklidu místnosti. Osvětlení by mělo být umělé a mělo by se střídat 12 hodin světla a 12 hodin tmy. Ke krmení lze použít konvenční laboratorní krmivo s neomezeným přísunem pitné vody. Výběr potravy může být ovlivněn nutností zajistit dostatečné mísení se zkoušenou látkou, je-li látka podávána touto cestou. Hlodavci by měli být chováni v malých skupinách (nejvýše po pěti v každé kleci) téhož pohlaví a se stejnou aplikací, pokud se nepředpokládá agresivní chování, přednostně v klecích s pevnou podlahou s vhodným obohacením životního prostředí. Zvířata mohou být umístěna v klecích individuálně, pouze je-li to vědecky odůvodněné.

Příprava zvířat

Obvykle se používají zdravá mladá dospělá zvířata (u hlodavců ideálně ve věku 6–10 týdnů na počátku expozice, ale přijatelná jsou i zvířata poněkud starší), která se náhodně přiřadí do kontrolních a experimentálních skupin. Jednotlivá zvířata se jednoznačně identifikují humánní, co nejméně invazivní metodou (např. kroužkováním, označením štítkem, pomocí mikročipu nebo biometrické identifikace, avšak nikoli nastřihnutím ucha nebo prstu dolní končetiny) a nechají se v laboratorních podmínkách alespoň pět dní aklimatizovat. Klece by měly být uspořádány tak, aby byl vliv umístění klecí minimalizován. Mělo by se zabránit vzájemné kontaminaci pozitivní kontroly a zkoušené chemické látky. V okamžiku zahájení studie by měla být odchylka v hmotnosti zvířat minimální a neměla by překročit ± 20 % střední hodnoty hmotnosti zvířat daného pohlaví.

Příprava dávek

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

Zkušební podmínky

Rozpouštědlo/vehikulum

Rozpouštědlo/vehikulum by nemělo mít při použitých úrovních dávek toxické účinky a nemělo by být schopno chemické reakce se zkoušenými chemickými látkami. Jsou-li použita jiná než známá rozpouštědla/vehikula, mělo by být jejich zařazení podloženo referenčními údaji o jejich kompatibilitě. Doporučuje se pokud možno nejprve zvážit použití vodných rozpouštědel/vehikul. Jako příklad běžně používaných kompatibilních rozpouštědel/vehikul lze uvést vodu, fyziologický roztok, roztok methylcelulosy, roztok sodné soli karboxymethylcelulosy, olivový olej a kukuřičný olej. Neexistují-li historické nebo publikované kontrolní údaje prokazující, že zvolené atypické rozpouštědlo/vehikulum neindukuje mikrojádra nebo jiné zhoubné účinky, měla by být provedena počáteční studie za účelem stanovení přijatelnosti kontroly s tímto rozpouštědlem/vehikulem.

▼M7

Kontroly

Pozitivní kontroly

V každé zkoušce by měla být obvykle zařazena jedna skupina zvířat vystavených pozitivní kontrolní chemické látce. Od toho lze upustit, jestliže zkušební laboratoř prokázala způsobilost k provádění zkoušky a stanovila historické rozmezí pozitivních kontrol. Není-li zařazena souběžná pozitivní kontrolní skupina, měly by být v každém experimentu zařazeny hodnotící kontroly (fixované a nezbarvené preparáty nebo vzorky buněčné suspenze podle toho, co je vhodné pro danou hodnotící metodu). Tyto hodnotící kontroly lze získat tak, že se do hodnocení studie zařadí vhodné referenční vzorky, které byly získány a uchovány ze samostatného experimentu s pozitivními kontrolami prováděného pravidelně (např. každých 6–18 měsíců), například během testování způsobilosti a poté pravidelně podle potřeby.

Chemické látky pro pozitivní kontrolu by měly spolehlivě vyvolat pozorovatelné zvýšení výskytu buněk s mikrojádry nad spontánní úroveň. Při použití manuálního hodnocení za použití mikroskopie by dávky u pozitivní kontroly měly být zvoleny tak, aby byl účinek zřetelný, ale aby hodnotitel okamžitě nezjistil identitu kódovaného vzorku. Je přijatelné, aby látka v pozitivní kontrole byla podávána jiným způsobem než zkoušená chemická látka, podle odlišného harmonogramu expozice, a aby se odběr vzorků prováděl pouze v jediném okamžiku. Pro pozitivní kontrolu navíc může být vzato v úvahu použití chemických látek ze stejné chemické třídy, je-li to vhodné. Příklady pozitivních kontrolních chemických látek jsou uvedeny v tabulce 1.

Tabulka 1.

Příklady chemických látek pro pozitivní kontroly.

Chemické látky a registrační číslo CAS (CASRN)
ethyl-methansulfonát [CASRN 62-50-0]
methyl-methansulfonát [CASRN 66-27-3]
1-ethyl-1-nitrosomočovina [CASRN 759-73-9]
mitomycin C [CASRN 50-07-7]
cyklofosfamid (cyklofosfamid monohydrát) [CASRN 50-18-0 (CASRN 6055-19-2)]
2,4,6-tris(aziridin-1-yl)- 1,3,5-triazin [CASRN 51-18-3]
kolchicin [CASRN 64-86-8] nebo vinblastin [CASRN 865-21-4] – jako aneugeny

Negativní kontroly

V každém expozičním intervalu by měla být zařazena souběžná negativní kontrolní skupina zvířat, která jinak podstupují stejný proces jako exponované skupiny až na to, že nejsou vystavena zkoušené chemické látce. Používá-li se při podávání zkoušené chemické látky rozpouštědlo/vehikulum, měla by toto rozpouštědlo/vehikulum dostávat i kontrolní skupina. Pokud však dosavadní údaje o negativních kontrolách v různých intervalech expozice v dané zkušební laboratoři prokazují konzistentní údaje o variabilitě zvířat a četnosti buněk s mikrojádry, může být pro negativní kontrolu nezbytný pouze jeden odběr. Je-li u negativních kontrol použit jediný odběr, měl by se provést v prvním (nejkratším) intervalu expozice použitém ve studii.

▼M7

Při použití periferní krve je u krátkodobých studií přijatelný vzorek odebraný před expozicí namísto souběžné negativní kontroly, pokud výsledné údaje jsou konzistentní s historickou kontrolní databází dané zkušební laboratoře. Bylo prokázáno, že u potkana vzorek s malými objemy odebraný před expozicí (např. méně než 100 µl/den) má minimální dopad na četnost výskytu mikrojader na pozadí (25).

POSTUP

Počet a pohlaví zvířat

Indukce mikrojader je v zásadě u samic a samců podobná, a většinu studií je proto možné provést s kterýmkoli z obou pohlaví (26). Existence údajů prokazujících významné rozdíly mezi samci a samicemi (např. rozdíly v systémové toxicitě, metabolismu, biologické dostupnosti, toxicita pro kostní dřeň atd. získané např. ve studii ke stanovení rozsahu dávek) by byla důvodem pro použití zvířat obojího pohlaví. V tomto případě může být vhodné provést studii s oběma pohlavími, např. jako součást studie toxicity po opakovaných dávkách. V případě použití obou pohlaví by mohlo být vhodné použít faktoriálního uspořádání experimentu. Podrobnosti ohledně toho, jak analyzovat údaje získané při tomto uspořádání experimentu, jsou uvedeny v dodatku 2.

Velikost skupin při zahájení studie by měla být stanovena tak, aby poskytla minimálně pět analyzovatelných zvířat jednoho pohlaví, nebo každého pohlaví, jsou-li použita obě, z každé skupiny. Je-li expozice člověka chemickým látkám specifická pro určité pohlaví, jako je tomu například u některých léčivých přípravků, měla by být zkouška provedena se zvířaty odpovídajícího pohlaví. Určitým vodítkem pro maximální typické požadavky na počet zvířat může být, že studie s kostní dření prováděné podle parametrů uvedených v odstavci 37 se třemi exponovanými skupinami a souběžnými negativními a kontrolními skupinami (každá skupina složena z pěti zvířat jednoho pohlaví) by vyžadovala 25 až 35 zvířat.

Dávkování

Provádí-li se studie pro zjištění rozsahu dávek, poněvadž nejsou k dispozici vhodné údaje, jež by mohly pomoci při stanovení dávek, měla by být provedena ve stejné laboratoři, se stejným druhem, kmenem, pohlavím a za stejného režimu expozice, které se použijí v hlavní studii (27). Cílem studie by mělo být zjistit maximální tolerovanou dávku, která je definována jako nejvyšší dávka, která bude po dobu trvání zkoušky tolerována bez příznaků toxicity omezující studii (např. vyvolání poklesu tělesné hmotnosti nebo cytotoxicity hematopoetického systému, avšak nikoli smrti nebo příznaků bolesti, utrpení nebo strádání, kdy je nezbytné zvířata humánně utratit (28)).

Nejvyšší dávka může být také definována jako dávka vyvolávající v kostní dřeni toxicitu (např. snížení podílu nezralých erytrocytů z celkového počtu erytrocytů v kostní dřeni nebo v periferní krvi o více než 50 %, avšak nejméně na 20 % kontrolní hodnoty). Při analýze CD71 pozitivních buněk v periferním krevním oběhu (tj. pomocí průtokové cytometrie) tato velmi mladá frakce nezralých erytrocytů odpovídá na toxické podněty rychleji než větší kohorta nezralých erytrocytů s pozitivní RNA. Vyšší zjevná toxicita proto může být zřejmá při uspořádání s akutní expozicí, kdy se zkoumá frakce CD71 pozitivních nezralých erytrocytů v porovnání s těmi uspořádáními, jež identifikují nezralé erytrocyty na základě obsahu RNA. A proto, jestliže se při experimentech využívá pěti nebo méně dnů expozice, může být nejvyšší dávka chemické látky způsobující toxicitu definována jako dávka, která způsobuje statisticky významné snížení podílu nezralých CD71 pozitivních erytrocytů z celkového množství erytrocytů, avšak nikoli na úroveň menší než 5 % kontrolní hodnoty (29).

▼M7

Výjimku z kritérií pro stanovení dávek mohou představovat chemické látky, jež vykazují saturaci toxikokinetických vlastností nebo indukují detoxifikační procesy, které mohou vést ke snížení expozice po dlouhodobé aplikaci, a jež by měly být hodnoceny v každém jednotlivém případě.

Aby bylo možné získat informace o dávce a účinku, měla by úplná studie zahrnovat negativní kontrolní skupinu a minimálně tři úrovně dávek, které jsou zpravidla odstupňovány faktorem 2, avšak nepřevyšujícím 4. Pokud zkoušená chemická látka ve studii ke stanovení rozsahu dávek nebo na základě existujících údajů nevyvolává toxicitu, měla by být nejvyšší dávka 1 000 mg/kg tělesné hmotnosti/den při době podávání 14 dní nebo delší nebo 2 000 mg/kg tělesné hmotnosti/den při dobách podávání kratších než 14 dní. Pokud však zkoušená chemická látka způsobuje toxicitu, měla by být největší podávanou dávkou maximální tolerovaná dávka a úrovně dávek by měly přednostně pokrývat rozmezí od maximální dávky až po dávku vyvolávající malou toxicitu nebo nevyvolávající žádnou toxicitu. Je-li toxicita pro cílovou tkáň (kostní dřeň) pozorována na všech testovaných úrovních dávek, doporučuje se další studie s netoxickými dávkami. Studie, jejichž cílem je úplnější charakteristika kvantitativních informací o dávce a odezvě, mohou vyžadovat zařazení doplňkových skupin zvířat exponovaných dalším dávkám. Pro některé typy zkoušených chemických látek (např. humánních léčivých přípravků), na něž se vztahují specifické požadavky, se tyto limity mohou lišit.

Limitní zkouška

Pokud experimenty pro určení rozsahu dávek nebo existující údaje získané u příbuzných kmenů zvířat naznačují, že aplikace limitní dávky (viz níže) nevyvolá pozorovatelné toxické účinky (ani pokles proliferace kostní dřeně nebo jiné příznaky cytotoxicity cílové tkáně), a není-li na základě studií genotoxicity *in vitro* nebo na základě údajů o látkách, které mají příbuznou strukturu, očekávána genotoxicita, nepovažuje se úplná studie se třemi úrovněmi dávky za nutnou, za předpokladu, že bylo prokázáno, že zkoušená chemická látka (látky) dosahuje (dosahují) cílové tkáně (kostní dřeně). V takových případech může být postačující jediná úroveň expozice v limitní dávce. Pro 14denní a delší aplikaci je limitní dávka 1 000 mg/kg tělesné hmotnosti/den. Pro kratší než 14denní aplikaci je limitní dávka 2 000 mg/kg tělesné hmotnosti/den.

Podávání dávek

Při plánování zkoušky by měl být zvážen předpokládaný způsob expozice člověka. Proto lze zvolit odůvodněné způsoby expozice např. potravou, v pitné vodě, lokálně, subkutánně, nitrožilně, orálně (pomocí žaludeční sondy), inhalací, intratracheálně nebo implantací. Způsob podávání by měl být v každém případě zvolen tak, aby zajistil odpovídající expozici cílové tkáně (tkání). Intraperitoneální injekce se obecně nedoporučují, protože se nejedná o předpokládaný způsob expozice člověka, a mohla by být použita pouze s konkrétním vědeckým zdůvodněním. Je-li zkoušená chemická látka přimíchána do potravy nebo pitné vody, zejména v případě jednorázové dávky, mělo by se dbát na to, že prodleva mezi příjmem krmiva a vody a odběrem vzorku by měla být dostatečná, aby umožnila detekci účinků (viz odstavec 37). Maximální objem kapaliny, který může být najednou podán žaludeční sondou nebo injekčně, závisí na velikosti pokusného zvířete. Toto množství by obvykle nemělo překročit 1 ml/100 g tělesné hmotnosti, s výjimkou vodných roztoků, kde lze použít maximálně 2 ml/100 g tělesné hmotnosti. Použití objemů větších než tento by mělo být odůvodněno. Až na dráždivé a žíravé zkoušené chemické látky, které obvykle při vyšších koncentracích vykazují zesílené účinky, by měla být variabilita zkušebního objemu minimalizována nastavením koncentrace zajišťující podávání konstantního objemu v závislosti na tělesné hmotnosti při všech úrovních dávky.

▼M7

Plán expozice

Přednostně se provádějí 2 nebo více aplikací v intervalu 24 hodin, zejména při začlenění tohoto testu do jiných studií toxicity. Alternativně lze podat jedinou dávku, pokud je to vědecky odůvodněno (např. chemické látky, o nichž je známo, že blokují buněčný cyklus). Zkoušené chemické látky mohou být podávány také ve dvou dávkách, tzn. dvě nebo více dávek v týž den v rozmezí ne více než 2–3 hodiny, aby bylo usnadněno podávání velkých objemů. Za těchto okolností, nebo je-li zkoušená chemická látka podávána inhalací, by měl být harmonogram odběru buněk stanoven na základě doby podání poslední dávky nebo ukončení expozice.

Zkouška může být prováděna na myších nebo potkanech jedním z těchto způsobů:

a. zkoušená chemická látka se aplikuje zvířatům jednorázově. Vzorky kostní dřeně se odeberou alespoň dvakrát (od nezávislých skupin zvířat), přičemž první odběr se provede nejdříve 24 hodin po aplikaci a poslední nejpozději 48 hodin po aplikaci, pokud není známo, že zkoušená chemická látka má mimořádné dlouhý poločas rozpadu, a s přiměřeným odstupem mezi odběry. Odběr dříve než 24 hodin po aplikaci musí být zdůvodněn. Vzorky periferní krve se odeberou alespoň dvakrát (od téže skupiny zvířat), přičemž první odběr se provede nejdříve 36 hodin po aplikaci a poslední nejpozději 72 hodin po aplikaci a po prvním odběru se dodrží odpovídající odstup/y. V prvním intervalu expozice by měly být aplikovány všechny exponované skupiny a proveden odběr buněk. V dalším intervalu (intervalech) expozice je potřebné podat pouze nejvyšší dávku. Je-li po prvním odběru pozorována pozitivní odpověď, není další odběr nutný, pokud není potřeba získat kvantitativní informace o dávce a odezvě. Popsané doby odběrů jsou důsledkem kinetiky výskytu a vymizení mikrojader v těchto dvou tkáňových složkách;

b. jsou-li podávány dvě dávky denně (např. dvě dávky v intervalu 24 hodin), měly by být vzorky při použití kostní dřeně odebrány jednou po 18 až 24 hodinách po poslední aplikaci a při použití periferní krve jednou po 36 až 48 hodinách po poslední aplikaci (30). Popsané doby odběrů jsou důsledkem kinetiky výskytu a vymizení mikrojader v těchto dvou tkáňových složkách;

c. jsou-li podávány tři nebo více dávek denně (např. tři nebo více dávek v intervalu přibližně 24 hodin), měly by být vzorky při použití kostní dřeně odebrány nejpozději po 24 hodinách po poslední aplikaci a při použití periferní krve by měly být odebrány nejpozději po 40 hodinách po poslední aplikaci (31). Tato možnost aplikace vyhovuje pro kombinaci s kometovým testem (např. odběr vzorků po 2–6 hodinách po poslední aplikaci) se zkouškou mikrojader a pro integraci zkoušky mikrojader se studiemi toxicity po opakovaných dávkách. Z akumulovaných údajů vyplývá, že indukci mikrojader je možné pozorovat v těchto širších časových úsecích, pokud byly podány tři nebo více dávek (15).

Popřípadě mohou být použity jiné režimy podávání dávek nebo odběru vzorků, je-li to vědecky zdůvodněno a k usnadnění integrace s jinými zkouškami toxicity.

Pozorování

Všeobecné klinické pozorování by se mělo provádět nejméně jednou denně, přednostně ve stejnou dobu (stejné doby) a s uvážením doby očekávaného maximálního účinku po podání látky. Nejméně dvakrát denně po dobu podávání dávek by měla být provedena prohlídka všech zvířat za účelem zjištění morbidity a mortality. Všechna zvířata by měla být zvážena na počátku studie, nejméně jednou týdně během studií s opakovanou dávkou a při utracení. Při studiích s alespoň týdenním trváním by se alespoň jednou týdně měla změřit spotřeba

▼M7

krmiva. Pokud je zkoušená chemická látka podávána v pitné vodě, měla by se spotřeba vody měřit při každé výměně vody a alespoň jednou týdně. Zvířata, která vykazují neletální indikátory nadměrné toxicity, by měla být humánně utracena před uplynutím doby zkoušky (28). Za určitých okolností by mohla být sledována tělesná teplota zvířete, protože hypertermie a hypotermie indukovaná expozicí může způsobovat falešné výsledky (32) (33) (34).

Expozice cílových tkání

Krevní vzorek by měl být odebrán ve vhodnou dobu (vhodné doby), aby mohlo být provedeno vyšetření hladiny zkoušené chemické látky v plazmě za účelem prokázání, že došlo k expozici kostní dřeně, pokud je to požadováno a pokud neexistují jiné údaje o expozici (viz odstavec 48).

Příprava kostní dřeně nebo krve

Buňky kostní dřeně se obvykle získávají z femuru nebo tibie zvířat ihned po jejich humánním usmrcení. Buňky se odeberou a zavedenými metodami se preparují a obarví. Malé objemy periferní krve lze podle příslušných standardů dobrého zacházení se zvířaty získat buď postupem, který umožňuje přežití zkušebního zvířete, např. odběrem z ocasní žíly nebo jiné vhodné krevní cévy, anebo srdeční punkcí nebo odběrem vzorku z velké cévy při utracení zvířete. U erytrocytů získaných z kostní dřeně nebo z periferní krve je možné, v závislosti na metodě analýzy, buňky ihned supravitálně obarvit (16) (17) (18), připravit preparáty roztěrem a poté je obarvit pro mikroskopii nebo vhodně fixovat a obarvit pro analýzu pomocí průtokové cytometrie. Použitím barviva specifického pro DNA [např. akridinová oranž (35) nebo Hoechst 33258 a pyronin-Y (36)] se lze vyhnout některým artefaktům spojeným s použitím barviva nespecifického pro DNA. Tato výhoda nebrání použití konvenčních barviv (např. Giemsa pro analýzu pod mikroskopem). Přídavné systémy [např. celulosová kolona k odstranění buněk obsahujících jádra (37) (38)] lze použít za předpokladu, že se prokázalo, že jsou kompatibilní se systémy pro preparaci vzorků v laboratoři.

Jsou-li tyto metody použitelné, lze k identifikaci povahy mikrojader (chromozóm/chromozómový fragment) využít protilátky proti kinetochorům (39), hybridizační metodu FISH využívající pan-centromerické DNA-sondy (40), případně značení *in situ* pomocí primerů se specifickou pan-centromerickou vazbou spolu s vhodným kontrastním barvením DNA (41), aby bylo možné určit, zda mechanismus indukce mikrojader je důsledkem klastogenního a/nebo aneugenního působení. K rozlišení mezi klastogeny a aneugeny lze použít i jiné metody, pokud se ukázaly jako účinné.

Analýza (manuální a automatizovaná)

Všechny preparáty nebo vzorky k analýze, včetně preparátů nebo vzorků pozitivní a negativní kontroly, by měly být před kterýmkoli typem analýzy označeny samostatným kódem a určeny náhodným výběrem tak, aby hodnotiteli používajícímu ruční postupy nebyly známy podmínky expozice; takové kódování není nutné při použití automatizovaných systémů hodnocení, které nejsou závislé na vizuální kontrole a nemohou být ovlivněny neobjektivností obsluhy. Pro každé zvíře se stanoví podíl nezralých erytrocytů z celkového (nezralé + zralé) množství erytrocytů, přičemž se v případě kostní dřeně použije celkově alespoň 500 erytrocytů a v případě periferní krve alespoň 2 000 erytrocytů (42). U každého zvířete by se mělo vyšetřit alespoň 4 000 nezralých erytrocytů na výskyt mikrojader v nezralých erytrocytech (43). Pokud z historické databáze negativních kontrol vyplývá, že střední četnost výskytu nezralých erytrocytů s mikrojádry v dané laboratoři je < 0,1 %, mělo by se zvážit vyhodnocení dalších buněk. Při analýze vzorků by podíl počtu nezralých erytrocytů z celkového počtu všech

▼M7

hodnocených erxtrocytů u exponovaných zvířat neměl být menší než 20 % podílu v kontrolách s vehikulem/rozpouštědlem při hodnocení pod mikroskopem a ne méně než přibližně 5 % podílu nezralých erytrocytů z celkového množství erytrocytů v kontrolách s vehikulem/rozpouštědlem při hodnocení CD71 + nezralých erytrocytů cytometrickými metodami (viz odstavec 31) (29). Například ve zkoušce s kostní dření, která je hodnocena mikroskopicky, pokud by podíl nezralých erytrocytů v kostní dřeni u kontrol byl 50 %, horní limit toxicity by představoval 10 % nezralých erytrocytů.

Poněvadž slezina potkanů erytrocyty s mikrojádry zachycuje a ničí, v zájmu zachování vysoké citlivosti zkoušky při analýze periferní krve potkana se upřednostňuje omezit analýzu nezralých erytrocytů s mikrojádry na nejmladší frakci. Při použití automatizovaných analytických metod lze tyto nejnezralejší erytrocyty identifikovat na základě jejich vysokého obsahu RNA nebo vysoké hladiny transferinových receptorů (CD71+) vyjádřené na jejich povrchu (31). Z přímého srovnání různých metod barvení však vyplynulo, že uspokojivé výsledky lze získat různými metodami, včetně konvenčního zbarvení akridinovou oranží (3)(4).

ÚDAJE A PŘEDKLÁDÁNÍ ZPRÁV

Zpracování výsledků

Údaje pro jednotlivá zvířata by měly být zpracovány ve formě tabulky. Pro každé analyzované zvíře by měl být uveden počet vyšetřených nezralých erytrocytů, počet nezralých erytrocytů s mikrojádry a podíl nezralých erytrocytů z celkového množství erytrocytů. Jestliže jsou myši exponovány nepřetržitě čtyři týdny nebo déle, měly by být také uvedeny údaje o počtu a podílu zralých erytrocytů s mikrojádry, byly-li shromažďovány. Uvedeny by měly být i údaje o toxicitě u zvířat a klinické příznaky.

Kritéria přijatelnosti

Přijatelnost zkoušky určují tato kritéria:

a. údaje o souběžné negativní kontrole jsou považovány za přijatelné pro přidání do historické kontrolní databáze laboratoře (viz odstavce 15–18);

b. souběžné pozitivní kontroly nebo hodnotící kontroly by měly vyvolat odpovědi, které jsou slučitelné s odpověďmi uvedenými v historické databázi pozitivních kontrol, a měly by vyvolat statisticky významný nárůst v porovnání se souběžnou negativní kontrolou (viz odstavce 24–25);

c. byl analyzován přiměřený počet dávek a buněk;

d. kritéria pro výběr nejvyšší dávky jsou v souladu s kritérii popsanými v odstavcích 30–33.

Hodnocení a interpretace výsledků

Za předpokladu, že všechna kritéria přijatelnosti byla splněna, lze zkoušenou chemickou látku považovat za jasně pozitivní, pokud:

a. alespoň jedna z exponovaných skupin vykazuje statisticky významné zvýšení výskytu nezralých erytrocytů s mikrojádry v porovnání se souběžnou negativní kontrolou;

b. hodnocení pomocí vhodného statistického trend-testu alespoň v jednom čase odběru ukáže závislost tohoto nárůstu na dávce a

c. všechny výsledky jsou mimo distribuci historických údajů o negativních kontrolách (např. mimo 95 % rozmezí dle Poissonova rozdělení).

▼M7

Je-li v určitém konkrétním čase odběru zkoumána pouze nejvyšší dávka, je zkoušená chemická látka považována za jasně pozitivní, pokud existuje statisticky významný nárůst v porovnání se souběžnou negativní kontrolou a výsledky jsou mimo distribuci dosavadních údajů o negativních kontrolách (např. mimo 95 % rozmezí dle Poissonova rozdělení). Doporučení ohledně nejvhodnějších statistických metod lze najít v literatuře (44) (45) (46) (47). Při provádění analýzy dávky a účinku by měly být analyzovány alespoň tři skupiny exponované různé dávce. Při statistických testech by mělo být zvíře použito jako experimentální jednotka. Pozitivní výsledky mikronukleus testu znamenají, že zkoušená látka indukuje mikrojádra, jež jsou důsledkem chromozómového poškození nebo poškození mitotického aparátu erytroblastu testovaného druhu. V případě, že cílem zkoušky bylo detekovat centromery v mikrojádrech, pak indukce mikrojader obsahujících centromery (centromerickou DNA nebo kinetochory, jež ukazují na ztrátu celých chromozómů) zkoušenou chemickou látkou je důkazem, že zkoušená chemická látka je aneugenní.

Za předpokladu, že všechna kritéria přijatelnosti byla splněna, je zkoušená chemická látka považována za jasně negativní, pokud ve všech zkoumaných zkušebních podmínkách:

a. žádná z exponovaných skupin nevykazuje statisticky významný nárůst výskytu nezralých erytrocytů s mikrojádry v porovnání se souběžnou negativní kontrolou;

b. hodnocení pomocí vhodného statistického trend-testu v žádném čase odběru neukazuje nárůst účinku v závislosti na dávce;

c. všechny výsledky spadají do rámce distribuce dosavadních údajů o negativních kontrolách (např. 95 % rozmezí dle Poissonova rozdělení); a

d. došlo k expozici kostní dřeně zkoušené chemické látce (látkám).

Doporučení ohledně nejvhodnějších statistických metod lze najít v literatuře (44) (45) (46) (47). Důkazy o expozici kostní dřeně zkoušené chemické látce mohou zahrnovat pokles poměru nezralých a zralých erytrocytů nebo měření hladiny zkoušené chemické látky v plazmě nebo krvi. V případě nitrožilního podání není důkazů o expozici zapotřebí. Alternativně mohou být k prokázání expozice kostní dřeně použity údaje o absorpci, distribuci, metabolismu a exkreci (ADME) získané při nezávislé studii za použití stejného způsobu expozice a se stejným druhem. Negativní výsledky znamenají, že zkoušená chemická látka za podmínek zkoušky neprodukuje mikrojádra v nezralých erytrocytech druhu zvířat použitého k testování.

Ověření jasně pozitivní či jasně negativní odpovědi se nepožaduje.

V případech, kdy odpověď není jasně negativní nebo pozitivní, a s cílem napomoci při stanovení biologického významu výsledku (např. slabý nebo okrajový nárůst), by měly být údaje vyhodnoceny na základě odborného posouzení a/nebo dalším vyšetřením u provedených experimentů. V některých případech by mohlo být užitečné analyzovat více buněk nebo provést opakovaný experiment za použití upravených zkušebních podmínek.

V ojedinělých případech dokonce ani po dalším šetření nebude možné na základě daných údajů učinit závěr, zda zkoušená chemická látka přináší pozitivní či negativní výsledky, a proto bude učiněn závěr, že výsledek studie je neurčitý.

Závěrečná zpráva

Závěrečná zpráva by měla obsahovat tyto informace:

Souhrn

Zkoušená chemická látka:

— zdroj, číslo šarže a je-li k dispozici, datum použitelnosti,

▼M7

— stabilita zkoušené chemické látky, je-li známa.

Jednosložková látka:

— fyzický vzhled, rozpustnost ve vodě a další důležité fyzikálně-chemické vlastnosti,

— chemická identifikace, jako např. název IUPAC nebo CAS, číslo CAS, kód SMILES nebo InChI, strukturní vzorec, čistota, případně chemická identita nečistot, je-li to prakticky proveditelné, atd.

Vícesložková látka, UVCB a směsi:

— charakterizovaná v co možná největší míře chemickou identitou (viz výše), kvantitativním výskytem a důležitými fyzikálně-chemickými vlastnostmi složek.

Příprava zkoušené chemické látky:

— zdůvodnění volby vehikula,

— rozpustnost a stabilita zkoušené chemické látky v rozpouštědle/vehikulu, je-li známa,

— příprava potravy, pitné vody nebo inhalačních aplikačních forem,

— analytická stanovení aplikační formy (např. stabilita, homogenita, nominální koncentrace), jsou-li prováděna.

Pokusná zvířata:

— použitý druh/kmen a odůvodnění jeho použití,

— počet, stáří a pohlaví zvířat,

— zdroj, podmínky chovu, strava atd.,

— metoda jednoznačného označení zvířat,

— u krátkodobých studií: hmotnost jednotlivých zvířat na začátku a na konci zkoušky; u studií delších než jeden týden: hmotnosti jednotlivých zvířat během studie a spotřeba potravy. Mělo by být uvedeno rozpětí tělesné hmotnosti, střední hodnota a směrodatná odchylka pro každou skupinu.

Zkušební podmínky:

— údaje o pozitivní a negativní (vehikulum/rozpouštědlo) kontrole,

— údaje ze studie pro zjištění rozsahu dávek, pokud byla provedena,

— zdůvodnění zvolených úrovní dávek,

— podrobné údaje o přípravě zkoušené chemické látky,

— podrobné údaje o podávání zkoušené chemické látky,

— zdůvodnění způsobu a trvání podávání,

— metody k ověření, že se zkoušená chemická látka (látky) dostala (dostaly) do obecné cirkulace nebo do cílové tkáně,

▼M7

— skutečná dávka (v mg/kg tělesné hmotnosti na den) vypočítaná z koncentrace zkoušené chemické látky v potravě / pitné vodě (v ppm) a ze spotřeby, je-li to relevantní,

— podrobné údaje o kvalitě krmiva a vody.

— způsob utracení,

— způsob analgezie (pokud se používá),

— podrobný popis harmonogramů aplikace a odběru vzorků a odůvodnění výběru konkrétního schématu,

— metody přípravy preparátů,

— postupy izolace a uchovávání vzorků,

— metody stanovení toxicity,

— kritéria hodnocení mikrojader v nezralých erytrocytech,

— počet buněk analyzovaných u každého zvířete při stanovení četnosti výskytu nezralých erytrocytů s mikrojádry a při stanovení poměru mezi nezralými a zralými erytrocyty,

— kritéria přijatelnosti studie,

— případně metody, např. využití protilátek proti kinetochorům nebo sond DNA se specifickou vazbou na centromery, použité k určení toho, zda mikrojádra obsahují celé chromozómy nebo fragmenty chromozómů, pokud to připadá v úvahu.

Výsledky:

— stav zvířat před zkouškou a během zkoušky, včetně známek toxicity,

— podíl nezralých erytrocytů z celkového množství erytrocytů,

— počet nezralých erytrocytů s mikrojádry uvedený samostatně pro každé zvíře,

— střední hodnota ± směrodatná odchylka počtu nezralých erytrocytů s mikrojádry v každé skupině,

— podle možnosti závislost účinku na dávce,

— případné statistické analýzy a metody,

— údaje o souběžné negativní a pozitivní kontrole s rozpětími, středními hodnotami a směrodatnými odchylkami,

— dosavadní údaje o negativních a pozitivních kontrolách s rozpětími, středními hodnotami a směrodatnými odchylkami a 95 % rozmezím distribuce a rovněž časové období, na které se údaje vztahují, a počet kontrolních souborů použitých pro distribuci,

— údaje dokládající, že došlo k expozici kostní dřeně,

— popisné údaje udávající, zda mikrojádra obsahují celé chromozómy nebo fragmenty chromozómů, pokud to bylo zjišťováno,

— splněná kritéria pro pozitivní nebo negativní odpověď.

▼**M7**

Diskuze výsledků.

Závěr.

Odkazy.

LITERATURA

1) OECD (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, No. 234, OECD, Paris.

2) Hayashi, M. et al. (2007), in vivo erythrocyte micronucleus assay III. Validation and regulatory acceptance of automated scoring and the use of rat peripheral blood reticulocytes, with discussion of non-hematopoietic target cells and a single dose-level limit test, Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, Vol. 627/1, s. 10-30.

3) MacGregor, J.T. et al. (2006), Flow cytometric analysis of micronuclei in peripheral blood reticulocytes: II. An efficient method of monitoring chromosomal damage in the rat, Toxicology Sciences, Vol. 94/1, s. 92-107.

4) Dertinger, S.D. et al. (2006), Flow cytometric analysis of micronuclei in peripheral blood reticulocytes: I. Intra- and interlaboratory comparison with microscopic scoring, Toxicological Sciences, Vol. 94/1, s. 83-91.

5) Dertinger, S.D. et al. (2011), Flow cytometric scoring of micronucleated erythrocytes: an efficient platform for assessing in vivo cytogenetic damage, Mutagenesis, Vol. 26/1, s. 139-145.

6) Parton, J.W., W.P. Hoffman, M.L. Garriott (1996), Validation of an automated image analysis micronucleus scoring system, Mutation Research, Vol. 370/1, s. 65-73.

7) Asano, N. et al. (1998), An automated new technique for scoring the rodent micronucleus assay: computerized image analysis of acridine orange supravitally stained peripheral blood cells, Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, Vol. 404/1-2, s. 149-154.

8) Styles, J.A. et al. (2001), Automation of mouse micronucleus genotoxicity assay by laser scanning cytometry, Cytometry, Vol. 44/2, s. 153-155.

9) Heddle, J.A. (1973), A rapid in vivo test for chromosomal damage, Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, Vol. 18/2, s. 187-190.

10) Schmid, W. (1975), The micronucleus test, Mutation Research, Vol. 31/1, s. 9-15.

11) Heddle, J.A. et al. (1983), The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program, Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology, Vol. 123/1, s. 61-118.

12) Mavournin, K.H. et al. (1990), The in vivo micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program, Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology, Vol. 239/1, s. 29-80.

13) MacGregor, J.T. et al. (1983), Micronuclei in circulating erythrocytes: a rapid screen for chromosomal damage during routine toxicity testing in mice, Developments in Toxicology Environmental Science, Vol. 11, s. 555-558.

▼M7

14) MacGregor, J.T. et al. (1987), Guidelines for the conduct of micronucleus assays in mammalian bone marrow erythrocytes, Mutation Research/Genetic Toxicology, Vol. 189/2, s. 103-112.

15) MacGregor, J.T. et al. (1990), The in vivo erythrocyte micronucleus test: measurement at steady state increases assay efficiency and permits integration with toxicity studies, Fundamental and Applied Toxicology, Vol. 14/3, s. 513-522.

16) Hayashi, M. et al. (1990), The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides, Mutation Research/ Genetic Toxicology, Vol. 245/4, s. 245-249.

17) CSGMT/JEMS.MMS – 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, Mutation Research/Genetic Toxicology, Vol. 278/2-3, s. 83-98.

18) CSGMT/JEMS.MMS – The Mammalian Mutagenesis Study Group of the Environmental Mutagen Society of Japan (1995), Protocol recommended by the CSGMT/JEMS.MMS for the short-term mouse peripheral blood micronucleus test. The Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (CSGMT) (CSGMT/JEMS.MMS, The Mammalian Mutagenesis Study Group of the Environmental Mutagen Society of Japan), Mutagenesis, Vol. 10/3, s. 153-159.

19) Salamone, M.F., K.H. Mavournin (1994), Bone marrow micronucleus assay: a review of the mouse stocks used and their published mean spontaneous micronucleus frequencies, Environmental and Molecular Mutagenesis, Vol. 23/4, s. 239-273.

20) Krishna, G., G. Urda, J. Paulissen (2000), Historical vehicle and positive control micronucleus data in mice and rats, Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, Vol. 453/1, s. 45-50.

21) Hayes, J. et al. (2009), The rat bone marrow micronucleus test–study design and statistical power, Mutagenesis, Vol. 24/5, s. 419-424.

22) Wakata, A. et al. (1998), Evaluation of the rat micronucleus test with bone marrow and peripheral blood: summary of the 9th collaborative study by CSGMT/JEMS. MMS. Collaborative Study Group for the Micronucleus Test. Environmental Mutagen Society of Japan. Mammalian Mutagenicity Study Group, Environmental and Molecular Mutagenesis, Vol. 32/1, s. 84-100.

23) Ryan, T.P. (2000), Statistical Methods for Quality Improvement, 2nd ed., John Wiley and Sons, New York.

24) Hayashi, M. et al. (2011), Compilation and use of genetic toxicity historical control data, Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, Vol. 723/2, s. 87–90.

25) Rothfuss, A. et al. (2011), Improvement of in vivo genotoxicity assessment: combination of acute tests and integration into standard toxicity testing, Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, Vol. 723/2, s. 108-120.

26) Hayashi, M. et al. (1994), in vivo rodent erythrocyte micronucleus assay, Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects, Vol. 312/3, s. 293-304.

27) Fielder, R.J. et al. (1992), Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group. Dose setting in in vivo mutagenicity assays, Mutagenesis, Vol. 7/5, s. 313-319.

▼M7

28) OECD (2000), „Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation“, OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, No. 19, OECD Publishing, Paris.

29) LeBaron, M.J. et al. (2013), Influence of counting methodology on erythrocyte ratios in the mouse micronucleus test, Environmental and Molecular Mutagenesis, Vol. 54/3, s. 222-228.

30) Higashikuni, N., S. Sutou (1995), An optimal, generalized sampling time of 30 +/– 6 h after double dosing in the mouse peripheral blood micronucleus test, Mutagenesis, Vol. 10/4, s. 313-319.

31) Hayashi, M. et al. (2000), in vivo rodent erythrocyte micronucleus assay. II. Some aspects of protocol design including repeated treatments, integration with toxicity testing, and automated scoring, Environmental and Molecular Mutagenesis, Vol. 35/3, s. 234-252.

32) Asanami, S., K. Shimono (1997), High body temperature induces micronuclei in mouse bone marrow, Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, Vol. 390/1-2, s. 79-83.

33) Asanami, S., K. Shimono, S. Kaneda (1998), Transient hypothermia induces micronuclei in mice, Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, Vol. 413/1, s. 7-14.

34) Spencer, P.J. et al. (2007), Induction of micronuclei by phenol in the mouse bone marrow: I. Association with chemically induced hypothermia, Toxicological Sciences, Vol. 97/1, s. 120-127.

35) Hayashi, M., T. Sofuni, M. Jr. Ishidate (1983), An application of Acridine Orange fluorescent staining to the micronucleus test, Mutation Research Letters, Vol. 120/4, s. 241-247.

36) MacGregor, J.T., C.M. Wehr, R.G. Langlois (1983), A simple fluorescent staining procedure for micronuclei and RNA in erythrocytes using Hoechst 33258 and pyronin Y, Mutation Research, Vol. 120/4, s. 269-275.

37) Romagna, F., C.D. Staniforth (1989), The automated bone marrow micronucleus test, Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, Vol. 213/1, s. 91-104.

38) Sun, J.T., M.J. Armstrong, S.M. Galloway (1999), Rapid method for improving slide quality in the bone marrow micronucleus assay; an adapted cellulose column procedure, Mutation Research, Vol. 439/1, s. 121-126.

39) Miller, B.M., I.D. Adler (1990), Application of antikinetochore antibody staining (CREST staining) to micronuclei in erythrocytes induced in vivo, Mutagenesis, Vol. 5/4, s. 411-415.

40) Miller, B.M. et al. (1991), Classification of micronuclei in murine erythrocytes: immunofluorescent staining using CREST antibodies compared to in situ hybridization with biotinylated gamma satellite DNA, Mutagenesis, Vol. 6/4, s. 297-302.

41) Russo, A. (2002), PRINS tandem labeling of satellite DNA in the study of chromosome damage, American Journal of Medical Genetics, Vol. 107/2, s. 99-104.

42) Gollapudi, B.B., L.G. McFadden (1995), Sample size for the estimation of polychromatic to normochromatic erythrocyte ratio in the bone marrow micronucleus test, Mutation Research, Vol. 347/2, s. 97-99.

43) OECD (2014), „Statistical analysis supporting the revision of the genotoxicity Test Guidelines“, OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, No. 198, OECD Publishing, Paris.

▼**M7**

44) Richold, M. et al. (1990), „In Vivo Cytogenetics Assays“, in Basic Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report. Part I revised, Kirkland, D.J. (ed.), Cambridge University Press, Cambridge, s. 115-141.

45) Lovell, D.P. et al. (1989), „Statistical Analysis of in vivo Cytogenetic Assays“, in Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. UKEMS SubCommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing, Report, Part III, Kirkland, D.J. (ed.), Cambridge University Press, Cambridge, s. 184-232.

46) Hayashi, M. et al. (1994), Statistical analysis of data in mutagenicity assays: rodent micronucleus assay, Environmental Health Perspectives, Vol. 102/Suppl 1, s. 49-52.

47) Kim, B.S., M. Cho, H.J. Kim (2000), Statistical analysis of in vivo rodent micronucleus assay, Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, Vol. 469/2, s. 233-241.

▼M7

Dodatek 1

DEFINICE

Centromera: oblast (oblasti) chromozómu, k níž (k nimž) se během dělení buněk připojí dělící vřeténko umožňující uspořádaný pohyb dceřiných chromozómů k pólům dceřiných buněk.

Chemická látka: chemická substance nebo směs.

Erytroblast: rané stadium vývoje erytrocytu, bezprostředně předcházející nezralému erytrocytu, kdy buňka ještě obsahuje jádro.

Kinetochor: proteinová struktura tvořící centromeru eukaryotických buněk, jež během mitózy a meiózy spojuje s polymery mikrotubulů z mitotického vřeténka a při dělení buněk působí tak, že odtahuje sesterské chromatidy od sebe.

Mikrojádra: malá jádra existující odděleně od hlavních buněčných jader a vedle nich, vytvářená během telofáze mitózy (meiózy) nereplikujícími se (lagging) chromozómovými fragmenty nebo celými chromozómy.

Normochromatický nebo zralý erytrocyt: plně zralý erytrocyt, který ztratil reziduální RNA, jež zůstává po vypuzení jádra a/nebo který ztratil jiné buněčné markery s krátkou životností, jež zpravidla mizí po vypuzení jádra následujícím po konečném dělení erytroblastu.

Polychromatický nebo nezralý erytrocyt: nově vzniklý erytrocyt v přechodném stadiu vývoje, který se obarví modrou a červenou složkou klasických krevních barviv jako např. Wright-Giemsa v důsledku přítomnosti reziduální RNA v nově vzniklé buňce. Takové nově vzniklé buňky jsou přibližně stejné jako retikulocyty, které se vizualizují pomocí vitálního barviva, jež způsobí, že se reziduální RNA shlukne do retikula. K identifikaci nově vzniklých červených krvinek se nyní často používají i jiné metody včetně monochromatického barvení RNA fluorescenčními barvivy nebo označení povrchových markerů s krátkou životností, jako je CD71, fluorescenčními protilátkami. Jak polychromatické erytrocyty, tak retikulocyty i CD71 pozitivní erytrocyty jsou nezralé erytrocyty, ačkoli každý z nich má poněkud odlišné věkové rozložení.

Retikulocyt: nově vzniklý erytrocyt obarvený vitálním barvivem, jež způsobuje, že se reziduální RNA shlukne do charakteristického retikula. Retikulocyty a polychromatické erytrocyty mají podobné věkové rozložení buněk.

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

▼M7

Dodatek 2

FAKTORIÁLNÍ POKUS KE ZJIŠTĚNÍ ROZDÍLŮ MEZI POHLAVÍMI V TESTU MIKROJADER *IN VIVO*

Faktoriální pokus a jeho analýza

Při tomto pokusu se na každé úrovni koncentrace testuje minimálně 5 samců a 5 samic a výsledkem je uspořádání s použitím minimálně 40 zvířat (20 samců a 20 samic plus příslušné pozitivní kontroly).

Tento pokus, který je jedním z nejjednodušších faktoriálních pokusů, je rovnocenný dvoucestné analýze rozptylu, přičemž hlavními prvky jsou úroveň koncentrace a pohlaví. Údaje je možné analyzovat pomocí mnoha standardních statistických softwarových balíčků, např. SPSS, SAS, STATA, Genstat a také pomocí programu R.

Analýza dělí variabilitu v souboru údajů na variabilitu mezi pohlavími, variabilitu mezi úrovněmi koncentrace a variabilitu interakce mezi pohlavími a koncentracemi. Každý z těchto znaků se testuje oproti odhadu variability u replicitních zvířat ve skupinách zvířat stejného pohlaví, jimž je podávána stejná koncentrace látky. Veškeré podrobnosti základní metodiky jsou dostupné v mnoha standardních učebnicích statistiky (viz odkazy) a v „nápovědě“ statistických programů.

Analýza se provádí zkoumáním znaku interakce pohlaví x koncentrace v tabulce ANOVA ([1]). Neexistuje-li významný znak interakce, kombinované hodnoty za obě pohlaví nebo za všechny úrovně koncentrace poskytují validní statistické testy variability mezi úrovněmi založené na zkoumání kumulovaného znaku vnitroskupinové variability pomocí analýzy ANOVA.

Analýza pokračuje rozdělením odhadu variability mezi koncentracemi na kontrasty, což zajišťuje test na lineární a kvadratické kontrasty odpovědí na všech úrovních koncentrace. Pokud existuje významná interakce pohlaví x koncentrace, lze tento znak také rozdělit na lineární a kvadratický člen kontrastů interakce pohlaví. Pomocí těchto znaků se testuje, zda jsou odpovědi na koncentraci u obou pohlaví paralelní, nebo zda je odpověď u každého pohlaví odlišná.

Odhad kumulované vnitroskupinové variability může být použit k párovému testování rozdílu mezi středními hodnotami. Tato srovnání by mohla být provedena mezi středními hodnotami u obou pohlaví a mezi středními hodnotami u různých úrovní koncentrace, např. za účelem porovnání s úrovněmi negativní skupiny. V případech, kdy existuje významná interakce, lze provádět srovnání mezi středními hodnotami při různých koncentracích v rámci jednotlivých pohlaví nebo mezi středními hodnotami u pohlaví při stejné koncentraci.

Odkazy

Existuje množství učebnic statistiky, které se zabývají teorií, uspořádáním, metodikou, analýzou a interpretací faktoriálních pokusů od nejjednodušších dvoufaktorových analýz až po složitější formy používané v metodice „experimentálního uspořádání“. Následující seznam není vyčerpávající. V některých pracích jsou uvedeny vypracované příklady srovnatelných uspořádání, v některých případech i s kódem pro provádění analýz pomocí různých počítačových programů.

([1]) Statistikové, kteří používají metodu modelování, např. pomocí obecných lineárních modelů (GLM), mohou k této analýze přistupovat různým, byť srovnatelným způsobem, ale nebudou nutně odvozovat tradiční tabulku ANOVA, což se datuje zpět k algoritmickým postupům k výpočtu statistik vyvinutým před érou počítačů.

▼**M7**

Box, G.E.P, Hunter, W.G. and Hunter, J.S. (1978). Statistics for Experimenters. An Introduction to Design, Data Analysis, and Model Building. New York: John Wiley & Sons.

Box G.E.P. & Draper, N.R. (1987). Empirical model-building and response surfaces. John Wiley & Sons Inc.

Doncaster, C.P. & Davey, A.J.H. (2007). Analysis of Variance and Covariance: How to Choose and Construct Models for the Life Sciences. Cambridge University Press.

Mead, R. (1990). The Design of Experiments. Statistical principles for practical application. Cambridge University Press.

Montgomery D.C. (1997). Design and Analysis of Experiments. John Wiley & Sons Inc.

Winer, B.J. (1971). Statistical Principles in Experimental Design. McGraw Hill.

Wu, C.F.J & Hamada, M.S. (2009). Experiments: Planning, Analysis and Optimization. John Wiley & Sons Inc.

▼B

B.13/14 **MUTAGENITA – ZKOUŠKA NA REVERZNÍ MUTACE S BAKTERIEMI**

1. **METODA**

Tato metoda je replikou metody OECD TG 471 – Zkouška na reverzní mutace s bakteriemi (1997).

1.1 ÚVOD

Při zkoušce na reverzní mutace s bakteriemi se používají bakteriální kmeny závislé na aminokyselinách *Salmonella typhimurium* a *Escherichia coli*, k detekci bodových mutací, které zahrnují substituci, adici a deleci jednoho nebo několika párů bází DNA (1, 2, 3). Podstata této zkoušky na reverzní mutace s bakteriemi spočívá v detekci mutací, které revertují mutace obsažené v testovacích kmenech, a obnovují tak funkční schopnost bakterií syntetizovat esenciální aminokyseliny. Bakterie po reverzi jsou detekovány díky své schopnosti růst v nepřítomnosti aminokyselin, které jsou vyžadovány mateřským testovacím kmenem.

Bodové mutace a podobné jevy jsou příčinou mnoha geneticky podmíněných chorob u člověka a existuje mnoho důkazů o tom, že bodové mutace v onkogenech a v genech somatických buněk tlumících nádory mají podíl na tvorbě rakoviny u člověka a u pokusných zvířat. Zkouška na reverzní mutace s bakteriemi je rychlá, nenákladná a relativně snadná. Mnoho testovacích kmenů má řadu vlastností, díky nimž jsou citlivější na detekci mutací, včetně responsivních sekvencí DNA na reverzních místech, zvýšené permeability buněk pro velké molekuly a eliminaci reparačních systémů DNA nebo zlepšení reparačních procesů DNA náchylných k chybám. Specifičnost testovacích kmenů může poskytnout některé užitečné informace o typech mutací, jež jsou indukovány genotoxickými činiteli. Pro zkoušky na reverzní mutací s bakteriemi je k dispozici velmi rozsáhlá databáze výsledků pro širokou škálu struktur a dále byly vyvinuty dobře vyzkoušené metody zkoušení chemických látek, včetně těkavých sloučenin, s různými fyzikálně-chemickými vlastnostmi.

Viz také obecný úvod, část B.

1.2 DEFINICE

Zkouška na reverzní mutace: s bakteriemi *Salmonella typhimurium* nebo *Escherichia coli* slouží k detekci mutací v kmeni vyžadujícím aminokyseliny (histidin resp. tryptofan), přičemž vzniká kmen nezávislý na vnějším přísunu aminokyseliny.

Mutageny substituce párů bází: činitele, jež způsobují změny v bázích DNA. Při zkoušce reverzních mutací se mohou tyto změny vyskytnout na místě původní mutace nebo jiném místě bakteriálního genomu.

Posunové mutageny: činitele, jež způsobují adici nebo deleci jednoho nebo více párů bází DNA a posunují tak čtecí rámec RNA.

▼B

1.3 VÝCHOZÍ ÚVAHY

Při zkouškách na reverzní mutace s bakteriemi se využívají prokaryotické buňky, které se liší od buněk savců faktory, jako jsou příjem, metabolismus, chromozomová struktura a reparační procesy DNA. Zkoušky prováděné *in vitro* obecně vyžadují použití vnějšího zdroje metabolické aktivace. Metabolické aktivační systémy *in vitro* nemohou zcela napodobit podmínky *in vivo* u savců. Zkouška tedy neposkytuje přímou informaci o mutagenním a karcinogenním potenciálu látky pro savce.

Zkouška na reverzní mutace s bakteriemi je zpravidla využívána pro počáteční vyšetření genotoxické aktivity, a zejména aktivity vyvolávající bodové mutace. Z rozsáhlé databáze vyplývá, že mnoho chemických látek, které jsou v této zkoušce pozitivní, vykazuje mutagenní aktivitu i v jiných zkouškách. Existují příklady mutagenních činitelů, které nejsou detekovány touto zkouškou. Příčiny těchto skutečností lze spatřovat ve specifické povaze detekovaného konečného jevu, v rozdílech v metabolické aktivaci nebo v rozdílech v biologické dostupnosti. Na druhé straně faktory, které zvyšují citlivost zkoušky na reverzní mutace na bakteriích, mohou vést k nadhodnocení mutagenní aktivity.

Zkouška na reverzní mutace s bakteriemi nemusí být vhodná pro určité třídy chemických látek, například vysoce baktericidní sloučeniny (např. určitá antibiotika) a pro chemické látky, o nichž se předpokládá (nebo o nichž se ví), že specifícky zasahují do replikačního systému buněk savců (např. některé inhibitory topoisomerasy a některé analogy nukleosidů). V takových případech mohou být vhodnější zkoušky mutagenity u savců.

Přestože mnoho sloučenin, pro něž je tato zkouška pozitivní, je karcinogenní pro savce, není korelace absolutní. Závisí na chemické třídě a existuje mnoho karcinogenů, jež nejsou detekovány touto zkouškou, neboť působí jinými, negenotoxickými mechanismy, nebo mechanismy, které v bakteriálních buňkách neexistují.

1.4 PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

Suspenze bakteriálních buněk jsou vystaveny zkoušené látce, a to za přítomnosti vnějšího metabolického aktivačního systému a bez něho. Ve standardním miskovém testu se suspenze smíchají s vrchním agarem a ihned se nanesou na minimální půdu. V preinkubační metodě se zkoušená směs inkubuje a poté se před nanesením na minimální půdu smíchá s vrchním agarem. Při obou technikách se po dvou nebo třech dnech inkubace spočítají kolonie revertantů a provede se srovnání s počtem kolonií spontánních revertantů na kontrolní misce s rozpouštědlem.

Je popsáno několik postupů provedení zkoušky na reverzní mutace s bakteriemi. Mezi běžně používané patří standardní miskový test (1, 2, 3, 4), preinkubační metoda (2, 3, 5, 6, 7, 8), fluktuační test (9, 10) a suspenzní metoda (11). Metody pro zkoušení plynů a par jsou popsány (12).

▼B

Zde popsané postupy se týkají hlavně standardního miskového testu a preinkubačních metod. Každá z nich je přijatelná pro provádění experimentů jak s metabolickou aktivací, tak bez ní. Některé látky lze účinněji detekovat za použití preinkubační metody. Tyto látky patří do chemických tříd, do nichž patří mezi jiným krátké alifatické nitrosaminy, dvojvazné kovy, aldehydy, azobarviva a diazoniové sloučeniny, pyrrolizidinové alkaloidy, allylové sloučeniny a nitrosloučeniny (3). Přitom se připouští, že určité třídy mutagenů nelze vždy detekovat standardními postupy, jako je standardní miskový test nebo preinkubační metoda. Měly by být považovány za „zvláštní případy“ a k jejich detekci se důrazně doporučuje použít alternativní postupy. Je možné identifikovat tyto „zvláštní případy“ (společně s příklady postupů jejich detekce): azobarviva a diazoniové sloučeniny (3, 5, 6, 13), plyny a těkavé chemické látky (12, 14, 15, 16) a glykosidy (17, 18). Odchylka od standardního postupu musí být vědecky zdůvodněna.

1.5 POPIS ZKUŠEBNÍ METODY

1.5.1 **Přípravky**

1.5.1.1 *Bakterie*

Čerstvé kultury bakterií by měly být kultivovány do pozdní exponenciální fáze nebo do časné stacionární fáze růstu (přibližně 10^9 buněk na ml). Buňky v pozdní stacionární fázi by neměly být použity. Je důležité, aby měly použité bakterie vysoký titr životaschopných bakterií. Titr může být prokázán buď na základě dosavadních kontrolních údajů o růstové křivce, nebo pro každou zkoušku stanovením počtu životaschopných buněk na miskách.

Doporučená inkubační teplota je 37 °C.

Mělo by být použito alespoň pět kmenů bakterií. Mezi nimi by měly být čtyři kmeny *S. typhimurium* (TA 1535; TA 1537 nebo TA97a nebo TA97; TA98; TA100), jejichž odpověď se ukázala v různých laboratořích jako spolehlivá a reprodukovatelná. Tyto čtyři kmeny *S. typhimurium* mají pár bází GC na primárním reverzním místě a je známo, že jejich prostřednictvím nelze detekovat určité oxidační mutageny, činitele způsobující překřížení vláken DNA a hydraziny. Tyto látky mohou být detekovány kmeny *E. coli* WP2 strains nebo *S. typhimurium* TA102 (19), které mají na primárním reverzním místě pár bází AT. Doporučená kombinace kmenů je tedy tato:

— *S. typhimurium* TA1535,

— *S. typhimurium* TA1537 nebo TA97 nebo TA97a,

— *S. typhimurium* TA98,

— *S. typhimurium* TA100 a

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

Pro detekci mutagenů způsobujících překřížení vláken DNA může být vhodnější zařadit TA102 nebo přidat kmen *E. coli* (např. *E. coli* WP2 nebo *E. coli* WP2 (pKM101)).

▼B

Měly by být použity zavedené postupy přípravy kmenové kultury, verifikace markeru a skladování. Potřeba aminokyseliny pro růst by měla být prokázána pro každou zmrazenou kmenovou kulturu (histidin pro kmeny *S. typhimurium* a tryptofan pro *E. coli*). Podobně by měly být kontrolovány jiné fenotypové charakteristiky, jmenovitě podle potřeby přítomnost nebo nepřítomnost R-faktoru plasmidů (tj. ampicilinová rezistence u kmenů TA98, TA100 a TA97a nebo TA97, WP2 uvrA a WP2 uvrA (pKM101) a ampicilinová a tetracyklinová rezistence u kmene TA102); přítomnost charakteristických mutací (tj. rfa mutací u *S. typhimurium* citlivostí na krystalovou violeť a uvrA mutace u *E. coli* nebo uvrB mutací u *S. typhimurium,* citlivostí na ultrafialové světlo) (2)(3). Kmeny by měly rovněž dávat počty kolonií spontánních revertantů na misce v rozmezí četností očekávaných na základě dosavadních údajů laboratorních kontrol a nejlépe v rozmezí uvedeném v literatuře.

1.5.1.2 *Médium*

Použije se vhodný minimální agar (např. obsahující minimální půdu E (Vogel-Bonner) a glukosu) a vrchní agar obsahující histidin a biotin nebo tryptofan umožňující několik buněčných dělení (1, 2, 9).

1.5.1.3 *Metabolická aktivace*

Bakterie by měly být vystaveny zkoušené látce, a to s vhodným systémem metabolické aktivace a bez něho. Nejčastěji používaným systémem je kofaktorem doplněná postmitochondriální frakce (S9) připravená z jater hlodavců ošetřených prostředkem indukujícím enzymy, jako je Aroclor 1254 (1, 2) nebo fenobarbitonu a β-naftoflavonu (18, 20, 21). Postmitochondriální frakce je obvykle používána v koncentracích v rozmezí 5 až 30 % obj. ve směsi S9. Volba a podmínky metabolického aktivačního systému může záviset na třídě zkoušené chemické látky. V některých případech může být vhodné použít více než jednu koncentraci postmitochondriální frakce. U azobarviv a diazoniových sloučenin může být vhodnější použití redukčního metabolického aktivačního systému (6, 13).

1.5.1.4 *Zkoušená látka nebo přípravek*

Pevné zkoušené látky by měly být před aplikací na bakterie rozpuštěny nebo suspendovány ve vhodných rozpouštědlech nebo vehikulech a popřípadě zředěny. Kapalné zkoušené látky mohou být přidány přímo k testovacím systémům a/nebo mohou být před aplikací zředěny. Měly by být použity čerstvě připravené zkoušené chemické látky, pokud údaje o stálosti neprokazují možnost skladování.

Rozpouštědlo/vehikulum by mělo být mimo podezření, že reaguje se zkoušenou látkou, a mělo by být slučitelné s přežitím bakterií a s aktivitou S9 (22). Jsou-li použita jiná než známá rozpouštědla/vehikula, mělo by být jejich zařazení podloženo údaji o jejich kompatibilitě. Doporučuje se pokud možno nejdříve zvážit použití vodných rozpouštědel/vehikul. Při zkoušení látek nestálých ve vodě by měla být použita organická rozpouštědla neobsahující vodu.

▼B

1.5.2 **Zkušební podmínky**

1.5.2.1 *Zkušební kmeny (viz 1.5.1.1)*

1.5.2.2 *Expoziční koncentrace*

Mezi kritéria, která mají být zohledněna při stanovení nejvyššího množství zkoušené látky patří cytotoxicita a rozpustnost v konečné směsi pro aplikaci.

Může být užitečné stanovit toxicitu a nerozpustnost v předběžných experimentech. Cytotoxicita může být detekována snížením počtu kolonií revertantů, vymizením nebo zeslabením bakteriálního podkladu nebo snížením stupně přežití exponovaných kultur. Cytotoxicita látky se může změnit v přítomnosti metabolických aktivačních systémů. Nerozpustnost by měla být posouzena na základě viditelného srážení v konečné směsi za skutečných zkušebních podmínek.

Doporučená maximální zkušební koncentrace pro rozpustné necytotoxické látky je 5 mg/misku nebo 5 µl/misku. U necytotoxických látek nerozpustných při koncentracích 5 mg/misku nebo 5 µl/misku by měla být jedna nebo více zkušebních koncentrací takových, aby látky byly v konečné směsi pro aplikaci nerozpustné. Zkoušené látky, které jsou cytotoxické již při koncentracích nižších než 5 mg/misku nebo 5 µl/misku, by měly být zkoušeny až do cytotoxické koncentrace. Sraženina by neměla vadit při vyšetřování.

Mělo by být použito alespoň pět různých analyzovatelných koncentrací zkoušené látky, přičemž při prvním experimentu by měly být intervaly mezi zkušebními body rovny přibližně polovině dílku logaritmické stupnice (tj. $\sqrt{10}$). Menší intervaly jsou vhodné v případě, kdy se vyšetřuje křivka závislosti odpovědi na koncentraci. Zkoušení koncentrací vyšších než 5 mg/misku nebo 5 µl/misku může být zváženo při hodnocení látek obsahujících významné množství potenciálně mutagenních nečistot.

1.5.2.3 *Negativní a pozitivní kontroly*

Součástí každého stanovení by měly být kmenově specifické pozitivní a negativní (rozpouštědlo nebo vehikulum) kontroly s metabolickou aktivací a bez ní. Pro pozitivní kontrolu by měly být vybrány koncentrace dokládající účinnost každé zkoušky.

V případě zkoušek s použitím metabolického aktivačního systému by měla být látka(látky) pro pozitivní kontrolu vybrána(vybrány) na základě typu použitého kmene bakterií.

Příkladem vhodné pozitivní kontroly u zkoušky s metabolickou aktivací jsou tyto látky:

Látka	Číslo CAS	Číslo podle EINECS
9,10-dimethylanthracen	781-43-1	212-308-4
7,12-dimethylbenzo[*a*]anthracen	57-97-6	200-359-5
benzo[*a*]pyren	50-32-8	200-028-6
2-aminoanthracen	613-13-8	210-330-9

▼B

Látka	Číslo CAS	Číslo podle EINECS
cyklofosfamid	50-18-0	
cyklofosfamid monohydrát	6055-19-2	200-015-4

Tato látka je vhodnou pozitivní kontrolou pro metodu redukční metabolické aktivace:

Látka	Číslo CAS	Číslo podle EINECS
CI Direct Red 28	573-58-0	209-358-4

2-aminoanthracen by neměl být použit jako jediný indikátor účinnosti směsi S9. Při použití 2-aminoanthracenu by měla být každá šarže S9 charakterizována mutagenem, který vyžaduje metabolickou aktivaci mikrosomálními enzymy, například benzo[a]pyren nebo 7,12-dimethylbenzo[a]anthracen.

Příkladem kmenověspecifické pozitivní kontroly u zkoušky bez vnější metabolické aktivace jsou tyto látky:

Látka	Číslo CAS	Číslo podle EINECS	Kmen
azid sodný	26628-22-8	247-852-1	TA1535 a TA100
2-nitrofluoren	607-57-8	210-138-5	TA98
9-aminoakridin	90-45-9	201-995-6	TA1537, TA97 a TA97a
ICR 191	17070-45-0	241-129-4	TA1537, TA97 a TA97a
kumenhydroperoxid	80-15-9	201-254-7	TA102
mitomycin C	50-07-7	200-008-6	WP2uvrA a TA102
1-methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidin	70-25-7	200-730-1	WP2, WP2 uvrA a WP2 uvrA (pKM101)
4-nitrochinolin-1-oxid	56-57-5	200-281-1	WP2, WP2 uvrA a WP2 uvrA (pKM101)
α[(5-nitro-2-furyl)methyliden]furan-2-acetamid (AF2)	3688-53-7		kmeny obsahující plasmidy

Pro pozitivní kontrolu mohou být použity jiné vhodné referenční látky. Pro pozitivní kontrolu by mělo být vzato v úvahu použití chemických látek ze stejné chemické třídy, jsou-li k dispozici.

Měly by být použity negativní kontroly skládající se ze samotného rozpouštědla nebo vehikula, bez zkoušené látky, zpracované jinak stejným způsobem jako exponované skupiny. Kromě toho by měly být neexponované kontroly použity také tehdy, neexistují-li dosud žádné kontrolní údaje prokazující, že zvolené rozpouštědlo nevyvolává žádné zhoubné nebo mutagenní účinky.

▼B

1.5.3 **Postup**

U standardní miskové metody (1, 2, 3, 4) bez metabolické aktivace se obvykle smíchá 0,05 ml nebo 0,1 ml zkušebních roztoků, 0,1 ml čerstvé bakteriální kultury (obsahující přibližně 10^8 životaschopných buněk) a 0,5 ml sterilního pufru s 2,0 ml vrchního agaru. V případě zkoušky s metabolickou aktivací se obvykle smíchá 0,5 ml metabolické aktivační směsi obsahující přiměřené množství postmitochondriální frakce (v rozmezí 5 až 30 % obj. v metabolické aktivační směsi) s vrchním agarem (2,0 ml) a zároveň s bakteriemi a zkoušenou látkou nebo zkušebním roztokem. Obsah každé zkumavky se promíchá a přelije přes povrch minimálního agaru na misce. Před inkubací se nechá vrchní agar ztuhnout.

U preinkubační metody (2, 3, 5, 6) se zkoušená látka nebo zkoušený roztok před smícháním s vrchním agarem a přelitím přes povrch minimálního agaru na misce obvykle 20 minut nebo déle preinkubuje s testovacím kmenem (obsahujícím přibližně 10^8 životaschopných buněk) a sterilním pufrem nebo metabolickým aktivačním systémem (0,5 ml) při 30–37 °C. Obvykle se smíchá 0,05 nebo 0,1 ml zkoušené látky nebo zkušebního roztoku, 0,1 ml bakterií a 0,5 ml směsi S9 nebo sterilního pufru s 2,0 ml vrchního agaru. Zkumavky by měly být během inkubace provzdušňovány na třepačce.

K dostatečnému odhadu odchylky by měly být při každé úrovni dávky použity 3 misky. Použití dvou misek je přijatelné po vědeckém zdůvodnění. Případná ztráta misky nemusí znamenat znehodnocení zkoušky.

Plynné nebo těkavé látky by měly být zkoušeny vhodnými metodami, např. v těsně uzavřených kultivačních nádobách (12, 14, 15, 16).

1.5.4 **Inkubace**

Všechny misky v dané zkoušce by měly být inkubovány při 37 °C po 48–72 hodinách. Po uplynutí inkubační doby se zjistí počet kolonií revertantů na misku.

2. **ÚDAJE**

2.1 ZPRACOVÁNÍ VÝSLEDKŮ

Předloženými údaji by měly být počty kolonií revertantů připadající na misku. Měl by být rovněž uveden počet kolonií revertantů jak na miskách s negativní kontrolou (kontrola rozpouštědla a případně neexponovaná kontrola), tak na miskách s pozitivní kontrolou. Počty na jednotlivých miskách, střední hodnoty počtu kolonií revertantů na misku a směrodatná odchylka by měly být předloženy pro zkoušenou látku a pozitivní a negativní kontrolu (neexponovanou kontrolu a/nebo kontrolu rozpouštědla).

Ověření jasně pozitivní odpovědi se nepožaduje. Dvojznačné výsledky by měly být vyjasněny dalším zkoušením, nejlépe s úpravami experimentálních podmínek. Negativní výsledky musí být potvrzeny případ od případu. V případech, kdy se nepovažuje potvrzení negativních výsledků za nezbytné, by mělo být podáno zdůvodnění. Změna parametrů studie s cílem rozšířit rozsah posuzovaných podmínek by měla být zvážena v následných experimentech. K parametrům studie, které by mohly být změněny, patří rozmezí koncentrací, metoda zpracování (standardní misková metoda nebo preinkubace v kapalném médiu) a podmínky metabolické aktivace.

▼B

2.2 HODNOCENÍ A INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

Pro stanovení pozitivního výsledku existuje několik kritérií, např. nárůst počtu kolonií revertantů na misku nad testovaný rozsah u alespoň jednoho kmene s metabolickým aktivačním systémem nebo bez něho, a to v závislosti na koncentraci, nebo reprodukovatelný nárůst tohoto počtu pro jednu nebo více koncentrací (23). Nejdříve by měla být uvážena biologická relevance výsledků. Při hodnocení výsledků zkoušky mohou být použity jako pomocný prostředek statistické metody (24). Statistická významnost by neměla být jediným určujícím faktorem pro pozitivní odpověď.

Zkoušená látka, jejíž výsledky nesplňují výše uvedená kritéria, se v tomto systému považuje za nemutagenní.

Ačkoli většina experimentů poskytne jasně pozitivní nebo negativní výsledky, v ojedinělých případech neumožní soubor údajů vyslovit konečný výrok o aktivitě zkoušené látky. Výsledky mohou zůstat dvojznačné nebo sporné bez ohledu na to, kolikrát je experiment opakován.

Pozitivní výsledky zkoušky na reverzní mutace s bakteriemi znamenají, že zkoušená látka indukuje v genomu kmenů *Salmonella typhimurium* a/nebo *Escherichia coli* bodové mutace substitucí bází nebo posunem čtecího rámce. Negativní výsledky znamenají, že zkoušená látka není za podmínek zkoušky pro testovací druhy mutagenní.

3. **ZPRÁVY**

PROTOKOL O ZKOUŠCE

Protokol o zkoušce musí obsahovat tyto informace:

Rozpouštědlo/vehikulum:

— zdůvodnění volby rozpouštědla/vehikula,

— rozpustnost a stálost zkoušené látky v rozpouštědle/vehikulu, je-li známa.

Kmeny:

— použité kmeny,

— počet buněk v kultuře,

— charakteristiky kmene.

Zkušební podmínky:

— množství zkoušené látky na misku (mg/misku nebo µl/misku) s odůvodněním výběru dávky a počtu misek na koncentraci,

— použitá média,

— typ a složení použitého metabolického aktivačního systému, včetně kritérií přijatelnosti,

— postup expozice.

Výsledky:

— známky toxicity,

— známky srážení,

— počty na jednotlivých miskách,

▼B

— střední hodnota počtu kolonií revertantů na misku a směrodatná odchylka,

— podle možnosti závislost odpovědi na dávce,

— případné statistické analýzy,

— údaje o souběžné negativní (rozpouštědlo/vehikulum) a pozitivní kontrole s rozpětími, středními hodnotami a směrodatnými odchylkami,

— dosavadní údaje o negativní (rozpouštědlo/vehikulum) a pozitivní kontrole s rozpětími, středními hodnotami a směrodatnými odchylkami.

Rozbor výsledků.

Závěry.

4. **LITERATURA**

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

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

3) Gatehouse, D., Haworth, S., Cebula, T., Gocke, E., Kier, L., Matsushima, T., Melcion, C., Nohmi, T., Venitt, S. and Zeiger, E. (1994). Recommendations for the Performance of Bacterial Mutation Assays. Mutation Res., 312, 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. and Ray V. (1986). The *Salmonella typhimurium*/Mammalian Microsomal Assay: A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. Mutation Res., 168, 69–240.

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

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

7) Gatehouse, D.G., Rowland, I.R., Wilcox, P., Callender, R.D. and Foster, R. (1980). Bacterial Mutation Assays. In: Basic Mutagenicity Tests: UKEMS Part 1 Revised. Ed. D.J. Kirkland, Cambridge University Press, s. 13–61.

8) Aeschacher, H.U., Wolleb, U. and Porchet, L. (1987). Liquid Preincubation Mutagenicity Test for Foods. J. Food Safety, 8, 167–177.

9) Green, M.H.L., Muriel, W.J. and Bridges, B.A. (1976). Use of a simplified fluctuation test to detect low levels of mutagens. Mutation Res., 38, 33–42.

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

▼B

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

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

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

14) Zeiger, E., Anderson, B.E., Haworth, S., Lawlor, T. and Mortelmans, K. (1992). Salmonella Mutagenicity Tests. V. Results from the Testing of 311 Chemicals. Environ. Mol. Mutagen., 19, 2–141.

15) Simmon, V., Kauhanen, K. and Tardiff, R.G. (1977). Mutagenic Activity of Chemicals Identified in Drinking Water. In Progress in Genetic Toxicology, D. Scott, B. Bridges and F. Sobels (Eds.) Elsevier, Amsterdam, s. 249–258.

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

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

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

19) Wilcox, P., Naidoo, A., Wedd, D.J. and Gatehouse, D.G. (1990). Comparison of *Salmonella typhimurium* TA 102 with *Escherichia coli* WP2 Tester strains. Mutagenesis, 5, 285–291.

20) Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. and Sugimura, T. (1976). A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer or Metabolic Activation Systems. In: „*In Vitro* metabolic Activation in Mutagenesis Testing“ Eds. F.J. de Serres et al. 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. and Wolf, R.C. (1992). Alternatives to Aroclor 1254-induced S9 in *In Vitro* Genotoxicity Assays. Mutagenesis, 7, 175–177.

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

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

▼B

24) Mahon, G.A.T., Green, M.H.L., Middleton, B., Mitchell, I., Robinson, W.D. and Tweats, D.J. (1989). Analysis of Data from Microbial Colony Assays. In: UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Part II. Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. Ed. Kirkland, D.J., Cambridge University Press, s. 28–65.

▼M7

_____

_____

▼M8

B.17 ZKOUŠKA NA GENOVÉ MUTACE V BUŇKÁCH SAVCŮ *IN VITRO* S POUŽITÍM GENŮ HPRT A XPRT

ÚVOD

1. Tato zkušební metoda je rovnocenná Pokynu OECD pro zkoušení (TG) č. 476 (2016). Zkušební metody se pravidelně přezkoumávají s ohledem na vědecký pokrok, měnící se potřeby regulace a dobré životní podmínky zvířat. Současná revidovaná verze zkušební metody B.17 odráží téměř třicet let zkušeností s touto zkouškou a vyplývá také z vývoje samostatné nové metody určené pro zkoušky na genové mutace v buňkách savců *in vitro* s použitím genu thymidinkinázy. Zkušební metoda B.17 je součástí série zkušebních metod v oblasti genetické toxikologie. Byl vypracován dokument, který obsahuje stručné informace o zkoušení v oblasti genetické toxikologie a přehled posledních změn, které OECD provedla ve svých pokynech ke zkoušení genotoxicity (1).

2. Účelem zkoušky na genové mutace v buňkách savců *in vitro* je detekce genových mutací vyvolaných chemickými látkami. Buněčné linie používané při těchto zkouškách měří přímé mutace reportérových genů, a to endogenního hypoxanthin-guaninfosforibosyltransferázového genu (Hprt v buňkách hlodavců, HPRT v lidských buňkách; v této zkušební metodě dále jen společně gen Hprt a zkouška HPRT) a xanthin-guaninfosforibosyltransferázového transgenu (gpt) (dále jen zkouška XPRT). Zkoušky na mutace HPRT a XPRT detekují různé spektrum genetických událostí. Kromě mutací detekovaných zkouškou HPRT (např. substituce párů bází, posunové mutace, malé delece a inserce) může autosomální lokace transgenu gpt umožnit detekci mutací vzniklých z velkých delecí a případně mitotickou rekombinaci nezjištěnou zkouškou HPRT, protože se gen Hprt nachází v chromozomu X (2) (3) (4) (5) (6) (7). Pro účely regulace se zkouška XPRT v současnosti používá méně často než zkouška HPRT.

3. Použité definice jsou uvedeny v dodatku 1.

VÝCHOZÍ ÚVAHY A OMEZENÍ

4. Zkoušky prováděné *in vitro* obecně vyžadují použití vnějšího zdroje metabolické aktivace. Systém exogenní metabolické aktivace zcela nenapodobuje podmínky *in vivo*.

5. Je třeba zabránit vzniku podmínek, které by mohly vést k uměle pozitivním výsledkům (tj. možná interakce se zkušebním systémem), které nejsou způsobeny přímou interakcí mezi zkoušenými chemickými látkami a genetickým materiálem buňky; takové podmínky zahrnují změny pH nebo osmolality (8) (9) (10), interakci se složkami média (11) (12) nebo nadměrné úrovně cytotoxicity (13). Pro zkoušku HPRT se cytotoxicita přesahující doporučené horní úrovně cytotoxicity stanovené v odstavci 19 považuje za nadměrnou.

▼M8

6. Před použitím této zkušební metody ke zkoušení směsi s cílem získat údaje pro zamýšlené regulační účely by mělo být zváženo, zda tato metoda může pro tento účel poskytnout přiměřené výsledky, a pokud ano, proč tomu tak je. Takové posouzení není nutné, pokud existuje právní požadavek na zkoušení dané směsi.

PRINCIP ZKOUŠKY

7. Mutantní buňky s deficientní aktivitou enzymu Hprt při zkoušce HPRT nebo deficientní aktivitou enzymu xprt při zkoušce XPRT jsou rezistentní na cytostatické účinky 6-thioguaninu (TG), což je analog purinů. Buňky produkující Hprt (při zkoušce HPRT) nebo gpt (při zkoušce XPRT) jsou citlivé na TG, což způsobuje inhibici buněčného metabolismu a zastavuje další buněčné dělení. Mutantní buňky jsou tedy schopny proliferace za přítomnosti TG, zatímco normální buňky, které obsahují enzym Hprt (při zkoušce HPRT) nebo enzym gpt (při zkoušce XPRT), tuto schopnost nemají.

8. Buňky v suspenzní nebo jednovrstevné kultuře jsou po vhodnou dobu (3–6 hodin) vystaveny zkoušené chemické látce jak s exogenním zdrojem metabolické aktivace (viz odstavec 14), tak bez něj, a poté subkultivovány za účelem stanovení cytotoxicity a za účelem exprese fenotypu před selekcí mutantů (14), (15), (16), (17). Cytotoxicita se stanoví podle relativního přežití, tj. účinnosti klonování měřené okamžitě po expozici a upravené podle případné ztráty buněk v průběhu expozice v porovnání s negativní kontrolou (odstavec 18 a dodatek 2). Exponované kultury se udržují v růstovém médiu po vhodnou dobu charakteristickou pro každý typ buněk, aby nastala přibližně optimální fenotypová exprese indukovaných mutací (obvykle 7–9 dnů). Po fenotypové expresi se četnost mutantů stanoví tak, že se nasadí známý počet buněk do média obsahujícího selekční činidlo pro detekci mutantních kolonií a do média bez selekčního činidla, aby byla stanovena účinnost klonování (životaschopnost). Po vhodné inkubační době se spočítají kolonie. Četnost mutantů se vypočítá podle počtu mutantních kolonií korigovaného účinností klonování v době selekce mutantů.

POPIS METODY

Přípravky

Buňky

9. Typy buněk použité pro zkoušky HPRT a XPRT by měly vykazovat citlivost k chemickým mutagenům, vysokou klonovací schopnost, stabilní karyotyp a stabilní frekvenci spontánních mutací. Mezi nejčastěji používané buňky pro zkoušku HPRT patří buněčné linie CHO, CHL a V79 křečka čínského, buňky lymfomu L5178Y myší a lymfoblastoidní buňky TK6 člověka (18) (19). Pro zkoušku XPRT se používají buňky AS52 odvozené z vaječníků křečka čínského obsahující transgen gpt (a které mají deletovaný gen Hprt) (20) (21); zkoušku HPRT nelze na buňkách AS52 provést, protože gen hprt je deletován. Použití jiných buněčných linií by mělo být zdůvodněno a validováno.

10. U buněčných linií by se měla pravidelně kontrolovat stabilita modální hodnoty počtu chromozomů a mělo by se zjišťovat, zda nejsou kontaminovány mykoplazmaty (22) (23). Pokud jsou kultury kontaminované nebo se modální hodnota počtu chromozomů změnila, neměly by se dotyčné kultury používat. Měla by být stanovena normální délka buněčného cyklu použitá ve

▼M8

zkušební laboratoři, která by měla být v souladu s buněčnými charakteristikami uvedenými v literatuře. Rovněž by měla být zkontrolována spontánní četnost mutací v zásobě základních buněk, a pokud četnost mutantů není přijatelná, zásoba by se neměla používat.

11. Před použitím v této zkoušce může být nezbytné odstranit z kultury již přítomné mutantní buňky, např. kultivací v médiu HAT pro zkoušku HPRT a v médiu MPA pro zkoušku XPRT (5) (24) (viz dodatek 1). Vyčištěné buňky mohou být uchovávány zmrazené a po rozmrazení použity jako pracovní zásoby. Právě rozmrazená pracovní zásoba může být použita pro zkoušku po dosažení normální rychlosti rozmnožování. Při provádění zkoušky XPRT by měla být rutinní kultura buněk AS52 použita za podmínek, které zajišťují zachování transgenu gpt (20).

Média a podmínky kultivace

12. Pro udržování kultur by mělo být použito vhodné kultivační médium a inkubační podmínky (kultivační nádoby, zvlhčená atmosféra s 5 % CO_2, inkubační teplota 37 °C). Buněčné kultury by měly být vždy uchovávány za podmínek, při nichž je zajištěn jejich logaritmický růst. Je zvláště důležité, aby byly média a podmínky kultivace zvoleny tak, aby byl zajištěn optimální růst buněk během období exprese a optimální účinnost klonování jak mutovaných, tak nemutovaných buněk.

Příprava kultur

13. Buněčné linie se pomnoží z kmenových kultur, nasadí se do kultivačního média v takové hustotě, aby u buněk v suspenzích nebo v monovrstvách pokračoval exponenciální růst v průběhu doby expozice a exprese (např. mělo by se zamezit konfluenci u buněk rostoucích v monovrstvách).

Metabolická aktivace

14. Při použití buněk, které mají nedostatečnou endogenní metabolickou schopnost, by se měly použít exogenní metabolizující systémy. Nejčastěji používaným systémem, který je standardně doporučován, pokud není zdůvodněno použití jiného systému, je kofaktorem dotovaná postmitochondriální frakce (S9) připravená z jater hlodavců (zpravidla potkanů) zpracovaná činidlem indukujícím enzymy, jako je Aroclor 1254 (25) (26) (27) (28), nebo směsí fenobarbitalu a β-naftoflavonu (29) (30) (31) (32). Uvedená směs není v rozporu se Stockholmskou úmluvou o perzistentních organických znečišťujících látkách (33) a bylo prokázáno, že je stejně účinná jako Aroclor 1254 pro indukování oxidáz se smíšenou funkcí (29) (31). Frakce S9 je v konečném testovacím médiu obvykle používána v koncentracích od 1 % do 2 % obj., avšak koncentraci je možné zvýšit do 10 %. Volbu oprávněného typu a koncentrace systému exogenní metabolické aktivace nebo metabolického induktoru, který se použije, může ovlivnit třída zkoušených látek (34) (35) (36).

Příprava zkoušené chemické látky

15. Pevné zkoušené chemické látky by měly být před aplikací na buňky rozpuštěny ve vhodných rozpouštědlech a popřípadě zředěny (viz odstavec 16). Kapalné látky lze přidat přímo do zkušebních systémů a/nebo je lze před použitím k ošetření zkušebních systémů zředit. Plynné a těkavé zkoušené chemické látky by se měly zkoušet za použití vhodně upravených standardních protokolů, například prostřednictvím ošetření buněk v neprodyšně uzavřených kultivačních nádobách (37) (38). Měly by se používat čerstvě připravené zkoušené látky, pokud údaje o stálosti neprokazují možnost skladování.

▼M8

ZKUŠEBNÍ PODMÍNKY

Rozpouštědla

16. Rozpouštědlo by mělo být zvoleno tak, aby optimalizovalo rozpustnost zkoušené chemické látky, aniž by nepříznivě ovlivnilo provádění zkoušky, např. měnilo růst buněk, ovlivňovalo integritu zkoušené chemické látky, reagovalo s kultivačními nádobami, narušovalo systém metabolické aktivace. Doporučuje se pokud možno nejprve zvážit použití vodného rozpouštědla (nebo kultivačního média). Dobře zavedenými rozpouštědly jsou například voda a dimethylsulfoxid. Podíl organických rozpouštědel by zpravidla neměl být větší než 1 % obj. a podíl vodných rozpouštědel (fyziologického roztoku nebo vody) v konečném expozičním médiu by neměl být větší než 10 % obj. Jsou-li použita jiná než osvědčená rozpouštědla (např. ethanol nebo aceton), mělo by být jejich použití podloženo údaji o jejich kompatibilitě se zkoušenými chemickými látkami a zkušebním systémem a o tom, že nejsou v použité koncentraci genotoxické. Pokud takové podpůrné údaje neexistují, je důležité přidat neexponované kontroly (viz dodatek 1) prokazující, že zvolené rozpouštědlo nevyvolává žádné škodlivé nebo mutagenní účinky.

Měření cytotoxicity a volba expozičních koncentrací

17. Při stanovení nejvyšší koncentrace zkoušené chemické látky by neměly být použity koncentrace, které jsou schopny vyvolat falešnou pozitivní odezvu, jako např. koncentrace, jež vyvolávají nadměrnou cytotoxicitu (viz odstavec 20), srážení kultivačního média (viz odstavec 21) nebo zřetelné změny pH nebo osmolality (viz odstavec 5). Pokud zkoušená chemická látka v době jejího přidání způsobuje zřetelnou změnu hodnoty pH média, lze pH upravit pufrováním konečného expozičního média tak, aby nedošlo k falešným pozitivním výsledkům a aby byly zachovány vhodné kultivační podmínky.

18. Volba koncentrace vychází z cytotoxicity a dalších faktorů (viz odstavce 20–22). Přestože hodnocení cytotoxicity při předběžné zkoušce může být užitečné a může napomoci k lepšímu určení koncentrací, jež mají být použity při hlavní zkoušce, předběžná zkouška není vyžadována. I v případě, že se provede předběžné hodnocení cytotoxicity, je při hlavním experimentu přesto požadováno měření cytotoxicity pro každou kulturu. Cytotoxicita by se měla hodnotit podle relativního přežití, tj. podle účinnosti klonování buněk umístěných na destičky okamžitě po expozici upravené podle případné ztráty buněk v průběhu expozice, a to podle počtu buněk, v porovnání s upravenou účinností klonování u negativních kontrol (s přiřazeným přežitím 100 %) (viz dodatek 2, kde je uveden vzorec).

19. Měly by se vyhodnotit nejméně čtyři zkušební koncentrace (nepočítaje v to kontroly s rozpouštědlem a pozitivní kontroly), které splňují kritéria přijatelnosti (vhodná cytotoxicita, počet buněk atd.). I když se doporučuje použít duplicitní kultury, lze pro každou zkušební koncentraci použít repliky nebo jednu exponovanou kulturu. Výsledky získané z duplicitních nezávislých kultur při dané koncentraci by měly být vykazovány samostatně, ale pro účely analýzy údajů je lze sloučit (17). U zkoušených látek, jež vykazují malou cytotoxicitu nebo nevykazují žádnou cytotoxicitu, budou obvykle vhodné přibližně dvojnásobné až trojnásobné intervaly koncentrací. V případě cytotoxicity by měly zvolené zkušební koncentrace pokrývat rozpětí od koncentrace vyvolávající cytotoxicitu po koncentrace, při nichž dochází ke střední a nízké cytotoxicitě nebo nedochází k žádné cytotoxicitě. Mnohé

▼M8

zkoušené chemické látky vykazují strmé křivky závislosti účinku na koncentraci, a aby bylo možné postihnout celý rozsah cytotoxicity nebo podrobně studovat závislost účinku na koncentraci, může být nezbytné zvolit menší rozdíly mezi jednotlivými koncentracemi a více než čtyři koncentrace, zejména v situacích, kdy je požadován opakovaný experiment (viz odstavec 43). Použití více než 4 koncentrací může být zvláště důležité, když se používá jedna kultura.

20. Je-li maximální koncentrace odvozena od cytotoxicity, měla by být nejvyšší koncentrace zvolena tak, aby se dosáhlo relativního přežití mezi 20 a 10 %. Je třeba dbát na to, aby byly interpretovány pouze ty pozitivní výsledky, které jsou vykazovány při relativním přežití 10 % nebo méně (odstavec 43).

21. V případě špatně rozpustných zkoušených chemických látek, které nejsou cytotoxické při koncentracích nižších, než je jejich rozpustnost, by nejvyšší analyzovaná koncentrace měla na konci expozice zkoušené chemické látce vyvolat zákal nebo sraženinu viditelnou pouhým okem nebo pomocí inverzního mikroskopu. Dokonce i v případech, kdy k výskytu cytotoxicity dochází při koncentracích vyšších, než je rozpustnost, se doporučuje testovat pouze při jedné koncentraci vyvolávající zákal nebo viditelné sraženiny, neboť sraženina může vést k falešným účinkům. Při koncentraci, kdy vzniká sraženina, je třeba dbát na to, aby sraženina nemohla ovlivňovat provádění zkoušky. Užitečné může být stanovit rozpustnost v kultivačním médiu před pokusem.

22. Není-li pozorována sraženina nebo omezení cytotoxicity, měla by největší zkušební koncentrace odpovídat 10 mM, 2 mg/ml nebo 2 μl/ml, podle toho, která z uvedených hodnot je nejnižší (39) (40). Pokud u zkoušené chemické látky není stanoveno její složení, např. u látek s neznámým nebo proměnlivým složením, komplexních reakčních produktů nebo biologického materiálu (tj. chemické látky s neznámým nebo proměnlivým složením, (UVCB)) (41), přírodních extraktů atd., bude možná muset být při nedostatečné cytotoxicitě nejvyšší koncentrace vyšší (např. 5 mg/ml), aby se zvýšila koncentrace každé ze složek. Je však třeba poznamenat, že u humánních léčivých přípravků se tyto požadavky mohou lišit (42).

Kontroly

23. V okamžiku každého odběru by měly být použity souběžné negativní kontroly (viz odstavec 16) skládající se ze samotného rozpouštědla v kultivačním médiu, s nimiž se zachází stejným způsobem jako s exponovanými kulturami.

24. Souběžné pozitivní kontroly jsou nutné pro prokázání schopnosti laboratoře identifikovat mutageny za daných experimentálních podmínek a případně pro prokázání účinnosti exogenního systému metabolické aktivace. Příklady pozitivních kontrol jsou uvedeny v tabulce 1 níže. V odůvodněných případech mohou být k pozitivní kontrole použity jiné látky. Jelikož jsou zkoušky na buňkách savců *in vitro* za účelem stanovení genetické toxicity dostatečně standardizovány, mohou být provedeny zkoušky s použitím expozice s exogenní metabolickou aktivací a bez exogenní metabolické aktivace za použití pouze pozitivní kontroly vyžadující metabolickou aktivaci. V tomto případě tato reakce jediné pozitivní kontroly prokáže činnost systému metabolické aktivace i citlivost zkušebního systému. Každá pozitivní kontrola by měla být použita při jedné nebo více koncentracích, u nichž se očekává, že poskytnou reprodukovatelný a detekovatelný nárůst oproti pozadí, čímž se prokáže citlivost testovacího systému, a reakce by neměla být narušena cytotoxicitou přesahující limitní hodnoty stanovené v této zkušební metodě (viz odstavec 20).

▼M8

Tabulka 1

Referenční látky doporučené pro posouzení způsobilosti laboratoře a pro výběr pozitivních kontrol

Stav metabolické aktivace	Lokus	Látka a číslo CAS
Bez vnější metabolické aktivace	*Hprt*	ethyl-methansulfonát [CAS č. 62-50-0] 1-ethyl-1-nitrosomočovina [CAS č. 759-73-9] 4-nitrochinolin-1-oxid [CAS č. 56-57-5]
	xprt	streptonigrin [CAS č. 3930-19-6] mitomycin C [CAS č. 50-07-7]
S vnější metabolickou aktivací	*Hprt*	3-methylcholanthren [CAS č. 56-49-5] 7,12-dimethylbenzoanthracen [CAS č. 57-97-6] Benzo[e]pyren [CAS č. 50-32-8]
	xprt	Benzo[e]pyren [CAS č. 50-32-8]

POSTUP

Expozice zkoušené chemické látce

25. Proliferující buňky se vystaví zkoušené chemické látce jak za přítomnosti metabolického aktivačního systému, tak bez něho. Expozice by měla trvat vhodnou dobu (obvykle je postačující doba 3 až 6 hodin).

26. Minimální počet buněk použitých pro každou zkušební (kontrolní a exponovanou) kulturu v každém stádiu zkoušky by měl vycházet z četnosti spontánních mutací. Obecným pravidlem je exponovat a pasážovat dostatečný počet buněk, aby bylo v každé kultuře uchováno v každé fázi zkoušky 10 spontánních mutantů (17). Četnost spontánních mutací obvykle činí 5 až 20×10^{-6}. Aby byl při četnosti spontánních mutací 5×10^{-6} uchován dostatečný počet spontánních mutantů (10 nebo více) i v kulturách exponovaných při koncentracích, které vyvolávají při expozici 90 % cytotoxicitu (10 % relativní přežití), bylo by nutné exponovat alespoň 20×10^{6} buněk. Kromě toho musí být v období exprese kultivován a umístěn na destičky pro výběr mutantů dostatečný počet buněk (nikdy však méně než 2 miliony) (17).

Doba exprese fenotypu a měření četnosti mutací

27. Na konci doby expozice se buňky kultivují za účelem umožnění exprese fenotypu mutanta. Obecně postačí minimálně 7 až 9 dnů, aby došlo k přibližně optimální fenotypové expresi nově indukovaných mutantů Hprt a xprt (43) (44). Během této doby jsou buňky pravidelně subkultivovány, aby se udržely ve fázi exponenciálního růstu. Po fenotypové expresi jsou buňky opět kultivovány v médiu se selekčním činidlem (6-thioguanin) a bez něj za účelem stanovení počtu mutantů, respektive účinnosti klonování v době selekce. Tato kultivace může být provedena pomocí misek u kultur v monovrstvách nebo pomocí mikrotitračních destiček u buněk v suspenzi. Pro selekci mutantů je třeba buňky kultivovat v takové hustotě, aby byla zajištěna optimální obnova mutací (tj. aby nedošlo k metabolické kooperaci) (17). Destičky se inkubují po dobu vhodnou pro optimální růst kolonii (např. 7–12 dnů) a kolonie se spočítají. Četnost mutantů se vypočítá podle počtu mutantních kolonií korigovaného účinností klonování v době selekce mutantů (viz dodatek 2, kde jsou uvedeny vzorce).

▼M8

Způsobilost laboratoře

28. Aby bylo možné před zahájením rutinního zkoušení zjistit, zda laboratoř má s danou zkouškou dostatečné zkušenosti, měla by provést sérii experimentů s referenčními pozitivními látkami, jež působí prostřednictvím různých mechanismů (alespoň s jednou látkou účinnou s metabolickou aktivací a jednou účinnou bez metabolické aktivace, které se vyberou ze seznamu látek uvedeného v tabulce 1), a s různými negativními kontrolami (s použitím různých rozpouštědel/vehikul). Odezvy těchto pozitivních a negativních kontrol by měly být v souladu s odbornou literaturou. Tento požadavek neplatí pro laboratoře, které tuto zkušenost mají, tj. které mají k dispozici databázi historických údajů, jak je definována v odstavcích 30 až 33.

29. Výběr z látek pro pozitivní kontroly (viz tabulka 1 v odstavci 25) by měl být zkoumán bez metabolické aktivace a s metabolickou aktivací, aby byla prokázána způsobilost pro detekci mutagenních chemických látek, stanovení účinnosti systému metabolické aktivace a prokázání vhodnosti podmínek pro růst buněk v průběhu expozice, fenotypovou expresi a selekci mutantů a postupů hodnocení. Rozsah koncentrací by u vybraných látek měl být zvolen tak, aby poskytl opakovatelná zvýšení účinku v závislosti na dávce nad úroveň pozadí, aby se tak prokázala citlivost a dynamické rozpětí testovacího systému.

Historické kontrolní údaje

30. Laboratoř by měla stanovit:

— historické rozmezí a distribuci pozitivních kontrol,

— historické rozmezí a distribuci negativních kontrol (neexponovaných, s rozpouštědlem).

31. Při prvním získávání údajů o historické distribuci negativních kontrol by měly být výsledky souběžných negativních kontrol v souladu s publikovanými kontrolními údaji (22). S tím, jak je do distribuce kontrol přidáváno více údajů z experimentů, měly by být souběžné negativní kontroly v ideálním případě uvnitř 95 % kontrolních limitů této distribuce (17) (45) (46).

32. Nejprve by měla být vybudována historická databáze negativních kontrol dané laboratoře na základě nejméně 10 experimentů, avšak raději by měla zahrnovat nejméně 20 experimentů provedených za srovnatelných zkušebních podmínek. V laboratořích by měly být uplatňovány metody kontroly kvality, jako např. regulační diagramy (např. C-diagramy nebo diagramy X s pruhem (47)), z nichž je patrné, jak proměnlivé jsou jejich údaje o pozitivních a negativních kontrolách a že metodika je v dané laboratoři „pod kontrolou“ (46). Další doporučení, jak získat a používat historické údaje (tj. kritéria pro zařazení údajů do historické databáze a jejich vyřazení a kritéria přijatelnosti pro daný experiment), lze najít v literatuře (45).

33. Údaje o negativních kontrolách by měly zahrnovat četnost mutací z jedné kultury nebo raději z replikovaných kultur, jak je popsáno v odstavci 23. Výsledky souběžných negativních kontrol by v ideálním případě měly spadat mezi 95 % kontrolních limitů distribuce v historické databázi negativních kontrol laboratoře (17) (45) (46). Pokud jsou údaje ze souběžných negativních kontrol mimo 95 % rozmezí, může být přijatelné je zahrnout do dosavadní distribuce kontrol, pokud tyto údaje nejsou mimořádně odlehlé a pokud existují důkazy o tom, že testovací systém je „pod kontrolou“ (viz výše), a důkazy o tom, že nedošlo k technické nebo lidské chybě.

▼M8

34. Jakékoli změny zkušebního protokolu by měly být zvažovány z hlediska jejich souladu se stávající historickou kontrolní databází laboratoře. Jakýkoli větší rozdíl ve zkušebním protokolu by měl vést k zavedení nové historické kontrolní databáze.

ÚDAJE A PŘEDKLÁDÁNÍ ZPRÁV

Vyjádření výsledků

35. Předložené výsledky by měly zahrnovat všechny údaje potřebné k výpočtu cytotoxicity (vyjádřené jako relativní přežití). Údaje za exponované i kontrolní kultury by měly zahrnovat počet buněk na konci expozice, počet buněk umístěných na destičky okamžitě po expozici a počet kolonií (nebo počet jamek bez kolonií u mikrotitrační metody). Relativní přežití u každé kultury by mělo být vyjádřeno jako procento ve vztahu k souběžné kontrole s rozpouštědlem (viz dodatek 1, kde jsou uvedeny definice).

36. Předložené výsledky by měly zahrnovat také všechny údaje potřebné k výpočtu četnosti mutací. Údaje za exponované i kontrolní kultury by měly zahrnovat: 1) počet buněk umístěných na destičky se selekčním činidlem a bez něj (v době, kdy jsou buňky umístěny na destičky pro selekci mutantů) a 2) počet spočtených kolonií (nebo počet jamek bez kolonií u mikrotitrační metody) z destiček se selekčním činitelem a bez něj. Četnost mutací se vypočítá podle počtu mutantních kolonií (na destičkách se selekčním činidlem) korigovaného účinností klonování (z destiček bez selekčního činidla). Četnost mutací by měla být vyjádřena jako počet mutantů na milion životaschopných buněk (viz dodatek 1, kde jsou uvedeny definice).

37. Měly by se uvést údaje za jednotlivé kultury. Kromě toho se všechny údaje shrnou do tabulky.

Kritéria přijatelnosti

38. Přijetí zkoušky je založeno na následujících kritériích:

— souběžná negativní kontrola je považována za přijatelnou pro přidání do historické databáze negativních kontrol laboratoře, jak je popsáno v odstavci 33,

— souběžné pozitivní kontroly (viz odstavec 24) by měly vyvolat odezvy, které jsou slučitelné s odezvami uvedenými v historické databázi pozitivních kontrol, a měly by vyvolat statisticky významný nárůst v porovnání se souběžnou negativní kontrolou,

— test se provede při dvou experimentálních uspořádáních (tj. s metabolickou aktivací a bez ní), pokud jedno z nich nevedlo k pozitivním výsledkům (viz odstavec 25),

— analyzovatelný je adekvátní počet buněk a koncentrací (odstavce 25, 26 a 19),

— kritéria pro výběr nejvyšší koncentrace jsou v souladu s kritérii popsanými v odstavcích 20, 21 a 22.

Hodnocení a interpretace výsledků

39. Za předpokladu, že všechna kritéria přijatelnosti byla splněna, lze zkoušenou chemickou látku považovat za jasně pozitivní, pokud v některé ze zkoumaných experimentálních uspořádání:

▼M8

— alespoň jedna ze zkušebních koncentrací vykazuje statisticky významný nárůst v porovnání se souběžnou negativní kontrolou,

— hodnocení pomocí vhodného trend-testu ukáže závislost tohoto nárůstu na koncentraci,

— všechny výsledky jsou mimo distribuci historických údajů o negativních kontrolách (např. mimo 95 % rozmezí dle Poissonova rozdělení, viz odstavec 33).

Jsou-li splněna všechna tato kritéria, má se za to, že zkoušená chemická látka je schopna vyvolávat mutace genů v kultivovaných savčích buňkách v tomto testovacím systému. Doporučení ohledně nejvhodnějších statistických metod lze najít v literatuře (46) (48).

40. Za předpokladu, že všechna kritéria přijatelnosti byla splněna, je zkoušená chemická látka považována za jasně negativní, pokud ve všech zkoumaných zkušebních podmínkách:

— žádná ze zkušebních koncentrací nevykazuje statisticky významný nárůst v porovnání se souběžnou negativní kontrolou,

— hodnocení pomocí vhodného trend-testu ukáže, že nedochází k nárůstu účinku v závislosti na koncentraci,

— všechny výsledky spadají do rámce distribuce historických údajů o negativních kontrolách (např. 95 % rozmezí dle Poissonova rozdělení, viz odstavec 33).

Pak se má za to, že zkoušená chemická látka není schopna vyvolávat mutace genů v kultivovaných savčích buňkách v tomto testovacím systému.

41. Ověření jasně pozitivní či jasně negativní odezvy není nutné.

42. V případech, kdy odezva není ani jasně negativní, ani jasně pozitivní, jak je popsáno výše, nebo s cílem napomoci při stanovení biologického významu výsledku, by měly být údaje vyhodnoceny na základě odborného posouzení a/nebo dalším šetřením. Užitečné by mohlo být provedení opakovaného experimentu, případně za použití upravených zkušebních podmínek (např. rozsah koncentrací, jiné podmínky metabolické aktivace (např. koncentrace S9 nebo původ S9).

43. Ve vzácných případech ani po dalším šetření nebude možné na základě daného souboru údajů dospět k závěru o pozitivitě či negativitě výsledku. Proto by měl být učiněn závěr, že odezva na zkoumanou chemickou látku je neurčitá (interpretováno jako stejná pravděpodobnost pozitivní nebo negativní odezvy).

Závěrečná Zpráva

44. Závěrečná zpráva by měla obsahovat tyto informace:

Zkoušená chemická látka:

— zdroj, číslo šarže a je-li k dispozici, datum použitelnosti,

— stabilita zkoušené chemické látky samotné, je-li známa,

— rozpustnost a stabilita zkoušené chemické látky v rozpouštědle, jsou-li známy,

— měření pH, případně osmolality a sraženiny v kultivačním médiu, do něhož byla přidána zkoušená chemická látka.

▼**M8**

Jednosložková látka:

— fyzický vzhled, rozpustnost ve vodě a další relevantní fyzikálně-chemické vlastnosti,

— chemická identifikace, např. název podle IUPAC nebo CAS, číslo CAS, kód SMILES nebo InChI, strukturní vzorec, čistota, případně chemická identita nečistot, je-li to prakticky možné, atd.

Vícesložková látka, látka s neznámým nebo proměnlivým složením, komplexní reakční produkt nebo biologický materiál a směsi:

— charakterizované v co možná nejvyšší míře chemickou identitou (viz výše), kvantitativním výskytem a relevantními fyzikálně-chemickými vlastnostmi složek.

Rozpouštědlo:

— zdůvodnění volby rozpouštědla,

— procentuální podíl rozpouštědla v konečném kultivačním médiu.

Buňky:

Pro základní laboratorní kultury:

— druh a zdroj buněčných linií,

— počet pasáží, je-li k dispozici, a historie v laboratoři,

— vlastnosti karyotypu a/nebo modální hodnota počtu chromozomů,

— metody udržování buněčných kultur,

— nepřítomnost mykoplasmat,

— doby zdvojnásobení buněk.

Zkušební podmínky:

— odůvodnění výběru koncentrací a počtu kultur, včetně např. údajů o cytotoxicitě a mezích rozpustnosti,

— složení média, koncentrace CO_2, vlhkost,

— koncentrace zkoušené chemické látky vyjádřená jako konečná koncentrace v kultivačním médiu (např. v μg nebo mg/ml nebo mM kultivačního média),

— koncentrace (a/nebo objem) rozpouštědla a zkoušené chemické látky přidaných do kultivačního média,

— inkubační teplota,

— inkubační doba,

— trvání expozice,

— hustota buněk během expozice,

— typ a složení použitého metabolického aktivačního systému (zdroj S9, metoda přípravy

— směsi S9, koncentrace nebo objem směsi S9 a S9 v konečném kultivačním médiu, kontroly jakosti S9),

— látky použité v pozitivních a negativních kontrolách, konečné koncentrace pro jednotlivé podmínky expozice,

▼**M8**

— délka doby exprese (případně včetně počtu nasazených buněk, subkultur a výměny média),

— identifikace selekčního činidla a jeho koncentrace,

— kritéria přijatelnosti zkoušek,

— metody použité k počítání životaschopných a mutantních buněk;

— metody použité pro měření cytotoxicity,

— jakékoli doplňkové informace týkající se cytotoxicity a použité metody,

— délka inkubace po umístění na destičky;

— kritéria klasifikace studie na pozitivní, negativní nebo neurčitou;

— metody použité ke stanovení pH, osmolality a sraženiny.

Výsledky:

— počet exponovaných buněk a počet subkultivovaných buněk v každé kultuře,

— měření cytotoxicity, případně další pozorování,

— známky srážení a čas jejich stanovení,

— počet buněk kultivovaných v selektivním a neselektivním médiu;

— počet kolonií v neselektivním médiu a počet rezistentních kolonií v selektivním médiu a související četnosti mutací,

— závislost účinku na koncentraci, pokud je to možné,

— údaje o souběžných negativních kontrolách (rozpouštědlo) a pozitivních kontrolách (koncentrace a rozpouštědla),

— historické údaje o negativních (rozpouštědlo) a pozitivních kontrolách s rozpětími, středními hodnotami a směrodatnými odchylkami a interval spolehlivosti (např. 95 %) a rovněž počet údajů,

— statistické analýzy (pro jednotlivé kultury, případně spojené repliky) a případné p hodnoty.

Diskuse o výsledcích.

Závěr

LITERATURA

(1) OECD (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, No. Series on Testing and Assessment, No 234, OECD, Paris.

(2) Moore M.M., DeMarini D.M., DeSerres F.J. and Tindall, K.R. (Eds.) (1987). Banbury Report 28: Mammalian Cell Mutagenesis, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, New York.

▼**M8**

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

(4) Moore M.M., Harrington-Brock K., Doerr C.L. and Dearfield K.L. (1989). Differential Mutant Quantitation at the Mouse Lymphoma TK and CHO HGPRT Loci. Mutagen. Res., 4, 394-403.

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

(6) Aaron C.S., Bolcsfoldi G., Glatt H.R., Moore M., Nishi Y., Stankowski L., Theiss J. and 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, 235-239.

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

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

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

(10) Brusick D. (1986). Genotoxic Effects in Cultured Mammalian Cells Produced by Low pH Treatment Conditions and Increased Ion concentrations, Environ. Mutagen., 8, 789-886.

(11) Nesslany F., Simar-Meintieres S., Watzinger M., Talahari I. and Marzin D. (2008). Characterization of the Genotoxicity of Nitrilotriacetic Acid. Environ. Mol. Mutation Res., 49, 439-452.

(12) Long L.H., Kirkland D., Whitwell J. and Halliwell B. (2007). Different Cytotoxic and Clastogenic Effects of Epigallocatechin Gallate in Various Cell-Culture Media Due to Variable Rates of its Oxidation in the Culture Medium, Mutation Res., 634, 177-183.

(13) Kirkland D., Aardema M., Henderson L., and Müller L. (2005). Evaluation of the Ability of a Battery of Three *In Vitro* Genotoxicity Tests to Discriminate Rodent Carcinogens and Non-Carcinogens. I: Sensitivity, Specificity and Relative Predictivity. Mutation Res., 5841-256.

(14) Li A.P., Carver J.H., Choy W.N., Hsie A.W., Gupta R.S., Loveday K.S., O'Neill J.P., Riddle J.C., Stankowski L.F. Jr. and Yang L.L. (1987). A Guide for the Performance of the Chinese Hamster Ovary Cell/Hypoxanthine-Guanine Phosphoribosyl Transferase Gene Mutation Assay. Mutation Res., 189, 135-141.

(15) Liber H.L., Yandell D.W. and 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, 9-17.

(16) Stankowski L.F. Jr., Tindall K.R. and Hsie A.W. (1986). Quantitative and Molecular Analyses of Ethyl Methanesulfonate- and ICR 191-Induced Molecular Analyses of Ethyl Methanesulfonate- and ICR 191-Induced Mutation in AS52 Cells. Mutation Res., 160, 133-147.

▼**M8**

(17) Arlett C.F., Smith D.M., Clarke G.M., Green M.H.L., Cole J., McGregor D.B. and Asquith J.C. (1989). Mammalian Cell Gene Mutation Assays Based upon Colony Formation. In: Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data, Kirkland, D.J. (Eds.), CambridgeUniversity Press, pp. 66-101.

(18) Hsie A.W., Casciano D.A., Couch D.B., Krahn D.F., O'Neill J.P., and Whitfield B.L. (1981). The Use of Chinese Hamster Ovary Cells to Quantify Specific Locus Mutation and to Determine Mutagenicity of Chemicals; a Report of the Gene-Tox Program, Mutation Res., 86, 193-214.

(19) Li A.P. (1981). Simplification of the CHO/HGPRT Mutation Assay Through the Growth of Chinese Hamster Ovary Cells as Unattached Cultures, Mutation Res., 85, 165-175.

(20) Tindall K.R., Stankowski Jr., L.F., Machanoff R., and Hsie A.W. (1984). Detection of Deletion Mutations in pSV2*gpt*-Transformed Cells, Mol. Cell. Biol., 4, 1411-1415.

(21) Hsie A. W., Recio L., Katz D. S., Lee C. Q., Wagner M., and Schenley R. L. (1986). Evidence for Reactive Oxygen Species Inducing Mutations in Mammalian Cells. Proc Natl Acad Sci., 83(24):9616–9620.

(22) Lorge E., Moore M., Clements J., Donovan M. O., Honma M., Kohara A., Van Benthem J., Galloway S., Armstrong M.J., Thybaud V., Gollapudi B., Aardema M., Kim J., Sutter A., Kirkland D.J. (2015). Standardized Cell Sources and Recommendations for Good Cell Culture Practices in Genotoxicity Testing. (Manuscript in preparation).

(23) Coecke S., Balls M., Bowe G., Davis J., Gstraunthaler G., Hartung T., Hay R., Merten O.W., Price A., Schechtman L., Stacey G. and Stokes W. (2005). Guidance on Good Cell Culture Practice. A Report of the Second ECVAM Task Force on Good Cell Culture Practice, ATLA, 33, 261-287.

(24) Rosen M.P., San R.H.C. and Stich H.F. (1980). Mutagenic Activity of Ascorbate in Mammalian Cell Cultures, Can. Lett. 8, 299-305.

(25) Natarajan A.T., Tates A.D, Van Buul P.P.W., Meijers M. and de Vogel N. (1976). Cytogenetic Effects of Mutagens/Carcinogens after Activation in a Microsomal System *In Vitro*, I. Induction of Chromosomal Aberrations and Sister Chromatid Exchanges by Diethylnitrosamine (DEN) and Dimethylnitrosamine (DMN) in CHO Cells in the Presence of Rat-Liver Microsomes. Mutation Res., 37, 83-90.

(26) Abbondandolo A., Bonatti S., Corti G., Fiorio R., Loprieno N. and Mazzaccaro A. (1977). Induction of 6-Thioguanine-Resistant Mutants in V79 Chinese Hamster Cells by Mouse-Liver Microsome-Activated Dimethylnitrosamine. Mutation Res., 46, 365-373.

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

(28) Maron D.M. and Ames B.N. (1983). Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test. Mutation Res., 113, 173, 215.

(29) Elliott B.M., Combes R.D., Elcombe C.R., Gatehouse D.G., Gibson G.G., Mackay J.M. and Wolf R.C. (1992) Alternatives to Aroclor 1254-Induced S9 in *In Vitro* Genotoxicity Assays. Mutagen. 7, 175-177.

(30) Matsushima T., Sawamura M., Hara K. and Sugimura T. (1976). A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls 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. and Philpot R.M. (Eds), Elsevier, North-Holland, pp. 85-88.

▼**M8**

(31) Ong T.-m., Mukhtar M., Wolf C.R. and Zeiger E. (1980). Differential Effects of Cytochrome P450-Inducers on Promutagen Activation Capabilities and Enzymatic Activities of S-9 from Rat Liver, J. Environ. Pathol. *Toxicol*., 4, 55-65.

(32) Johnson T.E., Umbenhauer D.R. and Galloway S.M. (1996). Human Liver S-9 Metabolic Activation: Proficiency in Cytogenetic Assays and Comparison with Phenobarbital/beta-Naphthoflavone or Aroclor 1254 Induced Rat S-9, Environ. Mol. Mutagen., 28, 51-59.

(33) UNEP. (2001). Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants, United Nations Environment Programme (UNEP). Dostupné na internetových stránkách: [http://www.pops.int.html].

(34) Tan E.-L. and Hsie A.W. (1981). Effect of Calcium Phosphate and Alumina Cγ Gels on the Mutagenicity and Cytotoxicity of Dimethylnitrosamine as Studied in the CHO/HGPRT System. Mutation Res., 84, 147-156.

(35) O'Neill J.P., Machanoff R., San Sebastian J.R., Hsie A.W. (1982). Cytotoxicity and Mutagenicity of Dimethylnitrosamine in Cammalian Cells (CHO/HGPRT system): Enhancement by Calcium Phosphate. Environ. Mol. Mutation., 4, 7-18.

(36) Li, A.P. (1984). Use of Aroclor 1254-Induced Rat Liver Homogenate in the Assaying of Promutagens in Chinese Hamster Ovary Cells. Environ. Mol. Mutation, 4, 7-18.

(37) Krahn D.F., Barsky F.C. and 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, pp. 91–103.

(38) Zamora P.O., Benson J.M., Li A.P. and 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. Environ. Mutagen. 5, 795-801.

(39) OECD (2014). Document Supporting the WNT Decision to Implement Revised Criteria for the Selection of the Top Concentration in the *In Vitro* Mammalian Cell Assays on Genotoxicity (Test Guidelines 473, 476 and 487). K dispozici na požádání u Organizace pro hospodářskou spolupráci a rozvoj.

(40) Brookmire L., Chen J.J. and Levy D.D. (2013). Evaluation of the Highest Concentrations Used in the *In Vitro* Chromosome Aberrations Assay, Environ. Mol. Mutation, 54, 36-43.

(41) EPA, Office of Chemical Safety and Pollution Prevention. (2011). Chemical Substances of Unknown or Variable Composition, Complex Reaction Products and Biological Materials: UVCB Substances,

(42) USFDA (2012). International Conference on Harmonisation (ICH) Guidance S2 (R1) on Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended for Human Use. Dostupné na internetových stránkách: [https://federalregister.gov/a/2012-13774].

(43) O'Neill J.P. and Hsie A.W. (1979). Phenotypic Expression Time of Mutagen-Induced 6-thioguranine resistance in Chinese hamster ovary cells (CHO/HGPRT system), Mutation, Res., 59, 109-118.

(44) Chiewchanwit T., Ma H., El Zein R., Hallberg L., and Au W.W. (1995). Induction of Deletion Mutations by Methoxyacetaldehyde in Chinese Hamster Ovary (CHO)-AS52 cells. Mutation, Res., 1335(2):121-8.

▼**M8**

(45) Hayashi M., Dearfield K., Kasper P., Lovell D., Martus H.J., and Thybaud V. (2011). Compilation and Use of Genetic Toxicity Historical Control Data, Mutation,Res., 723, 87-90.

(46) OECD (2014). Statistical Analysis Supporting the Revision of the Genotoxicity Test Guidelines. Environmental, Health and Safety, Series on testing and assessment (No 199), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(47) Richardson C., Williams D.A., Allen J.A., Amphlett G., Chanter D.O., and 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, pp. 141-154.

(48) Fleiss J. L., Levin B., and Paik M. C. (2003). Statistical Methods for Rates and Proportions, Third Edition, New York: John Wiley & Sons.

▼**M8**

Dodatek 1

DEFINICE

Mutageny substituce párů bází: chemické látky, které způsobují substituci párů bází v DNA.

Chemická látka: látka nebo směs.

Účinnost klonování: procento buněk kultivovaných v nízké hustotě, které jsou schopny se rozrůst do kolonií, jež mohou být spočítány.

Koncentrace: odkazuje na konečné koncentrace zkoušené chemické látky v kultivačním médiu.

Cytotoxicita: u zkoušek prováděných podle této zkušební metody se cytotoxicita vyjadřuje jako snížení relativního přežití exponovaných buněk v porovnání s negativní kontrolou (viz zvláštní odstavec).

Přímá mutace: genová mutace výchozího typu mutované formy, která způsobuje změnu nebo ztrátu enzymatické aktivity kódovaných bílkovin.

Posunové mutageny: chemické látky, které způsobují adici nebo deleci jednoho nebo více párů bází v molekule DNA.

Genotoxický: obecný termín zahrnující všechny typy poškození DNA nebo chromozomů včetně jejich rozlámání, aduktů, přestavby, mutací, chromozomálních aberací a aneuploidie. Ne všechny druhy genotoxických účinků způsobují mutace nebo stálé poškození chromozomů.

HAT médium: médium obsahující hypoxanthin, aminopterin a thymidin, které se používá na čištění mutantů Hprt.

Mitotická rekombinace: rekombinace mezi homologními chromatidami v průběhu mitózy, v jejímž důsledku může dojít k vyvolání zlomů dvojvláken DNA nebo ke ztrátě heterozygotnosti.

MPA médium: médium obsahující xanthin, adenin, thymidin, aminopterin a kyselinu mykofenolovou, které se používá na čištění mutantů Xprt.

Mutagenní: produkující dědičné změny sekvence (sekvencí) párů bází DNA v genech nebo struktury chromozomů (chromozomové aberace).

Četnost mutací: počet pozorovaných kolonií mutací dělený počtem buněk kultivovaných v selektivním médiu, korigovaný účinností klonování (nebo životaschopností) v době selekce.

Doba exprese fenotypu: doba po expozici, během níž v genomu vznikne genetická změna a všechny dříve existující genové produkty vymizí do té míry, že se změní fenotypová vlastnost.

Relativní přežití: relativní přežití se používá jako míra cytotoxicity související s expozicí. Relativní přežití je účinnost klonování buněk umístěných na destičky okamžitě po expozici, upravené podle případné ztráty buněk v průběhu expozice v porovnání s upravenou účinností klonování u negativních kontrol (s přiřazeným přežitím 100 %).

Jaterní frakce S9: supernatant homogenátu jater po odstředění při 9 000 g, tj. surový jaterní extrakt.

▼**M8**

Směs S9: směs jaterní frakce S9 a kofaktorů nezbytných pro metabolickou aktivaci enzymů.

Kontrola s rozpouštědlem: obecný termín k označení kontrolních kultur, ke kterým se přidává pouze rozpouštědlo používané k rozpuštění zkoušené chemické látky.

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

Neexponovaná kontrola: kultury, které se neexponují (tj. ani chemické látce, ani rozpouštědlu), ale zpracovávají se souběžně stejným způsobem jako kultury, k nimž se přidává zkoušená chemická látka.

UVCB: Chemické látky s neznámým nebo proměnlivým složením, komplexní reakční produkty nebo biologický materiál.

▼M8

Dodatek 2

VZORCE PRO STANOVENÍ CYTOTOXICITY A ČETNOSTI MUTACÍ

Cytotoxicita se hodnotí podle relativního přežití, tj. podle účinnosti klonování (CE) buněk umístěných na destičky okamžitě po expozici, upravené podle případné ztráty buněk v průběhu expozice v porovnání s upravenou účinností klonování u negativních kontrol (s přiřazeným přežitím 100 %) (viz vzorec pro relativní přežití níže).

Upravená účinnost klonování u kultury exponované zkoušené chemické látce se vypočítá jako:

$$\text{Upravená CE} = \frac{\text{Počet bunek na konci expozice}}{\text{Počet buněk na počátku expozice}}$$

Relativní přežití (RS) u kultury exponované zkoušené chemické látce se vypočítá jako:

$$\text{RS} = \frac{\text{Upravená CE vexponované kultuře}}{\text{Upravená CE vkontrole srozpouštědlem}} \times 100$$

Četnost mutací je účinnost klonování kolonií mutací v selektivním médiu děleno účinností klonování v neselektivním médiu, měřená u stejné kultury v době selekce.

$$\text{Četnost mutací} = \frac{\text{Účinnost klonování kolonií mutací vselektivním médiu}}{\text{Účinnost klonování kolonií vne selektivním médiu}}$$

Když se pro účinnost klonování používají destičky:

CE = počet kolonií / počet buněk umístěných na destičky.

Když se pro účinnost klonování používají mikrotitrační destičky:

Počet kolonií na jamku v mikrotitračních destičkách odpovídá Poissonovu rozdělení.

Účinnost klonování = –ln P(0) / počet buněk na jamku,

kde –ln P(0) je pravděpodobný počet prázdných jamek z počtu jamek s nasazenými buňkami a popisuje se tímto vzorcem:

ln P(0)= –ln (počet prázdných jamek / počet jamek s buňkami)

▼M7

_____

_____

_____

▼B

B.21 ZKOUŠKY NA TRANSFORMACE SAVČÍCH BUNĚK *IN VITRO*

1. METODA

1.1 ÚVOD

Viz obecný úvod, část B.

1.2 DEFINICE

Viz obecný úvod, část B.

1.3 REFERENČNÍ LÁTKY

Žádné.

1.4 PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

Kultury savčích buněk lze použít pro detekci fenotypických změn in vitro indukovaných chemickými látkami spojovanými s maligní transformací *in vivo*. Často používanými buňkami jsou C3H10$T_{1/2}$, 3T3, SHE, buňky potkanů Fischer a zkouška se opírá o změny buněčné morfologie, tvorbu ložisek nebo změny v uchycení v polotuhém agaru. Méně často se používají systémy detekující ostatní fyziologické či morfologické změny v buňkách po expozici karcinogenním chemickým látkám. Žádný výsledek zkoušky *in vitro* není důkazem karcinogenity. Některé systémy jsou schopny detekovat promotory tumorů. Cytotoxicita se zjistí měřením účinku zkoušeného materiálu na schopnost vytvářet kolonie (účinnosti klonování) nebo rychlosti růstu kultur. Stanovením cytotoxicity lze zjistit, zda byla expozice zkoušené látce toxikologicky relevantní, nelze ji však použít k určení četnosti transformace ve všech experimentech, protože u některých mohlo dojít k prodloužení inkubace nebo k replatingu.

1.5 KRITÉRIA JAKOSTI

Nejsou stanovena.

1.6 POPIS ZKUŠEBNÍ METODY

Příprava

Buňky

Pro různé zkoušky transformace existuje řada použitelných buněčných linií a primárních kultur. Experimentátor musí zajistit, že buňky použité v testu transformace vykazují příslušné fenotypické změny po expozici známým karcinogenům a že zkouška používaná v jeho laboratoři je ověřena a že je dokumentována její validita a spolehlivost.

Médium

Použitá média a experimentální podmínky musí být vhodné pro použitou zkoušku na transformace.

▼B

Zkoušená látka

Před exponováním buněk je možné zkoušené látky rozpustit nebo suspendovat v kultivačním médiu nebo ve vhodných vehikulech. Konečná koncentrace vehikula v kultuře nesmí ovlivnit životaschopnost buněk, rychlost růstu nebo výskyt transformace.

Metabolická aktivace

Buňky by měly být vystaveny zkoušené látce, a to s vhodnou metabolickou aktivací a bez ní. Pokud se použijí buněčné typy s vnitřní metabolickou aktivitou, mělo by být známo, že úroveň a vlastnosti této aktivity jsou vhodné pro zkoušenou třídu chemických látek.

Zkušební podmínky

Použití negativních a pozitivních kontrol

Do každého experimentu se nasadí pozitivní kontroly využívající jak přímo působící chemickou látku, tak látku vyžadující metabolickou aktivaci; rovněž se použije kontrola s vehikulem.

Příkladem pozitivní kontroly mohou být tyto látky:

— přímo působící látky:

  — ethyl-methansulfonát,

  — propano-3-lakton,

— látky vyžadující metabolickou aktivaci:

  — N-(fluoren-2-yl)acetamid,

  — 4-dimethylaminoazobenzen,

  — 7,12-dimethylbenzoanthracen.

Podle potřeby se zařadí další pozitivní kontrola ze stejné třídy chemických látek, jako je zkoušená látka.

Expoziční koncentrace

Použije se několik koncentrací zkoušené látky. Tyto koncentrace musí vyvolávat toxický účinek závislý na koncentraci, přičemž nejvyšší koncentrace má vést k nízké úrovni přežití buněk a úroveň přežití buněk při nejnižší koncentraci má být přibližně stejná jako u negativní kontroly. Látky, které jsou relativně nerozpustné ve vodě, se zkouší až k mezi rozpustnosti za použití vhodných postupů. Nejvyšší koncentrace u netoxických látek dobře rozpustných ve vodě se určí případ od případu.

▼B

Postup

Buňky se exponují dostatečnou dobu v závislosti na použitém zkušebním systému; při delší expozici může být nezbytná opakovaná expozice spojená s výměnou média (a podle potřeby s výměnou čerstvé metabolické aktivační směsi). Buňky, které nemají dostatečnou vnitřní metabolickou aktivitu, musí být exponovány zkoušené chemické látce za přítomnosti i za nepřítomnosti vhodného metabolického aktivačního systému. Na konci expoziční doby se z buněk vymyje zkoušená látka a buňky se kultivují za vhodných podmínek, aby se mohl projevit sledovaný transformovaný fenotyp; poté se zaznamená výskyt transformace. Všechny výsledky se potvrdí nezávislým experimentem.

2. **ÚDAJE**

Údaje se zpracují v tabulkové formě; podle použité zkoušky jimi mohou být např. počet misek, počet misek s transformací nebo počet transformovaných buněk. Podle potřeby se přežití buněk vyjádří v procentech přežití v kontrolní kultuře a četnost transformací se vyjádří jako podíl transformovaných buněk a životaschopných buněk. Údaje se vyhodnotí vhodnými statistickými metodami.

3. **ZPRÁVY**

3.1 PROTOKOL O ZKOUŠCE

Protokol o zkoušce musí pokud možno obsahovat tyto informace:

— typ použitých buněk, počet buněčných kultur, metody udržování buněčných kultur,

— zkušební podmínky: koncentrace zkoušené látky, použité vehikulum, doba inkubace, délka a frekvence expozice, hustota buněk během expozice, typ použitého vnějšího metabolického aktivačního systému, pozitivní a negativní kontroly, specifikace sledovaného fenotypu, použitý selekční systém (podle potřeby), zdůvodnění výběru koncentrací,

— metody počítání životaschopných a transformovaných buněk,

— statistické vyhodnocení,

— diskuse o výsledcích,

— interpretace výsledků.

3.2 HODNOCENÍ A INTERPRETACE

Viz obecný úvod, část B.

4. **LITERATURA**

Viz obecný úvod, část B.

▼**M8**

B.22 **DOMINANTNÍ LETÁLNÍ ZKOUŠKA NA HLODAVCÍCH**

ÚVOD

1. Tato zkušební metoda je rovnocenná Pokynu OECD pro zkoušení (TG) č. 478 (2016). Zkušební metody se pravidelně přezkoumávají s ohledem na vědecký pokrok, měnící se potřeby regulace a dobré životní podmínky zvířat. Tato upravená verze zkušební metody odráží více než třicet let zkušeností s touto zkouškou a možnost integrovat nebo sloučit tuto zkoušku s jinými zkouškami toxicity, jako jsou studie vývojové toxicity, studie reprodukční toxicity nebo studie genotoxicity; avšak vzhledem k omezením této zkoušky a používání velkého počtu zvířat není zkouška určena pro použití jako hlavní metoda, ale spíše jako doplňková zkušební metoda, kterou lze použít pouze v případě, že regulatorní požadavky nelze splnit alternativním způsobem. Kombinování zkoušek toxicity může ušetřit použití velkého počtu zvířat na zkoušky toxicity. OECD vypracovala dokument, který obsahuje stručné informace o zkoušení v oblasti genetické toxikologie a přehled posledních změn, které OECD provedla ve svých pokynech ke zkoušení genotoxicity (1).

2. Účelem zkoušky dominantní letality (DL) je zkoumat, zda chemické látky vytvářejí mutace vznikající z chromozomových aberací v zárodečných buňkách. Zkouška dominantní letality je dále zvláště významná k posouzení genotoxicity, neboť zde probíhají procesy aktivního metabolismu *in vivo*, farmakokinetiky a reparace DNA, které přispívají k účinku testované látky, jakkoli mohou být různé u různých druhů. Indukce dominantních letálních mutací po expozici zkoušené chemické látce naznačuje, že tato chemická látka poškozuje zárodečné tkáně zkušebního zvířete.

3. Dominantní letální mutace způsobují embryonální nebo fetální smrt. Indukce dominantních letálních mutací po expozici zkoušené chemické látce naznačuje, že tato chemická látka poškozuje zárodečné buňky zkušebního zvířete.

4. Zkouška dominantní letality je užitečná pro potvrzení pozitivních výsledků zkoušek používajících somatické sledované vlastnosti *in vivo* a je významnou sledovanou vlastností pro predikci nebezpečnosti pro člověka a rizika genetických onemocnění přenášených prostřednictvím zárodečných buněk. Tato zkouška však vyžaduje velký počet zvířat a je velmi pracná; proto je velmi nákladná a časově náročná na provedení. Protože je spontánní četnost dominantních letálních mutací celkem vysoká, je citlivost zkoušky na detekci malých nárůstů četnosti mutací obvykle omezená.

5. Definice nejdůležitějších termínů jsou uvedeny v dodatku 1.

VÝCHOZÍ ÚVAHY

6. Zkouška se nejčastěji provádí na myších (2) (3) (4), avšak v některých případech, je-li to vědecky zdůvodněno, mohou být vhodné i jiné druhy, například potkani (5) (6) (7) (8). Dominantní letalita je obecně výsledkem velkých chromozomových aberací (strukturálních a numerických abnormalit)

▼M8

(9) (10) (11), ale nelze vyloučit ani genové mutace. Dominantní letální mutace je mutace vyskytující se v zárodečné buňce jako taková nebo vzniká po oplodnění v raném embryu, nepůsobí dysfunkci gamety, ale je letální pro oplodněné vajíčko nebo vyvíjející se embryo.

7. Jednotliví samci jsou ve vhodných intervalech opakovaně kříženi s dosud nepřipuštěnými samicemi. Počet páření po expozici závisí na konečném účelu studie dominantní letality (odstavec 23) a měl by zajišťovat, aby byla dominantní letalita hodnocena ve všech stádiích zrání samčích zárodečných buněk (12).

8. Jestliže existuje důkaz o tom, že se zkoušená chemická látka nebo její metabolit (metabolity) nedostanou do varlat, není vhodné tuto zkoušku použít.

PRINCIP ZKOUŠKY

9. Samci jsou zpravidla vhodnou cestou exponováni zkoušené chemické látce a páření s neexponovanými, dosud nepřipuštěnými samicemi. Různé druhy zárodečných buněk mohou být testovány použitím po sobě jdoucích intervalů páření. Po páření se samice po uplynutí vhodné doby utratí a obsah dělohy se vyšetří za účelem určení počtu implantací a živých a mrtvých embryí. Dominantní letalita zkoušené chemické látky se stanoví porovnáním počtu živých implantací na samici v exponované skupině s počtem živých implantací na samici v kontrolní skupině vehikulum/rozpouštědlo. Nárůst mrtvých implantací na samici v exponované skupině nad počet mrtvých implantací na samici v kontrolní skupině odpovídá postimplantačním ztrátám indukovaným zkoušenou chemickou látkou. Postimplantační ztráty se vypočítají stanovením poměru mrtvých implantací k celkovým implantacím v exponované skupině v porovnání s poměrem mrtvých implantací k celkovým implantacím v kontrolní skupině. Preimplantační ztráty lze odhadnout porovnáním počtu žlutých tělísek minus celkový počet implantací nebo porovnáním všech implantací na samici v exponované a kontrolní skupině.

OVĚŘENÍ ODBORNÉ ZPŮSOBILOSTI LABORATOŘE

10. Způsobilost pro tuto zkoušku by měla být stanovena na základě doložení schopnosti reprodukovat četnost dominantní letality ze zveřejněných údajů (např. (13) (14) (15) (16) (17) (18)) s látkami pozitivní kontroly (včetně slabých reakcí), např. s látkami uvedenými v tabulce 1, a kontrolami vehikula a získáním četností negativní kontroly, které odpovídají přijatelnému rozpětí údajů (viz výše uvedené odkazy) nebo dosavadní distribuci kontrol v laboratoři, je-li k dispozici.

POPIS METODY

Příprava

Výběr zvířecích druhů

11. Měly by být použity běžně používané laboratorní kmeny zdravých pohlavně dospělých zvířat. Běžně se používá myš, ale vhodný může být také potkan. Použit může být i jakýkoli jiný vhodný druh savce, je-li ve zprávě poskytnuto vědecké zdůvodnění.

▼M8

Podmínky chovu a krmení zvířat

12. Teplota v místnosti pro zvířata by u hlodavců měla být 22 °C (± 3 °C). Relativní vlhkost vzduchu by v ideálním případě měla být 50–60 %, ale minimálně 40 %, a neměla by pokud možno přesáhnout 70 % kromě doby úklidu místnosti. Osvětlení by mělo být umělé a mělo by se střídat 12 hodin světla a 12 hodin tmy. Ke krmení lze použít konvenční laboratorní krmivo s neomezeným přísunem pitné vody. Výběr druhu potravy může být ovlivněn její dostatečnou mísitelností se zkoušenou chemickou látkou, je-li látka podávána tímto způsobem. Před expozicí nebo pářením by hlodavci měli být chováni v malých skupinách (nejvýše po pěti) téhož pohlaví, pokud se nepředpokládá nebo není pozorováno agresivní chování, přednostně v pevných klecích s vhodnou úpravou prostředí. Je-li to z vědeckého hlediska důvodné, mohou být zvířata v klecích individuálně.

Příprava zvířat

13. Zdraví a pohlavně zralí samci a dospělé samice se náhodným výběrem rozdělí na kontrolní skupinu a skupinu, která se exponuje. Jednotlivá zvířata se jednoznačně identifikují humánní, co nejméně invazivní metodou (např. kroužkováním, označením štítkem, pomocí mikročipu nebo biometrické identifikace, avšak nikoli nastřihnutím prstu dolní končetiny nebo ucha) a nechají se v laboratorních podmínkách alespoň pět dní aklimatizovat. Klece by měly být uspořádány tak, aby byl vliv umístění klecí minimalizován. Mělo by se zabránit vzájemné kontaminaci pozitivní kontroly a zkoušené chemické látky. V okamžiku zahájení studie by měla být odchylka v hmotnosti zvířat minimální a neměla by u obou pohlaví překročit ± 20 % střední hodnoty hmotnosti.

Příprava dávek

14. Pevné zkoušené chemické látky by se měly rozpustit nebo suspendovat ve vhodných rozpouštědlech nebo vehikulech nebo by měly být přimíchány do potravy nebo pitné vody před podáním dávky zvířatům. Kapalné zkoušené chemické látky mohou být podávány přímo nebo se před podáním zředí. Pro účely expozice inhalací lze zkoušené chemické látky v závislosti na jejich fyzikálně-chemických vlastnostech podávat jako plyn, páru nebo pevný/kapalný aerosol. Používat by se měla čerstvě připravená zkoušená chemická látka, pokud údaje o stabilitě neprokazují možnost skladování a nestanoví vhodné podmínky pro skladování.

Zkušební podmínky

Rozpouštědlo/vehikulum

15. Rozpouštědlo/vehikulum by nemělo mít při použitých objemech dávek toxické účinky a mělo by být vyloučeno podezření, že reaguje se zkoušenou chemickou látkou. Jsou-li použita jiná než známá rozpouštědla/vehikula, mělo by být jejich zařazení podloženo údaji o jejich kompatibilitě. Doporučuje se nejprve zvážit použití vodného rozpouštědla/vehikula. Jako příklad běžně používaných kompatibilních rozpouštědel/vehikul lze uvést vodu, fyziologický roztok, roztok methylcelulózy, roztok sodné soli karboxymethylcelulózy, olivový olej a kukuřičný olej.

Pozitivní kontroly

16. Pokud laboratoř neprokáže způsobilost k provádění zkoušky a nepoužívala zkoušku rutinně v nedávné minulosti (např. v posledních 5 letech), měla by být vždy používána zvířata pro souběžné pozitivní kontroly. Zvířata v pozitivní kontrolní skupině však nemusí být exponována stejným způsobem jako zvířata, kterým je podávána zkoušená chemická látka, a vzorky u nich

▼M8

nemusí být odebírány při všech intervalech páření. Látky používané pro pozitivní kontrolu by měly prokazatelně vyvolávat dominantní letalitu za podmínek používaných pro tuto zkoušku. S výjimkou expozice by měla zvířata kontrolní skupiny podstoupit identický proces jako zvířata ve skupinách, v nichž dojde k expozici.

17. Dávky pozitivních kontrolních látek by měly být vybrány tak, aby vyvolaly slabé nebo mírné účinky, které nejlépe dokládají správné provedení a citlivost zkoušky, ale které soustavně vyvolávají pozitivní dominantní letální účinky. Příklady pozitivních kontrolních látek a vhodných dávek jsou uvedeny v tabulce 1.

Tabulka 1

Příklady látek pro pozitivní kontroly

Látka [č. CAS] (referenční č.)	Rozpětí efektivní dávky (mg/kg) (druhy hlodavců)	Délka podávání (dny)
triethylenmelamin [51-18-3] (15)	0,25 (myš)	1
cyklofosfamid [50-18-0] (19)	50–150 (myš)	5
cyklofosfamid [50-18-0] (5)	25–100 (potkan)	1
ethyl-methansulfonát [62-50-0] (13)	100–300 (myš)	5
monomer akrylamidu [79-06-1] (17)	50 (myš)	5
chlorambucil [305-03-3] (14)	25 (myš)	1

Negativní kontroly

18. Součástí každého odběru vzorků by měla být negativní kontrolní zvířata, jimž je aplikováno pouze rozpouštědlo nebo vehikulum, ale jinak se s nimi zachází stejně jako s experimentálními skupinami (20). Nejsou-li k dispozici historické nebo zveřejněné kontrolní údaje, které by ukazovaly, že vybrané rozpouštědlo/vehikulum nevyvolává žádné dominantní letální nebo jiné zhoubné účinky, měla by být do každého odběru vzorků zahrnuta neexponovaná kontrolní zvířata pro posouzení účinku vehikula.

POSTUP

Počet zvířat

19. Jednotliví samci jsou ve vhodně stanovených intervalech (např. týdenní intervaly, odstavce 21 a 23) opakovaně kříženi nejlépe s jednou dosud nepřipuštěnou samicí. Počet samců ve skupině by měl být stanoven předem tak, aby stačil (v kombinaci s počtem připuštěných samic v každém intervalu páření) k dosažení statistické síly nezbytné pro zjištění nejméně zdvojnásobení četnosti dominantní letality (odstavec 44).

20. Také počet samic na jeden interval páření by měl být podle výpočtů statistické síly stanoven předem tak, aby umožnil zjištění nejméně dvojnásobné četnosti dominantní letality (tj. dostatečný počet březích samic, aby bylo možné získat alespoň 400 implantací celkem) (20) (21) (22) (23) a aby bylo možné očekávat alespoň jeden mrtvý zárodek na jednu jednotku analýzy (tj. skupina páření na jednu dávku) (24).

▼M8

Doba podávání a intervaly páření

21. Počet intervalů páření po expozici se řídí plánem expozice a je třeba zajistit, aby byla hodnocena indukce dominantní letality ve všech fázích dozrávání samčích zárodečných buněk (12) (25). U jednorázového podání maximálně 5 denních dávek je třeba, aby došlo k 8 (myš) nebo 10 (potkan) páření v týdenních intervalech po poslední expozici. U podání většího počtu dávek se může počet intervalů páření snížit poměrně k delší době podávání, je však třeba zachovat cíl hodnocení všech fází spermatogeneze (např. po 28denní expozici postačí pouze 4 páření jednou týdně, aby bylo možné vyhodnotit všechny fáze spermatogeneze u myší). Všechny plány expozice a páření by měly být vědecky zdůvodněny.

22. Samice musí být u samců ponechány nejméně po dobu trvání jednoho estrálního cyklu (např. jeden týden zahrnuje jeden estrální cyklus u myší i potkanů). Samice, které se nepářily v týdenním intervalu, lze použít pro následující interval páření. Nebo dokud nedojde ke spáření prokázanému spermiemi ve vagíně nebo přítomností vaginální zátky.

23. Použitý režim expozice a páření závisí na konečném účelu studie dominantní letality. Jestliže je cílem stanovit, zda daná chemická látka indukuje dominantní letální mutace jako takové, vhodnou metodou je expozice po celý cyklus spermatogeneze (např. 7 týdnů u myší, 5–7 expozicí týdně) a jedno páření na konci. Jestliže je však cílem identifikovat citlivý typ zárodečných buněk pro indukci dominantní letality, je lepší jednorázová nebo 5denní expozice, po níž následuje jedno páření týdně.

Dávkování

24. Jestliže se provádí předběžná studie pro stanovení rozsahu dávek, poněvadž nejsou k dispozici vhodné údaje, jež by mohly při stanovení dávek pomoci, pak by měla být provedena ve stejné laboratoři, se stejným druhem, kmenem, pohlavím a za stejného režimu expozice, které se použijí v hlavní studii (26). Cílem studie by mělo být zjistit maximální tolerovanou dávku, která je definována jako nejvyšší dávka, která bude po dobu trvání zkoušky tolerována bez příznaků toxicity omezující studii (např. abnormální chování nebo reakce, menší pokles tělesné hmotnosti nebo cytotoxicity hematopoetického systému), avšak nikoli smrti nebo příznaků bolesti, utrpení nebo strádání, kdy je nezbytné zvířata humánně utratit (27).

25. Maximální tolerovaná dávka dále nesmí negativně ovlivnit úspěch páření (21).

26. Zkoušené chemické látky se specifickým biologickým působením při nízkých netoxických dávkách (jako jsou hormony a mitogeny) a chemické látky, které vykazují saturaci toxikokinetických vlastností, mohou představovat výjimky z kritérií stanovení dávek a každý případ by měl být hodnocen individuálně.

27. Aby bylo možné získat informace o odezvě na dávku, měla by úplná studie zahrnovat negativní kontrolní skupinu a minimálně tři úrovně dávek, které jsou zpravidla odstupňovány faktorem 2, avšak nepřevyšujícím 4. Pokud ve studii ke stanovení rozsahu dávek nebo na základě stávajících údajů zkoušená chemická látka nevyvolává toxicitu, měla by nejvyšší dávka při jednorázovém podávání odpovídat 2 000 mg/kg tělesné hmotnosti. Pokud však

▼M8

zkoušená chemická látka způsobuje toxicitu, měla by být největší podávanou dávkou maximální tolerovaná dávka a úrovně dávek by měly přednostně pokrývat rozmezí od maximální dávky až po dávku vyvolávající malou toxicitu nebo nevyvolávající žádnou toxicitu. U netoxických chemických látek je limitní dávka 1 000 mg/kg tělesné hmotnosti/den při době podávání 14 dní nebo delší, nebo 2 000 mg/kg tělesné hmotnosti/den při dobách podávání kratších než 14 dní.

Podávání dávek

28. Při plánování zkoušky by měl být zvážen předpokládaný způsob expozice člověka. Proto lze zvolit odůvodněné způsoby expozice např. potravou, v pitné vodě, subkutánně, nitrožilně, lokálně, inhalací, orálně (pomocí žaludeční sondy) nebo implantací. Způsob podávání by měl být v každém případě zvolen tak, aby zajistil odpovídající expozici cílové tkáně (tkání). Intraperitoneální injekce se obvykle nedoporučují, protože se nejedná o předpokládanou cestu expozice člověka, a měly by být použity pouze s konkrétním vědeckým zdůvodněním. Je-li zkoušená chemická látka přimíchána do potravy nebo pitné vody, zejména v případě jednorázové dávky, mělo by se dbát na to, že prodleva mezi příjmem krmiva a vody a pářením by měla být dostatečná, aby umožnila detekci účinků (odstavec 31). Maximální objem kapaliny, který lze najednou podán žaludeční sondou nebo injekčně, závisí na velikosti pokusného zvířete. Toto množství by obvykle nemělo překročit 1 ml/100 g tělesné hmotnosti, s výjimkou vodných roztoků, kde lze použít maximálně 2 ml/100 g tělesné hmotnosti. Použití větších objemů, než jsou tyto (pokud je povolují právní předpisy o šetrném zacházení se zvířaty), je třeba odůvodnit. Kolísání objemu zkoušené chemické látky by se mělo omezit nastavením koncentrace tak, aby se na všech úrovních dávek zajistil konstantní objem v závislosti na tělesné hmotnosti.

Pozorování

29. Všeobecné klinické pozorování a záznam klinických příznaků by se měly provádět nejméně jednou denně, přednostně ve stejnou dobu (stejné doby) a s uvážením doby očekávaného maximálního účinku po podání látky. Nejméně dvakrát denně po dobu podávání dávek by měla být provedena prohlídka všech zvířat za účelem zjištění morbidity a mortality. Všechna zvířata by měla být zvážena na počátku studie a nejméně jednou týdně během studií s opakovanou dávkou a při utracení. Měření spotřeby potravy by se mělo provádět nejméně jednou týdně. Pokud je zkoušená chemická látka podávána v pitné vodě, měla by se spotřeba vody měřit při každé výměně vody a alespoň jednou týdně. Zvířata, která vykazují neletální indikátory nadměrné toxicity, by měla být utracena před uplynutím doby zkoušky (27).

Odběr a zpracování tkání

30. Samice se utratí v druhé polovině březosti, v 13. den gestace u myší a v 14.–15. den gestace u potkanů. Dělohy se vyšetří za účelem stanovení dominantních letálních účinků a určí se počet implantací, živých a mrtvých embryí a žlutých tělísek.

31. Obnaží se děložní rohy a vaječníky za účelem spočítání žlutých tělísek a plody se vyjmou, spočítají a zváží. Dělohy je třeba pečlivě vyšetřit, aby se nepřehlédly resorpce zakryté živými plody a aby bylo zajištěno, že budou všechny resorpce vyčísleny. Zaznamená se fetální mortalita. Dále se zaznamená počet úspěšně oplodněných samic a počet celkových implantací,

▼M8

preimplantačních ztrát a postimplantační mortalita (včetně časných a pozdních resorpcí). Kromě toho mohou být viditelné plody uchovány v Bouinově fixačním roztoku po dobu alespoň 2 týdnů, po nichž se prohlédnou, zda nevykazují větší vnější malformace (28), což poskytne další informace o reprodukčních a vývojových účincích zkoušené látky.

ÚDAJE A PŘEDKLÁDÁNÍ ZPRÁV

Zpracování výsledků

32. Údaje se zpracují v tabulkové formě a uvede se počet připuštěných samců, počet březích samic a počet nezabřezlých samic. Samostatně se uvedou výsledky každého páření, včetně identifikace každého samce a samice. Pro každou samici se uvede interval páření, dávka, kterou obdržel samec, a počet živých a mrtvých implantací.

33. Postimplantační ztráty se vypočítají stanovením poměru mrtvých implantací k celkovým implantacím z exponované skupiny v porovnání s poměrem mrtvých implantací k celkovým implantacím z kontrolní skupiny vehikulum/rozpouštědlo.

34. Preimplantační ztráty se vypočítají jako rozdíl mezi počtem žlutých tělísek a počtem implantací nebo jako snížení průměrného počtu implantací na samici ve srovnání s kontrolou. Odhadují-li se také preimplantační ztráty, uvedou se.

35. Dominantní letální faktor se odhadne jako: (postimplantační úhyn / celkové implantace na samici) × 100.

36. Měly by být uvedeny údaje o toxicitě a klinických příznacích (podle odstavce 29).

Kritéria přijatelnosti

37. Přijatelnost zkoušky určují tato kritéria.

— Souběžná negativní kontrola odpovídá publikovaným normám pro historické údaje o negativní kontrole a historickým kontrolním údajům laboratoře, jsou-li k dispozici (viz odstavce 10 a 18).

— Souběžné pozitivní kontroly vyvolávají odezvy, které jsou v souladu s publikovanými normami pro historické údaje o pozitivní kontrole nebo historickými pozitivními kontrolními údaji laboratoře, jsou-li k dispozici, a vyvolávají statisticky významný nárůst v porovnání s negativní kontrolou (viz odstavce 17 a 18).

— Byl analyzován přiměřený počet celkových implantací a dávek (odstavec 20).

— Kritéria pro výběr nejvyšší dávky jsou v souladu s kritérii popsanými v odstavcích 24 a 27.

Hodnocení a interpretace výsledků

38. Aby byly k dispozici dostatečné údaje pro analýzu vztahu dávky a odezvy, měly by být analyzovány nejméně tři exponované skupiny.

▼**M8**

39. Za předpokladu, že všechna kritéria přijatelnosti byla splněna, lze zkoušenou chemickou látku považovat za jasně pozitivní, pokud:

— alespoň jedna ze zkoušených dávek vykazuje statisticky významný nárůst v porovnání se souběžně provedenou negativní kontrolou,

— při hodnocení pomocí vhodného testu je tento nárůst alespoň pro jedno experimentální uspořádání závislý na dávce (např. interval páření jednou týdně), a

— všechny výsledky jsou mimo přijatelné rozpětí negativních kontrolních údajů nebo distribuci historických údajů laboratoře o negativních kontrolách (např. mimo 95 % rozmezí dle Poissonova rozdělení), pokud jsou k dispozici.

Pak se má za to, že zkoušená chemická látka je schopna vyvolávat dominantní letální mutace v zárodečných buňkách pokusných zvířat. Doporučení ohledně nejvhodnějších statistických metod jsou popsána v odstavci 44; v literatuře lze nalézt také další doporučené statistické přístupy (20) (21) (22) (24) (29). Použité statistické testy by měly brát v úvahu zvíře jako experimentální jednotku.

40. Za předpokladu, že všechna kritéria přijatelnosti byla splněna, lze zkoušenou chemickou látku považovat za jasně negativní, pokud:

— žádná ze zkušebních dávek nevykazuje statisticky významný nárůst v porovnání se souběžně provedenou negativní kontrolou,

— v žádném experimentálním uspořádání neexistuje nárůst v závislosti na dávce, a

— všechny výsledky jsou v přijatelném rozpětí negativních kontrolních údajů nebo distribuci historických údajů laboratoře o negativních kontrolách (např. v 95 % rozmezí dle Poissonova rozdělení), pokud jsou k dispozici.

Pak se má za to, že zkoušená chemická látka není schopna vyvolávat dominantní letální mutace v zárodečných buňkách pokusných zvířat.

41. Ověření jasně pozitivní či jasně negativní odezvy se nepožaduje.

42. Jestliže odezva není jasně negativní nebo pozitivní a s cílem napomoci při stanovení biologického významu výsledku (např. slabý nebo okrajový nárůst), údaje by měly být vyhodnoceny na základě odborného posouzení a/nebo dalším vyšetřením s využitím stávajících experimentálních údajů, jako je skutečnost, zda je pozitivní výsledek mimo přijatelné rozpětí negativních kontrolních údajů nebo historických negativních kontrolních údajů laboratoře (30).

43. Ve vzácných případech ani po dalším šetření nebude možné na základě daného souboru údajů dospět k závěru o pozitivitě či negativitě výsledku, a bude proto učiněn závěr, že výsledek je neurčitý.

44. Použité statistické testy by měly brát v úvahu samce jako experimentální jednotku. I když je možné, že údaje o počtech (např. počet implantací na samici) mohou vykazovat Poissonovo rozdělení anebo podíly (např. podíl mrtvých implantací) mohou mít binomické rozdělení, často se stává, že jsou tyto údaje příliš rozptýlené (31). Podobně při statistické analýze by měl být nejprve použit test na nadměrný/nedostatečný rozptyl pomocí takových testů rozptylu, jako je Cochranův binomický test rozptylu (32) nebo Taroneho C(α) test nadměrného binomického rozptylu (31) (33). Není-li zjištěna žádná odchylka od binomického rozptylu, mohou být testovány trendy

▼M8

podílů jednotlivých úrovní dávky pomocí Cochranova-Armitageova trend-testu (34) a párová porovnání s kontrolní skupinou mohou být otestována pomocí Fisherova exaktního testu (35). Podobně, není-li zjištěna žádná odchylka od Poissonova rozptylu, mohou být trendy počtů testovány pomocí Poissonovy regrese (36) a párová porovnání s kontrolní skupinou mohou být otestována v rámci Poissonova modelu s využitím párových kontrastů (36). Je-li zjištěn významný nadměrný nebo nedostatečný rozptyl, doporučují se neparametrické metody (23) (31). Zahrnují pořadové testy, jako jsou Jonckheerův-Terpstrův test trendů (37) a Mannovy-Whitneyovy testy (38) pro párová porovnání s kontrolní skupinou vehikulum/rozpouštědlo, jakož i permutační testy, převzorkování nebo bootstrap testy trendů a párová porovnání s kontrolní skupinou (31) (39).

45. Pozitivní zkouška dominantní letality poskytuje průkaz genotoxicity zkoušené chemické látky v zárodečných buňkách exponovaného samce pokusného druhu.

46. Při hodnocení biologického významu odezvy může být vodítkem posouzení, zda jsou zjištěné hodnoty uvnitř nebo vně rozsahu historických kontrolních hodnot (40).

ZÁVĚREČNÁ ZPRÁVA

47. Závěrečná zpráva by měla obsahovat tyto informace.

Shrnutí.

Zkoušená chemická látka:

— zdroj, číslo šarže, a je-li k dispozici, datum použitelnosti,

— stabilita zkoušené chemické látky samotné, je-li známa,

— rozpustnost a stabilita zkoušené chemické látky v rozpouštědle, jsou-li známy,

— měření pH, případně osmolality a sraženiny v kultivačním médiu, do něhož byla přidána zkoušená chemická látka.

Jednosložková látka:

— fyzický vzhled, rozpustnost ve vodě a další relevantní fyzikálně-chemické vlastnosti,

— chemická identifikace, např. název podle IUPAC nebo CAS, číslo CAS, kód SMILES nebo InChI, strukturní vzorec, čistota, případně chemická identita nečistot, je-li to prakticky možné, atd.

Vícesložková látka, látka s neznámým nebo proměnlivým složením, komplexní reakční produkt nebo biologický materiál a směsi:

— charakterizované pokud možno chemickou identitou (viz výše), kvantitativním výskytem a relevantními fyzikálně-chemickými vlastnostmi složek.

Příprava zkoušené chemické látky:

— zdůvodnění volby vehikula,

— rozpustnost a stabilita zkoušené chemické látky v rozpouštědle/vehikulu, jsou-li známy,

▼**M8**

— příprava potravy, pitné vody nebo inhalačních aplikačních forem,

— analytická stanovení aplikační formy (např. stabilita, homogenita, nominální koncentrace), jsou-li prováděna.

Pokusná zvířata:

— použitý druh/kmen a odůvodnění výběru,

— počet, věk a stáří zvířat,

— původ, podmínky chovu, strava atd.,

— metoda jednoznačného označení zvířat,

— u krátkodobých studií: hmotnost jednotlivých samců na začátku a na konci zkoušky, u studií trvajících déle než jeden týden: hmotnosti jednotlivých zvířat během studie a spotřeba potravy. Mělo by být uvedeno rozpětí tělesné hmotnosti, střední hodnota a směrodatná odchylka pro každou skupinu.

Zkušební podmínky:

— údaje o pozitivní a negativní (vehikulum/rozpouštědlo) kontrole,

— údaje ze studie pro stanovení rozmezí dávek,

— zdůvodnění zvolených úrovní dávek,

— podrobnosti o přípravě zkoušené chemické látky,

— podrobné údaje o podávání zkoušené chemické látky,

— zdůvodnění způsobu podávání,

— metody zjišťování toxicity, včetně případně histopatologických nebo hematologických analýz a četnosti, s jakou jsou prováděna pozorování zvířat, a četnosti vážení,

— metody ověřování, zda se zkoušená chemická látka dostala k cílové tkáni, nebo ověřování obecné cirkulace, pokud byly získány negativní výsledky,

— skutečná dávka (v mg na kg tělesné hmotnosti za den) vypočtená z koncentrace zkoušené chemické látky v potravě / pitné vodě (v ppm) a případně ze spotřeby;

— podrobnosti o jakosti krmení a vody,

— podrobnosti o úpravě klecového prostředí,

— podrobný popis harmonogramů expozice a odběru vzorků a odůvodnění výběru konkrétního schématu,

— metoda analgeze,

— způsob utracení,

▼**M8**

— postupy izolace a uchovávání tkání,

— zdroje a čísla šarží všech sad a chemických činidel (je-li to relevantní),

— metody počítání dominantních letálních účinků,

— plán páření,

— metody průkazu spáření,

— doba utracení,

— kritéria hodnocení dominantních letálních účinků, včetně žlutých tělísek, implantací, resorpcí a preimplantačních ztrát, živých implantací, mrtvých implantací.

Výsledky:

— stav zvířat před zkouškou a během zkoušky, včetně známek toxicity,

— hmotnosti jednotlivých samců během expozice a období páření,

— počet připuštěných samic,

— podle možnosti závislost odezvy na dávce,

— souběžné a historické údaje o negativní kontrole s rozpětími, středními hodnotami a směrodatnými odchylkami,

— údaje o souběžné pozitivní kontrole,

— údaje ve formě tabulky o každé samici včetně: počet žlutých tělísek na samici, počet implantací na samici, počet resorpcí a preimplantačních ztrát na samici, počet živých implantací na samici, počet mrtvých implantací na samici, hmotnosti plodů,

— výše uvedené údaje shrnuté pro každé období páření a dávku s četností dominantní letality,

— použité statistické analýzy a metody.

Diskuse o výsledcích.

Závěr.

LITERATURA

(1) OECD (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, No. Series on Testing and Assessment, No 234, OECD, Paris.

(2) Bateman, A.J. (1977). The Dominant Lethal Assay in the Male Mouse, in Handbook of Mutagenicity Test Procedures B.J. Kilbey *et. al.* (Eds.) pp. 235-334, Elsevier, Amsterdam

(3) Ehling U.H., Ehling, U.H., Machemer, L., Buselmaier, E., Dycka, D., Frohberg, H., Kratochvilova, J., Lang, R., Lorke, D., Muller, D., Pheh, J., Rohrborn, G., Roll, R., Schulze-Schencking, M., and Wiemann, H. (1978). Standard Protocol for the Dominant Lethal Test on Male Mice. Set up by the Work Group „Dominant“ lethal mutations of the ad hoc Committee Chemogenetics, Arch. *Toxicol., 39*, 173-185

▼**M8**

(4) Shelby M.D. (1996). Selecting Chemicals and Assays for Assessing Mammalian Germ Cell Mutagenicity. Mutation Res,. 352:159-167.

(5) Knudsen I., Knudsen, I., Hansen, E.V., Meyer, O.A. and Poulsen, E. (1977). A proposed Method for the Simultaneous Detection of Germ-Cell Mutations Leading to Fetal Death (Dominant Lethality) and of Malformations (Male Teratogenicity) in Mammals. Mutation Res., 48:267-270.

(6) Anderson D., Hughes, J.A., Edwards, A.J. and Brinkworth, M.H. (1998). A Comparison of Male-Mediated Effects in Rats and Mice Exposed to 1,3-Butadiene. Mutation Res., 397:77-74.

(7) Shively C.A., C.A., White, D.M., Blauch, J.L. and Tarka, S.M. Jr. (1984). Dominant Lethal Testing of Theobromine in Rats. *Toxicol.* Lett. 20:325-329.

(8) Rao K.S., Cobel-Geard, S.R., Young, J.T., Hanley, T.R. Jr., Hayes, W.C., John, J.A. and Miller, R.R. (1983). Ethyl Glycol Monomethyl Ether II. Reproductive and dominant Lethal Studies in Rats. Fundam. Appl. *Toxicol*., 3:80-85.

(9) Brewen J.G., Payne, H.S., Jones, K.P., and Preston, R.J. (1975). Studies on Chemically Induced Dominant Lethality. I. The Cytogenetic Basis of MMS-Induced Dominant Lethality in Post-Meiotic Male Germ Cells, Mutation Res., 33, 239-249.

(10) Marchetti F., Bishop, J.B., Cosentino, L., Moore II, D. and Wyrobek, A.J. (2004). Paternally Transmitted Chromosomal Aberrations in Mouse Zygotes Determine their Embryonic Fate. Biol. Reprod., 70:616-624.

(11) Marchetti F. and Wyrobek, A.J. (2005). Mechanisms and Consequences of Paternally Transmitted Chromosomal Aberrations. Birth Defects Res., C 75:112-129.

(12) Adler I.D. (1996). Comparison of the Duration of Spermatogenesis Between Rodents and Humans. Mutation Res., 352:169-172.

(13) Favor J., and Crenshaw J.W. (1978). EMS-Induced Dominant Lethal Dose Response Curve in DBA/1J Male Mice, Mutation Res., 53: 21–27.

(14) Generoso W.M., Witt, K.L., Cain, K.T., Hughes, L. Cacheiro, N.L.A, Lockhart, A.M.C. and Shelby, M.D. (1995). Dominant Lethal and Heritable Translocation Test with Chlorambucil and Melphalan. Mutation Res., 345:167-180.

(15) Hastings S.E., Huffman K.W. and Gallo M.A. (1976). The dominant Lethal Effect of Dietary Triethylenemelamine, Mutation Res., 40:371-378.

(16) James D.A. and Smith D.M. (1982). Analysis of Results from a Collaborative Study of the Dominant Lethal Assay, Mutation Res., 99:303-314.

(17) Shelby M.D., Cain, K.T., Hughes, L.A., Braden, P.W. and Generoso, W.M. (1986). Dominant Lethal Effects of Acrylamide in Male Mice. Mutation Res., 173:35-40.

▼**M8**

(18) Sudman P.D., Rutledge, J.C., Bishop, J.B. and Generoso W.M. (1992). Bleomycin: Female-Specific Dominant Lethal Effects in Mice, Mutation Res., 296: 143-156.

(19) Holstrom L.M., Palmer A.K. and Favor, J. (1993). The Rodent Dominant Lethal Assay. In Supplementary Mutagenicity Tests. Kirkland D.J. and Fox M. (Eds.), Cambridge University Press, s. 129-156.

(20) Adler I-D., Bootman, J., Favor, J., Hook, G., Schriever-Schwemmer, G., Welzl, G., Whorton, E., Yoshimura, I. and Hayashi, M. (1998). Recommendations for Statistical Designs of *In Vivo* Mutagenicity Tests with Regard to Subsequent Statistical Analysis, Mutation Res., 417:19–30.

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

(22) Generoso W.M. and Piegorsch W.W. (1993). Dominant Lethal Tests in Male and Female Mice. Methods, *Toxicol*., 3A:124-141.

(23) Haseman J.K. and Soares E.R. (1976).The Distribution of Fetal Death in Control Mice and its Implications on Statistical Tests for Dominant Lethal Effects. Mutation. Res., 41: 277-288.

(24) Whorton E.B. Jr. (1981). Parametric Statistical Methods and Sample Size Considerations for Dominant Lethal Experiments. The Use of Clustering to Achieve Approximate Normality, Teratogen. Carcinogen. *Mutagen*., 1:353 – 360.

(25) Anderson D., Anderson, D., Hodge, M.C.E., Palmer, S., and Purchase, I.F.H. (1981). Comparison of Dominant Lethal and Heritable Translocation Methodologies. Mutation. Res., 85:417-429.

(26) 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. and Richold, M. (1992). Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group: Dose Setting in *In Vivo* Mutagenicity Assays. Mutagen., 7:313-319.

(27) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No.19.), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(28) Barrow M.V., Taylor W.J and Morphol J. (1969). A Rapid Method for Detecting Malformations in Rat Fetuses, 127, 291–306.

(29) Kirkland D.J., (Ed.)(1989). Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data, Cambridge University Press.

(30) Hayashi, M., Dearfield, K., Kasper P., Lovell D., Martus H.-J. and Thybaud V. (2011). „Compilation and Use of Genetic Toxicity Historical Control Data“, Mutation. Res., 723:87-90.

(31) Lockhart A.C., Piegorsch W.W. and Bishop J.B. (1992). Assessing Over Dispersion and Dose-Response in the Male Dominant Lethal Assay. Mutation. Res., 272:35-58.

(32) Cochran W.G. (1954). Some Methods for Strengthening the Common χ^2 Tests. Biometrics, 10: 417-451.

▼**M8**

(33) Tarone R.E. (1979). Testing the Goodness of Fit of the Binomial Distribution. *Biometrika*, 66: 585-590.

(34) Margolin B.H. (1988). Test for Trend in Proportions. v *Encyclopedia of* Statistical Sciences, Volume 9, Kotz S. and Johnson N. L. (Edss.), pp. 334-336. John Wiley and Sons, New York.

(35) Cox D.R., Analysis of Binary Data. Chapman and Hall, London (1970).

(36) Neter J.M., Kutner, H.C., Nachtsheim, J. and Wasserman, W. (1996). Applied Linear Statistical Models, Fourth Edition, Chapters 14 and 17. McGraw-Hill, Boston

(37) Jonckheere R. (1954). A Distribution-Free K-Sample Test Against Ordered Alternatives. *Biometrika,* 41:133-145.

(38) Conover W.J. (1971). Practical Nonparametric Statistics. John Wiley and Sons, New York

(39) Efron, B. (1982). The Jackknife, the Bootstrap and Other Resampling Plans. Society for Industrial and Applied Mathematics, Philadelphia, PA.

(40) Fleiss J. (1973). Statistical Methods for Rates and Proportions. John Wiley and Sons, New York.

▼**M8**

Dodatek 1

DEFINICE

Chemická látka: látka nebo směs.

Žluté tělísko: struktura hormonální sekrece vytvořená na vaječníku v místě folikulu, z nějž se uvolnilo vajíčko. Počet žlutých tělísek ve vaječnících odpovídá počtu vajíček, které byly uvolněny z vaječníku.

Dominantní letální mutace: mutace, k níž došlo v zárodečné buňce nebo která vznikla po oplodnění a která působí úmrtí embrya nebo plodu.

Plodnost: počet připuštěných březích samic z počtu připuštěných samic.

Interval páření: doba mezi koncem expozice a pářením exponovaných samců. Kontrolováním tohoto intervalu lze hodnotit účinky chemické látky na různé druhy zárodečných buněk. U myší pářících se v průběhu týdne 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 a 8 po ukončení expozice se měří účinky na sperma, kondenzované spermatidy, kulaté spermatidy, pachyténní spermatocyty, rané spermatocyty, diferencované spermatogonie, diferencující se spermatogonie a spermatogoniální kmenové buňky.

Preimplantační ztráty: rozdíl mezi počtem implantací a počtem žlutých tělísek. Lze je také odhadnout porovnáním všech implantací na samici v exponované a kontrolní skupině.

Postimplantační ztráty: poměr mrtvých implantací v exponované skupině v porovnání s poměrem mrtvých implantací k celkovým implantacím v kontrolní skupině.

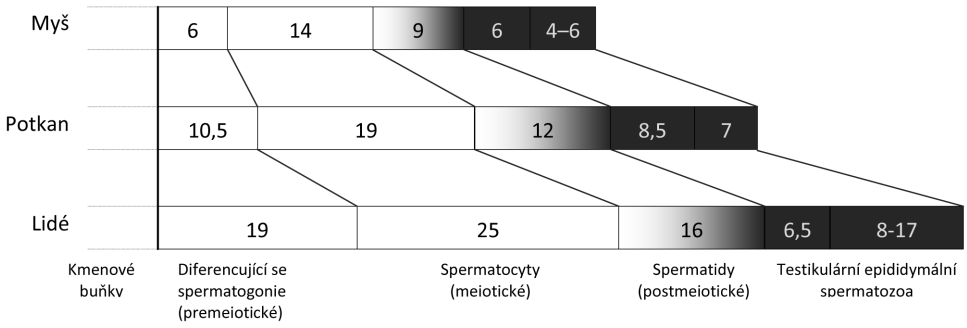
Zkoušená chemická látka: jakákoli látka nebo směs zkoušená touto zkušební metodou.

UVCB: chemická látka s neznámým nebo proměnlivým složením, komplexní reakční produkt nebo biologický materiál.

▼**M8**

Dodatek 2

NAČASOVÁNÍ SPERMATOGENEZE U SAVCŮ



Obr. 1: Srovnání délky (ve dnech) vývoje samčích zárodečných buněk u myší, potkanů a člověka. V průběhu dob vyznačených stínováním nedochází k opravě DNA.

Výše je znázorněno schéma spermatogeneze u myší, potkanů a u člověka (převzato z Adler, 1996). Nediferencované spermatogonie zahrnují: spermatogonie A_s (single), spermatogonie A_p (paired), a spermatogonie A_{al} (aligned) (Hess and de Franca, 2008). Spermatogonie A_s se považují za pravé kmenové buňky, aby tedy bylo možné posoudit účinky na kmenové buňky, musí uplynout alespoň 49 dnů (u myší) mezi poslední injekcí zkoušené chemické látky a pářením.

Odkazy

Adler, ID (1996). Comparison of the duration of spermatogenesis between rodents and humans. Mutat Res, 352:169-172.

Hess, RA, De Franca LR (2008). Spermatogenesis and cycle of the seminiferous epithelium. In: Molecular Mechanisms in Spermatogenesis, C. Yan Cheng (Ed), Landes Biosciences and Springer Science&Business Media:1-15.

▼**M8**

B.23 **ZKOUŠKA NA CHROMOZOMOVÉ ABERACE VE SPERMATOGONIÍCH SAVCŮ**

ÚVOD

1. Tato zkušební metoda je rovnocenná Pokynu OECD pro zkoušení (TG) č. 483 (2016). Zkušební metody se pravidelně přezkoumávají s ohledem na vědecký pokrok, měnící se potřeby regulace a dobré životní podmínky zvířat. Tato upravená verze zkušební metody odráží mnoho let zkušeností s touto zkouškou a možnost integrovat nebo sloučit tuto zkoušku s jinými studiemi toxicity nebo genotoxicity. Kombinování studií toxicity může snížit počty zvířat používaných na zkoušky toxicity. Tato zkušební metoda je součástí série zkušebních metod genetické toxikologie. OECD vypracovala dokument, který obsahuje stručné informace o zkoušení v oblasti genetické toxikologie a přehled posledních změn, které OECD provedla ve svých pokynech ke zkoušení genotoxicity (1).

2. Účelem zkoušky na chromozomové aberace ve spermatogoniích savců *in vivo* je identifikovat takové chemické látky, které způsobují strukturní chromozomové aberace ve spermatogoniích savců (2) (3) (4). Zkouška je dále zvláště významná k posouzení genotoxicity, neboť zde probíhá aktivní metabolismus *in vivo*, farmakokinetika a procesy reparace DNA, které přispívají k účinku testované látky, jakkoli mohou být různé u různých druhů. Tato zkušební metoda není určena k měření numerických abnormalit; k tomuto účelu se tato zkouška nepoužívá rutinně.

3. Touto zkouškou se stanovují strukturní chromozomové aberace (chromozomového i chromatidového typu) v dělících se spermatogoniálních zárodečných buňkách a předpokládá se tedy, že tato zkouška poskytne předpověď indukce dědičných mutací v těchto zárodečných buňkách.

4. Definice nejdůležitějších výrazů jsou uvedeny v dodatku.

VÝCHOZÍ ÚVAHY

5. Při této zkoušce jsou běžně používáni hlodavci, avšak v některých případech, je-li to vědecky zdůvodněno, mohou být vhodné i jiné druhy. Standardní cytogenetické preparáty z varlat hlodavců generují mitotické (spermatogonie) a meiotické (spermatocyt) metafáze. Mitotické a meiotické metafáze se identifikují podle morfologie chromozomů (4). Touto cytogenetickou zkouškou *in vivo* se detekují strukturní chromozomové aberace při mitóze spermatogonií. Jiné cílové buňky nejsou předmětem této zkušební metody.

6. Pro detekci aberací chromatidového typu ve spermatogoniích by mělo být vyšetřeno první mitotické buněčné dělení, které následuje po expozici, než se tyto aberace přemění při dalším buněčném dělení na aberace chromozomového typu. Další informace z exponovaných spermatocytů lze získat meiotickou chromozomovou analýzou strukturních aberací chromozomového typu v diakinese-metafázi I a metafázi II.

▼**M8**

7. Ve varlatech je přítomna řada generací spermatogonií (5), přičemž tyto různé druhy zárodečných buněk mohou mít různou citlivost na expozici chemické látce. Detekované aberace tedy představují souhrnnou odezvu exponovaných populací spermatogonií. Většinu mitotických buněk v preparátech z varlat tvoří spermatogonie B, které mají buněčný cyklus přibližně 26 hodin (3).

8. Jestliže existuje důkaz o tom, že se zkoušená chemická látka nebo její metabolit (metabolity) nedostanou do varlat, není vhodné tuto zkoušku použít.

PRINCIP ZKUŠEBNÍ METODY

9. Zvířata jsou obvykle vhodným způsobem exponována zkoušené chemické látce a po vhodné době po expozici utracena. Před utracením se zvířatům podá látka zastavující metafázi (např. kolchicin nebo Colcemid®). Ze zárodečných buněk se poté připraví preparáty chromozomů, obarví se a analyzují se chromozomové aberace metafázujících buněk.

OVĚŘENÍ ODBORNÉ ZPŮSOBILOSTI LABORATOŘE

10. Způsobilost pro tuto zkoušku by měla být stanovena na základě doložení schopnosti reprodukovat očekávané výsledky četností strukturních chromozomálních aberací ve spermatogoniích s látkami pozitivní kontroly (včetně slabých reakcí), např. s látkami uvedenými v tabulce 1, a získáním četností negativní kontroly, které odpovídají přijatelnému rozpětí kontrolních údajů v publikované literatuře (např. (2)(3)(6)(7)(8)(9)(10)) nebo dosavadní distribuci kontrol v laboratoři, je-li k dispozici.

POPIS METODY

Příprava

Výběr zvířecích druhů

11. Měly by být použity běžně používané laboratorní kmeny zdravých mladých pohlavně dospělých zvířat. Obvykle se používají myši samci; mohou však být použiti i samci jiných vhodných savců, je-li to vědecky zdůvodněno a jestliže to umožňuje provedení této zkoušky ve spojení s jinou zkušební metodou. Vědecké zdůvodnění použití jiných druhů než hlodavců by mělo být uvedeno ve zprávě.

Podmínky chovu a krmení zvířat

12. Teplota v místnosti pro zvířata by u hlodavců měla být 22 °C (± 3 °C). Relativní vlhkost vzduchu by v ideálním případě měla být 50–60 %, ale minimálně 40 %, a neměla by pokud možno přesáhnout 70 % kromě doby úklidu místnosti. Osvětlení by mělo být umělé a mělo by se střídat 12 hodin světla a 12 hodin tmy. Ke krmení lze použít konvenční laboratorní krmivo s neomezeným přísunem pitné vody. Výběr druhu potravy může být ovlivněn její dostatečnou mísitelností se zkoušenou chemickou látkou, je-li látka podávána tímto způsobem. Hlodavci by měli být chováni v malých skupinách (nejvýše po pěti v každé kleci), pokud se nepředpokládá agresivní chování, přednostně v klecích s pevnou podlahou s vhodnou úpravou prostředí. Je-li to z vědeckého hlediska důvodné, mohou být zvířata v klecích individuálně.

▼M8

Příprava zvířat

13. Obvykle se používají zdraví mladí dospělí samci (ve stáří 8–12 týdnů na začátku expozice), kteří se náhodně rozdělí do kontrolní a experimentální skupiny. Jednotlivá zvířata se jednoznačně identifikují humánní, co nejméně invazivní metodou (např. kroužkováním, označením štítkem, pomocí mikročipu nebo biometrické identifikace, avšak nikoli nastřihnutím ucha nebo prstu dolní končetiny) a nechají se v laboratorních podmínkách alespoň pět dní aklimatizovat. Klece by měly být uspořádány tak, aby byl vliv umístění klecí minimalizován. Mělo by se zabránit vzájemné kontaminaci pozitivní kontroly a zkoušené chemické látky. V okamžiku zahájení studie by měla být odchylka v hmotnosti zvířat minimální a neměla by překročit ± 20 %.

Příprava dávek

14. Pevné zkoušené chemické látky by se měly rozpustit nebo suspendovat ve vhodných rozpouštědlech nebo vehikulech nebo by měly být přimíchány do potravy nebo pitné vody před podáním dávky zvířatům. Kapalné zkoušené chemické látky mohou být podávány přímo nebo se před podáním zředí. Pro účely expozice inhalací lze zkoušené chemické látky v závislosti na jejich fyzikálně-chemických vlastnostech podávat jako plyn, páru nebo pevný/kapalný aerosol. Používat by se měla čerstvě připravená zkoušená chemická látka, pokud údaje o stabilitě neprokazují možnost skladování a nestanoví vhodné podmínky pro skladování.

Zkušební podmínky - rozpouštědlo/vehikulum

15. Rozpouštědlo/vehikulum by nemělo mít při použitých úrovních dávek toxické účinky a nemělo by být schopno chemické reakce se zkoušenými chemickými látkami. Jsou-li použita jiná než známá rozpouštědla/vehikula, mělo by být jejich zařazení podloženo údaji o jejich kompatibilitě. Doporučuje se pokud možno nejprve zvážit použití vodného rozpouštědla nebo vehikula. Jako příklad běžně používaných kompatibilních rozpouštědel/vehikul lze uvést vodu, fyziologický roztok, roztok methylcelulózy, roztok sodné soli karboxymethylcelulózy, olivový olej a kukuřičný olej. Neexistují-li historické nebo publikované kontrolní údaje prokazující, že zvolené atypické rozpouštědlo/vehikulum nevyvolává žádné strukturní chromozomové aberace a jiné zhoubné účinky, měla by být provedena počáteční studie za účelem stanovení přijatelnosti kontroly s tímto rozpouštědlem/vehikulem.

Pozitivní kontroly

16. Pokud laboratoř neprokáže způsobilost k provádění zkoušky a nepoužívala zkoušku rutinně v nedávné minulosti (např. v posledních 5 letech), měla by být vždy používána zvířata pro souběžné pozitivní kontroly. Není-li zařazena souběžná pozitivní kontrolní skupina, měly by být v každém experimentu zařazeny hodnotící kontroly (fixované a neobarvené preparáty). Tyto hodnotící kontroly lze získat tak, že se do hodnocení studie zařadí vhodné referenční vzorky, které byly získány a uchovány ze samostatného experimentu s pozitivními kontrolami prováděného pravidelně (např. každých 6–18 měsíců) v laboratoři, kde se provádí daná zkouška; například během testování způsobilosti a poté pravidelně podle potřeby.

17. Látky pro pozitivní kontrolu by měly spolehlivě vyvolat pozorovatelné zvýšení výskytů buněk se strukturními chromozomovými aberacemi nad spontánní úrovně. Dávky pozitivní kontroly by měly být zvoleny tak, aby byly účinky zřetelné, ale aby hodnotitel okamžitě nezjistil identitu kódovaného preparátu. Příklady pozitivních kontrolních látek jsou uvedeny v tabulce 1.

▼M8

Tabulka 1

Příklady látek pro pozitivní kontroly

Látky [č. CAS] (referenční číslo)
cyklofosfamid (cyklofosfamid monohydrát) [CAS č. 50-18-0 (CAS č. 6055-19-2)] (9)
cyklohexylamin [CAS č. 108-91-8] (7)
mitomycin C [CAS č. 50-07-7] (6)
monomer akrylamidu [CAS 79-06-1] (10)
triethylenmelamin [CAS 51-18-3] (8)

Negativní kontroly

18. Součástí každého odběru vzorků by měla být negativní kontrolní zvířata, jimž je aplikováno pouze rozpouštědlo nebo vehikulum, ale jinak se s nimi zachází stejně jako s experimentálními skupinami. Nejsou-li k dispozici historické nebo zveřejněné kontrolní údaje, které by ukazovaly, že vybrané rozpouštědlo/vehikulum nevyvolává žádné chromozomové aberace nebo jiné zhoubné účinky, měla by být do každého odběru vzorků zahrnuta neexponovaná kontrolní zvířata pro posouzení účinku vehikula.

POSTUP

Počet zvířat

19. Velikost skupin při zahájení studie by měla být stanovena tak, aby poskytla minimálně pět samců na skupinu. Tento počet zvířat na skupinu se považuje za dostatečný k dosažení adekvátní statistické síly (tj. obvykle takové, aby bylo možno zjistit nejméně zdvojnásobení četnosti chromozomových aberací, když je úroveň negativní kontroly 1,0 % nebo více, s 80 % pravděpodobností na hladině spolehlivosti 0,05) (3) (11). Určitým vodítkem pro typické maximální požadavky na počet zvířat může být, že studie při dvou odběrech se třemi skupinami exponovanými dávce a s jednou souběžnou negativní kontrolní skupinou plus jednou pozitivní kontrolní skupinou (každá složena z pěti zvířat na skupinu) by vyžadovala 45 zvířat.

Plán expozice

20. Zkoušené chemické látky jsou zpravidla podávány jednorázově (tj. při jedné expozici); mohou být použity i jiné režimy dávkování za předpokladu, že jsou vědecky odůvodněné.

21. Ve skupině s nejvyšší dávkou by měly být po expozici provedeny dva odběry. Poněvadž doba nezbytná pro příjem a metabolismus zkoušené chemické látky (látek) a rovněž pro účinky na kinetiku buněčného cyklu může mít vliv na optimální časový interval pro detekci chromozomových aberací, provede se jeden časný odběr a jeden pozdější odběr přibližně 24 hodin a 48 hodin po expozici. V případě jiné než nejvyšší dávky by měl být časný odběr proveden po 24 hodinách (v době kratší nebo rovnající se buněčnému cyklu spermatogonie B, což umožňuje optimalizovat pravděpodobnost hodnocení prvních metafází po expozici) po expozici, pokud není známa a odůvodněna jiná vhodnější doba.

22. Odběry mohou být provedeny také v jiné době. Například v případě chemických látek, které mohou způsobovat S-nezávislé účinky, mohou být vhodnější časnější odběry (tj. po méně než 24 hodinách).

▼M8

23. Může být použit režim opakované aplikace dávky, například ve spojení se zkouškou jiné sledované vlastnosti, který používá podávání po dobu 28 dnů (např. zkušební metoda B.58); bylo by však potřeba použít další skupiny zvířat, aby vyhovovaly různým dobám odběru vzorků. Vhodnost takového plánu pak musí být vědecky odůvodněna případ od případu.

24. Před usmrcením se zvířatům intraperitoneálně podá vhodná dávka chemické látky zastavující metafázi (např. Colcemid® nebo kolchicin). Poté se po vhodné době provede u zvířat odběr. U myší a potkanů je tato doba přibližně 3–5 h.

Dávkování

25. Provádí-li se předběžná studie ke stanovení rozsahu dávek, poněvadž ještě nejsou k dispozici vhodné údaje, které by mohly pomoci při stanovení dávek, měla by podle doporučení k provádění studií ke stanovení rozsahu dávek být provedena ve stejné laboratoři, se stejným druhem, kmenem a za stejného režimu expozice, které se použijí v hlavní studii (12). Cílem této studie by mělo být zjistit maximální tolerovanou dávku (MTD), která je definována jako dávka vyvolávající slabé toxické účinky po dobu trvání zkoušky (například nenormální chování nebo reakce, menší pokles tělesné hmotnosti nebo cytotoxicita hematopoetického systému), nikoli však smrt nebo důkazy o bolesti, utrpení nebo strádání vyžadující utracení zvířat (13).

26. Nejvyšší dávka může být také definována jako dávka vyvolávající ve spermatogoniích některé známky toxicity (např. snížení počtu spermatogonií v mitóze vzhledem k první a druhé meiotické metafázi). Toto snížení by nemělo překročit 50 %.

27. Zkoušené chemické látky se specifickým biologickým působením při nízkých netoxických dávkách (jako jsou hormony a mitogeny) a chemické látky, které vykazují saturaci toxikokinetických vlastností, mohou představovat výjimky z kritérií stanovení dávek a každý případ by měl být hodnocen individuálně.

28. Aby bylo možné získat informace o odezvě na dávku, měla by úplná studie zahrnovat negativní kontrolní skupinu (odstavec 18) a minimálně tři úrovně dávek, které jsou zpravidla odstupňovány faktorem 2, avšak nepřevyšujícím 4. Pokud ve studii ke stanovení rozsahu dávek nebo na základě stávajících údajů zkoušená chemická látka nevyvolává toxicitu, měla by nejvyšší dávka při jednorázovém podávání odpovídat 2 000 mg/kg tělesné hmotnosti. Pokud však zkoušená chemická látka způsobuje toxicitu, měla by být největší podávanou dávkou maximální tolerovaná dávka a úrovně dávek by měly přednostně pokrývat rozmezí od maximální dávky až po dávku vyvolávající malou toxicitu nebo nevyvolávající žádnou toxicitu. Je-li toxicita pro cílovou tkáň (tj. varlata) pozorována na všech testovaných úrovních dávek, doporučuje se další studie s netoxickými dávkami. Studie, jejichž cílem je úplnější charakteristika kvantitativních informací o dávce a odezvě, mohou vyžadovat zařazení doplňkových skupin zvířat exponovaných dalším dávkám. Pro některé typy zkoušených chemických látek (např. humánních léčivých přípravků), na něž se vztahují specifické požadavky, se tyto limity mohou lišit. Pokud zkoušená chemická látka vyvolává toxicitu, měla by být zvolena limitní dávka plus dvě nižší dávky (jak je popsáno výše). Limitní dávka je 1 000 mg/kg tělesné hmotnosti/den při době podávání 14 dní, nebo delší nebo 2 000 mg/kg tělesné hmotnosti/den při dobách podávání kratších než 14 dní.

▼M8

Podávání dávek

29. Při plánování zkoušky by měl být zvážen předpokládaný způsob expozice člověka. Proto lze zvolit odůvodněné způsoby expozice např. potravou, v pitné vodě, lokálně, subkutánně, nitrožilně, orálně (pomocí žaludeční sondy), inhalací nebo implantací. Způsob podávání by měl být v každém případě zvolen tak, aby zajistil odpovídající expozici cílové tkáně. Intraperitoneální aplikace se většinou nedoporučuje, pokud to není vědecky odůvodněno, protože to obvykle není fyziologicky relevantní způsob expozice člověka. Je-li zkoušená chemická látka přimíchána do potravy nebo pitné vody, zejména v případě jednorázové dávky, mělo by se dbát na to, že prodleva mezi příjmem krmiva a vody a odběrem vzorku by měla být dostatečná, aby umožnila detekci účinků (viz odstavec 33). Maximální objem kapaliny, který lze najednou podat žaludeční sondou nebo injekčně, závisí na velikosti pokusného zvířete. Toto množství by obvykle nemělo překročit 1 ml/100 g tělesné hmotnosti, s výjimkou vodných roztoků, kde lze použít maximálně 2 ml/100 g tělesné hmotnosti. Použití větších objemů, než jsou tyto (pokud je povolují právní předpisy o šetrném zacházení se zvířaty), je třeba odůvodnit. Kolísání objemu zkoušené chemické látky by se mělo omezit nastavením koncentrace tak, aby se zajistil konstantní objem v závislosti na tělesné hmotnosti na všech úrovních dávek.

Pozorování

30. Všeobecné klinické pozorování pokusných zvířat a záznam klinických příznaků by se měly provádět nejméně jednou denně, přednostně ve stejnou dobu (stejné doby) a s uvážením doby očekávaného maximálního účinku po podání látky. Nejméně dvakrát denně by měla být provedena prohlídka všech zvířat za účelem zjištění morbidity a mortality. Všechna zvířata by měla být zvážena na počátku studie, nejméně jednou týdně během studií s opakovanou dávkou a při utracení. Při studiích s alespoň týdenním trváním by se alespoň jednou týdně měla změřit spotřeba krmiva. Pokud je zkoušená chemická látka podávána v pitné vodě, měla by se spotřeba vody měřit při každé výměně vody a alespoň jednou týdně. Zvířata, která vykazují neletální indikátory nadměrné toxicity, by měla být utracena před uplynutím doby zkoušky (13).

Příprava preparátů pro analýzu chromosomů

31. Ihned po usmrcení se z jednoho nebo obou varlat získá suspenze zárodečných buněk, hypotonizuje se a fixuje podle stanovených protokolů (např. (2) (14) (15)). Poté se nanese na podložní sklíčka a obarví se (16) (17). Všechna sklíčka by měla být zakódována, aby hodnotitel neznal jejich identifikaci.

Analýza

32. U každého zvířete by mělo být posouzeno alespoň 200 buněk v dobře rozprostřené metafázi (3) (11). Jestliže je historická četnost negativních kontrol < 1 %, mělo by být posouzeno více než 200 buněk / zvíře, aby se zvýšila statistická síla (3). Používat by se měly takové metody barvení, které umožňují identifikaci centromery.

33. Chromozomové a chromatidové aberace by měly být zaznamenávány odděleně a klasifikovány podle podtypů (zlomy, výměny). Při stanovení, zda chemická látka indukuje významné navýšení výskytu buněk s chromozomovými aberacemi, se zaznamenají gapy, ale neberou se v úvahu. Postupy používané v laboratoři by měly zajistit, aby analýzu chromozomových

▼M8

aberací prováděli dobře odborně připravení hodnotitelé. Vzhledem k tomu, že při přípravě preparátů často dochází k poškození části buněk v metafázi s následnou ztrátou chromozomů, měly by vyšetřované buňky obsahovat centromery v počtu nejméně $2n \pm 2$, kde n je haploidní počet chromozomů pro daný druh.

34. I když je účelem zkoušky detekovat strukturní chromozomové aberace, je důležité zaznamenat četnost polyploidních buněk a buněk s endoreduplikovanými chromozomy, pokud jsou tyto jevy pozorovány (viz odstavec 44).

ÚDAJE A PŘEDKLÁDÁNÍ ZPRÁV

Zpracování výsledků

35. Údaje pro jednotlivá zvířata by měly být zpracovány ve formě tabulky. Pro každé zvíře by měl být vyhodnocen počet buněk se strukturními chromozomovými aberacemi a počet chromozomových aberací na buňku. Chromatidové a chromozomové aberace klasifikované podle podtypů (zlomy, výměny) by měly být uvedeny odděleně spolu s jejich počty a četností v experimentálních a kontrolních skupinách. Gapy se zaznamenávají zvlášť. Četnost výskytu gapů se zaznamenává, ale do analýzy celkové četnosti strukturních chromozomových aberací se nezahrnuje. Zaznamená se procentuální podíl polyploidie a/nebo endoreduplikovaných chromozomů, pokud jsou pozorovány.

36. Měly by být uvedeny údaje o toxicitě a klinických příznacích (podle odstavce 30).

Kritéria přijatelnosti

37. Přijatelnost zkoušky určují tato kritéria.

— Souběžná negativní kontrola odpovídá publikovaným normám pro historické údaje o negativní kontrole, které by obvykle měly být > 0 % a $\leq 1{,}5$ % buněk s chromozomovými aberacemi, a historickým kontrolním údajům laboratoře, jsou-li k dispozici (viz odstavce 10 a 18).

— Souběžné pozitivní kontroly vyvolávají odezvy, které odpovídají publikovaným normám pro historické údaje o pozitivní kontrole a historickým pozitivním kontrolním údajům laboratoře, jsou-li k dispozici, a vyvolávají statisticky významný nárůst v porovnání s negativní kontrolou (viz odstavce 17, 18).

— Byl analyzován přiměřený počet buněk a dávek (viz odstavce 28 a 32).

— Kritéria pro výběr nejvyšší dávky jsou v souladu s kritérii popsanými v odstavcích 25 a 26.

38. Je-li pozorována mitóza i meióza, měl by být jako míra cytotoxicity stanoven u všech exponovaných zvířat a zvířat sloužících jako negativní kontrola poměr spermatogonií v mitóze vzhledem k první a druhé meiotické metafázi, a to v celkovém vzorku 100 dělících se buněk na jedno zvíře. Pokud je sledována pouze mitóza, nejméně v 1 000 buňkách na zvíře by měl být stanoven mitotický index.

Hodnocení a interpretace výsledků

39. Aby byly k dispozici dostatečné údaje pro analýzu vztahu dávky a odezvy, měly by být analyzovány nejméně tři exponované skupiny.

▼**M8**

40. Za předpokladu, že všechna kritéria přijatelnosti byla splněna, lze zkoušenou chemickou látku považovat za jasně pozitivní, pokud:

— alespoň jedna ze zkoušených dávek vykazuje statisticky významný nárůst v porovnání se souběžně provedenou negativní kontrolou,

— nárůst je závislý na dávce alespoň při jednom odběru vzorků, a

— všechny výsledky jsou mimo přijatelné rozpětí negativních kontrolních údajů nebo distribuci historických údajů laboratoře o negativních kontrolách (např. mimo 95 % rozmezí dle Poissonova rozdělení), pokud jsou k dispozici.

Pak se má za to, že zkoušená chemická látka je schopna vyvolávat chromozomové aberace ve spermatogoniích pokusných zvířat. Doporučení ohledně nejvhodnějších statistických metod lze též najít v literatuře (11) (18). Použité statistické testy by měly brát v úvahu zvíře jako experimentální jednotku.

41. Za předpokladu, že všechna kritéria přijatelnosti byla splněna, lze zkoušenou chemickou látku považovat za jasně negativní, pokud:

— žádná ze zkušebních dávek nevykazuje statisticky významný nárůst v porovnání se souběžně provedenou negativní kontrolou,

— v žádném experimentálním uspořádání neexistuje nárůst v závislosti na dávce, a dále

— všechny výsledky jsou v přijatelném rozpětí negativních kontrolních údajů nebo distribuci historických údajů laboratoře o negativních kontrolách (např. v 95 % rozmezí dle Poissonova rozdělení), pokud jsou k dispozici.

Pak se má za to, že zkoušená chemická látka není schopna vyvolávat chromozomové aberace ve spermatogoniích pokusných zvířat. Doporučení ohledně nejvhodnějších statistických metod lze též najít v literatuře (11) (18). Negativní výsledek nevylučuje možnost, že chemická látka může indukovat chromozomální aberace v pozdějších fázích vývoje, které nejsou studovány, nebo genové mutace.

42. Ověření jasně pozitivní či jasně negativní odezvy se nepožaduje.

43. Jestliže odezva není jasně negativní nebo pozitivní, a s cílem napomoci při stanovení biologického významu výsledku (např. slabý nebo okrajový nárůst), by měly být údaje vyhodnoceny na základě odborného posouzení a/nebo dalším vyšetřením s využitím stávajících experimentálních údajů, jako je skutečnost, zda je pozitivní výsledek mimo přijatelné rozpětí negativních kontrolních údajů nebo historických negativních kontrolních údajů laboratoře (19).

44. Ve vzácných případech ani po dalším šetření nebude možné na základě daného souboru údajů dospět k závěru o pozitivitě či negativitě výsledku, a bude proto učiněn závěr, že výsledek je neurčitý.

45. Nárůst počtu polyploidních buněk může znamenat, že zkoušená chemická látka má schopnost potlačit mitotické procesy a indukovat numerické chromozomové aberace (20). Nárůst počtu buněk s endoreduplikovanými chromozomy může znamenat, že zkoušená chemická látka má schopnost potlačit progresi buněčného cyklu (21) (22), což je jiný mechanismus indukování numerických chromozomových změn než inhibice mitotických procesů (viz odstavec 2). Výskyt polyploidních buněk a buněk s endoreduplikovanými chromozomy by se proto měl zaznamenat odděleně.

▼M8

ZÁVĚREČNÁ ZPRÁVA

46. Závěrečná zpráva by měla obsahovat tyto informace:

Shrnutí.

Zkoušená chemická látka:

— zdroj, číslo šarže, a je-li k dispozici, datum použitelnosti,

— stabilita zkoušené chemické látky samotné, je-li známa,

— rozpustnost a stabilita zkoušené chemické látky v rozpouštědle, jsou-li známy,

— měření pH, případně osmolality a sraženiny v kultivačním médiu, do něhož byla přidána zkoušená chemická látka.

Jednosložková látka:

— fyzický vzhled, rozpustnost ve vodě a další relevantní fyzikálně-chemické vlastnosti,

— chemická identifikace, např. název podle IUPAC nebo CAS, číslo CAS, kód SMILES nebo InChI, strukturní vzorec, čistota, případně chemická identita nečistot, je-li to prakticky možné, atd.

Vícesložková látka, látka s neznámým nebo proměnlivým složením, komplexní reakční produkt nebo biologický materiál a směsi:

— charakterizované pokud možno chemickou identitou (viz výše), kvantitativním výskytem a relevantními fyzikálně-chemickými vlastnostmi složek.

Příprava zkoušené chemické látky:

— zdůvodnění volby vehikula,

— rozpustnost a stabilita zkoušené chemické látky v rozpouštědle/vehikulu,

— příprava potravy, pitné vody nebo inhalačních aplikačních forem,

— analytická stanovení aplikační formy (např. stabilita, homogenita, nominální koncentrace), pokud se provádí.

Pokusná zvířata:

— použitý druh/kmen a odůvodnění jeho použití,

— počet a věk zvířat,

— původ, podmínky chovu, strava atd.,

— metoda jednoznačného označení zvířat,

— u krátkodobých studií: hmotnost jednotlivých zvířat na začátku a na konci zkoušky, u studií trvajících déle než jeden týden: hmotnosti jednotlivých zvířat během studie a spotřeba potravy. Mělo by být uvedeno rozpětí tělesné hmotnosti, střední hodnota a směrodatná odchylka pro každou skupinu.

Zkušební podmínky:

— údaje o pozitivní a negativní (vehikulum/rozpouštědlo) kontrole,

▼M8

— údaje ze studie pro zjištění rozsahu dávek, pokud byla provedena,

— zdůvodnění zvolených úrovní dávek,

— zdůvodnění způsobu podávání,

— podrobnosti o přípravě zkoušené chemické látky,

— podrobné údaje o podávání zkoušené chemické látky,

— zdůvodnění dob usmrcení,

— metody zjišťování toxicity, včetně případně histopatologických nebo hematologických analýz a četnosti, s jakou jsou prováděna pozorování zvířat, a četnosti vážení,

— metody ověřování, zda se zkoušená chemická látka dostala k cílové tkáni, nebo ověřování obecné cirkulace, pokud byly získány negativní výsledky,

— skutečná dávka (v mg na kg tělesné hmotnosti za den) vypočtená z koncentrace zkoušené chemické látky v potravě / pitné vodě (v ppm) a případně ze spotřeby,

— podrobnosti o jakosti krmení a vody,

— podrobný popis harmonogramů aplikace a odběru vzorků a odůvodnění výběru konkrétního schématu,

— způsob utracení,

— způsob analgezie (pokud se používá),

— postupy izolace tkání,

— identifikace chemické látky zastavující metafázi, její koncentrace a délka aplikace,

— metody přípravy preparátů,

— kritéria hodnocení aberací,

— počet analyzovaných buněk na jedno zvíře,

— kritéria klasifikace studie na pozitivní, negativní nebo dvojznačnou.

Výsledky:

— stav zvířat před zkouškou a během zkoušky, včetně známek toxicity,

— tělesná hmotnost a hmotnost orgánů při utracení (pokud se používá více režimů expozice, tělesná hmotnost stanovená v průběhu režimu aplikace),

— známky toxicity,

— mitotický index,

— poměr spermatogonií v mitóze vzhledem k první a druhé metafázi meiózy nebo jiný průkaz expozice cílové tkáni,

— typ a počet aberací uvedený samostatně pro každé zvíře,

— celkový počet aberací ve skupině se středními hodnotami a směrodatnými odchylkami,

▼**M8**

— počet buněk s aberacemi ve skupině se středními hodnotami a směrodatnými odchylkami.

— podle možnosti závislost odezvy na dávce,

— použité statistické analýzy a metody,

— údaje o souběžné negativní kontrole,

— historické údaje o negativních kontrolách s rozpětími, středními hodnotami a směrodatnými odchylkami a 95 % interval spolehlivosti (je-li k dispozici), nebo publikované historické údaje o negativních kontrolách použité pro přijatelnost výsledků zkoušky,

— údaje o souběžné pozitivní kontrole,

— změny ploidie, byly-li pozorovány, včetně četností polyploidie a/nebo endoreduplikovaných buněk.

Diskuse o výsledcích

Závěr

LITERATURA

(1) OECD (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, No. Series on Testing and Assessment, No 234, OECD, Paris

(2) Adler, I.-D. (1984). Cytogenetic Tests in Mammals. In: Mutagenicity Testing: a Practical Approach. Ed. S. Venitt and J. M. Parry. IRL Press, Oxford, Washington DC, pp. 275-306.

(3) Adler I.-D., Shelby M. D., Bootman, J., Favor, J., Generoso, W., Pacchierotti, F., Shibuya, T. and 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, 313-318.

(4) Russo, A. (2000). *In Vivo* Cytogenetics: Mammalian Germ Cells. Mutation Res., 455, 167-189.

(5) Hess, R.A. and de Franca L.R. (2008). Spermatogenesis and Cycle of the Seminiferous Epithelium. In: Molecular Mechanisms in Spermatogenesis, Cheng C.Y. (Ed.) Landes Bioscience and Springer Science+Business Media, pp. 1-15.

(6) Adler, I.-D. (1974). Comparative Cytogenetic Study after Treatment of Mouse Spermatogonia with Mitomycin C, Mutation. Res., 23(3): 368-379.Adler, I.D. (1986). Clastogenic Potential in Mouse Spermatogonia of Chemical Mutagens Related to their Cell-Cycle Specifications. In: Genetic Toxicology of Environmental Chemicals, Part B: Genetic Effects and Applied Mutagenesis, Ramel C., Lambert B. and Magnusson J. (Eds.) Liss, New York, pp. 477-484.

(7) Cattanach, B.M., and Pollard C.E. (1971). Mutagenicity Tests with Cyclohexylamine in the Mouse, Mutation Res., 12, 472-474.

(8) Cattanach, B.M., and Williams, C.E. (1971). A search for Chromosome Aberrations Induced in Mouse Spermatogonia by Chemical Mutagens, Mutation Res., 13, 371-375.

(9) Rathenburg, R. (1975). Cytogenetic Effects of Cyclophosphamide on Mouse Spermatogonia, Humangenetik 29, 135-140.

▼**M8**

(10) Shiraishi, Y. (1978). Chromosome Aberrations Induced by Monomeric Acrylamide in Bone Marrow and Germ Cells of Mice, Mutation Res., 57(3): 313–324.

(11) Adler I-D., Bootman, J., Favor, J., Hook, G., Schriever-Schwemmer, G., Welzl, G., Whorton, E., Yoshimura, I. and Hayashi, M. (1998). Recommendations for Statistical Designs of *In Vivo* Mutagenicity Tests with Regard to Subsequent Statistical Analysis, Mutation Res., 417, 19–30.

(12) 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. and Richold, M. (1992). Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group: Dose setting in *In Vivo* Mutagenicity Assays. Mutagenesis, 7, 313-319.

(13) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation, Series on Testing and Assessment, (No 19.), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(14) Yamamoto, K. and Kikuchi, Y. (1978). A New Method for Preparation of Mammalian Spermatogonial Chromosomes. Mutation Res., 52, 207-209.

(15) Hsu, T.C., Elder, F. and Pathak, S. (1979). Method for Improving the Yield of Spermatogonial and Meiotic Metaphases in Mammalian Testicular Preparations. Environ. Mutagen., 1, 291-294.

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

(17) Richold, M., Ashby, J., Bootman, J., Chandley, A., Gatehouse, D.G. and Henderson, L. (1990). *In Vivo* Cytogenetics Assays, In: D.J. Kirkland (Ed.) Basic Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report. Part I revised. Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 115-141.

(18) Lovell, D.P., Anderson, D., Albanese, R., Amphlett, G.E., Clare, G., Ferguson, R., Richold, M., Papworth, D.G.and Savage, J.R.K. (1989). Statistical Analysis of *In Vivo* Cytogenetic Assays In: D.J. Kirkland (Ed.) Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing, Report, Part III. Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 184-232.

(19) Hayashi, M., Dearfield, K., Kasper, P., Lovell, D., Martus, H.-J. and Thybaud, V. (2011). Compilation and Use of Genetic Toxicity Historical Control Data. Mutation Res., 723, 87-90.

(20) Warr T.J., Parry E.M. and Parry J.M. (1993). A Comparison of Two *In Vitro* Mammalian Cell Cytogenetic Assays for the Detection of Mitotic Aneuploidy Using 10 Known or Suspected Aneugens, Mutation Res., 287, 29-46.

(21) Huang, Y., Change, C. and Trosko, J.E. (1983). Aphidicolin-Induced Endoreduplication in Chinese Hamster Cells. Cancer Res., 43, 1362-1364.

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

▼M8

Dodatek

DEFINICE

Aneuploidie: jakákoli odchylka od normálního diploidního (nebo haploidního) počtu chromozomů o jeden nebo více chromozomů, avšak nikoli o celou sadu (nebo více sad) chromozomů (polyploidie).

Centromera: oblast (oblasti) chromozomu, k níž (k nimž) se během dělení buněk připojí dělicí vřeténko umožňující uspořádaný pohyb dceřiných chromozomů k pólům dceřiných buněk.

Chemická látka: látka nebo směs.

Rozmanitost chromozomů: rozmanitost tvarů (např. metacentrické, akrocentrické atd.) a velikostí chromozomů.

Chromatidová aberace: strukturní poškození chromozomu v podobě zlomu jedné chromatidy nebo zlomu a opětného spojení chromatid.

Chromozomová aberace: strukturní poškození chromozomu v podobě zlomu nebo zlomu a spojení obou chromatid v tomtéž místě.

Klastogen: jakákoli chemická látka, která způsobuje strukturní chromozomové aberace v populacích buněk nebo organismů.

Gap: achromatická léze menší než šířka jedné chromatidy a s minimálním přerušením chromatid.

Genotoxický: obecný termín zahrnující všechny typy poškození DNA nebo chromozomů včetně jejich rozlámání, delecí, aduktů, modifikací a propojení nukleotidů, přestavby, mutací, chromozomových aberací a aneuploidie. Ne všechny druhy genotoxických účinků způsobují mutace nebo stálé poškození chromozomů.

Mitotický index (MI): poměr buněk v metafázi vydělený celkovým počtem buněk zjištěných v populaci buněk; udává stupeň proliferace této populace.

Mitóza: proces dělení buněčného jádra, který se obvykle člení na profázi, prometafázi, metafázi, anafázi a telofázi.

Mutagenní: produkující dědičné změny sekvence (sekvencí) párů bází DNA v genech nebo struktury chromozomů (chromozomové aberace).

Numerická abnormalita: odchylka počtu chromozomů od normálního počtu obvyklého u použitých zvířat.

Polyploidie: násobek haploidního počtu chromozomových sad (n) jiný než diploidní (tj. $3n$, $4n$ atd.).

Strukturní aberace: mikroskopicky pozorovatelné změny struktury chromozomů při buněčném dělení ve stadiu metafáze; jeví se jako delece a fragmenty, výměny.

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

UVCB: chemické látky s neznámým nebo proměnlivým složením, komplexní reakční produkty nebo biologický materiál.

▼M7

_____

▼B

B.25 ZKOUŠKA NA DĚDIČNOU TRANSLOKACI U MYŠÍ

1. METODA

1.1 ÚVOD

Viz obecný úvod, část B.

1.2 DEFINICE

Viz obecný úvod, část B.

1.3 REFERENČNÍ LÁTKY

Žádné.

1.4 PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

Zkouška na dědičnou translokaci u myší detekuje strukturní a numerické chromosomové změny v savčích zárodečných buňkách zachycené v první generaci potomků. U pozorovaných chromosomových změn se jedná o reciproční translokace a u samičích potomků o ztráty chromosomu X. Nositelé translokací a samice X0 vykazují sníženou fertilitu, která se využívá pro výběr potomstva F_1 pro cytogenetickou analýzu. Úplná sterilita je způsobena některými typy translokací (autosomální translokací X a translokací typu centromera-telomera). Translokace se analyzují v meiotických buňkách samců ve stadiu diakinézy-metafáze I, tzn. buď u samců generace F_1 nebo samčích potomků samic generace F_1. Samice X0 jsou cytogeneticky identifikovány přítomností pouhých 39 chromosomů v mitózách z kostní dřeně.

1.5 KRITÉRIA JAKOSTI

Nejsou stanovena.

1.6 POPIS ZKUŠEBNÍ METODY

Příprava

Zkoušené chemické látky se rozpustí v isotonickém fyziologickém roztoku. Látky nerozpustné ve vodě se rozpustí nebo suspendují ve vhodných vehikulech. Použijí se čerstvě připravené roztoky zkoušené látky. Jestliže bylo pro usnadnění dávkování látky použito rozpouštědlo, nesmí interferovat se zkoušenou látkou ani vyvolávat toxické účinky.

Způsob podávání

Obvyklými způsoby podávání jsou orální aplikace sondou nebo intraperitoneální injekce. Mohou být vhodné i jiné způsoby aplikace.

Pokusná zvířata

Z důvodu snadnějšího křížení a cytologické verifikace se tyto experimenty provádějí na myších. Nepožaduje se žádný specifický kmen myši. Průměrná velikost vrhu u kmene by však měla být větší než osm potomků a měla by být poměrně stálá.

Používají se zdravá pohlavně dospělá zvířata.

▼B

Počet zvířat

Nezbytný počet zvířat závisí na četnosti spontánních translokací a na minimálním počtu indukovaných translokací požadovaném pro pozitivní výsledek.

Zkouška se obvykle provádí analýzou samců generace F_1. Zkouší se nejméně 500 samců generace F_1 na každou exponovanou skupinu. Jestliže se zahrnou také samice generace F_1, je potřeba 300 samců a 300 samic.

Použití negativních a pozitivních kontrol

Měly by být k dispozici vhodné kontrolní údaje ze souběžné kontroly a z dřívějších pokusů. Jestliže jsou k dispozici přijatelné výsledky pozitivní kontroly z nedávných experimentů provedených v téže laboratoři, mohou být použity namísto souběžných pozitivních kontrol.

Úrovně dávek

Zkouší se jedna úroveň dávky, obvykle nejvyšší dávka vyvolávající minimální toxické účinky, avšak bez vlivu na reprodukční chování nebo přežití. Pro stanovení vztahu dávka/odezva je třeba dvou dalších, nižších dávek. U netoxických látek se použije maximální dosažitelná koncentrace.

Postup

Expozice a páření

Používají se dva plány expozice. Nejčastěji se volí jedno podání zkoušené látky. Je rovněž možné podávat zkoušenou látku sedm dní v týdnu po 35 dnů. Počet oplodnění po expozici se řídí plánem expozice a je třeba zajistit, aby byla analyzována všechna exponovaná buněčná stádia zárodečných buněk. Na konci období páření se samice umístí do oddělených klecí. U každého vrhu se zaznamená datum, velikost vrhu a pohlaví mláďat. Všichni samčí potomci se odstaví a samičí potomci se vyloučí, pokud se nepoužijí v experimentu.

Zjišťování translokačních heterozygotů

Používá se jedna ze dvou možných metod:

— test fertility potomků F_1 a následná verifikace možných nositelů translokací cytogenetickou analýzou,

— cytogenetická analýza všech samců generace F_1 bez předchozího výběru testem fertility.

a) Test fertility

Sníženou fertilitu zvířat v generaci F_1 lze stanovit z velikosti vrhu a/nebo analýzou obsahu dělohy samic.

Kritéria určení běžné a snížené fertility musí být stanovena pro každý použitý kmen myší.

▼B

Pozorování velikosti vrhu: samci generace F_1 určení k testování jsou umístěni samostatně do klecí se samicemi buď ze stejného experimentu, nebo ze stejné kolonie. Klece jsou kontrolovány denně počínaje 18. dnem po spáření. Velikost vrhu a pohlaví generace F_2 se při vrhu zaznamenají a vrh se poté vyloučí. Jestliže jsou testovány samice generace F_1, ponechá se generace F_2 malých vrhů pro další zkoušení. Samice, nositelky translokací, se zjistí cytogenetickou analýzou translokací u jakéhokoliv jejich samčího potomka. Samice X0 se rozpoznají ze změny poměru samců a samic u jejich potomků z 1:1 na 1:2. V následném kroku se normální zvířata generace F_1 vyřadí z dalšího testování, jestliže první vrh generace F_2 dosahuje předem určené normální hodnoty nebo ji překračuje; v opačném případě se pozoruje druhý nebo třetí vrh generace F_2.

Zvířata generace F_1, která po vyhodnocení tří vrhů generace F_2 nemohou být klasifikována jako normální, se dále testují buď analýzou obsahu dělohy, nebo se přímo podrobí cytogenetické analýze.

Analýzy obsahu dělohy: Snížení velikosti vrhu u nositelů translokací je způsobena smrtí embryí, takže vysoký počet mrtvých implantací naznačuje přítomnost translokací u testovaných zvířat. Samci generace F_1 kteří mají být testováni, jsou připouštěni každý ke 2–3 samicím. Oplodnění se zjišťuje denní ranní kontrolou vaginální zátky. Samice se usmrtí po 14–16 dnech a zaznamenají se živé a mrtvé zárodky v jejich děloze.

b) Cytogenetická analýza

Zhotoví se mikroskopické preparáty z varlat usušené na vzduchu. Nosiči translokací se identifikují na základě přítomnosti multivalentních konfigurací ve stádiu diakinézy – metafáze I v primárních spermatocytech. Nález nejméně dvou buněk s multivalentními asociacemi je požadovaným důkazem, že testované zvíře je nositelem translokace.

Jestliže nebyl proveden výběr testem fertility, vyšetří se všichni samci generace F_1 cytogeneticky. U každého samce se mikroskopicky vyšetří nejméně 25 buněk ve stadiu diakinézy – metafáze I. Analýza mitotických metafází ve spermatogoniích nebo v kostní dřeni je nezbytná u samců generace F_1 s malými varlaty a potlačením meiózy před diakinézí, nebo u samic generace F_1 s podezřením na X0. Přítomnost neobvykle dlouhého a/nebo krátkého chromosomu v každé z 10 buněk je důkazem existence částečné samčí translokační sterility (typu centromera-telomera). Některé translokace mezi autosomálními chromosomy a chromozomem X způsobující samčí sterilitu mohou být identifikovány pouze proužkovacími technikami analýzy mitotických chromosomů. Přítomnost 39 chromosomů ve všech 10 mitózách je důkazem, že se jedná o samice X0.

2. **ÚDAJE**

Údaje se zpracují v tabulkové formě.

Pro každý interval páření se zaznamená průměrná velikost vrhu a poměr pohlaví při narození a při odstavení.

▼B

Údaje o fertilitě zvířat generace F_1 musí zahrnovat průměrnou velikost vrhu u všech normálních páření a individuální velikosti vrhů u nositelů translokací generace F_1. U analýzy obsahu dělohy se uvede průměrný počet živých a mrtvých zárodků u normálních páření a individuální počty živých a mrtvých zárodků pro každé páření nositelů translokací generace F_1.

U cytogenetické analýzy diakinéze-metafáze I se pro každého nositele translokací uvede počet typů multivalentních konfigurací a celkový počet buněk.

U sterilních jedinců generace F_1 se uvede počet páření a jejich délka. Uvede se hmotnost varlat a podrobné údaje o cytogenetické analýze.

U samic X0 se uvede průměrná velikost vrhu, poměr pohlaví u generace F_2 a výsledky cytogenetické analýzy.

Pokud byli testem fertility předběžně vybráni možní nositelé translokací generaceF_1, uvede se v tabulkách informace o tom, kolik z nich bylo potvrzeno jako translokační heterozygoti.

Uvedou se údaje z experimentů s negativními a pozitivními kontrolami.

3. **ZPRÁVY**

3.1 PROTOKOL O ZKOUŠCE

Protokol o zkoušce musí pokud možno obsahovat tyto informace:

— kmen myši, stáří a hmotnost exponovaných zvířat,

— počet rodičovských zvířat každého pohlaví v exponovaných a kontrolních skupinách,

— zkušební podmínky, podrobný popis expozice, úrovně dávek, rozpouštědla, použité schéma páření,

— počet a pohlaví mláďat na samici, počet a pohlaví potomků určených pro analýzu translokací,

— doba a kritéria analýzy translokací,

— počet a podrobný popis nositelů translokací, včetně údajů o březosti a popřípadě o obsahu dělohy,

— popis cytogenetické metody a mikroskopické analýzy, pokud možno s obrázky,

— statistické vyhodnocení,

— diskuse o výsledcích,

— interpretace výsledků.

▼B

3.2 HODNOCENÍ A INTERPRETACE

Viz obecný úvod, část B.

4. **LITERATURA**

Viz obecný úvod, část B.

▼B

B.26 ZKOUŠKA SUBCHRONICKÉ ORÁLNÍ STUDIE ORÁLNÍ TOXICITY NA HLODAVCÍCH (90DENNÍ OPAKOVANÁ APLIKACE)

1. METODA

Popisovaná metoda zkoušení subchronické orální toxicity se řídí hlavními zásadami metody OECD TG 408 (1998).

1.1 ÚVOD

Při posouzení a hodnocení toxických vlastností chemické látky lze stanovení subchronické orální toxicity s opakovanou aplikací provést až po získání prvních informací o toxicitě ze zkoušek akutní toxicity a toxicity při 28denní opakované aplikaci. 90denní studie poskytuje informace o možném nebezpečí pro zdraví, které by mohlo vzniknout vlivem opakované expozice v průběhu delšího období, zahrnující vývoj po odstavení až do dospělosti. Studie poskytne informace o hlavních toxických účincích, určí cílové orgány a možnou kumulaci a může poskytnout odhad hladiny bez pozorovatelného nepříznivého účinku, kterou lze použít při výběru úrovní dávek pro chronické studie a pro stanovení bezpečnostních kritérií pro expozici člověka.

Metoda klade dále důraz na neurologické příznaky a naznačuje možné imunologické účinky a účinky na reprodukci. Důraz se klade také na pečlivé klinické pozorování zvířat s cílem získat co nejvíce informací. Tato studie by měla umožnit identifikaci chemických látek, které by mohly vyvolat neurotoxické nebo imunologické účinky nebo mít nepříznivý vliv na reprodukční orgány, a může odůvodnit další hlubší zkoumání.

Viz také obecný úvod, část B.

1.2 DEFINICE

Dávka: množství podané zkoušené látky. Dávka se vyjadřuje jako hmotnost (v g, mg) nebo jako hmotnost zkoušené látky na jednotku hmotnosti pokusného zvířete (např. v mg na kg) nebo jako konstantní koncentrace v potravě (v ppm).

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

NOAEL: anglická zkratka pro termín „no observed adverse effect level“ (hladina bez pozorovaného nepříznivého účinku) a odpovídá nejvyšší úrovni dávky nebo expozice, při které nejsou pozorovány žádné nepříznivé účinky související s podáním látky.

1.3 PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

Zkoušená látka se denně orálně podává v odstupňovaných dávkách několika skupinám pokusných zvířat; každé skupině se podává jedna úroveň dávky 90 dnů. Vprůběhu období podávání se zvířata každý den pečlivě pozorují, aby se zjistily příznaky toxicity. Zvířata, která v průběhu zkoušky uhynula nebo byla utracena, i zvířata, která do konce zkoušky přežila, se pitvají.

▼B

1.4 POPIS ZKUŠEBNÍ METODY

1.4.1 **Příprava zvířat**

Použijí se zdravá zvířata, která se aklimatizovala na laboratorní podmínky nejméně 5 dnů před zahájením zkoušky a nebyla vystavena žádným experimentálním zásahům. Musí být popsán druh, kmen, původ, pohlaví a hmotnost a/nebo věk pokusných zvířat. Zvířata by měla být náhodně přiřazena do kontrolních a experimentálních skupin. Klece by měly být uspořádány tak, aby byl vliv umístění klecí minimalizován. Každému zvířeti by mělo být přiřazeno samostatné identifikační číslo.

1.4.2 **Příprava dávek**

Zkoušená látka se podává sondou nebo v potravě či v pitné vodě. Metoda orálního podání závisí na účelu studie a na fyzikálně-chemických vlastnostech zkoušené látky.

Zkoušená látka se v případě potřeby rozpustí nebo suspenduje ve vhodném vehikulu. Je-li to možné, doporučuje se zvážit použití vodného roztoku/suspense, potom použití roztoku/emulse v oleji (např. v kukuřičném oleji) a nakonec roztoku v jiných vehikulech. U nevodných vehikul by měla být známa jejich toxická charakteristika. Měla by být stanovena stálost zkoušené látky v podmínkách podávání.

1.4.3 **Zkušební podmínky**

1.4.3.1 *Pokusná zvířata*

Dává se přednost potkanům, ale lze použít i jiný druh hlodavců, např. myši. Použity by měly být běžně používané kmeny mladých zdravých zvířat. Samice musí být nullipary a nesmí být březí. Podávání látky by mělo začít co nejdříve po odstavení a v každém případě dříve, než zvířata dosáhnou stáří devíti týdnů. Na začátku studie by měly být odchylky hmotnosti zvířat minimální a neměly by překročit ± 20 % střední hodnoty pro každé pohlaví. Provádí-li se studie jako předběžná studie pro dlouhodobou studii chronické toxicity, měla by být v obou studiích použita zvířata stejného kmene a stejného původu.

1.4.3.2 *Počet a pohlaví*

Pro každou úroveň dávek se použije nejméně 20 zvířat (10 samic a 10 samců). Pokud se budou zvířata usmrcovat v průběhu studie, je nutno zvýšit celkový počet zvířat o počet zvířat, která budou usmrcena před ukončením studie. Na základě dřívějších poznatků o chemické látce nebo jí blízce příbuzné látce by se mělo zvážit i přidání další satelitní skupiny 10 zvířat (5 zvířat každého pohlaví) do kontrolní skupiny a do skupiny s nejvyšší dávkou, aby se po ukončení aplikace mohlo posoudit, zda jsou případné účinky vratné nebo trvalé. Trvání tohoto období po expozici by mělo být vhodně stanoveno s ohledem na pozorované účinky.

▼B

1.4.3.3 *Úrovně dávek*

S výjimkou případů, kdy se provede limitní zkouška (viz bod 1.4.3.4), by měly být použity nejméně tři úrovně dávek a souběžná kontrola. Úrovně dávek je možno stanovit na základě výsledků studií při opakované aplikaci nebo orientačních studií a měly by zohlednit jakékoli existující dostupné toxikologické a toxikokinetické údaje o zkoušené látce nebo o příbuzné látce. Nebrání-li tomu fyzikálně-chemická povaha nebo biologické účinky zkoušené látky, měla by být nejvyšší úroveň dávky zvolena s cílem vyvolat toxicitu, ne však uhynutí nebo velké utrpení. Měla by být zvolena sestupná řada úrovní dávek s cílem prokázat účinky související s dávkou a nepřítomnost nepříznivých účinků při nejnižší úrovni dávky (NOAEL). Často je pro stanovení sestupných úrovní dávek optimální dvoj až čtyřnásobný interval mezi dávkami a je vhodnější přidat čtvrtou experimentální skupinu než použít velmi velké intervaly (odpovídající např. faktoru většímu než přibližně 6 až 10).

Kontrolní skupině se nepodává žádná látka, nebo se jí podává vehikulum, jestliže se při podávání zkoušené látky vehikulum používá. S výjimkou podávání zkoušené látky se se zvířaty v kontrolní skupině zachází stejně jako se zvířaty v experimentální skupině. Jestliže je použito vehikulum, podává se kontrolní skupině v nejvyšším použitém objemu. Jestliže se zkoušená látka podává v potravě a způsobuje-li omezení příjmu potravy, doporučuje se použít paralelně skupinu se stejným omezením potravy, aby se odlišil vliv snížení příjmu potravy nechutenstvím od toxikologických změn

V případě potřeby by měly být vzaty v úvahu následující charakteristiky vehikula a ostatních přísad: účinky na vstřebávání, distribuci, metabolismus nebo retenci zkoušené látky; dále vlivu na chemické vlastnosti zkoušené látky, které mohou změnit její toxické vlastnosti, a vliv na spotřebu potravy nebo vody nebo na nutriční stav zvířat.

1.4.3.4 *Limitní zkouška*

Pokud zkouška provedená podle postupů popsaných v této studii při jedné dávce nejméně 1 000 mg/kg tělesné hmotnosti a den nevyvolá pozorovatelné nepříznivé účinky a pokud se na základě údajů o látkách s podobnou strukturou nepředpokládá toxicita, není úplná studie za použití tří dávek nezbytná. Limitní zkouška se provádí s výjimkou případu, kdy údaje o expozici člověka naznačují, že je nezbytné použití vyšší úrovně dávek.

1.5 POSTUP

1.5.1 **Podání dávek**

Zkoušená látka se zvířatům podává 7 dní v týdnu po dobu 90 dnů. Jakýkoli jiný režim podávání, např. 5 dní v týdnu, musí být zdůvodněn. Pokud se zkoušená látka podává sondou, aplikuje se zvířatům jen v jediné dávce sondou nebo kanylou. Maximální objem kapaliny, kterou lze jednorázově podat, závisí na velikosti pokusného zvířete. Objem by neměl překročit 1 ml na 100 g tělesné hmotnosti, s výjimkou vodných roztoků, kdy lze použít 2 ml na 100 g tělesné hmotnosti. s výjimkou dráždivých nebo žíravých látek, u kterých se ve vyšších koncentracích zhoršují účinky, by měly být rozdíly ve zkušebním objemu minimalizovány úpravou koncentrace tak, aby byl při všech úrovních dávek podáván konstantní objem.

▼B

U látek podávaných v potravě nebo v pitné vodě je důležité zajistit, aby množství použité zkoušené látky neovlivňovalo normální výživu nebo vodní rovnováhu. Podává-li se zkoušená látka v potravě, může se použít buď konstantní koncentrace (v ppm), nebo konstantní dávkování ve vztahu k tělesné hmotnosti zvířete; použitá možnost musí být specifikována. U látky podávané prostřednictvím žaludeční sondy je třeba dávku podávat každý den přibližně ve stejnou dobu a alespoň jednou týdně ji přizpůsobit tak, aby se udržela konstantní úroveň dávky vzhledem k tělesné hmotnosti zvířete. Pokud je 90denní studie prováděna jako předběžná studie k dlouhodobé studii chronické toxicity, měla by být v obou studiích použita stejná dieta.

1.5.2 **Pozorování**

Doba pozorování by měla být nejméně 90 dní. Zvířata v satelitní skupině určená pro následná pozorování by měla být po vhodnou dobu bez expozice, aby se posoudilo, zda nastalo zotavení, nebo toxické účinky přetrvávají.

Všeobecné klinické pozorování by se mělo provádět nejméně jednou denně, přednostně ve stejnou dobu (stejné doby) a s uvážením doby očekávaného maximálního účinku po podání látky. Zaznamenává se klinický stav zvířat. Nejméně dvakrát denně, obvykle na začátku a na konci každého dne, se provede prohlídka všech zvířat za účelem zjištění morbidity a mortality.

Nejméně jednou před prvním podáním látky a dále jednou týdně se provede důkladné klinické vyšetření všech zvířat (za účelem intraindividuálního srovnání). Toto pozorování by se mělo provádět mimo chovnou klec ve standardním pozorovacím prostoru a přednostně pokaždé ve stejnou dobu. Pozorování by měla být pečlivě zaznamenávána, nejlépe za použití systému bodování explicitně definovaného ve zkušební laboratoři. Je třeba se pokusit zajistit, aby byly rozdíly mezi podmínkami pozorování minimální. Vyšetření by mělo mimo jiné zahrnovat změny kůže, srsti, očí a sliznic, přítomnost sekretů a exkretů a vegetativních funkcí (slzení, zježení srsti, velikost zornic, poruchy dýchání). Zaznamenávat by se měly změny chůze, držení těla a reakce na manipulaci, dále přítomnost klonických a tonických pohybů, stereotypů v chování (např. nadměrného čištění nebo opakovaného kroužení) nebo bizarního chování (např. sebepoškozování, chůze pozpátku) (1).

Před podáním zkoušené látky a při zakončení studie by mělo být provedeno vyšetření oftalmoskopem nebo rovnocenným přístrojem nejlépe u všech zvířat, alespoň však ve skupině s vysokou dávkou a v kontrolní skupině. Jsou-li zjištěny změny na očích, měla by být vyšetřena všechna zvířata.

Ke konci doby expozice, a v každém případě ne dříve než v jedenáctém týdnu, by mělo být provedeno posouzení reakce na smyslové podněty různého typu (1) (např. sluchové, zrakové a proprioceptivní podněty) (2, 3, 4), změří se síla úchopu (5) a motorická aktivita (6). Další informace o postupech, které lze použít, jsou uvedeny v příslušné literatuře. Místo postupů popsaných v této literatuře však lze použít alternativní postupy.

Pozorování funkčních poruch prováděná ke konci studie lze vynechat, pokud jsou údaje o pozorování funkčních poruch dostupná z jiných studií a pokud denní klinická pozorování neprokáží žádné funkční poruchy.

▼B

Pozorování funkčních poruch lze výjimečně vynechat u skupin, které vykazují příznaky toxicity v takové míře, že by při posuzování funkčního stavu vadily.

1.5.2.1 *Tělesná hmotnost a spotřeba potravy/vody*

Všechna zvířata by se měla nejméně jednou týdně zvážit. Příjem potravy by se měl provádět nejméně jednou týdně. Pokud se látka podává v pitné vodě, měla by se nejméně jednou týdně zaznamenat spotřeba vody. Spotřeba vody by měla být vzata v úvahu také v případě studií s podáváním v potravě nebo sondou, v jejichž průběhu může dojít ke změně příjmu tekutin.

1.5.2.2 *Hematologická a klinická biochemická vyšetření*

Krevní vzorky by se měly odebírat z určeného místa a v případě potřeby by se měly skladovat za vhodných podmínek. Na konci zkušebního období se vzorky odeberou těsně před utracením zvířat nebo v jeho průběhu.

Na konci zkušebního období a při případném odběru krevních vzorků v průběhu zkoušky by měla být provedena následující hematologická vyšetření: stanovení hematokritu, koncentrace hemoglobinu, počtu erytrocytů, celkového a diferenciálního počtu leukocytů, počtu trombocytů a stanoví se protrombinový čas.

Klinické biochemické analýzy za účelem vyšetření hlavních toxických účinků na tkáně a zejména na játra a ledviny se provedou na krevních vzorcích odebraných každému zvířeti před utracením nebo v jeho průběhu (kromě zvířat nalezených v agónii a/nebo zvířat utracených v průběhu zkoušky). Podobně jako hematologická vyšetření může být v průběhu zkoušky prováděn odběr vzorků pro klinické biochemické zkoušky. Před odebráním krevních vzorků se doporučuje ponechat zvířata přes noc nalačno ([1]). Vyšetření plazmy a séra zahrnuje stanovení sodíku, draslíku, glukosy, celkového cholesterolu, močoviny, dusíku močoviny, kreatininu, celkových proteinů a albuminu, nejméně dvou enzymů indikujících účinky na jaterní buňky (jako alaninaminotransferasa, aspartátaminotransferasa, alkalická fosfatasa, gamaglutamyltranspeptidasa a sorbitoldehydrogenasa). Zahrnout lze také stanovení dalších enzymů (jaterního nebo jiného původu) a žlučových kyselin, které může za určitých okolností poskytnout užitečné informace.

Dále je možné v průběhu posledního týdne studie provést následující analýzy moči za použití časově definovaného sběru: vzhled, objem, osmolalita nebo specifická hmotnost, pH, bílkoviny, glukosa a krev/krvinky.

Dále by se mělo uvážit vyšetření indikátorů celkového poškození tkání v séru. Další vyšetření by mělo být provedeno, pokud mohou známé vlastnosti zkoušené látky ovlivnit určité metabolické funkce, včetně vápníku, fosforu, triglyceridů nalačno, specifických hormonů, methemoglobinu a cholinesterasy. Účelnost těchto vyšetření se posuzuje podle příslušnosti chemické látky do určitých skupin nebo případ od případu.

([1]) Pro řadu stanovení v séru a plazmě, zejména pro glukosu, by bylo vhodné ponechat zvířata nalačno přes noc. Hlavním důvodem je, že u nehladovějících zvířat je vyšší variabilita výsledků, která by mohla maskovat jemné změny a ztížit interpretaci. Na druhé straně by hladovění přes noc mohlo mít vliv na celkový metabolismus a při podávání v potravě by zasáhlo do pravidelnosti expozice zkoušené látce. Pokud se odebírá krev nalačno, měla by být klinická biochemická vyšetření provedena až po pozorování funkčních poruch v rámci studie.

▼B

Obecně je třeba postupovat pružně v závislosti na druhu a na pozorovaných a/nebo předpokládaných účincích dané látky.

Pokud nejsou údaje o dosavadních výchozích hodnotách dostatečné, mělo by se zvážit stanovení hematologických a klinických biochemických parametrů před začátkem zkoušky; obecně se nedoporučuje tyto údaje získávat před expozicí (7).

1.5.2.3 *Pitva*

U všech pokusných zvířat zařazených do studie by měla být provedena celková, podrobná pitva, zahrnující pečlivé vyšetření vnějšího povrchu těla, všech otvorů a lebeční, hrudní a břišní dutiny a jejich obsahu. Játra, ledviny, nadledvinky, varlata, nadvarlata, děloha, vaječníky, brzlík, slezina, mozek a srdce všech zvířat (kromě zvířat nalezených v agónii a/nebo zvířat utracených v průběhu zkoušky) by měly být zbaveny všech ulpělých tkání a co nejdříve po sekci se ve vlhkém stavu zváží, aby nedošlo k vyschnutí.

Následující tkáně by měly být přechovány v nejvhodnějším fixačním médiu s ohledem na typ tkáně a plánovaná následná histopatologická vyšetření: všechny tkáně s lézemi, mozek (reprezentativní oblasti, včetně předního mozku, mozečku a prodloužené míchy), mícha (ve třech úrovních: krční, střední hrudní a lumbální), hypofýza, štítná žláza, příštítná tělíska, brzlík, jícen, slinné žlázy, žaludek, tenké i tlusté střevo (včetně Peyerových plátů), játra, slinivka břišní, ledviny, nadledvinky, slezina, srdce, průdušnice a plíce (konzervované naplněním fixačním roztokem a ponořením), aorta, gonády, děloha, přídatné pohlavní orgány, samičí mléčná žláza, prostata, močový měchýř, žlučník (myší), lymfatické uzliny (přednostně jedna pro oblast aplikace a jedna vzdálená pro pokrytí systémových účinků), periferní nerv (*n. ischiadicus* nebo *n. tibialis*), přednostně v blízkosti svalu, řez kostní dřeně (a/nebo čerstvý nátěr z nasáklé kostní dřeně), kůže a oči (jestliže byly při oftalmologických vyšetřeních pozorovány změny). Podle klinických nebo jiných nálezů může být nezbytné zkoumat i další tkáně. Všechny orgány považované za možné cílové orgány pro působení zkoušené látky by měly být uchovány.

1.5.2.4 *Histopatologická vyšetření*

U všech zvířat kontrolní skupiny a skupiny s vysokou dávkou by mělo být provedeno celkové histologické vyšetření uchovaných orgánů a tkání. Toto vyšetření by mělo být rozšířeno na zvířata všech ostatních dávkových skupin, pokud jsou u skupiny s vysokou dávkou pozorovány změny orgánů vyvolané zkoušenou dávkou.

1.5.2.5 *Vyšetření všech makroskopických lézí*

V případě použití satelitní skupiny by mělo být provedeno histopatologické vyšetření tkání a orgánů, na kterých byly pozorovány účinky u exponovaných skupin.

▼B

2. **ÚDAJE A JEJICH PŘEDKLÁDÁNÍ**

2.1 ÚDAJE

Měly by být uvedeny údaje pro každé jednotlivé zvíře. Kromě toho by měly být všechny údaje shrnuty do tabulky, přičemž se uvede u každé experimentální skupiny počet zvířat na začátku zkoušky, počet zvířat nalezených uhynulých v průběhu zkoušky nebo utracených z humánních důvodů a doba úmrtí nebo humánního utracení, počet zvířat vykazujících příznaky toxicity, popis toxických příznaků, včetně doby nástupu, trvání a závažnosti každého toxického účinku, počet zvířat vykazujících léze, typ lézí a procento zvířat vykazujících každý typ léze.

Číselné výsledky by měly být pokud možno vyhodnoceny vhodnou a obecně uznávanou statistickou metodou. Statistická metoda by měla být zvolena již při plánování studie.

2.2 PROTOKOL O ZKOUŠCE

Protokol o zkoušce musí obsahovat tyto informace:

2.2.1 **Zkoušená látka**

— fyzikální povaha, čistota a fyzikálně-chemické vlastnosti,

— identifikační údaje,

— vehikulum (je-li potřeba): zdůvodnění volby vehikula, není-li použita voda.

2.2.2 **Testovací druh:**

— použitý druh a kmen,

— počet, stáří a pohlaví zvířat,

— původ, podmínky chovu, strava atd.,

— hmotnost jednotlivých zvířat na začátku zkoušky.

2.2.3 **Zkušební podmínky:**

— zdůvodnění výběru úrovní dávek,

— podrobné údaje o složení látky nebo úpravě potravy, o dosažené koncentraci, stálosti a homogenitě přípravku,

— podrobné údaje o způsobu aplikace zkoušené látky,

— skutečné denní dávky (mg/kg tělesné hmotnosti) a popřípadě přepočet koncentrace zkoušené látky v potravě/pitné vodě (ppm) na skutečnou dávku,

— podrobné údaje o kvalitě stravy a vody.

2.2.4 **Výsledky:**

— tělesná hmotnost/změny tělesné hmotnosti,

— spotřeba potravy a popřípadě spotřeba vody,

— údaje o toxických reakcích podle pohlaví a úrovně dávky, včetně příznaků toxicity,

▼B

— charakter, závažnost a trvání klinických projevů (zda byly vratné nebo nevratné),

— výsledky oftalmologického vyšetření,

— posouzení reaktivity na smyslové podněty, úchopové síly a motorické aktivity (je-li dostupné),

— hematologické vyšetření s příslušnými výchozími (normálními) hodnotami,

— klinická biochemická vyšetření s příslušnými výchozími normálními hodnotami,

— konečná tělesná hmotnost, hmotnost orgánů a poměry hmotnosti orgánů a tělesné hmotnosti,

— pitevní nálezy,

— podrobný popis všech histopatologických nálezů,

— údaje o absorpci, pokud jsou dostupné,

— statistické zpracování číselných výsledků, kde je to možné.

Rozbor výsledků.

Závěry.

3. **LITERATURA**

1) IPCS (1986). Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals. Environmental Health Criteria Document No. 60.

2) Tupper, D.E., Wallace, R.B. (1980). Utility of the Neurologic Examination in Rats. Acta Neurobiol. Exp., 40, 999–1003.

3) Gad, S.C. (1982). A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. J.Toxicol. Environ. Health, 9, 691–704.

4) Moser, V.C., Mc Daniel, K.M., Phillips, P.M. (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of Amitraz. Toxicol. Appl. Pharmacol., 108, 267–283.

5) Meyer O.A., Tilson H.A., Byrd W.C., Riley M.T. (1979). A Method for the Routine Assesment of Fore- and Hind- limb grip Strength of Rats and Mice. Neurobehav. Toxivol., 1, 233–236.

6) Crofton K.M., Howard J.L., Moser V.C., Gill M.W., Reiter L.W., Tilson H.A., MacPhail R.C. (1991). Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. Neurotoxicol. Teratol., 13, 599–609.

7) Weingand K., Brown G., Hall R. *et al*. (1996). „Harmonisation of Animal Clinic Pathology Testing in Toxicity and Safety Studies“, Fundam. & Appl. Toxicol., 29, 198–201.

▼B

B.27 ZKOUŠKA SUBCHRONICKÉ ORÁLNÍ TOXICITY STUDIE ORÁLNÍ TOXICITY NA NEHLODAVCÍCH (90DENNÍ OPAKOVANÁ APLIKACE)

1. METODA

Popisovaná metoda zkoušení subchronické orální toxicity se řídí hlavními zásadami metody OECD TG 409 (1998).

1.1 ÚVOD

Při posouzení a hodnocení toxických vlastností chemické látky lze stanovení subchronické orální toxicity s opakovanou aplikací provést až po získání prvních informací o toxicitě ze zkoušek akutní toxicity a toxicity při 28denní opakované aplikaci. 90denní studie poskytuje informace o možném nebezpečí pro zdraví, které by mohlo vzniknout vlivem opakované expozice v průběhu období rychlého růstu a mladé dospělosti. Studie poskytne informace o hlavních toxických účincích, určí cílové orgány a možnost akumulace a může poskytnout odhad hladiny bez pozorovatelného nepříznivého účinku, kterou lze použít při výběru úrovní dávek pro chronické studie a pro stanovení bezpečnostních kritérií pro expozici člověka.

Tato zkušební metoda umožňuje zjistit nepříznivé účinky vyvolané chemickou látkou na nehlodavcích a měla by být použita pouze tehdy, pokud:

— účinky pozorované v jiných studiích naznačují potřebu je objasnit nebo charakterizovat na dalším druhu, a to na nehlodavcích, nebo

— toxikokinetické studie naznačují, že použití specifického druhu nehlodavce je nejvhodnější volbou laboratorního zvířete, nebo

— existují jiné specifické důvody, které zdůvodňují použití nehlodavce.

Viz také obecný úvod, část B.

1.2 DEFINICE

Dávka: množství podané zkoušené látky. Dávka se vyjadřuje jako hmotnost (v g, mg) nebo jako hmotnost zkoušené látky na jednotku hmotnosti pokusného zvířete (např. v mg/kg) nebo jako konstantní koncentrace v potravě (v ppm).

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

NOAEL: anglická zkratka pro termín „no observed adverse effect level“ (hladina bez pozorovaného nepříznivého účinku) a odpovídá nejvyšší úrovni dávky nebo expozice, při které nejsou pozorovány žádné nepříznivé účinky související s podáním látky.

1.3 PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

Zkoušená látka se denně orálně podává v odstupňovaných dávkách několika skupinám pokusných zvířat; každé skupině se podává jedna úroveň dávky 90 dnů. V průběhu období podávání se zvířata každý den pečlivě pozorují, aby se zjistily příznaky toxicity. Zvířata, která v průběhu zkoušky uhynula nebo byla utracena, i zvířata, která do konce zkoušky přežila, se pitvají.

▼B

1.4 POPIS ZKUŠEBNÍ METODY

1.4.1 **Výběr druhu zvířat**

Obvykle používaným druhem nehlodavce je pes, musí jít o definované plemeno, často se používá beagle. Dále lze použít jiné druhy, např. prase nebo miniprase. Primáti se nedoporučují a jejich použití musí být odůvodněno. Použita by měla být mladá zdravá zvířata a v případě psů by podávání mělo začít nejlépe ve věku 4 až 6 měsíců, nejpozději v devíti měsících. Provádí-li se studie jako předběžná studie pro dlouhodobou studii chronické toxicity, měl by být v obou studiích použit tentýž živočišný druh a plemeno.

1.4.2 **Příprava zvířat**

Použijí se mladá zdravá zvířata, která se aklimatizovala na laboratorní podmínky a která nebyla podrobena předchozím experimentálním postupům. Trvání aklimatizace závisí na vybraném testovacím druhu a původu zvířat. Doporučuje se nejméně 5 dnů pro psy nebo pro prasata chovaná pro tento účel ve vlastním chovu a nejméně 2 týdny pro zvířata z externích chovných zařízení. Musí být popsán druh, kmen, původ, pohlaví a hmotnost a/nebo věk pokusných zvířat. Zvířata by měla být náhodně přiřazena do kontrolních a experimentálních skupin. Klece by měly být uspořádány tak, aby byl vliv umístění klecí minimalizován. Každému zvířeti by mělo být přiřazeno samostatné identifikační číslo.

1.4.3 **Příprava dávek**

Zkoušenou látku lze podávat v potravě nebo v pitné vodě, sondou nebo v kapslích. Metoda orálního podání závisí na účelu studie a na fyzikálně-chemických vlastnostech zkoušeného materiálu.

Zkoušená látka se v případě potřeby rozpustí nebo suspenduje ve vhodném vehikulu. Je-li to možné, doporučuje se zvážit použití vodného roztoku/suspense, potom použití roztoku/emulse v oleji (např. v kukuřičném oleji) a nakonec roztoku v jiných vehikulech. Pro nevodná vehikula by měla být známa jejich toxická charakteristika. Měla by být stanovena stálost zkoušené látky v podmínkách podávání.

1.5 POSTUP

1.5.1 **Počet a pohlaví zvířat**

Pro každou úroveň dávek se použije nejméně 8 zvířat (4 samice a 4 samci). Pokud se budou zvířata usmrcovat v průběhu studie, je nutno zvýšit celkový počet zvířat o počet zvířat, která budou usmrcena před ukončením studie. Počet zvířat při zakončení studie musí být dostatečný pro smysluplné vyhodnocení toxických účinků. Na základě dřívějších poznatků o zkoušené chemické látce nebo jí blízce příbuzné látce by mělo být vzato v úvahu zařazení dodatečné satelitní skupiny 8 zvířat (4 zvířata každého pohlaví) do kontrolní skupiny a do skupiny s nejvyšší dávkou pro účely pozorování vratnosti nebo přetrvávání jakýchkoli toxických účinků v období po expozici. Trvání tohoto období po expozici by mělo být vhodně stanoveno s ohledem na pozorované účinky.

▼B

1.5.2 **Dávkování**

S výjimkou případů, kdy se provede limitní zkouška (viz bod 1.5.3), by měly být použity nejméně tři úrovně dávek a souběžná kontrola. Úrovně dávek je možno stanovit na základě výsledků studií při opakované aplikaci nebo orientačních studií a měly by zohlednit jakékoli existující toxikologické a toxikokinetické údaje dostupné pro zkoušenou sloučeninu nebo příbuzné materiály. Nebrání-li tomu fyzikálně-chemická povaha nebo biologické účinky zkoušené látky, měla by být nejvyšší úroveň dávky zvolena s cílem vyvolat toxicitu, ne však uhynutí nebo velké utrpení. Měla by být zvolena sestupná řada úrovní dávek s cílem prokázat účinky související s dávkou a nepřítomnost nepříznivých účinků při nejnižší úrovni dávky (NOAEL). Často je pro stanovení sestupných úrovní dávek optimální dvoj- až čtyřnásobný interval mezi dávkami a je vhodnější přidat čtvrtou experimentální skupinu než použít velmi velké intervaly (odpovídající např. faktoru většímu než 6 až 10).

Kontrolní skupině se nepodává žádná látka, nebo se jí podává vehikulum, jestliže se při podávání zkoušené látky vehikulum používá. S výjimkou podávání zkoušené látky se se zvířaty v kontrolní skupině zachází stejně jako se zvířaty v experimentální skupině. Jestliže je použito vehikulum, podává se kontrolní skupině v nejvyšším použitém objemu. Jestliže se zkoušená látka podává v potravě a způsobuje-li omezení příjmu potravy, doporučuje se použít paralelně skupinu se stejným omezením potravy, aby se odlišil vliv snížení příjmu potravy nechutenstvím od toxikologických změn

V případě potřeby by měly být vzaty v úvahu následující charakteristiky vehikula a ostatních přísad: účinky na absorpci, distribuci, metabolismus nebo vylučování zkoušené látky; dále vlivu na chemické vlastnosti zkoušené látky, které mohou změnit její toxické vlastnosti, a účinky na spotřebu potravy nebo vody nebo na nutriční stav zvířat.

1.5.3 **Limitní zkouška**

Pokud zkouška provedená podle postupů popsaných v této studii při jedné dávce nejméně 1 000 mg/kg tělesné hmotnosti a den nevyvolá pozorovatelné nepříznivé účinky a pokud se na základě údajů o látkách s podobnou strukturou nepředpokládá toxicita, není úplná studie za použití tří dávek nezbytná. Limitní zkouška se provádí s výjimkou případu, kdy údaje o expozici člověka naznačují, že je nezbytné použití vyšší úrovně dávek.

1.5.4 **Podání dávek**

Zkoušená látka se zvířatům podává 7 dní v týdnu po dobu 90 dnů. Jakýkoli jiný režim podávání, např. 5 dní v týdnu, musí být zdůvodněn. Pokud se zkoušená látka podává sondou, podává se zvířatům v jediné dávce za použití žaludeční sondy nebo vhodné intubační kanyly. Maximální objem kapaliny, kterou lze jednorázově podat, závisí na velikosti pokusného zvířete. Zpravidla se udržuje co nejnižší objem. Až na dráždivé a žíravé látky, které obvykle při vyšších koncentracích vykazují zesílené účinky, by měla být variabilita zkušebního objemu minimalizována nastavením koncentrace zajišťující konstantní objem při všech úrovních dávky.

▼B

U látek podávaných v potravě nebo v pitné vodě je důležité zajistit, aby množství použité zkoušené látky neovlivňovalo normální výživu nebo vodní rovnováhu. Podává-li se zkoušená látka v potravě, může se použít buď konstantní koncentrace (v ppm), nebo konstantní dávkování ve vztahu k tělesné hmotnosti zvířete; použitá možnost musí být specifikována. Aplikuje-li se látka sondou nebo v kapslích, mělo by se tak stát každý den přibližně ve stejnou dobu a dávkování by mělo být podle potřeby upraveno tak, aby bylo konstantní vzhledem k tělesné hmotnosti zvířete. Pokud je 90denní studie prováděna jako předběžná studie k dlouhodobé studii chronické toxicity, měla by být v obou studiích použita stejná potrava.

1.5.5 **Pozorování**

Doba pozorování by měla být nejméně 90 dní. Zvířata v satelitní skupině určená pro následná pozorování by měla být po vhodnou dobu bez expozice, aby se posoudilo, zda nastalo zotavení, nebo toxické účinky přetrvávají.

Všeobecné klinické pozorování by se mělo provádět nejméně jednou denně, přednostně ve stejnou dobu (stejné doby) a s uvážením doby očekávaného maximálního účinku po podání látky. Zaznamenává se klinický stav zvířat. Nejméně dvakrát denně, obvykle na začátku a na konci každého dne, se provede prohlídka všech zvířat za účelem zjištění morbidity a mortality.

Nejméně jednou před prvním podáním látky a dále jednou týdně se provede důkladné klinické vyšetření všech zvířat (za účelem intra-individuálního srovnání). Toto pozorování by se mělo, pokud je to možné, provádět mimo chovnou klec ve standardním pozorovacím prostoru a přednostně pokaždé ve stejnou dobu. Je třeba se pokusit zajistit, aby byly rozdíly mezi podmínkami pozorování minimální. Příznaky toxicity by měly být pečlivě zaznamenány, včetně doby nástupu, stupně a trvání. Pozorování by mělo mimo jiné zahrnovat změny kůže, srsti, očí a sliznic, výskyt sekretů a exkretů a vegetativních funkcí (slzení, zježení srsti, velikost zornic, nezvyklé dýchání). Zaznamenávat by se měly změny chůze, polohy a reakce na manipulaci, dále přítomnost klonických a tonických pohybů, stereotypů v chování (např. nadměrného čistění nebo opakovaného kroužení) nebo jakékoli zvláštní chování.

Před podáním zkoušené látky a při zakončení studie by mělo být provedeno vyšetření oftalmoskopem nebo rovnocenným přístrojem nejlépe u všech zvířat, alespoň však ve skupině s vysokou dávkou a v kontrolní skupině. Jsou-li zjištěny změny na očích související s podáním látky, měla by být vyšetřena všechna zvířata.

1.5.5.1 *Tělesná hmotnost a spotřeba potravy/vody*

Všechna zvířata by se měla nejméně jednou týdně zvážit. Měření spotřeby potravy by se mělo provádět nejméně jednou týdně. Pokud se látka podává v pitné vodě, měla by se nejméně jednou týdně měřit spotřeba vody. Spotřeba vody by měla být vzata v úvahu také v případě studií s podáváním v potravě nebo sondou, v jejichž průběhu může dojít ke změně příjmu tekutin.

▼B

1.5.5.2 *Hematologická a klinická biochemická vyšetření*

Krevní vzorky by se měly odebírat z určeného místa a v případě potřeby by se měly skladovat za vhodných podmínek. Na konci zkušebního období se vzorky odeberou těsně před utracením zvířat nebo v jeho průběhu.

Na začátku studie a poté v měsíčních intervalech nebo uprostřed zkušebního období a na konci zkušebního období se provede hematologické vyšetření, včetně stanovení hematokritu, koncentrace hemoglobinu, počtu erytrocytů, celkového a diferenciálního počtu leukocytů, počtu trombocytů a srážlivosti krve, stanoví se protrombinový a trombinový čas.

Klinické biochemické analýzy za účelem vyšetření hlavních toxických účinků na tkáně a zejména na játra a ledviny se provedou na krevních vzorcích odebraných všem zvířatům na začátku zkušebního období a poté v měsíčních intervalech nebo uprostřed a na konci zkušebního období. Zkušební oblasti, které je vhodné stanovit jsou koncentrace elektrolytů, metabolismus cukrů a funkce jater a ledvin. Výběr specifických zkoušek ovlivní pozorování mechanismu účinku zkoušené látky. Před odběrem vzorků by měla být zvířata ponechána nalačno po dobu vhodnou pro daný druh. Navrhovaná vyšetření zahrnují stanovení vápníku, fosforu, chloridů, sodíku, draslíku, glykémie nalačno, alaninaminotransferasy, aspartátaminotransferasy, ornitindekarboxylasy, gama-glutamyltranspeptidasy, dusíku močoviny, albuminu, kreatininu, celkového bilirubinu a celkových bílkovin v séru.

Analýzy moči za použití časově definovaného sběru by se měly provést alespoň na začátku, uprostřed a na konci studie. Analýzy moči zahrnují vyšetření vzhledu, objemu, osmolality nebo specifické hmotnosti, pH, bílkovin, glukosy a krve/krvinek. Zkoumání pozorovaného účinku (pozorovaných účinků) lze v případě potřeby rozšířit o další analýzy.

Dále by se mělo uvážit vyšetření indikátorů celkového poškození tkání. Mezi jiná stanovení, která mohou být potřebná pro úplné toxikologické hodnocení, patří analýza lipidů, hormonů, acidobasické rovnováhy, methemoglobinu a aktivity cholinesterasy. Další biochemické analýzy mohou být v případě potřeby použity pro širší vyšetření pozorovaných účinků. Tyto profily je třeba identifikovat pro chemické látky určitých skupin nebo případ od případu.

Obecně je třeba postupovat pružně v závislosti na druhu a na pozorovaných a/nebo předpokládaných účincích dané látky.

1.5.5.3 *Pitva*

U všech pokusných zvířat zařazených do studie by měla být provedena celková, podrobná pitva, zahrnující pečlivé vyšetření vnějšího povrchu těla, všech otvorů a lebeční, hrudní a břišní dutiny a jejich obsahu. Játra se žlučníkem, ledviny, nadledvinky, varlata, nadvarlata, vaječníky, děloha, štítná žláza (s příštítnými tělísky), brzlík, slezina, mozek a srdce všech zvířat (kromě zvířat nalezených v agónii a/nebo zvířat utracených v průběhu zkoušky) by měly být zbaveny všech ulpělých tkání a co nejdříve po sekci se ve vlhkém stavu zváží, aby nedošlo k vyschnutí.

▼B

Následující tkáně by měly být přechovány v nejvhodnějším fixačním médiu s ohledem na typ tkáně a plánovaná následná histopatologická vyšetření: všechny tkáně s lézemi, mozek (reprezentativní oblasti, včetně předního mozku, mozečku a prodloužené míchy), mícha (ve třech úrovních: krční, střední hrudní a lumbální), hypofýza, oči, štítná žláza, příštítná tělíska, brzlík, jícen, slinné žlázy, žaludek, tenké i tlusté střevo (včetně Peyerových plátů), játra, žlučník, slinivka břišní, ledviny, nadledvinky, slezina, srdce, průdušnice a plíce, aorta, gonády, děloha, přídatné pohlavní orgány, samičí mléčná žláza, prostata, močový měchýř, žlučník (myši), lymfatické uzliny (přednostně jedna pro oblast aplikace a jedna vzdálená pro pokrytí systémových účinků), periferní nerv (*n. ischiadicus* nebo *n. tibialis*), přednostně v blízkosti svalu, řez kostní dřeně (a/nebo čerstvý nátěr z nasáklé kostní dřeně) a kůže. Podle klinických nebo jiných nálezů může být nezbytné zkoumat i další tkáně. Všechny orgány považované za možné cílové orgány pro působení zkoušené látky by měly být uchovány.

1.5.5.4 *Histopatologická vyšetření*

Celkové histologické vyšetření uchovaných orgánů a tkání by mělo být provedeno nejméně u všech zvířat kontrolní skupiny a skupiny s vysokou dávkou. Toto vyšetření by mělo být rozšířeno na zvířata všech ostatních dávkových skupin, pokud jsou u skupiny s vysokou dávkou pozorovány změny orgánů vyvolané zkoušenou dávkou.

Měly by být zkoumány všechny makroskopické léze.

V případě použití satelitní skupiny by mělo být provedeno histopatologické vyšetření tkání a orgánů, na kterých byly pozorovány účinky u exponovaných skupin.

2. ÚDAJE A JEJICH PŘEDKLÁDÁNÍ

2.1 ÚDAJE

Měly by být uvedeny údaje pro každé jednotlivé zvíře. Navíc by měly být všechny údaje shrnuty do tabulky, přičemž se uvede u každé experimentální skupiny počet zvířat na začátku zkoušky, počet zvířat nalezených uhynulých v průběhu zkoušky nebo utracených z humánních důvodů a dobu úmrtí nebo humánního utracení, počet zvířat vykazujících příznaky toxicity, popis toxických příznaků, včetně doby nástupu, trvání a závažnosti každého toxického účinku, počet zvířat vykazujících léze, typ lézí a procento zvířat vykazujících každý typ léze.

Číselné výsledky by měly být pokud možno vyhodnoceny vhodnou a obecně uznávanou statistickou metodou. Statistická metoda by měla být zvolena již při plánování studie.

2.2 PROTOKOL O ZKOUŠCE

Protokol o zkoušce musí obsahovat tyto informace:

▼B

2.2.1 **Zkoušená látka**

— fyzikální povaha, čistota a fyzikálně-chemické vlastnosti,

— identifikační údaje,

— vehikulum (je-li potřeba): zdůvodnění volby vehikula, není-li použita voda.

2.2.2 **Testovací druh:**

— použitý druh a kmen,

— počet, stáří a pohlaví zvířat,

— původ, podmínky chovu, strava atd.,

— hmotnost jednotlivých zvířat na začátku zkoušky.

2.2.3 **Zkušební podmínky:**

— zdůvodnění výběru úrovní dávek,

— podrobné údaje o složení látky nebo úpravě potravy, o dosažené koncentraci, stálosti a homogenitě přípravku,

— podrobné údaje o způsobu podání zkoušené látky,

— přepočet z koncentrace látky v potravě nebo ve vodě (ppm) na skutečnou denní dávku v mg/kg tělesné hmotnosti (pokud jde o aplikaci v potravě nebo ve vodě),

— podrobné údaje o potravě a kvalitě vody.

2.2.4 **Výsledky**

— tělesná hmotnost/změny tělesné hmotnosti,

— spotřeba potravy a popřípadě spotřeba vody,

— údaje o toxických reakcích podle pohlaví a úrovně dávky, včetně příznaků toxicity,

— charakter, závažnost a trvání klinických projevů (zda byly vratné nebo nevratné),

— oftalmologické vyšetření,

— hematologické vyšetření s příslušnými výchozími hodnotami (normami),

— klinická biochemická vyšetření s příslušnými výchozími hodnotami,

— konečná tělesná hmotnost, hmotnost orgánů a poměry hmotnosti orgánů k tělesné hmotnosti,

— pitevní nálezy,

— podrobný popis všech histopatologických nálezů,

— údaje o absorpci, pokud jsou dostupné,

— popřípadě statistické vyhodnocení výsledků.

Rozbor výsledků.

Závěry.

▼B

B.28 **STUDIE SUBCHRONICKÉ DERMÁLNÍ TOXICITY (90DENNÍ OPAKOVANÁ KOŽNÍ APLIKACE NA HLODAVCÍCH)**

1. **METODA**

1.1 ÚVOD

Viz obecný úvod, část B.

1.2 DEFINICE

Viz obecný úvod, část B.

1.3 REFERENČNÍ LÁTKY

Žádné.

1.4 PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

Zkoušená látka se denně po dobu 90 dní nanáší na kůži v odstupňovaných dávkách několika skupinám pokusných zvířat, každé skupině jedna úroveň dávky. V průběhu období aplikace se zvířata každý den pozorují, aby se zjistily příznaky toxicity. Zvířata, která v průběhu zkoušky uhynula, i zvířata, která do konce zkoušky přežila, se pitvají.

1.5 KRITÉRIA JAKOSTI

Nejsou stanovena.

1.6 POPIS ZKUŠEBNÍ METODY

1.6.1. **Příprava**

Nejméně pět dní před zkouškou jsou zvířata chována v podmínkách chovu a krmení, v jakých budou během experimentu. Před zkouškou se provede náhodný výběr zdravých mladých dospělých zvířat, která se přiřadí do experimentálních a kontrolních skupin. Krátce před zahájením zkoušky se zvířatům ostříhá srst na zádech. Vyholení srsti je rovněž možné, mělo by se však provést asi 24 hodin před zkouškou. Ostříhání nebo oholení je obvykle třeba opakovat přibližně v týdenních intervalech. Při stříhání nebo holení srsti je třeba dbát na to, aby se neporanila kůže. Pro aplikaci zkoušené látky se připraví nejméně 10 % povrchu těla. Při rozhodování o velikosti připravované plochy kůže, která má být zbavena srsti, a o velikosti krycího obvazu je třeba vzít v úvahu hmotnost zvířat. Při zkouškách pevných látek, které mohou být podle potřeby rozetřeny na prach, se zkoušená látka dostatečně navlhčí vodou, popřípadě vhodným vehikulem, aby se zajistil dobrý styk s kůží. Kapalné zkoušené látky se zpravidla aplikují neředěné. Aplikace se provádí pět až sedm dnů v týdnu.

1.6.2 **Zkušební podmínky**

1.6.2.1. Pokusná zvířata

Může být použit dospělý potkan, králík nebo morče. Lze použít i jiné živočišné druhy, ale jejich použití musí být zdůvodněno. Na začátku zkoušky by nemělo rozpětí odchylek hmotností překročit ± 20 % příslušné střední hodnoty. Provádíli se subchronická dermální studie jako předběžná studie před dlouhodobou studií, měl by být v obou studiích použit stejný živočišný druh a kmen.

▼B

1.6.2.2. Počet a pohlaví

Pro každou úroveň dávek se použije nejméně 20 zvířat (10 samic a 10 samců) se zdravou kůží. Samice musí být nullipary a nesmějí být březí. Pokud se budou zvířata usmrcovat v průběhu studie, zvýší se celkový počet o počet zvířat, která budou usmrcena před ukončením studie. Kromě toho může být satelitní skupině 20 zvířat (10 zvířat každého pohlaví) podávána vysoká úroveň dávky po dobu 90 dnů a 28 dnů po podávání se pozoruje vratnost, přetrvávání nebo zpožděný výskyt toxických účinků.

1.6.2.3. Úrovně dávek

Použijí se nejméně tři úrovně dávek a kontrolní skupina nebo, jeli použito vehikulum, kontrolní skupina s vehikulem. Doba expozice by měla být nejméně šest hodin denně. Zkoušená látka by měla být aplikována každý den přibližně ve stejnou dobu a dávkování by mělo být pravidelně (týdně nebo každých čtrnáct dnů) přizpůsobeno, aby bylo konstantní vzhledem k tělesné hmotnosti zvířete. S výjimkou aplikace zkoušené látky se se zvířaty v kontrolní skupině zachází stejně jako se zvířaty v experimentální skupině. Používáli se pro usnadnění aplikace vehikulum, aplikuje se kontrolní skupině stejným způsobem jako pokusným skupinám, a to ve stejném množství, jaké obdrží skupina, které se aplikuje nejvyšší dávka. Nejvyšší úroveň dávky by měla mít za následek toxické účinky, ale neměla by způsobit žádná uhynutí nebo by měla mít za následek malý počet uhynutí. Nejnižší úroveň dávky by neměla vyvolat žádné příznaky toxicity. Pokud existují odhady expozice u člověka, má nejnižší dávka tuto hodnotu překračovat. V ideálním případě by střední úroveň dávky měla vyvolat minimální pozorovatelné toxické účinky. Použijeli se více než jedna mezilehlá úroveň dávky, měly by se úrovně lišit tak, aby vyvolaly odstupňované toxické účinky. Ve skupinách s nízkou a střední úrovní dávky a v kontrolních skupinách by měla být četnost uhynutí nízká, aby bylo možné provést smysluplné hodnocení výsledků.

Vede-li aplikace zkoušené látky k závažnému podráždění kůže, je třeba snížit koncentraci, což u vysoké úrovně dávky může vést k omezení nebo vyloučení ostatních toxických účinků. Došloli k závažnému poškození kůže, je nutné zkoušku ukončit a provést ji znovu s nižšími koncentracemi.

1.6.3. Limitní zkouška

Nevyvolá-li při předběžné studii aplikace dávky 1 000 mg/kg nebo vyšší dávky, která odpovídá možné expozici člověka, jeli známa, žádné toxické účinky, není další zkoušení potřebné.

1.6.4. Doba pozorování

Zvířata se pozorují denně s cílem zaznamenat příznaky toxicity. Zaznamenají se doba uhynutí a čas, ve kterém se objevily a opět odezněly toxické účinky.

▼B

1.6.5. *Postup*

Zvířata se chovají jednotlivě v klecích. Zvířatům se aplikuje zkoušená látka denně nejlépe 7 dní v týdnu po dobu 90 dnů.

Zvířata v satelitních skupinách, která jsou určena k následnému pozorování, se pozorují dalších 28 dnů bez aplikace, aby se posoudilo zotavení z otravy nebo přetrvávání toxických účinků. Doba expozice by měla být nejméně šest hodin denně.

Zkoušená látka se nanese rovnoměrně na plochu, která činí asi 10 % celkového povrchu těla. V případě vysoce toxických látek může být tato plocha menší; měla by se však porýt co největší část této plochy co nejslabší a nejstejnoměrnější vrstvou.

Během expozice se zkoušená látka udržuje ve styku s kůží pomocí porézního mulového obvazu a nedráždivé náplasti. Zkušební plocha se dále vhodným způsobem překryje, aby se mulový obvaz a zkoušená látka fixovaly a aby zvířata zkoušenou látku nepožila. K zamezení požití látky je možno použít i prostředky pro omezení volnosti pohybu, úplné znehybnění se však nedoporučuje.

Po uplynutí doby expozice se odstraní zbytky zkoušené látky pokud možno vodou nebo jiným vhodným způsobem očištění kůže.

Všechna zvířata se pozorují denně a zaznamenávají se známky toxicity včetně doby nástupu, závažnosti a trvání. Pozorování v kleci zahrnuje změny kůže, srsti, očí, sliznic, dýchání a krevního oběhu, změny funkce autonomní a centrální nervové soustavy, somatomotorické aktivity a chování. Měření spotřeby potravy a hmotnosti zvířat se provádějí týdně. Je třeba zajistit pravidelnou kontrolu zvířat, aby pokud možno nedocházelo ke ztrátám zvířat, např. v důsledku kanibalismu, autolýzy tkání nebo chybného zařazení. Na konci zkoušky se všechna zvířata, která přežila, s výjimkou satelitních skupin, pitvají. Zvířata nalezená v agónii se vyřadí, humánně utratí a pitvají.

U všech zvířat včetně kontrolních se obvykle provádějí následující vyšetření:

a) oftalmologické vyšetření oftalmoskopem nebo rovnocenným vhodným přístrojem se provede před podáním zkoušené látky a na konci studie nejlépe u všech zvířat, alespoň však u skupiny s nejvyšší dávkou a u kontrolních skupin. Jsou-li zjištěny oční změny, vyšetří se všechna zvířata;

b) na konci zkoušky se provede hematologické vyšetření, které má zahrnovat stanovení hematokritu, koncentrace hemoglobinu, počtu erythrocytů, celkového a diferenciálního počtu leukocytů a testy srážlivosti krve, změří se například doba srážlivosti, prothrombinový čas, thrombinový čas nebo počet trombocytů;

▼B

c) na konci zkoušky se provede biochemická analýza krve. Pro tyto studie je vhodné analyzovat koncentraci elektrolytů, metabolismus glycidů, funkci jater a ledvin. Výběr specifických zkoušek bude určen pozorováním způsobu účinku látky. Navrhovaná vyšetření zahrnují stanovení vápníku, fosforu, chloridů, sodíku, draslíku, glukózy na lačno (délka doby hladovění se volí podle živočišného druhu), hladiny sérové glutamát-pyruvát transaminasy ([1]), glutamát-oxalacetát transaminasy ([2]), ornitindekarboxylasy, gama-glutamyltranspeptidasy, dusíku močoviny, albuminu, kreatininu, celkového bilirubinu a celkových bílkovin v séru. Mezi další stanovení, která mohou být nezbytná pro správné toxikologické hodnocení, patří stanovení lipidů, hormonů, acidobasické rovnováhy, methemoglobinu a aktivity cholinesterasy. Další biochemické analýzy mohou být použity, je-li nezbytné provést širší vyšetření pozorovaných účinků;

d) analýza moči se běžně nevyžaduje, provádí se pouze na základě očekávané nebo pozorované toxicity.

Pokud nejsou kontrolní údaje z dřívějších pozorování vhodné, zváží se stanovení hematologických a biochemických parametrů ještě před začátkem aplikace.

Pitva

U všech zvířat se provede pitva zahrnující zevní prohlídku povrchu těla, všech tělních otvorů, lební, hrudní a břišní dutiny včetně jejich obsahu. Játra, ledviny, nadledviny a varlata se co nejdříve po sekci zváží, aby nedošlo k vysychání. Následující orgány a tkáně je třeba přechovávat ve vhodném médiu s ohledem na možná pozdější histopatologická vyšetření: všechny tkáně s makroskopickými lézemi, mozek – v řezech medula/pons, kůra mozku a mozečku, podvěsek mozkový, štítná žláza/příštítná tělíska, všechny thymické tkáně, průdušnice a plíce, srdce, aorta, (slinné žlázy), játra, slezina, ledviny, nadledviny, slinivka břišní, gonády, děloha (přídatné pohlavní orgány), (kůže), jícen, žaludek, dvanácterník, jejunum, ileum, caecum, tračník, konečník, močový měchýř, reprezentativní lymfatické uzliny, (samičí mléčná žláza), (stehenní sval), periferní nerv, hrudní kost s kostní dření, (oči), (kost stehenní včetně kloubních ploch), (mícha ve třech úrovních – krční, střední hrudní a bederní) a (slzné žlázy). Tkáně v závorkách se vyšetřují pouze v případě, že lze na jejich postižení usuzovat z příznaků toxicity nebo pokud souvisejí s cílovým orgánem.

Histopatologická vyšetření

a) Úplné histopatologické vyšetření normální a exponované kůže, orgánů a tkání se provede u všech zvířat kontrolní skupiny a u zvířat skupiny, které byla podána nejvyšší dávka.

b) Vyšetří se všechny makroskopické léze.

([1]) Nyní známá jako alaninaminotransferasa.
([2]) Nyní známá jako aspartátaminotransferasa.

▼B

c) Vyšetří se cílové orgány v jiných dávkových skupinách.

d) Použijí-li se potkani, plíce zvířat ve skupinách s nízkou a střední dávkou se histopatologicky vyšetří k zjištění příznaků infekce, neboť to umožňuje vhodné posouzení zdravotního stavu zvířat. Další histopatologická vyšetření se u zvířat těchto skupin nemusí provádět rutinně, musí se však provést vždy na orgánech, na kterých byly zjištěny léze ve skupině s vysokou dávkou.

e) V případě použití satelitní skupiny se provede histopatologické vyšetření tkání a orgánů, na kterých byly pozorovány účinky u exponovaných skupin.

2. **ÚDAJE**

Údaje se shrnou do tabulky, přičemž se uvede u každé experimentální skupiny počet zvířat na začátku zkoušky, počet zvířat vykazujících léze a procento zvířat vykazujících jednotlivé typy lézí. Výsledky se vyhodnotí vhodnou statistickou metodou. Může být použita jakákoli uznávaná statistická metoda.

3. **ZPRÁVY**

3.1 PROTOKOL O ZKOUŠCE

Protokol o zkoušce musí pokud možno obsahovat tyto informace:

— živočišný druh, kmen, původ, podmínky chovu, strava,

— zkušební podmínky,

— úrovně dávek (včetně vehikula, pokud je použito) a koncentrace,

— údaje o toxických reakcích podle pohlaví a dávky,

— úroveň bez účinku, pokud ji lze stanovit,

— doba uhynutí během experimentu, případně údaj o přežití zvířat do konce sledování,

— popis toxických nebo jiných účinků,

— doba, kdy byly pozorovány jednotlivé abnormální příznaky, a jejich další vývoj,

— údaje o spotřebě potravy a o tělesné hmotnosti,

— oftalmologické nálezy,

— provedená hematologická vyšetření a jejich výsledky,

— provedená biochemická vyšetření a jejich výsledky (včetně výsledků případných analýz moči),

— pitevní nálezy,

▼B

— podrobný popis všech histopatologických nálezů,

— statistické vyhodnocení výsledků, kde je to možné,

— diskuse o výsledcích,

— interpretace výsledků.

3.2 HODNOCENÍ A INTERPRETACE

Viz obecný úvod, část B.

4. **LITERATURA**

Viz obecný úvod, část B.

▼M4

B.29 SUBCHRONICKÁ INHALAČNÍ TOXICITA: 90DENNÍ STUDIE

SHRNUTÍ

Tato revidovaná zkušební metoda B.29 byla navržena s cílem plně charakterizovat toxicitu zkoušené chemické látky podávané inhalační cestou při subchronické expozici (90 dnů) a získat průkazné údaje pro kvantitativní posouzení rizik inhalace. Skupiny 10 samců a 10 samic hlodavců se vystaví 6 hodin denně po dobu 90 dnů (13 týdnů) a) zkoušené chemické látce na třech nebo více úrovních koncentrace, b) filtrovanému vzduchu (negativní kontrola) a/nebo c) nosiči (kontrola s nosičem). Zvířata jsou obvykle exponována 5 dnů týdně, avšak expozice po 7 dnů v týdnu je rovněž povolena. Zkouška se vždy provádí se samci i samicemi, avšak mohou být vystaveni odlišným úrovním koncentrace, pokud je známo, že je jedno pohlaví citlivější vůči dané zkušební chemické látce. Tato metoda poskytuje vedoucímu studie možnost zařadit do zkoušky satelitní (reverzibilní) skupiny, předběžná utracení, bronchoalveolární laváž (BAL), neurologické testy a další klinická patologická a histopatologická vyšetření za účelem lepší charakterizace toxicity zkoušené chemické látky.

ÚVOD

1. Tato zkušební metoda odpovídá Pokynům OECD pro zkoušení 413 (2009). Původní Pokyny pro zkoušení 413 (TG 413) subchronické inhalační toxicity byly schváleny v roce 1981 (1). Tato zkušební metoda B.29 (odpovídající revidovaným pokynům TG 413 (2009)) byla aktualizována tak, aby odrážela stav vědeckého poznání a naplňovala stávající a budoucí regulační potřeby.

2. Studie subchronické inhalační toxicity se používají především k odvození regulačních koncentrací pro posouzení rizika pro pracovníky v pracovním prostředí. Také se používají k posouzení rizika pro člověka v obytných prostorách, v dopravě a rizika pro životní prostředí. Tato metoda umožňuje charakterizaci nepříznivých účinků po opakované denní inhalační expozici zkoušené chemické látce po dobu 90 dnů (přibližně 10 % délky života potkana). Údaje získané ve studiích subchronické inhalační toxicity lze použít ke kvantitativnímu posouzení rizik a k výběru koncentrací pro chronické studie. Tato zkušební metoda není speciálně určena pro zkoušky nanomateriálů. Definice použité v kontextu této zkušební metody jsou uvedeny na konci této kapitoly a v Pokynech GD 39 (2).

VÝCHOZÍ ÚVAHY

3. Před zahájením této studie by měla laboratoř provádějící zkoušky vzít v úvahu veškeré dostupné informace o zkoušené chemické látce, aby se zvýšila kvalita studie a minimalizovalo použití zvířat. Mezi informace, které usnadňují výběr vhodných zkušebních koncentrací, patří identita zkoušené chemické látky, její chemická struktura a fyzikálně-chemické vlastnosti, výsledky jakýchkoli testů toxicity *in vitro* nebo *in vivo*, předpokládaná použití a potenciální expozice člověka, dostupné údaje (Q)SAR a toxikologické údaje o strukturně příbuzných látkách a údaje získané při jiných zkouškách toxicity po opakované expozici. Očekává-li se nebo je-li v průběhu studie pozorována neurotoxicita, může se vedoucí studie rozhodnout zahrnout vhodná vyšetření, například funkční pozorovací baterii (functional observational battery, FOB) a měření motorické aktivity. Přestože načasování expozic s ohledem na konkrétní vyšetření může být velmi důležité, nemělo by provádění těchto doplňkových činností narušovat základní plán studie.

▼M4

4. Roztoky žíravých nebo dráždivých zkoušených chemických látek lze testovat při koncentracích, které povedou k požadovanému stupni toxicity. Další informace naleznete v dokumentu GD 39 (2). Při vystavování zvířat těmto materiálům by však měly být cílové koncentrace dostatečně nízké, aby nezpůsobily výraznou bolest a utrpení, zároveň by však měly být dostačující k prodloužení křivky závislosti odezvy na koncentraci k hodnotám, které umožní splnit regulační a vědecký účel této zkoušky. Tyto koncentrace by se měly volit případ od případu, nejlépe na základě výsledků vhodně navržené studie ke stanovení dávkování, která poskytuje informace o kritickém cílovém parametru, prahu dráždivosti a době nástupu účinků (viz odstavce 11–13). Mělo by se uvést zdůvodnění výběru dané koncentrace.

5. Umírající zvířata nebo zvířata, která očividně trpí bolestí nebo vykazují známky závažného a přetrvávajícího stresu, by se měla humánním způsobem utratit. Umírající zvířata se posuzují stejným způsobem jako zvířata, která při zkoušce uhynou. Kritéria rozhodování o utracení umírajících nebo značně trpících zvířat a pokyny týkající se rozpoznání předvídatelného nebo blížícího se uhynutí jsou předmětem Pokynů OECD o humánních cílových parametrech (3).

POPIS METODY

Výběr zvířecích druhů

6. Měli by se použít mladí zdraví dospělí hlodavci běžně používaných laboratorních kmenů. Nejvhodnějším druhem je potkan. Pokud se použijí jiné druhy, mělo by se uvést odůvodnění.

Příprava zvířat

7. Samice musí být nullipary a nesmí být březí. V den randomizace by mělo jít o mladé dospělé jedince staré 7 až 9 týdnů. Tělesná hmotnost by se měla pohybovat v rozmezí ± 20 % průměrné hmotnosti u každého pohlaví. Zvířata se náhodně vyberou, označí pro potřeby individuální identifikace a umístí se do klecí nejméně 5 dnů před začátkem zkoušky, aby si mohla zvyknout na laboratorní podmínky.

Zvířecí chov

8. Zvířata by měla být individuálně označena, nejlépe pomocí subkutánních transpondérů, aby se usnadnila pozorování a zamezilo záměně. Teplota zkušební místnosti, v níž se zvířata uchovávají, by měla být 22 ± 3 °C. Relativní vlhkost by se měla ideálně udržovat v rozmezí 30 až 70 %, ačkoliv to nemusí být proveditelné, používá-li se jako nosič voda. Před expozicí a po ní by se měla zvířata držet v klecích rozdělena do skupin podle pohlaví a koncentrace, avšak počet zvířat v jedné kleci by neměl bránit jasnému pozorování každého zvířete a měl by minimalizovat ztráty v důsledku kanibalismu nebo bojů. Jsou-li zvířata vystavena látce pouze nazální cestou, může být nutné nechat je zvyknout si na zkumavky omezující pohyb. Zkumavky by neměly zvířatům způsobovat přílišný fyzický, termální nebo imobilizační stres. Omezení může ovlivnit fyziologické cílové parametry, jako je tělesná teplota (hypertermie) a/nebo minutový dechový objem. Jsou-li k dispozici obecné údaje, které prokazují, že k takovým změnám nedochází ve značné míře, není předběžná adaptace na omezující trubičky nutná. Zvířata, jež jsou vystavena aerosolu celým tělem, by se měla držet během expozice odděleně, aby se zabránilo pronikání zkoušeného aerosolu z jejich těla do srsti ostatních zvířat v kleci. Mohou se používat konvenční a certifikovaná laboratorní krmiva, kromě období expozice, podávaná s neomezeným množstvím pitné vody z vodovodu. Osvětlení by mělo být umělé a mělo by se střídat 12 hodin světla a 12 hodin tmy.

▼M4

Inhalační komory

9. Při výběru inhalační komory by se měla zvážit povaha zkoušené chemické látky a cíl zkoušky. Upřednostňuje se expozice pouze nazální cestou (přičemž tento termín zahrnuje i expozici hlavy, nosu nebo tlamy) Expozice pouze nazální cestou se obecně upřednostňuje u studií kapalných nebo pevných aerosolů a par, které mohou kondenzací vytvářet aerosoly. Speciálních cílů studie lze snáze dosáhnout, použije-li se celotělová expozice, avšak tato skutečnost by se měla zdůvodnit ve zprávě o studii. Pro zajištění stability atmosféry v komoře pro celotělovou expozici by neměl celkový objem zaplněný pokusnými zvířaty přesáhnout 5 % objemu komory. Principy techniky expozice pouze nazální cestou a celotělové expozice a jejich konkrétní výhody a nevýhody jsou popsány v dokumentu GD 39 (2).

STUDIE TOXICITY

Mezní koncentrace

10. Na rozdíl od akutních studií nejsou ve studiích subchronické inhalační toxicity žádné definované mezní koncentrace. Maximální zkoušená koncentrace by měla zohledňovat: 1) maximální dosažitelnou koncentraci, 2) úroveň expozice člověka v „nejhorším případě“, 3) potřebu udržet dostatečný přívod kyslíku, a/nebo 4) dobré životní podmínky zvířat. Chybí-li mezní hodnoty založené na skutečných údajích, mohou se použít akutní limity z nařízení (ES) č. 1272/2008 (13) (tj. maximálně 5 mg/l pro aerosoly, 20 mg/l pro páry a 20 000 ppm pro plyny), viz GD 39 (2). Pokud je při zkouškách plynů nebo vysoce těkavých chemických látek (např. chladicí prostředky) potřeba tyto limity překročit, mělo by se uvést zdůvodnění. Z mezní koncentrace by mělo být možné odvodit jednoznačnou toxicitu bez toho, aby byly zvířata vystavena nadměrnému stresu nebo aby byla ovlivněna délka jejich života.

Studie ke stanovení rozsahu

11. Před zahájením hlavní studie je obvykle nutno provést studii ke stanovení rozsahu. Studie ke stanovení rozsahu je komplexnější než orientační studie, protože není omezená na výběr koncentrace. Poznatky získané ve studii ke stanovení rozsahu mohou vést k úspěšné hlavní studii. Studie k stanovení rozsahu může například poskytnout technické informace týkající se analytických metod, stanovení velikosti částic, odhalení toxických mechanismů, klinické patologie a histopatologických údajů a odhady koncentrací NOAEL a MTC v hlavní studii. Vedoucí studie se může rozhodnout použít studii ke stanovení rozsahu pro určení prahové hodnoty pro podráždění dýchacích cest (např. pomocí histopatologického vyšetření dýchacích cest, zkoušení plicních funkcí nebo bronchoalveolární laváže), horní hranice koncentrace, kterou zvířata snášejí bez nadměrného stresu, a parametry, které budou nejlépe charakterizovat toxicitu zkoušené chemické látky.

12. Studie ke stanovení rozsahu se může skládat z jedné nebo více úrovní koncentrace. V závislosti na zvolených cílových parametrech by se mělo každé úrovni koncentrace vystavit tři až šest samců a tři až šest samic. Studie ke stanovení rozsahu by měla trvat minimálně 5 dní a obvykle ne déle než 28 dní. Ve zprávě o studii by se mělo uvést zdůvodnění výběru koncentrací pro hlavní studii. Cílem hlavní studie je ukázat vztah mezi koncentrací a odezvou založený na předpokládaném nejcitlivějším cílovém parametru. Nízká koncentrace by měla být v ideálním případě koncentrace, při níž nejsou pozorovány nepříznivé účinky, zatímco z vysoké by mělo být možné odvodit jednoznačnou toxicitu, aniž by se zvířatům způsobil nadměrný stres nebo se ovlivnila délka jejich života (3).

▼M4

13. Při výběru úrovní koncentrace pro studii ke stanovení rozsahu by se měly zvážit veškeré dostupné informace, včetně vztahů mezi strukturou a aktivitou a údajů o podobných chemických látkách (viz odstavec 3). Studie ke stanovení rozsahu může potvrdit/vyvrátit cílové parametry, které se považují z mechanistického hlediska za nejvíce citlivé, např. inhibice cholinesterázy organickými fosfáty, tvorba methemoglobinu v důsledku erytrocytotoxických látek, hormony štítné žlázy (T_3, T_4) u tyreotoxických látek, bílkoviny, LDH nebo neutrofily v bronchoalveolární laváži u neškodných špatně rozpustných částic nebo aerosolů dráždících plíce.

Hlavní studie

14. Hlavní studie subchronické toxicity se obvykle skládá ze tří úrovní koncentrace a rovněž zahrnuje souběžné negativní kontroly (se vzduchem) a/nebo dle potřeby kontroly s nosičem (viz odstavec 18). Při výběru vhodných úrovní expozice je třeba použít veškeré dostupné údaje, včetně výsledků studií systémové toxicity, metabolismu a kinetiky (zvláštní důraz by se měl klást na vyloučení vysokých úrovní koncentrace, které saturují kinetické procesy). Každá experimentální skupina obsahuje alespoň 10 samců a 10 samic hlodavců, kteří jsou vystaveni zkoušené chemické látce 6 hodin denně 5 dnů v týdnu po dobu 13 týdnů (celková doba trvání studie je alespoň 90 dní). Zvířata lze rovněž vystavit látce 7 dní v týdnu (např. při zkouškách inhalačních farmaceutik). Je-li známo, že je jedno pohlaví vůči dané zkoušené chemické látce citlivější, je možné vystavit jednotlivá pohlaví odlišným úrovním koncentrace, aby se optimalizoval vztah mezi koncentrací a odezvou, jak popisuje odstavec 15. Jsou-li k expozici pouze nazální cestou použity jiné druhy hlodavců než potkani, je možné upravit maximální doby expozice za účelem minimalizace druhově specifického utrpení. Použije-li se doba expozice kratší než 6 hodin/den, nebo pokud je nutné provést studii celotělové expozice s dlouhou dobou expozice (např. 22 hodin/den), mělo by se uvést zdůvodnění (viz GD 39) (2). Během expozice by se mělo pozastavit krmení zvířat, jestliže doba expozice nepřesahuje 6 hodin. Během celotělové expozice je možné zvířatům podávat vodu.

15. Zvolené cílové koncentrace by měly vést k identifikaci cílového orgánu (cílových orgánů) a ukázat jasný vztah mezi koncentrací a odezvou:

— Vysoká úroveň koncentrace by měla mít toxické účinky, avšak neměla by způsobovat trvalé následky či letalitu, které by zabránily smysluplnému vyhodnocení.

— Střední úrovně koncentrací mezi mezními hodnotami by měly odstupňovány, aby se toxické účinky zvyšovaly od nízké po vysokou koncentraci.

— Nízká úroveň koncentrace by měla vyvolat malé nebo žádné příznaky toxicity.

Předběžná utracení

16. Je-li plánováno utracení některých zvířat před ukončením studie, měl by se počet zvířat na každé úrovni expozice zvýšit o počet zvířat určených k utracení před koncem studie. Předběžná utracení by se měla zdůvodnit a náležitě zohlednit ve statistických analýzách.

▼M4

Satelitní studie (reverzibility)

17. Satelitní studii (reverzibility) je možné použít k pozorování reverzibility, přetrvávání nebo opožděného nástupu toxicity během dostatečně dlouhého období po expozici, nejméně však po 14 dnů. Skupiny v satelitní studii (studii reverzibility) tvořené deseti samci a deseti samicemi se látce vystaví současně s pokusnými zvířaty v hlavní studii. Skupiny v satelitní studii (studii reverzibility) by se měly vystavit nejvyšší úrovni koncentrace zkoušené chemické látky a měly by se použít souběžné kontroly se vzduchem a/nebo s nosičem, dle potřeby (viz odstavec 18).

Kontrolní zvířata

18. Se zvířaty v souběžné negativní kontrolní skupině (se vzduchem) by se mělo zacházet stejným způsobem jako se zvířaty v experimentální skupině, místo zkoušené chemické látce se však vystaví filtrovanému vzduchu. Pokud se ke generování zkušební atmosféry používá také voda nebo jiná látka, měla by se do studie místo negativní kontroly se vzduchem zařadit kontrolní skupina s nosičem. Kdykoli je to možné, měla by se jako nosič použít voda. Použije-li se jako nosič voda, měla by se kontrolní zvířata vystavit vzduchu o stejné relativní vlhkosti jako experimentální skupiny. Výběr vhodného nosiče by měl vycházet z vhodně provedené předběžné studie nebo dříve získaných údajů. Není-li toxicita nosiče dostatečně známá, může se vedoucí studie rozhodnout použít jak negativní kontrolu (se vzduchem), tak kontrolu s nosičem, ale takový postup se rozhodně nedoporučuje. Jestliže historické údaje ukážou, že nosič není toxický, není třeba používat negativní kontrolní skupinu (se vzduchem) a měla by se použít pouze kontrolní skupina s nosičem. Jestliže předběžná studie zkoušené chemické látky formulované na nosiči neodhalí žádnou toxicitu, vyplývá z toho, že nosič je při zkoušené koncentraci netoxický a měla by se použít tato kontrola s nosičem.

PODMÍNKY EXPOZICE

Podání koncentrací

19. Zvířata jsou vystavena zkoušené chemické látce ve formě plynu, páry, aerosolu nebo jejich směsi. Skupenství látky, které se má zkoušet, závisí na fyzikálně-chemických vlastnostech zkoušené chemické látky, zvolených koncentracích a/nebo fyzické formě, v níž se bude zkoušená chemická látka s největší pravděpodobností nacházet při manipulaci a používání. Hygroskopické a chemicky reaktivní zkoušené chemické látky by se měly zkoušet v podmínkách suchého vzduchu. Je třeba pečlivě zabránit vzniku explozivních koncentrací. Partikulární materiály je možné podrobit mechanickým postupům ke snížení velikosti částic. Další pokyny jsou uvedeny v dokumentu GD 39 (2).

Distribuce velikosti částic

20. U všech aerosolů a par, které mohou kondenzací vytvořit aerosoly, by se mělo provést stanovení velikosti částic. Aby byla možná expozice všech důležitých částí dýchací soustavy, doporučují se aerosoly s hodnotami hmotnostního mediánu aerodynamického průměru (MMAD) v rozmezí 1 až 3 μm a s geometrickou směrodatnou odchylkou (σ_g) v rozmezí 1,5 až 3,0 (4). Přestože by se mělo vynaložit dostatečné úsilí k splnění této normy, není-li to možné, je třeba předložit odborný posudek. Například částice kovových výparů mohou být menší, než je tato norma, a nabité částice a vlákna ji mohou překračovat.

▼M4

Příprava zkoušené chemické látky na nosiči

21. V ideálním případě by se měla zkoušená chemická látka testovat bez nosiče. Jestliže je nutné použít nosič k získání vhodné koncentrace a velikosti částic zkoušené chemické látky, měla by se přednostně použít voda. Kdykoli je zkoušená chemická látka v tomto nosiči rozpuštěna, měla by se prokázat její stabilita.

MONITOROVÁNÍ PODMÍNEK EXPOZICE

Proudění vzduchu komorou

22. Proudění vzduchu expoziční komorou by se mělo při každé expozici pečlivě kontrolovat, neustále monitorovat a zaznamenávat nejméně v hodinových intervalech. Aktuální monitorování koncentrace látky ve zkušební atmosféře (nebo stability v čase) je nedílnou součástí měření všech dynamických parametrů a poskytuje nepřímý prostředek ke kontrole všech důležitých dynamických inhalačních parametrů. Monitoruje-li se koncentrace v reálném čase, je možné snížit frekvenci měření průtoku vzduchu komorou na jediné měření pro každou expozici za den. Zvláštní pozornost je třeba věnovat tomu, aby se zamezilo opětovnému vdechování látky v komorách s nazální cestou expozice. Koncentrace kyslíku by měla být alespoň 19 % a koncentrace oxidu uhličitého by neměla přesáhnout 1 %. Existuje-li důvod se domnívat, že tyto normy nelze splnit, měly by se koncentrace kyslíku a oxidu uhličitého měřit. Jestliže měření v první den expozice ukážou, že jsou úrovně těchto plynů správné, není třeba provádět další měření.

Teplota a relativní vlhkost v komoře

23. Teplota v komoře by se měla udržovat na 22 ± 3 °C. Relativní vlhkost v dýchací zóně zvířat, jak při expozici pouze nazální cestou, tak při celotělové expozici, by se měla nepřetržitě sledovat a zaznamenávat pokud možno alespoň v hodinových intervalech během každé expozice. Relativní vlhkost by se měla udržovat nejlépe v rozmezí 30 až 70 %, to však může být neproveditelné (např. při zkoušení směsí na bázi vody) nebo neměřitelné v důsledku interference zkoušené chemické látky se zkušební metodou.

Zkoušená chemická látka: Nominální koncentrace

24. Je-li to možné, měla by se vypočítat a zaznamenat nominální koncentrace zkoušené chemické látky v expoziční komoře. Nominální koncentrace je hmotnost generované zkoušené chemické látky vydělená celkovým objemem vzduchu, který prošel systémem inhalační komory. Nominální koncentrace se nepoužívá k charakterizaci expozice zvířat, ale porovnání nominální koncentrace a skutečné koncentrace je ukazatelem výkonnosti zkušebního systému při generování zkušební atmosféry, a tudíž ji lze použít ke zjištění problémů při generování.

Zkoušená chemická látka: Skutečná koncentrace

25. Skutečná koncentrace je koncentrace zkoušené chemické látky ve vzorcích odebraných v dýchací zóně zvířat v inhalační komoře. Skutečné koncentrace lze změřit specifickými metodami (např. přímý odběr vzorků, adsorpční metody nebo metody založené na chemické reakci a následná analytická charakterizace) nebo nespecifickými metodami, jako je vážková analýza (gravimetrie). Použití gravimetrie je přípustné pouze u práškových aerosolů obsahujících jedinou složky nebo u aerosolů z kapalin s nízkou těkavostí a mělo by se podložit příslušnou specifickou charakterizací zkoušené chemické látky před provedením studie. Koncentraci práškového aerosolu sestávajícího z více složek lze rovněž stanovit gravimetricky. Vyžaduje to však analytické údaje, které prokazují, že složení materiálu ve vzduchu je podobné složení výchozího materiálu. Nejsou-li tyto informace k dispozici,

▼M4

může být nutné provádět během studie v pravidelných intervalech opakovanou analýzu zkoušené chemické látky (ideálně ve vzdušné formě). U látek v aerosolové formě, které se mohou vypařovat nebo sublimovat, by se mělo prokázat, že byly vybranou metodou zachyceny všechny fáze.

26. Během celé studie by se měla použít pokud možno jedna šarže zkoušené chemické látky a zkoušený vzorek by se měl uchovávat za takových podmínek, aby zůstal čistý, homogenní a stabilní. Před zahájením studie by se měla provést charakterizace zkoušené chemické látky, včetně určení její čistoty a, je-li to technicky proveditelné, identity a množství identifikovaných kontaminujících látek a nečistot. Je možné to prokázat mimo jiné těmito údaji: retenční čas a relativní plocha píku, molekulová hmotnost z hmotnostní spektroskopie nebo plynové chromatografie, nebo jiné odhady. Přestože určení identity zkoušeného vzorku není povinností laboratoře provádějící zkoušku, je vhodné alespoň do jisté míry ověřit popis látky poskytnutý zadavatelem (např. barvu, fyzikální vlastnosti atp.).

27. Podle možností je třeba udržovat expoziční atmosféru konstantní. K prokázání stability podmínek expozice lze použít přístroj pro sledování v reálném čase, například fotometr pro aerosoly nebo analyzátor celkových uhlovodíků pro páry. Skutečné koncentrace v komoře by se měly měřit alespoň třikrát během každého dne expozice a pro každou úroveň expozice. Není-li to v důsledku omezené rychlosti proudění vzduchu nebo nízké koncentrace možné, je přípustné použít jeden vzorek pro každé období expozice. V ideálním případě by se měl tento vzorek odebírat po celou dobu expozice. Jednotlivé vzorky k stanovení koncentrace v komoře by se neměly lišit od průměrné hodnoty koncentrace v komoře o více než ± 10 % u plynů a par a o více než ± 20 % u kapalných nebo pevných aerosolů. Měla by se vypočítat a zaznamenat doba potřebná k dosažení rovnovážného stavu v komoře (t_{95}). Doba expozice zahrnuje i dobu, během níž je zkoušená chemická látka generována. Bere se při tom v úvahu doba nutná k dosažení rovnovážného stavu v komoře (t_{95}) a doba rozpadu. Pokyny k výpočtu t_{95} naleznete v dokumentu GD 39 (2).

28. U vysoce komplexních směsí složených z plynů/par a aerosolů (např. atmosféry obsahující produkty spalování a zkoušené chemické látky vystřikované z účelových výrobků/zařízení pro koncové použití) se může každá fáze chovat v inhalační komoře jinak. Proto by se pro každou fázi (plyn/pára a aerosol) měla zvolit alespoň jedna indikační látka (analyt), obvykle hlavní účinná složka ve směsi. Je-li zkoušená chemická látka směsí, měla by se uvést analytická koncentrace celkové směsi, a nikoliv pouze účinné látky nebo indikační látky (analytu). Další informace týkající se skutečných koncentrací naleznete v dokumentu GD 39 (2).

Zkoušená chemická látka: Distribuce velikosti částic

29. Distribuce velikosti částic aerosolů by se měla stanovit alespoň jednou týdně pro každou úroveň koncentrace pomocí kaskádového impaktoru nebo jiného přístroje, např. aerodynamického spektrometru částic (APS). Je-li možné prokázat shodu výsledků získaných pomocí kaskádového impaktoru a jiného přístroje, může se tento jiný přístroj používat v průběhu celé studie.

▼M4

30. Kromě primárního přístroje by se měl použít ještě druhý přístroj, např. gravimetrický filtr nebo impinger / plynová promývačka, k ověření účinnosti záchytu primárním přístrojem. Hmotnostní koncentrace získaná analýzou velikosti částic by měla ležet v přiměřeném rozmezí hmotnostní koncentrace získané vážkovou analýzou [viz dokument GD 39 (2)]. Je-li možné v časné fázi studie prokázat u veškerých zkoušených koncentrací jejich rovnocennost, lze od dalších potvrzujících měření upustit. Z důvodu zajištění dobrých životních podmínek zvířat by se měly podniknout kroky k minimalizaci neprůkazných údajů, které mohou vést k nutnosti opakovat studii.

31. U par by se mělo provést měření velikosti částic, pokud existuje možnost, že kondenzace páry povede ke vzniku aerosolu nebo pokud jsou v parách detekovány částice s potenciálem pro tvorbu smíšených fází.

POZOROVÁNÍ

32. Zvířata by se měla klinicky sledovat před expozicí, během expozice i po expozici. Mohou být nutná častější pozorování v závislosti na reakci zvířat během expozice. Je-li pozorování zvířat znemožněno použitím zkumavek omezujících pohyb zvířat, špatným osvětlením v komorách pro celotělovou expozici nebo neprůhlednou atmosférou, měla by se zvířata pečlivě pozorovat po expozici. Pozorováním před expozicí následující den je možné zhodnotit případnou reverzibilitu nebo exacerbaci toxických účinků.

33. Všechna sledování se zaznamenávají, přičemž záznamy se vedou pro každé zvíře zvlášť. Pokud jsou zvířata z humánních důvodů utracena nebo je zjištěn jejich úhyn, je nutné dobu uhynutí zaznamenat co nejpřesněji.

34. Pozorování v kleci by měla zaznamenat změny kůže, srsti, očí, sliznic, a rovněž změny dýchání, krevního oběhu, změny funkce nervové soustavy, somatomotorické aktivity a chování. Je třeba pozorně sledovat, zde se neobjeví tremor, křeče, slinění, průjmy, letargie, spánek a kóma. Měření rektální teploty může poskytnout podpůrné důkazy pro reflexní bradypnoe nebo hypo/hypertermii spojenou s expozicí nebo držením v kleci. Do protokolu studie je možné zahrnout doplňující vyšetření, například kinetiku, biomonitoring, plicní funkce, zadržování špatně rozpustných materiálů, které se hromadí v plicní tkáni a změny v chování.

TĚLESNÉ HMOTNOSTI

35. Tělesná hmotnost jednotlivých zvířat by se měla zaznamenat krátce před první expozicí (den 0), poté dvakrát týdně (například každý pátek a pondělí, aby se prokázalo zotavení po víkendu bez expozice, nebo v takovém časovém intervalu, který umožňuje posouzení systémové toxicity) a v čase uhynutí nebo utracení. Pokud se během prvních 4 týdnů neobjeví žádné účinky na tělesnou hmotnost, lze ji po zbytek studie měřit pouze jednou týdně. Zvířata v satelitní skupině (sledování reverzibility) (jsou-li použita) by se měla nadále vážit jednou týdně po celé období zotavování. Na konci studie by se měla všechna zvířata krátce před utracením zvážit, aby bylo možné provést nezkreslený výpočet podílů hmotnosti orgánů vůči tělesné hmotnosti.

SPOTŘEBA KRMIVA A VODY

36. Spotřeba krmiva by se měla měřit jednou týdně. Rovněž by se měla měřit spotřeba vody.

▼M4

KLINICKÁ PATOLOGIE

37. Klinická patologická vyšetření by se měla provést u všech zvířat, včetně zvířat v kontrolní a satelitní (sledování reverzibility) skupině, když jsou utracena. Měl by se zaznamenat časový interval mezi koncem expozice a odběrem krve, zejména pokud je obnova příslušného cílového parametru rychlá. Odběr vzorků po ukončení expozice je indikován pro parametry s krátkým eliminačním poločasem v plazmě (např. COHb, CHE a MetHb).

38. Tabulka 1 uvádí klinické patologické parametry, které jsou obvykle vyžadovány ve všech toxikologických studiích. Analýza moči se běžně nevyžaduje, může se však provést, pokud se to považuje za vhodné na základě očekávané nebo pozorované toxicity. Vedoucí studie se může rozhodnout vyšetřit další parametry k lepší charakterizaci toxicity zkoušené chemické látky (např. cholinesteráza, lipidy, hormony, acidobazická rovnováha, methemoglobin nebo Heinzova tělíska, kreatinkináza, poměr myeloidní/erythroidní buňky, troponiny, vyšetření krevních plynů, laktátdehydrogenáza, sorbitoldehydrogenáza, glutamátdehydrogenáza a gamaglutamyltranspeptidáza).

Tabulka 1

Standardní klinické patologické parametry

Hematologická vyšetření	
Počet erytrocytů	Celkový počet leukocytů
Hematokrit	Diferenciální rozpočet leukocytů
Koncentrace hemoglobinu	Počet trombocytů
Průměrné množství hemoglobinu v erytrocytu (MHC)	Srážlivost (vyber jednu z možností): — protrombinový čas
Střední objem erytrocytu (MCV)	— koagulační čas
Průměrná koncentrace hemoglobinu v erytrocytu	— parciální tromboplastinový čas
Retikulocyty	

Klinická biochemická vyšetření	
Glukóza (*)	Alaninaminotransferáza
Celkový cholesterol	Aspartátaminotransferáza
Triglyceridy	Alkalická fosfatáza
Dusík močoviny v krvi	Draslík
Celkový bilirubin	Sodík
Kreatinin	Vápník
Celkový obsah proteinů	Fosfor
Albuminy	Chloridy
Globuliny	

Rozbor moči (volitelný)	
Vzhled (barva a zákal)	Celkový obsah proteinů
Objem	Glukóza
Relativní hustota nebo osmolalita	Krev/krvinky
pH	

(*) Protože dlouhé období lačnění může zkreslit výsledky měření glukózy u exponovaných zvířat oproti zvířatům kontrolním, měl by vedoucí studie určit, zda je vhodné, aby zvířata lačnila. Používá-li se období lačnění, mělo by být vhodné pro daný použitý druh. U potkana to může být 16 h (lačnění přes noc). Stanovení glukózy nalačno lze provést po lačnění přes noc během posledního týdne expozice nebo po lačnění přes noc před pitvou (v tomto případě se provede společně se všemi ostatními klinickými patologickými parametry).

▼M4

39. Existují-li důkazy o tom, že hlavním místem depozice a retence jsou dolní cesty dýchací (tj. alveoly), jako technika pro kvantitativní analýzu hypotetických parametrů závislosti účinku na dávce zaměřená na alveolitidu, plicní zánět a fosfolipidózu, může být zvolena bronchoalveolární laváž (BAL). Umožňuje to vhodně vyšetřit změny ve vztahu dávka–odezva a čas–průběh při poškození plicních sklípků. V tekutině z BAL lze stanovit diferenciální rozpočet leukocytů, celkový obsah proteinů a laktátdehydrogenázu. Další parametry, které je možno zvážit, jsou ty, které svědčí o lysozomálním poškození, fosfolipidóze, fibróze, zánětu z podráždění nebo alergickém zánětu, což může zahrnovat stanovení prozánětlivých cytokinů/chemokinů. Měření v tekutině BAL obecně doplňují výsledky histopatologických vyšetření, avšak nemohou je nahradit. Pokyny, jak provádět laváž plic je možné nalézt v dokumentu GD 39 (2).

OFTALMOLOGICKÉ VYŠETŘENÍ

40. Pomocí oftalmoskopu nebo obdobného přístroje by se mělo provést oftalmologické vyšetření fundu, lomivých prostředí oka, duhovky a spojivek u všech zvířat před podáním zkoušené chemické látky a u všech skupin s vysokou koncentrací látky a u kontrolních skupin také při ukončení studie. Zjistí-li se na očích změny, měla by se vyšetřit také všechna zvířata v ostatních skupinách, včetně satelitní skupiny (sledování reverzibility).

PITVA A HMOTNOSTI ORGÁNŮ

41. Všechna pokusná zvířata, včetně těch, která v průběhu zkoušky uhynula nebo byla utracena z důvodu ohleduplného zacházení se zvířaty, by se měla podrobit úplnému vykrvení (je-li proveditelné) a pitvě. Měl by se zaznamenat doba mezi koncem poslední expozice zvířete a jeho utracením. Není-li možné pitvu provést ihned po objevení uhynulého zvířete, mělo by se zvíře uchovávat v chladicím boxu (nikoli zmrazené) při teplotě dostatečně nízké k minimalizaci autolýzy. Pitva by se měla provést co možná nejdříve, obvykle během jednoho nebo dvou dnů. U každého zvířete by se měly zaznamenat všechny makroskopické patologické nálezy, přičemž se věnuje zvláštní pozornost jakýmkoli nálezům v dýchacích cestách.

42. Tabulka 2 uvádí orgány a tkáně, které by se měly během pitvy konzervovat ve vhodném médiu pro histopatologické vyšetření. Uchovávání orgánů a tkání uvedených **[**v závorkách**]** a jakýchkoli dalších orgánů a tkání závisí na rozhodnutí vedoucího studie. Orgány uvedené **tučným** písmem by se měly co nejdříve po vyjmutí z těla zbavit přirostlých tkání a zvážit, dříve než vyschnou. Štítná žláza a nadvarlata by se měly vážit pouze v případě potřeby, neboť artefakty z ořezávání přirostlých tkání mohou bránit histopatologickému vyšetření. Tkáně a orgány by se měly fixovat v 10 % pufrovaném formalínu nebo jiném vhodném fixativu ihned po provedení pitvy, a ne později než 24–48 hodin před ořezáváním přirostlých tkání v závislosti na použitém fixativu.

▼M4

Tabulka 2

Orgány a tkáně, které se během pitvy konzervují

Nadledvinky	Jícen
Aorta	[*Bulbus olfactorius*]
Kostní dřeň (a/nebo čerstvý aspirát)	**Vaječníky**
Mozek (zahrnující řezy mozkových hemisfér, mozečku a prodloužené míchy/mostu)	Slinivka břišní
	Příštítná tělíska
Slepé střevo	Periferní nerv (*nervus ischiadicus* nebo *nervus tibialis*, nejlépe blízko svalu)
Tlusté střevo	
Dvanáctník	Hypofýza
[**Nadvarlata**]	Prostata
[Oči (sítnice, oční nerv) a oční víčka]	*Rectum*
Femur a kolenní kloub	Slinné žlázy
Žlučník (je-li přítomen)	Semenné váčky
[Harderova žláza]	Kůže
Srdce	Mícha (krční, střední hrudní a bederní)
Ileum	**Slezina**
Jejunum	Sternum
Ledviny	Žaludek
[Slzné žlázy (extraorbitální)]	Zuby
Hrtan (3 úrovně včetně báze *epiglottis*)	**Varlata**
Játra	**Brzlík**
Plíce (všechny laloky v jedné úrovni včetně hlavních bronchů)	**Štítná žláza**
	[Jazyk]
Lymfatické uzliny z oblasti plicního hilu, zejména v případě špatně rozpustných partikulárních zkoušených chemických látek. Pro podrobnější vyšetření a/nebo studie s imunologickým zaměřením lze uvažovat i o dalších lymfatických uzlinách, např. z oblasti mediastina, oblasti cervikální, submandibulární a aurikulární.	Průdušnice (alespoň 2 úrovně zahrnující 1 podélný řez skrz *carinu tracheae* a 1 příčný řez)
	[Močovod]
	[Močová trubice]
Lymfatické uzliny (distálně od místa vstupu)	Močový měchýř
	Děloha
Prsní žlázy (samičí)	Cílové orgány
Sval (stehenní)	Veškeré makroskopicky viditelné léze a masy
Nosohltanové tkáně (alespoň 4 úrovně, 1 úroveň by měla zahrnovat *ductus naso-pharyngeus* a lymfatickou tkáň nosní sliznice (NALT))	

▼M4

43. Plíce je třeba vyjmout bez poškození, zvážit a fixovat vhodným médiem při tlaku 20–30 cm vody, aby se zachovala struktura plic (5). U všech laloků by se měly odebrat řezy na jedné úrovni, včetně hlavních bronchů, avšak provádí-li se plicní laváž, měly by se u nevyplachovaného laloku provést řezy na třech úrovních (nikoli sériové řezy).

44. Měly by se vyšetřit alespoň 4 úrovně tkání nosohltanu, z nichž jedna by měla zahrnovat *ductus nasopharyngeus* (5), (6), (7), (8), (9), aby bylo možné dostatečně vyšetřit epitel dlaždicový, přechodný (respirační bez řasinek), respirační (řasinkový respirační) a čichový a svodnou lymfatickou tkáň (NALT) (10), (11). Měly by se vyšetřit tři úrovně hrtanu a jedna z těchto úrovní by měla zahrnovat bázi epiglottis (12). Měly by se vyšetřit alespoň dvě úrovně průdušnice zahrnující jeden podélný řez skrz *carinu tracheae* v místě bifurkace a jeden příčný řez.

HISTOPATOLOGICKÉ VYŠETŘENÍ

45. Mělo by se provést histopatologické vyšetření všech orgánů a tkání uvedených v tabulce 2 u kontrolní skupiny a skupiny vystavené vysoké koncentraci látky a u všech zvířat, která uhynou nebo jsou utracena během studie. Zvláštní pozornost je třeba věnovat dýchacím cestám, cílovým orgánům a makroskopicky viditelným lézím. Orgány a tkáně, na nichž se objevily léze u skupiny zvířat vystavené vysoké koncentraci látky, by se měly vyšetřit ve všech skupinách. Vedoucí studie se může rozhodnout provést histopatologická vyšetření v dalších skupinách, aby se prokázala jasná odezva na koncentraci. V případě použití satelitní skupiny (sledování reverzibility) by se mělo provést histopatologické vyšetření všech tkání a orgánů, na kterých byly pozorovány účinky u exponovaných skupin. Pokud ve skupině s expozicí vysoké koncentraci látky příliš brzy uhyne velký počet zvířat nebo vzniknou jiné problémy, které by mohly zpochybnit významnost údajů, měla by se histopatologicky vyšetřit nejbližší nižší koncentrace. Měl by se učinit pokus porovnat makroskopicky viditelné změny s mikroskopickými nálezy.

ÚDAJE A JEJICH PŘEDKLÁDÁNÍ

Údaje

46. U každého zvířete by se měly uvést údaje o tělesné hmotnosti, spotřebě krmiva, klinické patologické údaje, údaje z pitvy, hmotnosti orgánů a histopatologické nálezy. Údaje z klinického sledování by se měly shrnout do tabulky, přičemž se u každé zkušební skupiny uvede počet použitých zvířat, počet zvířat vykazujících příznaky toxicity, počet zvířat uhynulých v průběhu zkoušky nebo utracených z humánních důvodů, doba uhynutí jednotlivých zvířat, popis, časový průběh a vratnost toxických účinků a pitevní nálezy. Všechny výsledky, kvantitativní a incidentální, by se měly vyhodnotit vhodnou statistickou metodou. Lze použít všeobecně uznávanou statistickou metodu. Statistické metody by se měly zvolit během vypracovávání návrhu studie.

Protokol o zkoušce

47. Protokol o zkoušce by měl obsahovat následující informace:

Pokusná zvířata a podmínky chovu

— popis podmínek v klecích uvádějící: počet (nebo změnu počtu) zvířat v každé kleci, materiál podestýlky, teplotu a relativní vlhkost prostředí, délku světelné fáze a druh stravy,

▼M4

— použitý druh/kmen a odůvodnění, pokud se použije jiný druh než potkan. Je možné uvést údaje ze zdroje a historické údaje, pokud se týkají zvířat, která byla exponována za podobných podmínek expozice, chovu a lačnění,

— počet, stáří a pohlaví zvířat,

— metoda randomizace,

— popis jakékoliv přípravy před zkouškou včetně stravy, karantény a léčby onemocnění.

Zkoušená chemická látka

— fyzikální povaha, čistota a v případě potřeby fyzikálně-chemické vlastnosti (včetně izomerizace),

— identifikační údaje a registrační číslo CAS (Chemical Abstract Services), je-li známo.

Nosič

— zdůvodnění použití nosiče a zdůvodnění výběru nosiče (pokud je jiný než voda),

— historické nebo současné údaje prokazující, že nosič neovlivňuje výsledek studie.

Inhalační komora

— popis inhalační komory, včetně objemu a nákresu,

— zdroj a popis zařízení použitého pro expozici zvířat a rovněž pro generování atmosféry,

— zařízení k měření teploty, vlhkosti, velikosti částic a skutečné koncentrace,

— zdroj vzduchu a použitý klimatizační systém,

— metody použité ke kalibraci zařízení k zajištění homogenní zkušební atmosféry,

— rozdíl tlaků (kladný nebo záporný),

— počet expozičních otvorů v každé komoře (v případě nazální expozice), umístění zvířat v komoře (v případě celotělová expozice),

— stabilita zkušební atmosféry,

— umístění čidel ke snímání teploty a vlhkosti a odběr vzorků zkušební atmosféry v komoře,

— úprava dodávaného/odsávaného vzduchu,

— průtokové rychlosti vzduchu, průtoková rychlost vzduchu na jeden expoziční otvor (v případě nazální expozice) nebo množství zvířat na jednu komoru (v případě celotělové expozice),

— doba nutná k dosažení rovnovážného stavu v inhalační komoře (t_{95}),

— počet výměn objemu vzduchu za hodinu,

— měřicí přístroje (používají-li se).

Údaje o expozici

— zdůvodnění volby cílové koncentrace v hlavní studii,

▼M4

— nominální koncentrace (celková hmotnost zkoušené chemické látky generované do inhalační komory vydělená objemem vzduchu prošlým komorou),

— skutečné koncentrace zkoušené chemické látky naměřené v dýchací zóně zvířat. U směsí, které vytvářejí heterogenní fyzikální formy (plyny, páry, aerosoly), je možné analyzovat každou zvlášť,

— veškeré koncentrace látky ve vzduchu by se měly uvádět raději v hmotnostních jednotkách (mg/l, mg/m^3, atd.), než v objemových jednotkách (ppm, ppb atd.),

— distribuce velikosti částic, hmotnostní medián aerodynamického průměru (MMAD) a geometrická směrodatná odchylka (σ_g), včetně metod jejich výpočtu. Měly by se uvést jednotlivé analýzy velikosti částic.

Zkušební podmínky

— podrobné údaje o přípravě zkoušené chemické látky včetně postupů použitých k snížení velikosti částic pevných látek nebo k přípravě roztoků zkoušené chemické látky,

— popis (pokud možno s nákresem) zařízení použitého ke generování zkušební atmosféry k expozici zvířat zkušební atmosféře,

— podrobné údaje o zařízení použitém k monitorování teploty a vlhkosti v komoře a proudění vzduchu komorou (tj. vývoj kalibrační křivky),

— podrobné údaje o zařízení použitém k odběru vzorků k stanovení koncentrace látky v komoře a distribuce velikosti částic,

— podrobné údaje o použité chemické analytické metodě a validaci metody (včetně účinnosti výtěžnosti zkoušené chemické látky ze vzorkovaného média),

— metoda randomizace použitá k rozdělení zvířat do zkoušených a kontrolních skupin,

— podrobnosti o jakosti vody a krmiva (včetně druhu/zdroje stravy, zdroje vody),

— zdůvodnění výběru zkoušených koncentrací.

Výsledky

— tabulka s údaji o teplotě, vlhkosti a průtoku vzduchu v komoře,

— tabulka s údaji o nominální a skutečné koncentraci v komoře,

— tabulka s údaji o velikosti částic včetně údajů o odběru analytických vzorků, distribuce velikosti částic a výpočtů MMAD a σ_g,

— tabulka s údaji o odezvě a úrovni koncentrace u každého zvířete (tj. zvířata vykazující příznaky toxicity včetně mortality, charakter, závažnost, doba nástupu a trvání účinků),

▼M4

— tabulka s údaji o tělesné hmotnosti jednotlivých zvířat,

— tabulka s údaji o spotřebě krmiva,

— tabulka s klinickými patologickými údaji,

— pitevní a histopatologické nálezy pro každé zvíře, pokud jsou k dispozici.

Diskuse a interpretace výsledků

— zvláštní důraz by se měl klást na popis metod použitých ke splnění kritérií této zkušební metody, např. mezní koncentrace nebo velikost částic,

— je třeba zabývat se vdechovatelností částic s ohledem na celkové nálezy, zejména pokud nebylo možné splnit kritéria pro velikost částic,

— v celkovém hodnocení studie by se měla uvést konzistentnost metod použitých ke stanovení nominálních a skutečných koncentrací a vztah mezi aktuální a skutečnou koncentrací,

— měla by se uvést pravděpodobná příčina úhynu a převládající mechanismus účinku (systémový nebo lokální),

— mělo by se uvést vysvětlení, pokud bylo nutno humánně utratit zvířata trpící bolestí nebo vykazující známky intenzivního a přetrvávajícího utrpení, na základě kritérií uvedených v pokynech OECD o humánních parametrech (3),

— měl(y) by se určit cílový (cílové) orgán(y),

— měla by se stanovit hodnota NOAEL a LOAEL.

LITERATURA:

1) OECD (1981). *Subchronic Inhalation Toxicity Testing*, Original Test Guideline No 413, Environment Directorate, OECD, Paris.

2) OECD (2009). *Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing,* Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 39, ENV/JM/MONO(2009)28, OECD, Paris.

3) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation, Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris.

4) Whalan JE and Redden JC (1994). Interim Policy for Particle Size and Limit Concentration Issues in Inhalation Toxicity Studies. Office of Pesticide Programs, United States Environmental Protection Agency.

5) Dungworth DL, Tyler WS, Plopper CE (1985). Morphological Methods for Gross and Microscopic Pathology (Chapter 9) in *Toxicology of Inhaled Material,* Witschi, H.P. and Brain, J.D. (eds), Springer Verlag Heidelberg, pp. 229-258.

6) Young JT (1981). Histopathological examination of the rat nasal cavity. Fundam. Appl. Toxicol. 1: 309-312.

7) Harkema JR (1990). Comparative pathology of the nasal mucosa in laboratory animals exposed to inhaled irritants. Environ. Health Perspect. 85: 231-238.

▼**M4**

8) Woutersen RA, Garderen-Hoetmer A, van Slootweg PJ, Feron VJ (1994). Upper respiratory tract carcinogenesis in experimental animals and in humans. In: Waalkes MP and Ward JM (eds) Carcinogenesis. Target Organ Toxicology Series, Raven Press, New York, 215-263.

9) Mery S, Gross EA, Joyner DR, Godo M, Morgan KT (1994). Nasal diagrams: A tool for recording the distribution of nasal lesions in rats and mice. Toxicol. Pathol. 22: 353-372.

10) Kuper CF, Koornstra PJ, Hameleers DMH, Biewenga J, Spit BJ, Duijvestijn AM, Breda Vriesman van PJC, Sminia T (1992). The role of nasopharyngeal lymphoid tissue. Immunol. Today 13: 219-224.

11) Kuper CF, Arts JHE, Feron VJ (2003). Toxicity to nasal-associated lymphoid tissue. Toxicol. Lett. 140-141: 281-285.

12) Lewis DJ (1981). Mitotic Indices of Rat Laryngeal Epithelia. Journal of Anatomy 132(3): 419-428.

13) Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1272/2008 ze dne 16. prosince 2008 o klasifikaci, označování a balení látek a směsí, o změně a zrušení směrnic 67/548/EHS a 1999/45/ES a o změně nařízení (ES) č. 1907/2006, Úř. věst. L 353, 31.12.2008, s. 1.

▼**M4**

Dodatek 1

DEFINICE

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

▼M4

B.30 STUDIE CHRONICKÉ TOXICITY

ÚVOD

1. Tato zkušební metoda odpovídá Pokynům OECD pro zkoušení (TG) 452 (2009). Původní Pokyny pro zkoušení 452 byly schváleny v roce 1981. Revize zkušební metody B.30 byla považována za nezbytnou k zohlednění nejnovějšího vývoje v oblasti zajištění dobrých životních podmínek zvířat a regulačních požadavků (1) (2) (3) (4). Aktualizace této zkušební metody B.30 se prováděla paralelně s revizemi kapitoly B.32 této přílohy, Studie karcinogenity, a kapitoly B.33 této přílohy, Kombinovaná studie chronické toxicity/karcinogenity, aby se získaly další informace o zvířatech použitých ve studii a poskytnout další podrobnosti o výběru dávky. Tato zkušební metoda je určena ke zkouškám široké škály chemických látek, včetně pesticidů a průmyslových chemikálií.

2. Většina studií chronické toxicity se provádí na hlodavcích, a tato zkušební metoda je proto primárně určena k použití pro studie prováděné na nich. Je-li potřeba provést studie na nehlodavcích, lze rovněž použít principy a postupy uvedené v této zkušební metodě spolu s těmi, které jsou uvedeny v kapitole B.27 této přílohy, Studie orální toxicity na nehlodavcích – 90denní opakovaná aplikace (5), příslušně pozměněné, jak je uvedeno v pokynech OECD, Pokyny č. 116 o přípravě a provádění studií chronické toxicity a karcinogenity (6).

3. Třemi hlavními způsoby podávání používanými ve studiích chronické toxicity jsou orální podávání, dermální aplikace a inhalační podávání. Výběr cesty podání závisí na fyzikálních a chemických vlastnostech zkoušené chemické látky a na převládající cestě expozice u lidí. Další informace o výběru cesty expozice jsou uvedeny v pokynech OECD č. 116 (6).

4. Tato zkušební metoda se zaměřuje na expozici orální cestou, což je cesta, která se ve studiích chronické toxicity používá nejběžněji. Přestože dlouhodobé studie chronické toxicity zahrnující expozici dermální nebo inhalační cestou mohou být k posouzení rizik pro lidské zdraví rovněž nezbytné a/nebo mohou být vyžadovány v rámci určitých regulačních režimů, jsou studie používající tyto cesty expozice značně technicky složité. Zde uvedená zkušební metoda posouzení a vyhodnocení chronické toxicity při orálním podávání může sloužit jako základ protokolu pro inhalační a/nebo dermální studie pokud jde o doporučení pro období expozice, klinické a patologické parametry atd., studie je však třeba navrhovat individuálně případ od případu. K dispozici jsou pokyny OECD týkající se podávání zkoušených chemických látek inhalační (6), (7) a dermální cestou (6). Při navrhování dlouhodobých studií zahrnujících expozici inhalační cestou by se měla konkrétně použít kapitola B.8 této přílohy (8) a kapitoly B.29 této přílohy (9) a rovněž pokyny OECD ke zkouškám akutní inhalační toxicity (7). V případě, že se zkoušky provádí dermální cestou, je třeba použít kapitolu B.9 této přílohy (10).

▼M4

5. Studie chronické toxicity poskytuje informace o možných rizicích pro zdraví, která může opakovaná expozice po značnou část života použitých druhů představovat. Studie rovněž poskytne informace o toxických účincích zkoušené chemické látky, určí cílové orgány a možnost akumulace. Může také poskytnout odhad hodnoty dávky bez pozorovaných nepříznivých účinků, což lze použít při stanovení kritérií pro bezpečnou expozici člověka. Důraz se klade také na pečlivé klinické pozorování zvířat s cílem získat co nejvíce informací.

6. Cíle studií zahrnutých v této zkušební metodě jsou:

— identifikace chronické toxicity zkoušené chemické látky,

— identifikace cílových orgánů,

— charakterizace vztahu mezi dávkou a odezvou,

— určení hodnoty dávky bez pozorovaného nepříznivého účinku (NOAEL) nebo výchozího bodu pro stanovení referenční dávky (BMD),

— předpověď chronických toxických účinků na úrovních expozice člověka,

— získání údajů ke zkoušení hypotéz ohledně způsobu účinku (6).

VÝCHOZÍ ÚVAHY

7. Zkušební laboratoř by měla před provedením studie vzít v úvahu při posuzování a hodnocení toxikologických vlastností zkoušené chemické látky veškeré dostupné informace o zkoušené chemické látce, aby zaměřila uspořádání studie směrem k účinnějšímu zkoušení potenciálu chronické toxicity a minimalizovala použití zvířat. Mezi informace, které usnadní vytváření plánu studie, patří identita zkoušené chemické látky, její chemická struktura a fyzikálně-chemické vlastnosti, všechny informace o způsobu účinku, výsledky jakýchkoli testů toxicity *in vitro* nebo *in vivo*, předpokládaná použití a potenciální expozici u člověka, dostupné údaje (Q)SAR a toxikologické údaje o strukturně příbuzných chemických látkách, dostupné toxikokinetické údaje (kinetika při jednorázové dávce a rovněž při opakovaných dávkách, je-li k dispozici) a údaje získané v jiných studiích toxicity po opakované expozici. Stanovení chronické toxicity by se mělo provádět pouze poté, co byly získány úvodní informace o toxicitě z 28denních a/nebo 90denních zkoušek toxicity po opakované dávce. Jako součást celkového zhodnocení potenciálních nepříznivých účinků konkrétní zkoušené chemické látky na zdraví by se měl zvážit postup zkoušení prováděný po fázích při zkouškách chronické toxicity (11), (12), (13), (14).

8. Nejvhodnější statistické metody pro analýzu výsledků s ohledem na uspořádání a cíle experimentu by se měly stanovit před zahájením studie. Je třeba zvážit, zda by měla statistika zahrnovat korekci vztahující se k přežití zvířat a analýzu v případě předčasného ukončení zkoušky u jedné nebo více skupin. Pokyny ohledně vhodných statistických analýz a klíčové odkazy na mezinárodně uznávané statistické metody jsou uvedeny v Pokynech č. 116 (6) a rovněž v Pokynech č. 35 o analýze a hodnocení studií chronické toxicity a karcinogenity (15).

▼M4

9. Při provádění studie chronické toxicity je nutné řídit se vždy vůdčími principy a úvahami uvedenými v Pokynech OECD č. 19 o rozpoznání, vyšetření a použití klinických příznaků jako lidských cílových parametrů u pokusných zvířat používaných při hodnocení bezpečnosti (16), zejména v odstavci 62 těchto pokynů. Tento odstavec uvádí, že „*Ve studiích zahrnujících opakované podávání dávky by se mělo v případě, kdy zvíře vykazuje klinické příznaky, které jsou progresivní a vedou k dalšímu zhoršení jeho stavu, učinit informované rozhodnutí, zda zvíře humánně utratit, či ne. Toto rozhodnutí by mělo obsahovat posouzení hodnoty informací, které se získají, bude-li se zvíře i nadále udržovat ve studii, oproti jeho celkovému stavu. Dospěje-li se k rozhodnutí pokračovat ve zkoušce na zvířeti, měla by se dle potřeby zvýšit četnost pozorování. Rovněž je možné, aniž by to nepříznivě ovlivnilo účel zkoušky, dočasně pozastavit podávání dávky, jestliže to zmírní bolest či utrpení, nebo snížit zkoušenou dávku.*“

10. Podrobné pokyny a diskuse o principech výběru dávky pro studie chronické toxicity a karcinogenity uvádí Pokyny č. 116 (6) a rovněž dvě publikace ústavu International Life Sciences Institute (17), (18). Hlavní strategie výběru dávky závisí na primárním cíli nebo cílech studie (odstavec 6). Při výběru vhodných úrovní dávky by se mělo dosáhnout rovnováhy mezi screeningem nebezpečnosti na jedné straně a charakterizací odezev na nízkou dávku a jejich významu na straně druhé. To je důležité zejména v situaci, kdy je nutno provést kombinovanou studii chronické toxicity a karcinogenity (kapitola B.33 této přílohy) (odstavec 11).

11. Mělo by se uvážit, zda neprovést raději kombinovanou studii chronické toxicity a karcinogenity (kapitola B.33 této přílohy) nežli jen dvě samostatné studie – chronické toxicity (tato zkušební metoda B.30) a karcinogenity (kapitola B.32 této přílohy). Kombinovaná zkouška zajišťuje větší efektivitu ve smyslu času a nákladů v porovnání s prováděním dvou samostatných studií, a zároveň nezhoršuje kvalitu údajů ani ve fázi zkoušení chronické toxicity, ani ve fázi zkoušení karcinogenity. Při provádění kombinované studie chronické toxicity a karcinogenity (kapitola B.33 této přílohy) však je třeba pečlivě zvážit zásady výběru dávky (odstavce 9 a 20–25) a rovněž se uznává, že v určitých regulačních rámcích mohou být vyžadovány samostatné studie.

12. Definice použité v kontextu této zkušební metody naleznete na konci této kapitoly a v Pokynech č. 116 (6).

PODSTATA ZKOUŠKY

13. Zkoušená chemická látka se podává denně v postupně rostoucích dávkách několika skupinám pokusných zvířat po dobu 12 měsíců, avšak je možné zvolit i delší nebo kratší dobu expozice v závislosti na regulačních požadavcích (viz odstavec 33). Tato doba trvání by se měla zvolit dostatečně dlouhá na to, aby umožnila manifestaci jakýchkoli účinků kumulativní toxicity, bez zkreslujících příznaků geriatrických změn. Odchylky od doby expozice 12 měsíců by měly být odůvodněny, zejména v případě kratších expozic. Zkoušená chemická látka se obvykle podává orální cestou, avšak zkoušky prováděné inhalační nebo dermální cestou mohou být také vhodné. Plán studie může rovněž zahrnovat jedno nebo více předběžných utracení, např. za 3 a 6 měsíců, a je možné přidat další skupiny zvířat, aby se tato skutečnost kompenzovala (viz odstavec 19). V průběhu období podávání se zvířata každý den pečlivě pozorují, aby se zjistily příznaky toxicity. Zvířata, která v průběhu zkoušky uhynula nebo byla utracena, se pitvají a na konci zkoušky se přeživší zvířata utratí a rovněž pitvají.

▼M4

POPIS METODY

Výběr zvířecích druhů

14. Tato zkušební metoda primárně zahrnuje posouzení a vyhodnocení chronické toxicity u hlodavců (viz odstavec 2), avšak uznává se, že v určitých regulačních rámcích mohou být vyžadovány podobné studie u nehlodavců. Výběr druhu by měl být zdůvodněn. Plán a provedení studií chronické toxicity u nehlodavců, jsou-li požadovány, by měl vycházet z principů uvedených v této zkušební metodě spolu s principy v kapitole B.27 této přílohy, 90denní studie orální toxicity po opakované aplikaci na nehlodavcích (5). Další informace o výběru druhu a kmene jsou uvedeny v Pokynech č. 116 (6).

15. V této zkušební metodě se dává přednost potkanům, ale lze použít i jiný druh hlodavců, např. myš. Krysy a myši jsou upřednostňovanými experimentálními modelovými organismy díky své relativně krátké době života, široce rozšířenému použití ve farmakologických a toxikologických studiích, citlivosti k indukci nádoru a dostupnosti dostatečně charakterizovaných kmenů. V důsledku těchto vlastností je k dispozici velké množství informací o jejich fyziologii a patologii. Měla by se použít mladá zdravá dospělá zvířata běžně používaných laboratorních kmenů. Studie chronické toxicity by se měla provádět na zvířatech ze stejného kmene a zdroje, jako byla zvířata použitá v předběžných studiích toxicity s kratší dobou trvání. Samice musí být nullipary a nesmějí být březí.

Podmínky chovu a krmení

16. Zvířata lze chovat jednotlivě nebo v klecích po malých skupinkách jedinců stejného pohlaví. Individuální chov by se měl použít pouze tehdy, je-li to vědecky odůvodněné (19), (20), (21). Klece by měly být uspořádány tak, aby byl případný vliv jejich polohy minimalizován. Teplota v místnosti pro pokusná zvířata by měla být 22 °C (± 3 °C). Relativní vlhkost vzduchu by měla být minimálně 30 % a pokud možno nepřesáhnout 70 % kromě doby úklidu místnosti. Cílem by měla být hodnota 50–60 %. Osvětlení by mělo být umělé a mělo by se střídat 12 hodin světla a 12 hodin tmy. Ke krmení lze použít konvenční laboratorní krmivo s neomezenou dodávkou pitné vody. Strava by měla splňovat všechny nutriční požadavky zkoušených druhů a obsah příměsí ve stravě zahrnující mimo jiné zbytky pesticidů, perzistentní organopolutanty, fytoestrogeny, těžké kovy a mykotoxiny, které mohou ovlivnit výsledek zkoušky, by měl být co možná nejnižší. Pravidelně by se měly získávat analytické informace o nutričních hodnotách stravy a množství příměsí ve stravě, alespoň na začátku studie a pokaždé, když se změní používaná šarže, a měly by se začlenit do závěrečné zprávy. Obdobně by se měla poskytnout analýza pitné vody. Výběr stravy může být ovlivněn nutností zajistit vhodnou přísadu zkoušené chemické látky, podává-li se látka v krmivu, a splnit nutriční potřeby zvířat.

Příprava zvířat

17. Použijí se zdravá zvířata, která se alespoň 7 dnů aklimatizovala na laboratorní podmínky a která nebyla dříve podrobena žádným experimentálním postupům. V případě hlodavců by se mělo podávání látky zahájit co možná nejdříve po jejich odstavení a aklimatizaci, nejlépe před dosažením stáří 8 týdnů. Pokusná zvířata by měla být charakterizována podle druhu, kmenu, původu, pohlaví, hmotnosti a stáří. Na začátku studie by měly být odchylky hmotnosti zvířat u každého pohlaví minimální a neměly by překročit ± 20 % průměrné hmotnosti pro všechna zvířata ve studii, pro každé pohlaví zvlášť. Zvířata by měla být rozdělena náhodným výběrem

▼M4

do kontrolních a experimentálních skupin. Po randomizaci by neměly být výrazné rozdíly v průměrných hodnotách tělesné hmotnosti mezi skupinami v rámci každého pohlaví. Existují-li statisticky významné rozdíly, měla by se randomizace pokud možno zopakovat. Každému zvířeti by se mělo přidělit jedinečné identifikační číslo a mělo by se tímto číslem trvale označit pomocí tetování, implantací mikročipu nebo jinou vhodnou metodou.

POSTUP

Počet a pohlaví zvířat

18. Měla by se použít obě pohlaví. Mělo by se použít dostatečné množství zvířat, aby bylo na konci studie v každé skupině dost zvířat pro podrobné biologické a statistické vyhodnocení. U hlodavců by se mělo obvykle použít alespoň 20 zvířat od každého pohlaví pro každou skupinu při každé úrovni dávky, oproti tomu u nehlodavců se doporučuje použít minimálně 4 jedince od každého pohlaví pro každou skupinu. Ve studiích používajících myši může být nutné přidat další zvířata do každé skupiny s příslušnou dávkou, aby se mohla provést všechna požadovaná hematologická vyšetření.

Zajištění předběžných utracení, satelitních skupin a ověřovacích zvířat

19. Studie může zajistit zvířata pro předběžná utracení (alespoň 10 zvířat/pohlaví/skupinu) např. v 6. měsíci, aby se získaly informace o progresi toxikologických změn a mechanistické informace, je-li to vědecky odůvodněné. Jsou-li tyto informace již k dispozici z předchozích studií toxicity zkoušené chemické látky po opakovaných dávkách, nemusí být předběžná utracení vědecky odůvodněná. Rovněž je možné zařadit do studie satelitní skupiny k monitorování reverzibility toxikologických změn vyvolaných zkoumanou chemickou látkou; ty budou obvykle omezeny na nejvyšší úroveň dávky ve studii plus kontrolu. Také je možné zařadit do studie další skupinu ověřovacích zvířat (obvykle 5 zvířat od každého pohlaví) k monitorování stavu onemocnění v průběhu studie, je-li to nutné (22). Pokud se plánují předběžná utracení zvířat nebo začlenění satelitní nebo ověřovací skupiny, je nutno zvýšit počet zvířat zařazených do studie o počet zvířat, která budou utracena před ukončením studie. U těchto zvířat by se měly obvykle sledovat stejné parametry, zahrnující tělesnou hmotnost, spotřebu krmiva/vody, hematologická a klinická biochemická měření a patologická vyšetření, jako u zvířat ve fázi chronické toxicity v hlavní studii, avšak měření se také mohou omezit (ve skupinách určených k předběžnému utracení) na konkrétní klíčové parametry, jako je neurotoxicita a imunotoxicita.

Dávkové skupiny a dávkování

20. Pokyny ohledně veškerých aspektů výběru dávky a odstupňování úrovní dávek jsou uvedeny v Pokynech č. 116 (6). S výjimkou případů, kdy se provede limitní zkouška (viz odstavec 27), by se měly použít nejméně tři úrovně dávek a souběžná kontrola. Úrovně dávek budou obecně vycházet z výsledků krátkodobých studií při opakované aplikaci nebo ze studií k stanovení rozsahu dávkování a měly by zohlednit jakékoli existující toxikologické a toxikokinetické údaje dostupné pro zkoušenou sloučeninu nebo příbuzné materiály.

▼M4

21. Nebrání-li tomu fyzikálně-chemická povaha nebo biologické účinky zkoušené chemické látky, měla by se obvykle zvolit nejvyšší úroveň dávky za účelem identifikace hlavních cílových orgánů a toxických účinků, která by však zároveň neměla vést k utrpení, závažné toxicitě, morbiditě nebo uhynutí. Za současného zohlednění faktorů uvedených v odstavci 22 níže by se měla vybrat taková nejvyšší dávka, aby vyvolala příznaky toxicity, např. pokles přírůstku tělesné hmotnosti (přibližně 10 %).

22. Nicméně v závislosti na cílech studie (viz odstavec 6) je možné zvolit nejvyšší dávku nižší, než je dávka prokazující toxicitu, např. jestliže dávka vyvolává nepříznivý účinek, který však má jen malý dopad na délku života nebo tělesnou hmotnost. Nejvyšší dávka by neměla přesáhnout 1 000 mg/kg tělesné hmotnosti/den (mezní dávka, viz odstavec 27).

23. Je možné zvolit úrovně dávek a jejich odstupňování ke stanovení vztahu mezi dávkou a odezvou a NOAEL nebo jiných plánovaných výsledků studie, např. BMD (viz odstavec 25) na nejnižší úrovni dávky. Faktory, které by se měly zvážit při určování nižších dávek, zahrnují předpokládanou směrnici křivky závislosti odezvy na dávce, dávky, při kterých mohou nastat důležité změny v metabolismu nebo způsobu toxického účinku, kde se předpokládá prahová hodnota nebo kde se předpokládá výchozí bod pro extrapolaci do oblasti nízkých dávek.

24. Odstupňování úrovní dávek bude záviset na vlastnostech zkoušené chemické látky a není možné je v této zkušební metodě předepsat, avšak dvou až čtyřnásobné intervaly obvykle vedou k dobré funkčnosti zkoušky, použijí-li se k nastavení sestupných úrovní dávek a často se upřednostňuje zařazení čtvrté zkušební skupiny před použitím velmi dlouhých intervalů (např. více než faktor přibližně 6–10) mezi dávkami. Obecně je třeba vyhnout se použití faktorů větších než 10 a jejich případné použití by se mělo zdůvodnit.

25. Jak je dále uvedeno v Pokynech č. 116 (6), je třeba při výběru dávky zvážit tyto body:

— známá nebo předpokládaná nelinearita či inflexní body na křivce závislosti odezvy na dávce,

— toxikokinetika a rozsahy dávkování, při kterých dochází nebo nedochází k metabolické indukci, saturaci nebo nelinearitě mezi vnějšími a vnitřními dávkami,

— prekurzorové léze, známky účinku nebo indikátory probíhajících klíčových základních biologických procesů,

— klíčové (nebo předpokládané) aspekty způsobu účinku, například dávky, při kterých začíná vzrůstat cytotoxicita, narušují se hladiny hormonů, homeostatické mechanismy jsou ochromeny atd.,

— oblasti křivky závislosti odezvy na dávce, kde je nutný obzvlášť robustní odhad, např. v rozsahu předpokládané BMD nebo prahové hodnoty,

— zvážení předpokládaných úrovní expozice člověka.

▼M4

26. Kontrolní skupina je neexponovaná skupina nebo kontrolní skupina s nosičem, pokud se nosič při podávání zkoušené chemické látky používá. S výjimkou aplikace zkoušené chemické látky je třeba se zvířaty v kontrolní skupině zacházet stejným způsobem jako se zvířaty v experimentálních skupinách. Používá-li se nosič, podá se kontrolní skupině v nejvyšším používaném objemu v rámci skupin. Jestliže se zkoušená chemická látka podává v krmivu a způsobuje podstatné snížení příjmu potravy v důsledku snížené chutnosti krmiva, může být užitečné použít další kontrolní skupinu krmenou tak, aby měla stejně snížený příjem potravy a posloužila jako vhodnější kontrola.

27. Pokud je možné na základě informací z předběžných studií předpokládat, že zkouška provedená podle postupů popsaných pro tuto studii při jedné úrovni dávky nejméně 1 000 mg na kg tělesné hmotnosti na den pravděpodobně nevyvolá nepříznivé účinky a pokud se na základě údajů o strukturně příbuzných chemických látkách nepředpokládá toxicita, nemusí být úplná studie s použitím tří úrovní dávek nutná. Mezní dávka 1 000 mg/kg tělesné hmotnosti/den se může použít s výjimkou případu, kdy údaje o expozici člověka naznačují, že je nezbytné použití vyšší úrovně dávek.

Příprava dávek a podávání zkoušené chemické látky

28. Zkoušená chemická látka se obvykle podává orálně, v krmivu či v pitné vodě nebo žaludeční sondou. Další informace o cestách a způsobech podání jsou uvedeny v Pokynech č. 116 (6). Cesta a způsob podání závisí na účelu studie, fyzikálně-chemických vlastnostech zkoušené chemické látky, její biologické dostupnosti a převládající cestě a způsobu expozice člověka. Mělo by se uvést zdůvodnění zvolené cesty a způsobu podání. V zájmu zajištění dobrých životních podmínek zvířat by se mělo podávání žaludeční sondou zvolit pouze u těch látek, u nichž tato cesta a způsob podání náležitě reprezentují potenciální expozici člověka (např. farmaceutika). Chemické látky, které se nacházejí v potravě nebo životním prostředí, včetně pesticidů, se obvykle podávají v krmivu nebo pitné vodě. Nicméně u některých scénářů expozice, např. expozice na pracovišti, mohou být vhodnější jiné cesty podání.

29. Zkoušená chemická látka se v případě potřeby rozpustí nebo suspenduje ve vhodném nosiči. Je třeba podle potřeby zvážit následující vlastnosti nosiče nebo jiných přídatných látek: účinky na absorpci, distribuci, metabolismus nebo retenci zkoušené chemické látky, účinky na chemické vlastnosti zkoušené chemické látky, které mohou změnit její toxické vlastnosti a účinky na konzumaci krmiva nebo vody či na nutriční stav zvířat. Je-li to možné, doporučuje se zvážit nejprve použití vodného roztoku/suspenze, poté použití roztoku/emulze v oleji (např. v kukuřičném oleji) a nakonec roztoku v jiných nosičích. U nosičů jiných než voda je nutné znát jejich toxické vlastnosti. Měly by být k dispozici informace o stabilitě zkoušené chemické látky a homogenitě podávaných roztoků nebo krmiva (dle potřeby) za podmínek podávání (např. v krmivu).

30. U látek podávaných v krmivu nebo v pitné vodě je důležité zajistit, aby množství použité zkoušené chemické látky neovlivňovalo normální výživu nebo vodní rovnováhu. V dlouhodobých studiích toxicity s podáváním látky v krmivu by koncentrace zkoušené chemické látky v krmivu obvykle neměla přesáhnout horní mez 5 % celkového množství krmiva, aby se zabránilo nutriční nerovnováze. Podává-li se zkoušená chemická látka v krmivu, může se použít buď konstantní koncentrace v krmivu (mg/kg krmiva nebo ppm), nebo konstantní dávkování vzhledem k tělesné hmotnosti zvířete (mg/kg tělesné hmotnosti) vypočítané jednou týdně. Použitá možnost by se měla specifikovat.

▼M4

31. V případě orálního podávání se zvířatům podává zkoušená chemická látka denně (sedm dnů v každém týdnu), obvykle po dobu 12 měsíců (viz také odstavec 33), avšak může být nutná i delší doba v závislosti na regulačních požadavcích. Jakýkoli jiný režim podávání, např. pět dní v týdnu, musí být zdůvodněn. V případě dermální aplikace se zvířata vystavují zkoušené chemické látce alespoň po dobu 6 hodin denně, 7 dnů v týdnu, jak je specifikováno v kapitole B.9 této přílohy (10) po dobu 12 měsíců. Expozice inhalační cestou se provádí 6 hodin denně, 7 dnů v týdnu, avšak je možné použít i expozici 5 dnů v týdnu, je-li zdůvodněna. Období expozice obvykle trvá 12 měsíců. Jsou-li k expozici pouze nazální cestou použity jiné druhy hlodavců než potkani, je možné upravit maximální doby expozice za účelem minimalizace druhově specifického utrpení. Používá-li se expozice kratší než 6 hodin denně, je třeba uvést zdůvodnění. Viz také kapitola B.8 této přílohy (8).

32. Pokud se zkoušená chemická látka podává zvířatům nitrožaludečně, mělo by se to provádět žaludeční sondou nebo vhodnou intubační kanylou, vždy v přibližně stejnou denní dobu. Obvykle se podává jedna dávka jednou denně. Pokud je např. chemická látka lokálně dráždící, je možné denní dávku podávat rozdělenou na dvě dávky (dvakrát denně). Maximální objem kapaliny, kterou lze jednorázově podat, závisí na velikosti pokusného zvířete. Objem by se měl udržovat co možná nejnižší a u hlodavců by obvykle neměl přesáhnout 1 ml/100 g tělesné hmotnosti (22). Kolísání objemu zkoušené chemické látky by se mělo omezit nastavením koncentrace tak, aby se zajistil konstantní objem na všech úrovních dávek. Potenciálně žíravé nebo dráždivé chemické látky jsou výjimkou a je nutné je naředit, aby se zamezilo závažným lokálním účinkům. Zkoušky při koncentracích, které by pravděpodobně vedly k poleptání nebo podráždění gastrointestinálního traktu, by se neměly provádět.

Délka studie

33. Přestože je tato zkušební metoda primárně navržena jako 12měsíční studie chronické toxicity, uspořádání studie dovoluje i jiné intervaly, a lze je tedy použít rovněž u kratších (např. 6 nebo 9 měsíců) nebo delších (např. 18 nebo 24 měsíců) studií v závislosti na požadavcích konkrétních regulačních rámců nebo pro specifické mechanistické účely. Odchylky od doby expozice 12 měsíců by měly být odůvodněny, zejména v případě kratších expozic. Satelitní skupiny zahrnuté pro monitorování reverzibility toxikologických změn vyvolaných zkoušenou chemickou látkou by se měly udržovat bez podávání látky po dobu nepřekračující 4 týdny a ne delší než jedna třetina celkové délky studie po skončení expozice. Další pokyny, včetně posouzení přežití ve studii, jsou uvedeny v Pokynech č. 116 (6).

POZOROVÁNÍ

34. Všechna zvířata by se měla kontrolovat s ohledem na morbiditu nebo mortalitu, obvykle na začátku a na konci každého dne, včetně víkendů a svátků. Všeobecné klinické pozorování by se mělo provádět nejméně jednou denně, přednostně ve stejnou dobu (stejné doby) a s uvážením doby očekávaných maximálních účinků po podání látky v případě podání sondou.

▼M4

35. Před první expozicí látce (za účelem intraindividuálního porovnání), na konci prvního týdne studie a dále jednou měsíčně se by se mělo provést důkladné klinické vyšetření všech zvířat. Protokol pozorování by se měl uspořádat tak, aby byly odchylky mezi jednotlivými pozorovateli minimalizovány a byly nezávislé na experimentální skupině. Toto pozorování by se mělo provádět mimo chovnou klec ve standardním pozorovacím prostoru a přednostně pokaždé ve stejnou dobu. Pozorování by se měla pečlivě zaznamenávat, nejlépe za použití systému bodování explicitně definovaného ve zkušební laboratoři. Je třeba se pokusit zajistit, aby byly rozdíly mezi podmínkami pozorování minimální. Vyšetření by se mělo mimo jiné soustředit na změny kůže, srsti, očí a sliznic, výskyt sekretů a exkretů a vegetativní funkce (slzení, zježení srsti, velikost zornic, nezvyklé dýchání). Zaznamenávat by se měly také změny chůze, držení těla a reakce na manipulaci, dále přítomnost klonických a tonických pohybů, stereotypů v chování (např. nadměrného čištění nebo opakovaného kroužení) nebo bizarního chování (např. sebepoškozování, chůze pozpátku) (24).

36. Před prvním podáním zkoušené chemické látky by se mělo u všech zvířat provést oftalmologické vyšetření s použitím oftalmoskopu nebo jiného vhodného přístroje. Na konci studie by se toto vyšetření mělo provést nejlépe u všech zvířat, avšak minimálně ve skupinách s vysokou dávkou a kontrolních skupinách. Zjistí-li se na očích změny související s podáním látky, měla by se vyšetřit všechna zvířata. Pokud analýza struktury nebo jiné informace naznačují toxicitu pro oko, měla by se četnost provádění očního vyšetření zvýšit.

37. V případě chemických látek, které při předchozích 28denních a/nebo 90denních zkouškách toxicity po opakované dávce vyvolaly neurotoxické účinky, je možné volitelně vyšetřit senzorickou reaktivitu na různé druhy stimulů (24) (např. sluchové, zrakové a proprioceptivní stimuly) (25), (26), (27), sílu úchopu (28) a motorickou aktivitu (29) před zahájením studie a v tříměsíčních intervalech po začátku studie až do 12 měsíců včetně a rovněž při ukončení studie (je-li delší než 12 měsíců). Další informace o postupech, které lze použít, jsou uvedeny v příslušné literatuře. Místo postupů popsaných v této literatuře však lze použít alternativní postupy.

38. V případě chemických látek, které při předchozích 28denních a/nebo 90denních zkouškách toxicity po opakované dávce vyvolaly imunotoxické účinky, je možno na konci studie volitelně provést další vyšetření tohoto cílového parametru.

Tělesná hmotnost, spotřeba krmiva/vody a využitelnost krmiva

39. Všechna zvířata by se měla zvážit na začátku expozice, alespoň jednou týdně během prvních 13 týdnů a poté alespoň jednou měsíčně. Měření spotřeby krmiva a využitelnosti krmiva by se měla provádět alespoň jednou týdně během prvních 13 týdnů a poté alespoň jednou měsíčně. Spotřeba vody by se měla měřit alespoň jednou týdně během prvních 13 týdnů a poté alespoň jednou měsíčně, podává-li se chemická látka v pitné vodě. Měření spotřeby vody by se mělo zvážit také v případě studií, při kterých může dojít ke změně příjmu tekutin.

▼M4

Hematologická a klinická biochemická vyšetření

40. Ve studiích na hlodavcích by se měla hematologická vyšetření provádět alespoň u 10 samců a 10 samic v každé skupině, 3., 6. a 12. měsíc a rovněž na konci studie (trvá-li déle než 12 měsíců), vždy u stejných zvířat. U myší mohou být zapotřebí satelitní zvířata, aby se mohla provést všechna požadovaná hematologická stanovení (viz odstavec 18). Ve studiích na nehlodavcích se budou vzorky odebírat menšímu počtu zvířat (např. 4 zvířatům od každého pohlaví v každé skupině ve studiích na psech) v průběžných odběrových časech a na konci studie, jak je popsáno u hlodavců. Měření po třech měsících, jak u hlodavců, tak u nehlodavců, se nemusí provádět, pokud nebyl v předchozí 90denní studii provedené při srovnatelných úrovních dávky pozorován žádný účinek na hematologické parametry. Krevní vzorky by se měly odebírat z určeného místa, například srdeční punkcí nebo z retroorbitálního sinu, v anestezii.

41. Měly by se vyšetřit následující parametry (30): Celkový počet leukocytů, diferenciální rozpočet leukocytů, počet erytrocytů, trombocytů, koncentrace hemoglobinu, hematokrit (objem erytrocytů), střední objem erytrocytu (MCV), průměrné množství hemoglobinu v erytrocytu (MCH), průměrná koncentrace hemoglobinu v erytrocytu (MCHC), protrombinový čas a aktivovaný parciální tromboplastinový čas. Dle potřeby lze změřit také další hematologické parametry, jako jsou Heinzova tělíska či jiné atypické morfologické formy erytrocytu nebo methemoglobin, v závislosti na toxicitě zkoušené chemické látky. Celkově by se mělo postupovat flexibilně, podle pozorovaného a/nebo očekávaného účinku dané zkoušené chemické látky. Jestliže má zkoušená chemická látka účinek na systém krvetvorby, může být indikováno také vyšetření počtu retikulocytů a cytologie kostní dřeni, přestože se tato vyšetření nemusí provádět rutinně.

42. Klinické biochemické analýzy za účelem vyšetření hlavních toxických účinků na tkáně, a zejména na játra a ledviny, by se měly provést na krevních vzorcích odebraných alespoň 10 samcům a 10 samicím v každé skupině ve stejných časových intervalech stanovených pro hematologická vyšetření a s použitím vždy stejných zvířat. U myší mohou být zapotřebí satelitní zvířata, aby se mohla provést všechna požadovaná biochemická vyšetření. Ve studiích na nehlodavcích se budou vzorky odebírat menšímu počtu zvířat (např. ve studiích na psech 4 zvířatům od každého pohlaví v každé skupině) v průběžných odběrových časech a na konci studie tak, jak je popsáno u hlodavců. Měření po třech měsících, jak u hlodavců, tak u nehlodavců, se nemusí provádět, pokud nebyl v předchozí 90denní studii provedené při srovnatelných úrovních dávky pozorován žádný účinek na klinické biochemické parametry. Před odebráním krevních vzorků se doporučuje ponechat zvířata (s výjimkou myší) přes noc lačnit. Měly by se vyšetřit následující parametry (30): glukóza, močovina (močovinový dusík), kreatinin, celkový obsah proteinů, albuminy, vápník, sodík, draslík, celkový cholesterol, alespoň dva vhodné testy pro hepatocelulární vyšetření (alaninaminotransferáza, aspartátaminotransferáza, glutamátdehydrogenáza, celkové kyseliny žlučové) (31) a alespoň dva vhodné testy pro hepatobiliární vyšetření (alkalická fosfatáza, gamaglutamyltransferáza, 5'-nukleotidáza, celkový bilirubin, celkový obsah žlučových kyselin) (31). Dle potřeby je možné změřit také další klinické biochemické parametry, např. triglyceridy nalačno, specifické hormony a cholinesterázu, v závislosti na toxicitě zkoušené chemické látky. Celkově je třeba postup přizpůsobit pozorovanému a/nebo očekávanému účinku zkoušené chemické látky.

▼M4

43. Rozbor moči by se měl provést alespoň u 10 samců a 10 samic v každé skupině, s použitím vzorků odebraných ve stejných intervalech, jako u hematologických a klinických biochemických vyšetření. Měření v 3. měsíci se nemusí provádět, pokud nebyl v předchozí 90denní studii provedené při srovnatelných úrovních dávky pozorován žádný účinek na složení moči. Odborné doporučení pro klinické patologické studie zahrnovalo následující parametry (30): vzhled, objem, osmolalita nebo specifická hmotnost, pH, celkový obsah proteinů a glukóza. Další stanovení zahrnují ketony, urobilinogen, bilirubin, a okultní krvácení. Zkoumání pozorovaného účinku (pozorovaných účinků) lze v případě potřeby rozšířit o další parametry.

44. Obecně se má za to, že ve studiích na psech je třeba před expozicí změřit výchozí hematologické a klinické biochemické parametry, avšak ve studiích na hlodavcích se stanovovat nemusí (30). Pokud jsou však historické výchozí údaje (viz odstavec 50) nedostatečné, je třeba zvážit získání těchto údajů.

Patologie

Pitva

45. U všech zvířat zařazených do studie se obvykle provede celková podrobná pitva zahrnující pečlivé vyšetření povrchu těla, všech otvorů a lebeční, hrudní a břišní dutiny a jejich obsahu. Nicméně je také možno měření omezit na konkrétní klíčové parametry (ve skupině pro předběžná utracení nebo v satelitní skupině), jako je neurotoxicita či imunotoxicita (viz odstavec 19). Zvířata se nemusí pitvat ani se u nich neprovádí postupy popsané v následujících odstavcích. V jednotlivých případech a dle uvážení vedoucího studie může být třeba provést pitvu u ověřovacích zvířat.

46. U všech ostatních zvířat, kromě zvířat vyloučených v druhé části odstavce 45, by se měly zvážit orgány. Nadledvinky, mozek, nadvarlata, srdce, ledviny, játra, vaječníky, slezina, varlata, štítná žláza (vážená po fixaci, včetně příštítných tělísek) a děloha všech zvířat (kromě zvířat nalezených umírajících a/nebo zvířat utracených v průběhu zkoušky) by se měly zbavit všech přirostlých tkání a co nejdříve po vyjmutí z těla ve vlhkém stavu zvážit, než vyschnou. Ve studii používající myši je vážení nadledvinek volitelné.

47. Následující tkáně by se měly konzervovat v nejvhodnějším fixačním médiu s ohledem na typ tkáně a plánovaná následná histopatologická vyšetření (32) (tkáně v hranatých závorkách jsou volitelné):

všechny makroskopicky viditelné léze	srdce	slinivka břišní	žaludek (předžaludek, žláznatý žaludek)
nadledvinka	*ileum*	příštítná tělíska	[zuby]
aorta	*jejunum*	periferní nerv	varlata
mozek (zahrnující řezy mozkových hemisfér, mozečku a prodloužené míchy/Varolova mostu)	ledviny	hypofýza	brzlík
slepé střevo	slzní žláza (extraorbitální)	prostata	štítná žláza
cervix	játra	rektum	[jazyk]

▼**M4**

koagulační žláza	plíce	slinná žláza	průdušnice
tlusté střevo	lymfatické uzliny (povrchové i hluboké)	semenný váček	močový měchýř
dvanáctník	prsní žláza (povinné u samic a, je-li očividně možné ji vypreparovat, i u samců)	kosterní sval	děloha (včetně hrdla děložního)
nadvarle	[horní cesty dýchací, včetně nosu, nosních skořep a vedlejších dutin nosních]	kůže	[močovod]
oko (včetně sítnice)	jícen	mícha (ve třech úrovních: krční, střední hrudní a bederní)	[močová trubice]
[*femur* s kloubem]	[*Bulbus olfactorius*]	slezina	pochva
žlučník (u jiných druhů než potkan)	vaječníky	[*sternum*],	řez kostní dření a/nebo čerstvý aspirát kostní dřeni
Harderova žláza			

V případě párových orgánů, např. ledvin, nadledvinek, by se měly uchovávat oba orgány. Na základě klinických nebo jiných nálezů může být nezbytné zkoumat i další tkáně. Také by se měly uchovat všechny orgány považované na základě známých vlastností zkoušené chemické látky za možné cílové orgány. Ve studiích s dermální cestou aplikace by se měl zachovat seznam orgánů stanovený pro orální cestu, a navíc je nezbytné odebrat a konzervovat vzorky kůže z místa aplikace. V inhalačních studiích by se měl seznam tkání z dýchacích cest určených ke konzervaci a vyšetření, řídit doporučeními uvedenými v kapitole B.8 této přílohy (8) a kapitole B.29 této přílohy (9). Co se týká ostatních orgánů/tkání (kromě specificky konzervovaných tkání z dýchacích cest) by se měly vyšetřit orgány uvedené na seznamu orgánů určeném pro orální cestu.

Histopatologické vyšetření

48. Jsou k dispozici pokyny ohledně osvědčených postupů při provádění toxikologických patologických studií (32). Histopatologická vyšetření by měla minimálně obsahovat:

— všechny tkáně ve skupinách s vysokou dávkou zkoušené chemické látky a kontrolních skupinách,

— všechny tkáně ze zvířat uhynulých nebo utracených během studie,

— všechny tkáně vykazující makroskopické abnormality,

— cílové tkáně nebo tkáně, které vykazují změny v souvislosti s expozicí ve skupině s vysokou dávkou, u všech zvířat ve všech ostatních experimentálních skupinách,

— v případě párových orgánů, např. ledvin, nadledvinek, by se měly vyšetřit oba orgány.

▼M4

ÚDAJE A JEJICH PŘEDKLÁDÁNÍ

Údaje

49. Měly by se uvést údaje o všech hodnocených parametrech u každého jednotlivého zvířete. Kromě toho by se měly všechny údaje shrnout do tabulky, přičemž se uvede u každé experimentální skupiny počet zvířat na začátku zkoušky, počet zvířat nalezených uhynulých v průběhu zkoušky nebo utracených z humánních důvodů a doba úmrtí nebo humánního utracení, počet zvířat vykazujících příznaky toxicity, popis příznaků toxicity, včetně doby nástupu, trvání a závažnosti každého toxického účinku, počet zvířat vykazujících léze, typ lézí a procento zvířat vykazujících každý typ léze. Tabulky se souhrnnými údaji by měly uvádět průměrné hodnoty a směrodatné odchylky (u spojitých dat ze zkoušky) u zvířat vykazujících toxické účinky nebo léze a také klasifikaci lézí.

50. Pro interpretaci výsledků studie mohou být cenné historické kontrolní údaje, např. v případě, kdy existují známky toho, že se současné kontroly značně odchylují od posledních údajů získaných od kontrolních zvířat ze stejného zkušebního zařízení/kolonie. Historické kontrolní údaje, pokud se hodnotí, by měly být ze stejné laboratoře a měly by pocházet od zvířat stejného věku a ze stejného kmene během pěti let předcházejících příslušné studii.

51. Číselné výsledky by měly být pokud možno vyhodnoceny vhodnou a obecně uznávanou statistickou metodou. Statistické metody a údaje, které se mají analyzovat, by se měly zvolit již při plánování studie (odstavec 8). Tento výběr by měl zahrnovat rezervu pro případné úpravy v závislosti na přežití.

Protokol o zkoušce

52. Protokol o zkoušce by měl obsahovat tyto údaje:

Zkoušená chemická látka:

— fyzikální vlastnosti, čistota a fyzikálně-chemické vlastnosti,

— identifikační údaje,

— zdroj chemické látky,

— číslo šarže,

— certifikát o chemické analýze.

Nosič (je-li použit):

— zdůvodnění výběru nosiče (pokud není použita voda).

Pokusná zvířata:

— použité druhy/kmen a zdůvodnění výběru,

— počet, věk a pohlaví zvířat na začátku zkoušky,

▼M4

— zdroj, podmínky chovu, krmivo atd.,

— hmotnosti jednotlivých zvířat na začátku zkoušky.

Zkušební podmínky:

— zdůvodnění způsobu podávání a výběru dávky,

— případně statistické metody použité k analýze dat,

— podrobnosti o použité formě zkoušené chemické látky/úpravě krmiva,

— analytické údaje o dosažené koncentraci, stabilitě a homogenitě přípravku,

— cesta podání a podrobné údaje o podávání zkoušené chemické látky,

— u inhalačních studií informace o tom, zda byla expozice pouze nazální cestou, nebo celotělová,

— skutečné dávky (mg/kg tělesné hmotnosti/den) a případně koeficient přepočtu koncentrace zkoušené chemické látky v krmivu/pitné vodě (mg/kg nebo ppm) na skutečnou dávku (mg/kg tělesné hmotnosti/den),

— podrobné údaje o kvalitě stravy a vody.

Výsledky (měly by se předložit souhrnné tabulky údajů a údaje pro jednotlivá zvířata):

— údaje o přežití,

— tělesná hmotnost/změny tělesné hmotnosti,

— spotřeba krmiva, výpočty využitelnosti krmiva, pokud byly provedeny a případně spotřeba vody,

— údaje o toxických reakcích podle pohlaví a úrovně dávky, včetně příznaků toxicity,

— povaha, výskyt (plus závažnost, je-li hodnocena) a trvání pozorovaných klinických příznaků (zda byly přechodné, nebo trvalé),

— oftalmologické vyšetření,

— hematologické testy,

— klinické biochemické testy,

— rozbor moči,

— výsledky všech vyšetření neurotoxicity nebo imunotoxicity,

— konečná tělesná hmotnost,

— hmotnosti orgánů (a jejich poměry, pokud se stanovují),

— pitevní nálezy,

— podrobný popis všech histopatologických nálezů souvisejících s expozicí,

— údaje o absorpci, pokud jsou dostupné.

▼**M4**

Statistické zpracování výsledků dle potřeby

Diskuse o výsledcích zahrnující:

— vztahy mezi dávkou a odezvou,

— posouzení všech informací o způsobu účinku,

— diskuse o všech modelovacích přístupech,

— stanovení BMD, NOAEL nebo LOAEL,

— historické kontrolní údaje,

— význam pro člověka.

Závěry

LITERATURA:

1) OECD (1995). Report of the Consultation Meeting on Sub-chronic and Chronic Toxicity/Carcinogenicity Testing (Rome, 1995), internal working document, Environment Directorate, OECD, Paris.

2) Combes RD, Gaunt I, Balls M (2004). A Scientific and Animal Welfare Assessment of the OECD Health Effects Test Guidelines for the Safety Testing of Chemicals under the European Union REACH System. ATLA 32: 163-208.

3) Barlow SM, Greig JB, Bridges JW *et al.* (2002). Hazard identification by methods of animal-based toxicology. Food. Chem. Toxicol. 40, 145-191.

4) Chhabra RS, Bucher JR, Wolfe M, Portier C (2003). Toxicity characterization of environmental chemicals by the US National Toxicology Programme: an overview. Int. J. Hyg. Environ. Health 206: 437-445.

5) Kapitola B.27 této přílohy, Zkouška subchronické orální toxicity studie orální toxicity na nehlodavcích (90denní opakovaná aplikace).

6) OECD (2012). Guidance Document on the Design and Conduct of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Supporting Test Guidelines 451, 452 and 453 - Second edition. Series on Testing and Assessment No. 116, available on the OECD public website for Test Guideline at www.oecd.org/env/testguidelines.

7) OECD (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing, Series on Testing and Assessment N°39, ENV/JM/MONO(2009)28, OECD, Paris.

8) Kapitola B.8 této přílohy, Subakutní inhalační toxicita: 28denní studie.

9) Kapitola B.29 této přílohy, Studie subchronické inhalační toxicity: 90denní studie.

10) Kapitola B.9 této přílohy, Dermální toxicita (28denní opakovaná aplikace).

11) Carmichael NG, Barton HA, Boobis AR *et al.* (2006). Agricultural Chemical Safety Assessment: A Multisector Approach to the Modernization of Human Safety Requirements. Critical Reviews in Toxicology 36: 1-7.

12) Barton HA, Pastoor TP, Baetcke T *et al.* (2006). The Acquisition and Application of Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion (ADME) Data in Agricultural Chemical Safety Assessments. Critical Reviews in Toxicology 36: 9-35.

13) Doe JE, Boobis AR, Blacker A *et al.* (2006). A Tiered Approach to Systemic Toxicity Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. Critical Reviews in Toxicology 36: 37-68.

▼M4

14) Cooper RL, Lamb JS, Barlow SM *et al*. (2006). A Tiered Approach to Life Stages Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. Critical Reviews in Toxicology 36: 69-98.

15) OECD (2002). Guidance Notes for Analysis and Evaluation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Series on Testing and Assessment No. 35 and Series on Pesticides No. 14, ENV/JM/MONO(2002)19, OECD, Paris.

16) OECD (2000). Guidance Document on the recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation, No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris.

17) Rhomberg LR, Baetcke K, Blancato J, Bus J, Cohen S, Conolly R, Dixit R, Doe J, Ekelman K, Fenner-Crisp P, Harvey P, Hattis D, Jacobs A, Jacobson-Kram D, Lewandowski T, Liteplo R, Pelkonen O, Rice J, Somers D, Turturro A, West W, Olin S (2007). Issues in the Design and Interpretation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies in Rodents: Approaches to Dose Selection Crit Rev. Toxicol. 37 (9): 729 - 837.

18) ILSI (International Life Sciences Institute) (1997). Principles for the Selection of Doses in Chronic Rodent Bioassays. Foran JA (Ed.). ILSI Press, Washington, DC.

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

20) National Research Council, 1985. Guide for the care and use of laboratory animals. NIH Publication No. 86-23. Washington D.C., US. Dept. of Health and Human Services.

21) GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, 1988). Publication on the Planning and Structure of Animal Facilities for Institutes Performing Animal Experiments. ISBN 3-906255-04-2.

22) GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, 2006). Microbiological monitoring of laboratory animals in various housing systems.

23) Diehl K-H, Hull R, Morton D, Pfister R, Rabemampianina Y, Smith D, Vidal J-M, van de Vorstenbosch C. 2001. A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. Journal of Applied Toxicology 21:15-23.

24) IPCS (1986). Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals. Environmental Health Criteria Document No. 60.

25) Tupper DE, Wallace RB (1980). Utility of the Neurologic Examination in Rats. Acta Neurobiol. Exp. 40: 999-1003.

26) Gad SC (1982). A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. J. Toxicol.Environ. Health 9: 691-704.

27) Moser VC, McDaniel KM, Phillips PM (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of Amitraz. Toxicol. Appl. Pharmacol. 108: 267-283.

28) Meyer OA, Tilson HA, Byrd WC, Riley MT (1979). A Method for the RoutineAssessment of Fore- and Hind-limb Grip Strength of Rats and Mice. Neurobehav. Toxicol. 1: 233-236.

29) Crofton KM, Howard JL, Moser VC, Gill MW, Reiter LW, Tilson HA, MacPhail RC (1991). Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. Neurotoxicol. Teratol. 13: 599-609.

▼**M4**

30) Weingand K, Brown G, Hall R *et al.* (1996). Harmonisation of Animal Clinical Pathology Testing in Toxicity and Safety Studies. Fundam. & Appl. Toxicol. 29: 198-201.

31) Dokument (návrh) agentury EMEA „Non-clinical guideline on drug-induced hepatotoxicity“ (Doc. Ref. EMEA/CHMP/SWP/a50115/2006).

32) Crissman JW, Goodman DG, Hildebrandt PK et al. (2004). Best Practices Guideline: Toxicological Histopathology. Toxicologic Pathology 32: 126-131.

▼**M4**

Dodatek 1

DEFINICE

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

▼B

B.31 STUDIE PRENATÁLNÍ VÝVOJOVÉ TOXICITY

1. METODA

Tato metoda je replikou metody OECD TG 414 (2001).

1.1 ÚVOD

Tato metoda zkoušení vývojové toxicity je určena k získání všeobecných informací týkajících se účinku prenatální expozice na březí pokusné zvíře a na organismus vyvíjející se v děloze; tyto informace mohou zahrnovat jak hodnocení účinku na matku, tak i vliv na uhynutí, strukturální odchylky nebo změněný růst plodu. I když funkční poruchy tvoří významnou část vývoje, nejsou součástí této metody. Zkoušky na tyto poruchy mohou být prováděny v samostatné studii nebo jako doplněk této studie pomocí zkušební metody vývojové neurotoxicity. Informace o zkoušení funkčních poruch a jiných postnatálních účinků lze v případě potřeby získat z dvougenerační zkoušky toxicity pro reprodukci a zkoušky vývojové neurotoxicity.

Tato zkušební metoda může ve specifických případech vyžadovat určitou úpravu na základě specifických znalostí, např. fyzikálně-chemických nebo toxikologických vlastností zkoušené látky. Tato úprava je přijatelná, jestliže přesvědčivé vědecké důkazy svědčí o tom, že díky ní bude mít zkouška vyšší vypovídací hodnotou. V takovém případě je třeba tyto vědecké důkazy pečlivě zdokumentovat ve zprávě o studii.

1.2 DEFINICE

Vývojová toxikologie: studie nepříznivých účinků na vyvíjející se organismus, které mohou vyplývat z expozice před početím, během prenatálního vývoje nebo v postnatálním období až do doby pohlavní zralosti. Hlavní projevy vývojové toxicity zahrnují: 1) úhyn organismu, 2) strukturální odchylky, 3) změněný růst a 4) funkční poruchu. Vývojová toxikologie se původně nazývala teratologie.

Nepříznivý účinek: jakákoliv odchylka od normálního stavu spojená se zkouškou, která snižuje schopnost organismu přežít, rozmnožovat se nebo se přizpůsobit prostředí. Pokud jde o vývojovou toxikologii v nejširším slova smyslu, zahrnuje tento pojem jakýkoliv účinek, který brání normálnímu vývoji plodu, a to jak před narozením, tak i po něm.

Změněný růst: změna hmotnosti nebo velikosti orgánu nebo těla u potomstva.

Odchylky (anomálie): strukturální změny ve vývoji, které zahrnují jak malformace, tak i odchylky (28).

Malformace/velká odchylka: strukturální změna považovaná za škodlivou pro zvíře (může být i letální); obvykle je vzácná.

▼B

Malformace/malá odchylka: strukturální změna, která nemá žádný nebo má jen malý škodlivý účinek na zvíře; může být přechodná a u kontrolní populace se může vyskytovat poměrně často.

Zárodek: celkové množství derivátů oplodněného vajíčka v jakékoliv fázi vývoje od oplodnění až do narození, včetně dalších zárodečných membrán, embrya nebo plodu.

Implantace (nidace): přichycení blastocytu k epitelové výstelce dělohy, včetně její penetrace do děložního epitelu a zahnízdění v děložní sliznici.

Embryo: raná nebo vývojová fáze organismu, a to zvláště plod vyvíjející se po oplodnění vajíčka poté, co se objeví dlouhá osa a dokud nejsou přítomné všechny hlavní struktury.

Embryotoxicita: toxicita škodlivá pro normální strukturu, vývoj, růst a/nebo životaschopnost embrya.

Zárodek: nenarozený potomek v post-embryonálním období.

Fetotoxicita: toxicita škodlivá pro normální strukturu, vývoj, růst a/nebo životaschopnost plodu.

Potrat: předčasné vyloučení produktů oplodnění – embrya nebo plodu neschopného života – z dělohy.

Resorpce: zárodek, který po implantaci do dělohy později odumřel a vstřebává se nebo se již vstřebal.

Raná resorpce: důkaz o zahnízdění (implantaci) bez rozeznatelného embrya/plodu.

Pozdní resorpce: mrtvé embryo nebo plod se zevními degenerativními změnami.

NOAEL: zkratka pro hladinu bez pozorovaného nepříznivého účinku; odpovídá nejvyšší úrovni dávky nebo expozice, při které nejsou pozorovány žádné nepříznivé nálezy související s podáním látky.

1.3 REFERENČNÍ LÁTKA

Žádná.

1.4 PRINCIP ZKUŠEBNÍ METODY

Obvykle se zkoušená látka podává březím zvířatům nejpozději od implantace až do dne před plánovaným usmrcením, který by se měl co nejvíce přiblížit očekávanému dni vrhu, aniž se riskuje ztráta údajů v důsledku předčasného vrhu. Zkušební metoda není určena výhradně ke zkoumání období organogeneze (např. 5.–15. den u hlodavce a 6.–18. den u králíka), ale popřípadě rovněž ke zkoumání účinků před implantací, pro celé období gestace a až do dne před císařským řezem. Krátce před císařským řezem se samice usmrtí, prozkoumá se děložní obsah a u plodů se vyhodnotí zevní viditelné anomálie, změny měkkých tkání a skeletu.

▼B

1.5 POPIS ZKUŠEBNÍ METODY

1.5.1 **Výběr živočišných druhů**

Doporučuje se provádět zkoušení s nejvhodnějšími druhy a využívat laboratorní druhy a kmeny, které se běžně používají při zkoušení prenatální vývojové toxicity. Upřednostňovaným druhem hlodavce je potkan a upřednostňovaným druhem nehlodavce je králík. Použití jiného druhu je třeba odůvodnit.

1.5.2 **Podmínky chovu a krmení**

Teplota v místnosti pro pokusná zvířata by měla být 22 °C (± 3°) pro hlodavce 18 °C (± 3°) pro králíky, relativní vlhkost vzduchu by měla být minimálně 30 % a pokud možno nepřesáhnout 70 %, kromě doby úklidu místnosti, cílem by měla být hodnota 50–60 %. Osvětlení by mělo být umělé a mělo by se střídat 12 hodin světla a 12 hodin tmy. Ke krmení lze použít konvenční laboratorní stravu s neomezenou dodávkou pitné vody.

Páření by mělo probíhat v klecích vhodných k tomuto účelu. I když se dává přednost individuálnímu chovu spářených zvířat, přípustný je rovněž chov v malých skupinkách.

1.5.3 **Příprava zvířat**

Použijí se zdravá zvířata, která se alespoň 5 dnů aklimatizovala na laboratorní podmínky a která nebyla podrobena předcházejícím zkušebním postupům. Pokusná zvířata by měla být charakterizována podle druhu, kmenu, původu, pohlaví, hmotnosti a/nebo stáří. Je-li to možné, měla by mít zvířata ze všech testovaných skupin stejnou hmotnost a věk. Pro každou úroveň dávek se použijí mladé dospělé samice, které by měly být nullipary. Samice se spáří se samci stejného druhu a kmene a nemělo by docházet k páření sourozenců. U hlodavců je nultým dnem gestace den, kdy se pozoruje vaginální zátka a/nebo sperma; u králíků je dnem 0 obvykle den páření nebo umělé inseminace, pokud se tato metoda používá. Oplodněné samice se náhodným výběrem rozdělí do kontrolních a experimentálních skupin. Klece by měly být uspořádány tak, aby byl vliv umístění klecí minimalizován. Každému zvířeti se přidělí vlastní identifikační číslo. Náhodným výběrem se oplodněné samice rozdělí do kontrolních a experimentálních skupin, a jsou-li samice pářeny v sadách, rozdělí se zvířata z jednotlivých sad rovnoměrně do všech skupin. Stejně tak se do všech skupin rozdělí samice oplodněné stejným samcem.

1.6 POSTUP

1.6.1 **Počet a pohlaví zvířat**

Každá experimentální a kontrolní skupina by měla obsahovat dostatečný počet samic, abych se při pitvě získalo přibližně 20 samic s implantací plodu. Skupiny s méně než 16 zvířaty s implantací plodu nejsou vhodné. Mortalita samic nemusí nutně znamenat znehodnocení studie za předpokladu, že nepřekročí přibližně 10 %.

▼B

1.6.2 **Příprava dávek**

Pokud se pro usnadnění dávkování používá vehikulum nebo jiná přísada, je třeba vzít v úvahu následující typické znaky: vliv na absorpci, distribuci, metabolismus a retenci nebo vylučování zkoušené látky; vliv na chemické vlastnosti zkoušené látky, která může pozměnit svoje toxické znaky, a vliv na spotřebu potravy nebo vody anebo nutričního stavu zvířat. Vehikulum by nemělo být ani vývojově toxické, ani by nemělo mít vliv na rozmnožování.

1.6.3 **Dávkování**

Zkoušená látka se obvykle podává denně od implantace (např. pátý den po spáření) až do dne před plánovaným císařským řezem. Pokud z případných předběžných studií nevyplývá vysoký potenciál předimplantační ztráty, lze aplikaci prodloužit tak, aby zahrnovala celé období gestace, od spáření až do dne před plánovaným usmrcením. Je známo, že nevhodné zacházení nebo stres během březosti může vést k prenatální ztrátě. S cílem zabránit prenatálním ztrátám z důvodů, které nejsou spojeny s expozicí, je nutné zamezit jak nadbytečné manipulaci se zvířaty, tak i stresu způsobenému zevními faktory, jako je např. hluk.

Použijí se alespoň tři úrovně dávek a souběžná kontrola. Zdravá zvířata se náhodným výběrem rozdělí do kontrolních a experimentálních skupin. Úrovně dávek se rozloží tak, aby byly toxické účinky odstupňovány. Pokud neexistuje žádné omezení fyzickou/chemickou podstatou nebo biologickými vlastnostmi zkoušené látky, zvolí se nejvyšší dávka s cílem vyvolat určitou vývojovou toxicitu a/nebo toxicitu pro matku (klinické znaky nebo snížení tělesné hmotnosti), ale nikoliv uhynutí nebo značné utrpení. Alespoň jedna střední úroveň dávky by měla vyvolat minimální zjistitelné toxické účinky. Nejnižší úroveň dávky by neměla vyvolat žádnou prokazatelnou toxicitu pro matku ani vývojovou toxicitu. S ohledem na prokázání jakékoli reakce související s dávkováním a s úrovní dávky bez pozorovaného nepříznivého účinku (NOAEL) by se měla zvolit sestupná posloupnost úrovní dávek. Pro nastavení sestupných úrovní dávek jsou obvykle optimální dvoj- až čtyřnásobné intervaly a často je vhodnější přidání čtvrté exponované skupiny než používání velkých intervalů mezi dávkami (např. lišících se faktorem 10). Ačkoliv je cílem stanovit hodnotu NOAEL pro samici, přijatelné jsou rovněž studie, které tuto hodnotu nestanoví (1).

Při výběru úrovní dávek je třeba brát v úvahu jakékoliv existující údaje o toxicitě a také jako další informace o metabolismu a toxikokinetice zkoušené látky nebo látek příbuzných. Tyto informace pomohou rovněž při prokazování přiměřenosti dávkovacího režimu.

Použije se souběžná kontrolní skupina. Tato skupina by měla tvořit zdánlivě léčenou kontrolní skupinu nebo kontrolní skupinu s vehikulem, pokud se vehikulum při podávání zkoušené látky používá. Všem skupinám se podává stejné množství zkoušené látky nebo vehikula. Se zvířaty v kontrolní skupině (kontrolních skupinách) se zachází stejně jako se zvířaty v experimentální skupině. Kontrolní skupina s vehikulem by měla dostat vehikulum v nejvyšším používaném množství (jako u experimentální skupiny s nejnižší dávkou).

▼B

1.6.4 **Limitní zkouška**

Pokud zkouška na jedné úrovni dávky v množství alespoň 1 000 mg/kg tělesné hmotnosti na den při orálním podávání nevyvolá při použití postupů předepsaných pro tuto studii žádnou zjistitelnou toxicitu ani u březích zvířat, ani u jejich plodů, a pokud se neočekává účinek ani na základě existujících údajů (např. o sloučeninách s podobnou strukturou a/nebo metabolismem), není nutné uvažovat o kompletní studii využívající tří úrovní dávek. Je možné, že předpokládaná expozice u člověka si vyžádá použití vyšší orální dávky v limitní zkoušce. U dalších způsobů podávání látky, jako je inhalační nebo kožní aplikace, může být maximální dosažitelná úroveň expozice dána fyzikálně-chemickými vlastnostmi zkoušené látky (např. kožní aplikace by neměla způsobit závažnou lokální toxicitu).

1.6.5 **Aplikace dávek**

Zkoušená látka nebo vehikulum se obvykle podává orálně intubací. Pokud se používá jiný způsob aplikace látky, měl by experimentátor volbu zdůvodnit a objasnit, přičemž možná bude nutné provést odpovídající změny (2, 3, 4). Zkoušená látka se podává každý den přibližně ve stejnou dobu.

Dávka pro jednotlivá zvířata obvykle vychází z aktuální zjištěné tělesné hmotnosti. Je však nutné věnovat velkou pozornost úpravě dávky během posledního trimestru březosti. Dávka by se měla zvolit na základě existujících údajů, aby se zabránilo nadměrné toxicitě u samic. Pokud je však u ošetřovaných samic zaznamenána nadměrná toxicita, tato zvířata se humánně utratí. Pokud několik březích zvířat vykazuje známky nadměrné toxicity, mělo by se zvážit utracení této skupiny. Je-li látka podávána prostřednictvím žaludeční sondy, měla by se zvířatům podávat ve formě jediné dávky pomocí hadičky k výplachu žaludku nebo vhodné intubační kanyly. Maximální objem kapaliny, kterou lze jednorázově podat, závisí na velikosti pokusného zvířete. Toto množství by nemělo překročit 1 ml/100 g tělesné hmotnosti, s výjimkou vodných roztoků, kde lze použít 2 ml/100 g tělesné hmotnosti. Pokud se jako vehikulum používá kukuřičný olej, nemělo by množství překročit 0,4 ml/100 g tělesné hmotnosti. Kolísání v množství zkoušené látky by se měla omezit nastavením koncentrací tak, aby se zajistilo konstantní množství na všech úrovních dávek.

1.6.6 **Sledování samic**

Klinická pozorování se provádějí a zaznamenávají minimálně jednou denně, a to každý den nejlépe ve stejnou dobu, a přihlédne se k době vrcholícího předpokládaného účinku po dávkování. Zaznamená se stav zvířat včetně mortality, agónie, relevantních změn chování a všech příznaků zjevné toxicity.

1.6.7 **Tělesná hmotnost a spotřeba potravy**

Zvířata se zváží během nultého dne gestace anebo nejpozději třetí den gestace, pokud externí chovatel dodává zvířata spářená ve stejnou dobu, první den podávání látky a minimálně každý třetí den v období podávání látky a dále v den plánovaného usmrcení.

▼B

Spotřeba potravy se zaznamená v třídenním intervalu a měla by se shodovat se dny zjišťování tělesné hmotnosti.

1.6.8 **Pitva**

Samice se usmrtí jeden den před očekávaným dnem vrhu. Samice vykazující známky potratu nebo předčasného vrhu předcházejícího plánovanému usmrcení se usmrtí a podrobí důkladnému makroskopickému vyšetření.

Samice se v okamžiku usmrcení nebo úhynu během studie makroskopicky vyšetří na strukturní odchylky nebo patologické změny. S cílem minimalizovat neobjektivnost se posuzování samic během císařského řezu a následná fetální analýza provedou pokud možno bez znalosti experimentální skupiny.

1.6.9 **Vyšetření děložního obsahu**

Okamžitě po usmrcení nebo co nejdříve po uhynutí se samicím vyjme děloha a zjistí se stav březosti. Dělohy, které nesvědčí o graviditě, se dále vyšetří (např. pomocí barvení sulfidem amonným u hlodavců a pomocí Salewského barvení nebo vhodnou alternativní metodou u králíků) a potvrdí se negravidní stav (5).

Gravidní děloha včetně děložního hrdla se zváží. Hmotnost gravidní dělohy by se neměla zjišťovat u zvířat, která během studie uhynula.

U březích zvířat se zjistí počet žlutých tělísek.

U děložního obsahu se vyšetří počet úhynů embrya nebo plodu a počet životaschopných plodů. Popíše se stupeň resorpce, aby bylo možné odhadnout relativní dobu uhynutí zárodku (viz část 1.2).

1.6.10 **Vyšetření plodů**

Zjistí se pohlaví a tělesná hmotnost každého plodu.

U každého plodu se vyšetří zevní odchylky (6).

U plodů se vyšetří změny kostry a měkkých tkání (např. odchylky a malformace nebo anomálie) (7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24). Kategorizace fetálních změn je vhodná, ale nikoli nezbytná. Pokud se kategorizace provede, měla by se jasně stanovit kritéria definování jednotlivých kategorií. Zvláštní pozornost je třeba věnovat rozmnožovací soustavě, která se vyšetří na přítomnost známek změněného vývoje.

U hlodavců se pitvá přibližně polovina každého vrhu, u něhož se vyšetří změny skeletu. Zbytek se pitvá a vyšetří na přítomnost změn měkkých tkání pomocí uznaných nebo vhodných metod postupných histologických řezů nebo důkladné pitvy.

▼B

U nehlodavců, např. králíků, se prozkoumají jak změny měkkých tkání, tak změny skeletu všech plodů. Opatrným oddělením tkání se u těchto plodů vyšetří změny měkkých tkání, přičemž pitva může zahrnovat i postupy pro další vyhodnocení vnitřní stavby srdce (25). Hlavy poloviny plodů zkoumaných tímto způsobem se oddělí a použijí se k vyhodnocení změn měkkých tkání (včetně očí, mozku, nosních dutin a jazyka), a to pomocí standardních metod postupného segmentování (26) nebo stejně citlivých metod. Těla těchto i zbývajících neporušených plodů se pitvají a vyšetří na přítomnost změn skeletu za použití stejných metod popsaných pro hlodavce.

2. **ÚDAJE**

2.1 ZPRACOVÁNÍ VÝSLEDKŮ

Výsledky se zaznamenají do tabulky samostatně pro samice a pro jejich potomky a u každé pokusné skupiny a každé generace se uvede počet zvířat na začátku zkoušky, počet zvířat uhynulých během zkoušky nebo utracených z humánních důvodů, doba úhynu nebo humánního utracení, počet březích samic, počet zvířat vykazujících příznaky toxicity, popis příznaků zjištěné toxicity včetně nástupu, trvání a závažnosti případných toxických účinků, typy pozorování embryí/plodů a všechny důležité údaje o vrhu.

Numerické výsledky se vyhodnotí vhodnou statistickou metodou, přičemž jako jednotka analýzy dat se použije vrh. Použije se všeobecně uznávaná statistická metoda; zvolí se jako součást návrhu studie a musí být zdůvodněna. Rovněž se uvedou údaje získané u zvířat, která nepřežila až do plánovaného usmrcení. Tyto údaje lze v případě potřeby zahrnout do skupinového průměru. Význam údajů získaných od těchto zvířat i jejich zahrnutí nebo nezahrnutí do průměru skupiny by měly být odůvodněny a individuálně posouzeny.

2.2 HODNOCENÍ VÝSLEDKŮ

Výsledky studie prenatální vývojové toxicity se vyhodnotí na základě zjištěných účinků.Vyhodnocení bude obsahovat následující informace:

— výsledky zkoušky u samic a embrya/plodu, včetně hodnocení vazeb nebo jejich absence mezi expozicí zvířat zkoušené látce a výskytem a závažností všech nálezů,

— kritéria používaná pro kategorizaci zevních změn, změn měkkých tkání a skeletu u plodu, pokud byla tato kategorizace provedena,

▼B

— případně předchozí kontrolní údaje ke snazšímu objasnění výsledků studie,

— číselné hodnoty používané při výpočtu všech procentuálních hodnot nebo koeficientů,

— případně odpovídající statistickou analýzu výsledků studie, která by měla zahrnovat dostatečné informace o metodě analýzy, aby nezávislý posuzovatel/statistik mohl tuto analýzu přehodnotit a zrekonstruovat.

U studií, které prokazují nepřítomnost toxických účinků, je třeba zvážit další zkoušky pro zjištění absorpce a biologické dostupnosti zkoušené látky.

2.3 INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

Studie prenatální vývojové toxicity poskytuje informace o účinku opakované expozice látce na březí samice a na nitroděložní vývoj jejich potomstva. Výsledky studie by měly být objasněny v souvislosti s výsledky ze subchronických, reprodukčních, toxikokinetických a dalších studií. Vzhledem k tomu, že se klade důraz jak na výslednou všeobecnou toxicitu z hlediska matky, tak i na vývojovou toxicitu, umožní výsledky této studie do určité míry rozlišit mezi vývojovými účinky vyskytujícími se v nepřítomnosti všeobecné toxicity a mezi účinky vyvolanými pouze na úrovních, které jsou toxické i pro březí zvířata (27).

3. **ZPRÁVY**

3.1 PROTOKOL O ZKOUŠCE

Protokol o zkoušce musí obsahovat následující specifické informace:

Zkoušená látka:

— fyzikální povaha, a je-li to podstatné, fyzikálně-chemické vlastnosti,

— identifikační údaje, včetně čísla CAS, je-li známo nebo přiděleno,

— čistota.

Vehikulum (je-li použito):

— zdůvodnění výběru vehikula, pokud není použita voda.

Pokusná zvířata:

— použitý druh/kmen,

— počet a stáří zvířat;

— původ, podmínky chovu, strava atd.,

— individuální hmotnosti zvířat na začátku zkoušky.

Zkušební podmínky:

— zdůvodnění výběru úrovně dávky,

— podrobné údaje o přípravě složení zkoušené látky/stravy, dosažené koncentraci, stabilitě a homogenitě přípravku,

▼B

— podrobné údaje o podávání zkoušené látky,

— v případě potřeby přepočet koncentrace zkoušené látky (ppm) ve stravě/pitné vodě na skutečnou dávku (mg na kg tělesné hmotnosti na den), je-li to možné,

— podmínky prostředí,

— podrobné údaje o kvalitě stravy a vody.

Výsledky:

Údaje o toxických reakcích matky podle dávky, např.:

— počet zvířat na začátku zkoušky, počet zvířat, která přežila, počet březích zvířat, počet zvířat, která potratila, a počet zvířat, která předčasně vrhla,

— den úhynu během studie anebo zda zvířata přežila až do dne usmrcení,

— uvedou se údaje o zvířatech, která nepřežila do plánovaného usmrcení, nezahrnou se však do statistických srovnání dat pro skupiny,

— den zjištění každého abnormálního klinického příznaku a jeho následný průběh,

— tělesná hmotnost, změna tělesné hmotnosti a hmotnost gravidní dělohy, včetně případných údajů o změně tělesné hmotnosti korigované o hmotnost gravidní dělohy,

— spotřeba potravy, a měří-li se, spotřeba vody,

— pitevní nálezy včetně děložní hmotnosti,

— zaznamenají se hodnoty NOAEL účinků na matku a vývojové účinky.

Ukazatele vývojové toxicity podle dávky pro vrhy s implantáty, včetně:

— počtu žlutých tělísek,

— počtu zahnízdění, počtu a procenta živých a mrtvých plodů a resorpcí,

— počtu procentuálního podílu pre- a postimplantačních ztrát.

Ukazatele vývojové toxicity podle dávky pro vrhy s živými plody, včetně:

— počtu a procentuálního podílu živých potomků,

— poměru pohlaví,

— fetální tělesné hmotnosti, pokud možno podle pohlaví a pro obě pohlaví dohromady,

— zevních malformací, malformací měkkých tkání a skeletu a jiných významných odchylek,

— případně kritérií kategorizace,

▼B

— celkového počtu a procentuálního podílu plodů a vrhů s jakýmikoli zevními a kosterními odchylkami, odchylkami měkkých tkání a rovněž typů a výskytů individuálních anomálií a jiných významných odchylek.

Diskuse o výsledcích.

Závěry.

4. **LITERATURA**

1) Kavlock R.J. et al. (1996) A Simulation Study of the Influence of Study Design on the Estimation of Benchmark Doses for Developmental Toxicity. *Risk Analysis* 16; 399–410.

2) Kimmel, C.A. and Francis, E.Z. (1990) Proceedings of the Workshop on the Acceptability and Interpretation of Dermal Developmental Toxicity Studies. *Fundamental and Applied Toxicology* 14; 386–398.

3) Wong, B.A., et al. (1997) Developing Specialized Inhalation Exposure Systems to Address Toxicological Problems. *CIIT Activities* 17; 1–8.

4) US Environmental Protection Agency (1985) Subpart E-Specific Organ/Tissue Toxicity, 40 CFR 798.4350: Inhalation Developmental Toxicity Study.

5) Salewski, E. (1964) Faerbermethode zum Makroskopischen Nachweis von Implantations Stellen am Uterusder Ratte. *Naunyn-Schmeidebergs Archiv fur Pharmakologie und Experimentelle Pathologie* 247; 367.

6) Edwards, J.A. (1968) The external Development of the Rabbit and Rat Embryo. In *Advances in Teratology*. D.H.M. Woolam (ed.) Vol. 3. Academic Press, NY.

7) Inouye, M. (1976) Differential Staining of Cartilage and Bone in Fetal Mouse Skeleton by Alcian Blue and Alizarin Red S. *Congenital Anomalies* 16; 171–173.

8) Igarashi, E. et al. (1992) Frequency Of Spontaneous Axial Skeletal Variations Detected by the Double Staining Techniquefor Ossified and Cartilaginous Skeleton in Rat Foetuses. *Congenital Anomalies* 32; 381–391.

9) Kimmel, C.A. et al. (1993) Skeletal Development Following Heat Exposure in the Rat. *Teratology* 47; 229–242.

10) Marr, M.C. et al. (1988) Comparison of Single and Double Staining for Evaluation of Skeletal Development: The Effects of Ethylene Glycol (EG) in CD Rats. *Teratology* 37; 476.

11) Barrow, M.V. and Taylor, W.J. (1969) A Rapid Method for Detecting Malformations in Rat Foetuses. *Journal of Morphology* 127; 291–306.

12) Fritz, H. (1974) Prenatal Ossification in Rabbits ss Indicative of Foetal Maturity. *Teratology* 11; 313–320.

13) Gibson, J.P. et al. (1966) Use of the Rabbit in Teratogenicity Studies. *Toxicology and Applied Pharmacology* 9; 398–408.

14) Kimmel, C.A. and Wilson, J.G. (1973) Skeletal Deviation in Rats: Malformations or Variations? *Teratology* 8; 309–316.

15) Marr, M.C. et al. (1992) Developmental Stages of the CD (Sprague-Dawley) Rat Skeleton after Maternal Exposure to Ethylene Glycol. *Teratology* 46; 169–181.

▼B

16) Monie, I.W. et al. (1965) Dissection Procedures for Rat Foetuses Permitting Alizarin Red Staining of Skeleton and Histological Study of Viscera. *Supplement to Teratology Workshop Manual*, s. 163–173.

17) Spark, C. and Dawson, A.B. (1928) The Order and Time of appearance of Centers of Ossification in the Fore and Hind Limbs of the Albino Rat, with Special Reference to the Possible Influence of the Sex Factor. *American Journal of Anatomy* 41; 411–445.

18) Staples, R.E. and Schnell, V.L. (1964) Refinements in Rapid Clearing Technique in the KOH-Alizarin Red s Method for Fetal Bone. *Stain Technology* 39; 61–63.

19) Strong, R.M. (1928) The Order Time and Rate of Ossification of the Albino Rat (Mus Norvegicus Albinus) Skeleton. *American Journal of Anatomy* 36; 313–355.

20) Stuckhardt, J.L. and Poppe, S.M. (1984) Fresh Visceral Examination of Rat and Rabbit Foetuses Used in Teratogenicity Testing. *Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis* 4; 181–188.

21) Walker, D.G. and Wirtschafter, Z.T. (1957) *The Genesis of the Rat Skeleton*. Thomas, Springfield, IL.

22) Wilson, J.G. (1965) Embryological Considerations in Teratology. In *Teratology: Principles and Techniques,* Wilson J.G. and Warkany J. (eds). University of Chicago, Chicago, IL, s. 251–277.

23) Wilson, J.G. and Fraser, F.C. (eds). (1977) *Handbook of Teratology*, Vol. 4. Plenum, NY.

24) Varnagy, L. (1980) Use of Recent Fetal Bone Staining Techniques in the Evaluation of Pesticide Teratogenicity. *Acta Vet. Acad. Sci. Hung*. 28; 233–239.

25) Staples, R.E. (1974) Detection of visceral Alterations in Mammalian Foetuses. *Teratology* 9; 37–38.

26) Van Julsingha, E.B. and C.G. Bennett (1977) A Dissecting Procedure for the Detection of Anomalies in the Rabbit Foetal Head. In: *Methods in Prenatal Toxicology* Neubert, D., Merker, H.J. and Kwasigroch, T.E. (eds.). University of Chicago, Chicago, IL, s. 126–144.

27) US Environmental Protection Agency (1991) Guidelines for Developmental Toxicity Risk Assessment. *Federal Register* 56; 63798–63826.

28) Wise, D.L. et al. (1997) Terminology of Developmental Abnormalities in Common Laboratory Mammals (Version 1) Teratology 55; 249–292.

▼M4

B.32 STUDIE KARCINOGENITY

ÚVOD

1. Tato zkušební metoda odpovídá Pokynům OECD pro zkoušení (TG) 451 (2009). Původní pokyny TG 451 ke studiím karcinogenity byly schváleny v roce 1981. Revize zkušební metody B.32 byla považována za nezbytnou k zohlednění nejnovějšího vývoje v oblasti zajištění dobrých životních podmínek zvířat a regulačních požadavků (2), (3), (4), (5), (6). Aktualizace této zkušební metody B.32 se prováděla paralelně s revizemi kapitoly B.30 této přílohy, Studie chronické toxicity, a kapitoly B.33 této přílohy, Kombinovaná studie chronické toxicity/karcinogenity, s cílem získat další informace o zvířatech použitých ve studii a poskytnout další podrobnosti o výběru dávky. Tato zkušební metoda B.32 je určena ke zkouškám široké škály chemických látek, včetně pesticidů a průmyslových chemikálií. V případě farmaceutik se však některé detaily a požadavky mohou lišit (viz pokyny S1B Mezinárodní konference o harmonizaci (ICH) testování karcinogenity léků).

2. Většina studií karcinogenity se provádí na hlodavcích, a tato zkušební metoda je proto primárně určena k použití ve studiích prováděných na těchto druzích. Je-li třeba provést studie na jiných druzích nežli z řádu hlodavců, lze rovněž použít příslušně pozměněné principy a postupy uvedené v této zkušební metodě spolu s těmi, které jsou uvedeny v kapitole B.27 této přílohy, Studie orální toxicity na nehlodavcích – 90denní opakovaná aplikace (6). Další pokyny jsou k dispozici v pokynech OECD č. 116 o přípravě a provádění studií chronické toxicity a karcinogenity (7).

3. Třemi hlavními způsoby podávání používanými ve studiích karcinogenity jsou orální podávání, dermální aplikace a inhalační podávání. Výběr cesty podání závisí na fyzikálních a chemických vlastnostech zkoušené chemické látky a na převládající cestě expozice u lidí. Další informace o výběru cesty expozice jsou uvedeny v Pokynech č. 116 (7).

4. Tato zkušební metoda se zaměřuje na expozici orální cestou, což je cesta, která se ve studiích karcinogenity používá nejběžněji. Přestože studie karcinogenity zahrnující expozici dermální nebo inhalační cestou mohou být pro posouzení rizik pro lidské zdraví rovněž nezbytné a/nebo mohou být vyžadovány v rámci určitých regulačních režimů, jsou studie používající tyto cesty expozice značně technicky složité. Takové studie je třeba navrhovat individuálně pro daný případ, přestože zde uvedená zkušební metoda pro posouzení a vyhodnocení karcinogenity při orálním podávání by mohla tvořit základ protokolu pro studie inhalační a/nebo dermální, pokud jde o doporučení pro období expozice, klinické a patologické parametry atd. Jsou k dispozici pokyny OECD týkající se podávání zkoušených chemických látek dermální (7) a inhalační cestou (7), (8). Při navrhování dlouhodobých studií zahrnujících expozici inhalační cestou by se mělo konkrétně nahlédnout do kapitoly B.8 této přílohy (9) a kapitoly B.29 této přílohy (10) a rovněž do pokynů OECD pro zkoušení akutní inhalační toxicity (8). V případě, že se zkoušky provádějí dermální cestou, je třeba nahlédnout do kapitoly B.9 této přílohy (11).

▼M4

5. Studie karcinogenity poskytuje informace o možných rizikách pro zdraví, která mohou pravděpodobně vzniknout při opakované expozici trvající až celou dobu života použitých druhů. Studie rovněž poskytne informace o toxických účincích zkoušené chemické látky, včetně potenciální karcinogenity, a může určit cílové orgány a možnost akumulace. Může také pro toxické účinky poskytnout odhad hodnoty dávky nevyvolávající pozorovatelné nepříznivé účinky a v případě negenotoxických karcinogenů pro nádorové odpovědi, což lze použít při stanovení kritérií pro bezpečnou expozici člověka. Důraz se klade také na pečlivé klinické pozorování zvířat s cílem získat co nejvíce informací.

6. Cíle studií karcinogenity zahrnutých v této zkušební metodě jsou:

— identifikace karcinogenních vlastností zkoušené chemické látky vedoucích ke zvýšenému výskytu novotvarů, zvýšenému podílu maligních novotvarů nebo snížení doby do vzniku novotvarů ve srovnání se souběžnými kontrolními skupinami,

— identifikace cílového orgánu (cílových orgánů) karcinogenity,

— identifikace doby do vzniku novotvarů,

— charakterizace vztahu mezi dávkou a nádorovou odezvou,

— určení hodnoty dávky bez pozorovaného nepříznivého účinku (NOAEL) nebo výchozího bodu pro stanovení referenční dávky (BMD),

— extrapolace karcinogenních účinků na nízké úrovně expozice člověka,

— získání údajů k ověření hypotéz o způsobu účinku (2), (7), (12), (13), (14), (15).

VÝCHOZÍ ÚVAHY

7. Zkušební laboratoř by měla před provedením studie vzít v úvahu při posuzování a hodnocení potenciální karcinogenity zkoušené chemické látky veškeré dostupné informace o zkoušené chemické látce, aby zaměřila uspořádání studie směrem k účinnějšímu zkoušení karcinogenního potenciálu a minimalizovala použití zvířat. Obzvlášť důležité jsou informace o způsobu účinku potenciálního karcinogenu a jeho posouzení (2), (7), (12), (13), (14), (15), neboť optimální uspořádání studie se může lišit podle toho, zda je zkoušená chemická látka známým genotoxickým karcinogenem nebo je u ní pouze podezření na genotoxickou karcinogenitu. Další pokyny k rozvahám o způsobu účinku jsou uvedeny v pokynech č. 116 (7).

8. Mezi informace, které usnadní vytváření plánu studie, patří identita zkoušené chemické látky, její chemická struktura a fyzikálně-chemické vlastnosti, výsledky všech testů toxicity *in vitro* nebo *in vivo* včetně testů genotoxicity, předpokládaná použití a potenciální expozice u člověka, dostupné údaje (Q)SAR, údaje o mutagenitě/genotoxicitě, karcinogenita a další toxikologické údaje o strukturně příbuzných chemických látek, dostupné toxikokinetické údaje (kinetika při jednorázové dávce a rovněž při opakovaných dávkách, je-li k dispozici) a údaje získané v jiných studiích s opakovanou expozicí. Zhodnocení karcinogenity by se mělo provádět po získání prvotních informací o toxicitě z 28denních a/nebo 90denních zkoušek toxicity

▼M4

v opakovaných dávkách. Krátkodobé zkoušky iniciace–propagace nádoru mohou rovněž poskytnout užitečné informace. Jako součást celkového zhodnocení potenciálních nepříznivých účinků konkrétní zkoušené chemické látky na zdraví by se měl zvážit postup zkoušení prováděný po fázích při zkouškách karcinogenity (16), (17), (18), (19).

9. Nejvhodnější statistické metody pro analýzu výsledků s ohledem na uspořádání a cíle experimentu by se měly stanovit před zahájením studie. Je třeba zvážit, zda by měla statistika zahrnovat korekci na přežití, analýzu kumulativních nádorových rizik ve vztahu k době přežití, analýzu doby do vzniku nádoru a analýzu v případě předčasného ukončení zkoušky u jedné nebo více skupin. Pokyny ohledně vhodných statistických analýz a klíčové odkazy na mezinárodně uznávané statistické metody jsou uvedeny v Pokynech č. 116 (7) a rovněž v Pokynech č. 35 o analýze a hodnocení studií chronické toxicity a karcinogenity (20).

10. Při provádění studie karcinogenity je nutné řídit se vždy zásadami a úvahami uvedenými v Pokynech OECD č. 19 k rozpoznání, vyšetření a použití klinických příznaků jako lidských cílových parametrů u pokusných zvířat používaných při hodnocení bezpečnosti (21), zejména v odstavci 62 těchto pokynů. Tento odstavec uvádí, že „*Ve studiích zahrnujících opakované podávání dávky by se mělo v případě, kdy zvíře vykazuje klinické příznaky, které jsou progresivní a vedou k dalšímu zhoršení jeho stavu, učinit informované rozhodnutí, zda zvíře humánně utratit, či ne. Toto rozhodnutí by mělo obsahovat posouzení hodnoty informací, které se získají, bude-li se zvíře i nadále udržovat ve studii, oproti jeho celkovému stavu. Dospěje-li se k rozhodnutí pokračovat u zvířete ve zkoušce, měla by se dle potřeby zvýšit četnost pozorování. Rovněž je možné, aniž by to nepříznivě ovlivnilo účel zkoušky, dočasně pozastavit podávání dávky, jestliže to zmírní bolest či utrpení, nebo snížit zkoušenou dávku.*“

11. Podrobné pokyny a diskuse o principech výběru dávky pro studie chronické toxicity a karcinogenity naleznete v Pokynech č. 116 (7) a rovněž ve dvou publikacích ústavu International Life Sciences Institute (22) (23). Hlavní strategie výběru dávky závisí na primárním cíli nebo cílech studie (odstavec 6). Při výběru vhodných úrovní dávky by se mělo dosáhnout rovnováhy mezi screeningem nebezpečnosti na straně jedné a charakterizací odezvy na nízkou dávku a jejich významu na straně druhé. To je důležité zejména v situaci, kdy je nutné provést kombinovanou studii chronické toxicity a karcinogenity (kapitola B.33 této přílohy) (odstavec 12).

12. Mělo by se zvážit, zda raději neprovést kombinovanou studii chronické toxicity a karcinogenity (kapitola B.33 této přílohy), a ne samostatné provedení studie chronické toxicity (tato zkušební metoda B.30) a studie karcinogenity (kapitola B.32 této přílohy). Kombinovaná zkouška zajišťuje větší efektivitu ve smyslu času a nákladů v porovnání s prováděním dvou samostatných studií a zároveň nezhoršuje kvalitu údajů ani ve fázi zkoušení chronické toxicity, ani ve fázi zkoušení karcinogenity. Při provádění kombinované studie chronické toxicity a karcinogenity (kapitola B.33 této přílohy) však je třeba pečlivě zvážit zásady výběru dávky (odstavce 11 a 22–25) a rovněž se uznává, že v určitých regulačních rámcích mohou být vyžadovány samostatné studie.

▼M4

13. Definice použité v kontextu této zkušební metody naleznete na konci této kapitoly a v Pokynech č. 116 (7).

PODSTATA ZKOUŠKY

14. Zkoušená chemická látka se podává denně v odstupňovaných dávkách několika skupinám pokusných zvířat po většinu jejich života, obvykle orální cestou. Expozice inhalační nebo dermální cestou může být rovněž vhodná. Zvířata se pečlivě sledují s ohledem na příznaky toxicity a rozvoj neoplastických lézí. Zvířata, která v průběhu zkoušky uhynula nebo byla utracena, se pitvají a na konci zkoušky se přeživší zvířata utratí a rovněž pitvají.

POPIS METODY

Výběr zvířecích druhů

15. Tato zkušební metoda se primárně zabývá posouzením a vyhodnocením karcinogenity u hlodavců (odstavec 2). Použití nehlodavců je možné zvážit, pokud dostupné údaje naznačují, že jsou pro předpověď účinků na lidské zdraví vhodnější. Výběr druhu by měl být zdůvodněn. Upřednostňovaným druhem hlodavců je potkan, ale lze použít i jiný druh hlodavců, např. myš. Přestože použití myší ve zkouškách karcinogenity může mít omezený užitek (24), (25), (26), jsou v některých stávajících regulačních programech zkoušky karcinogenity na myších ještě stále vyžadovány, pokud se neprokáže, že taková studie není z vědeckého hlediska nezbytná. Krysy a myši jsou upřednostňovanými experimentálními modelovými organismy díky své relativně krátké době života, široce rozšířenému použití ve farmakologických a toxikologických studiích, citlivosti k indukci nádoru a dostupnosti dostatečně charakterizovaných kmenů. V důsledku těchto vlastností je k dispozici velké množství informací o jejich fyziologii a patologii. Další informace o výběru druhu a kmene jsou uvedeny v Pokynech č. 116 (7).

16. Měla by se použít mladá zdravá dospělá zvířata běžně používaných laboratorních kmenů. Studie karcinogenity by se měla provádět nejlépe na zvířatech ze stejného kmene a zdroje, jako byla zvířata použitá v kratších předběžných studiích toxicity, i když je-li známo, že zvířata z tohoto kmene a zdroje nedosahují běžně uznávaných kritérií přežití v dlouhodobých studiích [viz Pokyny č. 116 (7)], měla by se zvážit možnost použít takovýkmen zvířat, který má přijatelnou míru přežití v dlouhodobé studii. Samice musí být nullipary a nesmějí být březí.

Umístění a krmení zvířat

17. Zvířata lze chovat jednotlivě nebo v klecích po malých skupinkách jedinců stejného pohlaví. Individuální chov by se měl použít pouze, je-li to vědecky odůvodněné (27), (28), (29). Klece by měly být uspořádány tak, aby byl případný vliv jejich polohy minimalizován. Teplota v místnosti pro pokusná zvířata by měla být 22 °C (± 3 °C). Relativní vlhkost vzduchu by měla být minimálně 30 % a pokud možno nepřesáhnout 70 % kromě doby čištění místnosti, cílem by měla být hodnota 50–60 %. Osvětlení by mělo být umělé a mělo by se střídat 12 hodin světla a 12 hodin tmy. Ke krmení lze použít konvenční laboratorní stravu s neomezenou dodávkou pitné vody. Strava by měla splňovat všechny nutriční požadavky zkoušených druhů a obsah příměsí v krmivu zahrnující mimo jiné zbytky pesticidů,

▼M4

perzistentní organopolutanty, fytoestrogeny, těžké kovy a mykotoxiny, které mohou ovlivnit výsledek zkoušky, by měl být co možná nejnižší. Pravidelně by se měly získávat analytické informace o nutričních hodnotách stravy a množství příměsí ve stravě, alespoň na začátku studie a pokaždé, když se změní používaná šarže, a měly by se začlenit do závěrečné zprávy. Obdobně by se měla poskytnout analýza pitné vody. Výběr krmiva může být ovlivněn nutností zajistit vhodnou přísadu zkoušené chemické látky, podává-li se látka v krmivu, a splnit nutriční potřeby zvířat.

Příprava zvířat

18. Použijí se zdravá zvířata, která se alespoň 7 dnů aklimatizovala na laboratorní podmínky a která nebyla dříve podrobena žádným experimentálním postupům. V případě hlodavců by se mělo podávání látky zahájit co možná nejdříve po jejich odstavení a aklimatizaci, nejlépe před dosažením stáří 8 týdnů. Pokusná zvířata by měla být charakterizována podle druhu, kmenu, původu, pohlaví, hmotnosti a stáří. Na začátku studie by měly být odchylky hmotnosti zvířat u každého pohlaví minimální a neměly by překročit ± 20 % průměrné hmotnosti pro všechna zvířata ve studii, pro každé pohlaví zvlášť. Zvířata by měla být rozdělena náhodným výběrem do kontrolních a experimentálních skupin. Po randomizaci by neměly být výrazné rozdíly v průměrných hodnotách tělesné hmotnosti mezi skupinami v rámci každého pohlaví. Existují-li statisticky významné rozdíly, měla by se randomizace pokud možno zopakovat. Každému zvířeti by se mělo přidělit jedinečné identifikační číslo a mělo by se tímto číslem trvale označit pomocí tetování, implantací mikročipu nebo jinou vhodnou metodou.

POSTUP

Počet a pohlaví zvířat

19. Měla by se použít obě pohlaví. Měl by se použít dostatečný počet zvířat umožňující důkladné biologické a statistické vyhodnocení. Každá exponovaná skupina a souběžná kontrolní skupina by proto měla obsahovat alespoň 50 zvířat od každého pohlaví. V závislosti na cíli studie může být možné zvýšit statistickou sílu klíčových odhadů rozdělením zvířat nerovnoměrně do skupin s různými dávkami, přičemž do skupin s nízkou dávkou se zařadí více než 50 zvířat, např. aby se odhadl karcinogenní potenciál při nízkých dávkách. Mírným zvýšením velikosti skupiny však statistická síla studie vzroste jen relativně málo. Další informace o statistickém uspořádání studie a výběru úrovní dávek k maximalizaci statistické síly jsou uvedeny v Pokynech č. 116 (7).

Zajištění předběžných utracení a satelitních (ověřovacích) skupin

20. Studie může zajistit zvířata pro předběžná utracení např. v 12. měsíci, aby se získaly informace o progresi neoplastických změn a mechanistické informace, je-li to vědecky odůvodněné. Jsou-li tyto informace již k dispozici z předchozích studií toxicity zkoušené chemické látky po opakovaných dávkách, nemusí být předběžná utracení vědecky odůvodněná. Pokud jsou v plánu studie zahrnuta předběžná utracení zvířat, v každé exponované skupině určených k předběžnému utracení je obvykle 10 zvířat od každého pohlaví a celkový počet zvířat zařazených do studie je nutno zvýšit o počet zvířat, která budou usmrcena před ukončením studie. Také je možné zařadit do studie další skupinu ověřovacích zvířat (obvykle 5 zvířat od každého pohlaví) k monitorování stavu onemocnění v průběhu studie, je-li to nutné (30). Další pokyny jsou uvedeny v Pokynech č. 116 (7).

▼M4

Dávkové skupiny a dávkování

21. Pokyny ohledně veškerých aspektů výběru dávky a odstupňování úrovní dávek jsou uvedeny v Pokynech č. 116 (7). Měly by se použít alespoň tři úrovně dávek a souběžná kontrola. Úrovně dávek budou obecně vycházet z výsledků krátkodobých studií při opakované aplikaci nebo ze studií k stanovení rozsahu dávkování a měly by zohlednit jakékoli existující toxikologické a toxikokinetické údaje dostupné pro zkoušenou sloučeninu nebo příbuzné materiály.

22. Nebrání-li tomu fyzikálně-chemická povaha nebo biologické účinky zkoušené chemické látky, měla by se zvolit nejvyšší úroveň dávky za účelem identifikace hlavních cílových orgánů a toxických účinků, která by však zároveň neměla vést k utrpení, závažné toxicitě, morbiditě nebo uhynutí. Za současného zohlednění faktorů uvedených v odstavci 23 níže by se měla vybrat taková nejvyšší dávka, aby vyvolala příznaky toxicity, např. pokles přírůstku tělesné hmotnosti (přibližně 10 %). Nicméně v závislosti na cílech studie (viz odstavec 6) je možné zvolit nejvyšší dávku nižší, než je dávka dokazující toxicitu, např. jestliže dávka vyvolává nepříznivý účinek, který však má jen malý dopad na délku života nebo tělesnou hmotnost.

23. Je možné zvolit úrovně dávek a odstupňování úrovní dávek ke stanovení vztahu mezi dávkou a odezvou a NOAEL nebo jiných plánovaných výsledků studie, např. BMD (viz odstavec 25) na nejnižší úrovni dávky, a to v závislosti na způsobu účinku zkoušené chemické látky. Mezi faktory, které by se měly zvážit při určování nižších dávek, patří předpokládaná směrnici křivky závislosti odezvy na dávce, dávky, při kterých mohou nastat důležité změny v metabolismu nebo způsobu toxického účinku, kde se předpokládá prahová hodnota nebo kde se předpokládá výchozí bod pro extrapolaci do oblasti nízkých dávek.

24. Interval mezi jednotlivými úrovněmi dávek bude záviset na vlastnostech zkoušené chemické látky a není možno jej v této zkušební metodě předepsat, avšak dvou až čtyřnásobné intervaly obvykle vedou k dobré funkčnosti zkoušky, použijí-li se k nastavení klesajících úrovní dávek; často se upřednostňuje zařazení čtvrté zkušební skupiny před použitím velmi velkých intervalů (např. více než přibližně 6–10násobek) mezi dávkami. Obecně je třeba vyhnout se použití koeficientů větších než 10 a jejich případné použití by se mělo zdůvodnit.

25. Jak je dále probráno v Pokynech č. 116 (7), je třeba při výběru dávky zvážit tyto body:

— známá nebo předpokládaná nelinearita či inflexní body na křivce závislosti odezvy na dávce,

— toxikokinetika a rozsahy dávkování, při kterých dochází nebo nedochází k metabolické indukci, saturaci nebo nelinearitě mezi vnějšími a vnitřními dávkami,

— prekurzorové léze, známky účinku nebo indikátory probíhajících klíčových základních biologických procesů,

— klíčové (nebo předpokládané) aspekty způsobu účinku, například dávky, při kterých začíná vzrůstat cytotoxicita, narušují se hladiny hormonů, homeostatické mechanismy jsou ochromeny atd.,

▼M4

— oblasti křivky závislosti odezvy na dávce, kde je nutný obzvlášť robustní odhad, např. v rozsahu předpokládané BMD nebo prahové hodnoty,

— zvážení předpokládaných úrovní expozice člověka.

26. Kontrolní skupina je neexponovaná skupina nebo kontrolní skupina s nosičem, pokud se nosič při podávání zkoušené chemické látky používá. S výjimkou aplikace zkoušené chemické látky je třeba se zvířaty v kontrolní skupině zacházet stejným způsobem jako se zvířaty v experimentálních skupinách. Používá-li se nosič, podá se kontrolní skupině v nejvyšším používaném objemu v rámci skupin. Jestliže se zkoušená chemická látka podává v krmivu a způsobuje podstatné snížení příjmu potravy v důsledku snížené chutnosti krmiva, může být užitečné použít další kontrolní skupinu krmenou tak, aby měla stejně snížený příjem potravy, která poslouží jako vhodnější kontrola.

Příprava dávek a podávání zkoušené chemické látky

27. Zkoušená chemická látka se obvykle podává orálně, v krmivu či v pitné vodě nebo sondou. Další informace o cestách a způsobech podání jsou uvedeny v Pokynech č. 116 (7). Cesta a způsob podání závisí na účelu studie, fyzikálně-chemických vlastnostech zkoušené chemické látky, její biologické dostupnosti a převládající cestě a způsobu expozice člověka. Mělo by se uvést zdůvodnění zvolené cesty a způsobu podání. V zájmu zajištění dobrých životních podmínek zvířat by se mělo podávání žaludeční sondou zvolit pouze u těch látek, u nichž tato cesta a způsob podání náležitě reprezentují potenciální expozici člověka (např. farmaceutika). Chemické látky, které se nacházejí v potravě nebo životním prostředí, včetně pesticidů, se obvykle podávají v krmivu nebo pitné vodě. Nicméně u některých scénářů expozice, např. expozice na pracovišti, mohou být vhodnější jiné cesty podání.

28. Zkoušená chemická látka se v případě potřeby rozpustí nebo suspenduje ve vhodném nosiči. Případně je třeba zvážit následující vlastnosti nosiče nebo jiných přídatných látek: účinky na absorpci, distribuci, metabolismus nebo retenci zkoušené chemické látky, účinky na chemické vlastnosti zkoušené chemické látky, které mohou změnit její toxické vlastnosti a účinky na konzumaci krmiva nebo vody či na nutriční stav zvířat. Je-li to možné, doporučuje se zvážit nejprve použití vodného roztoku/suspenze, poté použití roztoku/emulze v oleji (např. v kukuřičném oleji) a nakonec roztoku v jiných nosičích. U nosičů jiných než voda je nutné znát jejich toxické vlastnosti. Měly by být k dispozici informace o stabilitě zkoušené chemické látky a homogenitě podávaných roztoků nebo krmiva (dle potřeby) za podmínek podávání (např. v krmivu).

29. U látek podávaných v krmivu nebo v pitné vodě je důležité zajistit, aby množství použité zkoušené chemické látky neovlivňovalo normální výživu nebo vodní rovnováhu. V dlouhodobých studiích toxicity s podáváním látky v krmivu by koncentrace zkoušené chemické látky v krmivu obvykle horní mez neměla přesáhnout 5 % celkového množství krmiva, aby se zabránilo nutriční nerovnováze. Podává-li se zkoušená chemická látka v krmivu, může se použít buď konstantní koncentrace v krmivu (mg/kg krmiva nebo ppm) nebo konstantní dávkování v poměru k tělesné hmotnosti zvířete (mg/kg tělesné hmotnosti), která se vypočítá jednou týdně. Použitá možnost by se měla specifikovat.

▼M4

30. V případě orálního podávání se zvířatům podává zkoušená chemická látka denně (sedm dnů v každém týdnu), u hlodavců obvykle po dobu 24 měsíců (viz také odstavec 32). Jakýkoli jiný režim podávání, např. pět dní v týdnu, musí být zdůvodněn. V případě dermální aplikace se zvířata vystavují zkoušené chemické látce alespoň po dobu 6 hodin denně, 7 dnů v týdnu, jak je specifikováno v kapitole B.9 této přílohy (11) po dobu 24 měsíců. Expozice inhalační cestou se provádí 6 hodin denně, 7 dnů v týdnu, avšak je možné použít i expozici 5 dnů v týdnu, je-li zdůvodněna. Období expozice obvykle trvá 24 měsíců. Jsou-li k expozici pouze nazální cestou použity jiné druhy hlodavců než potkani, je možné upravit maximální doby expozice za účelem minimalizace druhově specifického utrpení. Používá-li se expozice kratší než 6 hodin denně, je třeba uvést zdůvodnění. Viz také kapitola B.8 této přílohy (9).

31. Pokud se zkoušená chemická látka podává zvířatům nitrožaludečně, mělo by se to provádět žaludeční sondou nebo vhodnou intubační kanylou, vždy v přibližně stejnou denní dobu. Obvykle se podává jedna dávka jednou denně. Pokud je např. chemická látka lokálně dráždící, je možné denní dávku podávat rozdělenou na dvě dávky (dvakrát denně). Maximální objem kapaliny, kterou lze jednorázově podat, závisí na velikosti pokusného zvířete. Objem by se měl udržovat co možná nejnižší a u hlodavců by obvykle neměl přesáhnout 1 ml/100 g tělesné hmotnosti (31). Kolísání objemu zkoušené chemické látky by se mělo omezit nastavením koncentrace tak, aby se zajistil konstantní objem na všech úrovních dávek. Potenciálně žíravé nebo dráždivé chemické látky jsou výjimkou a je nutné je naředit, aby se zamezilo závažným lokálním účinkům. Zkoušky při koncentracích, které by pravděpodobně vedly k poleptání nebo podráždění gastrointestinálního traktu, by se neměly provádět.

Délka studie

32. Délka studie u hlodavců je obvykle 24 měsíců, což představuje větší část normální délky života používaných zvířat. Trvání studie je možné zkrátit nebo prodloužit podle délky života kmene zvířecího druhu použitého ve studii, mělo by se však uvést zdůvodnění. U určitých kmenů myší, např. AKR/J, C3H/J nebo C57BL/6J, může být vhodnější délka studie 18 měsíců. Dále jsou uvedeny pokyny ohledně délky a ukončení studie a přežití. Další pokyny včetně posouzení přijatelnosti negativní karcinogenity vzhledem k přežití ve studii jsou uvedeny v pokynech OECD č. 116 o Uspořádání a provádění studií chronické toxicity a karcinogenity (7).

— O ukončení studie by se mělo uvažovat v případě, kdy počet přeživších zvířat ve skupinách s nižší dávkou nebo v kontrolní skupině poklesne pod 25 %.

— V případě, kdy v důsledku toxicity předčasně uhynou zvířata pouze ve skupině s vysokou dávkou, by se studie ukončit neměla.

— Přežití každého pohlaví by se mělo posuzovat odděleně.

— Studie by se neměla dosáhnout míry, při které již údaje ze studie nepostačují k provedení statisticky platného zhodnocení.

▼M4

POZOROVÁNÍ

33. Měla by se kontrolovat morbidita nebo mortalita u všech zvířat, obvykle na začátku a na konci každého dne, včetně víkendů a svátků. Dále by se mělo jednou denně kontrolovat, zda zvířata nevykazují konkrétní příznaky toxikologického významu a v případě podání nitrožaludečně by se měla vzít v úvahu doba očekávaných maximálních účinků po podání látky. Zvláštní pozornost je třeba věnovat rozvoji nádorů a mělo by se zaznamenat, kdy se nádor objeví, kde, jeho rozměry, vzhled a progrese každého viditelného nebo hmatného tumoru.

Tělesná hmotnost, spotřeba krmiva/vody a využitelnost krmiva

34. Všechna zvířata by se měla zvážit na začátku expozice, alespoň jednou týdně během prvních 13 týdnů a poté alespoň jednou měsíčně. Měření spotřeby krmiva a využitelnosti krmiva by se měla provádět alespoň jednou týdně během prvních 13 týdnů a poté alespoň jednou měsíčně. Spotřeba vody by se měla měřit alespoň jednou týdně během prvních 13 týdnů a poté alespoň jednou měsíčně, podává-li se chemická látka v pitné vodě. Měření spotřeby vody by se mělo zvážit také v případě studií, při kterých může dojít ke změně příjmu tekutin.

Hematologická, klinická biochemická vyšetření a další měření

35. Aby se ze studie získalo co nejvíce informací, zejména pro úvahy o způsobu účinku, je možno dle uvážení vedoucího studie odebrat vzorky krve pro hematologická a klinická biochemická vyšetření. Rovněž může být vhodné provést rozbor moči. Další pokyny k významu odběru těchto vzorků v rámci studie karcinogenity jsou uvedeny v Pokynech č. 116 (7). Považuje-li se to za vhodné, je možno provést odběry vzorků pro hematologická a klinická biochemická vyšetření a rozbor moči jako součást předběžného utracení (odstavec 20) a na konci studie u nejméně 10 zvířat od každého pohlaví v každé skupině. Krevní vzorky by se měly odebírat v anestezii z určeného místa, například srdeční punkcí nebo z retroorbitálního sinu, a měly by se případně uchovávat ve vhodných podmínkách. Také je možno připravit k vyšetření krevní nátěry, zejména pokud se zdá, že je cílovým orgánem kostní dřeň, přestože hodnota takového vyšetření k zhodnocení karcinogenního/onkogenního potenciálu se zpochybňuje (32).

PATOLOGIE

Pitva

36. U všech zvířat zařazených do studie (kromě ověřovacích zvířat a ostatních satelitních zvířat, viz odstavec 20) se provede celková podrobná pitva zahrnující pečlivé vyšetření povrchu těla, všech otvorů a lebeční, hrudní a břišní dutiny a jejich obsahu. V jednotlivých případech a dle uvážení vedoucího studie může být třeba provést pitvu ověřovacích a ostatních satelitních zvířat. Měření hmotnosti orgánů obvykle nebývá součástí studie karcinogeneze, neboť geriatrické změny a v pozdějších stádiích rozvoj nádorů maří použitelnost údajů o hmotnosti orgánů. Mohou však být velmi důležité pro hodnocení průkaznosti důkazů, a zejména pro úvahy o způsobu účinku. Jsou-li součástí satelitní studie, měly by se získat nejpozději jeden rok po zahájení studie.

▼**M4**

37. Následující tkáně by se měly konzervovat v nejvhodnějším fixačním médiu s ohledem na typ tkáně a plánovaná následná histopatologická vyšetření (33) (tkáně v hranatých závorkách jsou volitelné):

všechny makroskopicky viditelné léze	srdce	slinivka břišní	žaludek (předžaludek, žláznatý žaludek)
nadledvinka	*ileum*	příštítná tělíska	[zuby]
aorta	*jejunum*	periferní nerv	varlata
mozek (zahrnující řezy mozkových hemisfér, mozečku a prodloužené míchy/Varolova mostu)	ledviny	hypofýza	brzlík
slepé střevo	slzní žláza (extraorbitální)	prostata	štítná žláza
cervix	játra	rektum	[jazyk]
koagulační žláza	plíce	slinná žláza	průdušnice
tlusté střevo	lymfatické uzliny (povrchové i hluboké)	semenný váček	močový měchýř
dvanáctník	prsní žláza (povinné u samic a, je-li zřejmé, že je možné ji vypreparovat, i u samců)	kosterní sval	děloha (včetně hrdla děložního)
nadvarle	[horní cesty dýchací, včetně nosu, nosních skořep a vedlejších dutin nosních]	kůže	[močovod]
oko (včetně sítnice)	jícen	mícha (ve třech úrovních: krční, střední hrudní a bederní)	[močová trubice]
[*femur* s kloubem]	[*Bulbus olfactorius*]	slezina	pochva
žlučník (u jiných druhů než potkan)	vaječníky	[*sternum*],	řez kostní dření a/nebo čerstvý aspirát kostní dřeni
Harderova žláza			

V případě párových orgánů, např. ledvin či nadledvinek, by se měly uchovávat oba orgány. Na základě klinických nebo jiných nálezů může být nezbytné zkoumat i další tkáně. Také by se měly uchovat všechny orgány považované na základě známých vlastností zkoušené chemické látky za možné cílové orgány. Ve studiích s dermální cestou aplikace by se měl zachovat seznam orgánů stanovený pro orální cestu, a navíc je nezbytné odebrat a konzervovat vzorky kůže z místa aplikace. V inhalačních studiích by se měl seznam tkání z dýchacích cest určených ke konzervaci a vyšetření řídit doporučeními v kapitole B.8 a B.29 této přílohy. Co se týká ostatních orgánů/tkání (kromě specificky konzervovaných tkání z dýchacích cest) by se měly vyšetřit orgány uvedené na seznamu orgánů určeném pro orální cestu.

▼M4

Histopatologické vyšetření

38. Jsou k dispozici pokyny ohledně osvědčených postupů při provádění toxikologických patologických studií (33). Měly by se vyšetřit minimálně tyto tkáně:

— všechny tkáně ve skupinách s vysokou dávkou zkoušené chemické látky a kontrolních skupinách,

— všechny tkáně zvířat uhynulých nebo utracených během studie,

— všechny tkáně vykazující makroskopické abnormality včetně nádorů,

— pokud jsou ve skupině s vysokou dávkou pozorovány histopatologické změny související s expozicí, měly by se stejné tkáně vyšetřit u všech zvířat ve všech ostatních exponovaných skupinách,

— v případě párových orgánů, např. ledvin, nadledvinek, by se měly vyšetřit oba orgány.

ÚDAJE A JEJICH PŘEDKLÁDÁNÍ

Údaje

39. Měly by se uvést údaje o všech hodnocených parametrech u každého jednotlivého zvířete. Kromě toho by se měly všechny údaje shrnout do tabulky, přičemž se uvede u každé experimentální skupiny počet zvířat na začátku zkoušky, počet zvířat nalezených uhynulých v průběhu zkoušky nebo utracených z humánních důvodů a doba úmrtí nebo utracení, počet zvířat vykazujících příznaky toxicity, popis příznaků toxicity, včetně doby nástupu, trvání a závažnosti každého toxického účinku, počet zvířat vykazujících léze, typ lézí a procento zvířat vykazujících příslušný typ léze. Tabulky se souhrnnými údaji by měly uvádět průměrné hodnoty a směrodatné odchylky (u průběžných dat ze zkoušky) u zvířat vykazujících toxické účinky nebo léze a také klasifikaci lézí.

40. Pro interpretaci výsledků studie mohou být cenná historická kontrolní data, např. v případě, kdy existují známky toho, že souběžné kontroly se značně liší od posledních údajů získaných u kontrolních zvířat ze stejného zkušebního zařízení/kolonie. Historická kontrolní data, pokud se hodnotí, by měla být ze stejné laboratoře a měla by pocházet ze studie používající zvířata stejného věku a stejného kmene a měla by být z období pěti let předcházejících příslušné studii.

41. Číselné výsledky by měly být pokud možno vyhodnoceny vhodnou a obecně uznávanou statistickou metodou. Statistické metody a data, která se mají analyzovat, by se měly zvolit již při plánování studie (odstavec 9). Tento výběr by měl zahrnovat rezervu pro případné úpravy v závislosti na přežití.

Protokol o zkoušce

42. Protokol o zkoušce by měl obsahovat tyto údaje:

Zkoušená chemická látka:

— fyzikální povaha, čistota a fyzikálně-chemické vlastnosti,

— identifikační údaje,

▼**M4**

— zdroj chemické látky,

— číslo šarže,

— certifikát o chemické analýze.

Nosič (je-li použit):

— zdůvodnění výběru nosiče (pokud je jiný než voda).

Pokusná zvířata:

— použité druhy/kmen a zdůvodnění výběru,

— počet, věk, a pohlaví zvířat na začátku zkoušky,

— zdroj, podmínky chovu, strava atd.,

— individuální hmotnosti zvířat na začátku zkoušky.

Zkušební podmínky:

— zdůvodnění způsobu podávání a výběru dávky,

— případně statistické metody použité k analýze dat,

— podrobnosti o použité formě zkoušené chemické látky/úpravě krmiva,

— analytické údaje o dosažené koncentraci, stabilitě a homogenitě přípravku,

— cesta podání a podrobné údaje o podávání zkoušené chemické látky,

— u inhalačních studií informace o tom, zda byla expozice pouze nazální cestou, nebo celotělová,

— skutečné dávky (mg/kg tělesné hmotnosti/den) a případně koeficient přepočtu koncentrace zkoušené chemické látky v krmivu/pitné vodě (mg/kg nebo ppm) na skutečnou dávku (mg/kg tělesné hmotnosti/den),

— podrobné údaje o kvalitě krmiva a vody.

Výsledky (měly by se předložit souhrnné tabulky údajů a údaje pro jednotlivá zvířata)

Obecné

— údaje o přežití,

— tělesná hmotnost/změny tělesné hmotnosti,

— spotřeba krmiva, výpočty využitelnosti krmiva, pokud byly provedeny, a případně spotřeba vody, pokud se uplatňuje,

— toxikokinetické údaje, jsou-li k dispozici,

— oftalmoskopické vyšetření (je-li k dispozici),

— hematologická vyšetření (jsou-li k dispozici),

— klinická biochemická vyšetření (jsou-li k dispozici).

▼**M4**

Klinické nálezy

— známky toxicity,

— incidence (plus závažnost, je-li hodnocena) jakékoli abnormality,

— povaha, závažnost a trvání pozorovaných klinických příznaků (zda byly přechodné, nebo trvalé).

Pitevní údaje

— konečná tělesná hmotnost,

— hmotnosti orgánů a jejich poměry, pokud se stanovují,

— pitevní nálezy; incidence a závažnost abnormalit.

Histopatologické vyšetření

— histopatologické nálezy, které nejsou neoplastické,

— neoplastické histopatologické nálezy,

— vzájemný vztah mezi makroskopickými a mikroskopickými nálezy,

— podrobný popis všech histopatologických nálezů souvisejících s expozicí, včetně klasifikace závažnosti,

— zprávy o všech odborných revizích vzorků.

Statistické zpracování výsledků dle potřeby

Diskuse o výsledcích zahrnující

— diskuse o jakýchkoli modelovacích přístupech,

— vztahy mezi dávkou a odezvou,

— historické kontrolní údaje,

— posouzení jakýchkoli informací o způsobu účinku,

— stanovení BMD, NOAEL nebo LOAEL,

— význam pro člověka.

Závěry

LITERATURA:

1) OECD (1995). Report of the Consultation Meeting on Sub-chronic and Chronic Toxicity/Carcinogenicity Testing (Rome, 1995), internal working document, Environment Directorate, OECD, Paris.

2) EPA (2005). Guidelines for Carcinogen Risk Assessment Risk Assessment Forum U.S. Environmental Protection Agency Washington, DC.

3) Combes RD, Gaunt, I, Balls M (2004). A Scientific and Animal Welfare Assessment of the OECD Health Effects Test Guidelines for the Safety Testing of Chemicals under the European Union REACH System. ATLA 32:

4) Barlow SM, Greig JB, Bridges JW et al (2002). Hazard identification by methods of animal-based toxicology. Food. Chem. Toxicol. 40: 145-191.

5) Chhabra RS, Bucher JR, Wolfe M, Portier C (2003). Toxicity characterization of environmental chemicals by the US National Toxicology Programme: an overview. Int. J. Hyg. Environ. Health 206: 437-445.

▼M4

6) Kapitola B.27 této přílohy, Zkouška subchronické orální toxicity studie orální toxicity na nehlodavcích (90denní opakovaná aplikace).

7) OECD (2012). Guidance Document on the Design and Conduct of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Supporting Test Guidelines 451, 452 and 453 - Second edition. Series on Testing and Assessment No. 116, k dispozici na veřejných webových stránkách OECD s pokyny ke zkoušení na adrese www.oecd.org/env/testguidelines.

8) OECD (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing, Series on Testing and Assessment No. 39, ENV/JM/MONO(2009)28, OECD, Paris.

9) Kapitola B.8 této přílohy, Subakutní inhalační toxicita: 28denní opakovaná aplikace.

10) Kapitola B.29 této přílohy, Subchronická inhalační toxicita: 90denní studie.

11) Kapitola B.9 této přílohy, Dermální toxicita (28denní opakovaná aplikace).

12) Boobis AR, Cohen SM, Dellarco V, McGregor D, Meek ME, Vickers C, Willcocks D, Farland W (2006). IPCS Framework for analyzing the Relevance of a Cancer Mode of Action for Humans. Crit. Rev. in Toxicol, 36:793-801.

13) Cohen SM, Meek ME, Klaunig JE, Patton DE, and Fenner-Crisp PA (2003). The human relevance of information on carcinogenic Modes of Action: An Overview. Crit. Rev. Toxicol. 33:581-589.

14) Holsapple MP, Pitot HC, Cohen SN, Boobis AR, Klaunig JE, Pastoor T, Dellarco VL, Dragan YP (2006). Mode of Action in Relevance of Rodent Liver Tumors to Human Cancer Risk. Toxicol. Sci. 89:51-56.

15) Meek EM, Bucher JR, Cohen SM, Dellarco V, Hill RN, Lehman-McKemmon LD, Longfellow DG, Pastoor T, Seed J, Patton DE (2003). A Framework for Human Relevance analysis of Information on Carcinogenic Modes of Action. Crit. Rev. Toxicol. 33:591-653.

16) Carmichael NG, Barton HA, Boobis AR et al (2006). Agricultural Chemical Safety Assessment: A Multisector Approach to the Modernization of Human Safety Requirements. Critical Reviews in Toxicology 36: 1-7.

17) Barton HA, Pastoor TP, Baetcke T et al (2006). The Acquisition and Application of Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion (ADME) Data in Agricultural Chemical Safety Assessments. Critical Reviews in Toxicology 36: 9-35.

18) Doe JE, Boobis AR, Blacker A et al (2006). A Tiered Approach to Systemic Toxicity Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. Critical Reviews in Toxicology 36: 37-68.

19) Cooper RL, Lamb JS, Barlow SM et al (2006). A Tiered Approach to Life Stages Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. Critical Reviews in Toxicology 36: 69-98.

20) OECD (2002). Guidance Notes for Analysis and Evaluation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Series on Testing and Assessment No. 35 and Series on Pesticides No. 14, ENV/JM/MONO(2002)19, OECD, Paris.

21) OECD (2000). Guidance Document on the recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation, Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris.

▼**M4**

22) Rhomberg LR, Baetcke K, Blancato J, Bus J, Cohen S, Conolly R, Dixit R, Doe J, Ekelman K, Fenner-Crisp P, Harvey P, Hattis D, Jacobs A, Jacobson-Kram D, Lewandowski T, Liteplo R, Pelkonen O, Rice J, Somers D, Turturro A, West W, Olin S (2007). Issues in the Design and Interpretation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies in Rodents: Approaches to Dose Selection Crit Rev. Toxicol. 37 (9): 729 - 837.

23) ILSI (International Life Sciences Institute) (1997). Principles for the Selection of Doses in Chronic Rodent Bioassays. Foran JA (Ed.). ILSI Press, Washington, DC.

24) Griffiths SA, Parkinson C, McAuslane JAN and Lumley CE (1994). The utility of the second rodent species in the carcinogenicity testing of pharmaceuticals. The Toxicologist 14(1):214.

25) Usui T, Griffiths SA and Lumley CE (1996). The utility of the mouse for the assessment of the carcinogenic potential of pharmaceuticals. In D'Arcy POF & Harron DWG (eds). Proceedings of the Third International Conference on Harmonisation. Queen's University Press, Belfast. pp 279-284.

26) Carmichael NG, Enzmann H, Pate I, Waechter F (1997). The Significance of Mouse Liver Tumor Formation for Carcinogenic Risk Assessment: Results and Conclusions from a Survey of Ten Years of Testing by the Agrochemical Industry. Environ Health Perspect. 105:1196-1203.

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

28) National Research Council, 1985. Guide for the care and use of laboratory animals. NIH Publication No. 86-23. Washington, D.C., US Dept. of Health and Human Services.

29) GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, 1988). Publication on the Planning and Structure of Animal Facilities for Institutes Performing Animal Experiments. ISBN 3-906255-04-2.

30) GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, 2006). Microbiological monitoring of laboratory animals in various housing systems.

31) Diehl K-H, Hull R, Morton D, Pfister R, Rabemampianina Y, Smith D, Vidal J-M, van de Vorstenbosch C. (2001). A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. Journal of Applied Toxicology 21:15-23.

32) Weingand K, *et al.* (1996). Harmonization of Animal Clinical Pathology Testing in Toxicity and Safety Studies. Fund. Appl. Toxicol. 29: 198-201.

33) Crissman J, Goodman D, Hildebrandt P, *et al.* (2004). Best Practices Guideline: Toxicological Histopathology. Toxicologic Pathology 32: 126-131.

▼**M4**

Dodatek 1

DEFINICE

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

▼M4

B.33 **KOMBINOVANÉ STUDIE CHRONICKÉ TOXICITY A KARCINOGENITY**

ÚVOD

1. Tato zkušební metoda odpovídá Pokynům OECD pro zkoušení (TG) 453 (2009). Původní Pokyny pro zkoušení 453 byly schváleny v roce 1981. Revize zkušební metody B.33 byla považována za nezbytnou k zohlednění nejnovějšího vývoje v oblasti zajištění dobrých životních podmínek zvířat a regulačních požadavků (1), (2), (3), (4), (5). Aktualizace této zkušební metody B.33 se prováděla paralelně s revizemi kapitoly B.32 této přílohy, Studie karcinogenity, a kapitoly B.30 této přílohy, Studie chronické toxicity, s cílem získat další informace o zvířatech použitých ve studii a poskytnout další podrobnosti o výběru dávky. Tato zkušební metoda je určena ke zkouškám širokého spektra chemických látek, včetně pesticidů a průmyslových chemikálií. V případě farmaceutik se však některé detaily a požadavky mohou lišit (viz pokyny S1B Mezinárodní konference o harmonizaci (ICH) testování karcinogenity léků).

2. Většina studií chronické toxicity a karcinogenity se provádí na různých druzích hlodavců a tato zkušební metoda je proto primárně určena k použití ve studiích prováděných právě na těchto druzích. Je-li třeba tyto studie provést na nehlodavcích, lze rovněž použít principy a postupy uvedené v této zkušební metodě spolu s těmi, které jsou uvedeny v kapitole B.27 této přílohy, Studie orální toxicity na nehlodavcích – 90denní opakovaná aplikace (6), jak je uvedeno v pokynech OECD Pokyny č. 116 o přípravě a provádění studií chronické toxicity a karcinogenity (7).

3. Třemi hlavními způsoby podávání používanými ve studiích chronické toxicity/karcinogenity jsou orální podávání, dermální aplikace a inhalační podávání. Výběr cesty podání závisí na fyzikálních a chemických vlastnostech zkoušené chemické látky a na převládající cestě expozice u lidí. Další informace o výběru cesty expozice jsou uvedeny v Pokynech č. 116 (7).

4. Tato zkušební metoda se zaměřuje na expozici orální cestou, což je cesta, která se ve studiích chronické toxicity a karcinogenity používá nejběžněji. Přestože dlouhodobé studie zahrnující expozici dermální nebo inhalační cestou mohou být pro posouzení rizik pro lidské zdraví rovněž nezbytné a/nebo mohou být vyžadovány v rámci určitých regulačních režimů, jsou studie používající tyto cesty expozice značně technicky složité. Takové studie je třeba navrhovat individuálně pro daný případ, přestože zde uvedená zkušební metoda pro posouzení a vyhodnocení chronické toxicity a karcinogenity při orálním podávání by mohla tvořit základ protokolu pro studie inhalační a/nebo dermální, pokud jde o doporučení pro období expozice, klinické a patologické parametry atd. Jsou k dispozici pokyny OECD týkající se podávání zkoušených chemických látek inhalační (7), (8) a dermální cestou (7). Při navrhování dlouhodobých studií zahrnujících expozici inhalační cestou by se mělo konkrétně nahlédnout do kapitoly B.8 této přílohy (9) a kapitoly B.29 této přílohy (10) a rovněž do pokynů OECD ke zkouškám akutní inhalační toxicity (8). V případě, že se zkoušky provádějí dermální cestou, je třeba nahlédnout do kapitoly B.9 této přílohy (11).

▼M4

5. Kombinovaná studie chronické toxicity/karcinogenity poskytuje informace o možných rizicích pro zdraví, která mohou pravděpodobně vzniknout při opakované expozici trvající až po celou dobu života použitého druhu. Studie rovněž poskytne informace o toxických účincích zkoušené chemické látky včetně potenciální karcinogenity a určí cílové orgány a možnost akumulace. Může také poskytnout odhad hodnoty dávky bez pozorovaných nepříznivých účinků pro toxické účinky a v případě negenotoxických karcinogenů pro nádorové odezvy, což lze použít při stanovení kritérií pro bezpečnou expozici člověka. Důraz se klade také na pečlivé klinické pozorování zvířat s cílem získat co nejvíce informací.

6. Cíle studií chronické toxicity/karcinogenity zahrnutých v této zkušební metodě jsou:

— identifikace karcinogenních vlastností zkoušené chemické látky vedoucích ke zvýšenému výskytu novotvarů, zvýšenému podílu maligních novotvarů nebo snížení doby do vzniku novotvarů ve srovnání se souběžnými kontrolními skupinami,

— identifikace doby do vzniku novotvarů,

— identifikace chronické toxicity zkoušené chemické látky,

— identifikace cílového orgánu (cílových orgánů) chronické toxicity a karcinogenity,

— charakterizace vztahu mezi dávkou a odezvou,

— určení hodnoty dávky bez pozorovaného nepříznivého účinku (NOAEL) nebo výchozího bodu pro stanovení referenční dávky (BMD),

— extrapolace karcinogenních účinků na nízké úrovně expozice člověka,

— předpověď chronických toxických účinků na úrovních expozice člověka,

— získání údajů ke zkoušení hypotéz ohledně způsobu účinku (2), (7), (12), (13), (14), (15).

VÝCHOZÍ ÚVAHY

7. Před zahájením studie by měla laboratoř provádějící zkoušky vzít v úvahu při posuzování a hodnocení potenciální karcinogenity a chronické toxicity zkoušené chemické látky všechny dostupné informace o zkoušené chemické látce, aby zaměřila uspořádání studie směrem k účinnějšímu zkoušení jejích toxikologických vlastností a minimalizovala použití zvířat. Obzvlášť důležité jsou informace o způsobu účinku potenciálního karcinogenu a jeho posouzení (2), (7), (12), (13), (14), (15), neboť optimální uspořádání studie se může lišit podle toho, zda je zkoušená chemická látka známý genotoxický karcinogen nebo je u ní pouze podezření na genotoxickou karcinogenitu. Další pokyny k rozvahám o způsobu účinku jsou uvedeny v pokynech č. 116 (7).

8. Informace, které pomůžou při utváření plánu studie, zahrnují identitu, chemickou strukturu a fyzikálně-chemické vlastnosti zkoušené chemické látky, všechny informace o způsobu účinku, výsledky jakýchkoli testů toxicity včetně testů genotoxicity *in vitro* nebo *in vivo*, předpokládaná použití a potenciální expozici u člověka, dostupné údaje (Q)SAR, údaje o mutagenitě/genotoxicitě, karcinogenitě a další toxikologické údaje o strukturně příbuzných chemických látkách, dostupné toxikokinetické údaje (kinetika při jednorázové dávce a rovněž při opakovaných dávkách, je-li k dispozici) a údaje získané v jiných studiích s opakovanou expozicí. Stanovení chronické toxicity/karcinogenity by se mělo provádět pouze poté, co byly

▼M4

získány úvodní informace o toxicitě z 28denních a/nebo 90denních zkoušek toxicity po opakované dávce. Krátkodobé zkoušky iniciace – propagace mohou rovněž poskytnout užitečné informace. Jako součást celkového zhodnocení potenciálních nepříznivých účinků konkrétní zkoušené chemické látky na zdraví by se měl zvážit postup zkoušení prováděný po fázích při zkouškách karcinogenity (16), (17), (18), (19).

9. Nejvhodnější statistické metody pro analýzu výsledků s ohledem na uspořádání a cíle experimentu by se měly stanovit před zahájením studie. Je třeba zvážit, zda by měla statistika zahrnovat korekci na přežití, analýzu kumulativních nádorových rizik ve vztahu k době přežití, analýzu doby do vzniku nádoru a analýzu v případě předčasného ukončení zkoušky u jedné nebo více skupin. Pokyny ohledně vhodných statistických analýz a klíčové odkazy na mezinárodně uznávané statistické metody jsou uvedeny v Pokynech č. 116 (7) a rovněž v Pokynech č. 35 o analýze a hodnocení studií chronické toxicity a karcinogenity (20).

10. Při provádění studie karcinogenity je nutné řídit se vždy vůdčími principy a úvahami uvedenými v Pokynech OECD o rozpoznání, vyšetření a použití klinických příznaků jako lidských cílových parametrů u pokusných zvířat používaných při hodnocení bezpečnosti (21), zejména v odstavci 62 těchto pokynů. Tento odstavec uvádí, že „*Ve studiích zahrnujících opakované podávání dávky by se mělo v případě, kdy zvíře vykazuje klinické příznaky, které jsou progresivní a vedou k dalšímu zhoršení jeho stavu, učinit informované rozhodnutí, zda zvíře humánně utratit, či ne. Toto rozhodnutí by mělo obsahovat posouzení hodnoty informací, které se získají, bude-li se zvíře i nadále udržovat ve studii, oproti jeho celkovému stavu. Dospěje-li se k rozhodnutí, pokračovat u zvířete ve zkoušce, měla by se dle potřeby zvýšit četnost pozorování. Rovněž je možné, aniž by to nepříznivě ovlivnilo účel zkoušky, dočasně pozastavit podávání dávky, jestliže to zmírní bolest či utrpení, nebo snížit zkoušenou dávku.*“

11. Podrobné pokyny a diskuse o principech výběru dávky pro studie chronické toxicity a karcinogenity naleznete v Pokynech č. 116 (7) a rovněž ve dvou publikacích ústavu International Life Sciences Institute (22), (23). Hlavní strategie výběru dávky závisí na primárním cíli nebo cílech studie (odstavec 6). Při výběru vhodných úrovní dávky by se mělo dosáhnout rovnováhy mezi screeningem nebezpečnosti na straně jedné a charakterizací odezvy na nízkou dávku a jejich významu na straně druhé. To je důležité zejména v případě kombinované studie chronické toxicity a karcinogenity.

12. Je třeba zvážit možnost provedení této kombinované studie chronické toxicity a karcinogenity, namísto odděleného provádění studie chronické toxicity (kapitola B.30 této přílohy) a studie karcinogenity (kapitola B.32 této přílohy). Kombinovaná zkouška zajišťuje větší efektivitu ve smyslu času a nákladů a určité omezení použití zvířat v porovnání s prováděním dvou samostatných studií a zároveň nezhoršuje kvalitu údajů ani ve fázi zkoušení chronické toxicity, ani ve fázi zkoušení karcinogenity. Při provádění kombinované studie chronické toxicity a karcinogenity však je třeba pečlivě zvážit zásady výběru dávky (odstavce 11 a 22–26) a rovněž se uznává, že v určitých regulačních rámcích mohou být vyžadovány samostatné studie. Další pokyny o uspořádání kombinované studie chronické toxicity a karcinogenity s cílem dosáhnout maximální efektivity studie ve smyslu možností snížení počtu použitých zvířat a rovněž úpravou různých experimentálních postupů naleznete v Pokynech č. 116 (7).

▼M4

13. Definice použité v kontextu této zkušební metody naleznete na konci této kapitoly a v Pokynech č. 116 (7).

PODSTATA ZKOUŠKY

14. Plán studie se skládá ze dvou paralelních fází, chronické fáze a fáze karcinogenity (jejich délka viz odstavec 34 a 35). Zkoušená chemická látka se obvykle podává orální cestou, avšak zkoušky inhalační nebo dermální cestou mohou být také vhodné. V chronické fázi se zkoušená chemická látka podává denně v odstupňovaných dávkách několika skupinám pokusných zvířat, jedna úroveň dávky na každou skupinu, obvykle po dobu 12 měsíců, avšak je možné zvolit i delší nebo kratší dobu expozice v závislosti na regulačních požadavcích (viz odstavec 34). Tato doba trvání by se měla zvolit dostatečně dlouhá na to, aby umožnila manifestaci jakýchkoli účinků kumulativní toxicity bez zkreslujících příznaků geriatrických změn. Plán studie může rovněž zahrnovat jedno nebo více předběžných utracení, např. za 3 a 6 měsíců, a je možné přidat další skupiny zvířat, aby se tato skutečnost kompenzovala (viz odstavec 20. Ve fázi karcinogenity se zkoušená chemická látka se podává denně několika skupinám pokusných zvířat po většinu jejich života. Zvířata se v obou fázích pečlivě sledují s ohledem na příznaky toxicity a rozvoj neoplastických lézí. Zvířata, která v průběhu zkoušky uhynula nebo byla utracena, se pitvají a na konci zkoušky se přeživší zvířata utratí a rovněž pitvají.

POPIS METODY

Výběr zvířecích druhů

15. Tato zkušební metoda se primárně zabývá posouzením a vyhodnocením toxicity a karcinogenity u hlodavců (odstavec 2). Použití nehlodavců lze zvážit, pokud dostupné údaje naznačují, že jsou pro předpověď účinků na lidské zdraví vhodnější. Výběr druhu by měl být zdůvodněn. Upřednostňovaným druhem hlodavců je potkan, ale lze použít i jiný druh hlodavců, např. myš. Přestože použití myší ve zkouškách karcinogenity může mít omezený užitek (24), (25), (26), jsou v některých stávajících regulačních programech zkoušky karcinogenity na myších ještě stále vyžadovány, pokud se neprokáže, že taková studie není z vědeckého hlediska nezbytná. Krysy a myši jsou upřednostňovanými experimentálními modelovými organismy díky své relativně krátké době života, široce rozšířenému použití ve farmakologických a toxikologických studiích, citlivosti k indukci nádoru a dostupnosti dostatečně charakterizovaných kmenů. V důsledku těchto vlastností je k dispozici velké množství informací o jejich fyziologii a patologii. Plán a provedení studií chronické toxicity/karcinogenity u nehlodavců, jsou-li požadovány, by měly vycházet z principů uvedených v této zkušební metodě spolu s principy v kapitole B.27 této přílohy, 90denní studie orální toxicity po opakované aplikaci na nehlodavcích (6). Další informace o výběru druhu a kmene jsou uvedeny v Pokynech č. 116 (7).

16. Měla by se použít mladá zdravá dospělá zvířata běžně používaných laboratorních kmenů. Kombinovaná studie chronické toxicity/karcinogenity by se měla provádět na zvířatech ze stejného kmene a zdroje, jako byla zvířata použitá v kratších předběžných studiích toxicity, přestože je-li známo, že zvířata z tohoto kmene a zdroje mívají potíže dosáhnout běžně uznávaných kritérií přežití v dlouhodobých studiích [viz Pokyny č. 116 (7)], měla by se zvážit možnost použít takový kmen zvířat, který má přijatelnou míru přežití v dlouhodobé studii. Samice musí být nullipary a nesmějí být březí.

▼M4

Podmínky chovu a krmení

17. Zvířata lze chovat jednotlivě nebo v klecích po malých skupinkách jedinců stejného pohlaví. Individuální chov by se měl použít pouze, pokud je to vědecky odůvodněné (27), (28), (29). Klece by měly být uspořádány tak, aby byl případný vliv jejich polohy minimalizován. Teplota v místnosti pro pokusná zvířata by měla být 22 °C (± 3 °C). Relativní vlhkost vzduchu by měla být minimálně 30 % a pokud možno nepřesáhnout 70 % kromě doby úklidu místnosti, cílem by měla být hodnota 50–60 %. Osvětlení by mělo být umělé a mělo by se střídat 12 hodin světla a 12 hodin tmy. Ke krmení lze použít konvenční laboratorní stravu s neomezenou dodávkou pitné vody. Strava by měla splňovat všechny nutriční požadavky zkoušených druhů a obsah příměsí ve stravě zahrnující mimo jiné zbytky pesticidů, perzistentní organopolutanty, fytoestrogeny, těžké kovy a mykotoxiny, které mohou ovlivnit výsledek zkoušky, by měl být co možná nejnižší. Pravidelně by se měly získávat analytické informace o nutričních hodnotách stravy a množství příměsí ve stravě, alespoň na začátku studie a pokaždé, když se změní používaná šarže, a měly by se začlenit do závěrečné zprávy. Obdobně by se měly poskytnout analytické informace o pitné vodě. Výběr stravy může být ovlivněn nutností zajistit vhodnou přísadu zkoušené chemické látky, podává-li se látka v krmivu, a splnit nutriční potřeby zvířat.

Příprava zvířat

18. Použijí se zdravá zvířata, která se alespoň 7 dnů aklimatizovala na laboratorní podmínky a která nebyla dříve podrobena žádným experimentálním postupům. V případě hlodavců by se mělo podávání látky zahájit co možná nejdříve po jejich odstavení a aklimatizaci, nejlépe před dosažením stáří 8 týdnů. Pokusná zvířata by měla být charakterizována podle druhu, kmenu, původu, pohlaví, hmotnosti a stáří. Na začátku studie by měly být odchylky hmotnosti zvířat u každého pohlaví minimální a neměly by překročit ± 20 % průměrné hmotnosti pro všechna zvířata ve studii, pro každé pohlaví zvlášť. Zvířata by měla náhodným výběrem rozdělit do kontrolních a experimentálních skupin. Po randomizaci by neměly být výrazné rozdíly v průměrných hodnotách tělesné hmotnosti mezi skupinami v rámci každého pohlaví. Existují-li statisticky významné rozdíly, měla by se randomizace pokud možno zopakovat. Každému zvířeti by se mělo přidělit jedinečné identifikační číslo a mělo by se tímto číslem trvale označit pomocí tetování, implantací mikročipu nebo jinou vhodnou metodou.

POSTUP

Počet a pohlaví zvířat

19. Měla by se použít obě pohlaví. Měl by se použít dostatečný počet zvířat umožňující důkladné biologické a statistické vyhodnocení. U hlodavců by proto každá exponovaná skupina (jak je uvedeno v odstavci 22) a souběžná kontrolní skupina určená k fázi karcinogenity měla obsahovat alespoň 50 zvířat od každého pohlaví. V závislosti na cíli studie může být možné zvýšit statistickou sílu klíčových odhadů rozdělením zvířat nerovnoměrně do skupin s různou dávkou, přičemž do skupin s nízkou dávkou se zařadí více než 50 zvířat, např. aby se odhadl karcinogenní potenciál při nízkých dávkách. Je však třeba přiznat, že mírné zvýšení velikosti skupiny povede pouze k relativně malému zvýšení statistické síly studie. V případě hlodavců by každá exponovaná skupina (jak je uvedeno v odstavci 22) a souběžná kontrolní skupina určená k fázi chronické toxicity měla obsahovat alespoň 10 zvířat od každého pohlaví. Je třeba upozornit, že je tento počet nižší než ve studii chronické toxicity (kapitola 30 této přílohy). Interpretace údajů

▼M4

pocházejících od omezeného počtu zvířat v každé skupině ve fázi chronické toxicity této kombinované studie však bude podepřena také údaji od většího počtu zvířat z fáze karcinogenity této studie. Ve studiích používajících myši může být nutné přidat další zvířata do každé exponované skupiny ve fázi chronické toxicity, aby se mohla provést všechna požadovaná hematologická vyšetření. Další informace o statistickém uspořádání studie a výběru úrovní dávek k maximalizaci statistické síly jsou uvedeny v Pokynech č. 116 (7).

Zajištění předběžných utracení, satelitní skupiny a ověřovacích zvířat

20. Studie může zajistit zvířata pro předběžná utracení např. v 6. měsíci fáze chronické toxicity, aby se získaly informace o progresi non-neoplastických změn a mechanistické informace, je-li to vědecky odůvodněné. Jsou-li tyto informace již k dispozici z předchozích studií toxicity zkoušené chemické látky po opakovaných dávkách, nemusí být předběžná utracení vědecky odůvodněná. Zvířata použitá ve fázi chronické toxicity této studie trvající obvykle 12 měsíců (odstavec 34) poskytnou údaje z předběžného utracení pro fázi karcinogenity této studie, čímž se dosáhne snížení celkového počtu použitých zvířat. Do fáze chronické toxicity studie lze rovněž zařadit satelitní skupiny za účelem sledování reverzibility jakýchkoli toxikologických změn vyvolaných zkoušenou chemickou látkou, která se zkoumá. Tyto skupiny mohou být omezeny pouze na nejvyšší úroveň dávky ve studii a kontrolu. Také je možno zařadit do studie další skupinu ověřovacích zvířat (obvykle 5 zvířat od každého pohlaví) k monitorování stavu onemocnění v průběhu studie, je-li to nutné (30). Další pokyny o uspořádání studie tak, aby zahrnovalo předběžná utracení, satelitní a ověřovací zvířata a zároveň se minimalizoval celkový počet použitých zvířat, jsou uvedeny v Pokynech č. 116 (7).

21. Pokud jsou v plánu studie zahrnuta satelitní zvířata a/nebo předběžná utracení zvířat, činí počet zvířat v každé exponované skupině určených k tomuto účelu obvykle 10 zvířat od každého pohlaví a celkový počet zvířat zařazených do studie je nutno zvýšit o počet zvířat, která budou usmrcena před ukončením studie. U předběžně utracených a satelitních zvířat by se měly obvykle sledovat stejné parametry, jako u zvířat ve fázi chronické toxicity v hlavní studii, mezi něž patří tělesná hmotnost, spotřeba krmiva/vody, hematologická a klinická biochemická měření a patologická vyšetření, nicméně měření se mohou také omezit (ve skupinách určených k předběžnému utracení) na konkrétní klíčové parametry, jakými jsou neurotoxicita a imunotoxicita.

Dávkové skupiny a dávkování

22. Pokyny ohledně veškerých aspektů výběru dávky a odstupňování úrovní dávek jsou uvedeny v Pokynech č. 116 (7). V chronické fázi i ve fázi karcinogenity by se měly použít alespoň tři úrovně dávek a souběžná kontrola. Úrovně dávek budou obecně vycházet z výsledků krátkodobých studií při opakované aplikaci nebo ze studií k stanovení rozsahu dávkování a měly by zohlednit jakékoli existující toxikologické a toxikokinetické údaje dostupné pro zkoušenou sloučeninu nebo příbuzné materiály.

▼M4

23. V případě studie pro fázi chronické toxicity nemusí být úplná studie s použitím tří úrovní dávek nutná, pokud lze předpokládat, že zkouška provedená při jedné úrovni dávky nejméně 1 000 mg na kg tělesné hmotnosti na den pravděpodobně nevyvolá nepříznivé účinky. Tato úvaha by se měla zakládat na informacích z předběžných studií a předpoklad, že k toxicitě nedojde, by měl vycházet z údajů od strukturně příbuzných chemických látek. Mezní dávka 1 000 mg/kg tělesné hmotnosti/den se může použít s výjimkou případu, kdy údaje o expozici člověka naznačují, že je nezbytné použití vyšší úrovně dávek.

24. Nebrání-li tomu fyzikálně-chemická povaha nebo biologické účinky zkoušené chemické látky, měla by se zvolit nejvyšší úroveň dávky za účelem identifikace hlavních cílových orgánů a toxických účinků, která by však zároveň neměla vést k utrpení, závažné toxicitě, morbiditě nebo uhynutí. Obvykle by se měla vybrat taková nejvyšší dávka, aby vyvolala příznaky toxicity, např. pokles přírůstku tělesné hmotnosti (přibližně 10 %). Nicméně v závislosti na cílech studie (viz odstavec 6) je možno zvolit nejvyšší dávku nižší, než je dávka podávající důkaz o toxicitě, např. jestliže dávka vyvolává nepříznivý účinek, který však má jen malý dopad na délku života nebo tělesnou hmotnost.

25. Úrovně dávek a odstupňování úrovní dávek lze vybrat tak, aby mohly být stanoveny vztah mezi dávkou a odezvou a v závislosti na způsobu účinku zkoušené chemické látky také NOAEL nebo jiné plánované výsledky studie, např. BMD (viz odstavec 27). Mezi faktory, které by se měly zvážit při určování nižších dávek, patří předpokládaná směrnice křivky závislosti odezvy na dávce, dávky, při nichž mohou nastat důležité změny v metabolismu nebo ve způsobu toxického účinku, u nějž se předpokládá prahová hodnota, nebo dávky, u nichž předpokládá výchozí bod pro extrapolaci do oblasti nízkých dávek. Při provádění kombinované studie karcinogenity/chronické toxicity je hlavním cílem získat informace pro účely posouzení rizika karcinogenity a informace o chronické toxicitě jsou obvykle vedlejším cílem. Tuto skutečnost je třeba mít ve studii na paměti při výběru úrovní dávek a jejich odstupňováním.

26. Interval mezi jednotlivými úrovněmi dávek bude záviset na cílech studie a vlastnostech zkoušené chemické látky a není možné je v této zkušební metodě předepsat, avšak dvou až čtyřnásobné intervaly obvykle vedou k dobré funkčnosti zkoušky, použijí-li se k nastavení sestupných úrovní dávek, a často se upřednostňuje zařazení čtvrté zkušební skupiny před použitím velmi velkých intervalů (např. více než faktor přibližně 6–10) mezi dávkami. Obecně je třeba vyhnout se použití faktorů větších než 10 a jejich případné použití by se mělo zdůvodnit.

27. Jak je dále uvedeno v Pokynech č. 116 (7), je třeba při výběru dávky zvážit tyto body:

— známá nebo předpokládaná nelinearita či inflexní body na křivce závislosti odezvy na dávce,

— toxikokinetika a rozsahy dávkování, při kterých dochází nebo nedochází k metabolické indukci, saturaci nebo nelinearitě mezi vnějšími a vnitřními dávkami,

— prekurzorové léze, známky účinku nebo indikátory probíhajících klíčových základních biologických procesů,

▼M4

— klíčové (nebo předpokládané) aspekty způsobu účinku, například dávky, při kterých začíná vzrůstat cytotoxicita, narušují se hladiny hormonů, homeostatické mechanismy jsou ochromeny atd.,

— oblasti křivky závislosti odezvy na dávce, kde je nutný obzvlášť robustní odhad, např. v rozsahu předpokládané BMD nebo prahové hodnoty,

— zvážení předpokládaných úrovní expozice člověka, zejména při výběru středních a nízkých dávek.

28. Kontrolní skupina je neexponovaná skupina nebo kontrolní skupina s nosičem, pokud se nosič při podávání zkoušené chemické látky používá. S výjimkou aplikace zkoušené chemické látky je třeba se zvířaty v kontrolní skupině zacházet stejným způsobem jako se zvířaty v experimentálních skupinách. Používá-li se nosič, podá se kontrolní skupině v nejvyšším používaném objemu v rámci skupin. Jestliže se zkoušená chemická látka podává v krmivu a způsobuje podstatné snížení příjmu potravy v důsledku snížené chutnosti krmiva, může být užitečné použít další kontrolní skupinu krmenou tak, aby měla stejně snížený příjem potravy, která poslouží jako vhodnější kontrola.

Příprava dávek a podávání zkoušené chemické látky

29. Zkoušená chemická látka se obvykle podává orálně, v krmivu či v pitné vodě, nebo žaludeční sondou. Další informace o cestách a způsobech podání jsou uvedeny v Pokynech č. 116 (7). Cesta a způsob podání závisí na účelu studie, fyzikálně-chemických vlastnostech zkoušené chemické látky, její biologické dostupnosti a převládající cestě a způsobu expozice člověka. Mělo by se uvést zdůvodnění zvolené cesty a způsobu podání. V zájmu zajištění dobrých životních podmínek zvířat by se mělo podávání žaludeční sondou zvolit pouze u těch látek, u nichž tato cesta a způsob podání náležitě reprezentují potenciální expozici člověka (např. farmaceutika). Chemické látky, které se nacházejí v potravě nebo v životním prostředí, včetně pesticidů, se obvykle podávají v krmivu nebo pitné vodě. Nicméně u některých scénářů expozice, např. expozice na pracovišti, mohou být vhodnější jiné cesty podání.

30. Zkoušená chemická látka se v případě potřeby rozpustí nebo suspenduje ve vhodném nosiči. Je třeba podle potřeby zvážit následující vlastnosti nosiče nebo jiných přídatných látek: účinky na absorpci, distribuci, metabolismus nebo retenci zkoušené chemické látky, účinky na chemické vlastnosti zkoušené chemické látky, které mohou změnit její toxické vlastnosti a účinky na konzumaci krmiva nebo vody či na nutriční stav zvířat. Je-li to možné, doporučuje se zvážit nejprve použití vodného roztoku/suspenze, poté použití roztoku/emulze v oleji (např. v kukuřičném oleji) a nakonec roztoku v jiných nosičích. U nosičů jiných než voda je nutné znát jejich toxické vlastnosti. Měly by být k dispozici informace o stabilitě zkoušené chemické látky a homogenitě podávaných roztoků nebo krmiva (dle potřeby) za podmínek podávání (např. v krmivu).

31. U látek podávaných v krmivu nebo v pitné vodě je důležité zajistit, aby množství použité zkoušené chemické látky neovlivňovalo normální výživu nebo vodní rovnováhu. V dlouhodobých studiích toxicity s podáváním látky v krmivu by koncentrace zkoušené chemické látky v krmivu obvykle neměla přesáhnout horní mez 5 % celkového množství krmiva, aby se zabránilo nutriční nerovnováze. Podává-li se zkoušená chemická látka v krmivu, může se použít buď konstantní koncentrace v krmivu (mg/kg krmiva nebo ppm), nebo konstantní dávkování vzhledem k tělesné hmotnosti zvířete (mg/kg tělesné hmotnosti) vypočítané jednou týdně. Použitá možnost by se měla specifikovat.

▼M4

32. V případě orálního podávání se zvířatům podává zkoušená chemická látka denně (sedm dnů v každém týdnu) po dobu 12 měsíců (chronická fáze) nebo 24 měsíců (fáze karcinogenity), viz také odstavec 33 a 34. Jakýkoli jiný režim dávkování, např. pět dní v týdnu, musí být zdůvodněn. V případě dermální aplikace se zvířata vystavují zkoušené chemické látce alespoň po dobu 6 hodin denně, 7 dnů v týdnu, jak je specifikováno v kapitole B.9 této přílohy (11), po dobu 12 měsíců (chronická fáze) nebo 24 měsíců (fáze karcinogenity). Expozice inhalační cestou se provádí 6 hodin denně, 7 dnů v týdnu, avšak je možné použít i expozici 5 dnů v týdnu, je-li zdůvodněna. Období expozice obvykle trvá 12 měsíců (chronická fáze) nebo 24 měsíců (fáze karcinogenity). Jsou-li k expozici pouze nazální cestou použity jiné druhy hlodavců než potkani, je možné upravit maximální doby expozice za účelem minimalizace druhově specifického utrpení. Používá-li se expozice kratší než 6 hodin denně, je třeba uvést zdůvodnění. Viz také kapitola B.8 této přílohy (9).

33. Pokud se zkoušená chemická látka podává zvířatům nitrožaluludečně, mělo by se to provádět žaludeční sondou nebo vhodnou intubační kanylou, vždy v přibližně stejnou denní dobu. Obvykle se podává jedna dávka jednou denně. Pokud je např. chemická látka lokálně dráždící, je možno denní dávku podávat rozdělenou na dvě dávky (dvakrát denně). Maximální objem kapaliny, kterou lze jednorázově podat, závisí na velikosti pokusného zvířete. Objem by se měl udržovat co možná nejnižší a u hlodavců by obvykle neměl přesáhnout 1 ml/100 g tělesné hmotnosti (31). Kolísání objemu zkoušené chemické látky by se mělo omezit nastavením koncentrace tak, aby se zajistil konstantní objem na všech úrovních dávek. Potenciálně žíravé nebo dráždivé chemické látky jsou výjimkou a je nutné je naředit, aby se zamezilo závažným lokálním účinkům. Zkoušky při koncentracích, které by pravděpodobně vedly k poleptání nebo podráždění gastrointestinálního traktu, by se neměly provádět.

Délka studie

34. Období podávání dávky a délka chronické fáze této studie je obvykle 12 měsíců, avšak uspořádání studie umožňuje a lze jej použít rovněž ke kratším (např. 6 nebo 9 měsíců) nebo delším (např. 18 nebo 24 měsíců) studiím, v závislosti na požadavcích konkrétních regulačních rámců nebo k specifickým mechanistickým účelům. Odchylky od doby expozice 12 měsíců by měly být odůvodněny, zejména v případě kratších expozic. Všechny exponované skupiny zařazené do této fáze budou v určenou dobu ukončeny ke zhodnocení chronické toxicity a non-neoplastické patologie. Satelitní skupiny zahrnuté pro monitorování reverzibility toxikologických změn vyvolaných zkoušenou chemickou látkou by se měly udržovat bez podávání látky po dobu ne kratší než 4 týdny a ne delší než jedna třetina celkové délky studie po skončení expozice.

35. Délka fáze karcinogenity této studie bude u hlodavců obvykle 24 měsíců, což představuje většinu normální délky života používaných zvířat. Je možné použít kratší nebo delší dobu trvání studie, v závislosti na délce života kmene zvířecího druhu použitého ve studii, avšak mělo by to být zdůvodněno. U určitých kmenů myší, např. AKR/J, C3H/J nebo C57BL/6J, může být vhodnější délka studie 18 měsíců. Dále jsou uvedeny pokyny ohledně délky a ukončení studie a přežití, další pokyny včetně posouzení přijatelnosti negativní karcinogenity vzhledem k přežití ve studii jsou uvedeny v Pokynech č. 116 (7):

▼M4

— O ukončení studie by se mělo uvažovat v případě, kdy počet přeživších zvířat ve skupinách s nižší dávkou nebo v kontrolní skupině poklesne pod 25 %.

— K ukončení studie by neměla vést situace, kdy v důsledku toxicity předčasně uhynou zvířata pouze ve skupině s vysokou dávkou.

— Přežití každého pohlaví by se mělo posuzovat odděleně.

— Studie by se neměla rozšiřovat do takové míry, kdy údaje ze studie již nestačí k provedení statisticky platného zhodnocení.

POZOROVÁNÍ (FÁZE CHRONICKÉ TOXICITY)

36. Všechna zvířata by se měla kontrolovat s ohledem na morbiditu nebo mortalitu, obvykle na začátku a na konci každého dne, včetně víkendů a svátků. Všeobecné klinické pozorování by se mělo provádět nejméně jednou denně, přednostně ve stejnou dobu (stejné doby) a s uvážením doby očekávaných maximálních účinků po podání látky v případě podání žaludeční sondou.

37. Před první expozicí látce (za účelem intraindividuálního porovnání), na konci prvního týdne studie a dále jednou měsíčně se by se mělo provést důkladné klinické vyšetření všech zvířat. Protokol pozorování by se měl uspořádat tak, aby byly odchylky mezi jednotlivými pozorovateli minimalizovány a byly nezávislé na experimentální skupině. Toto pozorování by se mělo provádět mimo chovnou klec ve standardním pozorovacím prostoru a přednostně pokaždé ve stejnou dobu. Pozorování by se měla pečlivě zaznamenávat, nejlépe za použití systému bodování explicitně definovaného ve zkušební laboratoři. Je třeba se pokusit zajistit, aby byly rozdíly mezi podmínkami pozorování minimální. Vyšetření by mělo mimo jiné zaznamenat změny kůže, srsti, očí a sliznic, výskyt sekretů a exkretů a vegetativní funkce (např. slzení, zježení srsti, velikost zornic, nezvyklé dýchání). Zaznamenávat by se měly také změny chůze, držení těla a reakce na manipulaci, dále přítomnost klonických a tonických pohybů, stereotypů v chování (např. nadměrného čištění nebo opakovaného kroužení) nebo bizarního chování (např. sebepoškozování, chůze pozpátku) (32).

38. Před prvním podáním zkoušené chemické látky by se mělo u všech zvířat provést oftalmologické vyšetření s použitím oftalmoskopu nebo jiného vhodného přístroje. Na konci studie by se toto vyšetření mělo provést nejlépe u všech zvířat, avšak minimálně ve skupinách s vysokou dávkou a kontrolních skupinách. Zjistí-li se změny na očích související s podáním látky, měla by se vyšetřit všechna zvířata. Pokud analýza struktury nebo jiné informace naznačují toxicitu pro oko, měla by se četnost provádění očního vyšetření zvýšit.

39. U chemických látek, kde předchozí 28denní a/nebo 90denní zkoušky toxicity po opakované dávce ukázaly schopnost vyvolat neurotoxické účinky, je možné volitelně vyšetřit senzorickou reaktivitu na různé druhy stimulů (32) (např. sluchové, zrakové a proprioceptivní stimuly) (33), (34), (35), sílu úchopu (36) a motorickou aktivitu (37) před zahájením studie a v tříměsíčních intervalech po začátku studie až do 12 měsíců včetně a rovněž při ukončení studie (je-li delší než 12 měsíců). Další informace o postupech, které lze použít, jsou uvedeny v příslušné literatuře. Místo postupů popsaných v této literatuře však lze použít alternativní postupy.

▼M4

40. U chemických látek, kde předchozí 28denní a/nebo 90denní zkoušky toxicity po opakované dávce ukázaly schopnost vyvolat imunotoxické účinky, je možné na konci studie volitelně provést další vyšetření tohoto cílového parametru.

Tělesná hmotnost, spotřeba krmiva/vody a využitelnost krmiva

41. Všechna zvířata by se měla zvážit na začátku expozice, alespoň jednou týdně během prvních 13 týdnů a poté alespoň jednou měsíčně. Měření spotřeby krmiva a využitelnosti krmiva by se měla provádět alespoň jednou týdně během prvních 13 týdnů a poté alespoň jednou měsíčně. Spotřeba vody by se měla měřit alespoň jednou týdně během prvních 13 týdnů a poté alespoň jednou měsíčně, podává-li se chemická látka v pitné vodě. Měření spotřeby vody by se mělo zvážit také v případě studií, při kterých může dojít ke změně příjmu tekutin.

Hematologická a klinická biochemická vyšetření

42. Ve studiích na hlodavcích by se měla hematologická vyšetření provádět u všech zvířat ve studii (10 samců a 10 samic v každé skupině), 3., 6. a 12. měsíc a rovněž na konci studie (trvá-li déle než 12 měsíců). V případě myší mohou být zapotřebí satelitní zvířata, aby se mohla provést všechna požadovaná hematologická měření (viz odstavec 19). Ve studiích na nehlodavcích se budou vzorky odebírat menšímu počtu zvířat (např. 4 zvířatům od každého pohlaví v každé skupině ve studiích na psech) v průběžných odběrových časech a na konci studie, jak je popsáno u hlodavců. Měření v 3. měsíci jak u hlodavců, tak u nehlodavců, se nemusí provádět, pokud nebyl v předchozí 90denní studii provedené při srovnatelných úrovních dávky pozorován žádný účinek na hematologické parametry. Krevní vzorky by se měly odebírat z určeného místa, například srdeční punkcí nebo z retroorbitálního sinu, v anestezii.

43. Měly by se vyšetřit následující parametry (38): celkový počet leukocytů a diferenciální rozpočet leukocytů, počet erytrocytů, počet trombocytů, koncentrace hemoglobinu, hematokrit (objem erytrocytů), střední objem erytrocytu (MCV), průměrné množství hemoglobinu v erytrocytu (MCH), průměrná koncentrace hemoglobinu v erytrocytu (MCHC), protrombinový čas a aktivovaný parciální tromboplastinový čas. Dle potřeby lze změřit také další hematologické parametry, jako jsou Heinzova tělíska či jiné atypické morfologické formy erytrocytu nebo methemoglobin, v závislosti na toxicitě zkoušené chemické látky. Celkově by se mělo postupovat flexibilně, podle pozorovaného a/nebo očekávaného účinku dané zkoušené chemické látky. Jestliže má zkoušená chemická látka účinek na hematopoetický systém, může být indikováno také vyšetření počtu retikulocytů a cytologie kostní dřeni, přestože se tato vyšetření nemusí provádět rutinně.

44. Klinické biochemické analýzy za účelem vyšetření hlavních toxických účinků na tkáně, a zejména na játra a ledviny, by se měly provést na krevních vzorcích odebraných všem zvířatům ve studii (10 samcům a 10 samicím v každé skupině) ve stejných časových intervalech stanovených pro hematologická vyšetření. U myší mohou být zapotřebí satelitní zvířata, aby se mohla provést všechna požadovaná biochemická vyšetření. Ve studiích na nehlodavcích se budou vzorky odebírat menšímu počtu zvířat (např. 4 zvířatům od každého pohlaví v každé skupině ve studiích na psech)

▼M4

v průběžných odběrových časech a na konci studie, jak je popsáno u hlodavců. Měření v 3. měsíci, jak u hlodavců, tak u nehlodavců, se nemusí provádět, pokud nebyl v předchozí 90denní studii provedené při srovnatelných úrovních dávky pozorován žádný účinek na klinické biochemické parametry. Před odebráním krevních vzorků se doporučuje ponechat zvířata (s výjimkou myší) přes noc nalačno ([1]). Měly by se vyšetřit následující parametry (38): glukóza, močovina (močovinový dusík), kreatinin, celkový protein, albumin, vápník, sodík, draslík, celkový cholesterol, alespoň dva vhodné testy pro hepatocelulární vyšetření (alaninaminotransferáza, aspartátaminotransferáza, glutamátdehydrogenáza, celkové kyseliny žlučové) (39) a alespoň dva vhodné testy pro hepatobiliární vyšetření (alkalická fosfatáza, gamaglutamyltransferáza, 5'-nukleotidáza, celkový bilirubin, celkové kyseliny žlučové) (39). Dle potřeby je možné změřit také další klinické biochemické parametry, např. triglyceridy nalačno, specifické hormony a cholinesterázu, v závislosti na toxicitě zkoušené chemické látky. Celkově je třeba postupovat flexibilně, podle pozorovaného a/nebo očekávaného účinku dané zkoušené chemické látky.

45. Rozbor moči by se měl provést u všech zvířat ve studii (10 samců a 10 samic v každé skupině) s použitím vzorků odebraných ve stejných intervalech jako u hematologických a klinických biochemických vyšetření. Měření v 3. měsíci se nemusí provádět, pokud nebyl v předchozí 90denní studii provedené při srovnatelných úrovních dávky pozorován žádný účinek na složení moči. Odborné doporučení pro klinické patologické studie zahrnovalo následující parametry (38): vzhled, objem, osmolalita nebo specifická hmotnost, pH, celkový protein a glukóza. Další stanovení zahrnují ketony, urobilinogen, bilirubin, a okultní krev. Zkoumání pozorovaného účinku (pozorovaných účinků) lze v případě potřeby rozšířit o další parametry.

46. Obecně se má za to, že ve studiích na psech je třeba před expozicí změřit výchozí hematologické a klinické biochemické parametry, avšak ve studiích na hlodavcích se stanovovat nemusí (38). Pokud jsou však historické výchozí údaje (viz odstavec 58) nedostatečné, je třeba zvážit získání těchto údajů.

PATOLOGIE

Pitva

47. U všech zvířat zařazených do studie se obvykle provede celková podrobná pitva, zahrnující pečlivé vyšetření vnějšího povrchu těla, všech otvorů a lebeční, hrudní a břišní dutiny a jejich obsahu. Nicméně je také možno zajistit (ve skupině pro předběžná utracení nebo v satelitní skupině), aby se měření omezila na konkrétní klíčové parametry, jako je neurotoxicita či imunotoxicita (viz odstavec 21). Tato zvířata se nemusí pitvat ani se u nich neprovádí postupy popsané v následujících odstavcích. U ověřovacích zvířat může být třeba provést pitvu v jednotlivých případech a dle uvážení vedoucího studie.

([1]) Pro řadu stanovení v séru a plazmě, zejména pro glukózu, je vhodné ponechat zvířata nalačno přes noc. Hlavním důvodem je, že u nehladovějících zvířat je vyšší variabilita výsledků, která by mohla maskovat jemné změny a ztížit interpretaci. Je však nutno upozornit, že hladovění přes noc může mít vliv na celkový metabolismus zvířat a může narušit každodenní expozici zkoušené chemické látce, zejména ve studiích s podáváním látky v krmivu. Všechna zvířata by se měla vyšetřovat ve stejném fyziologickém stavu, a proto by se měla podrobná nebo neurologická vyšetření raději naplánovat na jiný den než odběr vzorků pro klinická biochemická vyšetření.

▼**M4**

48. U všech zvířat, kromě zvířat vyloučených v druhé části odstavce 47 by se měly zvážit orgány. Nadledvinky, mozek, nadvarlata, srdce, ledviny, játra, vaječníky, slezina, varlata, štítná žláza (vážená po fixaci, s příštítnými tělísky) a děloha všech zvířat (kromě zvířat nalezených umírajících a/nebo zvířat utracených v průběhu zkoušky) by se měly zbavit všech přirostlých tkání a co nejdříve po vyjmutí ve vlhkém stavu zvážit, aby nedošlo k vyschnutí.

49. Následující tkáně by se měly konzervovat v nejvhodnějším fixačním médiu s ohledem na typ tkáně a plánovaná následná histopatologická vyšetření (40) (tkáně v hranatých závorkách jsou volitelné):

všechny makroskopicky viditelné léze	srdce	slinivka břišní	žaludek (předžaludek, žláznatý žaludek)
nadledvinka	*ileum*	příštítná tělíska	[zuby]
aorta	*jejunum*	periferní nerv	varlata
mozek (zahrnující řezy mozkových hemisfér, mozečku a prodloužené míchy/Varolova mostu)	ledviny	hypofýza	brzlík
slepé střevo	slzní žláza (extraorbitální)	prostata	štítná žláza
cervix	játra	*rektum*	[jazyk]
koagulační žláza	plíce	slinná žláza	průdušnice
tlusté střevo	lymfatické uzliny (povrchové i hluboké)	semenný váček	močový měchýř
dvanáctník	prsní žláza (povinné u samic a, je-li očividně možné ji vypreparovat, i u samců)	kosterní sval	děloha (včetně hrdla děložního)
nadvarle	[horní cesty dýchací, včetně nosu, nosních skořep a vedlejších dutin nosních]	kůže	[močovod]
oko (včetně sítnice)	jícen	mícha (ve třech úrovních: krční, střední hrudní a bederní)	[močová trubice]
[*femur* s kloubem]	[*Bulbus olfactorius*]	slezina	pochva
žlučník (u jiných druhů než potkan)	vaječníky	[sternum],	řez kostní dření a/nebo čerstvý aspirát kostní dřeni
Harderova žláza			

▼M4

V případě párových orgánů, např. ledvin, nadledvinek, by se měly uchovávat oba orgány. Na základě klinických nebo jiných nálezů může být nezbytné zkoumat i další tkáně. Také by se měly uchovat všechny orgány považované na základě známých vlastností zkoušené chemické látky za možné cílové orgány. Ve studiích s dermální cestou podání by se měl vyšetřit stejný seznam orgánů, jako byl stanovený pro orální cestu, a navíc je nezbytné odebrat a konzervovat vzorky kůže z místa aplikace. V inhalačních studiích by se měl seznam tkání z dýchacích cest určených ke konzervaci a vyšetření, řídit doporučeními v kapitole B.8 této přílohy (9) a kapitole B.29 této přílohy (10). Co se týká ostatních orgánů/tkání (kromě specificky konzervovaných tkání z dýchacích cest) by se měly vyšetřit orgány uvedené na seznamu orgánů určeném pro orální cestu.

Histopatologické vyšetření

50. Jsou k dispozici pokyny ohledně osvědčených postupů při provádění toxikologických patologických studií (40). Histopatologická vyšetření by měla minimálně zahrnovat:

— všechny tkáně ve skupinách s vysokou dávkou zkoušené chemické látky a kontrolních skupinách,

— všechny tkáně ze zvířat uhynulých nebo utracených během studie,

— všechny tkáně vykazující makroskopické abnormality,

— cílové tkáně nebo tkáně, které vykazují změny v souvislosti s expozicí ve skupině s vysokou dávkou, u všech zvířat ve všech ostatních experimentálních skupinách,

— v případě párových orgánů, např. ledvin, nadledvinek, by se měly vyšetřit oba orgány.

POZOROVÁNÍ (FÁZE KARCINOGENITY)

51. Všechna zvířata by se měla kontrolovat s ohledem na morbiditu nebo mortalitu, obvykle na začátku a na konci každého dne, včetně víkendů a svátků. Zvířata by se měla navíc jednou denně kontrolovat s ohledem na specifické příznaky, které mají toxikologický význam. V případě studií s podáváním látky žaludeční sondou by se měla zvířata kontrolovat v době těsně po podání dávky. Zvláštní pozornost je třeba věnovat rozvoji nádorů a měla by se zaznamenat doba objevení se nádoru, umístění, rozměry, vzhled a progrese každého viditelného nebo hmatného tumoru.

52. Všechna zvířata by se měla zvážit na začátku expozice, alespoň jednou týdně během prvních 13 týdnů a poté alespoň jednou měsíčně. Měření spotřeby krmiva a využitelnosti krmiva by se měla provádět alespoň jednou týdně během prvních 13 týdnů a poté alespoň jednou měsíčně. Spotřeba vody by se měla měřit alespoň jednou týdně během prvních 13 týdnů a poté alespoň jednou měsíčně, podává-li se chemická látka v pitné vodě. Měření spotřeby vody by se mělo zvážit také v případě studií, při kterých může dojít ke změně příjmu tekutin.

▼M4

Hematologická, klinická biochemická vyšetření a další měření

53. Aby se ze studie získalo co nejvíce informací, zejména pro úvahy o způsobu účinku, je možné odebrat vzorky krve pro hematologická a klinická biochemická vyšetření, přestože to závisí na uvážení vedoucího studie. Rovněž může být vhodné provést rozbor moči. Údaje o zvířatech použitých ve fázi chronické toxicity studie, která obvykle trvá 12 měsíců (odstavec 34), poskytnou informace o těchto parametrech. Další pokyny o hodnotě odběru těchto vzorků v rámci studie karcinogenity jsou uvedeny v Pokynech č. 116 (7). Jestliže se odebírají vzorky krve, měly by se odebrat na konci zkušebního období těsně před utracením zvířat nebo v jeho průběhu. Měly by se odebírat z určeného místa, například srdeční punkcí nebo z retroorbitálního sinu, v anestezii. Také je možné připravit k vyšetření krevní nátěry, zejména pokud se zdá, že je cílovým orgánem kostní dřeň, přestože hodnota takového vyšetření krevních nátěrů k zhodnocení karcinogenního/onkogenního potenciálu ve fázi studie zkoumající karcinogenitu byla zpochybňována (38).

PATOLOGIE

Pitva

54. U všech zvířat zařazených do studie, kromě ověřovacích zvířat a ostatních satelitních zvířat (viz odstavec 20), se provede celková, podrobná pitva, zahrnující pečlivé vyšetření vnějšího povrchu těla, všech otvorů a lebeční, hrudní a břišní dutiny a jejich obsahu. U ověřovacích a ostatních satelitních zvířat může být třeba provést pitvu v jednotlivých případech a dle uvážení vedoucího studie. Měření hmotnosti orgánů obvykle nebývá součástí studie karcinogeneze, neboť geriatrické změny a, v pozdějších stádiích, rozvoj nádorů maří použitelnost údajů o hmotnosti orgánů. Mohou však být velmi důležité pro hodnocení průkaznosti důkazů a zejména pro úvahy o způsobu účinku. Jsou-li součástí satelitní studie, měly by se získat nejpozději jeden rok po zahájení studie.

55. Následující tkáně by se měly konzervovat v nejvhodnějším fixačním médiu s ohledem na typ tkáně a plánovaná následná histopatologická vyšetření (40) (tkáně v hranatých závorkách jsou volitelné):

všechny makroskopicky viditelné léze	srdce	slinivka břišní	žaludek (předžaludek, žláznatý žaludek)
nadledvinka	*ileum*	příštítná tělíska	[zuby]
aorta	*jejunum*	periferní nerv	varlata
mozek (zahrnující řezy mozkových hemisfér, mozečku a prodloužené míchy/Varolova mostu)	ledviny	hypofýza	brzlík
slepé střevo	slzní žláza (extraorbitální)	prostata	štítná žláza
cervix	játra	*rektum*	[jazyk]
koagulační žláza	plíce	slinná žláza	průdušnice
tlusté střevo	lymfatické uzliny (povrchové i hluboké)	semenný váček	močový měchýř

▼M4

dvanáctník	prsní žláza (povinné u samic a, je-li očividně možné ji vypreparovat, i u samců)	kosterní sval	děloha (včetně hrdla děložního)
nadvarle	[horní cesty dýchací, včetně nosu, nosních skořep a vedlejších dutin nosních]	kůže	[močovod]
oko (včetně sítnice)	jícen	mícha (ve třech úrovních: krční, střední hrudní a bederní)	[močová trubice]
[*femur* s kloubem]	[*Bulbus olfactorius*]	slezina	pochva
žlučník (u jiných druhů než potkan)	vaječníky	[*sternum*],	řez kostní dření a/nebo čerstvý aspirát kostní dřeni
Harderova žláza			

V případě párových orgánů, např. ledvin, nadledvinek, by se měly uchovávat oba orgány. Na základě klinických nebo jiných nálezů může být nezbytné zkoumat i další tkáně. Také by se měly uchovat všechny orgány považované na základě známých vlastností zkoušené chemické látky za možné cílové orgány. Ve studiích s dermální cestou podání by se měl vyšetřit stejný seznam orgánů, jako byl stanovený pro orální cestu, a navíc je nezbytné odebrat a konzervovat vzorky kůže z místa aplikace. V inhalačních studiích by se měl seznam tkání z dýchacích cest určených ke konzervaci a vyšetření, řídit doporučeními v kapitole B.8 této přílohy (8) a kapitole B.29 této přílohy (9). Co se týká ostatních orgánů/tkání (kromě specificky konzervovaných tkání z dýchacích cest) by se měly vyšetřit orgány uvedené na seznamu orgánů určeném pro orální cestu.

Histopatologické vyšetření

56. Jsou k dispozici pokyny ohledně osvědčených postupů při provádění toxikologických patologických studií (40). Měly by se vyšetřit minimálně tyto tkáně:

— všechny tkáně ve skupinách s vysokou dávkou zkoušené chemické látky a kontrolních skupinách,

— všechny tkáně zvířat uhynulých nebo utracených během studie,

— všechny tkáně vykazující makroskopické abnormality včetně nádorů,

— pokud jsou ve skupině s vysokou dávkou pozorovány histopatologické změny související s expozicí, měly by se stejné tkáně vyšetřit u všech zvířat ve všech ostatních exponovaných skupinách,

— v případě párových orgánů, např. ledvin, nadledvinek, by se měly vyšetřit oba orgány.

▼**M4**

ÚDAJE A JEJICH PŘEDKLÁDÁNÍ (KARCINOGENITA A CHRONICKÁ TOXICITA)

Údaje

57. Měly by se uvést údaje o všech hodnocených parametrech u každého jednotlivého zvířete. Kromě toho by se měly všechny údaje shrnout do tabulky, přičemž se uvede u každé experimentální skupiny počet zvířat na začátku zkoušky, počet zvířat nalezených uhynulých v průběhu zkoušky nebo utracených z humánních důvodů a doba úmrtí nebo humánního utracení, počet zvířat vykazujících příznaky toxicity, popis příznaků toxicity, včetně doby nástupu, trvání a závažnosti každého toxického účinku, počet zvířat vykazujících léze, typ lézí a procento zvířat vykazujících každý typ léze. Tabulky se souhrnnými údaji by měly uvádět průměrné hodnoty a směrodatné odchylky (u spojitých dat ze zkoušky) u zvířat vykazujících toxické účinky nebo léze a také klasifikaci lézí.

58. Pro interpretaci výsledků studie mohou být cenná historická kontrolní data, např. v případě, kdy existují známky toho, že souběžné kontroly se značně vymykají ve srovnání s posledními údaji získanými u kontrolních zvířat ze stejného zkušebního zařízení/kolonie. Historická kontrolní data, pokud se hodnotí, by měla být ze stejné laboratoře a měla by pocházet od zvířat stejného věku a ze stejného kmene během pěti let předcházejících příslušné studii.

59. Číselné výsledky by měly být pokud možno vyhodnoceny vhodnou a obecně uznávanou statistickou metodou. Statistické metody a data, která se mají analyzovat, by se měly zvolit již při plánování studie (odstavec 9). Tento výběr by měl zahrnovat rezervu pro případné úpravy v závislosti na přežití.

60. Protokol o zkoušce by měl obsahovat tyto údaje:

Zkoušená chemická látka:

— fyzikální povaha, čistota a fyzikálně-chemické vlastnosti,

— identifikační údaje,

— zdroj chemické látky,

— číslo šarže,

— certifikát o chemické analýze.

Nosič (je-li použit):

— zdůvodnění výběru nosiče, (pokud není použita voda).

Pokusná zvířata:

— použité druhy/kmen a zdůvodnění výběru,

— počet, věk, a pohlaví zvířat na začátku zkoušky,

— zdroj, podmínky chovu, strava atd.,

— individuální hmotnosti zvířat na začátku zkoušky.

▼**M4**

Zkušební podmínky:

— zdůvodnění způsobu podávání a výběru dávky,

— případně statistické metody použité k analýze dat,

— podrobnosti o použité formě zkoušené chemické látky/úpravě krmiva,

— analytické údaje o dosažené koncentraci, stabilitě a homogenitě přípravku,

— cesta podání a podrobné údaje o podávání zkoušené chemické látky,

— u inhalačních studií informace o tom, zda byla expozice pouze nazální cestou, nebo celotělová,

— skutečné dávky (mg/kg tělesné hmotnosti/den) a případně koeficient přepočtu koncentrace zkoušené chemické látky v krmivu/pitné vodě (mg/kg nebo ppm) na skutečnou dávku (mg/kg tělesné hmotnosti/den),

— podrobné údaje o kvalitě stravy a vody.

Výsledky (měly by se předložit souhrnné tabulky údajů a údaje pro jednotlivá zvířata):

Obecné

— údaje o přežití,

— tělesná hmotnost/změny tělesné hmotnosti,

— spotřeba krmiva, výpočty využitelnosti krmiva, pokud byly provedeny a případně spotřeba vody,

— toxikokinetické údaje, jsou-li k dispozici,

— oftalmoskopické vyšetření (je-li k dispozici),

— hematologická vyšetření (jsou-li k dispozici),

— klinická biochemická vyšetření (jsou-li k dispozici).

Klinické nálezy

— známky toxicity,

— incidence (plus závažnost, je-li hodnocena) jakékoli abnormality,

— povaha, závažnost a trvání pozorovaných klinických příznaků (zda byly přechodné, nebo trvalé).

Pitevní údaje

— konečná tělesná hmotnost,

— hmotnosti orgánů a jejich poměry, pokud se stanovují,

— pitevní nálezy; incidence a závažnost abnormalit.

Histopatologické vyšetření

— histopatologické nálezy, které nejsou neoplastické,

— neoplastické histopatologické nálezy,

▼M4

— vzájemný vztah mezi makroskopickými a mikroskopickými nálezy,

— podrobný popis všech histopatologických nálezů souvisejících s expozicí, včetně klasifikace závažnosti,

— zprávy o všech odborných revizích vzorků.

Statistické zpracování výsledků dle potřeby

Diskuse o výsledcích zahrnující:

— diskuse o jakýchkoli modelovacích přístupech,

— vztahy mezi dávkou a odezvou,

— historické kontrolní údaje,

— posouzení jakýchkoli informací o způsobu účinku,

— stanovení BMD, NOAEL nebo LOAEL,

— význam pro člověka.

Závěry

LITERATURA:

1) OECD (1995). Report of the Consultation Meeting on Sub-chronic and Chronic Toxicity/Carcinogenicity Testing (Rome, 1995), internal working document, Environment Directorate, OECD, Paris.

2) EPA (2005). Guidelines for Carcinogen Risk Assessment Risk Assessment Forum U.S. Environmental Protection Agency Washington, DC.

3) Combes RD, Gaunt I, Balls M (2004). A Scientific and Animal Welfare Assessment of the OECD Health Effects Test Guidelines for the Safety Testing of Chemicals under the European Union REACH System. ATLA 32: 163-208

4) Barlow SM, Greig JB, Bridges JW et al (2002). Hazard identification by methods of animal-based toxicology. Food. Chem. Toxicol. 40: 145-191

5) Chhabra RS, Bucher JR, Wolfe M, Portier C (2003). Toxicity characterization of environmental chemicals by the US National Toxicology Programme: an overview. Int. J. Hyg. Environ. Health 206: 437-445

6) Kapitola B.27 této přílohy, Zkouška subchronické orální toxicity studie orální toxicity na nehlodavcích (90denní opakovaná aplikace).

7) OECD (2012). Guidance Document on the Design and Conduct of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Supporting Test Guidelines 451, 452 and 453 - Second edition. Series on Testing and Assessment No. 116, dostupné na veřejných webových stránkách OECD pro pokyny ke zkoušení na adrese www.oecd.org/env/testguidelines.

8) OECD (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing. Series on Testing and Assessment No. 39, ENV/JM/MONO(2009)28, OECD, Paris.

9) Kapitola B.8 této přílohy, Subakutní inhalační toxicita: 28denní studie.

10) Kapitola B.29 této přílohy, Subchronická inhalační toxicita: 90denní studie.

11) Kapitola B.9 této přílohy, Dermální toxicita (28denní opakovaná aplikace).

▼**M4**

12) Boobis AR, Cohen SM, Dellarco V, McGregor D, Meek ME, Vickers C, Willcocks D, Farland W (2006). IPCS Framework for analyzing the Relevance of a Cancer Mode of Action for Humans. Crit. Rev. in Toxicol, 36:793-801.

13) Cohen SM, Meek ME, Klaunig JE, Patton DE, Fenner-Crisp PA (2003). The human relevance of information on carcinogenic Modes of Action: An Overview. Crit. Rev. Toxicol. 33:581-589.

14) Holsapple MP, Pitot HC, Cohen SN, Boobis AR, Klaunig JE, Pastoor T, Dellarco VL, Dragan YP (2006). Mode of Action in Relevance of Rodent Liver Tumors to Human Cancer Risk. Toxicol. Sci. 89:51-56.

15) Meek EM, Bucher JR, Cohen SM, Dellarco V, Hill RN, Lehman-McKemmon LD, Longfellow DG, Pastoor T, Seed J, Patton DE (2003). A Framework for Human Relevance analysis of Information on Carcinogenic Modes of Action. Crit. Rev. Toxicol. 33:591-653.

16) Carmichael NG, Barton HA, Boobis AR *et al.* (2006). Agricultural Chemical Safety Assessment: A Multisector Approach to the Modernization of Human Safety Requirements. Crit. Rev. Toxicol. 36, 1-7.

17) Barton HA, Pastoor TP, Baetcke T *et al.* (2006). The Acquisition and Application of Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion (ADME) Data in Agricultural Chemical Safety Assessments. Crit. Rev. Toxicol. 36: 9-35.

18) Doe JE, Boobis AR, Blacker A *et al*. (2006). A Tiered Approach to Systemic Toxicity Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. Crit. Rev. Toxicol. 36: 37-68.

19) Cooper RL, Lamb JS, Barlow SM *et al.* (2006). A Tiered Approach to Life Stages Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. Crit. Rev. Toxicol. 36: 69-98.

20) OECD (2002). Guidance Notes for Analysis and Evaluation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Series on Testing and Assessment No. 35 and Series on Pesticides No. 14, ENV/JM/MONO(2002)19, OECD, Paris.

21) OECD (2000). Guidance Document on the recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation, Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris.

22) Rhomberg LR, Baetcke K, Blancato J, Bus J, Cohen S, Conolly R, Dixit R, Doe J, Ekelman K, Fenner-Crisp P, Harvey P, Hattis D, Jacobs A, Jacobson-Kram D, Lewandowski T, Liteplo R, Pelkonen O, Rice J, Somers D, Turturro A, West W, Olin S (2007). Issues in the Design and Interpretation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies in Rodents: Approaches to Dose Selection Crit Rev. Toxicol. 37 (9): 729 - 837.

23) ILSI (International Life Sciences Institute) (1997). Principles for the Selection of Doses in Chronic Rodent Bioassays. Foran JA (Ed.). ILSI Press, Washington, DC.

24) Griffiths SA, Parkinson C, McAuslane JAN and Lumley CE (1994). The utility of the second rodent species in the carcinogenicity testing of pharmaceuticals. The Toxicologist 14(1):214.

25) Usui T, Griffiths SA and Lumley CE (1996). The utility of the mouse for the assessment of the carcinogenic potential of pharmaceuticals. In D'Arcy POF & Harron DWG (eds). Proceedings of the Third International Conference on Harmonisation. Queen's University Press, Belfast. pp 279-284.

26) Carmichael NG, Enzmann H, Pate I, Waechter F (1997). The Significance of Mouse Liver Tumor Formation for Carcinogenic Risk Assessment: Results and Conclusions from a Survey of Ten Years of Testing by the Agrochemical Industry. Environ Health Perspect 105:1196-1203.

▼**M4**

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

28) National Research Council, 1985. Guide for the care and use of laboratory animals. NIH Publication No. 86-23. Washington D.C., US. Dept. of Health and Human Services.

29) GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, December, 1989). Publication on the Planning and Structure of Animal Facilities for Institutes Performing Animal Experiments. ISBN 3-906255-06-9.

30) GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, 2006). Microbiological monitoring of laboratory animals in various housing systems.

31) Diehl K-H, Hull R, Morton D, Pfister R, Rabemampianina Y, Smith D, Vidal J-M, van de Vorstenbosch C. (2001). A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. Journal of Applied Toxicology 21:15-23.

32) IPCS (1986). Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals. Environmental Health Criteria Document No. 60.

33) Tupper DE, Wallace RB (1980). Utility of the Neurologic Examination in Rats. Acta Neurobiol. Exp. 40: 999-1003.

34) Gad SC (1982). A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. J. Toxicol.Environ. Health 9: 691-704.

35) Moser VC, McDaniel KM, Phillips PM (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of Amitraz. Toxicol. Appl. Pharmacol. 108: 267-283.

36) Meyer OA, Tilson HA, Byrd WC, Riley MT (1979). A Method for the RoutineAssessment of Fore- and Hind-limb Grip Strength of Rats and Mice. Neurobehav. Toxicol. 1: 233-236.

37) Crofton KM, Howard JL, Moser VC, Gill MW, Reiter LW, Tilson HA, MacPhail RC (1991). Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. Neurotoxicol. Teratol. 13: 599-609.

38) Weingand K, Brown G, Hall R *et al*. (1996). Harmonisation of Animal Clinical Pathology Testing in Toxicity and Safety Studies. Fundam. & Appl. Toxicol. 29: 198-201.

39) (Návrh) dokumentu agentury EMEA „Non-clinical guideline on drug-induced hepatotoxicity“ (Doc. Ref. EMEA/CHMP/SWP/a50115/2006).

40) Crissman JW, Goodman DG, Hildebrandt PK *et al.* (2004). Best Practices Guideline: Toxicological Histopathology. Toxicologic Pathology 32: 126-131.

▼**M4**

Dodatek 1

DEFINICE

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

▼B

B.34 **JEDNOGENERAČNÍ ZKOUŠKA TOXICITY PRO REPRODUKCI**

1. **METODA**

1.1 ÚVOD

Viz obecný úvod, část B.

1.2 DEFINICE

Viz obecný úvod, část B.

1.3 REFERENČNÍ LÁTKY

Žádné.

1.4 PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

Zkoušená látka se podává několika skupinám samic a samců v odstupňovaných dávkách. Samcům se podává zkoušená látka v době růstu a v průběhu alespoň jednoho úplného spermatogenního cyklu (přibližně 56 dnů u myši a 70 dnů u potkana), aby byl zachycen jakýkoli nepříznivý účinek zkoušené látky na spermatogenezi.

Samicím rodičovské generace (P) se podává látka po dobu alespoň dvou estrálních cyklů, aby byl zachycen jakýkoli nepříznivý účinek zkoušené látky na strus. Zvířata jsou poté připuštěna. V době připuštění se zkušební látka podává zvířatům obou pohlaví, v době březosti a laktace pouze samicím. Pro inhalační aplikaci je třeba metodu modifikovat.

1.5 KRITÉRIA JAKOSTI

Nejsou stanovena.

1.6 POPIS ZKUŠEBNÍ METODY

1.6.1 *Příprava*

Před zkouškou se provede náhodný výběr zdravých mladých dospělých zvířat, která se přiřadí do experimentálních a kontrolních skupin. Nejméně pět dní před zkouškou jsou zvířata chována v podmínkách chovu a krmení, v jakých budou během experimentu. Doporučuje se podávat zkoušenou látku v potravě nebo v pitné vodě. Jiné způsoby podání jsou také přijatelné. Všem zvířatům se zkoušená látka podává po celou dobu zkoušky stejnou metodou. Používá-li se pro usnadnění aplikace vehikulum nebo jiná přísada, musí být o nich známo, že nemají toxické účinky.

▼B

Látka se podává sedm dní v týdnu.

1.6.2 Pokusná zvířata

Výběr druhu

Upřednostňovanými druhy jsou potkan nebo myš. Používají se zdravá zvířata, dosud nepoužitá pro jiné experimenty. Používaný kmen by neměl mít nízkou plodnost. Pokusná zvířata musí být plně charakterizována co do druhu, kmene, pohlaví, hmotnosti a/nebo věku.

Plodnost musí být ověřena vhodným způsobem u obou pohlaví. Zvířata v experimentální i kontrolní skupině musí být odstavena před zahájením aplikace.

Počet a pohlaví

Každá experimentální i kontrolní skupina by měla obsahovat dostatečný počet zvířat, aby bylo možné získat minimálně 20 březích samic s přibližně stejným termínem vrhu.

Cílem je získat dostatečný počet březích samic a dostatečné potomstvo, a tím zajistit spolehlivé hodnocení vlivu látky na plodnost, průběh březosti a mateřské chování v generaci P a laktaci, růst a vývoj potomstva generace F_1 od početí do odstavení.

1.6.3 Zkušební podmínky

Vodu a potravu dostávají zvířata *ad libitum*. Před vrhem se březí samice přemístí do oddělených vrhních nebo mateřských klecí a je jim poskytnut materiál pro vytvoření hnízda.

1.6.3.1 Úrovně dávek

Použijí se alespoň tři exponované skupiny a jedna kontrolní. Používá-li se pro usnadnění aplikace zkoušené látky vehikulum, podává se kontrolní skupině v nejvyšším použitém objemu. Snižuje-li zkoušená látka příjem a využití potravy, může být nezbytné použít párově krmenou kontrolní skupinu. Pokud to dovolují fyzikálně-chemické vlastnosti nebo biologické účinky zkoušené látky, má nejvyšší dávka v ideálním případě vyvolávat toxicitu, avšak nikoli uhynutí v rodičovské populaci zvířat (P). Střední dávka (dávky) by měla vyvolávat minimální toxické účinky, které by mohly být připisovány zkoušené látce, a nejnižší dávka by neměla vyvolávat žádné pozorovatelné nepříznivé účinky ani u rodičů ani u potomstva. Při podání sondou nebo v kapslích se dávka stanoví individuálně na základě hmotnosti zvířete a každý týden se přizpůsobuje podle změny hmotnosti. U březích samic mohou být dávky popřípadě určeny na základě tělesné hmotnosti v 0. nebo 6. dni březosti.

1.6.3.2 Limitní zkouška

Pokud látka o nízké toxicitě neposkytne při úrovni dávky 1 000 mg/kg žádné důkazy o vlivu na reprodukční schopnost, není zkoušení při dalších úrovních dávky potřebné. Pokud předběžná studie prokáže, že vysoká dávka vyvolávající u matek jasné příznaky toxicity nemá nepříznivé účinky na plodnost, není zkoušení při dalších úrovních dávky potřebné.

▼B

1.6.3.3 *Provedení zkoušky*

Plán pokusu

Denní podávání samcům rodičovské generace (P) se zahájí ve věku pěti až devíti týdnů po nejméně pětidenní aklimatizaci po odstavení. U potkana se v podávání pokračuje po 10 týdnů do období připouštění (u myši osm týdnů). Samci se buď utratí a vyšetří na konci období připouštění, nebo se pokračuje v podávání a samci mohou být použiti pro produkci druhého vrhu a utratí se a vyšetří ještě před koncem studie. U samic rodičovské generace (P) se podávání zahájí po nejméně pětidenní aklimatizaci a pokračuje se v něm alespoň do doby dvou týdnů před obdobím připouštění. V denním podávání se poté pokračuje po celé tři týdny období připouštění, v době březosti a poté až do odstavení generace F_1. Může být nezbytné změnit plán dávkování podle dostupných znalostí o vlastnostech zkoušené látky, např. o indukci metabolismu a/nebo bioakumulaci.

Postup při připouštění

Ve studiích toxicity pro reprodukci je možné použít párování 1:1 (jeden samec a jedna samice) anebo 1:2 (jeden samec a dvě samice).

V případě párování 1:1 se samice ponechá s týmž samcem do zabřeznutí nebo po dobu tří týdnů. Každé ráno se samice vyšetří na přítomnost spermatu nebo vaginální zátky. Dnem 0 březosti je den, kdy je pozorována vaginální zátka a/nebo spermie.

Páry, u kterých nedojde k oplodnění, se vyšetří s cílem zjistit důvod neplodnosti.

Tento postup může zahrnovat umožnění další příležitosti k oplodnění se zvířetem s osvědčenou plodností, mikroskopické vyšetření reprodukčních orgánů anebo vyšetření estrálního cyklu a spermatogeneze.

Velikost vrhů

Zvířatům exponovaným ve studii fertility se ponechá možnost vrhit normálně a pečovat o své potomstvo do okamžiku odstavení bez standardizace velikosti vrhů.

Při standardizaci vrhů se doporučuje následující postup. Mezi 1. a 4. dnem po vrhu se velikost všech vrhů upraví vyřazením nadbytečných jedinců tak, aby bylo pokud možno dosaženo počtu 4 samců a 4 samic na vrh.

Pokud počet mladých samců nebo samic neumožňuje ponechat čtyři z každého pohlaví, je možné se tomu částečně přizpůsobit (např. ponechat pět samců a tři samice). Vrhy s méně než osmi potomky nelze standardizovat.

▼B

1.6.4 Pozorování

Po dobu zkoušky se každé zvíře pozoruje alespoň jednou denně. Zaznamenávají se významné změny chování, příznaky ztíženého nebo prodlouženého vrhu a všechny příznaky toxicity, včetně mortality. Před obdobím připouštění i během něho se denně měří příjem potravy. Po vrhu a v průběhu laktace se měří příjem potravy (a vody, pokud se látka podává v pitné vodě) ve stejný den, kdy se váží potomstvo. Samci a samice rodičovské generace (P) se váží první den podávání a poté týdně. Všechna pozorování se zaznamenávají individuálně pro každé dospělé zvíře.

Doba gestace se počítá ode dne 0 březosti. Každý vrh se co nejdříve po vrhu vyšetří a stanoví se počty a pohlaví mláďat, počet mrtvě a živě narozených mláďat a přítomnost nápadných anomálií.

Mrtvá mláďata a mláďata utracená ve 4. dnu se uchovají pro vyšetření na možné defekty. Živá mláďata se spočítají a celé vrhy se zváží ráno po vrhu, ve 4. a 7. dnu a poté každý týden do ukončení studie, kdy se zvířata zváží jednotlivě.

Zaznamenávají se všechny pozorované abnormality v chování a fyzickém stavu matek nebo potomstva.

1.6.5 Patologie

1.6.5.1 Pitva

Po utracení nebo úmrtí během studie se všechna zvířata generace P makroskopicky vyšetří na strukturní abnormality anebo patologické změny, přičemž se zvláštní pozornost věnuje orgánům reprodukčního systému. Uhynulá mláďata nebo mláďata v agónii se vyšetří na defekty.

1.6.5.2 Histopatologická vyšetření

Vaječníky, děloha, děložní hrdlo, vagina, varlata, epididymis, semenné váčky, prostata, koagulační žláza, hypofysa a cílový orgán (cílové orgány) všech zvířat generace P se uchovají pro mikroskopické vyšetření. V případě, že tyto orgány dosud nebyly vyšetřeny v jiných studiích s více dávkami, provede se podle možnosti mikroskopické vyšetření u všech zvířat ze skupiny s nejvyšší dávkou a u kontrolní skupiny a dále u zvířat, která uhynula v průběhu studie.

Orgány, které u těchto skupin zvířat vykazovaly abnormality, se vyšetří i u zvířat generace P ostatních dávkových skupin. V těchto případech se mikroskopicky vyšetří všechny tkáně vykazující makroskopické změny. Jak již bylo doporučeno v oddíle o připouštění, mohou být reprodukční orgány zvířat podezřelých z neplodnosti podrobeny mikroskopické analýze.

▼B

2. **ÚDAJE**

Údaje se shrnou do tabulky, přičemž se u každé experimentální skupiny uvede počet zvířat na začátku zkoušky, počet plodných samců, počet březích samic, typ změn a procento zvířat vykazujících jednotlivé typy změn.

Podle možnosti se numerické výsledky vyhodnotí vhodnou statistickou metodou. Může být použita jakákoli všeobecně uznávaná statistická metoda.

3. **ZPRÁVY**

3.1 PROTOKOL O ZKOUŠCE

Protokol o zkoušce musí pokud možno obsahovat tyto informace:

— druh/kmen použitých zvířat,

— údaje o toxických reakcích podle pohlaví a dávky, včetně ukazatelů plodnosti, gestace a životaschopnosti,

— doba uhynutí během studie, nebo zda zvířata přežila do plánovaného utracení nebo do konce studie,

— tabulka s údaji o hmotnosti každého vrhu, průměrné hmotnosti mláďat a individuální hmotnosti potomků při ukončení studie,

— toxické a další účinky pro reprodukci, potomstvo a postnatální růst,

— den, kdy byly pozorovány jednotlivé abnormální příznaky, a jejich další vývoj,

— údaje o tělesné hmotnosti zvířat generace P,

— pitevní nálezy,

— podrobný popis všech histopatologických nálezů,

— statistické vyhodnocení výsledků, kde je to možné,

— diskuse o výsledcích,

— interpretace výsledků.

3.2 HODNOCENÍ A INTERPRETACE

Viz obecný úvod, část B.

4. **LITERATURA**

Viz obecný úvod, část B.

▼B

B.35 **DVOUGENERAČNÍ STUDIE REPRODUKČNÍ TOXICITY**

1. **METODA**

Tato metoda je replikou metody OECD TG 416 (2001).

1.1 ÚVOD

Tato metoda zkoušení dvougenerační reprodukce je určena k získání všeobecných informací týkajících se účinků zkoušené látky na integritu a výkonnost samčí a samičí rozmnožovací soustavy, včetně funkcí pohlavních žláz, estrálního cyklu, způsobu chování při páření, plození, gestaci, vrhu, laktaci, odstavení, růstu a vývoje potomstva. Studie může rovněž poskytnout informace o účinku zkoušené látky na neonatální nemocnost a úmrtnost a předběžné informace o prenatální a postnatální vývojové toxicitě a může sloužit jako návod pro další zkoušky. Mimo zkoumání růstu a vývoje generace F_1 je tato zkušební metoda určena rovněž k hodnocení integrity a výkonnosti samčí a samičí rozmnožovací soustavy a rovněž růstu a vývoje generace F_2. S cílem získat další informace o vývojové toxicitě a funkčních poruchách lze do tohoto protokolu začlenit další prvky studie, přičemž jako vhodné se jeví metody vývojové toxicity a/nebo vývojové neurotoxicity, anebo lze tyto konečné výsledky zkoumat v samostatných studiích pomocí vhodných metod zkoušení.

1.2 PRINCIP ZKUŠEBNÍ METODY

Zkoušená látka se podává v odstupňovaných dávkách několika skupinám samců a samic. Samcům z generace P se látka podává během růstu a během minimálně jednoho dokončeného spermatogenetického cyklu (přibližně 56 dnů u myši a 70 dnů u potkana), aby bylo možné zachytit jakékoliv nepříznivé účinky na spermatogenezi. Účinky na spermie se stanoví pomocí parametrů pro spermie (např. morfologie a motilita spermií), z pitvy tkání a podrobné histopatologie. Jsou-li k dispozici informace o spermatogenezi z předešlých dostatečně dlouhých studií opakovaného dávkování, např. 90denní studie, není do hodnocení nutné zahrnovat samce z generace P. Tyto vzorky nebo digitální záznamy o spermiích z generace P je však vhodné uchovat pro možnost pozdějšího vyhodnocení. Samicím z generace P se látka podá během růstu a během několika dokončených estrálních cyklů, aby bylo možné odhalit jakékoliv nepříznivé účinky zkoušené látky na normální průběh estrálního cyklu. Zkoušená látka se podává rodičovské (P) generaci zvířat během jejich páření, následné březosti a až do doby odstavení jejich potomstva F_1. Po odstavení se u generace F_1 v podávání látky pokračuje během růstu až do dospělosti, v průběhu páření a produkce generace F_2 a až do doby, kdy dojde k odstavení generace F_2.

U všech zvířat se provádějí klinická sledování a patologická vyšetření příznaků toxicity, a to se zvláštním důrazem na její vliv na integritu a výkonnost samčí a samičí rozmnožovací soustavy a na růst a vývoj jejich potomstva.

▼B

1.3 POPIS ZKUŠEBNÍ METODY

1.3.1 **Výběr živočišných druhů**

Nejvhodnějším druhem pro testování je potkan. Použití jiných druhů je třeba zdůvodnit a provést odpovídající úpravy. Není vhodné používat kmeny s nižší plodností nebo s typicky vysokým výskytem vývojových vad. Na začátku studie by měly být u používaných zvířat jen minimální odchylky hmotnosti, které by neměly překročit 20 % průměrné hmotnosti u každého pohlaví.

1.3.2 **Podmínky chovu a krmení**

Teplota v místnosti pro pokusná zvířata by měla být 22 °C (± 3 °C). Relativní vlhkost vzduchu by měla být minimálně 30 % a pokud možno nepřesáhnout 70 %, kromě doby úklidu místnosti, cílem by měla být hodnota 50–60 %. Osvětlení by mělo být umělé a mělo by se střídat 12 hodin světla a 12 hodin tmy. Ke krmení lze použít konvenční laboratorní stravu s neomezenou dodávkou pitné vody. Výběr stravy může být ovlivněn nutností zajistit vhodnou přísadu zkoušené látky, je-li látka podávána tímto způsobem.

Zvířata lze chovat jednotlivě, anebo je umístit v klecích v malých skupinkách zvířat stejného pohlaví. Páření by mělo probíhat v klecích, které jsou k tomuto účelu vhodné. Po spáření je třeba umístit oplodněné samice individuálně do klecí určených k vrhu nebo chovu mláďat. Oplodněné potkany lze rovněž chovat v malých skupinách a oddělit jeden až dva dny před vrhem. Když se blíží doba vrhu, je nutné oplodněným zvířatům poskytnout odpovídající a přesně stanovený materiál pro tvorbu hnízda.

1.3.3 **Příprava zvířat**

Použijí se zdravá zvířata, která se alespoň 5 dnů aklimatizovala na laboratorní podmínky a která nebyla podrobena předcházejícím zkušebním postupům. Pokusná zvířata by měla být charakterizována podle druhu, kmenu, původu, pohlaví, hmotnosti a/nebo stáří. K dispozici by měly být veškeré informace o sourozeneckých vztazích, aby se nepářili sourozenci. Zvířata se náhodným výběrem rozdělí do kontrolních a experimentálních skupin (doporučuje se rozdělení podle tělesné hmotnosti). Klece by měly být uspořádány tak, aby byl vliv umístění klecí minimalizován. Každému zvířeti se přiřadí vlastní identifikační číslo. U generace P se tato čísla přiřadí před zahájením podávání dávek. U generace F_1 je nutné přidělit tato čísla po odstavení zvířat vybraných k páření. U všech vybraných zvířat generace F_1 se vedou záznamy označující původ vrhu. Kromě toho se doporučuje individuální identifikace mláďat co nejdříve po narození, kdy se provádí individuální vážení mláďat nebo jakékoliv funkční zkoušky.

Na začátku podávání dávek musí být rodičovská (P) generace zvířat stará přibližně 5 až 9 týdnů. Je-li to možné, měla by mít zvířata ze všech zkušebních skupin stejnou hmotnost a věk.

▼B

1.4 POSTUP

1.4.1 **Počet a pohlaví zvířat**

Každá experimentální i kontrolní skupina by měla obsahovat dostatečný počet zvířat, aby bylo možné získat minimálně 20 březích samic s přibližně stejným termínem vrhu. To pravděpodobně nebude možné u látek, které vyvolávají nežádoucí účinky spojené s aplikací (např. sterilitu, nadměrnou toxicitu při vysoké dávce). Cílem je získat dostatečný počet březích samic, a tím zajistit smysluplné hodnocení potenciálu dané látky na plodnost, březost, chování samice a kojených mláďat, růst a vývoje potomstva generace F_1 od doby početí až do doby dospělosti a vývoj jejich potomstva (F_2) až do odstavení. Nepodaří-li se však dosáhnout požadovaného počtu březích zvířat (tj. 20), nemusí to nutně znamenat znehodnocení studie, a proto by hodnocení mělo vždy probíhat individuálně případ od případu.

1.4.2 **Příprava dávek**

Není-li jiný vhodnější způsob aplikace (např. kožní nebo inhalační), doporučuje se orální podávání zkoušené látky (ve stravě, pitné vodě nebo pomocí žaludeční sondy).

Zkoušená látka se v případě potřeby rozpustí nebo suspenduje ve vhodném vehikulu. Je-li to možné, doporučuje se zvážit použití vodného roztoku/suspenze, poté použití roztoku/emulze v oleji (např. v kukuřičném oleji) a nakonec roztoku jiného vehikula. U jiného typu vehikula, než je voda, je třeba znát jeho toxické charakteristiky. Stanoví se stálost zkoušené látky v daném vehikulu.

1.4.3 **Dávkování**

Použijí se alespoň tři úrovně dávek a souběžná kontrola. Není-li dávka limitována fyzikálně-chemickou podstatou nebo biologickými účinky zkoušené látky, zvolí se nejvyšší úroveň dávky tak, aby vyvolala toxicitu, ale nezpůsobila úhyn nebo značné utrpení. V případě neočekávané úmrtnosti jsou obvykle ještě přijatelné studie s úmrtností rodičovských (P) zvířat nižší než přibližně 10 %. Ve snaze prokázat jakoukoli reakci související s dávkováním a s hodnotou dávky bez pozorovatelného nepříznivého účinku (NOAEL) se zvolí sestupná posloupnost úrovní dávek. Pro nastavení sestupných úrovní dávek jsou obvykle optimální intervaly lišící se faktorem 2 až 4 a často je vhodnější přidání čtvrté zkušební skupiny než používání velkých intervalů mezi jednotlivými dávkami (např. lišících se faktorem 10). U studií stravy by dávky neměly být více než trojnásobné. Při výběru úrovně dávek je třeba vzít v úvahu jakékoliv existující údaje o toxicitě, a to zvláště v případě výsledků studií po opakované dávce. Rovněž je třeba vzít v úvahu jakékoliv existující informace o metabolismu a kinetice zkoušené sloučeniny nebo příbuzných látek. Tyto informace navíc napomohou rovněž při prokazování přiměřenosti dávkovacího režimu.

▼B

Kontrolní skupina je neexponovaná skupina nebo kontrolní skupina s vehikulem, pokud se vehikulum pro aplikaci zkoušené látky používá. S výjimkou aplikace zkoušené látky je třeba se zvířaty v kontrolní skupině zacházet stejným způsobem jako se zvířaty v experimentální skupině. Používá-li se vehikulum, podá se kontrolní skupině v nejvyšším používaném objemu. Podává-li se zkoušená látka ve stravě a způsobuje-li snížený příjem nebo využití potravy, pak je třeba zvážit nutnost použití párově krmené kontrolní skupiny. Jinak lze místo souběžné párově krmené kontrolní skupiny použít údaje získané z kontrolovaných studií určených k hodnocení účinků snížené spotřeby potravy na reprodukční parametry.

Pozornost je třeba věnovat následujícím typickým znakům vehikula a jiných přísad: účinku na absorpci, distribuci, metabolismus, a/nebo retenci zkoušené látky, dále vlivu na chemické vlastnosti zkoušené látky, které mohou změnit její toxické vlastnosti, a vlivu na spotřebu potravy, vody nebo nutriční stav zvířat.

1.4.4 **Limitní zkouška**

Pokud orální studie s jednou úrovní dávky v množství alespoň 1 000 mg/kg tělesné hmotnosti a den a/nebo rovnocenné procento látky v potravě nebo pitné vodě při aplikaci dávky v potravě nebo pitné vodě pomocí postupů předepsaných pro tuto studii nevyvolá žádnou zjistitelnou toxicitu ani u rodičovských zvířat, ani u jejich potomstva a pokud se neočekává ani toxicita na základě existujících údajů o strukturně/metabolicky příbuzných sloučeninách, pak není nutné uvažovat o kompletní studii využívající několika úrovní dávek. Limitní zkouška se použije, pokud expozice u člověka nevyžaduje použít vyšší úroveň orální dávky. U dalších způsobů podávání látky, jako je inhalační nebo kožní aplikace, může být maximální dosažitelná úroveň expozice dána fyzikálně-chemickými vlastnostmi zkoušené látky.

1.4.5 **Aplikace dávek**

Zkoušená látka se podává zvířatům 7 dnů v týdnu. Upřednostňuje se orální způsob podávání (ve stravě, pitné vodě nebo žaludeční sondou). Pokud se používá jiný způsob podávání, je třeba podat zdůvodnění a provést odpovídající modifikace. Všem zvířatům by měla být látka během odpovídajícího experimentálního období podávána stejným způsobem. Je-li látka podávána žaludeční sondou, podává se hadičkou určenou k výplachu žaludku. Množství jednorázově podávané tekutiny by nemělo překročit 1 ml/100 g tělesné hmotnosti (u kukuřičného oleje maximum představuje dávka 0,4 ml/100 g tělesné hmotnosti), výjimkou jsou vodní roztoky, kde lze použít 2 ml/100 g tělesné hmotnosti. S výjimkou dráždivých nebo žíravých látek, které ve vyšších koncentracích obvykle odhalí další zhoršení účinků, se proměnlivost množství zkoušené látky sníží nastavením takové koncentrace, která zajistí konstantní množství na všech úrovních dávek. Ve studiích zaměřených na podávání látky žaludeční sondou budou mláďata dostávat zkoušenou látku obvykle nepřímo prostřednictvím mléka, dokud nezačne přímé dávkování po jejich odstavení. Ve studiích zaměřených na podávání látky ve stravě nebo pitné vodě budou mláďata navíc dostávat zkoušenou látku přímo, jakmile začnou během posledního týdne laktačního období sama žrát.

▼B

U látky podávané ve stravě nebo pitné vodě je velmi důležité zajistit, aby množství použité zkoušené látky nebránilo vyváženosti běžné stravy nebo vody. Je-li zkoušená látka podávána ve stravě, je třeba používat buď konstantní koncentrace (ppm) ve stravě, nebo konstantní úrovně dávky ve vztahu k tělesné hmotnosti zvířete. Použití jiného způsobu je třeba zdůvodnit. Látka podávaná žaludeční sondou se podává každý den přibližně ve stejnou dobu a alespoň jednou týdně se přizpůsobí tak, aby se udržela konstantní úroveň dávky vzhledem k tělesné hmotnosti zvířete. Při přizpůsobování dávky podle hmotnosti u podávání látky sondou je třeba vzít v úvahu informace týkající se placentární distribuce.

1.4.6 **Plán zkoušky**

S každodenním podáváním zkoušené látky se u rodičovské generace (P) samců a samic zahájí od 5. do 9. týdne věku. Denní podávání látky u samců a samic generace F_1 je třeba zahájit po jejich odstavení; stále je třeba mít na paměti, že v případě, kdy se zkoušená látka podává prostřednictvím stravy nebo pitné vody, může docházet k přímé expozici mláďat F_1 zkoušené látce již během laktačního období. U obou pohlaví (P i F^1) by se mělo s podáváním látky pokračovat alespoň 10 týdnů před obdobím páření. S dávkováním se u obou pohlaví pokračuje i během dvoutýdenního období páření. Nejsou-li samci již potřební k hodnocení reprodukčních účinků, měli by být humánním způsobem utraceni a vyšetřeni. U rodičovské generace (P) samic dávkování pokračuje i během březosti a až do odstavení potomstva generace F_1. Pozornost je třeba věnovat modifikacím dávkovacího programu na základě dostupných informací o zkoušené látce, včetně existujících údajů o toxicitě, indukci metabolismu nebo bioakumulaci. Obvykle by dávka pro jednotlivá zvířata měla vycházet z aktuálně zjištěné tělesné hmotnosti. Velkou pozornost je však třeba věnovat úpravě dávek během posledního trimestru březosti.

Podávání látky samcům a samicím generací P a F_1 pokračuje až do doby jejich utracení. Všichni dospělí samci a samice generace P a F_1 se humánním způsobem utratí, pokud již nejsou potřební k hodnocení reprodukčních účinků. Potomstvo generace F_1, které není vybráno k páření, a celé potomstvo generace F_2 se po odstavení humánním způsobem utratí.

1.4.7 **Páření**

1.4.7.1 *Připouštění rodičovské generace (P)*

U každého páření se samice umístí s jedním samcem se stejnou úrovní dávek (páření 1:1), dokud nedojde ke spáření, nebo po dobu alespoň 2 týdnů. Každý den se samice vyšetří na přítomnost spermatu nebo vaginální zátky. Nultým dnem březosti je den, kdy je pozorována vaginální zátka a/nebo spermie. V případě, že je páření neúspěšné, se zváží spáření se samci s osvědčenou plodností ze stejné skupiny. Spářené páry se v záznamech jasně označí. Je třeba se vyvarovat páření sourozenců.

▼B

1.4.7.2 *Páření generace F_1*

U páření zvířat generace F_1 se za účelem produkce generace F_2 po odstavení vybere z každého vrhu alespoň jeden samec a samice pro spáření s jinými zvířaty ze stejné dávkové skupiny, ale z odlišného vrhu. Výběr zvířat z každého vrhu se provede náhodně, pokud nejsou mezi zvířaty z daného vrhu pozorovány žádné výrazné odlišnosti v tělesné hmotnosti nebo vzhledu. V případě zjištěných odlišností se z každého vrhu vyberou nejkvalitnější jedinci. Z hlediska pragmatického by bylo nejlepší tento výběr provádět na základě tělesné hmotnosti, vhodnějším se však může jevit výběr na základě vzhledu. Potomstvo generace F_1 by se nemělo pářit před dosažením plné pohlavní zralosti.

Páry bez potomstva je třeba vyšetřit za účelem zjištění skutečné příčiny neplodnosti. Tento postup může zahrnovat umožnění další příležitosti k oplodnění se zvířetem s osvědčenou plodností, mikroskopické vyšetření reprodukčních orgánů anebo vyšetření estrálního cyklu a spermatogeneze.

1.4.7.3 *Druhé páření*

V určitých případech, např. u odchylek velikosti vrhu spojených s aplikací nebo při zjištění nejednoznačného účinku po prvním páření, se doporučuje opětovné připuštění dospělých zvířat z generace P a F_1 za účelem produkce druhého vrhu. Rovněž se doporučuje znovu připustit samice nebo samce, u kterých nedošlo k produkci mláďat s osvědčeným zvířaty. Pokud je u jakékoliv generace nezbytná produkce druhého vrhu, zvířata budou opakovaně připuštěna přibližně jeden týden po odstavení posledního vrhu.

1.4.7.4 *Velikost vrhu*

Zvířatům se ponechá možnost normálně vrhnout a pečovat o svoje potomstvo až do jeho odstavení. Standardizace velikosti vrhů je dobrovolná. Pokud se standardizace provádí, je nutné používanou metodu detailně popsat.

1.5 POZOROVÁNÍ

1.5.1 **Klinická pozorování**

Všeobecné klinické pozorování se provádí denně a v případě podávání látky žaludeční sondou časový rozvrh zohlední očekávané doby nejvyšších účinků po podání látky. Zaznamenají se významné změny chování, známky ztíženého nebo prodlužovaného vrhu a všechny příznaky toxicity. Alespoň jednou týdně se u každého zvířete provede další podrobnější vyšetření, nejlépe v době vážení zvířete. Dvakrát denně, během víkendu případně jednou denně, se provádí pozorování nemocnosti a úmrtnosti všech zvířat.

▼B

1.5.2 **Tělesná hmotnost a spotřeba potravy/vody u rodičovských zvířat**

Rodičovská zvířata (generace P a F_1) se zváží v první den podávání látky a poté alespoň jednou týdně. Samice rodičovské generace (P a F_1) se zváží 0., 7., 14. a 20. nebo 21. den gestace, během stejných dnů v průběhu laktace, při vážení vrhů a poté v den utracení zvířat. Tato pozorování se zaznamenají individuálně u každého dospělého zvířete. V období před pářením a během gestačního období se spotřeba potravy měří minimálně každý týden. Pokud se látka podává ve vodě, měří se spotřeba vody alespoň jednou týdně.

1.5.3 **Estrální cyklus**

Před pářením a popřípadě i během páření se u samic generace P a F_1 hodnotí délka a normálnost estrálního cyklu pomocí vaginálních stěrů, dokud se nezíská důkaz o zabřeznutí. Při získávání vaginálních/cervikálních buněk je třeba neporušit sliznice a následně také nevyvolat stav falešné březosti (1).

1.5.4 **Parametry spermatu**

U všech samců generace P a F_1 se po utracení zaznamená hmotnost varlat a nadvarlat a jeden z každého orgánu se ponechá pro histopatologické vyšetření (viz body 1.5.7, 1.5.8.1). Zbylá varlata a nadvarlata z podskupiny alespoň deseti samců z každé generace P a F_1 se použijí pro výpočet homogenizačně odolných spermatid a kaudálních epididymálních rezerv spermií. Od stejné podskupiny samců se shromáždí spermie z kaudálních částí nadvarlat nebo spermie z chámovodů za účelem vyhodnocení jejich motility a morfologie. Pokud se zjistí účinky spojené s aplikací látky anebo jsou z jiných studií k dispozici důkazy o možném účinku na spermatogenezi, provede se hodnocení spermatu u všech samců z každé skupiny podle dávky; jinak se výpočet omezí pouze na samce z kontrolní skupiny a ze skupiny generace P a F_1 s vysokou dávkou.

Vypočítá se celkový počet homogenizačně odolných testikulárních spermatid a spermií z kaudální části nadvarlat (2, 3). Kaudální rezervy spermií lze odvodit z koncentrace a objemu spermií v suspenzi používané k doplnění kvalitativních hodnocení a počtu spermií získaných pomocí následného rozřezání a/nebo homogenizování zbylé kaudální tkáně. Pokud nejsou zhotoveny digitální záznamy nebo videozáznamy anebo nejsou-li vzorky zmraženy a analýza provedena později, je nutné výpočet u vybrané podskupiny samců ze všech dávkových skupin provést okamžitě po utracení zvířat. v těchto případech se nejprve provádí analýza u kontrolní skupiny a u skupiny s vysokou dávkou. Pokud se nezjistí žádné účinky spojené s aplikací (např. vliv na počet, motilitu nebo morfologii spermií), není nutné provádět analýzu u ostatních dávkových skupin. Pokud se zjistí účinky spojené s aplikací u skupiny s vysokou dávkou, je nutné zhodnotit i skupiny s nižšími dávkami.

▼B

Motilita epididymálních spermií (nebo spermií z chámovodu) se vyhodnotí nebo zaznamená na video okamžitě po utracení. V takovém případě je nutné vyhodnotit rovněž skupiny s nižší úrovní dávek. Spermie se odeberou tak, aby došlo k minimálnímu poškození, a pomocí vhodných metod se zředí pro analýzu motility (4). Procento progresivně pohyblivých spermií se stanoví subjektivně, nebo objektivně. Pokud se provádí počítačová analýza pohyblivosti (5, 6, 7, 8, 9, 10), spočívá odvození progresivní motility v mezních uživatelsky nastavených hodnotách průměrné rychlosti dráhy a přímosti nebo lineárního koeficientu. Pokud se pořídí videozáznam vzorků (11) anebo jsou zobrazení během pitvy zaznamenána jiným způsobem, stačí provést následnou analýzu pouze u kontrolní skupiny a u skupiny s vysokou dávkou u samců z generací P a F_1, pokud nedojde ke zjištění účinků spojených s aplikací. Pokud nejsou k dispozici žádné digitální záznamy ani videozáznam, analyzují se pitvou všechny vzorky od všech experimentálních skupin.

Provede se morfologické hodnocení vzorků epididymálních spermií (nebo spermií z chámovodů). Spermie (minimálně 200 na vzorek) se vyšetří jako stabilní, mokré preparáty (12) a klasifikují se jako normální nebo abnormální. Příklady morfologických odchylek spermií by měly zahrnovat syntézu, izolované a zdeformované hlavičky a/nebo ocásky. Hodnocení se provádí u vybraných podskupin samců ze všech skupin podle úrovní dávek bezprostředně po utracení zvířat, nebo později na základě digitálních záznamů nebo videozáznamů. Jsou-li stěry zakonzervované, lze je rovněž vyhodnotit později. V takovém případě se analyzuje nejprve kontrolní skupina a skupiny s vysokou dávkou. Pokud se nezjistí žádné účinky spojené s aplikací (např. účinek na morfologii spermií), není nutné analyzovat ostatní dávkové skupiny. Pokud se zjistí účinky spojené s aplikací u skupiny s vysokou dávkou, je nutné zhodnotit i skupiny s nižšími dávkami.

Pokud již byly kterékoliv výše zmíněné parametry spermií zkoumány v rámci nejméně 90 dnů trvající studie systémové toxicity, není nutné je v rámci dvougenerační studie opakovat. Doporučuje se však veškeré vzorky nebo digitální záznamy spermií z generace P uchovat pro pozdější hodnocení.

1.5.5 **Potomstvo**

Vrhy se vyšetří co nejdříve po vrhu (v nultý den laktace), aby bylo možné stanovit počet a pohlaví mláďat, počet mrtvě a živě narozených mláďat a přítomnost nápadných anomálií. Mláďata, která byla nalezena mrtvá v den 0, se vyšetří na možné defekty a příčinu smrti (nejsou-li rozložená) a posléze se uchovají. Živá mláďata se spočítají, každé se ihned po narození zváží (v nultý den laktace) nebo během 1. dne a poté v pravidelných intervalech, např. v 4., 7., 14., a 21. den laktace. Zaznamenají se fyzické nebo behaviorální abnormality zjištěné u samic nebo jejich potomstva.

▼B

Fyzický vývoj u potomstva se zaznamenává hlavně podle přírůstku tělesné hmotnosti. Další fyzické parametry (např. otevření uší a očí, prořezávání zubů, růst srsti) mohou poskytnout doplňkové informace, ale u těchto údajů se dává přednost hodnocení v kontextu údajů o pohlavní zralosti (např. stáří a tělesná hmotnost při vaginálním otevření nebo odpojení předkožky) (13). Doporučuje se provést funkční vyšetření (např. pohybová aktivita, smyslové funkce, reflexní ontogeneze) potomstva generace F_1 před a/nebo po odstavení, a to zvláště vyšetření týkající se pohlavní zralosti, nejsou-li taková vyšetření součástí samostatných studií. U odstavených potomků generace F_1 vybraných k připuštění je třeba stanovit stáří, ve kterém došlo k vaginálnímu otevření a odloučení předkožky. U mláďat generace F_2 je třeba změřit anogenitální vzdálenost během postnatálního dne 0, je-li vyvolána změnami v poměru pohlaví u generace F_1 nebo načasováním pohlavní zralosti.

Funkční sledování lze vynechat u skupin, které jinak vykazují jasné známky nepříznivých účinků (např. významné snížení přírůstku hmotnosti atd.). Pokud se provádí funkční vyšetření, nemělo by se provádět u mláďat vybraných k páření.

1.5.6 **Celková pitva**

Po utracení nebo uhynutí během studie se všechna zvířata rodičovské generace (P a F_1), všechna mláďata se zevními odchylkami nebo klinickými známkami a rovněž jedno náhodně vybrané mládě z každého pohlaví a vrhu z obou generací F_1 a F_2 makroskopicky vyšetří na jakékoliv strukturální abnormality anebo patologické změny. Speciální pozornost je třeba věnovat orgánům rozmnožovací soustavy. U mláďat, která jsou humánním způsobem utracena ve stavu agónie, a u mrtvých mláďat, která nejsou rozložena, se provede vyšetření za účelem zjištění možných defektů a/nebo příčiny uhynutí. Mláďata se uchovají.

Děloha všech samic prvorodiček se vyšetří na přítomnost a počet zachycených vajíček v děloze způsobem, který nebude mít vliv na histopatologické hodnocení.

1.5.7 **Hmotnost orgánů**

V okamžiku utracení se u všech rodičovských zvířat generace P a F_1 stanoví tělesná hmotnost a hmotnost těchto orgánů (párové orgány je třeba vážit jednotlivě):

— děloha, vaječníky,

— varlata, nadvarlata (celkem a kaudální),

— prostata,

— semenné váčky s koagulačními žlázami a jejich tekutinami a s prostatou (jako jedna jednotka),

— mozek, játra, ledviny, slezina, hypofýza, štítná žláza a nadledvinky a známé cílové orgány.

U mláďat generace F_1 a F_2 vybraných k pitvě se stanoví tělesná hmotnost v okamžiku utracení. U jednoho náhodně vybraného mláděte z každého pohlaví a vrhu (viz odstavec 1.5.6) se zváží tyto orgány: mozek, slezina a brzlík.

▼B

Je-li to proveditelné, zhodnotí se výsledky celkové pitvy a hmotnosti orgánů v souvislost s výsledky zjištěnými v jiných studiích opakovaného dávkování.

1.5.8 **Histopatologie**

1.5.8.1 *Rodičovská zvířata*

Pro histopatologické vyšetření se připraví a ve vhodném prostředí uchovají tyto orgány a tkáně rodičovských zvířat, nebo jejich reprezentativní vzorky:

— vagina, děloha s děložním hrdlem a vaječníky (uložené ve vhodném konzervačním prostředku),

— jedno varle (uložené v Bouinově roztoku nebo jiném srovnatelném prostředku), jedno nadvarle, semenné váčky, prostata a koagulační žláza,

— již dříve určený cílový orgán nebo orgány od všech zvířat generace P a F_1 vybraných k páření.

U všech zvířat generace P a F_1 ze skupiny s vysokou dávkou a z kontrolní skupiny vybraných k páření se provede kompletní histopatologické vyšetření všech výše vyjmenovaných uchovaných orgánů a tkání. Vyšetření vaječníků u zvířat generace P není povinné. Provede se rovněž vyšetření orgánů vykazujících změny spojené s aplikací látky u zvířat ze skupiny s nízkou a střední dávkou, které mohou napomoci stanovit dávku NOAEL. Histopatologické vyšetření se navíc provede u reprodukčních orgánů zvířat ze skupiny s nízkou a střední dávkou, u kterých je podezření na sníženou plodnost, např. u těch, u kterých nedošlo k páření, zabřeznutí, zplodnění nebo k vrhu zdravého potomstva nebo u kterých byl ovlivněn estrální cyklus nebo počet, motilita nebo morfologie spermií. Vyšetří se všechny makroskopické léze, jako např. atrofie nebo tumory.

Za účelem zjištění účinků spojených s aplikací, jako jsou např. nevyvinuté spermatidy, chybějící vrstva nebo typ zárodečných buněk, mnohojaderné obří buňky nebo rozrušení spermatických buněk v dutině, se provede podrobné histopatologické vyšetření varlat (např. pomocí Bouinova roztoku, zalití do parafinu a příčných řezů o tloušťce 4–5 μm) (14). Vyšetření intaktního nadvarlete by mělo zahrnovat vyšetření hlavy, těla a kaudální části, čehož lze dosáhnout vyhodnocením podélného řezu. U nadvarlete se vyšetří leukocytová infiltrace, změna v prevalenci typů buněk, aberantní typy buněk a fagocytóza spermií. k vyšetření samčí rozmnožovací soustavy lze použít PAS a hematoxylin.

Postlaktační vaječník by měl obsahovat původní a rostoucí folikuly a rovněž zvětšená žlutá tělíska z období laktace. Histopatologické vyšetření by mělo odhalit kvalitativní snížení celkového počtu původních folikulů. U samic generace F_1 se provede kvantitativní vyhodnocení původních folikulů. K vyhodnocení použitého postupu je nutné mít statisticky odpovídající počet zvířat, výběr řezů vaječníků a velikost vzorků řezů. S cílem umožnit srovnání vaječníků u testované a kontrolní skupiny by mělo vyšetření zahrnovat výpočet počtu původních folikulů, které lze zkombinovat s malými rostoucími folikuly (15, 16, 17, 18, 19).

▼B

1.5.8.2 *Odstavená mláďata*

Pro histopatologické vyšetření se ve vhodném prostředí připraví a uchová makroskopicky abnormální tkáň a cílové orgány od všech mláďat se zevními odchylkami nebo klinickými příznaky a rovněž od jednoho náhodně vybraného mláděte z každého pohlaví a vrhu z obou generací F_1 a F_2, které nebyly vybrány k páření. Kompletní histopatologická charakterizace uchovaných tkání se provede se speciálním důrazem na orgány rozmnožovací soustavy.

2. **ÚDAJE**

2.1 ZPRACOVÁNÍ VÝSLEDKŮ

Výsledky se zaznamenávají individuálně a shrnou se do tabulek tak, aby byl u každé experimentální skupiny a každé generace uveden počet zvířat na začátku zkoušky, počet zvířat uhynulých během zkoušky nebo utracených z humánních důvodů, doba úhynu nebo humánního utracení, počet plodných samic, počet březích samic, počet zvířat vykazujících příznaky toxicity, popis pozorovaných příznaků toxicity včetně doby nástupu, trvání a závažnosti veškerých toxických účinků, typy pozorování rodičovských zvířat a jejich potomstva a všechny významné údaje o vrhu.

Numerické výsledky se vyhodnotí pomocí vhodné, všeobecně uznávané statistické metody; metody se zvolí v rámci návrhu studie a je třeba je zdůvodnit. Pro analýzu dat je vhodné použít statistické modely dávka-odezva. Protokol by měl obsahovat dostatečné informace o použité metodě analýzy a počítačovém programu, aby mohl tuto analýzu znovu vyhodnotit a rekonstruovat nezávislý statistik.

2.2 HODNOCENÍ VÝSLEDKŮ

Výsledky této dvougenerační studie reprodukční toxicity se vyhodnotí ve vztahu k pozorovaným účinkům včetně pitvy a mikroskopických nálezů. V hodnocení musí být uvedeno, zda existuje nebo neexistuje souvislost mezi dávkou zkoušené látky a přítomností nebo nepřítomností, výskytem a závažností abnormalit včetně makroskopických lézí stanovených cílových orgánů, vlivu na plodnost, klinických abnormalit, vlivu na reprodukční výkonnost a schopnost vrhu, změny tělesné hmotnosti, vlivu na úmrtnost a další toxické účinky. Při hodnocení výsledků zkoušky se přihlédne k fyzikálně-chemickým vlastnostem zkoušené látky a toxikokinetickým údajům, jsou-li k dispozici.

Správně provedená zkouška reprodukční toxicity by měla zajistit dostačující odhad úrovně dávky bez účinku a vysvětlení nepříznivých účinků na reprodukci, vrh, laktaci, postnatální vývoj včetně růstu a pohlavního vývoje.

▼B

2.3 INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

Dvougenerační studie reprodukční toxicity poskytne informace o účinku opakované expozice látce během všech fází reprodukčního cyklu. Studie zejména poskytne informace o reprodukčních parametrech a o vývoji, růstu, dozrávání a přežívání potomstva. Výsledky studie se interpretují v souvislosti s výsledky ze subchronických, reprodukčních, toxikokinetických a dalších studií. Výsledky této studie lze použít k posouzení potřeby dalšího zkoušení chemické látky. Extrapolace výsledků této studie na člověka platí pouze v omezené míře. Největší význam těchto výsledků spočívá v tom, že poskytují informace o úrovni dávky bez účinků a o přípustné expozici člověka (20, 21, 22, 23).

3. **ZPRÁVY**

3.1. PROTOKOL O ZKOUŠCE

Protokol o zkoušce musí obsahovat tyto informace:

Zkoušená látka:

— fyzikální vlastnosti, a je-li to podstatné, též fyzikálně-chemické vlastnosti,

— identifikační údaje,

— čistota.

Vehikulum (je-li použito):

— zdůvodnění výběru vehikula, pokud není použita voda.

Pokusná zvířata:

— použitý druh/kmen,

— počet, stáří a pohlaví zvířat,

— původ, podmínky chovu, strava, materiál na výrobu hnízda atd.,

— individuální hmotnosti zvířat na začátku zkoušky.

Zkušební podmínky:

— zdůvodnění výběru úrovně dávky,

— podrobné údaje o složení zkoušené látky/krmiva, o dosažené koncentraci,

— stabilita a homogenita přípravku,

— podrobné údaje o podávání zkoušené látky,

— v případě potřeby přepočet koncentrace zkoušené látky (ppm) ve stravě/pitné vodě na skutečnou dávku (mg na kg tělesné hmotnosti na den), je-li to možné,

— podrobné údaje o kvalitě stravy a vody.

▼B

Výsledky:

— spotřeba stravy a vody, jsou-li k dispozici, využití stravy (přírůstek tělesné hmotnosti na gram spotřebované potravy) a spotřeba zkoušené látky u zvířat generace P a F_1 s výjimkou období kohabitace a minimálně poslední třetiny laktace,

— údaje o absorpci (jsou-li k dispozici),

— údaje o tělesné hmotnosti zvířat z generace P a F_1 vybraných k páření,

— údaje o hmotnosti vrhu a mláďat,

— tělesná hmotnost při utracení a údaje o absolutní a relativní hmotnosti orgánů u rodičovských zvířat,

— povaha, závažnost a trvání klinických pozorování (vratných i nevratných),

— den úhynu během studie nebo údaj, že zvířata přežila až do dne utracení,

— údaje o toxické reakci podle pohlaví a dávky, včetně koeficientů páření, plodnosti, gestace, porodnosti, životaschopnosti a laktace; zpráva by měla uvádět údaje využité při výpočtu těchto koeficientů,

— toxické nebo jiné účinky na reprodukci, potomstvo, postnatální růst atd.;

— pitevní nálezy,

— podrobný popis všech histopatologických nálezů,

— počet samic s normálním cyklem z generace P a F_1 a délka cyklu,

— celkový počet kaudálních epididymálních spermií, procento progresivně pohyblivých spermií, procento morfologicky normálních spermií a procento spermií se všemi identifikovanými abnormalitami,

— doba do páření včetně počtu dnů před pářením,

— délka gestace,

— počet implantátů, žlutých tělísek, velikost vrhu,

— počet živě narozených mláďat a postimplantačních ztrát,

— počet mláďat s makroskopicky viditelnými abnormalitami a počet zakrslých mláďat, pokud byl zjišťován,

— údaje o fyzických vývojových znacích u mláďat a další údaje o postnatálním vývoji; hodnocené fyzické vývojové znaky je nutno zdůvodnit,

— případně údaje o funkčním pozorování mláďat a dospělých zvířat,

— statistické vyhodnocení výsledků, je-li to možné.

▼B

Rozbor výsledků.

Závěry včetně hodnot NOAEL pro účinky na samice a potomstvo.

4. **LITERATURA**

1) Sadleir, R.M.F.S. (1979). Cycles and Seasons, In: *Reproduction in Mammals:* I. Germ Cells and Fertilization, C.R. Auston and R.V. Short (eds.), Cambridge, New York.

2) Gray, L.E. et al., (1989). A Dose-Response Analysis of Methoxychlor-Induced Alterations of Reproductive Development and Function in the Rat. *Fundamental and Applied Toxicology* 12; 92–108.

3) Robb, G.W. et al., (1978). Daily Sperm Production and Epididymal Sperm Reserves of Pubertal and Adult Rats. *Journal of Reproduction and Fertility* 54; 103–107.

4) Klinefelter, G.R. et al., (1991). The Method of Sperm Collection Significantly Influences Sperm Motion Parameters Following Ethane Dimethanesulfonate Administration in the Rat. *Reproductive Toxicology* 5; 39–44

5) Seed, J. et al. (1996). Methods for Assessing Sperm Motility, Morphology, and Counts in the Rat, Rabbit, and Dog: a Consensus Report. *Reproductive Toxicology* 10(3); 237–244.

6) Chapin, R.E. et al., (1992).Methods for Assessing Rat Sperm Motility. *Reproductive Toxicology* 6; 267–273

7) Klinefelter, G.R. et al., (1992). Direct Effects of Ethane Dimethanesulphonate on Epididymal Function in Adult Rats: an *In Vitro* Demonstration. *Journal of Andrology* 13; 409–421.

8) Slott, V.L. et al., (1991). Rat Sperm Motility Analysis: Methodologic Considerations. *Reproductive Toxicology* 5; 449–458.

9) Slott, V.L. and Perreault, S.D., (1993). Computer-Assisted Sperm Analysis of Rodent Epididymal Sperm Motility Using the Hamilton-Thorn Motility Analyzer. In: *Methods in Toxicology,* Part A., Academic, Orlando, Florida; s. 319–333.

10) Toth, G.P. et al. (1989). The Automated Analysis of Rat Sperm Motility Following Subchronic Epichlorhydrin Administration: Methodologic and Statistical Considerations. Journal of Andrology 10; 401–415.

11) Working, P.K. and M. Hurtt, (1987). Computerized Videomicrographic Analysis of Rat Sperm Motility. Journal of Andrology 8; 330–337.

12) Linder, R.E. et al., (1992). Endpoints of Spermatoxicity in the Rat After Short Duration Exposures to Fourteen Reproductive Toxicants. Reproductive Toxicology 6; 491–505.

13) Korenbrot, C.C. et al., (1977). Preputial Separation as an External Sign of Pubertal Development in the Male Rat. Biological Reproduction 17; 298–303.

14) Russell, L.D. et al., (1990). Histological and Histopathological Evaluation of the Testis, Cache River Press, Clearwater, Florida.

15) Heindel, J.J. and R.E. Chapin, (eds.) (1993). Part B. Female Reproductive Systems, Methods in Toxicology, Academic, Orlando, Florida.

16) Heindel, J.J. et al., (1989) Histological Assessment of Ovarian Follicle Number in Mice As a Screen of Ovarian Toxicity. In: Growth Factors and the Ovary, A.N. Hirshfield (ed.), Plenum, New York, s. 421–426.

17) Manson, J.M. and Y.J. Kang, (1989). Test Methods for Assessing Female Reproductive and Developmental Toxicology. In: Principles and Methods of Toxicology, A.W. Hayes (ed.), Raven, New York.

▼B

18) Smith, B.J. et al,. (1991). Comparison of Random and Serial Sections in Assessment of Ovarian Toxicity. Reproductive Toxicology 5; 379–383.

19) Heindel, J.J. (1999). Oocyte Quantitation and Ovarian Histology. In: An Evaluation and Interpretation of Reproductive Endpoints for Human Health Risk Assessment, G. Daston,. and C.A. Kimmel, (eds.), ILSI Press, Washington, DC.

20) Thomas, J. A. (1991). Toxic Responses of the Reproductive System. In: Casarett and Doull's Toxicology, M.O. Amdur, J. Doull, and C.D. Klaassen (eds.), Pergamon, New York.

21) Zenick, H. and E.D. Clegg, (1989). Assessment of Male Reproductive Toxicity: A Risk Assessment Approach. In: Principles and Methods of Toxicology, A.W. Hayes (ed.), Raven Press, New York.

22) Palmer, A.K. (1981). In: Developmental Toxicology, Kimmel, C.A. and J. Buelke-Sam (eds.), Raven Press, New York.

23) Palmer, A.K. (1978). In Handbook of Teratology, Vol. 4, J.G. Wilson and F.C. Fraser (eds.), Plenum Press, New York.

▼M4

B.36 **TOXIKOKINETIKA**

ÚVOD

1. Tato zkušební metoda odpovídá Pokynům OECD pro zkoušení (TG) 417 (2010). Studie zkoumající toxikokinetiku (TK) zkoušené chemické látky se provádí za účelem získání náležitých informací o její absorpci, distribuci, biotransformaci (tj. metabolismu) a exkreci, které pomohou dát do souvislosti koncentraci či dávku s pozorovanou toxicitou a pomohou pochopit mechanismus její toxicity. Toxikokinetika může pomoci porozumět TK studiím tím, že prokáže, že jsou pokusná zvířata systémově vystavena zkoušené chemické látce a odhalením identity cirkulujících složek (mateřská chemická látka/metabolity). Základní TK parametry stanovené v těchto studiích rovněž poskytnou informace o schopnosti zkoušené chemické látky hromadit se v tkáních a/nebo orgánech a o schopnosti vyvolat biotransformaci v důsledku expozice zkoušené chemické látce.

2. TK údaje mohou přispět k posouzení přijatelnosti a relevantnosti použití údajů o toxicitě u zvířat k extrapolaci na nebezpečnost pro člověka a/nebo posouzení rizik. Dále mohou toxikokinetické studie poskytnout užitečné informace pro stanovení úrovní dávek ve studiích toxicity (lineární vs. nelineární kinetika), účinků cesty podání, biologické dostupnosti a otázek souvisejících s uspořádáním studie. Určité druhy TK údajů lze použít k vývoji modelu toxikokinetiky na fyziologické bázi (PBTK).

3. Údaje o metabolitech/TK údaje jsou důležité např. k navržení možných toxických účinků a způsobů účinků a jejich vztahu k úrovni dávky a k cestě expozice. Dále mohou údaje o metabolismu poskytnout užitečné informace pro posouzení toxikologického významu expozic exogenně produkovaných metabolitů zkoušené chemické látky.

4. Náležité toxikokinetické údaje pomohou zajistit další přijatelnost a uplatnitelnost kvantitativních vztahů mezi strukturou a aktivitou, analogických přístupů či přístupů založených na seskupování, při hodnocení bezpečnosti chemických látek. Údaje o kinetice lze rovněž použít k zhodnocení toxikologické relevantnosti jiných studií (např. *in vivo*/*in vitro*).

5. Není-li uvedena jiná cesta podání (viz zejména odstavce 74–78), používá se tato zkušební metoda při orálním podávání zkoušené chemické látky.

VÝCHOZÍ ÚVAHY

6. Regulační systémy mají u různých tříd chemických látek (např. pesticidy, biocidy, průmyslové chemikálie) různé požadavky a potřeby týkající se měření cílových parametrů souvisejících s toxikokinetikou. Na rozdíl od většiny zkušebních metod tato zkušební metoda popisuje zkoušky toxikokinetiky, což zahrnuje více měření a cílových parametrů. V budoucnosti může být vyvinuto nové zkušební metody a/nebo pokyny, které budou popisovat každý cílový parametr samostatně a podrobněji. V případě této zkušební metody jsou zkoušky či vyhodnocení, které se mají provést, určeny podle požadavků a/nebo potřeb každého regulačního systému.

▼M4

7. Existuje řada studií, které lze provést ke zhodnocení TK chování zkoušené chemické látky pro regulační účely. Nicméně v závislosti na konkrétních regulačních potřebách nebo situacích nemusí být všechny tyto studie pro hodnocení zkoušené chemické látky nutné. Při plánování toxikokinetických studií je nutná flexibilita a zohlednění hodnocených vlastností zkoušené chemické látky. V některých případech je třeba prozkoumat pouze určitou sadu otázek, aby se zhodnotila nebezpečnost a obavy z rizik související se zkoušenou chemickou látkou. V některých situacích se mohou TK údaje shromáždit jako součást hodnocení v jiných toxikologických studiích. V jiných situacích může být nutné provést doplňující a/nebo rozsáhlejší studie TK, v závislosti na regulačních potřebách a/nebo pokud se při hodnocení zkoušené chemické látky objeví nové otázky.

8. Před zahájením této studie by měla laboratoř provádějící zkoušky vzít v úvahu veškeré dostupné informace o zkoušené chemické látce a příslušných metabolitech a analozích, aby se zvýšila kvalita studie a předešlo se zbytečnému použití zvířat. Tyto informace mohou obsahovat údaje z ostatních relevantních zkušebních metod (studie *in vivo*, studie *in vitro* a/nebo hodnocení *in silico*). K plánování studie a interpretaci výsledků mohou být užitečné fyzikálně-chemické vlastnosti, jakými jsou rozdělovací koeficient oktanol–voda (vyjádřený jako log P_{ow}), pKa, rozpustnost ve vodě, tlak par a molekulová hmotnost chemické látky. Lze je stanovit pomocí vhodných metod, jak je popsáno v příslušných zkušebních metodách.

OMEZENÍ

9. Tato zkušební metoda není určena pro speciální okolnosti, např. březí zvířata nebo zvířata v laktaci a mláďata, či k hodnocení potenciálních reziduí u exponovaných zvířat chovaných pro potravinářské účely. Nicméně údaje získané ze studie B.36 mohou poskytnout podkladové informace, které mohou být vodítkem při plánování speciálních studií pro tyto výzkumy. Tato zkušební metoda není určena pro zkoušky nanomateriálů. Ze zprávy o předběžném přezkoumání Pokynů OECD ke zkouškám s ohledem na jejich použitelnost u nanomateriálů vyplývá, že pokyny TG 417 (odpovídající této zkušební metodě B.36) není možné v případě nanomateriálů použít (1).

DEFINICE

10. Definice použité pro účely této zkušební metody jsou uvedeny v dodatku.

ÚVAHY O ZAJIŠTĚNÍ DOBRÝCH ŽIVOTNÍCH PODMÍNEK ZVÍŘAT

11. Pokyny k humánnímu zacházení se zvířaty jsou k dispozici v Pokynech OECD (GD) 19 (2). U všech studií *in vivo* a *in vitro* popsaných v této zkušební metodě se doporučuje postupovat podle dokumentu OECD GD 19.

POPIS METOD

Pilotní studie

12. Při výběru experimentálních parametrů pro studie toxikokinetiky (např. metabolismu, látkové bilance, analytických postupů, stanovení dávky, vydechovaného CO_2 atd.) se doporučuje použít pilotní studie. K charakterizaci některých z těchto parametrů nemusí být nutné používat radioizotopově značené chemické látky.

▼M4

Výběr zvířat

Druhy

13. Zvířecí druh (a kmen) použitý pro zkoušky TK by měl být nejlépe stejný jako druh použitý v jiných toxikologických studiích prováděných s danou zkoušenou chemickou látkou. Obvykle by se měl použít potkan, neboť se v toxikologických studiích široce používá. Použití jiných nebo doplňkových druhů může být oprávněné, pokud kritické toxikologické studie prokážou výskyt významné toxicity u těchto druhů nebo pokud se ukáže, že toxicita/toxikokinetika těchto druhů je pro člověka relevantnější. Výběr zvířecího druhu a kmene by se měl zdůvodnit.

14. Není-li uvedeno jinak, týká se tato zkušební metoda potkana jakožto zkoušeného druhu. Pokud jsou ke zkouškám použity jiné druhy, může být nutné určité aspekty této metody upravit.

Stáří a kmen

15. Měla by se použít mladá dospělá zvířata (v době podávání dávky obvykle 6–12 týdnů stará) (viz také odstavce 13 a 14). Použití zvířat, která nejsou mladá a dospělá, by se mělo zdůvodnit. Všechna zvířata by měla být na počátku studie přibližně stejného stáří. Odchylky v hmotnosti jednotlivých zvířat by v dané experimentální skupině neměly překročit ± 20 % průměrné hmotnosti. V ideálním případě by se měl použít stejný kmen, jaký se použil při získávání toxikologických dat o dané zkoušené chemické látce.

Počet a pohlaví zvířat

16. Pro každou zkoumanou dávku by se měla použít alespoň čtyři zvířata od každého pohlaví. Mělo by se uvést zdůvodnění pro výběr pohlaví použitých zvířat. Jestliže existují důkazy, které svědčí o významných rozdílech v toxicitě v závislosti na pohlaví, mělo by se použití obou pohlaví (čtyř samců a čtyř samic) uvážit.

Podmínky chovu a krmení

17. Zvířata by se měla v průběhu zkoušky chovat jednotlivě. Za speciálních podmínek může být odůvodněn skupinový chov. Osvětlení by mělo být umělé a mělo by se střídat 12 hodin světla a 12 hodin tmy. Teplota v místnosti pro pokusná zvířata by měla být 22 °C (± 3 °C) a relativní vlhkost 30–70 %. Ke krmení lze použít konvenční laboratorní krmivo s neomezeným přísunem pitné vody.

Zkoušená chemická látka

18. Pro látkovou bilanci a identifikaci metabolitů ve studii by se měla použít radioizotopově značená zkoušená chemická látka (pomocí ^{14}C), avšak je-li možné prokázat, že:

— látkovou bilanci a identifikaci metabolitů lze dostatečně vyhodnotit i při použití neznačené zkoušené chemické látky,

— analytická specifičnost a citlivost metody použité s neznačenou zkoušenou chemickou látkou je shodná nebo větší, než jaké by bylo možné dosáhnout s radioizotopově značenou zkoušenou chemickou látkou,

▼M4

pak se radioizotopově značená chemická látka nemusí používat. Kromě toho lze použít jiné radioaktivní a stabilní izotopy, zejména pokud je příslušný prvek zodpovědný za toxicitu nebo je součástí toxické části zkoušené chemické látky. Je-li to možné, měla by být radioaktivní značka umístěna ve středové části molekuly, která je metabolicky stabilní (není zaměnitelná, nelze ji metabolicky odbourat jako CO_2 a nestává se součástí zásob jednouhlíkových jednotek v organismu). Někdy může být nutné označit více míst nebo specifických oblastí molekuly, aby bylo možné sledovat metabolický osud zkoušené chemické látky.

19. Pomocí vhodných metod by se měla stanovit čistota a identita radioizotopově značených a neznačených zkoušených chemických látek. Radiochemická čistota radioaktivní zkoušené chemické látky by měla být nejvyšší, jaké lze u dané zkoušené chemické látky dosáhnout (v ideálním případě by měla být větší než 95 %) a mělo by se vynaložit dostatečné úsilí k identifikaci nečistot přítomných v množství 2 % a větším. Čistota spolu s identitou a procentuálním zastoupením jakýchkoli nečistot, které byly identifikovány, by se měla zaznamenat. Další užitečné pokyny při definování a specifikacích zkoušených chemických látek, které jsou složeny ze směsí, a metody pro stanovení čistoty mohou být obsaženy v individuálních regulačních programech.

Výběr dávky

Pilotní studie

20. Pro pilotní studii je obvykle dostačující jednorázová orální dávka. Dávka by měla být netoxická, avšak dostatečně vysoká na to, aby umožnila identifikaci metabolitů v exkretech (a případně v plazmě) a rovněž aby splňovala uvedený účel pilotní studie, jak je uveden v odstavci 12 této zkušební metody.

Hlavní studie

21. Pro hlavní studie se upřednostňují minimálně dvě dávky, neboť informace získané alespoň ze dvou exponovaných skupin mohou pomoci při nastavování dávek v jiných studiích toxicity a při hodnocení vztahu mezi dávkou a odezvou v již dostupných zkouškách toxicity.

22. Pokud se podávají dvě dávky, měly by být obě dostatečně vysoké, aby umožnily identifikaci metabolitů v exkretech (a případně v plazmě). Při výběru dávky by se měly vzít v úvahu dostupné toxikologické údaje. Nejsou-li tyto informace k dispozici (např. ze studií akutní orální toxicity zaznamenávajících příznaky toxicity nebo ze studií toxicity po opakovaných dávkách), může se zvážit použití vyšší dávky, která je menší než odhad LD_{50} (orální a dermální cesta) nebo LC_{50} (inhalační cesta) nebo menší než nižší hodnota odhadovaného rozmezí akutní toxicity. Nižší dávka by se měla stanovit vydělením vyšší dávky.

23. Jestliže se zkoumá pouze jedna úroveň dávky, měla by být dávka v ideálním případě dostatečně vysoká, aby umožnila identifikaci metabolitů v exkretech (a případně v plazmě), aniž by vedla ke zjevné toxicitě. Mělo by se uvést zdůvodnění, proč nebyla zařazena druhá úroveň dávky.

24. Jestliže je třeba stanovit účinek dávky na kinetické procesy, nemusí být dvě dávky dostačující a alespoň jedna dávka by měla být dostatečně vysoká, aby tyto procesy saturovala. Pokud se při dvou úrovních dávky použité v hlavní studii plocha pod křivkou závislosti koncentrace v plazmě na čase (AUC) nemění lineárně, svědčí to o tom, že k saturaci jednoho nebo více kinetických procesů dochází někde mezi těmito dvěma úrovněmi dávek.

▼M4

25. U zkoušených chemických látek s nízkou toxicitou (podávaných orálně a dermálně) by se měla použít maximálně dávka 1 000 mg/kg tělesné hmotnosti (pokud se látka podává inhalační cestou, viz pokyny v kapitole B.2 této přílohy; obvykle tato dávka nepřesahuje 2 mg/l). Úvahy specifické pro danou chemickou látku mohou vyžadovat vyšší dávku v závislosti na potřebách regulačních opatření. Výběr dávky by měl být vždy zdůvodněn.

26. Údaje o toxikokinetice a distribuci látky v tkáních po jednorázové dávce mohou být dostačující pro stanovení potenciálu akumulace a/nebo perzistence. Nicméně za určitých okolností může být třeba podávat dávku opakovaně i) aby bylo úplnější zhodnocení potenciálu akumulace a/nebo perzistence či změny v TK (tj. například indukce a inhibice enzymů) nebo ii) protože to vyžaduje příslušný regulační systém. Ve studiích s opakovaným podáváním dávky obvykle postačí opakované podávání nízké dávky, avšak za jistých okolností může být nutné podávat opakovaně vysokou dávku (viz také odstavec 57).

Podávání zkoušené chemické látky

27. Pokud je známo, jaký nosiči byl použit pro studie orální toxicity s danou chemickou látkou podávanou nitrožaludečně, měla by se zkoušená chemická látka rozpustit nebo homogenně suspendovat ve stejném nosiči. Mělo by se uvést zdůvodnění výběru nosiče. Výběr nosiče a objemu dávkování by se měl zvážit v návrhu studie. Obvyklým způsobem podání je žaludeční sonda, avšak ve speciálních případech může být výhodné podávat látku ve formě želatinové tobolky nebo ve směsi s potravou (v obou případech je třeba uvést zdůvodnění). Mělo by se uvést ověření skutečné dávky podané každému zvířeti.

28. Maximální objem tekutiny, který se podává najednou žaludeční sondou, závisí na velikosti pokusného zvířete, druhu nosiče dávky a na skutečnosti, zda je před podáním zkoušené chemické látky pozastaveno krmení či nikoli. Mělo by se uvést zdůvodnění pro podávání nebo omezení krmiva před podáním dávky. Objem dávky by měl být za běžných okolností co možná nejnižší, až už se použijí vodné nebo jiné nosiče. Objemy dávky by u hlodavců obvykle neměly přesáhnout 10 ml/kg tělesné hmotnosti. Objemy nosičů použitých pro lipofilnější zkoušené chemické látky mohou začínat na 4 ml/kg tělesné hmotnosti. Při opakovaném podávání dávky, kdy je lačnění přes den kontraindikováno, by se mělo uvažovat o nižších objemech dávky (např. 2–4 ml/kg tělesné hmotnosti). Kdykoli je to možné, může se zvážit použití stejného objemu dávky, jaký byl podáván žaludeční sondou v jiných orálních studiích zkoušené chemické látky.

29. K stanovení biologické dostupnosti nebo relativní orální absorpce je možné použít nitrožilní (intravenózní, IV) podání zkoušené chemické látky a měření hladiny zkoušené chemické látky v krvi a/nebo exkretech. V případě IV studie se podává jednorázová dávka (obvykle odpovídající nižší orální dávce, avšak ji nepřesahující – viz výběr dávky) zkoušené chemické látky s pomocí vhodného nosiče. Tento materiál by se měl podávat ve vhodném objemu (např. 1 ml/kg tělesné hmotnosti) na vybraném místě podání alespoň čtyřem zvířatům vhodného pohlaví (je-li to potřeba, mohou se použít obě pohlaví, viz odstavec 16). K podání zkoušené chemické látky intravenózně je nutné, aby byla dávka plně rozpuštěna nebo suspendována. Nosič použitý při IV podání by neměl ovlivňovat integritu krve ani krevní tok. Jestliže se zkoušená chemická látka podává infuzí a používá-li se infuzní pumpa, měla by se uvést infuzní rychlost a měla by být standardizována pro všechna zvířata. Je-li zaváděna kanyla do *vena jugularis* (k podání zkoušené chemické látky a/nebo odběru krve) nebo podává-li se látka do *arteria femoralis*, měla by se použít anestézie. Druh anestézie je třeba náležitě

▼M4

zvážit, neboť může ovlivnit toxikokinetiku. Zvířatům by se měl ponechat dostatek času na náležité zotavení před podáním zkoušené chemické látky a nosiče.

30. Ostatní cesty podání, např. dermální a inhalační (viz odstavce 74–78), se mohou použít u určitých druhů zkoušených chemických látek s ohledem na jejich fyzikálně-chemické vlastnosti a očekávané použití nebo expozici u člověka.

Měření

Látková bilance

31. Látková bilance se stanoví sečtením procentuálního zastoupení podané (radioaktivní) dávky, která se vyloučila močí, výkaly a vydechovaným vzduchem, a procentuálního zastoupení v tkáních, zbývajících částech mrtvého těla a ve zbytcích vymytých z klece (viz odstavec 46). Obvykle se považují celkové výtěžky podané chemické látky (radioaktivní) nad 90 % za dostatečné.

Absorpce

32. Úvodní odhad absorpce lze stanovit tak, že se z látkové bilance odečte procentuální zastoupení dávky v gastrointestinálním (GI) traktu a/nebo výkalech. Výpočet procentuální absorpce uvádí odstavec 33. Vyšetření exkretů uvádí odstavce 44–49. Nelze-li ze studií látkové bilance určit přesnou míru absorpce po orálním podání dávky (např. když je více než 20 % podané dávky přítomno ve výkalech), může být nezbytné provést další vyšetření. Tyto studie se mohou zahrnovat buď 1) orální podání zkoušené chemické látky a měření obsahu zkoušené chemické látky ve žluči, nebo 2) orální a IV podání zkoušené chemické látky a měření čistého množství zkoušené chemické látky přítomné v moči a vydechovaném vzduchu a v mrtvém těle při každé z těchto dvou cest. V obou plánech studie se provádí měření radioaktivity jako náhradní metoda za chemicky specifickou analýzu zkoušené chemické látky a metabolitů.

33. Provádí-li se studie exkrece žlučí, používá se obvykle orální cesta podání. V této studii by se měly kanylovat žlučovody alespoň čtyř zvířat vhodného pohlaví (nebo obou pohlaví, je-li to opodstatněné) a měla by se jim podat jednorázová dávka zkoušené chemické látky. Po podání zkoušené chemické látky by se měla sledovat exkrece radioaktivní/zkoušené chemické látky ve žluči tak dlouho, jak je potřeba pro určení procentuálního podílu podané dávky, který se vylučuje touto cestou a který lze použít k přímému výpočtu míry orální absorpce takto:

$$\text{Procentuální absorpce} = \frac{(\text{množství ve žluči} + \text{moči} + \text{vydechovaném vzduchu} + \text{mrtvém těle bez obsahu GI traktu})/\text{podané množství}}{\times\ 100}$$

34. U některých tříd zkoušených chemických látek může dojít k přímé sekreci absorbované dávky přes střevní stěnu. V takových případech se měření % dávky ve výkalech po orálním podání dávky u potkana s kanylovanými žlučovody nepovažuje za odpovídající neabsorbované dávce. Doporučuje se, aby se v případě, kdy podle předpokladů dochází k sekreci látky ze střev, zakládalo stanovení % absorbované dávky na absorpci vypočítané ze srovnání exkrece po orální a IV cestě podání (potkan s kanylovanými žlučovody nebo intaktní) (viz odstavec 35). Rovněž se doporučuje, aby se v případě, kdy se považuje za nutné kvantifikovat střevní sekreci, měřila exkrece u potkana s kanylovanými žlučovody po IV podání dávky.

▼M4

Biologická dostupnost

35. Biologickou dostupnost lze stanovit z kinetiky látky v plazmě/krvi u skupin s orálním a IV podáním, jak popisují odstavce 50–52, specifickou chemickou analýzou zkoušené chemické látky a/nebo příslušného metabolitu (příslušných metabolitů), a radioizotopově značená zkoušená chemická látka proto není nutná. Výpočet biologické dostupnosti (F) zkoušené chemické látky nebo příslušného metabolitu (příslušných metabolitů) lze provést následovně:

$$F = (AUC_{exp}/AUC_{IV}) \times (Dávka_{IV}/Dávka_{exp})$$

kde AUC je plocha pod křivkou závislosti koncentrace v plazmě na čase a exp je experimentální cesta podání (orální, dermální nebo inhalační).

36. K posouzení rizika systémových účinků se obvykle upřednostňuje použití biologické dostupnosti toxické složky před procentuální absorpcí, když se porovnávají systémové koncentrace ze studií na zvířatech s analogickými údaji z biomonitorování ve studiích expozice pracovníků. Situace se může stát složitější, pokud se dávky nacházejí v nelineárním rozmezí, proto je důležité, aby se při toxikokinetickém screeningu stanovily dávky v lineárním rozmezí.

Distribuce v tkáních

37. Poznatky o distribuci zkoušené chemické látky a/nebo jejích metabolitů v tkáních jsou důležité pro identifikaci cílových tkání a pochopení základních mechanismů toxicity a pro získání informací o schopnosti akumulace a perzistence zkoušené chemické látky a jejích metabolitů. Procentuální podíl celkové (radioaktivní) dávky v tkáních a rovněž ve zbylém mrtvém těle by se měl měřit alespoň při ukončení exkrečního experimentu (např. obvykle do 7 dnů či méně po podání dávky v závislosti na specifickém chování zkoušené chemické látky). Pokud při ukončení studie není v tkáních detekována žádná zkoušená chemická látka (např. protože mohlo k její eliminaci dojít ještě před ukončením studie v důsledku krátkého eliminačního poločasu), je třeba důsledně předcházet nesprávné interpretaci údajů. V takové situaci by se měla distribuce v tkáních vyšetřit v době maximální koncentrace zkoušené chemické látky (a/nebo metabolitu) v plazmě/krvi (T_{max}) nebo v době maximální míry exkrece látky močí dle vhodnosti (viz odstavec 38). Kromě toho může být potřeba odebrat tkáň ještě v dalších časových bodech k stanovení distribuce zkoušené chemické látky a/nebo jejích metabolitů v tkáních, zhodnocení závislosti na čase (je-li vhodné), pomoci při stanovení látkové bilance a/nebo na základě požadavků příslušného orgánu. Mezi tkáně, které by se měly odebrat, patří játra, tuková tkáň, GI trakt, ledviny, slezina, krev jako celek, zbylé části mrtvého těla, tkáně cílových orgánů a jakékoli další tkáně (např. štítná žláza, erytrocyty, reprodukční orgány, kůže, oči – zejména u zvířat s pigmentací), které mohou mít význam při toxikologickém hodnocení zkoušené chemické látky. Měla by se zvážit analýza dalších tkání ve stejných časových bodech za účelem maximálního využití zvířat a v případě, kdy je ve studiích subchronické a chronické toxicity pozorována toxicita vůči cílovým orgánům. Měly by se rovněž uvádět (radioaktivní) zbytkové koncentrace a poměr tkání a plazmy (krví).

38. Zhodnocení distribuce v tkáních v dalších časových bodech, jako je čas maximální koncentrace látky v plazmě/krvi (T_{max}) nebo čas maximální míry exkrece látky močí, v příslušných experimentech zkoumajících kinetiku látky v plazmě/krvi nebo exkreci látky, může být také potřebné nebo jej může vyžadovat příslušný orgán. Tyto informace mohou být užitečné k pochopení toxicity a schopnosti akumulace a perzistence zkoušené chemické látky a jejích metabolitů. Mělo by se uvést zdůvodnění výběru vzorků. Vzorky k analýze by měly být obvykle stejné jako výše zmiňované (viz odstavec 37).

▼M4

39. Kvantifikaci radioaktivity ve studiích distribuce v tkáních lze provést preparací orgánu, homogenizací, spálením a/nebo solubilizací, po čemž následuje kapalinová scintilační spektrometrie (LSC) zachycených reziduí. Při stanovování distribuce zkoušené chemické látky v orgánech a/nebo tkáních mohou být užitečné určité techniky, které jsou v současnosti v různých fázích vývoje, např. kvantitativní celotělová autoradiografie a receptorová mikroskopická autoradiografie (3), (4).

40. U jiných cest expozice než orální by se měly odebrat a analyzovat specifické tkáně, jako jsou plíce v inhalačních studiích a kůže v dermálních studiích. Viz odstavce 74–78.

Metabolismus

41. Pro identifikaci a kvantifikaci nezměněné zkoušené chemické látky a metabolitů by se měly odebrat exkrety (a plazma, je-li to vhodné), jak je popsáno v odstavcích 44–49. Sloučení exkretů v rámci skupiny s danou dávkou k usnadnění identifikace metabolitů je přípustné. Doporučuje se určit profil metabolitů v každém časovém období. Pokud však množství vzorků a/nebo výše radioaktivity nejsou dostatečné, je přípustné sloučit moč a výkaly z několika časových bodů. Slučování vzorků odebraných různým pohlavím nebo při různých dávkách však přípustné není. K analýze moči, výkalů, radioaktivity uvolněné z exponovaných zvířat a případně žluči by se měly použít vhodné kvalitativní a kvantitativní metody.

42. Mělo by se vynaložit dostatečné úsilí k identifikaci všech metabolitů, které představují 5 % množství podané dávky či větším a k vytvoření metabolického schématu zkoušené chemické látky. Měly by se identifikovat zkoušené chemické látky, které byly zjištěny v exkretech v množství 5 % podané dávky a větším,. Identifikací se rozumí přesné určení struktury složek. Obvykle se identifikace provádí simultánní chromatografií metabolitu se známými standardy s použitím dvou rozdílných systémů nebo pomocí technik schopných provést pozitivní identifikaci struktury, jako je hmotnostní spektrometrie, nukleární magnetická rezonance (NMR) atd. V případě simultánní chromatografie se chromatografické techniky používající stejnou stacionární fázi se dvěma různými systémy rozpouštědla nepovažují za dostatečnou verifikaci metabolitu dvěma metodami, neboť tyto metody nejsou nezávislé. Identifikace pomocí simultánní chromatografie by se měla provést pomocí dvou rozdílných analyticky nezávislých systémů, jako je například chromatografie na tenké vrstvě (TLC) s reverzní a normální fází a vysoce účinná kapalinová chromatografie (HPLC). Jestliže je chromatografická separace dostatečně kvalitní, není další potvrzení pomocí spektroskopických postupů nutné. Jednoznačné identifikace lze dosáhnout také pomocí metod podávajících informace o struktuře, jako je kapalinová chromatografie/hmotnostní spektrometrie (LC-MS) nebo kapalinová chromatografie/tandemová hmotnostní spektrometrie (LC-MS/MS), plynová chromatografie/hmotnostní spektrometrie (GC-MS) a NMR spektrometrie.

43. Jestliže identifikace metabolitů představujících 5 % množství podané dávky a větší není možná, mělo by se v závěrečné zprávě uvést zdůvodnění/vysvětlení. Může být vhodné identifikovat metabolity představující méně než 5 % podané dávky k lepšímu pochopení metabolické dráhy zkoušené chemické látky pro posouzení její nebezpečnosti a/nebo rizik. Kdykoli je to možné, mělo by se uvést potvrzení struktury. To může zahrnovat určení jejího profilu v plazmě, krvi nebo jiných tkáních.

▼M4

Vylučování

44. Rychlost a rozsah vylučování podané dávky by se měly určit měřením procentuální výtěžnosti (radioaktivní) dávky z moči, výkalů a vydechovaného vzduchu. Tyto údaje rovněž pomohou při stanovení látkové bilance. Množství zkoušené chemické látky (radioaktivita) vyloučené v moči, výkalech a vydechovaném vzduchu by se mělo stanovovat ve vhodných časových intervalech (viz odstavce 47–49). Experimenty s opakovaným podáváním dávky by měly být správně navrženy tak, aby umožnily sběr údajů o exkreci ke splnění cílů popsaných v odstavci 26. Umožní to srovnání s experimenty s jednorázovou dávkou.

45. Jestliže pilotní studie prokázala, že se ve vydechovaném vzduchu nevylučuje žádné významné množství zkoušené chemické látky (radioaktivity) (dle odstavce 49), nemusí se v konečné studii vydechovaný vzduch odebírat.

46. Každé zvíře se musí umístit do oddělené metabolické jednotky pro sběr exkretů (moč, výkaly a vydechovaný vzduch). Na konci každého období sběru (viz odstavce 47–49) by se měly metabolické jednotky vypláchnout vhodným rozpouštědlem (tomu se říká „vymytí klece“) aby se zajistil maximální výtěžek zkoušené chemické látky (radioaktivity). Sběr exkretů by se měl ukončit 7. den nebo poté, co bylo získáno alespoň 90 % podané dávky, podle toho, co nastane dříve.

47. Celková množství zkoušené chemické látky (radioaktivity) v moči se musí stanovit v 1. den sběru alespoň ve dvou časových bodech, z nichž jeden by měl být 24 h po podání dávky, a poté se stanovují denně až do konce studie. První den se doporučuje zvolit více než dva odběrové časy (např. po 6 h, 12 h a 24 h). Výsledky pilotních studií by se měly analyzovat, aby se získaly informace k určení alternativních nebo doplňujících odběrových časů. Odběrová schémata by měla být zdůvodněna.

48. Celková množství zkoušené chemické látky (radioaktivity) ve výkalech by se měla stanovovat denně, s prvním odběrem 24 h po podání dávky, až do konce studie, pokud pilotní studie nenavrhuje alternativní nebo doplňující odběrové časy. Alternativní odběrová schémata by měla být zdůvodněna.

49. Sběr vydechovaného CO_2 a dalších těkavých materiálů lze v daném studijním experimentu ukončit, jestliže se během 24hodinového období sběru ve vydechovaném vzduchu nalezne méně než 1 % podané dávky.

Studie časového průběhu

Kinetika v plazmě/krvi

50. Cílem těchto studií je získat odhady základních TK parametrů [např. C_{max}, T_{max}, eliminační poločas ($t_{1/2}$), AUC] zkoušené chemické látky. Tyto studie lze provádět s jednou dávkou nebo – pravděpodobněji – se dvěma a více dávkami. Nastavení dávek by se mělo určit podle podstaty experimentu a/nebo příslušné tkáně. Kinetické údaje mohou být zapotřebí k řešení otázek, jako je biologická dostupnost zkoušené chemické látky a/nebo k objasnění účinku dávky na clearanci (např. k objasnění, zda je clearance saturována způsobem závisejícím na dávce).

51. V těchto studiích by se měla použít nejméně čtyři zvířata jednoho pohlaví pro každou skupinu s příslušnou dávkou. Mělo by se uvést zdůvodnění pro výběr pohlaví použitých zvířat. Použití obou pohlaví (čtyři samci a čtyři samice) by se mělo zvážit, jestliže existují důkazy, které svědčí o významných rozdílech v toxicitě v závislosti na pohlaví.

▼M4

52. Po podání zkoušené chemické látky (radioizotopově značené) by se měly každému zvířeti ve vhodnou dobu odebrat krevní vzorky pomocí náležité metodiky odběru. Objem a množství krevních vzorků, které lze získat od jednoho zvířete, může být limitován potenciálními účinky opakovaného odběru na zdraví/fyziologii zvířete a/nebo citlivostí analytické metody. Vzorky by se měly analyzovat u každého jednotlivého zvířete zvlášť. Za určitých okolností (např. charakterizace metabolitů), může být nutné sloučit vzorky od více než jednoho zvířete. Sloučené vzorky by měly být jasně označené a mělo by se podat zdůvodnění sloučení vzorků. Používá-li se radioizotopově značená zkoušená chemická látka, může být postačující analýza celkové přítomné radioaktivity. Je-li tomu tak, měla by se celková radioaktivita analyzovat v krvi a plazmě nebo v plazmě a červených krvinkách, aby byl možný výpočet podílu látky v krvi/plazmě. V jiných případech mohou být nezbytná specifičtější vyšetření vyžadující identifikaci mateřské sloučeniny a/nebo metabolitů nebo vyhodnocení vazby na proteiny.

Kinetika v dalších tkáních

53. Cílem těchto studií je získat informace o časovém průběhu, aby bylo možno zodpovědět otázky týkající se např. způsobu toxického účinku, bioakumulace a bioperzistence pomocí stanovení hladiny zkoušené chemické látky v různých tkáních. Výběr tkání a počet hodnocených časových bodů bude záviset na příslušné tkáni a na databázi toxikologických údajů o zkoušené chemické látce. Plán těchto studií kinetiky v dalších tkáních by měl brát v úvahu také informace získané postupy popsanými v odstavcích 37–40. Tyto studie mohou používat jednorázové nebo opakované podání dávky. Mělo by se uvést podrobné zdůvodnění použitého postupu.

54. Mezi důvody pro provádění studií kinetiky v dalších tkáních může patřit:

— důkaz prodlouženého eliminačního poločasu v krvi naznačující možnou akumulaci zkoušené chemické látky v různých tkáních nebo

— zájem zjistit, zda bylo v konkrétních tkáních dosaženo ustáleného stavu (např. ve studiích s opakovanými dávkami může být zájem zjistit, zda bylo dosaženo ustáleného stavu v cílových tkáních v okamžiku, kdy bylo zdánlivě dosaženo ustáleného stavu zkoušené chemické látky v krvi).

55. V těchto typech studií sledujících časový průběh by se měla podat příslušná orální dávka zkoušené chemické látky nejméně čtyřem zvířatům pro každou dávku a každý časový bod a ve vybraných tkáních se poté sleduje časový průběh distribuce. Je možno použít pouze jedno pohlaví, pokud nebyla pozorována toxicita specifická pro pohlaví. Zda se bude analyzovat celková radioaktivita nebo mateřská chemická látka a/nebo metabolity bude rovněž záviset na příslušné tkáni. Vyhodnocení distribuce v tkáních by se mělo provádět pomocí vhodných technik.

Enzymová indukce/inhibice

56. Studie sledující možné účinky enzymové indukce/inhibice nebo biotransformace studované zkoušené chemické látky mohou být zapotřebí v jednom nebo více z následujících případů:

1) dostupné důkazy naznačují vztah mezi biotransformací zkoušené chemické látky a zvýšenou toxicitou;

2) dostupné údaje o toxicitě naznačují nelineární vztah mezi dávkou a metabolismem;

▼M4

3) výsledky studií identifikace metabolitů prokázaly identifikaci potenciálně toxického metabolitu, který by mohl být produkován enzymovou drahou indukovanou zkoušenou chemickou látkou;

4) při vysvětlování účinků, o nichž se tvrdí, že jsou spojeny s fenoménem enzymové indukce;

5) jsou-li pozorovány toxikologicky významné změny metabolického profilu zkoušené chemické látky buď v *in vitro,* nebo v *in vivo* experimentech s různými druhy či za různých podmínek, může být potřebná charakterizace zúčastněného enzymu (zúčastněných enzymů) (např. enzymy fáze I, jako jsou isoenzymy systému monooxygenázy závislém na cytochromu P450, enzymy fáze II, jako jsou isoenzymy sulfotransferázy nebo uridin-difosfát-glukuronosyl-transferázy nebo jakékoli další relevantní enzymy). Tyto informace lze použít ke zhodnocení vhodnosti mezidruhových extrapolací.

57. Ke zhodnocení změn TK souvisejících se zkoušenou chemickou látkou by se měly použít vhodné protokoly studie, náležitě validované a zdůvodněné. Ukázkové plány studie se skládají z opakovaného podávání dávky neznačené zkoušené chemické látky, po němž následuje 14. den jednorázová radioizotopově značená dávka nebo opakované podávání dávek radioizotopově značené zkoušené chemické látky a odběry vzorků 1., 7. a 14. den ke stanovení profilu metabolitů. Opakované podávání dávky radioizotopově značené zkoušené chemické látky může rovněž poskytnout informace o bioakumulaci (viz odstavec 26).

DOPLŇKOVÉ POSTUPY

58. Doplňkové postupy nad rámec experimentů *in vivo* popsané v této zkušební metodě mohou poskytnout užitečné informace o absorpci, distribuci, metabolismu či eliminaci zkoušené chemické látky u určitých druhů.

Použití informací *in vitro*

59. Několik otázek týkajících se metabolismu zkoušené chemické látky lze vyřešit pomocí studií *in vitro* používajících vhodné zkušební systémy. Čerstvě izolované nebo kultivované hepatocyty a subcelulární frakce (např. mikrozomy a cytosol nebo frakce S9) z jater lze použít ke studiu možných metabolitů. Lokální metabolismus v cílovém orgánu, např. plicích, může být předmětem zájmu při posuzování rizik. K těmto účelům mohou být vhodné mikrozomální frakce cílových tkání. Studie na mikrozomech mohou být užitečné ke zkoumání potenciálních rozdílů mezi pohlavími a životními stadii a k charakterizaci enzymatických parametrů (K_m a V_{max}), které mohou pomoci při hodnocení závislosti metabolismu na dávce v souvislosti s úrovněmi expozice. Dále mohou být mikrozomy užitečné k identifikaci specifických mikrozomálních enzymů účastnících se metabolismu zkoušené chemické látky, které mohou být významné při mezidruhové extrapolaci (viz také odstavec 56). Schopnost indukce biotransformace lze rovněž zkoumat za použití subcelulárních frakcí z jater (např. mikrozomy a cytosol) zvířat předběžně vystavených příslušné zkoušené chemické látce, *in vitro* prostřednictvím studií indukce hepatocytů nebo pomocí specifických buněčných linií exprimujících příslušné enzymy. Za určitých okolností a vhodných podmínek lze uvažovat o použití subcelulárních frakcí z lidských tkání k stanovení potenciálních rozdílů v biotransformaci mezi druhy. Výsledky zkoumání *in vitro* mohou být rovněž užitečné při vývoji modelů PBTK (5).

▼M4

60. *In vitro* studie dermální absorpce mohou poskytnout doplňující informace k charakterizaci absorpce (6).

61. Primární buněčné kultury z jaterních buněk a čerstvé tkáňové řezy lze použít k zodpovězení podobných otázek jako u jaterních mikrozomů. V určitých případech se může podařit zodpovědět konkrétní otázky za použití buněčných linií s definovanou expresí příslušného enzymu nebo buněčných linií připravených pomocí genetického inženýrství. V určitých případech může být užitečné studovat inhibici a indukci specifických isoenzymů cytochromu P450 (např. CYP1A1, 2E1, 1A2 a dalších) a/nebo enzymů fáze II mateřskou sloučeninou ve studiích *in vitro*. Získané informace mohou být užitečné u sloučenin s podobnou strukturou.

Použití toxikokinetických údajů ze studií toxicity jako doplňující informace

62. Analýza vzorků krve, tkání a/nebo exkretů získaných během jakýchkoli jiných studií toxicity může poskytnout údaje o biologické dostupnosti, změnách v plazmatických koncentracích v čase (AUC, C_{max}), schopnosti bioakumulace, rychlostech clearance a o změnách v metabolismu a kinetice souvisejících s pohlavím nebo životním stadiem.

63. Posouzení plánu studie lze použít k zodpovězení otázek týkajících se saturace absorpce, drah biotransformace nebo exkrece při vyšších úrovních dávek, působení nových metabolických drah při vyšších úrovních dávek a omezení toxických metabolitů na vyšší dávky.

64. Další úvahy při hodnocení nebezpečnosti by se mohly týkat například těchto charakteristik:

— citlivosti spojené s věkem v důsledku rozdílů ve stavu hematoencefalické bariéry, ledvin a/nebo detoxikačních schopností,

— subpopulační citlivosti v důsledku rozdílů v biotransformačních schopnostech nebo jiných TK rozdílech,

— míry expozice plodu prostřednictvím transplacentárního přenosu chemických látek nebo novorozence prostřednictvím laktace.

Použití toxikokinetického modelování

65. Toxikokinetické modely mohou být užitečné pro různé aspekty posouzení nebezpečnosti a rizik, například při predikci systémové expozice a vnitřní dávky v tkáni. Dále je možno zabývat se v těchto modelech specifickými otázkami týkajícími se způsobu účinku a tyto modely mohou představovat základ pro mezidruhovou extrapolaci, extrapolaci mezi cestami expozice, režimy dávkování a pro posouzení rizik pro člověka. Mezi údaje, které jsou užitečné pro vývoj modelů PBTK pro zkoušenou chemickou látku u jakéhokoliv druhu, patří 1) rozdělovací koeficienty, 2) biochemické konstanty a fyziologické parametry, 3) absorpční parametry specifické pro cestu podání a 4) *in vivo* kinetické údaje pro modelové hodnocení [např. parametry clearance pro příslušné (> 10 %) dráhy exkrece, K_m a V_{max} pro metabolismus]. Experimentální data používaná při vývoji modelu by měla být získána pomocí řádných vědeckých metod a modelové výsledky by měly být validovány. K usnadnění vývoje nekompartmentálních modelů nebo modelů na fyziologické bázi se často stanovují parametry specifické pro zkoušenou chemickou látku a živočišný druh, jako jsou rychlosti absorpce, rozdělení látky mezi krev a tkáně a konstanty metabolické rychlosti.

▼M4

ÚDAJE A JEJICH PŘEDKLÁDÁNÍ

66. Doporučuje se, aby ve zprávě o studii byl uveden i její obsah.

Hlavní část zprávy

67. Hlavní část zprávy by měla obsahovat informace získané v této zkušební metodě rozčleněné do oddílů a odstavců následujícím způsobem:

Shrnutí

68. Tento oddíl zprávy o studii by měl obsahovat shrnutí plánu studie a popis použitých metod. Měl by také zdůraznit klíčové výsledky týkající se látkové bilance, povahy a významu metabolitů, tkáňových reziduí, rychlosti clearance, bioakumulačního potenciálu, rozdílů mezi pohlavími atd. Souhrn by měl být dostatečně podrobný, aby umožňoval zhodnocení výsledků.

Úvod

69. Tento oddíl zprávy by měl obsahovat cíle studie, zdůvodnění a plán a rovněž příslušné odkazy na literaturu a jakékoli podkladové historické údaje.

Materiál a metody

70. Tento oddíl zprávy by měl obsahovat podrobné popisy všech relevantních informací, mezi něž patří:

a) Zkoušená chemická látka

Tento pododdíl by měl obsahovat identifikaci zkoušené chemické látky: chemický název, molekulární strukturu, kvalitativní a kvantitativní stanovení jejího chemického složení, chemickou čistotu a – je-li to možné – druh a množství nečistot. Rovněž by měl obsahovat informace o fyzikálně-chemických vlastnostech včetně skupenství, barvy, přibližné rozpustnosti a/nebo rozdělovacího koeficientu, stability a případně žíravosti. Případně by se měly uvést informace o izomerech. Je-li zkoušená chemická látka radioizotopově značená, měly by se do tohoto pododdílu zahrnout informace o typu radionuklidu, pozici značky, specifické aktivitě a radiochemické čistotě.

Měl by se uvést druh nebo popis jakéhokoliv nosiče, rozpouštědel, suspenzních a emulgačních činidel či jiných materiálů použitých při podávání zkoušené chemické látky.

b) Pokusná zvířata

Tento pododdíl by měl obsahovat informace o pokusných zvířatech, včetně výběru druhu a zdůvodnění výběru příslušného druhu, kmene a stáří na počátku studie, pohlaví a rovněž tělesné hmotnosti, zdravotního stavu a zvířecího chovu.

c) Metody

Tento pododdíl by měl obsahovat podrobnosti o plánu studie a použité metodice. Měl by zahrnovat:

1) zdůvodnění jakékoli úpravy cesty expozice a případně podmínek expozice;

▼M4

2) zdůvodnění výběru úrovní dávek;

3) popis pilotních studií použitých v experimentálním plánu následných studií, je-li to vhodné. Měly by se předložit podpůrné údaje pro pilotní studie;

4) popis přípravy podávaného roztoku a druh použitého rozpouštědla nebo nosiče, pokud se používaly;

5) počet exponovaných skupin zvířat a počet zvířat v každé skupině;

6) úrovně a objemy dávek (a specifická aktivita dávky, používá-li se radioaktivita);

7) cestu (cesty) a způsoby podání;

8) četnost podávání dávky;

9) období lačnění (pokud se použilo);

10) celkovou radioaktivitu působící na každé zvíře;

11) popis manipulace se zvířaty;

12) odběr vzorků a manipulace s nimi;

13) analytické metody použité k separaci, kvantifikaci a identifikaci metabolitů;

14) mez detekce použitých metod;

15) další použitá experimentální měření a postupy (včetně validace metod pro analýzu metabolitů).

d) Statistická analýza

Pokud se k analýze výsledků studie používá statistická analýza, měly by se uvést dostatečné informace o metodě analýzy a použitý výpočetní program, aby mohl nezávislý recenzent/statistik analýzu znovu vyhodnotit a rekonstruovat.

V případě studií modelujících systémy, například PBTK, by mělo představení modelů obsahovat kompletní popis modelů umožňující nezávislou rekonstrukci a validaci modelu (viz odstavec 65 a dodatek: Definice).

Výsledky

71. Veškeré údaje by se měly shrnout a uvést v tabulkách spolu s příslušným statistickým vyhodnocením a popsat v textu tohoto oddílu. Naměřené údaje o radioaktivitě by se měly shrnout a uvést způsobem vhodným pro studii, obvykle jako počet mikrogramů nebo miligramů na hmotnost vzorku, lze však použít i jiné jednotky. Tento oddíl by měl obsahovat grafická znázornění výsledků, reprodukci příslušných chromatografických a spektrometrických údajů, identifikaci/kvantifikaci metabolitů a navrhované metabolické dráhy, včetně molekulární struktury metabolitů. Kromě toho by se měly v tomto oddíle uvést následující informace, je-li to možné:

1) kvantita a procentuální výtěžek radioaktivity v moči, výkalech, vydechovaném vzduchu a v rozpouštědle po vymytí klece od moči a výkalů:

— u dermálních studií rovněž uveďte údaje o výtěžku zkoušené chemické látky z exponované kůže, oplachů kůže a zbytkovou radioaktivitu v materiálu pokrývajícím kůži a v metabolické jednotce a také výsledky studie oplachů kůže. Další diskusi naleznete v odstavcích 74–77,

▼M4

— u inhalačních studií rovněž uveďte údaje o výtěžku zkoušené chemické látky z plic a nosních tkání (8). Další diskusi naleznete v odstavci 78;

2) distribuce v tkáních uvedená jako procento podané dávky a koncentrace (počet mikrogramů na gram tkáně) a podíly množství látky v tkáni vůči krvi nebo v tkáni vůči plazmě;

3) látková bilance z každé studie zahrnující rozbor tělních tkání a exkretů;

4) plazmatické koncentrace a toxikokinetické parametry (biologická dostupnost, AUC, Cmax, Tmax, clearance, eliminační poločas) po podání látky příslušnou cestou (příslušnými cestami) expozice;

5) rychlost a míra absorpce zkoušené chemické látky po podání příslušnou cestou (příslušnými cestami) expozice;

6) množství zkoušené chemické látky a metabolitů (uvedená jako procento podané dávky) v exkretech;

7) odkaz na údaje v dodatku, které obsahují všechny údaje týkající se měřených cílových parametrů u jednotlivých zvířat (např. podání dávky, procentuální výtěžek, koncentrace, TK parametry atd.);

8) Obrázek s navrhovanými metabolickými drahami a molekulárními strukturami metabolitů.

Diskuse a závěry

72. V tomto oddíle by měl autor (by měli autoři):

1) uvést navrhovanou metabolickou dráhu vycházející z výsledků týkajících se metabolismu a rozmístění zkoušené chemické látky;

2) prodiskutovat jakékoli potenciální druhové a pohlavní rozdíly týkající se distribuce a/nebo biotransformace zkoušené chemické látky;

3) uvést v tabulkách a prodiskutovat identifikaci a význam metabolitů, rychlosti clearance, bioakumulační potenciál a množství tkáňových reziduí mateřské sloučeniny a/nebo metabolitu (metabolitů) a rovněž změny TK parametrů v závislosti na dávce, je-li to vhodné;

4) zahrnout do tohoto oddílu všechny relevantní TK údaje získané během provádění studií toxicity;

5) uvést stručný a výstižný závěr, který lze podložit výsledky studie;

6) přidat další oddíly (dle potřeby či vhodnosti).

73. Další oddíly by měly sloužit k uvedení podpůrných informací z literatury, tabulek, obrázků, dodatků atd.

▼M4

ALTERNATIVNÍ CESTY EXPOZICE

Dermální

Dermální aplikace

74. Tento oddíl uvádí specifické informace ohledně zkoumání toxikokinetiky zkoušené chemické látky při aplikaci dermální cestou. Pro informace o dermální absorpci je třeba nahlédnout do kapitoly B.44 této přílohy [Absorpce kůží: metoda *in vivo* (9)]. U ostatních cílových parametrů, jako jsou distribuce a metabolismus, je možno použít tuto zkušební metodu B.36. Při dermální aplikaci by se měla použít jedna nebo více úrovní dávky zkoušené chemické látky. Zkoušená chemická látka (např. čistý, zředěný, nebo formulovaný materiál obsahující zkoušenou chemickou látku, která je aplikována na kůži) by měla být stejná jako ta, které mohou být lidé nebo jiné potenciální cílové druhy vystaveny (nebo by měla být její realistickou náhražkou). Úroveň (úrovně) dávky by se měly vybrat v souladu s odstavci 20–26 této zkušební metody. Mezi faktory, které by se měly vzít v úvahu při výběru dermální dávky, patří očekávaná expozice člověka a/nebo dávky, při nichž byla pozorována toxicita v jiných studiích dermální toxicity. Dermální dávka (dávky) by se měla v případě potřeby rozpustit ve vhodném nosiči a aplikovat v objemu dostatečném pro její dodání. Krátce před zahájením zkoušky by se měla zvířatům ostříhat srst na zádech. Vyholení srsti je rovněž možné, mělo by se však provést asi 24 hodin před zkouškou. Při stříhání nebo holení srsti je třeba dbát na to, aby se neporanila kůže, což by mohlo změnit její prostupnost. Pro aplikaci zkoušené chemické látky by se mělo obnažit přibližně 10 % tělesného povrchu. U vysoce toxických chemických látek může být tato plocha menší než přibližně 10 %, avšak měla by se pokrýt co možná největší plocha tenkou a rovnoměrnou vrstvičkou látky. U všech zkoušených skupin by se měla k aplikaci látky použít stejná plocha povrchu. Plochy s nanesenou dávkou by se měly chránit vhodným krytím, které se upevní v daném místě. Zvířata by se měla chovat odděleně.

75. Měla by se provést studie mytí kůže k stanovení množství aplikované dávky zkoušené chemické látky, které lze z kůže odstranit mytím ošetřené oblasti kůže jemným mýdlem a vodou. Tato studie může rovněž pomoci při stanovování látkové bilance, pokud je zkoušená chemická látka podávána dermální cestou. Při této studii mytí kůže by se měla aplikovat dvěma zvířatům jedna dávka zkoušené chemické látky. Úroveň dávky se zvolí v souladu s odstavcem 23 této zkušební metody (viz rovněž diskusi o době kontaktu s kůží v odstavci 76). Měla by se stanovit množství zkoušené chemické látky získaná z těchto mytí, aby se zhodnotila účinnost odstranění zkoušené chemické látky mytím.

76. Pokud to není vyloučeno kvůli žíravosti, měla by se zkoušená chemická látka aplikovat a udržovat na kůži alespoň 6 hodin. Po odstranění krytí by se měla ošetřená oblast umýt postupem uvedeným ve studii mytí kůže (viz odstavec 75). V krytí i v tekutině z mytí by se měla analyzovat zbytková zkoušená chemická látka. Při ukončení studií by se měla všechna zvířata humánním způsobem utratit v souladu s (2) a ošetřená kůže se odstraní. Měla by se analyzovat příslušná část ošetřené kůže, aby se stanovila zbytková zkoušená chemická látka (radioaktivita).

77. Pro toxikokinetické hodnocení farmaceutik mohou být zapotřebí různé postupy, v souladu s příslušným regulačním systémem.

▼M4

Inhalační

78. Měla by se použít jedna koncentrace (či více, je-li to třeba) zkoušené chemické látky. Koncentrace by se měla (měly) vybrat v souladu s odstavci 20–26 této zkušební metody. Inhalační expozice by se měly provést pomocí „nosního konusu“ nebo přístroje typu „pouze hlava“, aby se zabránilo absorpci alternativními cestami expozice (8). Používají-li se jiné podmínky inhalační expozice, mělo by být zdokumentováno zdůvodnění této změny. Měla by se definovat délka inhalační expozice, obvykle expozice trvá 4–6 hodin.

LITERATURA:

1) OECD (2009). Preliminary Review of OECD Test Guidelines for their Applicability to Manufactured Nanomaterials, Series on the Safety of Manufactured Nanomaterials No. 15, ENV/JM/MONO(2009)21, OECD, Paris.

2) OECD (2000). Guidance Document on Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation; Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment N°19, ENV/JM/MONO(2000), OECD, Paris.

3) Solon E G, Kraus L (2002). Quantitative whole-body autoradiography in the pharmaceutical industry; Survey results on study design, methods, and regulatory compliance, J Pharm and Tox Methods 46: 73-81.

4) Stumpf WE (2005). Drug localization and targeting with receptor microscopic autoradiography. J. Pharmacological and Toxicological Methods 51: 25-40.

5) Loizou G, Spendiff M, Barton HA, Bessems J, Bois FY, d'Yvoire MB, Buist H, Clewell HJ 3rd, Meek B, Gundert-Remy U, Goerlitz G, Schmitt W. (2008). Development of good modelling practice for physiologically based pharmacokinetic models for use in risk assessment: The first steps. Regulatory Toxicology and Pharmacology 50: 400 – 411.

6) Kapitola B.45 této přílohy, Absorpce kůží: Metoda in vitro.

7) IPCS (2010). Characterization and application of Physiologically-BasedPharmacokinetic Models in Risk Assessment. IPCS Harmonization Project Document No 9. Geneva, World Health Organization, International Programme on Chemical Safety.

8) OECD (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing, Series on Testing and Assessment No. 39, ENV/JM/MONO(2009)28, OECD, Paris.

9) Kapitola B.44 této přílohy, Absorpce kůží: Metoda in vivo.

10) Barton HA, *et al.* (2006). The Acquisition and Application of Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion (ADME) Data in Agricultural Chemical Safety Assessments, Critical Reviews in Toxicology 36: 9-35.

11) Gibaldi M and Perrier D, (1982), Pharmacokinetics, 2nd edition, Marcel Dekker, Inc., New York.

▼M4

Dodatek

DEFINICE

Absorpce: Proces(y) příjmu či prostupování chemických látek tkáněmi. Absorpce se týká mateřské sloučeniny a všech jejích metabolitů. Nezaměňovat s „biologickou dostupností“.

Akumulace (bioakumulace): Zvýšení množství zkoušené chemické látky v tkáních (obvykle v tukových tkáních po opakované expozici) postupem času. Pokud je přísun zkoušené chemické látky do těla větší než rychlost, kterou je vylučována, organismus zkoušenou chemickou látku akumuluje a je možno dosáhnout toxických koncentrací zkoušené chemické látky.

ADME: Akronym pro „absorpce, distribuce, metabolismus a exkrece“.

AUC: (Plocha pod křivkou závislosti plazmatické koncentrace na čase): Plocha pod křivkou v grafu vyjadřujícím závislost koncentrace zkoušené chemické látky v plazmě na čase. Představuje celkové množství zkoušené chemické látky absorbované tělem za předem stanovené časové období. Za lineárních podmínek je AUC (od času nula až do nekonečna) úměrná celkovému množství zkoušené chemické látky absorbované tělem bez ohledu na rychlost absorpce.

Autoradiografie: (Celotělová autoradiografie): Používá se ke kvalitativnímu a/nebo kvantitativnímu určení lokalizace radioaktivní zkoušené chemické látky v tkáni. Tato technika používá radiografický film nebo v poslední době skenování využívající fosforové záznamové desky k vizualizaci radioaktivně značených molekul nebo fragmentů molekul prostřednictvím záznamu záření vydávaného studovaným objektem. Kvantitativní celotělová autoradiografie může mít v porovnání s pitvou orgánů různé výhody při hodnocení distribuce zkoušené chemické látky a stanovení celkové výtěžnosti a rozlišení radioaktivního materiálu v tkáních. Jednou, velmi podstatnou výhodou je například to, že ji lze používat u pigmentovaného zvířecího modelu k stanovení možné vazby zkoušené chemické látky na melanin, který je schopen vázat určité molekuly. Přestože tato technika může poskytovat vhodné celotělové přehledy vazebných míst o vysoké kapacitě a nízké afinitě, při rozeznávání specifických cílových míst, jako jsou receptorová vazebná místa, kde je k detekci zapotřebí poměrně vysoké rozlišení a vysoká citlivost, může mít naopak svá omezení. Používá-li se autoradiografie, měly by se experimenty určené ke stanovení látkové bilance podané sloučeniny provádět jako samostatná skupina nebo v rámci samostatné studie oddělené od experimentu stanovujícím tkáňovou distribuci, v němž se všechny exkrety (které mohou zahrnovat rovněž vydechovaný vzduch) a celá mrtvá těla homogenizují a analyzují pomocí kapalinové scintilační spektrometrie.

Biliární exkrece: Exkrece žlučovody.

Bioakumulace: Viz „akumulace“.

Biologická dostupnost (biodostupnost): Frakce podané dávky, která se dostane do systémového oběhu nebo je k dispozici v místě fyziologického působení. Biologická dostupnost zkoušené chemické látky se obvykle týká mateřské sloučeniny, ale mohla by se vztahovat i na její metabolit. Bere v úvahu pouze jednu chemickou formu. *Poznámka:* biologická dostupnost a absorpce nejsou totéž. Rozdíl mezi např. orální absorpcí (tj. přítomností látky ve střevní stěně a portálním oběhu) a biologickou dostupností (tj. přítomností látky v systémovém oběhu a tkáních) může vzniknout mimo jiné v důsledku rozkladu látky v rámci metabolismu střevní stěny nebo transportu prostřednictvím efluxních pump zpět do dutiny střeva nebo presystémového metabolismu v játrech (10). Biologická dostupnost toxické složky (mateřské sloučeniny nebo metabolitu) je rozhodujícím parametrem při posuzování rizika pro člověka (extrapolace z vysokých dávek do oblasti nízkých dávek, extrapolace mezi cestami) k odvození vnitřní hodnoty z externích hodnot NOAEL či BMD (aplikovaná dávka). Pro účinky na játra po orálním podání je dostačující znát orální absorpci. Nicméně pro všechny ostatní účinky, kromě účinků v místě vstupu, je obecně spolehlivějším parametrem pro další použití v posouzení rizika biologická dostupnost, nikoliv absorpce.

▼M4

Bioperzistence: Viz „perzistence“.

Biotransformace: (Obvykle enzymová) chemická konverze zkoušené chemické látky v těle na odlišnou chemickou látku. Synonymní s pojmem „metabolismus“.

C_{max}: Buď maximální (vrcholová) koncentrace v krvi (plazmě/séru) po podání nebo maximální (vrcholová) exkrece (v moči nebo výkalech) po podání.

Rychlost clearance: Kvantitativní míra rychlosti, jakou je zkoušená chemická látka odstraňována z krve, plazmy nebo určité tkáně za jednotku času.

Kompartment: Strukturní nebo biochemická část (či jednotka) těla, tkáně nebo buňky, která je oddělena od zbytku.

Detoxikační dráhy: Série kroků vedoucích k eliminaci toxických chemických látek z těla buď metabolickou přeměnou, nebo exkrecí.

Distribuce: Rozšíření zkoušené chemické látky a jejích derivátů v celém organismu.

Enzymy/isoenzymy: Proteiny, které katalyzují chemické reakce. Isoenzymy jsou enzymy, které katalyzují podobné chemické reakce, avšak liší se ve svých aminokyselinových sekvencích.

Enzymové parametry: K_m: Michaelisova konstanta a V_{max}: maximální rychlost

Exkrece: Proces(y), kterým(i) se podaná zkoušená chemická látka a/nebo její metabolity odstraňují z těla.

Exogenně: Zavedený z vnějšku nebo produkovaný mimo organismus nebo systém.

Extrapolace: Odvození jedné nebo více neznámých hodnot na základě známých nebo pozorovaných skutečností.

Eliminační poločas ($t_{1/2}$): Doba nutná k poklesu koncentrace zkoušené chemické látky v kompartmentu o jednu polovinu. Obvykle se vztahuje k plazmatické koncentraci nebo množství zkoušené chemické látky v celém těle.

Indukce / enzymová indukce: Enzymová syntéza v reakci na environmentální stimul nebo molekulu induktoru.

Linearita / lineární kinetika: Proces je ve smyslu kinetiky lineární, pokud všechny rychlosti přenosu mezi kompartmenty jsou úměrné přítomným množstvím nebo koncentracím, tj. prvního řádu. V důsledku toho jsou clearance, distribuční objemy a rovněž eliminační poločasy konstantní. Dosažené koncentrace jsou úměrné míře dávkování (expozice) a akumulaci lze snadněji předpovídat. Linearitu/nelinearitu lze vyhodnotit porovnáním příslušných parametrů, např. AUC, po různých dávkách nebo po jednorázové a opakovaných expozicích. Nepřítomnost závislosti na dávce může nasvědčovat saturaci enzymů účastnících se metabolismu dané sloučeniny, vzestup AUC po opakované expozici v porovnání s jednorázovou expozicí může naznačovat inhibici metabolismu a pokles AUC může svědčit o indukci metabolismu [viz také (11)].

Látková bilance: Bilance zkoušené chemické látky vstupující do systému a opouštějící systém.

Hmotnostní bilance: Viz „látková bilance“.

Mechanismus (způsob) toxicity / mechanismus (způsob) účinku: Mechanismus účinku se vztahuje k specifickým biochemickým interakcím, pomocí nichž zkoušená chemická látka účinkuje. Způsob účinku se vztahuje k obecnějším drahám vedoucím k toxicitě zkoušené chemické látky.

▼M4

Metabolismus: Synonymní s pojmem „biotransformace“.

Metabolity: Produkty metabolismu nebo metabolických procesů.

Orální absorpce: Procento dávky zkoušené chemické látky absorbované z místa podání (tj. GI traktu). Tento kritický parametr lze použít k pochopení frakce podané chemické látky, která se dostane až do vrátnicové žíly a následně do jater.

Rozdělovací koeficient: Rovněž znám jako distribuční koeficient, je měřítkem diferenciální rozpustnosti chemické látky ve dvou rozpouštědlech.

Maximální hladiny v krvi (plazmě/séru): Maximální (vrcholová) koncentrace v krvi (plazmě/séru) po podání (viz také „C_{max}“).

Perzistence (bioperzistence): Dlouhodobá přítomnost chemické látky (v biologickém systému) v důsledku odolnosti vůči degradaci/eliminaci.

Analogický přístup: Informace o cílovém parametru u jedné nebo více chemických látek se použijí k odhadu cílového parametru u cílové chemické látky.

Receptorová mikroskopická autoradiografie (nebo receptorová mikroautoradiografie): Tuto techniku lze použít k vyšetření xenobiotických interakcí se specifickými místy v tkáních nebo buněčných populacích, například ve studiích vazeb na receptory či specifických způsobů účinku, které mohou vyžadovat vysoké rozlišení a vysokou citlivost, jež nemusí být dosažitelná s pomocí jiných technik, jako je celotělová autoradiografie.

Cesta podání (orální, nitrožilní, dermální, inhalační atd.): Vztahuje se ke způsobu, jakým jsou chemické látky dopraveny do těla (např. orálně sodnou, orálně v krmivu, dermálně, inhalací, nitrožilně atd.).

Saturace: Stav, kdy jeden nebo více kinetických (např. absorpce, metabolismus či clearance) proces(ů) dosáhne maxima (tzn. „je saturován“).

Citlivost: Schopnost metody nebo přístroje rozlišit mezi naměřenými odezvami představujícími různé hodnoty dotčené proměnné.

Ustálené hladiny v krvi (plazmě): Nerovnovážný stav otevřeného systému, kdy všechny síly působící na systém jsou přesně vyrovnávány opačnými silami, a to takovým způsobem, že všechny složky systému mají neměnnou koncentraci, přestože systémem proudí hmota.

Modelování systémů (toxikokinetické založené na fyziologii, založené na farmakokinetice, farmakokinetické založené na fyziologii, založené na biologii atd.): Abstraktní model, který používá k popisu chování systému matematický jazyk.

Cílová tkáň: Tkáň, v níž se projevuje hlavní nepříznivý účinek toxické látky.

▼M4

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

Distribuce v tkáních: Reverzibilní pohyb zkoušené chemické látky z jednoho místa v těle do jiného. Distribuci v tkáních lze studovat pomocí pitvy orgánů, homogenizace, spálení a kapalinové scintilační spektrometrie či pomocí kvalitativní a/nebo kvantitativní celotělové autoradiografie. První způsob je užitečný pro získání hodnoty koncentrace a procentuální výtěžnosti z tkání a zbylého mrtvého těla stejných zvířat, avšak nemusí mít dostatečné rozlišení pro všechny tkáně a může mít menší než ideální celkovou výtěžnost (< 90 %). Definici druhého způsobu viz výše.

T_{max}: Doba potřebná k dosažení C_{max}.

Toxikokinetika (Farmakokinetika): Studie absorpce, distribuce, metabolismu a vylučování chemických látek v průběhu času.

Validace modelů: Postup zhodnocení adekvátnosti modelu pro účely konzistentního popisu dostupných toxikokinetických údajů. Modely lze vyhodnotit pomocí statistického a vizuálního porovnání modelových předpovědí s experimentálními hodnotami oproti společné nezávislé proměnné (např. čas). Rozsah hodnocení by se měl odůvodnit vzhledem k určenému použití modelu.

▼B

B.37 POZDNÍ NEUROTOXICITA ORGANICKÝCH SLOUČENIN FOSFORU PO AKUTNÍ EXPOZICI

1. METODA

1.1 ÚVOD

Při posouzení a hodnocení toxických účinků látek je důležité vzít v úvahu schopnost určitých skupin látek vyvolat specifické typy neurotoxicity, které nemohou být zjištěny jinými studiemi toxicity. U určitých organických sloučenin fosforu byla pozorována pozdní neurotoxicita; tyto látky mají být podrobeny zkoumání touto metodou.

Screeningové zkoušky *in vitro* lze použít pro vyhledání látek, které mohou vyvolat pozdní polyneuropatii; negativní nález ze zkoušek *in vitro* však neposkytuje důkaz, že látka nemá schopnost vyvolat pozdní neurotoxicitu.

Viz obecný úvod, část B.

1.2 DEFINICE

Mezi „organické sloučeniny fosforu“ patří neutrální organické estery, thioestery nebo anhydridy kyseliny fosforečné, fosfonové nebo amidofosforečné nebo příslušných kyselin thiofosforečných, thiofosfonových nebo amidothiofosforečných, nebo jiné látky, které mohou způsobit pozdní neurotoxicitu pozorovanou u některých látek této skupiny.

Pozdní neurotoxicita je syndrom projevující se pozdním počátkem ataxie, distální axonopatií v míše a periferním nervu a dále inhibicí a stárnutím specifické esterasy (NTE – neuropathy target esterase) v nervové tkáni.

1.3 REFERENČNÍ LÁTKY

Referenční látka může být zkoušena v pozitivní kontrolní skupině s cílem prokázat, že se v laboratorních podmínkách reakce pokusných druhů podstatně nezměnila.

Příkladem široce používané látky s pozdním toxickým účinkem je tri-o-tolyl-fosfát (CAS 78308, EINECS 2011035, název podle CAS: tris(2methylfenyl)fosfát), známá také pod názvem triokresylfosfát (TOCP).

1.4 PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

Zkoušená látka se podává orálně v jediné dávce slepicím domácím, chráněným před možnými akutními cholinergními účinky. Zvířata se pozorují po dobu 21 dnů, zaznamenává se abnormální chování, ataxie a peréza. Biochemická vyšetření, zejména inhibice NTE (neropathy target esterase), se provádějí u slepic náhodně vybraných z každé skupiny, obvykle 24 a 48 hodin po podání látky. Dvacet jedna dnů po podání látky se zbývající slepice usmrtí a provede se histopatologické vyšetření vybraných nervových tkání.

▼B

1.5 POPIS ZKUŠEBNÍ METODY

1.5.1 **Příprava**

Provede se náhodný výběr mladých zdravých dospělých slepic, které nejsou ovlivněny virovými onemocněními a farmakologickou léčbou a mají normální chůzi, přiřadí se do experimentální a kontrolní skupiny a nejméně 5 dnů před zahájením studie se aklimatizují na laboratorní podmínky.

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

Zkoušená látka se obvykle podává orálně sondou, želatinovými tobolkami nebo srovnatelnou metodou. Kapaliny se podávají neředěné nebo rozpuštěné ve vhodném vehikulu, jako je např. kukuřičný olej, pevné látky by se měly nechat rozpustit, protože velké dávky pevných látek v želatinových tobolkách by se nemusely dostatečně vstřebat. Toxické vlastnosti nevodných vehikul by měly být známy před zkouškou, a pokud nejsou známy, měly by být předem určeny.

1.5.2 **Zkušební podmínky**

1.5.2.1 *Pokusná zvířata*

Doporučuje se mladá nosnice kura domácího (*Gallus gallus domesticus*), stará 8–12 měsíců. Používají se plemena o standardní velikosti a slepice by měly být chovány za podmínek umožňujících volný pohyb.

1.5.2.2 *Počet a pohlaví*

Kromě experimentální skupiny by měla být použita kontrolní skupina s vehikulem a pozitivní kontrolní skupina. S výjimkou podání zkoušené látky se s kontrolní skupinou zachází stejně jako s experimentální skupinou.

V každé skupině by měl být použit dostatečný počet slepic, aby aspoň šest slepic mohlo být usmrceno pro biochemické vyšetření (tři v první a tři v druhý den po podání) a šest přežilo 21denní pozorování patologických příznaků.

Pozitivní kontrolní skupina může být zkoušena souběžně nebo mohou být použity údaje z nedávno použité kontrolní skupiny. Měla by zahrnovat nejméně šest slepic, kterým se podá látka, o níž je známo, že vyvolává pozdní neurotoxicitu, tři slepice pro biochemické vyšetření a tři slepice pro histopatologické vyšetření. Doporučuje se periodicky doplňovat historické údaje. Nové pozitivní kontrolní údaje by měly být doplněny, pokud provádějící laboratoř v průběhu testu změní některý základní prvek zkoušky (např. plemeno, stravu, podmínky chovu).

▼B

1.5.2.3 *Úrovně dávek*

Měla by se provést předběžná studie za použití vhodného počtu slepic a skupin s různými úrovněmi dávek, aby bylo možné stanovit úroveň, která má být použita v hlavní studii. Pro stanovení přiměřené dávky v hlavní studii je v této předběžné studii nezbytná určitá letalita. Aby se však zabránilo úhynu vlivem akutních cholinergních účinků, lze použít atropin nebo jiný ochranný přípravek, o kterém je známo, že nemá vliv na pozdní neurotoxické reakce. Pro odhad nejvyšší neletální dávky zkoušených látek lze použít řadu metod (viz metoda B.1a). Při výběru dávky mohou být užitečné také dosavadní údaje o slepicích nebo jiné toxikologické informace.

Úroveň dávky zkoušené látky v hlavní studii by měla být co nejvyšší, přičemž se berou v úvahu výsledky předběžné studie výběru dávky a horní limit dávky 2 000 mg/kg tělesné hmotnosti. Případný úhyn by neměl narušit dostatečný počet zvířat pro biochemická vyšetření (šest) a pro histologická vyšetření (šest) po 21 dnech. Aby se zabránilo úmrtí vlivem akutních cholinergních účinků, použije se atropin nebo jiný ochranný přípravek, o kterém je známo, že nemá vliv na pozdní neurotoxické účinky.

1.5.2.4 *Limitní zkouška*

Pokud zkouška provedená podle postupů popsaných v této studii při jedné dávce nejméně 2 000 mg/kg tělesné hmotnosti na den nevyvolá pozorovatelné toxické účinky a pokud se na základě údajů o látkách s podobnou strukturou nepředpokládá toxicita, není úplná studie za použití vyšší dávky nezbytná. Limitní zkouška se použije s výjimkou případu, kdy údaje o expozici člověka naznačují, že je nezbytné použití vyšší úrovně dávek.

1.5.3 **Doba pozorování**

Doba pozorování by měla být 21 dnů.

1.5.4 Postup

Po podání přípravku chránícího před uhynutím na následky akutního cholinergního účinku se podá zkoušená látka v jedné dávce.

Obecná pozorování

Pozorování by měla začít okamžitě po podání. Všechny slepice se pečlivě několikrát denně pozorují v průběhu prvních dvou dnů a poté nejméně jednou denně po dobu 21 dnů nebo do plánovaného usmrcení. Veškeré příznaky toxicity by měly být zaznamenány, včetně doby nástupu, typu, závažnosti a trvání abnormálního chování. Ataxie by měla být hodnocena podle nejméně čtyřstupňové pořadové stupnice a zaznamenává se paréza. Nejméně dvakrát týdně se slepice určené s patologickými příznaky vyjmou z klecí a podrobí zkoušce nucené motorické aktivity, jako např. stoupání po žebříku, aby se usnadnilo posouzení sebemenších toxických účinků. Zvířata v agónii a zvířata, která se trápí nebo trpí bolestí, se ihned vyřadí, humánně utratí a pitvají.

▼B

Tělesná hmotnost

Všechny slepice se zváží těsně před podáním zkoušené látky a poté nejméně jednou týdně.

Biochemická vyšetření

Šest slepic náhodně vybraných z každé experimentální skupiny a kontrolní skupiny s vehikulem a tři slepice z pozitivní kontrolní skupiny (pokud se zkouška souběžně provádí s touto skupinou) se usmrtí v prvních dnech po podání látky, mozek a lumbální mícha se vypreparují a vyšetří se na inhibici NTE. Dále může být rovněž vhodné vypreparovat *n. ischiadicus* a analyzovat jeho tkáň na inhibici aktivity NTE. Zpravidla se usmrtí tři slepice z kontrolní skupiny a z každé experimentální skupiny po 24 hodinách a další tři po 48 hodinách, zatímco tři slepice z pozitivní kontrolní skupiny se usmrtí po 24 hodinách. Pokud pozorování klinických příznaků toxicity naznačuje, že se toxická látka v organismu vstřebává velmi pomalu (to lze často posoudit pozorováním doby nástupu cholinergních příznaků), může být vhodnější odebrat vzorek tkáně dvakrát ze tří zvířat mezi 24 až 72 hodinami po podání látky.

Na těchto vzorcích tkáně mohou být provedeny také analýza acetylcholinesterasy (AChE), je-li to považováno za vhodné. *In vivo* však může nastat spontánní reaktivace AChE, což může vést k podcenění látky jako inhibitoru AChE.

Pitva

Pitva všech zvířat (usmrcených podle plánu a utracených v agónii) by měla zahrnovat posouzení stavu mozku a míchy.

Histopatologická vyšetření

Nervová tkáň zvířat, která přežila dobu pozorování a nebyla použita pro biochemické studie, by měla být mikroskopicky vyšetřena. Tkáně by měly být fixovány *in situ,* za použití perfúzních technik. Odebírá se mozeček (střední podélný řez), prodloužená mícha, mícha a periferní nervy. Řezy míchy by měly být odebrány z horní krční části, střední hrudní a lumbosakrální oblasti. Měly by být odebrány řezy distální části n. tibialis a jeho větví k m. gastrocnemius a z n. ischiadicus. Řezy se barví vhodnými barvivy na myelin a axony.

2. **ÚDAJE**

Negativní výsledky získané pro výsledné účinky zvolené v této metodě (biochemická a histopatologická vyšetření a vyšetření změn chování) nevyžadují zpravidla další zkoušení pozdní neurotoxicity. Při dvojznačných nebo neprůkazných výsledcích těchto vyšetření může být nezbytné další sledování.

Měly by být uvedeny údaje pro každé jednotlivé zvíře. Navíc by měly být všechny údaje shrnuty do tabulky, přičemž se uvede u každé experimentální skupiny počet zvířat na začátku zkoušky, počet zvířat vykazujících léze, účinky na chování nebo biochemické účinky, typ a závažnost těchto lézí nebo účinků a procento zvířat vykazující každý typ a závažnost léze nebo účinku.

▼B

Údaje z této studie by měly být vyhodnoceny z hlediska výskytu, závažnosti a korelace účinků na chování a biochemických a histopatologických nálezů a dále jakýchkoli dalších pozorovaných účinků na experimentální a kontrolní skupiny.

Číselné výsledky by měly být pokud možno vyhodnoceny vhodnou a obecně uznávanou statistickou metodou. Statistická metoda by měla být zvolena již při plánování studie.

3. **ZPRÁVY**

PROTOKOL O ZKOUŠCE

Protokol o zkoušce má pokud možno obsahovat tyto údaje:

3.1 Pokusná zvířata:

— použité plemeno,

— počet a stáří zvířat,

— původ, podmínky chovu atd.,

— hmotnost jednotlivých zvířat na začátku zkoušky.

3.2 Zkušební podmínky:

— podrobné údaje o přípravě zkoušené látky, popřípadě o její stálosti a homogenitě,

— zdůvodnění volby vehikula,

— podrobné údaje o podání zkoušené látky,

— podrobné údaje o stravě a o kvalitě vody,

— zdůvodnění výběru úrovní dávek,

— specifikace podávaných dávek, včetně podrobných informací o vehikulu, objemu a fyzikální formě podané látky,

— identifikace jakéhokoli ochranného přípravku a podrobné informace o jeho podání.

3.3 Výsledky:

— údaje o tělesné hmotnosti,

— údaje o toxických reakcích podle skupin, včetně mortality,

— charakter, závažnost a trvání klinických projevů (zda byly vratné nebo nevratné),

— podrobný popis biochemických vyšetření a nálezů,

— pitevní nálezy,

— podrobný popis všech histopatologických nálezů,

— popřípadě statistické vyhodnocení výsledků.

Rozbor výsledků.

Závěry.

4. **LITERATURA**

Metoda je analogická metodě OECD TG 418.

▼B

B.38 POZDNÍ NEUROTOXICITA ORGANICKÝCH SLOUČENIN FOSFORU – 28DENNÍ OPAKOVANÁ EXPOZICE

1. METODA

1.1 ÚVOD

Při posouzení a hodnocení toxických účinků látek je důležité vzít v úvahu schopnost určitých skupin látek vyvolat specifické typy neurotoxicity, které nemohou být zjištěny jinými studiemi toxicity. U určitých organických sloučenin fosforu byla pozorována pozdní neurotoxicita; tyto látky mají být podrobeny zkoumání touto metodou.

Screeningové zkoušky *in vitro* lze použít pro vyhledání látek, které mohou vyvolat pozdní polyneuropatii; negativní nález ze zkoušek *in vitro* však neposkytuje důkaz, že látka nemá schopnost vyvolat pozdní neurotoxicitu.

28denní zkouška pozdní neurotoxicity poskytuje informace o možném nebezpečí pro zdraví, které by se mohlo projevit z opakovaných expozic během omezeného časového období. Poskytne informace o reakci na dávku a může poskytnout odhad úrovně bez pozorovatelných nepříznivých účinků, což může být užitečné při stanovení kritérií pro bezpečnou expozici člověka.

Viz také obecný úvod, část B.

1.2 DEFINICE

Mezi „organické sloučeniny fosforu“ patří neutrální organické estery, thioestery nebo anhydridy kyseliny fosforečné, fosfonové nebo amidofosforečné nebo příslušných kyselin thiofosforečných, thiofosfonových nebo amidothiofosforečných, nebo jiné látky, které mohou způsobit pozdní neurotoxicitu pozorovanou u některých látek této skupiny.

Pozdní neurotoxicita je syndrom projevující se pozdním počátkem ataxie, distální axonopatií v míše a periferním nervu a dále inhibicí a stárnutím specifické esterasy (NTE – neuropathy target esterase) v nervové tkáni.

1.3 PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

Zkoušené látky se podávají denně orálně slepicím domácím po dobu 28 dnů. Zvířata se pozorují nejméně jednou denně, zaznamenává se abnormální chování, ataxie a paréza ještě 14 dnů po poslední dávce. Biochemická vyšetření, zejména inhibice NTE (neropathy target esterase), se provádějí u slepic náhodně vybraných z každé skupiny, obvykle 24 a 48 hodin po podání látky. Dva týdny po poslední dávce se zbývající slepice usmrtí a provede se histopatologické vyšetření vybraných nervových tkání.

▼B

1.4 POPIS ZKUŠEBNÍ METODY

1.4.1 **Příprava**

Provede se náhodný výběr mladých zdravých dospělých slepic, které nejsou ovlivněny virovými onemocněními a farmakologickou léčbou a mají normální chůzi, přiřadí se do experimentální a kontrolních skupin a nejméně 5 dnů před zahájením studie se aklimatizují na laboratorní podmínky.

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

Zkoušená látka se podává každý den, 7 dnů v týdnu, nejlépe orálně sondou nebo želatinovými tobolkami. Kapaliny se podávají neředěné nebo rozpuštěné ve vhodném vehikulu, např. kukuřičný olej, pevné látky by se měly nechat rozpustit, protože velké dávky pevných látek v želatinových tobolkách by se nemusely dostatečně vstřebat. Toxické vlastnosti nevodných vehikul by měly být známy před zkouškou, a pokud nejsou známy, měly by být předem určeny.

1.4.2 **Zkušební podmínky**

Pokusná zvířata

Doporučuje se mladá nosnice kura domácího (*Gallus gallus domesticus*), stará 8–12 měsíců. Používají se plemena o standardní velikosti a slepice by měly být chovány za podmínek umožňujících volný pohyb.

Počet a pohlaví

Obecně by měly být použity nejméně tři experimentální skupiny a kontrolní skupina s vehikulem. S výjimkou podání zkoušené látky se s kontrolní skupinou s vehikulem zachází stejně jako s experimentální skupinou.

V každé skupině by měl být použit dostatečný počet slepic, aby aspoň šest slepic mohlo být usmrceno pro biochemické vyšetření (tři v první a tři v druhý den po podání) a šest přežilo 14denní pozorování patologických příznaků.

Úrovně dávek

Při výběru úrovní dávek by měly být vzaty v úvahu tři výsledky akutní zkoušky pozdní neurotoxicity a jakékoli další dostupné údaje o toxicitě a kinetice zkoušené sloučeniny. Nejvyšší úroveň dávky by měla být vybrána s cílem vyvolat toxické účinky, nejlépe pozdní neurotoxicitu, ne však uhynutí nebo zjevné utrpení. Dále by měla být zvolena sestupná řada dávek s cílem prokázat, že existuje závislost účinku na dávce a že nejnižší dávka nevyvolává žádné projevy toxicity.

▼B

Limitní zkouška

Pokud zkouška provedená podle postupů popsaných v této studii při jedné dávce nejméně 1 000 mg/kg tělesné hmotnosti na den nevyvolá pozorovatelné toxické účinky a pokud se na základě údajů o látkách s podobnou strukturou nepředpokládá toxicita, není úplná studie za použití vyšší dávky nezbytná. Limitní zkouška se provádí s výjimkou případu, kdy údaje o expozici člověka naznačují, že je nezbytné použití vyšší úrovně dávek.

Doba pozorování

Všechna zvířata by měla být pozorována nejméně jednou denně po dobu expozice a 14 dnů po ní až do provedení pitvy podle plánu.

1.4.3 **Postup**

Zvířatům se podává zkoušená látka sedm dnů v týdnu po dobu 28 dnů.

Obecná pozorování

Pozorování by měla začít okamžitě po podání. Všechny slepice se pečlivě pozorují jednou denně každý den z 28 dnů expozice a 14 dnů po expozici nebo do plánovaného usmrcení. Veškeré příznaky toxicity by měly být zaznamenány, včetně doby nástupu, typu, závažnosti a trvání. Pozorování má zahrnovat abnormality chování, ale nemá se na ně omezovat. Ataxie by měla být hodnocena podle nejméně čtyřstupňové pořadové stupnice a zaznamenává se paréza. Nejméně dvakrát týdně se slepice s patologickými příznaky vyjmou z klecí a podrobí zkoušce nucené motorické aktivity, jako např. stoupání po žebříku, aby se usnadnilo posouzení sebemenších toxických účinků. Zvířata v agónii a zvířata, která se trápí nebo trpí bolestí, se ihned vyřadí, humánně utratí a pitvají.

Tělesná hmotnost

Všechny slepice se zváží těsně před podáním zkoušené látky a poté nejméně jednou týdně.

Biochemická vyšetření

Šest slepic náhodně vybraných z každé experimentální skupiny a kontrolní skupiny s vehikulem a tři slepice z pozitivní kontrolní skupiny se usmrtí v prvních dnech po podání poslední dávky, mozek a lumbální mícha se vypreparují a vyšetří se na inhibici NTE. Dále může být vhodné vypreparovat *n. ischiadicus* a analyzovat jeho tkáň na inhibici aktivity NTE. Zpravidla se usmrtí tři slepice z kontrolní skupiny a z každé experimentální skupiny po 24 hodinách a další tři po 48 hodinách od poslední dávky. Pokud údaje z akutní studie nebo z jiných studií (např. toxikokinetických) naznačují, že jsou vhodné jiné doby usmrcení po poslední dávce než tyto doby, měly by být použity a zdůvodnění by mělo být uvedeno v dokumentaci.

Na těchto vzorcích tkáně mohou být provedeny také analýza acetylcholinesterasy (AChE), je-li to považováno za vhodné. In vivo však může nastat spontánní reaktivace AChE, což může vést k podcenění látky jako inhibitoru AChE.

▼B

Pitva

Pitva všech zvířat (usmrcených podle plánu a utracených v agónii) by měla zahrnovat posouzení stavu mozku a míchy.

Histopatologická vyšetření

Nervová tkáň zvířat, která přežila dobu pozorování a nebyla použita pro biochemické studie, by měla být mikroskopicky vyšetřena. Tkáně by měly být fixovány *in situ,* za použití perfúzních technik. Odebírá se mozeček (střední podélný řez), prodloužená mícha, mícha a periferní nervy. Řez míchy by měl být proveden z horní krční části, střední hrudní a lumbosakrální oblasti. Měly by být odebrány řezy distální části *n. tibialis* a jeho větví k *m. gastrocnemius* a z *n. ischiadicus*. Řezy se barví vhodnými barvivy na myelin a axony. Nejprve by mělo být provedeno mikroskopické vyšetření fixované tkáně všech zvířat kontrolní skupiny a skupiny s vysokou dávkou. Pokud se u skupiny s vysokou dávkou projeví účinky, mělo by být mikroskopické vyšetření provedeno také na slepicích ze skupiny se střední a nízkou dávkou.

2. **ÚDAJE**

Negativní výsledky získané pro výsledné účinky zvolené v této metodě (biochemická a histopatologická vyšetření a vyšetření změn chování) nevyžadují zpravidla další zkoušení pozdní neurotoxicity. Při dvojznačných nebo neprůkazných výsledcích těchto vyšetření může být nezbytné další sledování.

Měly by být uvedeny údaje pro každé jednotlivé zvíře. Navíc by měly být všechny údaje shrnuty do tabulky, přičemž se uvede u každé experimentální skupiny počet zvířat na začátku zkoušky, počet zvířat vykazujících léze, účinky na chování nebo biochemické účinky, typ a závažnost těchto lézí nebo účinků a procento zvířat vykazující každý typ a závažnost léze nebo účinku.

Údaje z této studie by měly být vyhodnoceny z hlediska výskytu, závažnosti a korelace účinků na chování a biochemických a histopatologických nálezů a dále jakýchkoli dalších pozorovaných účinků na experimentální a kontrolní skupiny.

Číselné výsledky by měly být pokud možno vyhodnoceny vhodnou a obecně uznávanou statistickou metodou. Statistická metoda by měla být zvolena již při plánování studie.

3. **ZPRÁVY**

PROTOKOL O ZKOUŠCE

Protokol o zkoušce obsahuje pokud možno tyto informace:

3.1 Pokusná zvířata:

— použité plemeno,

— počet a stáří zvířat,

— původ, podmínky chovu atd.,

— hmotnost jednotlivých zvířat na začátku zkoušky.

▼B

3.2 Zkušební podmínky:

— podrobné údaje o přípravě zkoušené látky, popřípadě o její stálosti a homogenitě,

— zdůvodnění volby vehikula,

— podrobné údaje o způsobu podání zkoušené látky,

— podrobné údaje o stravě a o kvalitě vody,

— zdůvodnění výběru úrovní dávek,

— specifikace podávaných dávek, včetně podrobných informací o vehikulu, objemu a fyzikální formě podané látky,

— zdůvodnění jiných časů odběru pro biochemické vyšetření, není-li použito 24 a 48 hodin.

3.3 Výsledky:

— údaje o tělesné hmotnosti,

— údaje o toxických reakcích podle skupin, včetně mortality,

— úroveň bez pozorovatelných nepříznivých účinků,

— charakter, závažnost a trvání klinických projevů (zda byly vratné nebo nevratné),

— podrobný popis biochemických vyšetření a nálezů,

— pitevní nálezy,

— podrobný popis všech histopatologických nálezů,

— popřípadě statistické zpracování výsledků.

Rozbor výsledků.

Závěry.

4. **LITERATURA**

Metoda je analogická metodě OECD TG 419.

▼B

B.39 ZKOUŠKA NA NEPLÁNOVANOU SYNTÉZU DNA (UDS) V JATERNÍCH BUŇKÁCH SAVCŮ *IN VIVO*

1. METODA

Tato metoda je replikou metody OECD TG 486. Zkouška na neplánovanou syntézu DNA (UDS) v jaterních buňkách savců *in vivo* (1997).

1.1 ÚVOD

Účelem zkoušky na neplánovanou syntézu DNA (UDS) v jaterních buňkách savců *in vivo* je identifikovat zkoušené látky, které indukují reparace DNA v jaterních buňkách exponovaných zvířat (1, 2, 3, 4).

Tato zkouška *in vivo* poskytuje metodu vyšetření genotoxických účinků chemických látek v játrech. Stanovovaný jev je ukazatelem poškození DNA a následné reparace v jaterních buňkách. Játra jsou obvykle hlavním místem, kde jsou absorbované sloučeniny metabolizovány. Jsou tedy vhodným místem pro hodnocení míry poškození DNA *in vivo*.

Jestliže existuje důkaz o tom, že se zkoušená látka nedostane do cílové tkáně, není vhodné tuto zkoušku použít.

Rozsah neplánované syntézy DNA (UDS) se zhodnotí stanovením inkorporace značených nukleosidů do buněk, které neprošly plánovanou syntézou DNA (S-fází). Nejrozšířenější technikou je autoradiografické stanovení inkorporace thymidinu značeného tritiem (^{3}H-TdR). Pro zkoušky na UDS *in vivo* se přednostně používají játra potkana. Jiné tkáně než játra mohou být rovněž použity, nejsou však předmětem této metody.

Detekce odpovědi UDS závisí na počtu bází DNA vyštěpených a nahrazených v místě poškození. Zkouška na UDS je tedy vhodná zvláště pro detekci dlouhých reparací („long-patch repair“) (20 až 30 bází) indukovaných látkou. Krátké opravy („short-patch repair“) (jedna až tři báze) jsou naproti tomu detekovány s daleko menší citlivostí. Navíc může důsledkem neuskutečněné reparace, chybné reparace nebo chybné replikace lézí DNA dojít k mutagenním událostem. Rozsah odpovědi UDS neposkytuje žádnou informaci o věrnosti reparačních procesů. Navíc je možné, že mutagen reaguje s DNA, ale poškození DNA není opraveno vyštěpovací reparací. Nedostatek specifických informací, které tato zkouška poskytuje o mutagenní aktivitě, je vyvážen potenciální citlivostí tohoto jevu, neboť je vyšetřován v celém genomu.

Viz také obecný úvod, část B.

1.2 DEFINICE

Opravované buňky: čistý počet zrn odpovídajících buněčným jádrům (NNG) vyšší než předvolená hodnota stanovená laboratoří provádějící zkoušku.

Čistý počet zrn odpovídajících buněčným jádrům (NNG): kvantitativní míra UDS aktivity buněk v autoradiografické zkoušce na UDS, vypočtená odečtením průměrného počtu zrn v cytoplasmatických oblastech (CG) odpovídajících jádrům od počtu zrn odpovídajících buněčným jádrům (NG): NNG = NG – CG. Hodnota NNG se vypočte pro jednotlivé buňky, poté společně pro buňky v kultuře, v paralelních kulturách atd.

▼B

Neplánovaná syntéza DNA (UDS): syntéza reparací DNA po vyštěpení a odstranění úseku DNA obsahujícího region s poškozením indukovaným chemickými látkami nebo fyzikálními činiteli.

1.3 PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

Zkouška na UDS v jaterních buňkách savců *in vivo* indikuje syntézu reparací DNA po vyštěpení a odstranění úseku DNA obsahujícího region s poškozením indukovaným chemickými látkami nebo fyzikálními činiteli. Zkouška je obvykle založena na inkorporaci ^{3}H-TdR do DNA jaterních buněk, kde je malá četnost buněk v S-fázi buněčného cyklu. Inkorporace ^{3}H-TdR je obvykle stanoveno autoradiografií, jelikož tato technika není tak citlivá na vliv S-fáze buněk jako např. kapalná scintilační spektrometrie.

1.4 POPIS METODY

1.4.1 **Přípravky**

1.4.1.1 *Výběr druhu zvířete*

Běžně je používán potkan, ačkoli lze použít jakýkoli vhodný druh savce. Měly by být použity běžně používané laboratorní kmeny mladých zdravých pohlavně dospělých zvířat. V okamžiku zahájení studie by měla být odchylka v hmotnosti zvířat minimální a neměla by překročit ± 20 % střední hodnoty hmotnosti pro obě pohlaví.

1.4.1.2 *Podmínky chovu a strava*

Platí obecné podmínky podle obecného úvodu k části B, přičemž by mělo být dosaženo vlhkosti vzduchu 50–60 %.

1.4.1.3 *Příprava zvířat*

Zdravá mladá dospělá zvířata se náhodným výběrem rozdělí na kontrolní skupinu a skupinu, která se exponuje. Klece by měly být uspořádány tak, aby byl vliv jejich polohy minimalizován. Zvířata se jednoznačně identifikují a před započetím studie se nechají v laboratorních podmínkách alespoň pět dní aklimatizovat.

1.4.1.4 *Příprava zkoušené látky*

Pevné zkoušené látky by měly být před aplikací zvířatům rozpuštěny nebo suspendovány ve vhodných rozpouštědlech nebo vehikulech a popřípadě zředěny. Kapalné zkoušené látky mohou být podávány přímo nebo mohou být před podáním zředěny. Měly by být použity čerstvě připravené zkoušené látky, pokud údaje o stálosti neprokazují možnost skladování.

1.4.2 **Zkušební podmínky**

1.4.2.1 *Rozpouštědlo/vehikulum*

Rozpouštědlo/vehikulum by nemělo mít při použitých úrovních dávek toxické účinky a mělo by být vyloučeno podezření, že reaguje se zkoušenou látkou. Jsou-li použita jiná než známá rozpouštědla/vehikula, mělo by být jejich zařazení podloženo údaji o jejich kompatibilitě. Doporučuje se pokud možno nejdříve zvážit použití vodných rozpouštědel/vehikul.

▼B

1.4.2.2 *Kontroly*

Součástí každé nezávisle prováděné části experimentu by měly být souběžné pozitivní a negativní (rozpouštědlo/vehikulum) kontroly. s výjimkou aplikace zkoušené látky by měla zvířata kontrolní skupiny podstoupit stejný proces jako zvířata ve skupinách, v nichž dojde k expozici.

Pozitivními kontrolami by měly být látky, o nichž je známo, že jejich podávání v očekávaných expozičních koncentracích vede k nárůstu UDS detekovatelnému nad pozadím. Pozitivní kontroly vyžadující metabolickou aktivaci by měly být použity v dávkách vyvolávající mírnou odpověď (4). Dávky mohou být zvoleny tak, aby byl účinek zřetelný, ale aby při odečtu nevyšla ihned najevo kódovaná identifikace preparátu. Příklady látek pro pozitivní kontrolu:

Doby odběru	Látka	Číslo CAS	Číslo podle EINECS
Časné doby odběru (2 až 4 hodiny)	N-nitrosodimethylamin	62-75-9	200-249-8
Pozdní doby odběru (12 až 16 hodin)	N-(fluoren-2-yl)acetamid (2-AAF)	53-96-3	200-188-6

Mohou být použity také jiné látky pro pozitivní kontrolu. Je přípustné, aby byla pozitivní kontrolní látka podávána jiným způsobem, než zkoušená látka.

1.5 POSTUP

1.5.1 **Počet a pohlaví zvířat**

Měl by být použit dostatečný počet zvířat, aby bylo zohledněno přirozené biologické kolísání odpovědi na zkoušku. Každá skupina by se měla skládat alespoň ze tří analyzovatelných zvířat. Jestliže jsou shromážděny dostatečné dosavadní údaje, je pro negativní a pozitivní kontrolní skupiny nezbytné pouze jedno až dvě zvířata.

Jestliže jsou v době studie k dispozici údaje ze studií se stejným druhem a za použití stejného způsobu expozice, jež prokazují, že neexistuje mezi pohlavími rozdíl v toxicitě, bude postačující zkoušení jednoho pohlaví, nejlépe samců. Je-li expozice člověka specifická pro určité pohlaví, jako je tomu například u některých farmaceutických látek, měla by být zkouška provedena se zvířaty odpovídajícího pohlaví.

1.5.2 **Plán expozice**

Zkoušené látky jsou zpravidla podávány jednorázově.

1.5.3 **Dávkování**

Za normálních podmínek se používají alespoň dvě úrovně dávek. Nejvyšší dávka je definována jako dávka vyvolávající takové známky toxicity, že vyšší dávky by vedly podle očekávání při stejném režimu dávkování k letalitě. Nižší dávka by měla být zpravidla 50 % až 25 % vyšší dávky.

▼B

Látky se specifickou biologickou aktivitou při nízkých netoxických dávkách (např. hormony a mitogeny) nemusí kritériím stanovení dávky vyhovovat a měly by být hodnoceny případ od případu. Provádí-li se kvůli neexistenci vhodných dostupných údajů studie pro zjištění rozsahu, měla by být provedena ve stejné laboratoři, se stejným druhem, kmenem, pohlavím a za stejného režimu expozice, jež se použijí v hlavní studii.

Nejvyšší dávka může být definována také jako dávka vyvolávající známky toxicity v játrech (např. pyknotická jádra).

1.5.4 **Limitní zkouška**

Jestliže zkouška s jednou dávkou o alespoň 2 000 mg/kg tělesné hmotnosti podanou jednorázově nebo ve dvou dávkách v jednom dni nevykazuje žádné pozorovatelné toxické účinky a není-li na základě údajů o látkách, které mají podobnou strukturu, očekávána genotoxicita, nemusí být úplná studie nezbytná. Očekávaná expozice člověka může znamenat potřebu použít v limitní zkoušce vyšší úroveň dávky.

1.5.5 **Podávání dávek**

Zkoušená látka se obvykle podává nitrožaludečně, žaludeční sondou nebo vhodnou intubační kanylou. Jiné způsoby podávání jsou možné, lze-li je zdůvodnit. Podávání intraperitoneálně se však nedoporučuje, neboť by játra mohla být exponována zkoušené látce přímo a nikoli prostřednictvím oběhového systému. Maximální objem kapaliny, který může být najednou podán žaludeční sondou nebo injekčně, závisí na velikosti testovacího zvířete. Objem by neměl překročit 2 ml/100 g tělesné hmotnosti. Použití vyšších objemů, než je uvedený objem, musí být zdůvodněno. Až na dráždivé a žíravé látky, které obvykle při vyšších koncentracích vykazují zesílené účinky, by měla být variabilita zkušebního objemu minimalizována nastavením koncentrace zajišťující konstantní objem při všech úrovních dávky.

1.5.6 **Příprava jaterních buněk**

Jaterní buňky se připravují z exponovaných zvířat zpravidla 12 až 16 hodin po podání dávky. Doplňující dřívější odebrání vzorků (obecně dvě až čtyři hodiny po expozici) je nezbytné, není-li po 12 až 16 hodinách jasná pozitivní odpověď. Mohou však být použity jiné doby odběru, jsou-li zdůvodněny na základě toxikokinetických údajů.

Krátkodobé kultury jaterních buněk savců se zpravidla zakládají perfuzí jater kolagenasou *in situ* a umožní se, aby se čerstvě disociované jaterní buňky zachytily na vhodném povrchu. Jaterní buňky z negativní kontroly by měly vykazovat životaschopnost (5) alespoň 50 %.

1.5.7 **Stanovení UDS**

Čerstvě izolované jaterní buňky savců se obvykle vhodnou dobu, např. tři až osm hodin, inkubují s médiem obsahujícím ^{3}H-TdR. Na konci inkubační doby by mělo být médium z buněk odstraněno a buňky poté mohou být inkubovány s médiem obsahujícím přebytek neznačeného thymidinu, aby byla snížena neinkorporovaná radioaktivita („cold chase“). Buňky se poté promyjí, fixují a vysuší. Při delší inkubační době nemusí být snížení radioaktivity nezbytné. Preparáty se ponoří do autoradiografické emulse, exponují se v temnu (např. v chladu 7 až 14 dnů), vyvolají se, obarví a spočítají se exponovaná zrna stříbra. Z každého zvířete se připraví dva až tři preparáty.

▼B

1.5.8 **Analýza**

Preparáty by měly obsahovat dostatečný počet morfologicky normálních buněk, aby mělo hodnocení UDS výpovědní hodnotu. Preparáty se pod mikroskopem prohlédnou na známky zjevné cytotoxicity (např. na pyknosu, sníženou úroveň značení radioaktivním izotopem).

Před počítáním zrn by měly být preparáty kódovány. Zpravidla se vyšetřuje 100 buněk na každé zvíře alespoň ze dvou preparátů; vyšetření méně než 100 buněk/zvíře by mělo být zdůvodněno. Při počítání zrn se jádra v S-fázi nevyšetřují, ale podíl buněk v S-fázi může být zaznamenán.

Množství ^{3}H-TdR inkorporovaného do jader a cytoplasmy morfologicky normálních buněk doložené navrstvením zrn stříbra by mělo být stanoveno vhodnou metodou.

Počet buněk se stanoví z počtu zrn odpovídajících buněčným jádrům (NG) a z průměrného počtu zrn v cytoplasmatických oblastech (CG) odpovídajících jádrům. Jako hodnota CG se použije buď počet buněk pro nejsilněji označenou oblast cytoplasmy, nebo průměrná hodnota dvou až tří náhodně vybraných oblastí v blízkosti dotyčných buněčných jader. Po odpovídajícím zdůvodnění mohou být použity i jiné postupy stanovení počtu buněk (např. počítání celých buněk) (6).

2. **ÚDAJE**

2.1 ZPRACOVÁNÍ VÝSLEDKŮ

Měly by být uvedeny údaje pro jednotlivé preparáty a zvířata. Údaje by měly být dále shrnuty ve formě tabulky. Odečtením hodnoty CG od hodnoty NG by měl být vypočten pro každou buňku, pro každé zvíře a pro každou dávku a čas čistý počet zrn odpovídajících buněčným jádrům (NNG). Jestliže jsou počítány „opravované“ buňky, měla by být kritéria pro definování „opravovaných“ buněk odůvodněna a založena na dosavadních nebo souběžných údajích o negativních kontrolách. Numerické výsledky mohou být zhodnoceny statistickými metodami. Mají-li být použity, měly by být statistické testy vybrány a odůvodněny před provedením studie.

2.2 HODNOCENÍ A INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

Mezi příklady kritérií pro pozitivní nebo negativní odpověď patří:

pozitivní
- i) hodnota NNG leží nad prahovou úrovní, která je zdůvodněna na základě dosavadních údajů laboratoře; nebo
- ii) hodnota NNG je významně vyšší než hodnota pro souběžnou kontrolu;

negativní
- i) hodnota NNG leží na dosavadní prahové hodnotě nebo pod ní; nebo
- ii) hodnota NNG není významně vyšší než hodnota pro souběžnou kontrolu.

▼B

Měla by být uvažována biologická relevance údajů, tj. měly by být vzaty v úvahu parametry, jako jsou variabilita zvířat, vztah dávky a odpovědi a cytotoxicita. Při hodnocení výsledků zkoušky mohou být použity jako pomocný prostředek statistické metody. Statistická významnost by neměla být jediným určujícím faktorem pro pozitivní odpověď.

Ačkoli většina experimentů poskytne jasně pozitivní nebo negativní výsledky, v ojedinělých případech neumožní soubor údajů vyslovit konečný výrok o aktivitě zkoušené látky. Výsledky mohou zůstat dvojznačné nebo sporné bez ohledu na to, kolikrát je experiment opakován.

Pozitivní výsledky zkoušky na UDS v jaterních buňkách savců *in vivo* znamenají, že zkoušená látka indukuje v jaterních buňkách savců *in vivo* poškození DNA, které lze opravit neplánovanou syntézou DNA *in vitro*. Negativní výsledky znamenají, že zkoušená látka za podmínek zkoušky neindukuje poškození DNA, které lze detekovat touto zkouškou.

Měla by být diskutována pravděpodobnost, s jakou se zkoušená látka dostane do krevního oběhu popř. do cílové tkáně (např. systémová toxicita).

3. **ZPRÁVY**

PROTOKOL O ZKOUŠCE

Protokol o zkoušce musí obsahovat tyto informace:

Rozpouštědlo/vehikulum:

— zdůvodnění volby vehikula,

— rozpustnost a stálost zkoušené látky v rozpouštědle/vehikulu, je-li známa.

Testovací zvířata:

— použitý druh/kmen,

— počet, stáří a pohlaví zvířat,

— zdroj, podmínky chovu, strava atd.,

— individuální hmotnost zvířat na počátku zkoušky, včetně rozpětí tělesné hmotnosti, střední hodnoty a směrodatné odchylky pro každou skupinu.

Zkušební podmínky:

— pozitivní a negativní (vehikulum/rozpouštědlo) kontroly,

— údaje ze studie pro zjištění rozsahu, pokud byla provedena,

— zdůvodnění zvolených úrovní dávek,

— údaje o přípravě zkoušené látky,

— údaje o podávání zkoušené látky,

— zdůvodnění způsobu podávání,

— popřípadě metody ověření, zda se zkoušená látka dostala do krevního oběhu nebo do cílové tkáně,

▼B

— případně přepočet mezi koncentrací zkoušené látky v krmivu nebo vodě (ppm) na odpovídající dávku (mg/kg tělesné hmotnosti/den),

— podrobné údaje o kvalitě krmiva a vody,

— podrobný popis rozvrhu expozice a odběru,

— metody stanovení toxicity,

— metody přípravy a kultivace jaterních buněk,

— použitá autoradiografická technika,

— počet preparátů a počet vyšetřených buněk,

— kritéria hodnocení,

— kritéria klasifikace studie na pozitivní, negativní nebo dvojznačnou.

Výsledky:

— střední hodnoty počtu zrn odpovídajících buněčným jádrům a počtu zrn odpovídajících cytoplasmě a čistý počet zrn, jednotlivě pro preparáty, zvířata a skupiny,

— podle možnosti závislost odpovědi na dávce,

— případné statistické hodnocení,

— známky toxicity,

— údaje o souběžné negativní (rozpouštědlo/vehikulum) a pozitivní kontrole,

— dosavadní údaje o negativní (rozpouštědlo/vehikulum) a pozitivní kontrole s rozmezími, středními hodnotami a směrodatnými odchylkami,

— počet buněk „opravovaných“ buněk, je-li stanoven,

— počet buněk v S-fázi, je-li stanoven,

— životaschopnost buněk.

Rozbor výsledků.

Závěry.

4. **LITERATURA**

1) Ashby, J., Lefevre, P.A., Burlinson, B. and Penman, M.G. (1985). An Assessment of the *In Vivo* Rat Hepatocyte DNA Repair Assay. Mutation Res., 156, 1–18.

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

3) Kennelly, J.C., Waters, R., Ashby, J., Lefevre, P.A., Burlinson, B., Benford, D.J., Dean, S.W. and Mitchell, I. de G. (1993). In Vivo Rat Liver UDS Assay. In: Kirkland D.J. and Fox M., (Eds) Supplementary Mutagenicity Tests: UKEM Recommended Procedures. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report. Part II revised. Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, s. 52–77.

▼B

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

5) Fautz, R., Hussain, B., Efstathiou, E. and 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, 21–27.

6) Mirsalis, J.C., Tyson, C.K. and Butterworth, B.E. (1982). Detection of Genotoxic Carcinogens in the *In Vivo/In Vitro* Hepatocyte DNA Repair Assay. Environ. Mutagen, 4, 553–562.

▼M8

B.40 LEPTAVÉ ÚČINKY NA KŮŽI *IN VITRO*: ZKUŠEBNÍ METODA TRANSKUTÁNNÍHO ELEKTRICKÉHO ODPORU (TER)

ÚVOD

1. Tato zkušební metoda je rovnocenná Pokynu OECD pro zkoušení (TG) č. 430 (2015). Leptavými účinky na kůži se označuje vyvolání nevratného poškození kůže, které se projevuje jako viditelná, do koria zasahující nekróza pokožky, po aplikaci zkoušené chemické látky [jak ji definuje globálně harmonizovaný systém klasifikace a označování chemických látek Organizace spojených národů (GHS OSN) (1) a nařízení Evropské unie (EU) č. 1272/2008 o klasifikaci, označování a balení látek a směsí (dále jen „nařízení CLP“) ([1])]. Tato aktualizovaná zkušební metoda B.40 stanoví postup *in vitro*, který umožňuje určení nežíravých a žíravých látek a směsí podle systému GHS OSN a nařízení CLP.

2. Posuzování leptavých účinků na kůži obvykle zahrnovalo používání laboratorních zvířat (zkušební metoda B.4 ekvivalentní Pokynu OECD pro zkoušení č. 404 původně vydanému v roce 1981 a revidovanému v letech 1992, 2002 a 2015) (2). Kromě stávající zkušební metody B.40 byly validovány další zkušební metody *in vitro* pro zkoušení potenciálních leptavých účinků chemických látek na kůži, které byly přijaty jako zkušební metoda B.40a (ekvivalentní Pokynu OECD pro zkoušení č. 431) (3) a zkušební metoda B.65 (ekvivalentní Pokynu OECD pro zkoušení č. 435) (4), jež rovněž dokážou v případě potřeby určit podkategorie žíravých chemických látek. Několik validovaných zkušebních metod *in vitro* bylo přijato jako zkušební metoda B.46 (ekvivalentní Pokynu OECD pro zkoušení č. 439) (5) pro použití ke zkoušení dráždivosti pro kůži. Pokyny OECD k integrovanému přístupu ke zkouškám a posuzování (IATA) dráždivých/leptavých účinků na kůži popisují několik modulů obsahujících různé informační zdroje a analytické nástroje a poskytují návod (i) na integraci a používání stávajících údajů ze zkoušek i jiných údajů pro posouzení potenciálu dráždivých a leptavých účinků chemických látek na kůži a (ii) a navrhují přístup, když je nutné další zkoušení (6).

3. Tato zkušební metoda se týká sledovaných vlastností leptavých účinků na kůži z hlediska lidského zdraví. Vychází ze zkušební metody transkutánního elektrického odporu kůže potkana (TER), která využívá terčíky kůže k určení žíravých látek podle jejich schopnosti zapříčinit ztrátu normální integrity a bariérové funkce rohovité vrstvy (*stratum corneum*). Odpovídající pokyn OECD pro zkoušení byl původně přijat v roce 2004 a v roce 2015 byl aktualizován o odkazy na pokyny IATA.

4. Aby mohly být vyhodnoceny zkoušky leptavých účinků na kůži *in vitro* pro účely regulace, byly provedeny předběžné validační studie (7) a poté formální validační studie zkušební metody TER s využitím kůže potkana pro posouzení leptavých účinků na kůži (8) (9) (10) (11). Výsledek těchto

([1]) Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1272/2008 ze dne 16. prosince 2008 o klasifikaci, označování a balení látek a směsí, o změně a zrušení směrnic 67/548/EHS a 1999/45/ES a o změně nařízení (ES) č. 1907/2006, Úř. věst. L 353, 31.12.2008, s. 1.

▼**M8**

studií vedl k doporučení, že by zkušební metoda TER (určená jako validovaná referenční metoda – VRM) mohla být používána pro účely regulace pro posouzení leptavých účinků na kůži *in vivo* (12) (13) (14).

5. Nežli lze pro regulační účely použít pro leptavé účinky na kůži navrhovanou podobnou nebo modifikovanou zkušební metodu TER *in vitro* jinou než VRM, je zapotřebí stanovit její spolehlivost, relevantnost (přesnost) a omezení týkající se jejího navrhovaného použití, aby se zajistila její podobnost s VRM v souladu s požadavky standardů funkčnosti (15). Vzájemné uznávání údajů bude v rámci OECD zaručeno až poté, co bude každá navrhovaná nebo aktualizovaná zkušební metoda podle standardů funkčnosti podrobena revizi a zahrnuta do odpovídajícího pokynu OECD ke zkoušení.

DEFINICE

6. Použité definice jsou uvedeny v dodatku.

VÝCHOZÍ ÚVAHY

7. Validační studie (10) a další zveřejněné studie (16) (17) ukazují, že zkušební metoda TER dokáže rozlišit známé látky s leptavými účinky na kůži od látek, které na kůži nemají leptavé účinky, při celkové citlivosti 94 % (51/54) a specifičnosti 71 % (48/68) u databáze 122 látek.

8. Tato zkušební metoda řeší leptavé účinky na kůži *in vitro*. Umožňuje určení nežíravých a žíravých zkoušených chemických látek podle systému GHS OSN a nařízení CLP. Jak prokazují validační studie (8) (9) (10) (11), omezením této zkušební metody je to, že neumožňuje klasifikaci žíravých látek a směsí do podkategorií podle systému GHS OSN / CLP. Platný právní rámec určí, jak bude tato zkušební metoda používána. I když tato zkušební metoda neposkytuje odpovídající informace o dráždivosti pro kůži, je třeba poznamenat, že zkušební metoda B.46 řeší konkrétně zdravotní účinky dráždivosti pro kůži *in vitro* (5). Pro úplné vyhodnocení lokálních účinků na kůži po jednotlivých kožních expozicích je třeba postupovat podle pokynů OECD k integrovanému přístupu ke zkouškám a posuzování dráždivých/leptavých účinků na kůži (6).

9. Při validaci této zkušební metody byla testována široká škála chemikálií (především chemických látek) a empirická databáze validační studie obsahovala celkem 60 látek z nejrůznějších chemických tříd (8) (9). Podle všech dostupných údajů je tato zkušební metoda použitelná pro širokou škálu chemických tříd a skupenství, včetně kapalin, polotuhých látek, pevných látek a vosků. Protože však pro některá skupenství nejsou okamžitě k dispozici zkušební položky s vhodnými referenčními údaji, je třeba poznamenat, že při validaci byl posuzován srovnatelně malý počet vosků a žíravých pevných látek. Kapaliny mohou být vodné či nevodné; pevné látky mohou být ve vodě rozpustné či nerozpustné. V případech, kdy mohou být předloženy důkazy prokazující nepoužitelnost této zkušební metody ke zkoušení specifické kategorie látek, neměla by se tato zkušební metoda na tuto specifickou kategorii látek používat. Dále se předpokládá, že tato zkušební metoda je použitelná i pro směsi jako rozšíření její použitelnosti pro látky. Avšak vzhledem ke skutečnosti, že směsi zahrnují širokou škálu kategorií a složení a že v současné době jsou k dispozici pouze omezené údaje o zkoušení směsí, v případech, kdy lze prokázat nepoužitelnost této zkušební metody pro konkrétní kategorii směsí (*např.* podle strategie navržené v Eskes *et al.*, 2012) (18), by se tato zkušební metoda neměla pro tuto konkrétní kategorii směsí používat. Před použitím této zkušební metody ke zkoušení

▼M8

směsi s cílem získat údaje pro zamýšlené regulační účely by mělo být zváženo, zda tato metoda může pro tento účel poskytnout přiměřené výsledky, a pokud ano, proč tomu tak je. Takové úvahy nejsou nutné, pokud existuje právní požadavek na zkoušení dané směsi. Plyny a aerosoly dosud nebyly ve validačních studiích hodnoceny (8) (9). Ačkoli není jejich zkoušení pomocí zkušební metody TER teoreticky vyloučeno, současná zkušební metoda zkoušení plynů a aerosolů neumožňuje.

PRINCIP ZKOUŠKY

10. Zkoušená chemická látka je aplikována až 24 hodin na epidermální stranu terčíků kůže ve dvoukomorovém zkušebním systému, ve kterém terčíky kůže oddělují obě komory. Terčíky kůže jsou odebrány z humánně usmrcených potkanů starých 28–30 dní. Chemické látky s leptavými účinky jsou identifikovány schopností způsobit ztrátu normální integrity a bariérové funkce rohovité vrstvy (stratum corneum), která je měřena jako snížení vlastního TER pod určitou prahovou úroveň (16) (viz odstavec 32). Jako hraniční hodnota TER pro pokožku potkanů byla vybrána hodnota 5 kΩ a to na základě rozsáhlých údajů pro široké spektrum látek, pro něž hodnota TER v převážné většině případů byla buď značně nad (často > 10 kΩ), nebo značně pod (často < 3 kΩ) touto hraniční hodnotou (16). Všeobecně platí, že zkoušené chemické látky, které nejsou žíravé pro zvířata, ale jsou dráždivé nebo nedráždivé, nesnižují TER pod tuto hraniční hodnotu. Použití jiných kožních přípravků nebo jiného přístroje může změnit volbu hraniční hodnoty a vyžadovat její další validaci.

11. Do zkušebního postupu je pro potvrzující zkoušku pozitivních výsledků včetně hodnot TER okolo 5 kΩ zařazen stupeň pro stanovení vázání barviva. Tento stupeň pro stanovení vázání barviva určuje, zda zvýšení permeability iontů je důsledkem fyzikálního porušení rohovité vrstvy (*stratum corneum*). Ukázalo se, že metoda TER s využitím kůže potkana umožňuje předvídat výsledky zjišťování leptavých účinků *in vivo* s králíky podle zkušební metody B.4 (2).

PROKÁZÁNÍ ZPŮSOBILOSTI

12. Dříve než začnou laboratoře rutinně používat zkušební metodu TER s využitím kůže potkana, která dodržuje tuto zkušební metodu, měly by prokázat svou odbornou způsobilost správným určením klasifikace dvanácti vhodných látek doporučených v tabulce 1. V situacích, kdy některá z uvedených látek není k dispozici, lze v odůvodněných případech použít jinou látku, u níž jsou k dispozici odpovídající referenční údaje o použití *in vivo* a *in vitro* (např. ze seznamu referenčních chemických látek (16)), pokud budou použita stejná kritéria výběru jako kritéria popsaná v tabulce 1.

Tabulka 1

Seznam vhodných látek ([1])

Látka	č. CAS	Třída chemických látek ([2])	Kategorie GHS OSN/CLP na základě výsledků *in vivo* ([3])	Kategorie VRM na základě výsledků *in vitro*	Skupenství	pH ([4])
Látky žíravé *in vivo*						
N,N'-dimethyl dipropylentriamin	10563-29-8	organická zásada	1A	6 × C	K	8,3
propan-1,2-diamin	78-90-0	organická zásada	1A	6 × C	K	8,3

▼**M8**

Látka	č. CAS	Třída chemických látek ([2])	Kategorie GHS OSN/CLP na základě výsledků *in vivo* ([3])	Kategorie VRM na základě výsledků *in vitro*	Skupenství	pH ([4])
Látky žíravé *in vivo*						
kyselina sírová (10 %)	7664-93-9	anorganická kyselina	(1A/)1B/1C	5 × C 1 × NC	K	1,2
hydroxid draselný (10 % aq)	1310-58-3	anorganická zásada	(1A/)1B/1C	6 × C	K	13,2
kyselina oktanová (kaprylová)	124-07-2	organická kyselina	1B/1C	4 × C 2 × NC	K	3,6
2-terc-butylfenol	88-18-6	fenol	1B/1C	4 × C 2 × NC	K	3,9
Látky nežíravé *in vivo*						
kyselina isostearová	2724-58-5	organická kyselina	NC	6 × NC	K	3,6
4-amino-1H-1,2,4-triazol	584-13-4	organická zásada	NC	6 × NC	P	5,5
fenethylbromid	103-63-9	elektrofilní	NC	6 × NC	K	3,6
4-(methylthio)benzaldehyd	3446-89-7	elektrofilní	NC	6 × NC	K	6,8
1,9-dekadien	1647-16-1	neutrální organická látka	NC	6 × NC	K	3,9
tetrachlorethen	127-18-4	neutrální organická látka	NC	6 × NC	K	4,5

Zkratky: aq = vodný; č. CAS = Chemical Abstracts Service Registry Number (registrační číslo CAS); VRM = validovaná referenční metoda; C = žíravý; NC = nežíravý.

([1]) Látky pro zkoušení způsobilosti, roztříděné nejprve na žíravé a nežíravé, poté do podkategorií leptavých látek a poté podle chemické třídy, byly vybrány z látek použitých ve validační studii ECVAM zkušební metody TER s využitím kůže potkana (8) (9). Není-li uvedeno jinak, byly látky zkoušeny na úrovni čistoty dosažené při nákupu z komerčního zdroje (8). Výběr zahrnoval pokud možno látky, které: i) jsou charakteristické pro celý rozsah poleptání (např. nežíravé; slabě až silně žíravé), jež validovaná referenční metoda dokáže změřit nebo predikovat; ii) jsou charakteristické pro chemické třídy použité ve validační studii; iii) vyjadřují funkční charakteristiky validované referenční metody; iv) mají chemickou strukturu, která je dobře definována; v) vyvolávají v referenční zkušební metodě *in vivo* definitivní výsledky; vi) jsou komerčně dostupné; a vii) nejsou spojeny s příliš vysokými náklady na likvidaci odpadu.

([2]) Chemická třída přiřazená podle Barratt *et al.* (8).

([3]) Odpovídající obalové skupiny jsou UN I, II a III pro kategorie GHS OSN/CLP 1A, 1B a 1C v tomto pořadí.

([4]) Hodnoty pH převzaty z Fentem *et al.* (9) a Barratt *et al.* (8).

▼M8

POSTUP

13. K dispozici jsou standardní prováděcí postupy pro zkušební metodu TER s využitím kůže potkana pro zjišťování leptavých účinků na kůži (19). Zkušební metody TER s využitím kůže potkana zahrnuté v této zkušební metodě musí splňovat následující podmínky:

Zvířata

14. Měli by být použiti potkani, protože citlivost jejich kůže k látkám v této zkušební metodě již byla prokázána (12) a jsou jediným zdrojem kůže, který je formálně validován (8) (9). Stáří (v době odběru kůže) a kmen potkanů jsou zvláště důležité pro zajištění toho, aby folikuly chlupů byly v latentní fázi, před začátkem růstu zralé srsti.

15. Hřbetní a boční srst mladých, přibližně 22denních samců nebo samic potkanů (z kmene příbuzného Wistaru nebo srovnatelného kmene) se opatrně odstraní holicím strojkem. Zvířata se poté umyjí opatrným otíráním, přičemž se oholená oblast ponoří do roztoku antibiotik (obsahujícího např. streptomycin, penicilin, chloramfenikol a amfotericin o koncentracích zastavujících růst bakterií). Zvířata se třetí nebo čtvrtý den po prvním omytí znovu omyjí roztokem antibiotik a použijí se do 3 dnů po druhém omytí, kdy jejich *stratum corneum* po odstranění srsti zregeneruje.

Příprava terčíků kůže

16. Zvířata se humánně usmrtí ve stáří 28–30 dní; toto stáří je zásadně důležité. Z každého zvířete se poté odstraní hřbetní a boční kůže a nadbytečný tuk se z kůže opatrně seškrábne. Odeberou se terčíky kůže o průměru přibližně 20 mm. Kůže může být před použitím terčíků uchovávána, je-li prokázáno, že pozitivní a negativní kontrolní údaje jsou ekvivalentní údajům získaným s kůží čerstvou.

17. Každý terčík kůže se přeloží přes jeden z konců teflonové (PTFE) trubičky tak, aby epidermis byla v kontaktu s trubičkou. Přes konec trubičky se těsně přetáhne pryžový O-kroužek, aby byla kůže upevněna, a přebytek tkáně se ořízne. Pryžový O-kroužek na teflonové trubičce se poté pečlivě utěsní ke konci teflonové trubičky vrstvou vazelíny. Trubička držená pomocí pružinové svorky se umístí do receptorové komory obsahující roztok síranu hořečnatého $MgSO_4$ (154 mM) (obrázek 1). Terčík kůže musí být úplně ponořen do roztoku $MgSO_4$. Z jedné kůže potkana může být získáno 10 až 15 terčíků kůže. Rozměry trubičky a O-kroužku jsou uvedeny na obrázku 2.

18. Pro každou zvířecí kůži je před započetím zkoušky změřena hodnota TER dvou terčíků kůže jako postup kontroly jakosti. Pro oba terčíky by měla být naměřena hodnota elektrického odporu větší než 10 kΩ, mají-li být pro tuto zkušební metodu použity ostatní terčíky. Pokud je hodnota odporu nižší než 10 kΩ, musí být ostatní terčíky z dotyčné kůže ze zkoušek vyřazeny.

Aplikace zkoušené chemické látky a kontrolních látek

19. Pro každou zkoušku (experiment) by měly být provedeny souběžné pozitivní a negativní kontroly k zajištění dostatečné účinnosti daného experimentálního modelu. V každé zkoušce (experimentu) by měly být použity terčíky kůže z téhož zvířete. Navrženými zkoušenými chemickými látkami pro pozitivní kontrolu je 10M kyselina chlorovodíková a pro negativní kontrolu destilovaná voda.

▼M8

20. Kapalné zkoušené chemické látky (150 µl) se aplikují stejnoměrně na epidermis uvnitř trubičky. Při zkoušení pevných materiálů se použije dostatečné množství tak, aby byla rovnoměrně pokryta celá epidermis. Poté se na povrch pevné látky přidá deionizovaná voda (150 µl) a trubička se lehce protřepe. K zajištění maximálního styku látky s kůží může být nutné zahřát pevnou látku až na 30 °C, aby se zkoušená chemická látka roztavila či změkla, nebo ji rozemlít na zrnitý materiál či prášek.

21. Pro každou zkoušenou a kontrolní chemickou látku se použijí tři terčíky kůže pro každou zkoušku (experiment). Zkoušené chemické látky se aplikují po dobu 24 hodin při 20–23 °C. Zkoušená chemická látka se zcela odstraní proudem tekoucí vody o nejvýše pokojové teplotě.

Měření TER

22. Impedance kůže se měří jako TER nízkonapěťovým impedančním Wheatstoneovým můstkem pro střídavý proud (18). Všeobecné specifikace můstku: provozní napětí 1 až 3 V, sinusový nebo pravoúhlý tvar kmitů střídavého proudu frekvence 50–1 000 Hz a rozsah měření nejméně 0,1–30 kΩ. Můstek použitý ve validační studii měří induktanci, kapacitanci a odpor až do hodnot 2 000 H, 2 000 µF, a 2 MΩ při frekvencích 100 Hz nebo 1 kHz za použití sériových nebo paralelních hodnot. Pro účely měření TER v rámci zkoušky leptavých účinků se zaznamenávají hodnoty odporu při frekvenci 100 Hz a za použití sériových hodnot. Před měřením elektrického odporu se povrchové napětí kůže sníží přidáním dostatečného objemu 70 % ethanolu tak, aby byla epidermis zakryta. Po několika sekundách se ethanol z trubice vylije a tkáň se zvlhčí přidáním 3 ml roztoku $MgSO_4$ (154 mM). Elektrody můstku se umístí na obě strany terčíku kůže za účelem odečtu odporu v kΩ/terčík kůže (obrázek 1). Rozměry elektrod a délky exponovaných částí elektrod pod krokosvorkou jsou uvedeny na obrázku 2. Svorka vnitřní elektrody je během měření odporu opřena o horní konec teflonové trubičky, aby bylo zajištěno, že se délka části elektrody ponořené v roztoku $MgSO_4$ nemění. Vnější elektroda je umístěna uvnitř receptorové komory tak, aby spočívala na dně komory. Vzdálenost mezi pružinovou svorkou a dnem teflonové trubičky se udržuje konstantní (obrázek 2), neboť tato vzdálenost má vliv na naměřené hodnoty odporu. Proto by vzdálenost mezi vnitřní elektrodou a terčíkem kůže měla být konstantní a minimální (1–2 mm).

23. Je-li naměřená hodnota vyšší než 20 kΩ, může to být způsobeno zbytky vrstvy zkoušené látky na epidermální straně terčíku kůže. O odstranění této vrstvy se lze pokusit např. tím, že se teflonová trubička zakryje palcem v rukavici a přibližně 10 sekund se protřepává; roztok $MgSO_4$ se odstraní a měření se opakuje s čerstvým $MgSO_4$.

24. Vlastnosti a rozměry zkušebního přístroje a použitý experimentální postup mohou ovlivnit naměřené hodnoty TER. Prahová hodnota 5 kΩ pro leptavé účinky byla odvozena na základě údajů zjištěných se specifickým přístrojem a postupem popsanými v této zkušební metodě. Pokud se změní podmínky zkoušky nebo je použit jiný přístroj, mohou platit jiné prahové a kontrolní hodnoty. Proto je nutné kalibrovat metodu a prahové hodnoty odporu zkoušením řady vhodných látek vybraných z látek použitých ve validační studii (8) (9) nebo z tříd chemických látek podobných zkoušeným látkám. Soubor vhodných látek je uveden v tabulce 1.

▼M8

Metody stanovení vázání barviva

25. Expozice kůže některým nežíravým materiálům může snížit odpor pod hraniční hodnotu 5 kΩ, v důsledku čehož je umožněn průnik iontů přes *stratum corneum* a snižuje se elektrický odpor (9). Např. neutrální organické látky a povrchově aktivní látky (včetně detergentů, emulgátorů a jiných povrchově aktivních látek) mohou vést k odstranění kožních lipidů, čímž se bariéra stane pro ionty průchodnější. Proto pokud jsou při absenci viditelného poškození terčíků kůže hodnoty TER vyvolané těmito chemickými látkami okolo 5 kΩ, nebo jsou nižší než 5 kΩ, mělo by být na kontrolních a upravených tkáních provedeno posouzení průniku barviva ke zjištění, zda jsou naměřené hodnoty TER výsledkem zvýšené permeability kůže, nebo poleptání kůže (7) (9). V případě poleptání kůže, kdy *stratum corneum* je porušeno, barvivo sulforhodamin B při aplikaci na kůži rychle proniká a zbarvuje podložní tkáň. Toto konkrétní barvivo je stabilní v prostředí širokého rozsahu látek a nemá na něj vliv níže popsaný extrakční postup.

Aplikace a odstranění barviva sulforhodaminu B

26. Po měření TER se roztok síranu hořečnatého vylije z trubičky a kůže se pečlivě přezkoumá, zda není zjevně poškozena. Pokud není patrné žádné zjevné větší poškození (např. perforace), aplikuje se na epidermální stranu každého terčíku kůže po dobu 2 hodin 150 µl 10 % roztoku (m/V) barviva sulforhodaminu B (Acid Red 52; C.I. 45100; č. CAS 3520-42-1) v destilované vodě. Terčíky kůže se poté přibližně 10 sekund omývají tekoucí vodou o nejvýše pokojové teplotě, aby se odstranilo veškeré volné barvivo. Všechny terčíky kůže se opatrně sejmou z teflonové trubičky a umístí se do lahvičky (např. 20 ml skleněné lahvičky pro scintilační spektrometrii) obsahující deionizovanou vodu (8 ml). Lahvičky se lehce 5 minut protřepávají, aby se odstranilo další volné barvivo. Tato metoda oplachování se poté zopakuje a pak se terčíky kůže vyjmou a vloží do lahviček obsahujících 5 ml 30 % roztoku (m/V) natrium-dodecyl-sulfátu (SDS) v destilované vodě a inkubují se přes noc při 60 °C.

27. Po inkubaci se všechny terčíky kůže vyjmou a zlikvidují a zbylý roztok se odstředí 8 minut při 21 °C (při relativní odstředivé síle ~175 × g). 1 ml vzorku supernatantu se poté zředí 4 ml 30 % (m/V) roztoku SDS v destilované vodě. Absorbance (A) roztoku se měří přibližně při 565 nm.

Výpočet obsahu barviva

28. Obsah barviva sulforhodaminu B na terčík kůže se vypočte z hodnot absorbance A (9) (molární absorpční koeficient sulforhodaminu B při 565 nm = $8{,}7 \times l0^4$; molekulová hmotnost = 580). Obsah barviva sulforhodaminu B se vypočte pro každý terčík kůže využitím vhodné kalibrační křivky a poté se vypočte jeho střední hodnota.

Kritéria přijatelnosti

29. Střední hodnoty výsledků TER jsou přijatelné, pokud hodnoty pro paralelní pozitivní a negativní kontroly spadají do přijatelného rozmezí dané metody v dotyčné zkušební laboratoři. Pro popsanou metodiku a přístroje jsou přijatelné hodnoty rozmezí odporu uvedeny v následující tabulce:

▼**M8**

Kontrola	Látka	Rozmezí odporu (kΩ)
Pozitivní	10M kyselina chlorovodíková	0,5–1,0
Negativní	destilovaná voda	10–25

30. Střední hodnoty výsledků vázání barviva jsou přijatelné, pokud hodnoty pro paralelní kontroly spadají do přijatelného rozmezí metody. Doporučené přijatelné hodnoty rozmezí obsahu barviva pro kontrolní látky pro popsanou metodiku a přístroje jsou uvedeny v následující tabulce:

Kontrola	Látka	Rozmezí obsahu barviva (μg/terčík kůže)
Pozitivní	10M kyselina chlorovodíková	40–100
Negativní	destilovaná voda	15–35

Interpretace výsledků

31. Hraniční hodnota TER odlišující žíravé zkoušené chemické látky od nežíravých byla stanovena během optimalizace zkušební metody, testována během předvalidační fáze a potvrzena ve formální validační studii.

32. Predikční model pro zkušební metodu TER s využitím kůže potkana (9) (19), související se systémem klasifikace GHS OSN/CLP, je uveden níže:

Zkoušená chemická látka je pokládána za látku, která nemá na kůži leptavé účinky (nežíravá látka):

i) je-li střední hodnota TER změřená pro tuto zkoušenou chemickou látku větší než 5 kΩ; nebo

ii) je-li střední hodnota TER naměřená u zkoušené chemické látky menší nebo rovna (≤) 5 kΩ a

— terčíky kůže nevykazují žádné zjevné poškození (např. perforaci), a

— střední obsah barviva v terčíku kůže je nižší než (<) střední obsah barviva v terčíku kůže získaný souběžně při použití 10M HCl jako pozitivní kontroly (viz odstavec 30, kde jsou uvedeny hodnoty pozitivní kontroly).

Zkoušená chemická látka je pokládána za látku, která má na kůži leptavé účinky (žíravá látka):

i) je-li střední hodnota TER naměřená u zkoušené chemické látky menší nebo rovna (≤) 5 kΩ a terčíky kůže jsou zjevně poškozeny (např. perforovány); nebo

ii) je-li střední hodnota TER naměřená u zkoušené chemické látky menší nebo rovna (≤) 5 kΩ a

— terčíky kůže nejsou zjevně poškozeny (např. perforovány), ale

▼M8

— střední obsah barviva v terčíku kůže je větší nebo roven (≥) střednímu obsahu barviva v terčíku kůže získanému souběžně při použití 10M HCl jako pozitivní kontroly (viz odstavec 30, kde jsou uvedeny hodnoty pozitivní kontroly).

33. U zkoušené látky s jednoznačnou klasifikací by mělo stačit jedno provedení zkoušky (experiment) za použití alespoň tří replikátů terčíků kůže. Avšak v případě hraničních výsledků, jako jsou například nesouhlasné výsledky opakovaných měření a/nebo střední hodnota TER rovnající se 5 ± 0,5 kΩ, by se mělo zvážit provedení druhé nezávislé zkoušky (experimentu), jakož i třetí zkoušky v případě nesouhlasných výsledků mezi prvními dvěma provedenými zkouškami (experimenty).

ÚDAJE A PŘEDKLÁDÁNÍ ZPRÁV

Údaje

34. Hodnoty odporu (kΩ) a případně hodnoty obsahu barviva (μg/terčík) pro zkoušenou chemickou látku a také pro pozitivní a negativní kontroly by měly být uvedeny ve formě tabulky, včetně údajů za jednotlivé replikované terčíky z jednotlivých zkoušek (experimentů) a jejich střední hodnoty spolu s jejich ± směrodatnou odchylkou. Uvádějí se všechny opakované experimenty. Pozorované poškození terčíků kůže je nutno uvádět za každou zkoušenou chemickou látku.

ZÁVĚREČNÁ ZPRÁVA

35. Závěrečná zpráva by měla obsahovat tyto informace:

Zkoušené chemické látky a kontrolní látky

— jednosložková látka: chemická identifikace, např. název podle IUPAC nebo CAS, číslo CAS, kód SMILES nebo InChI, strukturní vzorec, čistota, případně chemická identita nečistot, je-li to prakticky možné, atd.,

— vícesložková látka, UVCB a směs: charakterizované pokud možno chemickou identitou (viz výše), kvantitativním výskytem a relevantními fyzikálně-chemickými vlastnostmi složek,

— fyzický vzhled, rozpustnost ve vodě a další relevantní fyzikálně-chemické vlastnosti,

— zdroj, číslo šarže, jsou-li k dispozici,

— případně ošetření zkoušených látek chemických/kontrolních látek před zkoušením (např. zahřátí, mletí),

— stabilita zkoušené chemické látky, datum použitelnosti nebo datum opětovné analýzy, je-li známo,

— podmínky skladování.

Pokusná zvířata:

— použitý kmen a pohlaví,

— stáří zvířat použitých jako dárcovská zvířata,

— zdroj, podmínky chovu, potrava atd.,

— podrobnosti přípravy kůže.

▼**M8**

Zkušební podmínky:

— kalibrační křivky zkušebního přístroje,

— kalibrační křivky pro zkoušku účinnosti vázání barviva, pásmová propustnost použitá pro měření hodnot optické hustoty, případně rozsah linearity přístroje měřícího optické hustoty (např. spektrofotometru),

— podrobnosti zkušebního postupu pro měření TER,

— případně podrobnosti zkušebního postupu pro stanovení vázání barviva,

— použité zkušební dávky, doba (doby) expozice a teplota (teploty) expozice,

— informace o použitém postupu vymývání po expozici,

— počet replik terčíků kůže použitých na jednu zkoušenou chemickou látku a kontroly (pozitivní a negativní kontrola),

— popis jakýchkoli úprav zkušebního postupu,

— odkaz na historické údaje modelu. Ty by měly zejména zahrnovat:

i) přijatelnost hodnot TER pozitivních a negativních kontrol (v kΩ) s odkazem na rozsahy odporu pozitivních a negativních kontrol;

ii) přijatelnost hodnot obsahu barviva u pozitivních a negativních kontrol (v μg/terčík) s odkazem na rozpětí obsahu barviva u pozitivních a negativních kontrol;

iii) přijatelnost výsledků zkoušek s odkazem na historickou variabilitu mezi replikami terčíků kůže,

— popis použitých kritérií rozhodování / predikčního modelu.

Výsledky:

— údaje změřených hodnot TER a případně obsahu vázaného barviva pro jednotlivé zkoušené chemické látky a kontroly, pro každé provedení zkoušky (experiment) a každou repliku terčíků kůže (jednotlivá zvířata a jednotlivé vzorky kůže), střední hodnoty, směrodatné odchylky a variační koeficienty zpracované ve formě tabulky,

— popis jakýchkoli pozorovaných účinků,

— odvozená klasifikace s odkazem na použitý predikční model / kritéria rozhodování.

Diskuse o výsledcích

Závěry

LITERATURA

(1) United Nations (UN) (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Second Revised Edition, UN New York and Geneva, 2013. Dostupné na webových stránkách: [http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html].

▼**M8**

(2) Kapitola B.4 této přílohy, Akutní dráždivé/leptavé účinky na kůži.

(3) Kapitola B.40a této přílohy, Kožní model *in vitro*.

(4) Kapitola B.65 této přílohy, Zkušební metoda s využitím membránové bariéry *in vitro*.

(5) Kapitola B.46 této přílohy, Dráždivost pro kůži *in vitro*: Zkušební metoda za použití rekonstruované lidské epidermis.

(6) OECD (2014). Guidance document on Integrated Approaches to Testing and Assessment for Skin Irritation/Corrosion. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (No 203), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(7) Botham P.A., Chamberlain M., Barratt M.D., Curren R.D., Esdaile D.J., Gardner J.R., Gordon V.C., Hildebrand B., Lewis R.W., Liebsch M., Logemann P., Osborne R., Ponec M., Regnier J.F., Steiling W., Walker A.P., and Balls M. (1995). A Prevalidation Study on *In Vitro* Skin Corrosivity Testing. The Report and Recommendations of ECVAM Workshop 6.*ATLA* 23, 219-255.

(8) Barratt M.D., Brantom P.G., Fentem J.H., Gerner I., Walker A.P., and Worth A.P. (1998). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Skin Corrosivity. 1. Selection and Distribution of the Test Chemicals. *Toxic.In Vitro* 12, 471-482.

(9) Fentem J.H., Archer G.E.B., Balls M., Botham P.A., Curren R.D., Earl L.K., Esdaile D.J., Holzhütter H.-G., and Liebsch M. (1998). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests For Skin Corrosivity. 2. Results and Evaluation by the Management Team. *Toxic.In Vitro*12, 483- 524.

(10) Balls M., Blaauboer B.J., Fentem J.H., Bruner L., Combes R.D., Ekwall B., Fielder R.J., Guillouzo A., Lewis R.W., Lovell D.P., Reinhardt C.A., Repetto G., Sladowski D., Spielmann H., and Zucco F. (1995). Practical Aspects of the Validation of Toxicity Test Procedures. The Report and Recommendations of ECVAM Workshops.*ATLA*23, 129-147.

(11) ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods). (1997). Validation and Regulatory Acceptance of Toxicological Test Methods. Publikace NIH č. 97-3981. National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA.

(12) EC-ECVAM (1998). Statement on the Scientific Validity of the Rat Skin Transcutaneos Electrical Resistance (TER) Test (an *In Vitro* Test for Skin Corrosivity), Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC10), 3 April 1998.

(13) ECVAM (1998). ECVAM News & Views. ATLA 26, 275–280.

(14) ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods) (2002). ICCVAM Evaluation of EpiDerm™ (EPI-200), EPISKIN™ (SM), and the Rat Skin Transcutaneous Electrical Resistance (TER) Assay: *In Vitro* Test Methods for Assessing Dermal Corrosivity Potential of Chemicals. Publikace NIH č. 02-4502. National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods, National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA.

(15) OECD (2015). Performance Standards for the Assessment of Proposed Similar or Modified *In Vitro* Transcutaneous Electrical Resistance (TER) Test Method for Skin Corrosion in Relation to TG 430. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No 218. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

▼**M8**

(16) Oliver G.J.A., Pemberton M.A., and Rhodes C. (1986). An *In Vitro* Skin Corrosivity Test -Modifications and Validation. Fd. Chem. *Toxicol.*24, 507-512.

(17) Botham P.A., Hall T.J., Dennett R., McCall J.C., Basketter D.A., Whittle E., Cheeseman M., Esdaile D.J., and Gardner J. (1992). The Skin Corrosivity Test *In Vitro:* Results of an Interlaboratory Trial. *Toxicol*. *In Vitro* 6,191-194.

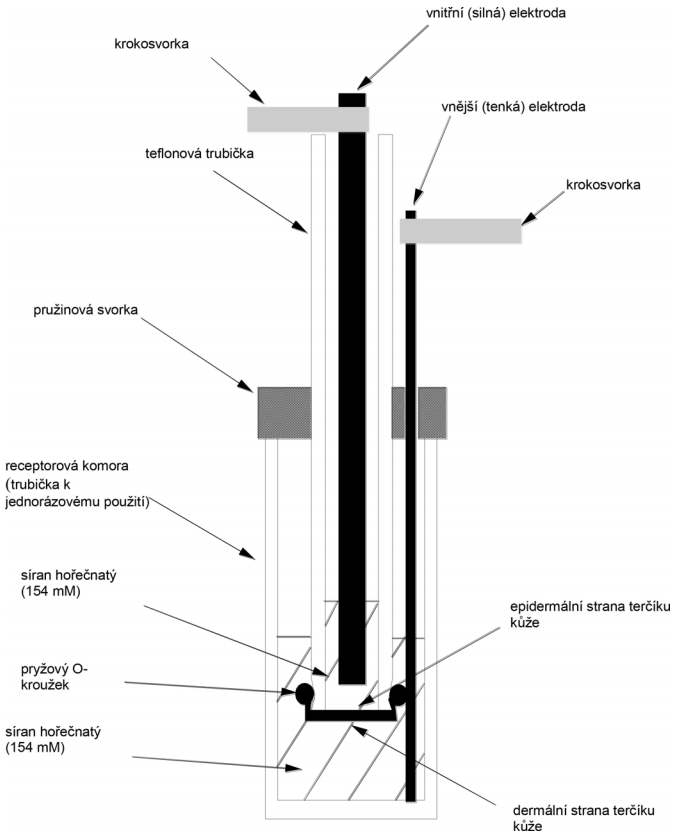
(18) Eskes C., Detappe V., Koëter H., Kreysa J., Liebsch M., Zuang V., Amcoff P., Barroso J., Cotovio J., Guest R., Hermann M., Hoffmann S., Masson P., Alépée N., Arce L.A., Brüschweiler B., Catone T., Cihak R., Clouzeau J., D'Abrosca F., Delveaux C., Derouette J.P., Engelking O., Facchini D., Fröhlicher M., Hofmann M., Hopf N., Molinari J., Oberli A., Ott M., Peter R., Sá-Rocha V.M., Schenk D., Tomicic C., Vanparys P., Verdon B., Wallenhorst T., Winkler G.C. and Depallens O. (2012). Regulatory Assessment of *In Vitro* Skin Corrosion and Irritation Data Within the European Framework: Workshop Recommendations. Regul.*Toxicol.Pharmacol.* 62, 393-403.

(19) TER SOP (December 2008). *INVITTOX* Protocol (No 115) Rat Skin Transcutaneous Electrical Resistance (TER) Test.

(20) OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 34), Organisation for Economic Cooperation and Devlopment, Paris.

Obrázek 1

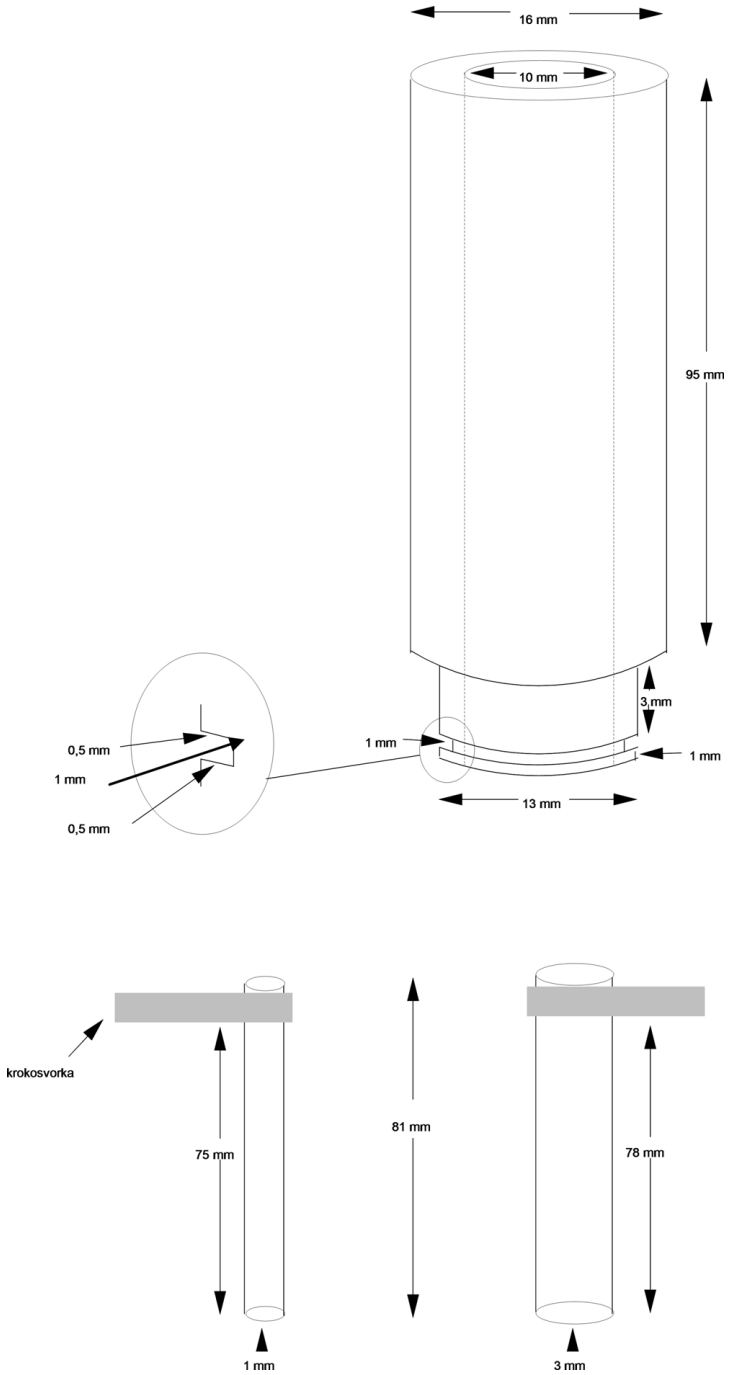
Přístroj Pro Zkoušku Ter Na Kůži Potkana



▼**M8**

Obrázek 2

Rozměry Teflonové a Receptorové Trubičky a Použitých Elektrod



Kritické faktory přístroje uvedeného výše:

— vnitřní průměr teflonové trubičky,

— taková délka elektrod vzhledem k teflonové trubičce a receptorové trubičce, aby se elektrody nedotýkaly terčíku kůže a aby standardní délka elektrody byla ve styku s roztokem $MgSO_4$,

▼**M8**

— objem roztoku $MgSO_4$ v receptorové trubičce musí vzhledem k hladině v teflonové trubičce dávat takovou výšku kapaliny, jak je znázorněno na obrázku 1,

— terčík kůže musí být k teflonové trubičce připevněn tak, aby elektrický odpor představoval skutečnou míru vlastností kůže.

▼M8

Dodatek

DEFINICE

Přesnost: přesnost shody mezi výsledky zkušební metody a přijatými referenčními hodnotami. Je to míra funkčnosti zkušební metody a jeden z aspektů její relevantnosti. Tento pojem se často používá místo pojmu „soulad“ a rozumí se jím podíl správných výsledků zkušební metody (20).

C („corrosive:“): žíravá látka.

Chemická látka: látka nebo směs.

Soulad: je měřítkem funkčnosti u zkušebních metod poskytujících kategorické výsledky a je jedním z aspektů její relevantnosti. Tento pojem se někdy používá místo pojmu „přesnost“ a je definován jako podíl všech zkoušených chemických látek, které jsou správně klasifikovány jako pozitivní nebo negativní. Soulad závisí do velké míry na prevalenci pozitivních výsledků u druhů studovaných zkoušených chemických látek (20).

GHS (Globálně harmonizovaný systém klasifikace a označování chemických látek (OSN)): systém navrhující klasifikaci chemických látek a směsí podle standardizovaných typů a úrovní fyzikální, zdravotní a environmentální nebezpečnosti a zabývající se příslušnými komunikačními prvky, jako jsou piktogramy, signální slova, výroky o nebezpečí, výroky o bezpečnostních opatřeních a bezpečnostní datové listy, které obsahují informace o jejich nežádoucích účincích s ohledem na ochranu lidí (včetně zaměstnavatelů, pracovníků, přepravců, spotřebitelů a osob reagujících na nouzové situace) a životního prostředí (1).

IATA: integrovaný přístup ke zkoušení a posuzování.

Směs: směs nebo roztok složený ze dvou nebo více látek.

Jednosložková látka: látka definovaná svým kvantitativním složením, v níž je přítomna jedna hlavní složka v míře alespoň 80 % hmot.

Vícesložková látka: látka definovaná svým kvantitativním složením, v níž je přítomna více než jedna hlavní složka v koncentraci $\geq$ 10 % hmot. a $<$ 80 % hmot. Vícesložková látka je výsledkem výrobního procesu. Rozdíl mezi směsí a vícesložkovou látkou spočívá v tom, že směs se získá smísením dvou nebo více látek bez chemické reakce. Vícesložková látka je výsledkem chemické reakce.

NC („non-corrosive“): nežíravá látka.

OD („optical density“): optická hustota (absorbance).

Pozitivní kontrola: replika obsahující všechny složky zkušebního systému a látku, o níž je známo, že způsobuje pozitivní reakci. Aby se zajistilo, že proměnlivost v reakci na pozitivní kontrolu bude možné časem vyhodnotit, rozsah pozitivní reakce by neměl být nadměrný.

▼**M8**

Standardy funkčnosti: standardy založené na validované referenční metodě, které slouží jako základ pro hodnocení srovnatelnosti navrhované zkušební metody, která je mechanicky a funkčně podobná. Patří mezi ně: i) zásadní složky zkušební metody; ii) minimální seznam srovnávacích látek vybraných z chemických látek používaných k prokázání přijatelné funkčnosti validované referenční metody; a iii) srovnatelné hladiny spolehlivosti a přesnosti založené na hodnotách získaných u validované referenční metody, jež by navrhovaná zkušební metoda měla prokázat při vyhodnocení za použití minimálního seznamu srovnávacích látek.

Relevantnost: popis vztahu zkoušky k účinku, který je předmětem zájmu, a také toho, zda je zkouška smysluplná a použitelná pro konkrétní účel. Vyjadřuje, do jaké míry zkušební metoda správně měří nebo predikuje biologický účinek, který je předmětem zájmu. Relevantnost zahrnuje také posouzení přesnosti (shody) zkušební metody (20).

Spolehlivost: měření rozsahu, v jakém může být zkušební metoda časem reprodukovatelná v laboratořích a mezi laboratořemi, když se provádí s použitím stejného protokolu. Hodnotí se na základě výpočtu vnitrolaboratorní a mezilaboratorní reprodukovatelnosti (20).

Citlivost: podíl všech pozitivních/aktivních chemických látek, které jsou na základě zkušební metody správně klasifikovány. Je měřítkem přesnosti zkušební metody, která poskytuje kategorické výsledky, a je důležitým prvkem při hodnocení relevantnosti zkušební metody (20).

Leptavé účinky na kůži:*in vivo*: vyvolání nevratného poškození kůže; zejména viditelné, do koria zasahující nekrózy pokožky do čtyř hodin po aplikaci zkoušené chemické látky. Reakce po poleptání se projevují vředy, krvácením, krvavými strupy a v závěru čtrnáctidenního pozorování ztrátou barvy v důsledku vyblednutí kůže, úplnými ložisky alopecie a jizvami. K vyhodnocení sporných lézí by se měla uvážit histopatologie.

Specifičnost: podíl všech negativních/neaktivních chemických látek, které jsou na základě zkušební metody správně klasifikovány. Je měřítkem přesnosti zkušební metody, která poskytuje kategorické výsledky, a je důležitým prvkem při hodnocení relevantnosti zkušební metody (20).

Látka: chemický prvek a jeho sloučeniny v přírodním stavu nebo získané výrobním postupem, včetně jakýchkoliv aditiv potřebných pro zachování stability výrobku a všech nečistot pocházejících z použitého postupu, ale s vyloučením všech rozpouštědel, která je možno oddělit bez ovlivnění stability dané látky nebo změny jejího složení.

(Provedení) zkoušky: jedna zkoušená chemická látka, která byla souběžně zkoušena na minimálně třech replikách terčíků kůže.

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

Transkutánní elektrický odpor (TER): je mírou elektrické impedance kůže, vyjádřenou hodnotou elektrického odporu v kiloohmech. Jednoduchá a robustní metoda posouzení bariérové funkce, která spočívá ve sledování průchodu iontů kůží užitím Wheatstoneova můstku.

UVCB: látky s neznámým nebo proměnlivým složením, komplexní reakční produkty nebo biologický materiál.

▼M8

B.40a LEPTAVÉ ÚČINKY NA KŮŽI *IN VITRO*: ZKUŠEBNÍ METODA ZA POUŽITÍ REKONSTRUOVANÉ LIDSKÉ EPIDERMIS (RhE)

ÚVOD

1. Tato zkušební metoda je rovnocenná Pokynu OECD pro zkoušení (TG) č. 431 (2016). Leptavými účinky na kůži se označuje vyvolání nevratného poškození kůže, které se projevuje jako viditelná, do koria zasahující nekróza pokožky, po aplikaci zkoušené chemické látky [jak ji definuje globálně harmonizovaný systém klasifikace a označování chemických látek Organizace spojených národů (GHS OSN) (1) a nařízení Evropské unie (EU) č. 1272/2008 o klasifikaci, označování a balení látek a směsí (dále jen „nařízení CLP“) ([1])]. Tato aktualizovaná zkušební metoda B.40a stanovuje postup *in vitro*, který umožňuje určení nežíravých a žíravých látek a směsí podle systému GHS OSN a nařízení CLP. Umožňuje také částečnou klasifikaci žíravých látek do podkategorií.

2. Posuzování potenciálu leptavých účinků chemických látek na kůži bylo obvykle prováděno na pokusných zvířatech (zkušební metoda B.4 ekvivalentní Pokynu OECD pro zkoušení č. 404; původně vydané v roce 1981 a revidované v letech 1992, 2002 a 2015) (2). Kromě stávající zkušební metody B.40a byly validovány další zkušební metody *in vitro* pro zkoušení potenciálních leptavých účinků chemických látek na kůži, které byly přijaty jako zkušební metoda B.40 (ekvivalentní Pokynu OECD pro zkoušení č. 430) (3) a zkušební metoda B.65 (ekvivalentní Pokynu OECD pro zkoušení č. 435) (4). Dále byla přijata zkušební metoda B.46 *in vitro* (ekvivalentní Pokynu OECD pro zkoušení č. 439) (5) pro zkoušení potenciálu dráždivosti pro kůži. Pokyny OECD k integrovanému přístupu ke zkouškám a posuzování (IATA) dráždivých/leptavých účinků na kůži popisují několik modulů obsahujících informační zdroje a analytické nástroje a poskytují návod (i) na integraci a používání stávajících údajů ze zkoušek i jiných údajů pro posouzení potenciálu dráždivých a leptavých účinků chemických látek na kůži a (ii) a navrhují přístup, když je nutné další zkoušení (6).

3. Tato zkušební metoda se týká sledovaných vlastností leptavých účinků na kůži z hlediska lidského zdraví. Využívá rekonstruované lidské *epidermis* (RhE) (získané z netransformovaných keratinocytů lidské epidermis), která věrně napodobuje histologické, morfologické, biochemické a fyziologické vlastnosti svrchních částí lidské kůže, tj. *epidermis*. Odpovídající pokyn OECD pro zkoušení byl původně přijat v roce 2004 a v roce 2013 byl aktualizován o další zkušební metody používající model s rekonstruovanou lidskou epidermis a možnost používat metody na podporu klasifikace žíravých chemických látek do podkategorií, dále byl aktualizován v roce 2015 o odkazy na pokyny IATA a bylo zavedeno použití alternativního postupu k měření životaschopnosti.

4. Tato zkušební metoda zahrnuje čtyři validované komerčně dostupné modely RhE. Pro dva z těchto komerčně dostupných zkušebních modelů, EpiSkin™ Standard Model (SM) a EpiDerm™ Skin Corrosivity Test (SCT) (EPI-200), byly provedeny (11) (12) předvalidační studie (7) (v dalším textu jen validované referenční metody - VRM) s následnou formální validační studií pro posouzení leptavých účinků na kůži (8)(9)(10). Závěr z těchto studií vedl k doporučení, že pro rozlišení žíravých (C) a nežíravých látek (NC) pro regulační účely by mohly být použity tyto dvě validované referenční metody

([1]) Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1272/2008 ze dne 16. prosince 2008 o klasifikaci, označování a balení látek a směsí, o změně a zrušení směrnic 67/548/EHS a 1999/45/ES a o změně nařízení (ES) č. 1907/2006, Úř. věst. L 353/1, 31.12.2008, s. 1.

▼M8

a že model EpiSkin™ by navíc mohl být používán na podporu třídění žíravých látek do podkategorií (13)(14)(15). Dva další komerčně dostupné modely *in vitro* pro zkoušení leptavých účinků na kůži za použití rekonstruované lidské epidermis vykazují podle validace na základě standardů funkčnosti podobné výsledky jako EpiDerm™ VRM (16) (17) (18). Jedná se o metody SkinEthic™ RHE ([1]) a epiCS® (dřívější název EST1000), které mohou být také použity pro regulační účely pro rozlišení žíravých a nežíravých látek (19) (20). Validační studie provedené výrobci modelu RhE v letech 2012 až 2014 s vylepšeným protokolem korigujícím interference nespecifické redukce MTT zkoušenými chemickými látkami zlepšily funkční způsobilost pro rozlišení C/NC i podpůrnou klasifikaci žíravých látek do podkategorií (21) (22). Byly provedeny další statistické analýzy povalidačních údajů generovaných modely EpiDerm™ SCT, SkinEthic™ RHE a EpiCS® s cílem nalézt alternativní predikční modely, které by zlepšily prediktivní schopnost klasifikace do podkategorií (23).

5. Nežli lze pro regulační účely použít pro leptavé účinky na kůži navrhovanou podobnou nebo modifikovanou zkušební metodu RhE *in vitro* jinou než VRM, je zapotřebí stanovit její spolehlivost, relevantnost (přesnost) a omezení týkající se jejího navrhovaného použití, aby se zajistila její podobnost s VRM v souladu s požadavky standardů funkčnosti (24) stanovenými v souladu se zásadami uvedenými v pokynu OECD č. 34 (25). Vzájemné uznávání údajů bude zaručeno až poté, co bude každá navrhovaná nebo aktualizovaná zkušební metoda podle standardů funkčnosti podrobena revizi a zahrnuta do odpovídajícího pokynu ke zkoušení. Zkušební modely zahrnuté do tohoto pokynu ke zkoušení mohou být použity pro účely požadavků jednotlivých zemí na výsledky zkoušek u zkušební metody pro leptavé účinky na kůži *in vitro*, přičemž může být využito vzájemné uznávání údajů.

DEFINICE

6. Použité definice jsou uvedeny v dodatku 1.

VÝCHOZÍ ÚVAHY

7. Tato zkušební metoda umožňuje určení nežíravých a žíravých látek a směsí podle systému GHS OSN a nařízení CLP. Dále tato zkušební metoda podporuje klasifikaci žíravých látek a směsí do podkategorií, a to na doplňkovou podkategorii 1A podle GHS OSN (1), jakož i kombinaci podkategorií 1B a 1C (21)(22)(23). Omezení této zkušební metody spočívá v tom, že neumožňuje rozlišení mezi leptavými účinky na kůži podkategorie 1B a podkategorie 1C podle systému GHS OSN a nařízení CLP vzhledem k omezenému množství dobře známých žíravých chemických látek *in vivo* podkategorie 1C. Zkušební modely EpiSkin™, EpiDerm™ SCT, SkinEthic™ RHE a epiCS® dokážou rozdělovat na podkategorie (tj. 1A proti 1B-a-1C proti NC).

8. Při validaci zkušebních modelů, které jsou zahrnuty v této zkušební metodě a používají se pro určení nežíravých a žíravých látek, byla testována široká škála chemických látek představujících zejména jednotlivé látky; empirická databáze validační studie obsahovala 60 chemických látek z nejrůznějších chemických tříd (8) (9) (10). Vývojáři zkušební metody provedli zkoušení za účelem prokázání citlivosti, specifičnosti, přesnosti a vnitrolaboratorní

([1]) Zkratka RhE („reconstructed human epidermis“ = rekonstruovaná lidská epidermis) se používá pro všechny modely na bázi technologie RhE. Zkratka RHE použitá ve spojení s modelem SkinEthic™ znamená totéž, ale jako součást obchodního názvu této konkrétní zkušební metody se všechna písmena píšou velká.

▼M8

reprodukovatelnosti analýzy pro klasifikaci do podkategorií a výsledky kontrolovala OECD (21) (22) (23). Podle všech dostupných údajů je tato zkušební metoda použitelná pro širokou škálu chemických tříd a skupenství, včetně kapalin, polotuhých látek, pevných látek a vosků. Kapaliny mohou být vodné či nevodné; pevné látky mohou být ve vodě rozpustné či nerozpustné. Pevné látky by měly být pokud možno před aplikací rozemlety na jemný prášek; žádná další úprava vzorku není vyžadována. V případech, kdy mohou být předloženy důkazy prokazující nepoužitelnost modelů zařazených do této zkušební metody pro specifickou kategorii zkoušených chemických látek, neměly by se pro tuto specifickou kategorii zkoušených chemických látek používat. Dále se předpokládá, že je tato zkušební metoda jako doplnění použitelnosti pro látky použitelná pro směsi. Avšak vzhledem ke skutečnosti, že směsi zahrnují širokou škálu kategorií a složení a že v současné době jsou k dispozici pouze omezené údaje o zkoušení směsí, v případech, kdy lze prokázat nepoužitelnost této zkušební metody pro konkrétní kategorii směsí (např. podle strategie navržené v (26)), by se tato zkušební metoda neměla používat pro tuto konkrétní kategorii směsí. Před použitím této zkušební metody ke zkoušení směsi s cílem získat údaje pro zamýšlené regulační účely by mělo být zváženo, zda tato metoda může pro tento účel poskytnout přiměřené výsledky, a pokud ano, proč tomu tak je. Takové úvahy nejsou nutné, pokud existuje právní požadavek na zkoušení dané směsi. Plyny a aerosoly dosud nebyly ve validačních studiích hodnoceny (8) (9) (10). Ačkoli není jejich zkoušení postupem za použití rekonstruované lidské epidermis teoreticky vyloučeno, současná zkušební metoda zkoušení plynů a aerosolů neumožňuje.

9. Zkoušené chemické látky absorbující světlo ve stejném pásmu jako formazan MTT a zkoušené chemické látky schopné přímé redukce vitálního barviva MTT (na formazan MTT) mohou interferovat s měřením životaschopnosti tkání, proto je třeba pro korekce použít upravené kontroly. Druh upravených kontrol, které mohou být potřebné, se bude lišit v závislosti na druhu interference vyvolané zkoušenou chemickou látkou a na postupu použitém pro měření formazanu MTT (viz odstavce 25-31).

10. I když tato zkušební metoda neposkytuje odpovídající informace o dráždivosti pro kůži, je třeba poznamenat, že zkušební metoda B.46 řeší konkrétně zdravotní účinky dráždivosti pro kůži *in vitro* a je založena na tomtéž zkušebním systému RhE, i když podle jiného protokolu (5). Pro úplné vyhodnocení lokálních účinků na kůži po jednotlivých kožních expozicích je třeba postupovat podle pokynů OECD k integrovanému přístupu ke zkouškám a posuzování dráždivých/leptavých účinků na kůži (6). Tento integrovaný přístup ke zkouškám a posuzování zahrnuje provádění zkoušek leptavých účinků na kůži (jak je uvedeno v této zkušební metodě) a dráždivých účinků na kůži *in vitro* před zvažováním zkoušek na živých zvířatech. Je známo, že použití lidské kůže je předmětem vnitrostátních a mezinárodních etických úvah a podmínek.

PRINCIP ZKOUŠKY

11. Zkoušená látka se místně nanese na trojrozměrný model rekonstruované lidské epidermis tvořené netransformovanými keratinocyty získanými z lidské epidermis, které byly kultivovány tak, aby vytvořily vícevrstvý, vysoce diferenciovaný model lidské *epidermis*. Skládá se z uspořádaných bazálních, výběžkovitých a granulárních vrstev a vícevrstevného *stratum corneum*, jež obsahuje mezibuněčné lamelární lipidové vrstvy představující hlavní třídy lipidů analogické těm, které se nacházejí *in vivo*.

▼M8

12. Zkušební metoda RhE je založena na předpokladu, že chemické látky s leptavými účinky jsou ty, jež jsou schopny proniknout rohovitou vrstvou (*stratum corneum*) difuzí nebo erozí a jsou cytotoxické pro buňky v hlubších buněčných vrstvách. Životaschopnost buněk se měří enzymatickou přeměnou vitálního barviva MTT [3–(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium-bromid, thiazolylová modř, tetrazolium-bromid; číslo CAS 298–93-1] na sůl modrého formazanu, jehož množství se změří po extrakci z tkání (27). Žíravé chemické látky se zjišťují na základě jejich schopnosti snižovat životaschopnost buněk pod definované prahové úrovně (viz odstavce 35 a 36). Ukázalo se, že zkušební metoda leptavých účinků na kůži na bázi RhE umožňuje předvídat leptavé účinky na kůži *in vivo* u králíků podle zkušební metody B.4 (2).

PROKÁZÁNÍ ZPŮSOBILOSTI

13. Dříve než začnou laboratoře rutinně používat kterýkoli ze čtyř validovaných zkušebních modelů RhE, který dodržuje tuto zkušební metodu, měly by prokázat svou odbornou způsobilost správným určením klasifikace dvanácti vhodných látek uvedených v tabulce 1. V případě použití metody pro podrobnou klasifikaci je třeba prokázat také správné zařazení do podkategorií. V situacích, kdy některá z uvedených látek není k dispozici, lze v odůvodněných případech použít jinou látku, u níž jsou k dispozici odpovídající referenční údaje o použití *in vivo* a *in vitro* (např. ze seznamu referenčních chemických látek (24)), pokud budou použita stejná kritéria výběru jako kritéria popsaná v tabulce 1.

Tabulka 1

Seznam vhodných látek ([1])

Látka	č. CAS	Třída chemických látek ([2])	Kat. GHS OSN/CLP na základě výsledků *in vivo* ([3])	Kategorie VRM na základě výsledků *in vitro* ([4])	MTT redukční činidlo ([5])	Skupenství látky
Podkategorie 1A Žíravé látky *in vivo*						
Bromoctová kyselina	79-08-3	organická kyselina	1A	(3) 1A	—	P
Dihydrát fluoridu boritého	13319-75-0	anorganická kyselina	1A	(3) 1A	—	K
Fenol	108-95-2 Org.	Fenol	1A	(3) 1A	—	P
Dichloroacetyl chlorid	79-36-7 Org.	elektrofil	1A	(3) 1A	—	K
Kombinace podkategorií 1B a 1C Žíravé látky *in vivo*						
Monohydrát kyseliny glyoxylové	563-96-2	organická kyselina	1B a 1C	(3) 1B a 1C	—	P
Kyselina mléčná	598-82-3	organická kyselina	1B a 1C	(3) 1B a 1C	—	K
Ethanolamin	141-43-5	organická zásada	1B	(3) 1B a 1C	A	viskózní

▼**M8**

Látka	č. CAS	Třída chemických látek (2)	Kat. GHS OSN/CLP na základě výsledků *in vivo* (3)	Kategorie VRM na základě výsledků *in vitro* (4)	MTT redukční činidlo (5)	Skupenství látky
Podkategorie 1A Žíravé látky *in vivo*						
Kyselina chlorovodíková (14,4 %)	7647-01-0	anorganická kyselina	1B a 1C	(3) 1B a 1C	—	K
Nežíravé látky *in vivo*						
Fenethylbromid	103-63-9	elektrofil	NC	(3) NC	A	K
4-amino-1H-1,2,4-triazol	584-13-4	organická zásada	NC	(3) NC	—	P
4-(methylthio)-benzal-dehyd	3446-89-7	elektrofil	NC	(3) NC	A	K
Kyselina laurová	143-07-7	organická kyselina	NC	(3) NC	—	P

Zkratky: č. CAS = Chemical Abstracts Service Registry Number (registrační číslo CAS) VRM = validovaná referenční metoda NC = nežíravý; A = ano; P = pevné; K = kapalné.

(1) Látky pro zkoušení způsobilosti, roztříděné nejprve na žíravé a nežíravé, poté do podkategorií žíravých látek a poté podle chemické třídy, byly vybrány z látek použitých ve validačních studiích ECVAM modelů EpiSkin™ a EpiDerm™ (8) (9) (10) a z povalidačních studií vycházejících z údajů poskytnutých vývojáři modelů EpiSkin™ (22), EpiDerm™, SkinEthic™ a epiCS® (23). Není-li uvedeno jinak, byly látky zkoušeny na úrovni čistoty dosažené při nákupu z komerčního zdroje (8) (10). Výběr zahrnuje pokud možno látky, které: i) jsou charakteristické pro celý rozsah poleptání (např. nežíravé; slabě až silně žíravé), jež validované referenční metody dokážou změřit nebo predikovat; ii) jsou charakteristické pro chemické třídy použité ve validačních studiích; iii) mají chemické struktury, které jsou dobře definovány; iv) vyvolávají v referenční zkušební metodě reprodukovatelné výsledky; v) vyvolávají v referenční zkušební metodě *in vivo* definitivní výsledky; vi) jsou komerčně dostupné; a vii) nejsou spojeny s příliš vysokými náklady na likvidaci odpadu.

(2) Chemická třída přiřazená podle Barratt *et al.* (8).

(3) Odpovídající obalové skupiny jsou UN I, II a III pro GHS OSN/CLP 1A, 1B, respektive 1C.

(4) Predikce pro validované referenční metody *in vitro* uvedené v této tabulce byly získány se zkušebními modely EpiSkin™ a EpiDerm™ (VRM) během povalidačního zkoušení provedeného vývojáři zkušebních metod.

(5) Hodnoty životaschopnosti získané ve validačních studiích leptavých účinků na kůži ECVAM nebyly korigovány podle přímé redukce MTT (ve validačních studiích nebyly provedeny kontroly s utracenými zvířaty). Povalidační údaje generované vývojáři zkušebních metod, které jsou uvedeny v této tabulce, však byly získány s upravenými kontrolami (23).

14. V rámci prokazování způsobilosti se doporučuje, aby uživatel po obdržení modelu rekonstruované lidské epidermis ověřil bariérové vlastnosti tkání uvedené jeho výrobcem. To je zvláště důležité v případě, že se tkáně zasílají na dlouhé vzdálenosti nebo že jejich přeprava trvá dlouhou dobu. Pokud je zkušební metoda úspěšně zavedena a je prokázána způsobilost tuto metodu správně používat, není nutno takové ověřování běžně provádět. Při běžném používání zkušební metody se však doporučuje i nadále v pravidelných intervalech bariérové vlastnosti posuzovat.

POSTUP

15. Následuje obecný popis složek a postupů zkušebních modelů s použitím rekonstruované lidské epidermis při hodnocení leptavých účinků na kůži, kterých se týká tato zkušební metoda. Modely RhE schválené jako vědecky validní pro použití v rámci této zkušební metody, tj. modely EpiSkin™ (SM), EpiDerm™ (EPI-200), SkinEthic™ RHE a epiCS® (16)(17)(19)(28)(29)(30)(31)(32)(33), lze získat z komerčních zdrojů. K dispozici jsou standardní pracovní postupy pro tyto čtyři modely RhE (34)(35)(36)(37), hlavní složky zkušebních metod jsou

▼M8

shrnuty v dodatku 2. Při provádění a používání jednoho z těchto modelů v laboratoři se doporučuje použít příslušný standardní pracovní postup. Zkoušení pomocí čtyř zkušebních modelů RhE zahrnutých v této zkušební metodě musí splňovat následující podmínky:

SLOŽKY ZKUŠEBNÍ METODY S POUŽITÍM REKONSTRUOVANÉ LIDSKÉ EPIDERMIS

Všeobecné podmínky

16. K rekonstrukci epitelu je zapotřebí použít netransformované lidské keratinocyty. Pod funkční svrchní vrstvou epidermis nazývanou *stratum corneum* by mělo být přítomno několik vrstev životaschopných epitelových buněk (bazální vrstva, *stratum spinosum*, *stratum granulosum*). *Stratum corneum* by mělo být vícevrstevné a obsahovat profil esenciálních lipidů k vytvoření funkční bariéry robustní natolik, aby vzdorovala rychlému průniku cytotoxických referenčních chemických látek, např. dodecylsulfátu sodného (SDS) nebo přípravku Triton X-100. Bariérová funkce by měla být prokázána a lze ji hodnotit buď určením koncentrace, při níž referenční chemická látka snižuje životaschopnost tkání o 50 % (IC_{50}) po pevně stanovené expoziční době, nebo stanovením expoziční doby potřebné ke snížení životaschopnosti buněk o 50 % (ET_{50}) po aplikaci referenční chemické látky v pevně stanovené koncentraci (viz odstavec 18). Zadržovací vlastnosti modelu rekonstruované lidské *epidermis* by měly zabránit průchodu materiálu v oblasti *stratum corneum* do životaschopné tkáně, což by vedlo k nesprávnému modelování expozice kůže. Model rekonstruované lidské epidermis by neměl být kontaminován bakteriemi, viry, mykoplazmaty ani houbovými mikroorganismy.

Funkční podmínky

Životaschopnost

17. K určení míry životaschopnosti tkání se používá zkouška MTT (27). Vitální buňky tkáňového modelu redukují vitální barvivo MTT na modrou sraženinu formazanu, která je poté z tkáně extrahována pomocí isopropylalkoholu (nebo podobného rozpouštědla). Optická hustota samotného extrakčního rozpouštědla by měla být dostatečně malá, tzn. OD < 0,1. Extrahovaný formazan MTT může být kvantifikován pomocí standardního měření absorbance (OD) nebo spektrofotometrickým postupem HPLC/UPLC (38). Uživatelé modelu rekonstruované lidské epidermis by měli zajistit, aby každá použitá šarže modelu rekonstruované lidské epidermis splňovala stanovená kritéria pro negativní kontrolu. Rozsah přijatelnosti (horní a dolní mez) hodnot OD negativní kontroly je zapotřebí zjistit u subjektu, který model rekonstruované lidské epidermis vyvinul nebo dodává. Rozsahy přijatelnosti hodnot OD negativní kontroly pro čtyři validované zkušební modely RhE zařazené do této zkušební metody jsou uvedeny v tabulce 2. Uživatel spektrofotometrie HPLC/UPLC by měl jako kritérium přijatelnosti pro negativní kontrolu používat rozsahy OD negativní kontroly uvedené v tabulce 2. Je třeba doložit, že tkáně ošetřené negativní kontrolou jsou stabilně kultivovány (poskytují podobné naměřené hodnoty OD) po dobu trvání expozice.

Tabulka 2

Rozsahy přijatelnosti pro hodnoty OD negativní kontroly pro kontrolu kvality šarže

	Dolní mez přijatelnosti	Horní mez přijatelnosti
EpiSkin™ (SM)	> 0,6	< 1,5
EpiDerm™ SCT (EPI-200)	> 0,8	< 2,8
SkinEthic™ RHE	> 0,8	< 3,0
epiCS®	> 0,8	< 2,8

▼M8

Bariérová funkce

18. *Stratum corneum* a jeho lipidové složení by mělo dostačovat na to, aby odolávalo rychlému průniku určitých cytotoxických referenčních chemických látek (např. SDS nebo Triton X-100) podle odhadu na základě hodnoty IC_{50} nebo ET_{50} (tabulka 3). Bariérovou funkci každé šarže použitého modelu RhE by měl prokázat vývojář/prodejce modelu RhE při dodávce tkání koncovému uživateli (viz odstavec 21).

Morfologie

19. Je třeba provést histologické vyšetření modelu RhE prokazující vícevrstevnou strukturu podobnou lidské epidermis, která obsahuje *stratum basale, stratum spinosum, stratum granulosum* a *stratum corneum* a má lipidový profil podobný lipidovému profilu lidské epidermis. Histologické vyšetření každé šarže použitého modelu RhE prokazující vhodnou morfologii tkání by měl poskytnout vývojář/prodejce modelu RhE při dodávce tkání koncovému uživateli (viz odstavec 21).

Reprodukovatelnost

20. Uživatelé zkušebních metod by měli prokázat jejich reprodukovatelnost v čase s pozitivními a negativními kontrolami. Kromě toho by zkušební metoda měla být používána pouze v případě, že vývojář/dodavatel modelu RhE poskytne údaje prokazující reprodukovatelnost v čase s žíravými a nežíravými chemickými látkami například ze seznamu vhodných látek (tabulka 1). V případě použití zkušební metody pro podrobnou kategorizaci je třeba prokázat také reprodukovatelnost s ohledem na zařazení do podkategorií.

Kontrola kvality

21. Model rekonstruované lidské epidermis by měl být použit pouze v případě, že subjekt, který jej vyvinul nebo dodává, prokáže, že každá použitá šarže modelu RhE splňuje stanovená produkční kritéria pro uvolnění do oběhu, přičemž mezi nejvýznamnější z nich patří kritéria *životaschopnosti* (odstavec 17), *bariérové funkce* (odstavec 18) a *morfologie* (odstavec 19). Tyto údaje se poskytnou uživatelům metody, aby je mohli uvést v závěrečné zprávě. Pro spolehlivou predikci klasifikace zkoušené látky jako látky s leptavými účinky mohou být přijatelné pouze výsledky získané za použití tkáňových šarží, které prošly kontrolou kvality. Rozsah přijatelnosti (horní a dolní mez) pro IC50 nebo ET50 stanoví subjekt, který model rekonstruované lidské epidermis vyvinul nebo dodává. V tabulce 3 jsou uvedeny rozsahy přijatelnosti pro čtyři validované zkušební modely.

Tabulka 3

Kritéria kontroly kvality pro uvolnění šarže do oběhu

	Dolní mez přijatelnosti	Horní mez přijatelnosti
EpiSkin™ (SM) (18 hodin expozice za použití SDS) (33)	IC_{50} = 1,0 mg/ml	IC_{50} = 3,0 mg/ml
EpiDerm™ SCT (EPI-200) (1 % Triton X-100)(34)	ET50 = 4,0 hodiny	ET50 = 8,7 hodiny
SkinEthic™ RHE (1 % Triton X-100)(35)	ET50 = 4,0 hodiny	ET50 = 10,0 hodin
epiCS® (1 % Triton X-100)(36)	ET50 = 2,0 hodiny	ET50 = 7,0 hodin

▼M8

Aplikace zkoušených a kontrolních chemických látek

22. Pro každou zkoušenou chemickou látku a pro kontroly pro jednotlivé expozice by se měly použít alespoň dva tkáňové replikáty. V případě kapalných a pevných chemických látek je zapotřebí nanést dostatečné množství zkoušené látky, aby rovnoměrně pokryla povrch epidermis, a současně se vyhnout nekonečné dávce, tzn. že je třeba použít nejméně 70 µl/cm^2 nebo 30 mg/cm^2. V závislosti na modelech je nutno povrch epidermis před nanesením pevných chemických látek zvlhčit deionizovanou nebo destilovanou vodou, aby se zlepšil kontakt zkoušené chemické látky s povrchem epidermis (34) (35) (36) (37). Pevné látky by se měly pokud možno zkoušet ve formě jemného prášku. Aplikační metoda by měla být pro zkoušenou chemickou látku vhodná (viz např. odkazy (34–37). Na konci expoziční doby je nutno zkoušenou látku pečlivě spláchnout z *epidermis* vodným pufrem nebo 0,9 % roztokem NaCl. Podle toho, který ze čtyř validovaných zkušebních modelů RhE se používá, použijí se dvě nebo tři doby expozice na jednu zkoušenou chemickou látku (pro všechny čtyři platné modely RhE: 3 min. a 1 hodina; pro model EpiSkin™ čtyři další hodiny expozice). V závislosti na použitém zkušebním modelu RhE a posuzované době expozice se může inkubační teplota v průběhu expozice pohybovat v rozsahu od pokojové teploty do 37 °C.

23. Při každém provedení zkoušky by se měly používat souběžné negativní kontroly a pozitivní kontroly, aby se prokázalo, že životaschopnost (při použití negativních kontrol), bariérová funkce a výsledná tkáňová citlivost tkání (při použití pozitivní kontroly) jsou v rámci stanoveného rozpětí dosavadních hodnot přijatelnosti. Navrženými chemickými látkami pro pozitivní kontrolu jsou ledová kyselina octová nebo 8N KOH v závislosti na použitém modelu RhE. Je třeba poznamenat, že 8N KOH přímo redukuje MTT, což může vyžadovat upravené kontroly, jak je popsáno v odstavcích 25 a 26. Navrženými látkami pro negativní kontrolu jsou 0,9 % (m/V) roztok NaCl nebo voda.

Měření životaschopnosti buněk

24. K měření životaschopnosti buněk podle této zkušební metody by se měla používat zkouška MTT, což je kvantitativní zkouška (27). Vzorek tkáně se na dobu tří hodin vloží do roztoku MTT o vhodné koncentraci (0,3 nebo 1 mg/ml). Vysrážený modrý formazan se poté extrahuje z tkáně pomocí rozpouštědla (např. isopropylalkoholu nebo kyselého isopropylalkoholu) a koncentrace formazanu se změří určením OD při vlnové délce 570 nm za použití filtru o pásmové propustnosti nejvýše ± 30 nm nebo spektrofotometrickým postupem HPLC/UPLC (viz odstavce 30 a 31) (38).

25. Zkoušené chemické látky mohou interferovat se zkouškou MTT, a to přímou redukcí MTT na modrý formazan, anebo barevnou interferencí, jestliže zkoušená chemická látka absorbuje, přirozeně nebo v důsledku experimentálních postupů, ve stejném rozsahu OD jako formazan (570 ± 30 nm, zejména modré a fialové chemické látky). Měly by se používat i další kontroly za účelem zjištění a korigování případné interference těchto zkoušených chemických látek, jako je kontrola na nespecifickou redukci MTT (NSMTT) a kontrola na nespecifické zbarvení (NSC) (viz odstavce 26 až 30). To je zvláště důležité v případě, že se určitá zkoušená chemická látka opláchnutím z tkáně zcela neodstraní nebo že pronikne do *epidermis*, takže je přítomna v tkáních, když se provádí zkouška životaschopnosti MTT. Podrobný popis, jak korigovat přímou redukci MTT a interference způsobené barvivy, lze nalézt ve standardních prováděcích postupech zkušebních modelů (34) (35) (36) (37).

▼M8

26. Aby bylo možné identifikovat přímá redukční činidla MTT, je třeba každou zkoušenou chemickou látku přidávat do čerstvě připraveného média MTT (34) (35) (36) (37). Jestliže směs MTT obsahující zkoušenou chemickou látku zmodrá/zfialoví, je zkoušená chemická látka považována za přímé redukční činidlo MTT, přičemž je třeba provést další funkční kontrolu na neživotaschopné epidermis nezávisle na použití standardního měření absorbance (OD) nebo spektrofotometrického postupu HPLC/UPLC. Tato další funkční kontrola využívá neživé tkáně, které mají pouze zbytkovou metabolickou aktivitu, ale absorbují zkoušenou chemickou látku v podobném množství jako životaschopné tkáně. Každá chemická látka redukující MTT se aplikuje na nejméně dva neživé tkáňové replikáty na každou dobu expozice, které se podrobí celé zkoušce leptavých účinku na kůži. Skutečná životaschopnost tkáně se poté vypočítá jako procentuální životaschopnost tkáně získaná z živých tkání vystavených působení redukčního činidla MTT minus procentuální nespecifická redukce MTT získaná z neživých tkání vystavených stejnému redukčnímu činidlu MTT, počítáno ve vztahu k negativní kontrole prováděné souběžně s korigovanou zkouškou (% NSMTT).

27. Aby bylo možné zjistit potenciální interferenci zabarvených zkoušených chemických látek nebo zkoušených chemických látek, které se zabarvily při kontaktu s vodou nebo isopropylalkoholem, a rozhodnout, zda je nutné provést další kontroly, je třeba provést spektrální analýzu zkoušené chemické látky ve vodě (prostředí v průběhu expozice) anebo v isopropylalkoholu (extrakční roztok). Jestliže zkoušená chemická látka ve vodě anebo isopropylalkoholu absorbuje světlo v pásmu 570 ± 30 nm, je třeba provést další kontroly s barvivy, případně použít spektrofotometrický postup HPLC/UPLC, přičemž v tomto případě nejsou tyto kontroly nutné (viz odstavce 30 a 31). Při provádění standardního měření absorbance (OD) se každá interferující zbarvená zkoušená chemická látka aplikuje na alespoň dva životaschopné tkáňové replikáty na jednu dobu expozice, které se podrobí celé zkoušce na leptavé účinky pro kůži, ale v průběhu inkubačního kroku MTT se inkubují v médiu místo roztoku MTT za účelem vytvoření kontroly nespecifického zbarvení (NSC_{living}). Vzhledem k inherentní biologické variabilitě živých tkání je třeba kontrolu NSC_{living} provádět souběžně na každou dobu expozice s každou zbarvenou zkoušenou chemickou látkou (při každém provedení zkoušky). Skutečná životaschopnost tkáně se poté vypočítá jako procentuální životaschopnost tkáně získaná z živých tkání vystavených působení interferující zkoušené chemické látky a inkubovaných v roztoku MTT minus procentuální nespecifické zbarvení získané z živých tkání vystavených působení interferující zkoušené chemické látky a inkubovaných v roztoku bez MTT, prováděno souběžně s korigovanou zkouškou (% NSC_{living}).

28. Zkoušené chemické látky, u nichž se zjistí, že přímo redukují MTT (viz odstavec 26) a působí barevné interference (viz odstavec 27), budou při provádění standardního měření absorbance (OD) také vyžadovat třetí skupinu kontrol vedle kontrol NSMTT a NSC_{living} popsaných v předchozích odstavcích. Obvykle je tomu tak u tmavě zbarvených zkoušených chemických látek interferujících s analýzou MTT (např. modré, fialové, černé), protože jejich vlastní barva narušuje posouzení jejich schopnosti přímo redukovat MTT, jak je popsáno v odstavci 26. Tyto zkoušené chemické látky se mohou vázat na živé i neživé tkáně, a proto kontrola NSMTT musí nejen korigovat potenciální přímou redukci MTT způsobenou zkoušenou chemickou látkou, ale také barevnou interferenci vznikající z vazby zkoušené chemické látky na neživé tkáně. Mohlo by to vést k dvojí korekci barevné interference, protože kontrola NSC_{living} již koriguje barevnou interferenci vznikající z vazby zkoušené chemické látky na živé tkáně. Aby byla vyloučena možná dvojí korekce barevné interference, je třeba provést třetí kontrolu na nespecifické zbarvení u neživých tkání (NSC_{killed}). Při této další kontrole se zkoušená chemická látka aplikuje na alespoň dva neživé tkáňové replikáty na jednu dobu expozice, které se podrobí celé zkoušce, ale v průběhu inkubačního kroku MTT se inkubují v médiu místo roztoku MTT. Postačí jedna kontrola NSC_{killed} na zkoušenou chemickou látku bez ohledu na počet provedených nezávislých zkoušek/experimentů, ale tuto kontrolu je třeba provést souběžně s kontrolou NSMTT a pokud možno se stejnou šarží tkáně. Skutečná životaschopnost

▼M8

tkáně se poté vypočítá jako procentuální životaschopnost tkáně získaná z živých tkání vystavených působení zkoušené chemické látky minus % NSMTT minus % NSC_{living} plus procentuální nespecifické zbarvení získané z neživých tkání vystavených působení interferující zkoušené chemické látky a inkubovaných v roztoku bez MTT, počítáno ve vztahu k negativní kontrole prováděné souběžně s korigovanou zkouškou (% NSC_{killed}).

29. Je důležité uvést, že nespecifická redukce MTT a nespecifické barevné interference mohou zvýšit odečty tkáňového extraktu nad rozsah linearity spektrofotometru. Z tohoto důvodu by měla každá laboratoř stanovit rozsah linearity svého spektrofotometru s použitím formazanu MTT (č. CAS 57360-69-7) z komerčního zdroje, než zahájí testování zkoušených chemických látek pro regulační účely. Pro posouzení zkoušených chemikálií, které přímo redukují MTT a působí barevné interference, když je optická hustota tkáňových extraktů zjištěná za použití zkoušené chemikálie bez korekce přímé redukce MTT anebo barevné interference v lineárním rozsahu spektrofotometru nebo když již byla zkoušená chemická látka definována jako látka s leptavými účinky podle zjištěné nekorigované procentuální životaschopnosti (viz odstavce 35 a 36), je vhodné zejména standardní měření absorbance (OD) pomocí spektrofotometru. Výsledky u zkoušených chemických látek, které dávají % NSMTT anebo % NSC_{living} > 50 % negativní kontroly, je třeba posuzovat opatrně.

30. U barevných zkoušených chemických látek, které nejsou kompatibilní se standardním měřením absorbance (OD) vzhledem k příliš velké interferenci se zkouškou MTT, může být použit alternativní HPLC/UPLC spektrofotometrický postup měření formazanu MTT (viz odstavec 31) (37). Spektrofotometrický systém HPLC/UPLC umožňuje oddělit formazan MTT od zkoušené chemické látky před její kvantifikací (38). Z tohoto důvodu se při použití spektrofotometrie HPLC/UPLC nepožadují kontroly NSC_{living} ani NSC_{killed}, a to nezávisle na zkoušené chemické látce. Kontroly NSMTT by se však měly použít, pokud existuje podezření, že zkoušená chemická látka přímo redukuje MTT, nebo v případě, že má barvu, která znesnadňuje posouzení schopnosti přímé redukce MTT (jak je popsáno v odstavci 26). Při použití spektrofotometrie HPLC/UPLC na měření formazanu MTT se procentuální životaschopnost tkáně vypočítá jako procentuální plocha píku formazanu MTT získaná z živých tkání vystavených působení zkoušené chemické látky ve vztahu k píku formazanu MTT získanému při souběžné negativní kontrole. U zkoušených chemických látek, které dokážou přímo redukovat MTT, se skutečná životaschopnost tkáně vypočítá jako procentuální životaschopnost tkáně získaná z živých tkání vystavených působení zkoušené chemické látky minus % NSMTT. Konečně je třeba uvést, že přímá redukční činidla MTT, jež mohou být také barevně interferující a která zůstanou v tkáních po expozici a redukují MTT tak silně, že to vede k takovým hodnotám optické hustoty (při využití standardního měření OD) nebo plochám píků (při použití spektrofotometrie UPLC/HPLC) zkoušených tkáňových extraktů, které spadají mimo rozsah linearity spektrofotometrie, nelze posuzovat, i když lze očekávat, že k tomu dochází velmi vzácně.

▼M8

31. Spektrofotometrie HPLC/UPLC může být použita také u všech druhů zkoušených chemických látek (barevných, nebarevných, látek redukujících MTT i látek, které MTT neredukují) pro měření formazanu MTT (38). Vzhledem k různým spektrofotometrickým systémům HPLC/UPLC je třeba prokázat způsobilost spektrofotometrického systému HPLC/UPLC před jeho použitím pro kvantifikaci formazanu MTT z tkáňových extraktů splněním kritérií přijatelnosti pro skupinu standardních parametrů způsobilosti vycházejících z parametrů popsaných v pokynu amerického Úřadu pro potraviny a léčiva pro průmysl k validaci bioanalytických metod (38) (39). Tyto klíčové parametry a jejich kritéria přijatelnosti jsou uvedeny v dodatku 4. Po splnění kritérií přijatelnosti definovaných v dodatku 4 je spektrofotometrický systém HPLC/UPLC považován za způsobilý a připravený na měření formazanu MTT za experimentálních podmínek popsaných v této zkušební metodě.

Kritéria přijatelnosti

32. U každé zkušební metody s použitím platných modelů rekonstruované lidské epidermis by tkáně ošetřené negativní kontrolou měly vykazovat hodnoty OD odrážející kvalitu tkání, jak je popsáno v tabulce 2, a neměly by být pod dosud zjištěnými dolními hranicemi. Tkáně ošetřené pozitivní kontrolou, tj. ledovou kyselinou octovou nebo 8N KOH, by měly odrážet schopnost tkání reagovat na žíravou chemickou látku v podmínkách zkušebního modelu (viz dodatek 2). Variabilita mezi tkáňovými replikáty u zkoušené chemické látky a/nebo kontrolních chemických látek by měla spadat do přijatelných limitů pro každý požadavek platného modelu RhE (viz dodatek 2) (např. rozdíl životaschopnosti mezi dvěma tkáňovými replikáty by neměl přesahovat 30 %). Jestliže se negativní nebo pozitivní kontrola zařazená do zkoušky nachází mimo přijatelné rozsahy, je toto provedení zkoušky považováno za nezpůsobilé a zkoušku je třeba opakovat. Jestliže se variabilita zkoušených chemických látek pohybuje mimo definovaný rozsah, je třeba jejich zkoušení opakovat.

Interpretace výsledků a predikční model

33. Hodnoty absorbance OD dosažené pro každou zkoušenou chemickou látku by měly být použity k výpočtu životaschopnosti v procentech vzhledem k negativní kontrole, která je stanovena na úroveň 100 %. Při použití spektrofotometrie HPLC/UPLC se procentuální životaschopnost tkáně vypočítá jako procentuální plocha píku formazanu MTT získaná z živých tkání vystavených působení zkoušené chemické látky ve vztahu k píku formazanu MTT získanému při souběžné negativní kontrole. Hraniční procentuální hodnoty životaschopnosti buněk, kterými se rozlišují žíravé zkoušené chemické látky od nežíravých (nebo kterými se rozlišují různé podkategorie leptavých účinků), jsou definovány níže v odstavcích 35 a 36 pro jednotlivé modely zahrnuté do této zkušební metody a měly by se používat pro interpretaci výsledků.

34. U zkoušené chemické látky s jednoznačnou výslednou klasifikací by mělo stačit jedno provedení zkoušky za použití alespoň dvou tkáňových replikátů. Avšak v případě hraničních výsledků, jako jsou například nesouhlasné výsledky opakovaných měření, lze zvážit druhé provedení zkoušky, jakož i třetí provedení zkoušky v případě nesouhlasných výsledků mezi prvními dvěma provedeními zkoušky.

35. Predikční model pro zkušební model EpiSkin™ pro leptavé účinků na kůži (9) (34) (22), související se systémem klasifikace GHS OSN/CLP, je uveden v tabulce 4:

▼M8

Tabulka 4

Predikční model EpiSkin™

Životaschopnost měřená po časových intervalech expozice (t=3, 60 a 240 minut)	Zvážit predikci
< 35 % po 3 minutách expozice	**Žíravá:** • Doplňková podkategorie 1A (*)
≥ 35 % po 3 minutách expozice **A** < 35 % po 60 minutách expozice **NEBO** ≥ 35 % po 60 minutách expozice **A** < 35 % po 240 minutách expozice	**Žíravá:** • Kombinace doplňkových podkategorií 1B a 1C
≥ 35 % po 240 minutách expozice	**Nežíravá**

(*) Údaje vypracované za účelem posouzení užitečnosti zkušebních modelů RhE na podporu klasifikace do podkategorií ukázaly, že zhruba 22 % výsledků z podkategorie 1A u zkušebního modelu EpiSkin™ může ve skutečnosti představovat látky/směsi podkategorie 1B nebo podkategorie 1C (tj. nadhodnocené klasifikace) (viz dodatek 3).

36. Predikční modely pro zkušební modely leptavých účinků na kůži EpiDerm™ SCT (10) (23) (35), SkinEthic™ RHE (17) (18) (23) (36) a epiCS® (16) (23) (37), související se systémem klasifikace GHS OSN/CLP, jsou uvedeny v tabulce 5:

Tabulka 5

EpiDerm™ SCT, SkinEthic™ RHE a epiCS®

Životaschopnost měřená po časových intervalech expozice (t = 3 a 60 minut)	Zvážit predikci
KROK 1 pro EpiDerm™ SCT, SkinEthic™ RHE a epiCS®	
< 50 % po 3 minutách expozice	**Žíravá**
≥ 50 % po 3 minutách expozice **A** < 15 % po 60 minutách expozice	**Žíravá**
≥ 50 % po 3 minutách expozice **A** ≥ 15 % po 60 minutách expozice	**Nežíravá**
KROK 2 pro EpiDerm™ SCT - pro látky/směsi určené v kroku 1 jako žíravé	
< 25 % po 3 minutách expozice	Doplňková podkategorie 1A*
≥ 25 % po 3 minutách expozice	Kombinace doplňkových podkategorií 1B a 1C
KROK 2 pro SkinEthic™ RHE - pro látky/směsi určené v kroku 1 jako žíravé	
< 18 % po 3 minutách expozice	Doplňková podkategorie 1A*

▼M8

Životaschopnost měřená po časových intervalech expozice (t = 3 a 60 minut)	Zvážit predikci
KROK 1 pro EpiDerm™ SCT, SkinEthic™ RHE a epiCS®	
≥ 18 % po 3 minutách expozice	Kombinace doplňkových podkategorií 1B a 1C
KROK 2 pro epiCS® - pro látky/směsi určené v kroku 1 jako žíravé	
< 15 % po 3 minutách expozice	Doplňková podkategorie 1A*
≥ 15 % po 3 minutách expozice	Kombinace doplňkových podkategorií 1B a 1C

ÚDAJE A PŘEDKLÁDÁNÍ ZPRÁV

Údaje

37. Za každou zkoušku by se údaje získané z jednotlivých tkáňových replikátů (např. hodnoty OD a vypočítaná životaschopnost buněk v procentech pro každou zkoušenou chemickou látku, a to včetně její klasifikace) měly vykazovat ve formě tabulky, popřípadě včetně údajů z opakovaných experimentů. Dále by měly být uvedeny střední hodnoty a rozsahy životaschopnosti a variační koeficienty mezi tkáňovými replikáty pro každou zkoušku. Pozorované interakce s činidlem MTT a látkami, které MTT přímo redukují, nebo barevnými zkoušenými chemickými látkami je nutno uvádět za každou zkoušenou chemickou látku.

ZÁVĚREČNÁ ZPRÁVA

38. Závěrečná zpráva by měla obsahovat tyto informace:

Zkoušená chemická látka a kontrolní chemické látky:

— jednosložková látka: chemická identifikace, např. název podle IUPAC nebo CAS, číslo CAS, kód SMILES nebo InChI, strukturní vzorec, čistota, případně chemická identita nečistot, je-li to prakticky možné, atd.

— vícesložková látka, UVCB a směs: charakterizované pokud možno chemickou identitou (viz výše), kvantitativním výskytem a relevantními fyzikálně-chemickými vlastnostmi složek,

— fyzický vzhled, rozpustnost ve vodě a další relevantní fyzikálně-chemické vlastnosti,

— zdroj, číslo šarže, jsou-li k dispozici,

— případně ošetření zkoušené chemické látky / kontrolní látky před zkoušením (např. zahřátí, mletí),

— stabilita zkoušené chemické látky, datum použitelnosti nebo datum opětovné analýzy, je-li známo,

— podmínky skladování.

Použitý model RhE a protokol a jeho (případné) zdůvodnění

Zkušební podmínky:

— použitý model rekonstruované lidské epidermis (včetně čísla šarže),

▼**M8**

— kalibrační údaje o měřicím zařízení (např. spektrofotometrie), (případně) vlnová délka a pásmová propustnost použitá pro kvantifikaci formazanu MTT a rozsah linearity měřicího zařízení,

— popis metody použité pro kvantifikaci formazanu MTT,

— případně popis způsobilosti spektrofotometrického systému HPLC/UPLC,

— úplné podklady ke konkrétnímu použitému modelu rekonstruované lidské epidermis včetně jeho chování při zkoušce. Ty by měly zejména zahrnovat:

i) životaschopnost;

ii) bariérovou funkci;

iii) morfologii;

iv) reprodukovatelnost a prediktivní schopnost;

v) kontroly kvality modelu;

— odkaz na historické údaje modelu. Ten by měl zejména zahrnovat přijatelnost údajů QC s odkazem na historické údaje šarže,

— prokázání způsobilosti při provádění zkušební metody před rutinním použitím při zkoušení látek pro prokázání způsobilosti.

Postup zkoušky:

— podrobnosti použitého zkušebního postupu (včetně postupů vymývání použitých po expozici),

— dávky zkoušené chemické látky a použitých kontrolních chemických látek,

— délka doby (dob) expozice a teploty (teplot) expozice,

— přehled kontrol použitých pro látky, které přímo redukují MTT, případně pro zbarvující zkoušené chemické látky,

— počet tkáňových replikátů použitých na jednu zkoušenou chemickou látku a kontroly (pozitivní kontrola, negativní kontrola a NSMTT, případně NSC_{living} a NSC_{killed}) na každou dobu expozice,

— popis použitých kritérií rozhodování / predikčního modelu podle použitého modelu RhE,

— popis jakýchkoli změn zkušebního postupu (včetně postupů vymývání).

Kritéria přijatelnosti každého provedení zkoušky:

— střední hodnoty pozitivních a negativních kontrol a rozpětí přijatelnosti založené na porovnání s historickými údaji,

— přijatelná variabilita mezi tkáňovými replikáty pro pozitivní a negativní kontroly,

▼**M8**

— přijatelná variabilita mezi tkáňovými replikáty pro zkoušenou chemickou látku.

Výsledky:

— tabulka s údaji o jednotlivých zkoušených chemických látkách a kontrolách pro každou dobu expozice, každé provedení zkoušky a každé měření replikátů včetně hodnot OD nebo plochy píku formazanu MTT, procentuální životaschopnosti tkáně, střední procentuální životaschopnosti tkáně, rozdílů mezi replikáty, případně běžných odchylek a variačních koeficientů,

— případně výsledky kontrol použitých pro přímá redukční činidla MTT anebo zbarvující zkoušené chemické látky včetně hodnot OD nebo plochy píku formazanu MTT, %NSMTT, $\%NSC_{living}$, $\%NSC_{killed}$, rozdílů mezi tkáňovými replikáty, (případně) běžných odchylek a variačních koeficientů a konečná korigovaná procentuální životaschopnost tkáně,

— výsledky získané u zkoušených chemických látek a kontrolních chemických látek ve vztahu k definovaným kritériím přijatelnosti každého provedení zkoušky,

— popis ostatních pozorovaných účinků,

— odvozená klasifikace s odkazem na použitý predikční model / kritéria rozhodování.

Diskuse o výsledcích

Závěry

LITERATURA

(1) UN (2013). United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS) (Globálně harmonizovaný systém klasifikace a označování chemických látek Organizace spojených národů). Fifth Revised Edition, UN New York and Geneva. Dostupné na internetových stránkách: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html

(2) Kapitola B.4 této přílohy, Akutní dráždivé/leptavé účinky na kůži.

(3) Kapitola B.40 této přílohy, Leptavé účinky na kůži *in vitro*.

(4) Kapitola B.65 této přílohy, Zkušební metoda s využitím membránové bariéry *in vitro*.

(5) Kapitola B.46 této přílohy, Dráždivost pro kůži *in vitro*: Zkušební metoda za použití rekonstruované lidské epidermis.

(6) OECD (2014). Guidance Document on Integrated Approaches to Testing and Assessment of Skin Irritation/Corrosion. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (No 203) Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(7) Botham P.A., Chamberlain M., Barratt M.D., Curren R.D., Esdaile D.J., Gardner J.R., Gordon V.C., Hildebrand B., Lewis R.W., Liebsch M., Logemann P., Osborne R., Ponec M., Regnier J.F., Steiling W., Walker A.P., and Balls M. (1995). A Prevalidation Study on *In Vitro* Skin Corrosivity Testing. The report and Recommendations of ECVAM Workshop *6.ATLA* 23:219-255.

(8) Barratt M.D., Brantom P.G., Fentem J.H., Gerner I., Walker A.P., and Worth A.P. (1998). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Skin Corrosivity. 1. Selection and distribution of the Test Chemicals. *Toxicol.In Vitro* 12:471-482.

▼**M8**

(9) Fentem J.H., Archer G.E.B., Balls M., Botham P.A., Curren R.D., Earl L.K., Esdaile D.J., Holzhutter H.-G., and Liebsch M. (1998). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Skin Corrosivity. 2. Results and Evaluation by the Management Team. Toxicol.in Vitro 12:483-524.

(10) Liebsch M., Traue D., Barrabas C., Spielmann H., Uphill, P., Wilkins S., Wiemann C., Kaufmann T., Remmele M. and Holzhütter H. G. (2000). The ECVAM Prevalidation Study on the Use of EpiDerm for Skin Corrosivity Testing, *ATLA* 28: 371-401.

(11) Balls M., Blaauboer B.J., Fentem J.H., Bruner L., Combes R.D., Ekwall B., Fielder R.J., Guillouzo A., Lewis R.W., Lovell D.P., Reinhardt C.A., Repetto G., Sladowski D., Spielmann H. et Zucco F. (1995). Practical Aspects of the Validation of Toxicity Test Procedures. The Report and Recommendations of ECVAM Workshops, ATLA 23:129-147.

(12) ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods) (1997). Validation and Regulatory Acceptance of Toxicological Test Methods. Publikace NIH č. 97-3981. National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA.

(13) ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods) (2002). ICCVAM evaluation of EpiDerm™ (EPI-200), EPISKIN™ (SM), and the Rat Skin Transcutaneous Electrical Resistance (TER) Assay: *In Vitro* Test Methods for Assessing Dermal Corrosivity Potential of Chemicals. Publikace NIH č. 02-4502. National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods, National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA.

(14) EC-ECVAM (1998). Statement on the Scientific Validity of the EpiSkin™ Test (an *In Vitro* Test for Skin Corrosivity), Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC10), 3 April 1998.

(15) EC-ECVAM (2000). Statement on the Application of the EpiDerm™ Human Skin Model for Skin Corrosivity Testing, Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC14), 21 March 2000.

(16) Hoffmann J., Heisler E., Karpinski S., Losse J., Thomas D., Siefken W., Ahr H.J., Vohr H.W. and Fuchs H.W. (2005). Epidermal-Skin-Test 1000 (EST-1000)-A New Reconstructed Epidermis for *In Vitro* Skin Corrosivity Testing. *Toxicol.In Vitro* 19: 925-929.

(17) Kandárová H., Liebsch M., Spielmann,H., Genschow E., Schmidt E., Traue D., Guest R., Whittingham A., Warren N, Gamer A.O., Remmele M., Kaufmann T., Wittmer E., De Wever B., and Rosdy M. (2006). Assessment of the Human Epidermis Model SkinEthic RHE for *In Vitro* Skin Corrosion Testing of Chemicals According to New OECD TG 431. *Toxicol.In Vitro* 20: 547-559.

(18) Tornier C., Roquet M. and Fraissinette A.B. (2010). Adaptation of the Validated SkinEthic™ Reconstructed Human Epidermis (RHE) Skin Corrosion Test Method to 0,5 cm^2 Tissue Sample. *Toxicol. Chem. In Vitro* 24: 1379-1385.

(19) EC-ECVAM (2006). Statement on the Application of the SkinEthic™ Human Skin Model for Skin Corrosivity Testing, Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC25), 17 November 2006.

(20) EC-ECVAM (2009). ESAC Statement on the Scientific Validity of an *In-Vitro* Test Method for Skin Corrosivity Testing: the EST-1000, Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC30), 12 June 2009.

▼**M8**

(21) OECD (2013). Summary Document on the Statistical Performance of Methods in OECD Test Guideline 431 for Sub-categorisation. Environment, Health, and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 190). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(22) Alépée N., Grandidier M.H., and Cotovio J. (2014). Sub-Categorisation of Skin Corrosive Chemicals by the EpiSkin™ Reconstructed Human Epidermis Skin Corrosion Test Method According to UN GHS: Revision of OECD Test Guideline 431. *Toxicol. Chem. In Vitro* 28:131-145.

(23) Desprez B., Barroso J., Griesinger C., Kandárová H., Alépée N., and Fuchs, H. (2015). Two Novel Prediction Models Improve Predictions of Skin Corrosive Sub-categories by Test Methods of OECD Test Guideline No 431. *Toxicol. Chem. In Vitro* 29:2055-2080.

(24) OECD (2015). Performance Standards for the Assessment of Proposed Similar or Modified *In Vitro* Reconstructed Human Epidermis (RHE) Test Methods For Skin Corrosion in Relation to OECD TG 431. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 219). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(25) OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (No 34) Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(26) Eskes C. *et al.* (2012). Regulatory Assessment of *In Vitro* Skin Corrosion and Irritation Data Within the European Framework: Workshop Recommendations. *Regul.Toxicol.Pharmacol.* 62:393-403.

(27) Mosmann T. (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J. Immunol. Methods* 65:55-63.

(28) Tinois E., *et al.* (1994). The Episkin Model: Successful Reconstruction of Human *Epidermis In Vitro.* In: *In Vitro* Skin Toxicology. Rougier A.,. Goldberg A.M and Maibach H.I. (Eds): 133-140.

(29) Cannon C. L., Neal P.J., Southee J.A., Kubilus J. and Klausner M. (1994), New Epidermal Model for Dermal Irritancy Testing. *Toxicol.in Vitro* 8:889 - 891.

(30) Ponec M., Boelsma E, Weerheim A, Mulder A, Bouwstra J and Mommaas M. (2000). Lipid and Ultrastructural Characterization of Reconstructed Skin Models. Inter. J. Pharmaceu. 203:211 - 225.

(31) Tinois E., Tillier, J., Gaucherand, M., Dumas, H., Tardy, M. and Thivolet J. (1991). *In Vitro* and Post - Transplantation Differentiation of Human Keratinocytes Grown on the Human Type IV Collagen Film of a Bilayered Dermal Substitute. *Exp. Cell Res.* 193:310-319.

(32) Parenteau N.L., Bilbo P, Nolte CJ, Mason VS and Rosenberg M. (1992). The Organotypic Culture of Human Skin Keratinocytes and Fibroblasts to Achieve Form and Function. *Cytotech.* 9:163-171.

(33) Wilkins L.M., Watson SR, Prosky SJ, Meunier SF and Parenteau N.L. (1994). Development of a Bilayered Living Skin Construct for Clinical Applications. *Biotech. Bioeng.* 43/8*:*747-756.

(34) EpiSkin™ SOP (December 2011). *INVITTOX* Protocol (No 118). EpiSkin™ Skin Corrosivity Test.

(35) EpiDerm™ SOP (February 2012). Version MK-24-007-0024 Protocol for: *In Vitro* EpiDerm™ Skin Corrosion Test (EPI-200-SCT), for Use with MatTek Corporation's Reconstructed Human Epidermal Model EpiDerm.

▼**M8**

(36) SkinEthic™ RHE SOP (January 2012). *INVITTOX* Protocol SkinEthic™ Skin Corrosivity Test.

(37) EpiCS® SOP (January 2012). Version 4.1 *In Vitro* Skin Corrosion: Human Skin Model Test Epidermal Skin Test 1000 (epiCS®) CellSystems.

(38) Alépée N., Barroso J., De Smedt A., De Wever B., Hibatallah J., Klaric M., Mewes K.R., Millet M., Pfannenbecker U., Tailhardat M., Templier M., and McNamee P. Use of HPLC/UPLC- spectrophotometry for Detection of MTT Formazan in In Vitro Reconstructed Human Tissue (RhT)- based Test Methods Employing the MTT Assay to Expand their Applicability to Strongly Coloured Test Chemicals. *Toxicol. Chem. In Vitro* 29: 741-761.

(39) US FDA (2001). Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration. (May 2001). Dostupné na internetových stránkách: [http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070107.pdf].

▼M8

Dodatek 1

DEFINICE

Přesnost:: přesnost shody mezi výsledky zkušební metody a přijatými referenčními hodnotami. Je to míra funkčnosti zkušební metody a jeden z aspektů její relevantnosti. Tento pojem se často používá místo pojmu „soulad“ a rozumí se jím podíl správných výsledků zkušební metody (25).

Životaschopnost buněk: parametr měřící celkovou aktivitu buněčné populace, např. jako schopnost buněčných mitochondriálních dehydrogenáz redukovat vitální barvivo MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyl-2H-tetrazoliumbromid, thiazolylová modř), které v závislosti na naměřené sledované vlastnosti a koncepci použité zkoušky koreluje s celkovým počtem a/nebo vitalitou živých buněk.

Chemická látka: Látka nebo směs.

Soulad: je měřítkem funkčnosti u zkušebních metod poskytujících kategorické výsledky a je jedním z aspektů její relevantnosti. Tento pojem se někdy používá místo pojmu „přesnost“ a je definován jako podíl všech zkoušených chemických látek, které jsou správně klasifikovány jako pozitivní nebo negativní. Soulad závisí do velké míry na prevalenci pozitivních výsledků u druhů studovaných zkoušených chemických látek (25).

ET_{50}: tuto hodnotu lze odhadnout na základě určení doby expozice potřebné k tomu, aby se životaschopnost buněk snížila o 50 % po aplikaci referenční chemické látky v pevně stanovené koncentraci, viz rovněž IC_{50}.

GHS (Globálně harmonizovaný systém klasifikace a označování chemických látek): systém navrhující klasifikaci chemických látek a směsí podle standardizovaných typů a úrovní fyzikálních, zdravotních a environmentálních nebezpečí a zabývající se příslušnými komunikačními prvky, jako jsou piktogramy, signální slova, výroky o nebezpečí, výroky o bezpečnostních opatřeních a bezpečnostní datové listy, které obsahují informace o jejich nežádoucích účincích s ohledem na ochranu lidí (včetně zaměstnavatelů, pracovníků, přepravců, spotřebitelů a osob reagujících na nouzové situace) a životního prostředí (1).

HPLC: vysokoúčinná kapalinová chromatografie

IATA: integrovaný přístup ke zkoušení a posuzování.

IC_{50}: tuto hodnotu lze odhadnout na základě určení koncentrace, při níž referenční chemická látka snižuje životaschopnost tkání o 50 % (IC_{50}) po pevně stanovené době expozice, viz rovněž ET_{50}.

Nekonečná dávka: množství zkoušené látky nanesené na *epidermis*, které přesahuje množství potřebné k úplnému a rovnoměrnému pokrytí povrchu *epidermis*.

Směs: směs nebo roztok tvořený dvěma nebo více látkami, které v něm nereagují.

Jednosložková látka: látka definovaná svým kvantitativním složením, v níž je přítomna jedna hlavní složka v míře alespoň 80 % hmot.

▼**M8**

MTT: 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyl-2H-tetrazolium-bromid, thiazolylová modř.

Vícesložková látka: látka definovaná svým kvantitativním složením, v níž je přítomna více než jedna hlavní složka v koncentraci > 10 % hmot. a < 80 % hmot. Vícesložková látka je výsledkem výrobního procesu. Rozdíl mezi směsí a vícesložkovou látkou spočívá v tom, že směs se získá smísením dvou nebo více látek bez chemické reakce. Vícesložková látka je výsledkem chemické reakce.

NC („non-corrosive“):: nežíravá látka.

Kontrola NSC_{killed}: nespecifická barevná kontrola u neživých tkání.

Kontrola $NSC_{living:}$: nespecifická barevná kontrola u živých tkání.

NSMTT: nespecifická redukce MTT.

OD: optická hustota.

Pozitivní kontrola: replika obsahující všechny složky zkušebního systému a zkoušená s chemickou látkou, o níž je známo, že způsobuje pozitivní odezvu. Aby se zajistilo, že proměnlivost v odezvě na pozitivní kontrolu bude možné časem vyhodnotit, neměl by být rozsah pozitivní odezvy nadměrný.

Standardy funkčnosti: standardy založené na validované zkušební metodě, které slouží jako základ pro hodnocení srovnatelnosti navrhované zkušební metody, která je mechanicky a funkčně podobná. Patří mezi ně: i) zásadní složky zkušební metody; ii) minimální seznam srovnávacích látek vybraných z chemických látek používaných k prokázání přijatelné funkčnosti validované zkušební metody; a iii) srovnatelné úrovně spolehlivosti a přesnosti založené na hodnotách získaných u validované zkušební metody, jež by navrhovaná zkušební metoda měla prokázat při vyhodnocení za použití minimálního seznamu srovnávacích látek (25).

Relevantnost: popis vztahu zkušební metody k účinku, který je předmětem zájmu, a také toho, zda je zkušební metoda smysluplná a použitelná pro konkrétní účel. Vyjadřuje, do jaké míry zkušební metoda správně měří nebo predikuje biologický účinek, který je předmětem zájmu. Relevantnost zahrnuje také posouzení přesnosti (shody) zkušební metody (25).

Spolehlivost: měření rozsahu, v jakém může být zkušební metoda časem reprodukovatelná v laboratořích a mezi laboratořemi, když se provádí s použitím stejného protokolu. Hodnotí se na základě výpočtu vnitrolaboratorní a mezilaboratorní reprodukovatelnosti (25).

Provedení zkoušky: jedna či více zkoušených chemických látek se zkouší souběžně s negativní kontrolou a s pozitivní kontrolou.

Citlivost: podíl všech pozitivních/aktivních chemických látek, které jsou na základě zkušební metody správně klasifikovány. Je měřítkem přesnosti zkušební metody, která poskytuje kategorické výsledky, a je důležitým prvkem při hodnocení relevantnosti zkušební metody (25).

▼**M8**

Leptavé účinky na kůži *in vivo*: vyvolání nevratného poškození kůže, zejména viditelné, do koria zasahující nekrózy pokožky, do čtyř hodin po aplikaci zkoušené chemické látky. Reakce po poleptání se projevují vředy, krvácením, krvavými strupy a v závěru čtrnáctidenního pozorování ztrátou barvy v důsledku vyblednutí kůže, úplnými ložisky alopecie a jizvami. K vyhodnocení sporných lézí by se měla uvážit histopatologie.

Specifičnost: podíl všech negativních/neaktivních chemických látek, které jsou na základě zkušební metody správně klasifikovány. Je měřítkem přesnosti zkušební metody, která poskytuje kategorické výsledky, a je důležitým prvkem při hodnocení relevantnosti zkušební metody (25).

Látka: chemický prvek a jeho sloučeniny v přírodním stavu nebo získané výrobním postupem, včetně jakýchkoliv aditiv potřebných pro zachování stability výrobku a všech nečistot pocházejících z použitého postupu, ale s vyloučením všech rozpouštědel, která je možno oddělit bez ovlivnění stability dané látky nebo změny jejího složení.

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

UPLC: ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie.

UVCB: látky s neznámým nebo proměnlivým složením, komplexní reakční produkty nebo biologický materiál.

▼M8

Dodatek 2

HLAVNÍ SLOŽKY ZKUŠEBNÍCH MODELŮ RHE VALIDOVANÝCH PRO ZKOUŠENÍ LEPTAVÝCH ÚČINKŮ NA KŮŽI

Složky zkušebních modelů	EpiSkin™	EpiDerm™ SCT	SkinEthic™ RHE	epiCS®
Povrch modelu	0,38 cm^2	0,63 cm^2	0,5 cm^2	0,6 cm^2
Počet tkáňových replikátů	Nejméně 2 na každou dobu expozice	2–3 na každou dobu expozice	Nejméně 2 na každou dobu expozice	Nejméně 2 na každou dobu expozice
Experimentální dávky a aplikace	Kapaliny a viskózní látky: 50 µl ± 3 µl (131,6 µl/cm^2) Pevné látky: 20 ± 2 mg (52,6 mg/cm^2) + 100 µl ± 5µl roztoku NaCl (9 g/l) Vosky/lepivé látky: 50 ± 2 mg (131,6 mg/cm^2) s nylonovou síťkou	Kapaliny: 50 µl (79,4 µl/cm^2) s nylonovou síťkou nebo bez ní *Kompatibilita zkoušené chemické látky s nylonovou síťkou před zkouškou* Polotuhé látky: 50 µl (79,4 µl/cm^2) Pevné látky: 25 µl H_2O (nebo více v případě potřeby) + 25 mg (39,7 mg/cm^2) Vosky: ploché „kotouče“ o průměru přibližně 8 mm umístěné na tkáň zvlhčenou 15 µl H_2O.	Kapaliny a viskózní látky: 40 µl ± 3µl (80 µl/cm^2) s použitím nylonové síťky *Kompatibilita zkoušené chemické látky s nylonovou síťkou před zkouškou* Pevné látky: 20 µl ± 2µl H_2O + 20 ± 3 mg (40 mg/cm^2) Vosky/lepivé látky: 20 ± 3 mg (40 mg/cm^2) s použitím nylonové síťky	Kapaliny: 50 µl (83,3 µl/cm^2) s použitím nylonové síťky *Kompatibilita zkoušené chemické látky s nylonovou síťkou před zkouškou* Polotuhé látky: 50 µl (83,3 µl/cm^2) Pevné látky: 25 mg (41,7 mg/cm^2) + 25 µl H_2O (nebo více v případě potřeby) Vosky: ploché „kotouče“ o průměru přibližně 8 mm umístěné na tkáň zvlhčenou 15 µl H_2O.
Předběžná kontrola na přímou redukci MTT	50 µl (kapalina) nebo 20 mg (pevná látka)+ 2 ml MTT roztoku 0,3 mg/ml po dobu 180 ± 5 min při 37 °C, 5 % CO_2, 95 % RH → jestliže roztok zmodrá/zfialoví, je třeba provést přizpůsobené kontroly na tkáni usmrcené vodou	50 µl (kapalina) nebo 25 mg (pevná látka)+ 1 ml MTT roztoku 1 mg/ml po dobu 60 min při 37 °C, 5 % CO_2, 95 % RH → jestliže roztok zmodrá/zfialoví, je třeba provést přizpůsobené kontroly na tkáni usmrcené zmrazením	40 µl (kapalina) nebo 20 mg (pevná látka)+ 1 ml MTT 1 mg/ml roztoku po dobu 180 ± 15 min při teplotě 37 °C, 5 % CO_2, 95 % RH → jestliže roztok zmodrá/zfialoví, je třeba provést přizpůsobené kontroly na tkáni usmrcené zmrazením	50 µl (kapalina) nebo 25 mg (pevná látka)+ 1 ml MTT roztoku 1 mg/ml po dobu 60 min při 37 °C, 5 % CO_2, 95 % RH → jestliže roztok zmodrá/zfialoví, je třeba provést přizpůsobené kontroly na tkáni usmrcené zmrazením

▼M8

Složky zkušebních modelů	EpiSkin™	EpiDerm™ SCT	SkinEthic™ RHE	epiCS®
Předběžná kontrola na barevnou interferenci	10 µl (kapalina) nebo 10 mg (pevná látka) + 90 µl H_2O mícháno po dobu 15 min při pokojové teplotě → jestliže se roztok zbarví, je třeba provést přizpůsobené kontroly na živé tkáni	50 µl (kapalina) nebo 25 mg (pevná látka) + 300 µl H_2O po dobu 60 min při teplotě 37 °C, 5 % CO_2, 95 % RH → jestliže se roztok zbarví, je třeba provést přizpůsobené kontroly na živé tkáni	40 µl (kapalina) nebo 20 mg (pevná látka) + 300 µl H_2O mícháno po dobu 60 min při pokojové teplotě → jestliže se zkoušená chemická látka zbarví, je třeba provést přizpůsobené kontroly na živé tkáni	50 µl (kapalina) nebo 25 mg (pevná látka) + 300 µl H_2O po dobu 60 min při teplotě 37 °C, 5 % CO_2, 95 % RH → jestliže se roztok zbarví, je třeba provést přizpůsobené kontroly na živé tkáni
Doba expozice a teplota	3 min, 60 min (± 5 min) a 240 min (± 10 min) Ve ventilované skříni Pokojová teplota (RT, 18–28°C)	3 min při pokojové teplotě a 60 min při 37 °C, 5 % CO_2, 95 % RH	3 min při pokojové teplotě a 60 min při 37 °C, 5 % CO_2, 95 % RH	3 min při pokojové teplotě a 60 min při 37 °C, 5 % CO_2, 95 % RH
Oplachování	25 ml 1 x PBS (2 ml/na ponoření)	20krát stálým mírným proudem 1 x PBS	20krát stálým mírným proudem 1 x PBS	20krát stálým mírným proudem 1 x PBS
Negativní kontrola	50 µl roztoku NaCl (9 g/l) Zkoušeno u každé doby expozice	50 µl H_2O Zkoušeno u každé doby expozice	40 µl H_2O Zkoušeno u každé doby expozice	50 µl H_2O Zkoušeno u každé doby expozice
Pozitivní kontrola	50 µl ledové kyseliny octové Zkoušeno pouze po dobu 4 hodin	50 µl 8N KOH Zkoušeno u každé doby expozice	40 µl 8N KOH Zkoušeno pouze po dobu 1 hodiny	50 µl 8N KOH Zkoušeno u každé doby expozice
Roztok MTT	2 ml 0,3 mg/ml	300 µl 1 mg/ml	300 µl 1 mg/ml	300 µl 1 mg/ml
Doba inkubace MTT a teplota	180 min (± 15 min) při 37 °C, 5 % CO_2, 95 % RH	180 min při 37 °C, 5 % CO_2, 95 % RH	180 min (± 15 min) při 37 °C, 5 % CO_2, 95 % RH	180 min při 37 °C, 5 % CO_2, 95 % RH

▼M8

Složky zkušebních modelů	EpiSkin™	EpiDerm™ SCT	SkinEthic™ RHE	epiCS®
Extrakční rozpouštědlo	500 µl acidifikovaného isopropylalkoholu (0,04 N HCl v isopropylalkoholu) (izolovaná tkáň plně ponořená)	2 ml isopropylalkoholu (extrakce z horní a dolní části vložky)	1,5 ml isopropylalkoholu (extrakce z horní a dolní části vložky)	2 ml isopropylalkoholu (extrakce z horní a dolní části vložky)
Doba a teplota extrakce	Přes noc při pokojové teplotě, chráněno před světlem	Přes noc bez protřepávání při pokojové teplotě nebo 120 minut s protřepáváním (~120 rpm) při pokojové teplotě	Přes noc bez protřepávání při pokojové teplotě nebo 120 minut s protřepáváním (~120 rpm) při pokojové teplotě	Přes noc bez protřepávání při pokojové teplotě nebo 120 minut s protřepáváním (~120 rpm) při pokojové teplotě
Odečet OD	570 nm (545–595 nm) bez referenčního filtru	570 nm (nebo 540 nm) bez referenčního filtru	570 nm (540–600 nm) bez referenčního filtru	540–570 nm bez referenčního filtru
Kontrola kvality tkání	18 hodin expozice za použití SDS 1,0 mg/ml ≤ IC_{50} ≤ 3,0 mg/ml	Expozice za použití 1 % Tritonu X-100 4,08 hodiny ≤ ET_{50} ≤ 8,7 hodiny	Expozice za použití 1 % Tritonu X-100 4,0 hodiny ≤ ET_{50} ≤ 10,0 hodin	Expozice za použití 1 % Tritonu X-100 2,0 hodiny ≤ ET_{50} ≤ 7,0 hodin
Kritéria přijatelnosti	1. Střední hodnota OD tkáňových replikátů vystavených působení negativní kontroly (NaCl) by měla být ≥ 0,6 a ≤ 1,5 pro každou dobu expozice 2. Střední životaschopnost tkáňových replikátů vystavených působení pozitivní kontroly (ledová kyselina octová) po dobu 4 hodin, vyjádřeno jako % negativní kontroly, by měla být ≤ 20 % 3. V rozsahu 20–100 % životaschopnosti a pro hodnoty OD ≥ 0,3 by rozdíl životaschopnosti mezi dvěma tkáňovými replikáty neměl přesahovat 30 %.	1. Střední hodnota OD tkáňových replikátů vystavených působení negativní kontroly (H_2O) by měla být ≥ 0,8 a ≤ 2,8 pro každou dobu expozice 2. Střední životaschopnost tkáňových replikátů vystavených působení pozitivní kontroly (8N KOH) po dobu 1 hodiny, vyjádřeno jako % negativní kontroly, by měla být < 15 % 3. V rozsahu 20–100 % životaschopnosti by variační koeficient (CV) mezi tkáňovými replikáty měl být ≤ 30 %	1. Střední hodnota OD tkáňových replikátů vystavených působení negativní kontroly (H_2O) by měla být ≥ 0,8 a ≤ 3,0 pro každou dobu expozice 2. Střední životaschopnost tkáňových replikátů vystavených působení pozitivní kontroly (8N KOH) po dobu 1 hodiny (a případně 4 hodin), vyjádřeno jako % negativní kontroly, by měla být < 15 % 3. V rozsahu 20–100 % životaschopnosti a pro hodnoty OD ≥ 0,3 by rozdíl životaschopnosti mezi dvěma tkáňovými replikáty neměl přesahovat 30 %	1. Střední hodnota OD tkáňových replikátů vystavených působení negativní kontroly (H_2O) by měla být ≥ 0,8 a ≤ 2,8 pro každou dobu expozice 2. Střední životaschopnost tkáňových replikátů vystavených působení pozitivní kontroly (8N KOH) po dobu 1 hodiny, vyjádřeno jako % negativní kontroly, by měla být < 20 % 3. V rozsahu 20–100 % životaschopnosti a pro hodnoty OD ≥ 0,3 by rozdíl životaschopnosti mezi dvěma tkáňovými replikáty neměl přesahovat 30 %

▼**M8**

Dodatek 3

FUNKČNÍ ZPŮSOBILOST ZKUŠEBNÍCH MODELŮ PRO KLASIFIKACI DO PODKATEGORIÍ

V následující tabulce je uvedena funkční způsobilost čtyř zkušebních modelů vypočtená ze skupiny 80 chemických látek zkoušených čtyřmi dodavateli, kteří zkoušky vyvinuli. Výpočty provedl sekretariát OECD a zkontrolovala a schválila je podskupina odborníků (21) (23).

Zkušební modely EpiSkin™, EpiDerm™ , SkinEthic™ a epiCS® lze rozdělovat na podkategorie (tj. 1A proti 1B-a-1C proti NC)

Funkční způsobilost, podíly nadhodnocené klasifikace do podkategorií, podíly podhodnocené klasifikace do podkategorií a přesnost (prediktivní schopnost) čtyř zkušebních modelů podle skupiny 80 chemických látek, z nichž všechny byly zkoušeny každým zkušebním modelem ve 2 nebo 3 zkouškách:

STATISTIKA PREDIKCÍ ZÍSKANÝCH Z CELÉ SKUPINY CHEMICKÝCH LÁTEK

(n = 80 chemických látek zkoušených ve 2 nezávislých zkouškách u modelu epiCS® nebo ve 3 nezávislých zkouškách u modelů EpiDerm™ SCT, EpiSkin™ a SkinEthic™ RHE, tj. 159 (*), respektive 240 klasifikací)

	EpiSkin™	EpiDerm ™	SkinEthic™	epiCS®
Nadhodnocená klasifikace do podkategorií:				
1B a 1C nadhodnoceně klasifikované jako 1A	21,50 %	29,0 %	31,2 %	32,8 %
negativní kontrola nadhodnoceně klasifikovaná do podkategorií 1B a 1C	20,7 %	23,4 %	27,0 %	28,4 %
negativní kontrola nadhodnoceně klasifikovaná do podkategorie 1A	0,00 %	2,7 %	0,0 %	0,00 %
nadhodnoceně klasifikovaná žíravost	20,7 %	26,1 %	27,0 %	28,4 %
Celkový podíl nadhodnocené klasifikace (všechny kategorie)	**17,9 %**	**23,3 %**	**24,5 %**	**25,8 %**
Podhodnoceně klasifikované do podkategorií:				
1A podhodnoceně klasifikované do podkategorií 1B a 1C	16,7 %	16,7 %	16,7 %	12,5 %
1A nadhodnoceně klasifikované jako negativní kontrola	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
1B a 1C podhodnoceně klasifikované jako negativní kontrola	2,2 %	0,00 %	7,5 %	6,6 %
Celkový podíl podhodnocené klasifikace (všechny kategorie)	**3,3 %**	**2,5 %**	**5,4 %**	**4,4 %**
Správné klasifikace:				
1A správně klasifikována	83,3 %	83,3 %	83,3 %	87,5 %
1B a 1C správně klasifikovány	76,3 %	71,0 %	61,3 %	60,7 %
negativní kontrola správně klasifikována	79,3 %	73,9 %	73,0 %	71,62 %
Celková přesnost	**78,8 %**	**74,2 %**	**70 %**	**69,8 %**

Negativní kontrola: Nežíravá

(*) jedna chemická látka byla zkoušena jednou v modelu epiCS® z důvodu nedostupnosti (23)

▼**M8**

Dodatek 4

Klíčové Parametry A Kritéria Přijatelnosti Pro Způsobilost Spektrofotometrického Systému Hplc/Uplc Pro Měření Formazanu Mtt Extrahovaného z Rekonstruované Lidské Epidermis

Parametr	Protokol vycházející z pokynu FDA (37)(38)	Kritéria přijatelnosti
Selektivita	Analýza isopropylalkoholu, slepý pokus s živou tkání (isopropylalkoholový extrakt z živých tkání RhE bez jakékoli expozice), slepý pokus s neživou tkání (isopropylalkoholový extrakt z neživých tkání RhE bez jakékoli expozice)	$plocha_{interference} \leq 20\ \%\ plochy_{LLOQ}$ ([1])
Přesnost	Kontroly kvality (tj. formazan MTT při 1,6 μg/ml, 16 μg/ml a 160 μg/ml) v isopropylalkoholu (n=5)	CV ≤ 15 % nebo ≤ 20 % pro LLOQ
Přesnost	Kontroly kvality v isopropylalkoholu (n = 5)	%Dev ≤ 15 % nebo ≤ 20 % pro LLOQ
Vlivy matrice	Kontroly kvality ve slepém pokusu s živou tkání (n = 5)	85 % ≤vlivy matrice ≤ 115 %
Únik	Analýza isopropylalkoholu po standardu $ULOQ^2$ ([2])	$plocha_{interference} \leq 20\ \%\ plochy_{LLOQ}$
Reprodukovatelnost (v rámci dne)	3 nezávislé kalibrační křivky (vycházející z 6 postupných třetinových ředění formazanu MTT v isopropylalkoholu s počátkem při ULOQ, tj. 200 μg/ml), Kontroly kvality v isopropylalkoholu (n = 5)	Kalibrační křivky: %Dev ≤ 15 % nebo ≤ 20 % pro LLOQ Kontroly kvality: %Dev ≤ 15 % a CV ≤ 15 %
Reprodukovatelnost (mezi dny)	1. den: 1 kalibrační křivka a kontroly kvality v isopropylalkoholu (n = 3) 2. den: 1 kalibrační křivka a kontroly kvality v isopropylalkoholu (n = 3) 3. den: 1 kalibrační křivka a kontroly kvality v isopropylalkoholu (n = 3)	
Krátkodobá stabilita formazanu MTT v tkáňovém extraktu RhE	Kontroly kvality ve slepém pokusu s živou tkání (n = 3) analyzované v den přípravy a po 24 hodinách uložení při pokojové teplotě	%Dev ≤ 15 %
Dlouhodobá stabilita formazanu MTT v tkáňovém extraktu RhE, je-li požadována	Kontroly kvality ve slepém pokusu s živou tkání (n = 3) analyzované v den přípravy a po několika dnech uložení při stanovené teplotě (např. 4 °C, –20 °C, –80 °C)	%Dev ≤ 15 %

([1]) LLOQ: dolní mez stanovitelnosti, definovaná, aby postihla 1–2 % tkáňovou životaschopnost, tj. 0,8 μg/ml.
([2]) ULOQ: horní mez stanovitelnosti, definovaná tak, aby byla alespoň dvakrát vyšší než nejvyšší očekávaná koncentrace formazanu MTT v isopropylalkoholových extraktech z negativních kontrol, tj. 200 μg/ml. [[G1]]

▼B

B.41 **ZKOUŠKA FOTOTOXICITY 3T3 NRU *IN VITRO***

1. **METODA**

Tato zkušební metoda je rovnocenná metodě OECD TG 432 (2004).

1.1 ÚVOD

Fototoxicita je definována jako toxická odezva na látku aplikovanou na tělo, která je vyvolána nebo zvýšena (a je zjevná při nižších úrovních dávek) po následné expozici světlu nebo která je vyvolána ozářením kůže po systémovém podání látky.

Zkouška fototoxicity 3T3 NRU *in vitro* slouží k identifikaci fototoxického potenciálu zkoušené látky, který je vyvolán chemickou látkou excitovanou po expozici světlem. Zkouška vyhodnocuje fotocytotoxicitu z relativního snížení životaschopnosti buněk exponovaných zkoušené chemické látce v přítomnosti světla versus při jeho absenci. Látky identifikované touto zkouškou jsou pravděpodobně fototoxické *in vivo* po systémovém podání a po nanesení na kůži, nebo po nanesení na pokožku.

Fototoxické účinky byly zaznamenány u mnoha typů chemických látek (1, 2, 3, 4). Jejich společným rysem je schopnost absorbovat světelnou energii v oblasti slunečního světla. Podle prvního zákona fotochemie (Grotthaus-Draperův zákon) vyžaduje fotoreakce dostatečnou absorpci světelných kvant. Před zvážením biologického zkoušení musí být stanoveno UV/VIS absorpční spektrum zkoušené chemické látky podle Metodiky OECD TG 101. Vychází se z toho, že pokud je molární absorpční koeficient nižší než 10 l/mol/cm dotyčná chemická látka pravděpodobně není fotoreaktivní. Takové látky nemusí být zkouškou fototoxicity 3T3 NRU in vitro ani jinými biologickými zkouškami zkoušeny na nepříznivé fotochemické účinky (1, 5). Viz též přílohu 1.

V poslední době byla vyhodnocena spolehlivost a význam zkoušky fototoxicity 3T3 NRU *in vitro* (6, 7, 8, 9). Bylo prokázáno, že zkouška fototoxicity 3T3 NRU *in vitro* umožňuje předpovídat akutní fototoxické účinky u zvířat a u člověka *in vivo*. Zkouška není určena pro předpověď jiných nepříznivých účinků, které mohou plynout z kombinovaného působení chemické látky a světla, např. neumožňuje zkoumat fotogenotoxicitu, fotoalergii nebo fotokarcinogenitu ani neumožňuje posuzovat fototoxický potenciál. Tato zkouška dále není určena ke zkoumání nepřímých mechanismů fototoxicity ani účinků metabolitů zkoušené látky nebo účinků směsí.

Zatímco použití metabolizujícího systému je obecným požadavkem při všech zkouškách *in vitro* určených pro posouzení genotoxického a karcinogenního potenciálu, ve fototoxikologii je dosud známo pouze málo příkladů, kdy je metabolická transformace nutná pro působení chemické látky jako fototoxinu *in vivo* nebo *in vitro*. Nepovažuje se tedy ani za nezbytné ani za vědecky zdůvodněné, aby byla předložená zkouška provedena se systémem aktivace metabolismu.

▼B

1.2 DEFINICE

Intenzita ozáření: intenzita ultrafialového (UV) nebo viditelného světla dopadajícího na povrch, měřená ve W/m^2 nebo mW/cm^2.

Dávka světelného záření: množství (intenzita × čas) ultrafialového (UV) nebo viditelného záření dopadajícího na povrch, vyjádřená v joulech (W × s) na plochu povrchu, např. J/m^2 nebo J/cm^2.

Vlnová pásma UV světla: označení doporučená komisí CIE (Mezinárodní komise pro osvětlení): UVA (315–400 nm), UVB (280–315 nm) a UVC (100–280 nm). Používají se rovněž jiná označení; jako hranice mezi UVB a UVA je často používána hodnota 320 nm a pásmo UVA může být rozděleno na UV-A1 a UV-A2 s hranicí kolem 340 nm.

Životaschopnost buněk: parametr, kterým se měří celková aktivita buněčné populace (např. příjem vitálního barviva neutrální červeně do buněčných lysosomů) a který v závislosti na měřeném jevu a na použitém uspořádání zkoušky koreluje s celkovým počtem a/nebo životaschopností buněk.

Relativní životaschopnost buněk: životaschopnost v poměru ke kontrolám s rozpouštědlem (negativní kontroly), které prošly celým postupem zkoušky (s ozářením i bez něj), ale nebyly exponovány zkoušeným chemickým látkám.

PIF (Photo-Irritation-Factor – fotoiritační faktor): faktor získaný srovnáním dvou stejně účinných cytotoxických koncentrací (IC_{50}) zkoušené látky, a to při necytotoxickém ozáření UVA/VIS světlem a bez ozáření.

IC_{50}: koncentrace zkoušené látky, při níž se životaschopnost buněk sníží o 50 %.

MPE (Mean-Photo-Effect – střední světelný účinek): veličina odvozená z matematické analýzy průběhu křivek závislosti účinku na koncentraci získaných při necytotoxickém ozáření UVA/VIS světlem v přítomnosti ozáření a bez něho.

Fototoxicita: akutní toxická reakce vyvolaná po první expozici kůže určitým chemickým látkám a následné expozici světlu nebo podobně vyvolaná ozářením kůže po systémovém podání chemické látky.

1.3 PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

Zkouška fototoxicity 3T3 NRU *in vitro* je založena na srovnání cytotoxicity chemické látky při zkoušení s expozicí necytotoxické dávce simulovaného slunečního světla a bez této expozice. Cytotoxicita je v této zkoušce vyjádřena jako koncentračně závislé snížení příjmu vitálního barviva neutrální červeně (NR) 24 hodin po působení zkoušené chemické látky a ozáření (10). NR je slabé kationické barvivo, které nedifusně snadno proniká buněčnými membránami a akumuluje se mezibuněčně v lysosomech. Změny povrchu citlivých lysosomálních membrán způsobují ztrátu pevnosti lysosomů a další změny, které se postupně stávají nevratnými. Tyto změny vyvolané působením xenobiotik vedou ke snížení příjmu a vázání neutrální červeně. Je proto možné rozlišovat mezi životaschopnými, poškozenými nebo mrtvými buňkami, což je základem této zkoušky.

▼B

Buňky Balb/c 3T3 se 24 hodin kultivují, aby vytvořily monovrstvu. Dvě 96jamkové destičky na jednu zkoušenou chemickou látku se poté 1 hodinu preinkubují osmi různými koncentracemi zkoušených chemických látek. Poté je jedna ze dvou destiček exponována nejvyšší necytotoxickou dávkou ozáření, zatímco druhá destička se udržuje v temnu. U obou destiček se poté expoziční médium nahradí kultivačním médiem a po dalších 24 hodinách inkubace je životaschopnost buněk stanovena pomocí příjmu neutrální červeně (NRU). Životaschopnost buněk je vyjádřena v procentech vzhledem k neexponované kontrole s rozpouštědlem a vypočte se pro každou zkušební koncentraci. Pro předpověď fototoxického potenciálu se porovnají koncentračně závislé odezvy získané při ozáření a bez ozáření, obvykle při hodnotě IC_{50}, tj. při koncentraci způsobující 50 % úbytek životaschopnosti buněk ve srovnání s neexponovanými kontrolami.

1.4 POPIS ZKUŠEBNÍ METODY

1.4.1 **Příprava**

1.4.1.1 *Buňky*

Při validační studii byla použita permanentní myší linie buněk fibroplastů – Balb/c 3T3, klon 31 – buď z banky ATCC (American Type Culture Collection) v Manassasu ve Virginii (USA) nebo z banky ECACC (European Collection of Cell Cultures) v Salisbury v hrabství Wiltshire (Spojené království), a je tudíž doporučeno získat buňky z dobře kvalifikovaných zdrojů buněk. Jiné buňky nebo buněčné linie mohou být při stejném zkušebním postupu použity za předpokladu, že jsou kultivační podmínky přizpůsobeny specifickým potřebám buněk, ale musí být prokázána jejich rovnocennost.

Buňky by měly být pravidelně kontrolovány, zda nejsou kontaminovány mykoplasmaty, a měly by být použity, pouze pokud kontaminovány nejsou (11).

Je důležité, aby byla citlivost buněk na UV pravidelně kontrolována postupem kontroly jakosti popsaným v této metodě. Vzhledem k tomu, že citlivost buněk na UVA může růst s počtem pasáží, měly by být použity buňky Balb/c 3T3 z pasáže s nejnižším dosažitelným počtem pasáží, nejlépe z nižší než sté pasáže (viz bod 1.4.2.2.2 a příloha 2).

1.4.1.2 *Média a kultivační podmínky*

Pro rutinní buněčné pasážování a během zkušebního postupu by měla být použita vhodná kultivační média a inkubační podmínky, např. u buněk Balb/c 3T3 se jedná o DMEM (Dulbeccova modifikace Eagleova média) obohacenou 10 % novorozeneckým telecím sérem, 4mM glutaminem, penicilinem (100 IU) a streptomycinem (100 μg/ml) a o inkubaci ve vlhčené atmosféře při 37 °C, 5–7,5 % CO_2 v závislosti na použitém pufru (viz druhý odstavec bod 1.4.1.4). Zvlášť důležité je, aby kultivační podmínky zajistily, aby byl buněčný cyklus uvnitř dosavadního rozpětí pro použité buňky nebo buněčné linie.

1.4.1.3 *Příprava kultur*

Buňky ze zmrazených kmenových kultur se nasadí do kultivačního média ve vhodné hustotě a alespoň jednou se pasážují před použitím ve zkoušce fototoxicity 3T3 NRU *in vitro*.

▼B

Při zkoušce fototoxicity se buňky nasazují do kultivačního média v takové hustotě, aby nedosáhly konfluence do konce zkoušky, tj. do okamžiku, kdy je po 48 hodin od nasazení stanovována životaschopnost. Pro buňky Balb/c 3T3 kultivované v 96jamkových destičkách je doporučeno inokulum 1×10^4 buněk na jamku.

Pro každou chemickou látku se buňky nasadí stejným způsobem do dvou oddělených 96jamkových destiček, které jsou poté souběžně podrobeny celému postupu zkoušky za stejných podmínek kromě doby, kdy je jedna z destiček ozářena (+ Irr) a druhá je udržována v temnu (– Irr).

1.4.1.4 *Příprava zkoušené látky*

Zkoušené látky musí být čerstvě připraveny vždy bezprostředně před použitím, pokud údaje neprokáží jejich stabilitu při skladování. Doporučuje se veškeré chemické kroky a počáteční úpravy buněk provádět při světelných podmínkách vylučujících fotoaktivaci nebo degradaci zkoušené látky před ozářením.

Zkoušené chemické látky se rozpustí ve fyziologickém roztoku, např. v Earlově fyziologickém roztoku (EBSS), nebo v jiných fyziologicky vyvážených pufrovaných roztocích, které nesmí obsahovat proteinové složky a složky absorbující světlo (např. pH indikátory a vitaminy), aby nerušily při ozařování. Protože během ozařování jsou buňky drženy přibližně 50 minut mimo inkubátor s CO_2, je nutno dbát na vyloučení alkalizace. Je-li použit slabý pufr jako např. EBSS, lze toho dosáhnout inkubováním buněk v prostředí se 7,5 % CO_2. Jsou-li buňky inkubovány pouze při 5 % CO_2, je nutno použít silnější pufr.

Zkoušené chemické látky s omezenou rozpustností ve vodě by měly být rozpuštěny ve vhodném rozpouštědle. Použije-li se rozpouštědlo, musí být přítomné v konstantní koncentraci ve všech kulturách, tj. v negativní (rozpouštědlové) kontrole i ve všech koncentracích zkoušené chemické látky, a nesmí být při této koncentraci cytotoxické. Koncentrace zkoušené chemické látky musí být voleny tak, aby bylo vyloučeno srážení nebo zakalení roztoku.

Doporučenými rozpouštědly jsou dimethylsulfoxid (DMSO) a ethanol (EtOH). Vhodná mohou být i jiná málo cytotoxická rozpouštědla. Před použitím by měly být pro všechna rozpouštědla posouzeny jejich specifické vlastnosti, např. reakce se zkoušenou chemickou látku, potlačení fototoxických účinků, záchyt radikálů a/nebo chemická stabilita v rozpouštědle.

Rozpouštění může být usnadněno mícháním a/nebo ultrazvukem a/nebo zahřátím na vhodnou teplotu, pokud tím není dotčena stabilita zkoušené chemické látky.

▼B

1.4.1.5 *Podmínky ozařování*

1.4.1.5.1 Zdroj světla

Volba vhodného zdroje světla a filtrů je kritickým faktorem zkoušení fototoxicity. Záření v pásmu UVA a ve viditelném pásmu je obvykle spojováno s fototoxickými reakcemi *in vivo* (3, 12), zatímco záření v pásmu UVB je méně relevantní a je vysoce cytotoxické; cytotoxicita vzrůstá mezi 313 nm a 280 nm tisíckrát (13). Kritéria pro volbu vhodného světelného zdroje musí zahrnovat požadavek, aby zdroj světla vyzařoval světlo o vlnových délkách, které zkoušená chemická látka absorbuje (absorpční spektrum), a aby dávka světelného záření (dosažitelná po přijatelnou dobu expozice) byla dostatečná pro detekci známých fotocytotoxických chemických látek. Použité vlnové délky a dávky by dále neměly nadměrně poškozovat zkušební systém, např. emisí tepla (infračervená oblast).

Simulace slunečního světla solárními simulátory se považuje za optimální zdroj umělého světla. Distribuce zářivého výkonu filtrovaného solárního simulátoru by měla být blízká dennímu venkovnímu světlu uvedenému v literatuře (14). V solárních simulátorech se používá jak xenonová výbojka, tak vysokotlaká rtuťová halogenová výbojka (15). Druhá z nich má tu výhodu, že emituje méně tepla a je levnější, avšak sluneční světlo napodobuje méně dokonale než výbojka xenonová. Poněvadž všechny solární simulátory vyzařují významné množství UVB záření, měly by být vhodně filtrovány, aby byly vysoce cytotoxické vlnové délky UVB zeslabeny. Protože plastové materiály pro buněčné kultury obsahují UV stabilizátory, spektrum by mělo být měřeno po průchodu stejným typem víčka 96jamkové destičky, jaké se použije v daném stanovení. Nehledě na opatření přijatá k potlačení částí spektra filtrováním nebo na nevyhnutelné filtrační vlivy zařízení, spektrum zaznamenané za těmito filtry by se nemělo lišit od normalizovaného denního světla ve vnějším prostředí (14). Příklad spektrální distribuce filtrovaného záření solárního simulátoru použitého ve validační studii zkoušky fototoxicity 3T3 NRU *in vitro* je uveden v literatuře (8, 16). Viz též dodatek 2 obrázek 1.

1.4.1.5.2 Dozimetrie

Intenzita světla (intenzita ozáření) se musí pravidelně před každou zkouškou fototoxicity kontrolovat za použití vhodného širokopásmového UV-metru. Intenzita by měla být měřena po průchodu stejným typem víčka 96jamkové destičky, jaké se použije v daném stanovení. UV-metr musí být pro daný zdroj kalibrován. Funkčnost UV-metru by měla být kontrolována a za tímto účelem se doporučuje použít druhý referenční UV-metr stejného typu, stejným způsobem kalibrovaný. V ideálním případě by měl být v delších časových odstupech použit k měření spektrální intenzity záření filtrovaného zdroje světla a ke kontrole kalibrace širokopásmového UV-metru spektroradiometr.

Dávka 5 J/cm^2 (změřená v pásmu UVA) byla shledána jako necytotoxická pro buňky Balb/c 3T3 a dostatečně silná k excitaci chemických látek pro vyvolání fototoxických reakcí (6, 17), např. pro dosažení 5 J/cm^2 po dobu 50 minut byla intenzita ozáření nastavena na 1,7 mW/cm^2. Viz dodatek 2 obrázek 2. Jestliže je použita jiná buněčná linie nebo jiný světelný zdroj, musí být dávka ozáření případně kalibrována, aby mohl být režim dávkování volen tak, aby nepoškozoval buňky a byl dostatečný k excitaci standardních fototoxinů. Doba světelné expozice se vypočte tímto způsobem:

▼B

$$t(\text{min}) = \frac{\text{dávka ozáření } (\text{J/cm}^2) \times 1\,000}{\text{intenzita ozáření } (\text{mW/cm}^2) \times 60} \quad (1\ \text{J} = 1\ \text{Ws})$$

1.4.2 **Zkušební podmínky**

1.4.2.1 *Koncentrace zkoušené látky*

Rozmezí koncentrací chemických látek zkoušených se světlem (+ Irr) a bez světla (– Irr) by měly být náležitě stanoveny v experimentech pro zjištění rozmezí. Může být užitečné zjistit rozpustnost na počátku a po 60 minutách (nebo po době odpovídající době expozice), neboť rozpustnost se může měnit s časem nebo v průběhu expozice. pH buněčných kultur s přídavkem zkoušených látek by měla být v rozmezí 6,5–7,8, aby byla vyloučena toxicita způsobená nevhodnými kultivačními podmínkami nebo vysoce kyselými či zásaditými chemickými látkami.

Nejvyšší koncentrace zkoušené chemické látky by se měla nacházet v mezích fyziologických zkušebních podmínek, např. by měl být vyloučen osmotický stres či stres z pH. V závislosti na zkoušené chemické látce může být nutné brát v úvahu další fyzikálně-chemické vlastnosti jako faktory omezující nejvyšší zkušební koncentraci. U relativně nerozpustných látek, které nejsou toxické až do koncentrace nasycení, by měla být testována nejvyšší dosažitelná koncentrace. Obecně by mělo být vyloučeno srážení zkoušené látky při jakýchkoli zkušebních koncentracích. Maximální koncentrace zkoušené látky by neměla překročit 1 000 μg/ml; osmolarita by neměla překročit 10 mM. Měla by být použita geometrická řada ředění 8 koncentrací zkoušené látky s konstantním faktorem ředění (viz druhý odstavec bodu 2.1).

Pokud existují údaje (z experimentů pro zjištění rozmezí koncentrací) o tom, že zkoušená chemická látka není cytotoxická až do mezní koncentrace určené pro experiment v temnu (– Irr), ale je vysoce cytotoxická po ozáření (+ Irr), rozmezí koncentrací, které má být zvoleno pro experimenty s ozářením (+ Irr), se může lišit od rozmezí zvoleného pro experimenty v temnu (– Irr), má-li být splněn požadavek uspokojivé kvality údajů.

1.4.2.2 *Kontroly*

1.4.2.2.1 Citlivost buněk na záření, zjištění dosavadních údajů:

Citlivost buněk na zdroj světla by měla být pravidelně kontrolována (přibližně každá pátá pasáž) posouzením jejich životaschopnosti po expozici rostoucími dávkami ozáření. Při tomto posouzení by mělo být použito několik dávek ozáření, včetně úrovní podstatně vyšších, než jsou úrovně při zkoušce fototoxicity 3T3 NRU. Tyto dávky se nejsnáze kvantifikují měřením UV složek světelného zdroje. Buňky se nasadí při intenzitě použité ke zkoušce fototoxicity 3T3 NRU *in vitro* a příští den se ozáří. Životaschopnost buněk se poté stanoví o den později využitím příjmu neutrální červeně. Mělo by být prokázáno, že výsledná nejvyšší necytotoxická dávka (např. dávka ve validační studii 5 J/cm^2 (UVA)) byla dostatečná ke korektní klasifikaci referenčních chemických látek (tabulka 1).

▼B

1.4.2.2.2 Citlivost na záření, kontrola současné zkoušky:

Zkouška splňuje kritéria jakosti, pokud ozářené negativní/rozpouštědlové kontroly vykazují životaschopnost více než 80 % v porovnání s neozářenými negativními/rozpouštědlovými kontrolami.

1.4.2.2.3 Životaschopnost rozpouštědlové kontroly

Absolutní absorbance ($A_{540\ NRU}$) neutrální červeně extrahované z rozpouštědlových kontrol naznačí, zda 1×10^4 buněk nasazených na jednu jamku zachovalo při růstu během dvou dnů zkoušky obvyklou dobu zdvojnásobení (doubling time). Zkouška splňuje kritérium přijatelnosti, jestliže střední hodnota $A_{540\ NRU}$ neexponovaných kontrol je $\geq 0{,}4$ (tj. přibližně dvacetinásobek absorbance rozpouštědlového pozadí).

1.4.2.2.4 Pozitivní kontrola

Při každé zkoušce fototoxicity 3T3 NRU *in vitro* musí být souběžně zkoušena známá fototoxická chemická látka. Doporučen je chlorpromazin (CPZ). Pro CPZ zkoušený podle standardního postupu při zkoušce fototoxicity 3T3 NRU *in vitro* byla definována tato kritéria přijatelnosti zkoušky: CPZ ozářený (+ Irr): IC_{50} = 0,1 až 2,0 μg/ml, pro CPZ neozářený (– Irr): IC_{50} = 7,0 až 90,0 μg/ml. Fotoiritační faktor (PIF) by měl být > 6. Měla by být sledována předcházející funkčnost této pozitivní kontroly.

Namísto chlorpromazinu mohou být použity jako souběžné pozitivní kontroly jiné fototoxické chemické látky vhodné z hlediska typu nebo rozpustnosti hodnocené chemické látky.

1.4.3 **Zkušební postup (6, 7, 8, 16, 17)**

1.4.3.1 *První den*

Do obvodových jamek 96jamkové mikrotitrační destičky pro tkáňové kultury se odpipetuje po 100 μl kultivačního média (slepý pokus). Do zbývajících jamek se dávkuje po 100 μl buněčné suspenze s 1×10^5 buněk/ml v kultivačním médiu (= 1×10^4 buněk na jamku). Pro každou řadu koncentrací jednotlivých zkoušených chemických látek a pro rozpouštědlovou a pro pozitivní kontrolu se připraví dvě destičky.

Buňky se inkubují 24 hodin (viz bod 1.4.1.2), dokud nedosáhnou semikonfluentní monovrstvy. Tato inkubační doba umožní regeneraci buněk, jejich přichycení a exponenciální růst.

1.4.3.2 *Druhý den*

Po inkubaci se kultivační médium z buněk dekantuje a důkladně promyje 150 μl pufrovaného roztoku použitého k inkubaci. Přidá se 100 μl pufru obsahujícího vhodnou koncentraci zkoušené chemické látky, nebo pouze rozpouštědlo (rozpouštědlová kontrola). Aplikuje se 8 různých koncentrací zkoušené chemické látky. Buňky se zkoušenou chemickou látkou se inkubují v temnu po dobu 60 minut (viz bod 1.4.1.2 a druhý odstavec bodu 1.4.1.4).

Jedna ze dvou destiček připravených pro každou z řady koncentrací zkoušené chemické látky a kontroly se zvolí, obvykle náhodně, pro stanovení cytotoxicity (– Irr) (tj. kontrolní destička) a jedna (tj. expoziční destička) pro stanovení fotocytotoxicity (+ Irr).

▼B

K provedení části zkoušky s ozářením (+ Irr) se buňky při pokojové teplotě po dobu 50 minut ozařují přes víčko 96jamkové destičky nejvyšší dávkou záření, která je necytotoxická (viz též dodatek 2). Neozářené destičky (– Irr) se ponechají 50 minut (= doba expozice světlem) v temnu při pokojové teplotě.

Zkušební roztok se odstraní a každá jamka se promyje dvakrát 150 µl pufrovaného roztoku použitého k inkubaci, ale neobsahujícího zkoušený materiál. Pufrovaný roztok se poté nahradí kultivačním médiem a inkubuje se (viz bod 1.4.1.2) přes noc (18–22 hodin).

1.4.3.3 *Třetí den*

1.4.3.3.1 Mikroskopické hodnocení

Buňky se prohlédnou pod mikroskopem s fázovým kontrastem vzhledem k jejich růstu, morfologii a neporušenosti monovrstvy. Zaznamenají se změny morfologie buněk a účinky na růst buněk.

1.4.3.3.2 Zkouška příjmu neutrální červeně

Buňky se promyjí 150 µl předehřátého roztoku pufru. Promývací roztok se opatrně odstraní poklepem. Přidá se 100 µl média bez séra (16) s koncentrací 50 µg/ml neutrální červeně (NR) (3-amino-7-dimethylamino-2-methylphenazin hydrochlorid; N^8,N^8,3-trimethylfenazin-2,8-diamin-hydrochlorid; č. EINECS 209-035-8; č. CAS 553-24-2; C.I. 50040) a inkubuje se 3 hodiny dle popisu v bod 1.4.1.2. Po inkubaci se médium NR odstraní a buňky se promyjí 150 µl pufru. Ten se dekantuje a zcela odstraní odsátím nebo odstředěním.

Přidá se přesně 150 µl čerstvě připraveného roztoku (49 dílů vody + 50 dílů ethanolu + 1 díl kyseliny octové) k odstranění NR.

Mikrotitrační destička se jemně 10 minut třepe na třepačce, dokud se NR z buněk nevylouží a nevytvoří homogenní roztok.

Spektrometrem se změří absorbance extraktu NR při 540 nm, přičemž se pro srovnání použije slepý pokus. Údaje se uloží ve vhodném formátu elektronického souboru pro následnou analýzu.

2. **ÚDAJE**

2.1 KVALITA A MNOŽSTVÍ ÚDAJŮ

Údaje ze zkoušky by měly umožnit smysluplnou analýzu závislosti odezvy na koncentraci získané při ozáření a bez něho, a je-li to možné, koncentraci zkoušené látky, při níž je životaschopnost buněk snížena na 50 % (IC_{50}). Je-li zjištěna cytotoxicita, měl by být rozsah koncentrací a interval mezi nimi nastaven tak, aby bylo možné proložit experimentálními údaji křivku.

Pro jasně pozitivní a jasně negativní výsledky (viz první odstavec bodu 2.3) může dostačovat primární experiment podpořený jedním nebo více předběžnými experimenty pro stanovení rozsahu dávek.

▼B

Neprůkazné, hraniční nebo nejasné výsledky by měly být vyjasněny dalším zkoušením (viz též druhý odstavec bodu 2.4). V těchto případech by měla být uvážena změna experimentálních podmínek. Změněné experimentální podmínky se mohou týkat rozmezí koncentrací nebo rozestupů mezi jednotlivými koncentracemi, preinkubační doby a doby expozice ozářením. Kratší doba expozice může být vhodná u chemických látek nestálých ve vodě.

2.2 VYHODNOCENÍ VÝSLEDKŮ

S cílem umožnit vyhodnocení údajů může být vypočten fotoiritační faktor (PIF) a střední světelný účinek (MPE).

Pro výpočet parametrů fotocytotoxicity (viz níže) musí být soubor diskrétních hodnot závislosti odezvy na koncentraci aproximován vhodnou spojitou křivkou závislosti odezvy na koncentraci (vhodným modelem). Prokládání dat křivkou je běžně prováděno metodou nelineární regrese (18). Pro posouzení vlivu variability údajů na proloženou křivku se doporučuje postup *bootstrap*.

Fotoiritační faktor (PIF) se vypočte ze vzorce:

$$PIF = \frac{IC_{50}(-Irr)}{IC_{50}(+Irr)}$$

Pokud nelze vypočíst IC_{50} v přítomnosti a při absenci ozáření, nelze pro zkoušený materiál fotoiritační faktor PIF stanovit.

$$MPE = \frac{\sum_{i=1}^{n} w_i PE_{c_i}}{\sum_{i=1}^{n} w_i}$$

Střední světelný účinek (MPE) je založen na srovnání úplné křivky závislosti odezvy na koncentraci (19). MPE je definován jako vážený průměr reprezentativního souboru hodnot světelného účinku:

Světelný účinek při koncentraci C (PE_c) je definován jako součin účinku odezvy RE_c a účinku dávky DE_c tj. $PE_c = RE_c \times DE_c$. Účinek odezvy RE_c je rozdíl mezi odezvou pozorovanou při absenci a v přítomnosti světla, tj. $RE_c = R_c$ (– Irr) – R_c (+ Irr). Účinek dávky je dán vzorcem:

$$DE_c = \left| \frac{C/C^* - 1}{C/C^* + 1} \right|$$

kde C* představuje ekvivalentní koncentraci, tj. koncentraci, při které se odezva v přítomnosti světla + Irr rovná odezvě při absenci světla – Irr při koncentraci C. Pokud nelze ekvivalentní koncentraci C* určit, protože hodnoty odezvy R_C (+ Irr) křivky jsou soustavně vyšší nebo nižší než hodnoty R_C (– Irr)), je účinek dávky stanoven na hodnotu 1. Váhové faktory w_i jsou dány nejvyšší hodnotou odezvy, tj. w_i = MAX {R_i (+ Irr), R_i (– Irr) }. Koncentrační síť C_i je volena tak, aby v každém koncentračním intervalu definovaném hodnotami koncentrací použitými v experimentu byl stejný počet bodů. Výpočet středního světelného účinku je omezen na nejvyšší hodnoty koncentrací, při nichž alespoň jedna z obou křivek stále ještě vykazuje odezvu nejméně 10 %. Pokud je tato maximální koncentrace vyšší než nejvyšší koncentrace použitá v + Irr experimentu, je na zbývající části + Irr křivky odezva kladena jako rovná nule (= 0). V závislosti na tom, zda je, či není hodnota MPE větší než vhodně zvolená hraniční hodnota (MPE_c = 0,15), zkoušená chemická látka je, či není klasifikována jako fototoxická.

▼B

Program pro výpočet parametrů PIF a MPE je dostupný v (20).

2.3 INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

Na základě validační studie (8) lze předpovědět, že zkoušená látka s PIF < 2 či MPE < 0,1„není fototoxická“. Hodnoty PIF > 2 a < 5 či MPE > 0,1 a < 0,15 předpovídají: „pravděpodobně fototoxická“; a PIF > 5 či MPE > 0,15 předpovídají: „fototoxická“.

V laboratoři zavádějící prvně toto stanovení by referenční materiály uvedené v tabulce 1 měly být odzkoušeny před zkoušením zkušebních látek ke stanovení fototoxicity. Naměřené hodnoty PIF a MPE by měly být blízké hodnotám uvedeným v tabulce 1.

Tabulka 1

Chemický název	č. EINECS	č. CAS	PIF	MPE	Absorpční pík	Rozpouštědlo [1]
amiodaron-hydrochlorid	243-293-2	[19774-82-4]	> 3,25	0,27–0,54	242 nm 300 nm (rameno)	ethanol
chlorpromazin-hydrochlorid	200-701-3	[69-09-0]	> 14,4	0,33–0,63	309 nm	ethanol
norfloxacin	274-614-4	[70458-96-7]	> 71,6	0,34–0,90	316 nm	acetonitril
anthracen	204-371-1	[120-12-7]	> 18,5	0,19–0,81	356 nm	acetonitril
protoporfyrin IX, disodná sůl	256-815-9	[50865-01-5]	> 45,3	0,54–0,74	402 nm	ethanol
L-histidin		[7006-35-1]	žádný PIF	0,05–0,10	211 nm	voda
2,2'-methylenbis(3,4,6-trichlorfenol); hexachlorofen	200-733-8	[70-30-4]	1,1–1,7	0,00–0,05	299 nm 317 nm (rameno)	ethanol
natrium-dodecyl-sulfát	205-788-1	[151-21-3]	1,0–1,9	0,00–0,05	neabsorbuje	voda

[1] Rozpouštědlo použité pro měření absorpce.

2.4 INTERPRETACE ÚDAJŮ

Jsou-li fototoxické účinky pozorovány pouze při nejvyšších zkoušených koncentracích (zvláště v případě zkoušených chemických látek rozpustných ve vodě), mohou být pro posouzení nebezpečnosti nezbytné další úvahy. Ty se mohou týkat údajů o absorpci kůží a akumulaci chemické látky v kůži a/nebo údajů z jiných zkoušek, např. ze zkoušek dotyčné chemické látky *in vitro* za použití zvířecí nebo lidské kůže či jejich modelů.

▼B

Není-li toxicita prokázána (+ Irr a – Irr) a jsou-li koncentrace, které by mohly být zkoušeny, omezeny malou rozpustností, není patrně zkouška pro zkoušenou látku vhodná a mělo by být zváženo potvrzující zkoušení za použití např. jiného modelu.

3. **ZPRÁVY**

PROTOKOL O ZKOUŠCE

Protokol o zkoušce musí obsahovat přinejmenším tyto informace:

Zkoušená látka:

— identifikační údaje, obecné generické názvy a čísla podle IUPAC a CAS, jsou-li známa,

— fyzikální vlastnosti a čistota,

— fyzikálně-chemické vlastnosti důležité pro provedení studie,

— UV/VIS absorpční spektrum,

— stálost a fotostabilita, jsou-li známy.

Rozpouštědlo:

— zdůvodnění volby rozpouštědla,

— rozpustnost zkoušené chemické látky v rozpouštědle,

— procentuální koncentrace rozpouštědla v aplikačním médiu.

Buňky:

— typ a zdroj buněk,

— nepřítomnost mykoplasmat,

— číslo buněčné pasáže, je-li známo,

— citlivost buněk na záření stanovená ozařovacím zařízením použitým ve zkoušce fototoxicity 3T3 NRU *in vitro*.

Zkušební podmínky (1); *inkubace před aplikací a po ní*:

— typ a složení kultivačního média,

— inkubační podmínky (koncentrace CO_2; teplota; vlhkost),

— délka inkubace (zpracování před inkubací a po ní).

Zkušební podmínky (2); *aplikace chemické látky*:

— zdůvodnění výběru koncentrací zkoušené chemické látky použitých jak při ozáření, tak bez něj,

— v případě, že zkoušená chemická látka vykazuje omezenou rozpustnost a není cytotoxická: zdůvodnění nejvyšší zkušební koncentrace,

— typ a složení aplikačního média (pufrovaný fyziologický roztok),

— délka aplikace chemické látky.

Zkušební podmínky (3); *ozáření*:

— zdůvodnění výběru použitého zdroje světla,

▼B

— výrobce a typ zdroje světla a radiometru,

— spektrální charakteristiky ozáření ze zdroje světla,

— charakteristiky propustnosti a absorpce použitého filtru (použitých filtrů),

— charakteristiky radiometru a podrobnosti o jeho kalibraci,

— vzdálenost zdroje světla od zkoušeného systému,

— intenzita ozáření UVA v této vzdálenosti, vyjádřená v mW/cm^2,

— délka expozice UV/VIS světlu,

— dávka UVA záření (intenzita × čas), vyjádřená v J/cm^2,

— teplota buněčných kultur během ozařování a teplota buněčných kultur souběžně udržovaných v temnu.

Zkušební podmínky (4); *zkouška životaschopnosti příjmem neutrální červeně*:

— složení aplikačního média neutrální červeně,

— doba inkubace neutrální červeně,

— inkubační podmínky (koncentrace CO_2; teplota; vlhkost),

— podmínky extrakce neutrální červeně (extrakční činidlo; délka extrakce),

— vlnová délka použitá pro spektrofotometrický odečet absorbance neutrální červeně,

— druhá (referenční) vlnová délka, je-li použita,

— složení slepého roztoku pro spektrometrii, je-li použit.

Výsledky:

— životaschopnost buněk získaná při každé koncentraci zkoušené chemické látky vyjádřená v procentech střední životaschopnosti souběžných rozpouštědlových kontrol,

— křivky koncentrační závislosti odezvy (koncentrace zkoušené chemické látky versus relativní životaschopnost buněk) získané při souběžných experimentech + Irr a – Irr,

— analýza křivek koncentrační závislosti odezvy; je-li to možné, výpočet hodnot / IC_{50} (+ Irr) a IC_{50} (– Irr),

— srovnání obou křivek koncentrační závislosti odezvy získaných s ozářením a bez něho, a to buď výpočtem fotoiritačního faktoru (PIF), nebo výpočtem středního světelného účinku (MPE),

— kritéria přijatelnosti zkoušky; souběžná rozpouštědlová kontrola:

— absolutní životaschopnost (absorbance extraktu NR) ozářených a neozářených buněk,

— dosavadní údaje pro negativní a rozpouštědlovou kontrolu; střední hodnoty a směrodatné odchylky,

— kritéria přijatelnosti zkoušky; souběžná pozitivní kontrola:

▼B

— IC_{50} (+ Irr) a IC_{50} (– Irr) a PIF/MPE pozitivní kontrolní chemické látky,

— dosavadní údaje pozitivní kontrolní chemické látky: IC_{50} (+ Irr) a IC_{50} (– Irr) a PIF/MPE; střední hodnoty a směrodatné odchylky.

Rozbor výsledků.

Závěry.

4. **LITERATURA**

1) Lovell W.W. (1993). A scheme for *in vitro* screening of substances for photoallergenic potential. Toxic. In Vitro 7: 95–102.

2) Santamaria, L. and Prino, G. (1972). List of the photodynamic substances. In „Research Progress in Organic, Biological and Medicinal Chemistry“ Vol. 3 part 1. North Holland Publishing Co. Amsterdam. p XI–XXXV.

3) Spielmann, H., Lovell, W.W., Hölzle, E., Johnson, B.E., Maurer, T., Miranda, M.A., Pape, W.J.W., Sapora, O., and Sladowski, D. (1994). *In vitro* phototoxicity testing: The report and recommendations of ECVAM Workshop 2. ATLA, 22, 314–348.

4) Spikes, J.D. (1989). Photosensitization. In „The science of Photobiology“ Edited by K.C. Smith. Plenum Press, New York. 2nd edition, s. 79–110.

5) OECD (1997) Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No.7 „Guidance Document On Direct Phototransformation Of Chemicals In Water“ Environment Directorate, OECD, Paris.

6) Spielmann, H., Balls, M., Döring, B., Holzhütter, H.G., Kalweit, S., Klecak, G., L'Eplattenier, H., Liebsch, M., Lovell, W.W., Maurer, T., Moldenhauer. F. Moore. L., Pape, W., Pfannbecker, U., Potthast, J., De Silva, O., Steiling, W., and Willshaw, A. (1994). EEC/COLIPA project on *in vitro* phototoxicity testing: First results obtained with a Balb/c 3T3 cell phototoxicity assay. Toxic. In Vitro 8, 793–796.

7) Anon (1998). Statement on the scientific validity of the 3T3 NRU PT test (an *in vitro* test for phototoxicity), European Commission, Joint Research Centre: ECVAM and DGXI/E/2, 3 November 1997, ATLA, 26, 7–8.

8) Spielmann, H., Balls, M., Dupuis, J., Pape, W.J.W., Pechovitch, G. De Silva, O., Holzhütter, H.G., Clothier, R., Desolle, P., Gerberick, F., Liebsch, M., Lovell, W.W., Maurer, T., Pfannenbecker, U., Potthast, J. M., Csato, M., Sladowski, D., Steiling, W., and Brantom, P. (1998). The international EU/COLIPA *In vitro* phototoxicity validation study: results of phase II (blind trial), part 1: the 3T3 NRU phototoxicity test. Toxic. In Vitro 12, 305–327.

9) OECD (2002) Extended Expert Consultation Meeting on The In Vitro 3T3 NRU Phototoxicity Test Guideline Proposal, Berlin, 30^{th}-31^{th} October 2001, Secretariat's Final Summary Report, 15^{th} March 2002, OECD ENV/EHS, available upon request from the Secretariat.

10) Borenfreund, E., and Puerner, J.A. (1985). Toxicity determination *in vitro* by morphological alterations and neutral red absorption. Toxicology Lett., 24, 119–124.

11) Hay, R.J. (1988) The seed stock concept and quality control for cell lines. Analytical Biochemistry 171, 225–237.

▼B

12) Lambert L.A, Warner W.G., and Kornhauser A. (1996) Animal models for phototoxicity testing. In „Dermatotoxicology“, edited by F.N. Marzulli and H.I. Maibach. Taylor & Francis, Washington DC. 5th Edition, s. 515–530.

13) Tyrrell R.M., Pidoux M (1987) Action spectra for human skin cells: estimates of the relative cytotoxicity of the middle ultraviolet, near ultraviolet and violet regions of sunlight on epidermal keratinocytes. Cancer Res., 47, 1825–1829.

14) ISO 10977. (1993). Photography – Processed photographic colour films and paper prints – Methods for measuring image stability.

15) Sunscreen Testing (UV.B) TECHNICALREPORT, CIE, International Commission on Illumnation, Publication No. 90, Vienna, 1993, ISBN 3900734275.

16) ZEBET/ECVAM/COLIPA – Standard Operating Procedure: *In Vitro* 3T3 NRU Phototoxicity Test. Final Version, 7 September, 1998. 18 stran.

17) Spielmann, H., Balls, M., Dupuis, J., Pape, W.J.W., De Silva, O., Holzhütter, H.G., Gerberick, F., Liebsch, M., Lovell, W.W., and Pfannenbecker, U. (1998) A study on UV filter chemicals from Annex VII of the European Union *Directive 76/768/EEC,* in the *in vitro* 3T3 NRU phototoxicity test. ATLA 26, 679–708.

18) Holzhütter, H.G., and Quedenau, J. (1995) Mathematical modeling of cellular responses to external signals. J. Biol. Systems 3, 127–138.

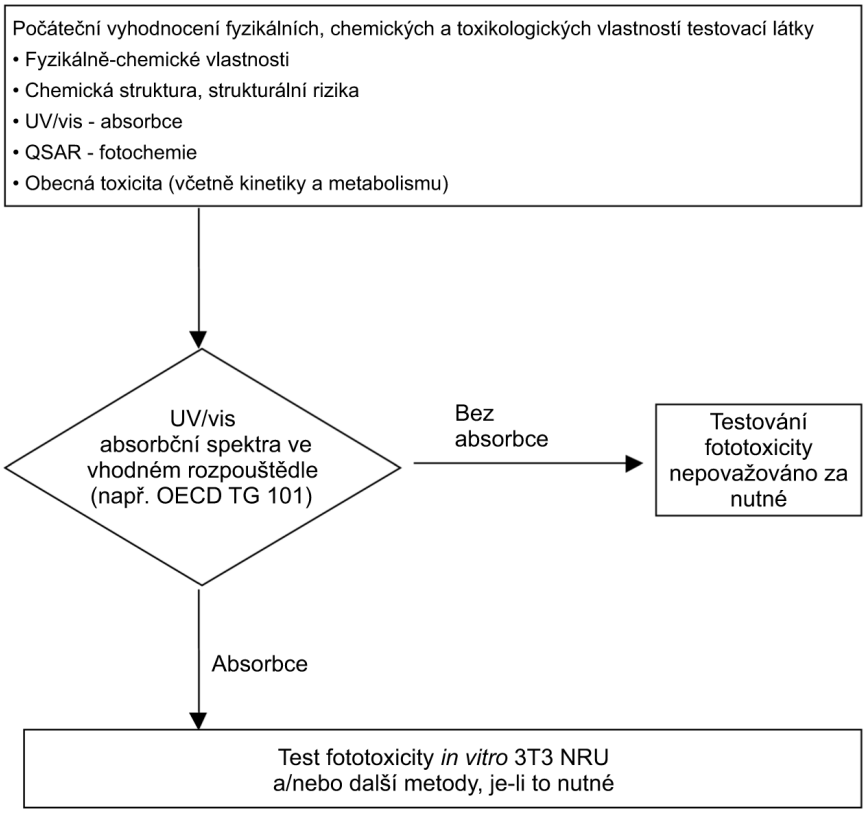
19) Holzhütter, H.G. (1997). A general measure of *in vitro* phototoxicity derived from pairs of dose-response curves and its use for predicting the *in vivo* phototoxicity of chemicals. ATLA, 25, 445–462.

20) http://www.oecd.org/document/55/0,2340,en_2649_34377_2349687_1_1_1_1,00.html.

▼B

DODATEK 2

Role zkoušky fototoxicity 3T3 NRU v postupném zkoušení fototoxicity chemických látek

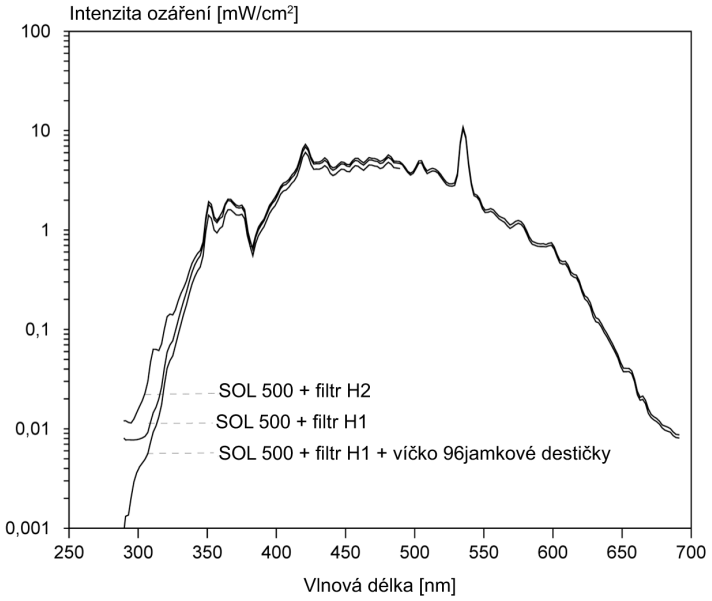


▼B

DODATEK 2

Obrázek 1

Spektrální distribuce výkonu filtrovaného solárního simulátoru



(viz druhý odstavec bodu 1.4.1.5)

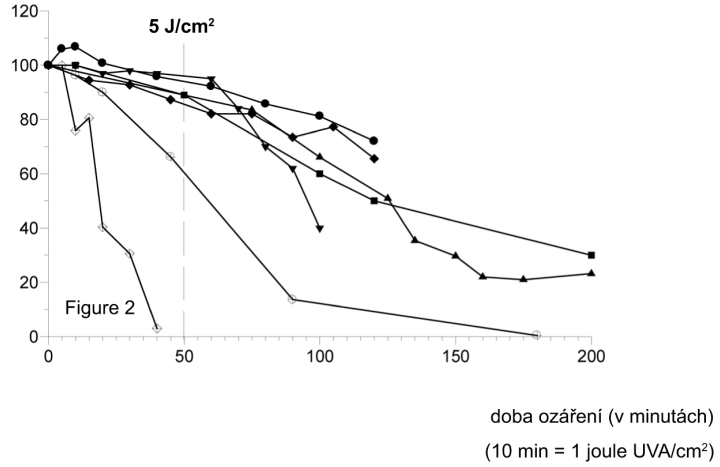
Obrázek 1 uvádí příklad přijatelné spektrální distribuce intenzity ozáření filtrovaného solárního simulátoru. Pochází ze zdroje dopovaného halidy kovů, použitého ve validačním experimentu zkoušky fototoxicity 3T3 NRU (6, 8, 17). Je ukázán účinek dvou různých filtrů a dodatečný filtrační účinek víčka 96jamkové destičky pro kultivaci buněk. Filtr H2 byl použit pouze ve zkušebních systémech tolerantních k vyšší dávce UVB (zkouška modelu kůže a fotohemolytická zkouška červených krvinek). Pro zkoušku fototoxicity 3T3 NRU byl použit filtr H1. Obrázek ukazuje, že dodatečný filtrační účinek víčka destičky je pozorován hlavně v oblasti UVB, přičemž víčkem proniká stále ještě dostatečné množství UVB ze spektra intenzity ozáření k excitování chemických látek obvykle absorbujících v UVB oblasti, jako amiodaron (viz tabulka 1).

▼B

Obrázek 2

Citlivost buněk Balb/c 3T3 k ozáření (měřená v oblasti UVA)

Životaschopnost buněk (v % úrovně příjmu neutrální červeně v kontrole v temnu)



doba ozáření (v minutách)

(10 min = 1 joule UVA/cm²)

(viz bod 1.4.1.5.2 druhý odstavec; 1.4.2.2.1, 1.4.2.2.2)

Citlivost buněk Balb/c 3T3 k ozáření solárním simulátorem použitým ve validačním experimentu zkoušky fototoxicity 3T3 NRU, naměřená v UVA oblasti. Obrázek znázorňuje výsledky změřené v sedmi různých laboratořích v předvalidační studii (1). Zatímco dvě křivky označené neplnými symboly byly získány se staršími buňkami (s vyšším počtem pasáží), které musely být nahrazeny novými buňkami, křivky s plnými symboly představují buňku s přijatelnou tolerancí k ozáření.

Z těchto údajů byla odvozena nejvyšší necytotoxická dávka ozáření 5 J/cm^2 (svislá čárkovaná čára). Vodorovná čárkovaná čára představuje navíc maximální přijatelný účinek ozáření uvedený v bodu 1.4.2.2.

▼M3

B.42 SENZIBILIZACE KŮŽE: ZKOUŠKA S VYŠETŘENÍM LOKÁLNÍCH LYMFATICKÝCH UZLIN

ÚVOD

1. Metodiky OECD pro testování chemických látek a na nich založené zkušební metody EU jsou pravidelně přezkoumávány s ohledem na vědecký pokrok, změny regulačních potřeb a dobré životní podmínky zvířat. Již dříve byla přijata původní zkušební metoda (ZM) pro stanovení senzibilizace kůže u myší, tzv. zkouška s vyšetřením lokálních lymfatických uzlin (LLNA; zkušební metodika OECD č. 429; kapitola B.42 této přílohy) (1). Podrobnosti o validaci metody LLNA a přehled souvisejících prací byly publikovány (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11). Aktualizovaná metoda LLNA je založena na posouzení zkušeností a vědeckých údajů (12). Jedná se o druhou ZM, která je určena k hodnocení potenciálu chemikálií (látek a směsí) způsobovat senzibilizaci kůže u zvířat. Druhá zkušební metoda (tzn. podle zkušební metodiky OECD č. 406 nebo kapitoly B.6 této přílohy) využívá zkoušky na morčatech, a to zvláště maximalizační zkoušku na morčatech a Bühlerův test (13). Metoda LLNA poskytuje oproti metodě uvedené v kapitole B.6 a zkušební metodice OECD č. 406 (13) určité výhody, pokud jde o dobré životní podmínky zvířat. Tato aktualizovaná zkušební metoda LLNA obsahuje sadu standardů funkčnosti (dodatek 1), které lze používat k posouzení stavu validace nových a/nebo modifikovaných zkušebních metod, které jsou funkčně a mechanicky podobné metodě LLNA, v souladu se zásadami uvedenými v Pokynu OECD č. 34 (14).

2. Metoda LLNA zkoumá indukční fázi senzibilizace kůže a poskytuje kvantitativní údaje, které jsou vhodné pro hodnocení závislosti odezvy na dávce. Je třeba poznamenat, že mírně nebo středně silně senzibilizující látky, které se doporučují jako vhodné pozitivní kontrolní látky pro zkoušky na morčatech (tzn. podle kapitoly B.6 této přílohy nebo zkušební metodiky OECD č. 406) (13) jsou vhodné také pro metodu LLNA (6) (8) (15). V této ZM je jako alternativa popsána také redukovaná metoda LLNA (rLLNA), při které by se mohlo používat až o 40 % méně zvířat (16) (17) (18). Metodu rLLNA lze použít, když právní předpisy vyžadují potvrzení negativní predikce potenciálu určité chemické látky senzibilizovat kůži, pokud se dodrží všechny ostatní specifikace protokolu metody LLNA popsané v této ZM. Predikce negativního výsledku by měla být založena na všech dostupných informacích popsaných v odstavci 4. Před použitím metody rLLNA je nutno poskytnout jednoznačné obecné a vědecké zdůvodnění jejího použití. Pokud jsou v rozporu s původním očekáváním získány při použití metody rLLNA pozitivní nebo nejednoznačné výsledky, může být k interpretaci nebo objasnění výsledku nezbytné provést další zkoušky. Metoda rLLNA by se neměla používat k zjišťování nebezpečnosti látek, které se používají při zkouškách senzibilizace kůže, pokud jsou zapotřebí informace ohledně závislosti odezvy na dávce, například při podrobném dílčím třídění látek pro účely nařízení (ES) č. 1272/2008 o klasifikaci, označování a balení látek a směsí nebo pro účely globálně harmonizovaného systému klasifikace a označování chemických látek OSN.

DEFINICE

3. Použité definice jsou uvedeny v dodatku 2.

VÝCHOZÍ ÚVAHY A OMEZENÍ

4. Metoda LLNA představuje alternativní metodu pro identifikaci chemických látek způsobujících senzibilizaci kůže. To však nutně neznamená, že by se metoda LLNA měla používat ve všech případech namísto zkoušek na morčatech (tzn. podle kapitoly B.6 nebo zkušební metodiky OECD č. 406) (13); znamená to spíše, že tato metoda má stejnou hodnotu a že ji lze použít jako alternativní metodu, jejíž pozitivní ani negativní výsledky obvykle již nevyžadují žádné další potvrzování. Zkušební laboratoř by měla před

▼M3

provedením studie zohlednit všechny dostupné informace o zkoušené látce. Mezi tyto informace patří totožnost a chemická struktura zkoušené látky, její fyzikálně-chemické vlastnosti, výsledky jakýchkoli jiných zkoušek toxicity *in vitro* a *in vivo* za použití zkoušené látky a toxikologické údaje o strukturně příbuzných látkách. Tyto informace by se měly posoudit, aby se zjistilo, zda je metoda LLNA vhodná pro danou látku (s ohledem na neslučitelnost některých druhů chemických látek s metodou LLNA – viz odstavec 5), a také aby se usnadnila volba dávkování.

5. Zkušební metoda LLNA je metodou *in vivo*, a tudíž taková neeliminuje používání zvířat při hodnocení alergického kontaktního senzibilizujícího působení. Tato metoda však umožňuje snížit počet zvířat, která jsou k tomuto účelu nezbytná. Kromě toho metoda LLNA nabízí podstatné zlepšení způsobu zacházení se zvířaty (méně bolesti a utrpení), která se využívají ke zkoušení kontaktní alergické senzibilizace. Metoda LLNA je založena na posouzení imunologických jevů navozených chemickými látkami během indukční fáze senzibilizace. Na rozdíl od zkoušek na morčatech (tzn. podle kapitoly B.6 nebo zkušební metodiky OECD č. 406) (13) metoda LLNA nevyžaduje umělé vyvolání kožní přecitlivělosti. Kromě toho metoda LLNA nevyžaduje ani používání adjuvantu, jak je tomu v případě maximalizační zkoušky na morčatech (13). Díky tomu metoda LLNA snižuje bolest a utrpení zvířat. Ale i přes výhody, které má metoda LLNA ve srovnání s metodou popsanou v kapitole B.6 a zkušební metodice OECD č. 406, je třeba si uvědomit, že existují určitá omezení, která si mohou vyžádat použití metody popsané v kapitole B.6 nebo zkušební metodice OECD č. 406 (13) (např. falešně negativní výsledky při použití metody LLNA pro určité kovy, falešně pozitivní výsledky u určitých látek způsobujících podráždění kůže [jako jsou například některé chemikálie typu povrchově aktivních látek] (19) (20) nebo rozpustnost zkoušené látky). Kromě toho si použití zkoušek na morčatech (tzn. podle kapitoly B.6 nebo zkušební metodiky OECD č. 406) (13) mohou vyžádat také některé třídy chemických látek nebo látky obsahující funkční skupiny, u nichž je prokázáno, že mohou způsobovat zkreslení výsledků (21). Na základě omezené validační databáze, která se skládala převážně z pesticidních přípravků, je pravděpodobnější, že u těchto druhů zkoušených látek poskytne pozitivní výsledek metoda LLNA nežli zkouška na morčatech (22). Avšak při testování přípravků by se dalo uvažovat o možnosti použít podobné látky se známými výsledky jakožto srovnávací látky, které prokáží, že metoda LLNA funguje správně (viz odstavec 16). S výjimkou těchto známých omezení by měla být metoda LLNA použitelná k testování jakýchkoli látek, nejsou-li s těmito látkami spojeny vlastnosti, které mohou nepříznivě ovlivnit přesnost metody LLNA.

PODSTATA ZKOUŠKY

6. Základní podstata metody LLNA spočívá v tom, že senzibilizující látky vyvolávají proliferaci lymfocytů v lymfatických uzlinách drenujících místo aplikace zkoušené látky. Tato proliferace je úměrná dávce a účinnosti aplikovaného alergenu a představuje jednoduchý prostředek k získání kvantitativního údaje o míře senzibilizace. Proliferace se měří porovnáním střední proliferace u každé zkušební skupiny se střední proliferací u kontrolní skupiny s vehikulem. Určí se poměr střední proliferace u každé z exponovaných skupin ke střední proliferaci u souběžně testované kontrolní skupiny s vehikulem, nazývaný index stimulace (SI), přičemž jeho hodnota by měla být větší nebo rovna třem, aby bylo zařazení zkoušené látky mezi potenciální senzibilizátory kůže oprávněné. Zde popsané postupy jsou založeny na použití radioaktivního značení *in vivo* k měření zvýšeného počtu proliferujících buněk v lymfatických uzlinách drenujících aurikulární oblast. K posouzení počtu proliferujících buněk však lze použít i jiné ukazatele za předpokladu, že jsou zcela splněny požadavky standardů funkčnosti (viz dodatek 1).

▼M3

POPIS ZKOUŠKY

Volba druhu zvířat

7. Vhodným druhem pro tuto zkoušku je myš. Používají se mladé dospělé samice myší z kmene CBA/Ca nebo CBA/J, které musí být nullipary a nesmějí být březí. Při zahájení studie by zvířata měla být přibližně 8 až 12 týdnů stará, přičemž odchylky v hmotnosti zvířat by měly být pouze minimální a neměly by překročit 20 % střední hmotnosti. Případně lze používat i jiné kmeny a samce, pokud je k dispozici dostatek údajů, které dokazují, že v rámci reakcí neexistují u metody LLNA významné specifické odlišnosti mezi kmeny a/nebo pohlavími.

Podmínky chovu a krmení

8. Myši by měly být chovány ve skupinách (23), není-li předloženo dostatečné vědecké zdůvodnění, proč by měly být chovány jednotlivě. Teplota v místnosti pro pokusná zvířata by měla být 22 ± 3 °C. Ačkoli by relativní vlhkost vzduchu měla být minimálně 30 % a pokud možno by kromě doby úklidu místnosti neměla přesáhnout 70 %, cílem by měla být hodnota 50–60 %. Osvětlení by mělo být umělé se střídáním 12 hodin světla a 12 hodin tmy. Ke krmení lze používat běžnou laboratorní stravu a k pití by měly mít myši k dispozici neomezené množství vody.

Příprava zvířat

9. Zvířata se náhodně vyberou, pro usnadnění individuální identifikace se označí (nesmí se však použít žádná forma značení uší) a chovají se v klecích minimálně pět dnů před začátkem aplikování zkoušené látky, aby se mohla přizpůsobit laboratorním podmínkám. Před začátkem aplikace látky se všechna zvířata vyšetří, aby se ověřilo, že nemají žádné pozorovatelné kožní léze.

Příprava dávkovacích roztoků

10. Pevné chemické látky by se měly před nanesením na ucho myši rozpustit nebo suspendovat ve vhodných rozpouštědlech nebo vehikulech a popřípadě zředit. Kapalné látky lze aplikovat bez přísad nebo je lze před dávkováním rozpustit. Nerozpustné látky, jaké se nejčastěji používají k výrobě zdravotnických prostředků, by měly být vystaveny intenzívní extrakci ve vhodném rozpouštědle, aby se před nanesením na ucho myši odhalily všechny extrahovatelné složky, které je nutno testovat. Zkoušené látky by se měly připravovat každý den čerstvé, pokud údaje o stálosti neprokazují přijatelnost jejich skladování.

Kontrola spolehlivosti

11. K prokázání řádné funkčnosti zkoušky slouží pozitivní kontrolní chemikálie, a to tak, že reagují s dostatečnou a reprodukovatelnou citlivostí na zkoušenou senzibilizující látku, u níž je dobře popsána síla odezvy. Zařazení souběžné pozitivní kontroly se doporučuje proto, že prokazuje způsobilost laboratoře úspěšně provést každou zkoušku a umožňuje posoudit vnitrolaboratorní a mezilaboratorní reprodukovatelnost a srovnatelnost. Pozitivní kontrolu při každé studii také vyžadují některé regulační orgány, a proto se uživatelům doporučuje před provedením zkoušky LLNA příslušné orgány konzultovat. Doporučuje se tudíž běžně používat souběžnou pozitivní kontrolu, aby nebylo nutné další zkoušení na zvířatech ke splnění požadavků, které by mohly vzniknout při používání periodické pozitivní kontroly (viz odstavec 12). Pozitivní kontrola by měla v rámci metody LLNA vyvolat pozitivní odezvu při úrovni expozice, u které se očekává zvýšení indexu stimulace (SI) > 3 ve srovnání s negativní kontrolní skupinou. Dávka pozitivní kontroly by měla být zvolena tak, aby nevyvolala nadměrné podráždění kůže nebo systémovou toxicitu

▼M3

a přitom aby indukce byla reprodukovatelná, avšak nikoli nadměrná (tzn. že hodnota SI > 20 by byla příliš velká). K upřednostňovaným látkám, které se používají jako pozitivní kontrola, patří 25 % roztok 2-benzylidenoktanalu (reg. č. Chemical Abstracts Service [CAS] 101-86-0) v acetonu s olivovým olejem (v objemovém poměru 4:1) a 5 % roztok 2-sulfanylbenzothiazolu (CAS 149-30-4) v *N,N*-dimethylformamidu (viz dodatek 1, tabulka 1). Mohou existovat určité okolnosti, za nichž lze při řádném zdůvodnění použít i jiné pozitivní kontrolní látky, které splňují výše uvedená kritéria.

12. I když se zařazení skupiny souběžných pozitivních kontrol doporučuje, mohou existovat situace, kdy může být periodické testování (tzn. v intervalech ≤ 6 měsíců) pozitivních kontrol vhodné u laboratoří, které provádějí zkoušky LLNA pravidelně (tzn. nejméně jednou měsíčně) a mají k dispozici databázi dřívějších údajů pozitivních kontrol, která prokazuje schopnost laboratoře získat při použití pozitivních kontrol reprodukovatelné a přesné výsledky. Odpovídající zběhlost v používání metody LLNA lze úspěšně prokázat dosažením shodných pozitivních výsledků při použití pozitivní kontroly alespoň v 10 nezávislých zkouškách provedených během přiměřené doby (tzn. během méně než jednoho roku).

13. Skupina souběžných pozitivních kontrol by se měla zařadit vždy, když dojde k procedurální změně metody LLNA (např. při změně složení vyškoleného personálu, při změně materiálů a/nebo činidel či vybavení, jež se používají v rámci zkušební metody, nebo při změně zdroje pokusných zvířat), přičemž takové změny by se měly vždy zdokumentovat v laboratorních zprávách. Při určování nezbytnosti vytvořit novou databázi ke zdokumentování shodnosti výsledků pozitivních kontrol by se měl zvážit dopad těchto změn na přiměřenost dosavadní databáze.

14. Zkoušející by si měli uvědomit, že rozhodnutí používat pozitivní kontroly periodicky namísto souběžně má závažné dopady na přiměřenost a přijatelnost negativních výsledků studie získaných bez souběžných pozitivních kontrol během intervalu mezi jednotlivými periodickými použitími pozitivních kontrol. Například obdržení falešně negativního výsledku při periodickém používání pozitivních kontrol může zpochybnit negativní výsledky zkoušené látky získané v období mezi poslední přijatelnou periodickou studií pozitivních kontrol a nepřijatelnou periodickou studií pozitivních kontrol. Důsledky, jež z toho vyplývají, je třeba pečlivě zvážit při rozhodování, zda do zkoumání zařadit souběžné pozitivní kontroly, nebo používat pouze periodické pozitivní kontroly. Je také nutno vzít v úvahu možnost použít v rámci skupiny souběžných pozitivních kontrol méně zvířat, jestliže je to vědecky opodstatněné a jestliže laboratoř na základě svých vlastních dosavadních údajů prokáže, že lze používat méně myší (12).

15. Ačkoli by se pozitivní kontroly měly zkoušet ve vehikulu, o němž je známo, že vždy vyvolává shodnou reakci (např. aceton s olivovým olejem v objemovém poměru 4:1), mohou nastat určité situace, kdy je z důvodů požadovaných v právních předpisech nezbytné provést zkoušku s použitím nestandardního vehikula (klinicky/chemicky relevantní složení) (24). Pokud se souběžná pozitivní kontrola zkouší v jiném vehikulu než zkoušená látka, měla by být součástí zkoušky se souběžnou pozitivní kontrolou také samostatná kontrola s vehikulem.

16. V případech, kdy se hodnotí zkoušené látky, které patří do určité třídy chemických látek nebo vykazují určitou škálu odezev, mohou být užitečné také srovnávací látky, jelikož mohou prokázat, že zkušební metoda je schopna správně zjistit potenciál těchto druhů zkoušených látek vyvolávat senzibilizaci kůže. Vhodné srovnávací látky by měly mít tyto vlastnosti:

— strukturální a funkční podobnost s třídou, do níž patří zkoušená látka,

— známé fyzikálně-chemické vlastnosti,

— podklady ze zkoušky LLNA,

— podklady získané při použití jiných zvířecích modelů a/nebo lidí.

▼M3

ZKUŠEBNÍ POSTUP

Počet zvířat a dávkování

17. Na každou dávkovou skupinu se použijí alespoň čtyři zvířata, přičemž se použijí minimálně tři koncentrace zkoušené látky, dále se použije souběžná negativní kontrolní skupina, k jejíž expozici se použije pouze vehikulum zkoušené látky, a pozitivní kontrola (souběžná nebo z nedávné jiné zkoušky – v závislosti na postupech dané laboratoře při zohlednění odstavců 11–14). Mělo by se zvážit zkoušení většího počtu dávek pozitivní kontroly, a to zejména v případě, že se pozitivní kontrola nepoužívá soustavně. Se zvířaty v kontrolních skupinách by se s výjimkou aplikace zkoušené látky mělo zacházet stejně jako se zvířaty v exponovaných skupinách.

18. Volba dávkování a vehikula by měla být založena na doporučeních uvedených v literatuře – (3) a (5). Po sobě jdoucí dávky se běžně vybírají z vhodné řady koncentrací, například 100 %, 50 %, 25 %, 10 %, 5 %, 2,5 %, 1 %, 0,5 % atd. Volba této řady koncentrací by měla být dostatečně vědecky zdůvodněna. Při výběru tří po sobě jdoucích koncentrací je třeba zvážit veškeré existující toxikologické informace (např. o akutní toxicitě a kožní dráždivosti) a informace o struktuře a fyzikálně-chemických vlastnostech zkoušené látky (a/nebo strukturně příbuzných látek), jsou-li k dispozici, aby nejvyšší koncentrace maximalizovala expozici, aniž by současně vyvolala systémovou toxicitu a/nebo nadměrné lokální podráždění kůže (3) (25). Nejsou-li takové informace k dispozici, může být nezbytné provést úvodní předběžnou screeningovou zkoušku (viz odstavce 21–24).

19. Vehikulum by nemělo nepříznivě ovlivňovat ani jinak zkreslovat výsledky zkoušky a mělo by být vybráno tak, aby se maximalizovala rozpustnost umožňující dosáhnout nejvyšší možné koncentrace a zároveň připravit roztok nebo suspenzi, jež jsou vhodné pro aplikaci zkoušené látky. K doporučeným vehikulům patří aceton s olivovým olejem (v objemovém poměru 4:1), *N,N*-dimethylformamid, ethyl(methyl)keton, propan-1,2-diol a dimethylsulfoxid (19), avšak při dostatečném vědeckém zdůvodnění lze použít i jiná vehikula. V určitých situacích může být nezbytné použít jako doplňující kontrolu klinicky relevantní rozpouštědlo nebo komerční přípravek obsahující zkoušenou látku. Zvláště je třeba dbát na to, aby byly hydrofilní zkoušené látky zapracovány do takového vehikula, které zvlhčí kůži a nesteče ihned z pokožky. Toho lze dosáhnout použitím vhodných solubilizérů (jako je např. 1 % Pluronic® L92). Není tudíž vhodné používat zcela vodná vehikula.

20. Zpracování lymfatických uzlin z jednotlivých myší umožňuje posoudit variabilitu mezi jednotlivými zvířaty a provést statistické porovnání rozdílu mezi hodnotami zkoušené látky a hodnotami naměřenými u kontrolní skupiny se samotným vehikulem (viz odstavec 35). Kromě toho je vhodné posoudit možnost snížit počet myší v pozitivní kontrolní skupině, když se zaznamenávají údaje od jednotlivých zvířat (12). Sběr údajů od jednotlivých zvířat navíc vyžadují i některé regulační orgány. Souhrnné údaje za všechna zvířata mohou být nicméně některými regulačními orgány považovány za přijatelné, přičemž v takových situacích se mohou uživatelé rozhodnout, zda zvolí individuální nebo souhrnné údaje.

Předběžná screeningová zkouška

21. Nejsou-li k dispozici informace pro stanovení nejvyšší dávky, která má být předmětem zkoušky (viz odstavec 18), měla by se provést předběžná screeningová zkouška umožňující vymezit vhodné dávkování, které se bude metodou LLNA zkoušet. Účelem předběžné screeningové zkoušky je poskytnout vodítko pro volbu maximálního dávkování, které se má použít v hlavní studii LLNA, pokud nejsou k dispozici informace o koncentraci, která vyvolává systémovou toxicitu (viz odstavec 24) a/nebo nadměrné lokální podráždění kůže (viz odstavec 23). Maximální zkoušenou dávkou by mělo být 100 % zkoušené látky v případě kapalin, respektive maximální možná koncentrace v případě pevných látek nebo suspenzí.

▼M3

22. Předběžná screeningová zkouška se provádí za stejných podmínek jako hlavní studie LLNA až na to, že se nehodnotí proliferace buněk z lymfatických uzlin a lze použít méně zvířat na dávkovou skupinu. Navrhuje se počet jednoho až dvou zvířat na dávkovou skupinu. Všechny myši se denně pozorují, zda nevykazují klinické příznaky systémové toxicity nebo lokálního podráždění v místě aplikace. Před zahájením zkoušky a před jejím ukončením (den 6) se zaznamenají hodnoty tělesné hmotnosti zvířat. Na obou uších každé myši se sleduje výskyt erytému, který se vyhodnotí podle tabulky 1 (25). Tloušťka ucha se změří tloušťkoměrem (např. digitálním mikrometrem nebo tloušťkoměrem s kruhovou stupnicí) v den 1 (před aplikací první dávky), v den 3 (přibl. 48 hodin po první dávce) a v den 6. Kromě toho lze v den 6 určit tloušťku ucha na základě stanovení hmotnosti části ucha vyseknuté speciálními kleštěmi, což by se mělo provádět až poté, co se zvířata humánně usmrtí. Známkou nadměrného lokálního podráždění kůže je zarudnutí ohodnocené 3 nebo více body a/nebo zvýšení tloušťky ucha o 25 % nebo více v kterýkoli den měření (26) (27). Jako nejvyšší dávka se pro hlavní studii LLNA v rámci řady koncentrací zjištěných při předběžné screeningové zkoušce (viz odstavec 18) zvolí nejbližší nižší dávka, která nevyvolává systémovou toxicitu a/nebo nadměrné lokální podráždění kůže.

Tabulka 1

Bodové hodnocení erytému

Pozorované příznaky	Bodové ohodnocení
Žádný erytém	0
Velmi slabý erytém (sotva patrný)	1
Zřetelně viditelný erytém	2
Mírný až výrazný erytém	3
Těžký erytém (silné zarudnutí) nebo tvorba příškvaru znemožňující posouzení erytému	4

23. Kromě 25 % zvýšení tloušťky ucha (26) (27) se k identifikaci dráždivých látek při zkoušce LLNA používá také statisticky významné zvýšení tloušťky ucha u myší ze zkušební skupiny ve srovnání s kontrolními zvířaty (28) (29) (30) (31) (32) (33) (34). Ačkoli mohou nastat případy statisticky významného zvýšení, i když se tloušťka ucha zvýší o méně než 25 %, nebyly tyto případy spojeny výhradně s nadměrným podrážděním (30))32) (33) (34).

24. O systémové toxicitě (35) (36) mohou při použití v rámci integrovaného hodnocení svědčit tyto poznatky z klinického pozorování, a tudíž mohou indikovat maximální dávku, která by se měla použít v hlavní studii LLNA: změny fungování nervového systému (např. piloerekce, ataxie, třes a křeče), změny chování (např. agresivita, změna činností týkajících se péče o srst, výrazná změna úrovně aktivity), změny způsobů dýchání (tj. změny frekvence a intenzity dýchání, např. dušnost, lapání po dechu a chropy) a změny v přijímání potravy a vody. Při hodnocení je navíc nutno brát v úvahu známky letargie a/nebo absence reagování, veškeré klinické příznaky více než mírné nebo momentální bolesti či utrpení nebo snížení tělesné hmotnosti ode dne 1 do dne 6 o více než 5 % a také úmrtnost. Umírající zvířata nebo zvířata, která očividně trpí bolestí nebo jeví známky silného a trvalého utrpení, by se měla humánně usmrtit 37).

▼M3

Harmonogram zkoušek v rámci hlavní studie

25. Harmonogram zkoušky je následující:

— *Den 1:* Každé zvíře se zváží a zaznamená se jeho hmotnost a jakékoli poznatky z klinického pozorování. Na hřbet každého ucha se aplikuje 25 µl vhodně zředěného roztoku zkoušené látky, samotné vehikulum nebo pozitivní kontrola (tu lze provádět buď souběžně, nebo lze použít pozitivní kontrolu z nedávné jiné zkoušky – v závislosti na postupech dané laboratoře při zohlednění odstavců 11–15).

— *Den 2 a den 3:* Zopakuje se postup aplikace provedený v den 1.

— *Den 4 a den 5:* Žádná aplikace.

— *Den 6:* Zaznamená se hmotnost každého zvířete. Přes ocasní žílu se všem pokusným i kontrolním myším vpíchne 250 µl fyziologického roztoku ve fosfátovém pufru (PBS) obsahujícího 20 µCi ($7{,}4\times10^5$ Bq) [^{3}H]thymidinu (tritiovaného na methylu). Jinou možností je všem myším přes ocasní žílu vpíchnout 250 µl PBS obsahujícího 2 µCi ($7{,}4\times10^4$ Bq) [^{125}I]joddeoxyuridinu a 10^{-5} M fluordeoxyuridinu. O pět hodin (5 hod.) později se zvířata humánně usmrtí. U každého zvířete se vyjmou lymfatické uzliny drenující aurikulární oblast obou uší a zpracují se v PBS (individuální přístup) nebo se lymfatické uzliny vyjmou na obou stranách u všech myší z celé zkušební skupiny a společně se uloží do PBS (přístup založený na sdružení exponované skupiny). Podrobnosti a grafické znázornění vyhledání uzlin a jejich disekce lze nalézt v literatuře (12). Pro účely dalšího sledování lokální kožní reakce v rámci hlavní studie lze do protokolu studie zařadit i další parametry, jako je bodové ohodnocení erytému ucha nebo údaje o tloušťce ucha (získané buď pomocí tloušťkoměru, nebo na základě stanovení hmotnosti části ucha vyseknuté speciálními kleštěmi při pitvě).

Příprava buněčných suspenzí

26. Jednobuněčná suspenze obsahující buňky vyňatých lymfatických uzlin drenujících oblast obou uší a pocházejících od jednotlivých zvířat nebo od celé exponované skupiny se připraví jemnou mechanickou deagregací přes 200 µm sítko z korozivzdorné oceli nebo jiným přijatelným postupem vytvoření jednobuněčné suspenze. Buňky lymfatických uzlin se dvakrát propláchnou v dostatečném množství PBS a jejich DNA se nechá vysrážet s 5 % kyselinou trichloroctovou při 4 °C po dobu 18 hod. (3). Sediment se buď resuspenduje v 1 ml kyseliny trichloroctové a přemístí do scintilačních kyvet obsahujících 10 ml kapalného scintilátoru pro měření aktivity ^{3}H, nebo se přenese přímo do zkumavek pro měření aktivity ^{125}I.

Stanovení buněčné proliferace (inkorporované radioaktivity)

27. Inkorporace [^{3}H]thymidinu se měří β-scintilační metodou a vyjadřuje se počtem rozpadů za minutu (DPM). Inkorporace [^{125}I]joddeoxyuridinu se měří prostřednictvím aktivity ^{125}I a rovněž se vyjadřuje v DPM. V závislosti na použitém přístupu se inkorporace vyjádří v DPM na zvíře (individuální přístup) nebo v DPM na zkušební skupinu (sdružený přístup).

Redukovaná metoda LLNA

28. V určitých situacích, kdy právní předpisy vyžadují potvrzení negativní predikce potenciálu určité chemické látky senzibilizovat kůži, lze použít volitelný protokol zkoušky rLLNA (16) (17) (18) vyžadující menší počet zvířat, pokud se dodrží všechny ostatní specifikace protokolu LLNA popsané v této ZM. Před použitím metody rLLNA je nutno poskytnout jednoznačné obecné a vědecké zdůvodnění jejího použití. Pokud jsou získány pozitivní nebo nejednoznačné výsledky, může být k interpretaci nebo objasnění výsledku nezbytné provést další zkoušky.

▼M3

29. Snížení počtu dávkových skupin je jediný rozdíl mezi protokoly zkušebních metod LLNA a rLLNA, a proto zkouška rLLNA neposkytuje informace o závislosti odezvy na dávce. Proto by se metoda rLLNA neměla používat, když je nutno získat informace o závislosti odezvy na dávce. Stejně jako při vícedávkové zkoušce LLNA by měla hodnocená koncentrace látky zkoušené metodou rLLNA být maximální koncentrací, která nevyvolává zjevnou systémovou toxicitu a/nebo nadměrné lokální podráždění kůže u myší (viz odstavec 18).

ZÍSKANÉ POZNATKY

Poznatky z klinického pozorování

30. Každá myš se jednou denně pečlivě vyšetří, zda nevykazuje jakékoli klinické příznaky lokálního podráždění v místě aplikace nebo příznaky systémové toxicity. Všechny získané poznatky se systematicky zaznamenají, přičemž záznamy se vedou zvlášť za každou myš. Plány sledování by měly obsahovat kritéria umožňující rychle identifikovat myši, jež vykazují známky systémové toxicity, nadměrného lokálního podráždění pokožky nebo poleptání kůže, aby mohly být usmrceny (37).

Hodnoty tělesné hmotnosti

31. Jak je uvedeno v odstavci 25, tělesnou hmotnost jednotlivých zvířat je nutno zjistit na začátku zkoušky a v době plánovaného humánního usmrcení zvířete.

VÝPOČET VÝSLEDKŮ

32. Výsledky za každou exponovanou skupinu se vyjádří jako index stimulace (SI). Při individuálním přístupu se SI stanoví jako podíl průměrné hodnoty DPM na zvíře jak u každé exponované skupiny, tak u pozitivní kontrolní skupiny, a průměrné hodnoty DPM na zvíře u kontrolní skupiny s rozpouštědlem/vehikulem. Průměrná hodnota SI u kontrolních skupin s vehikulem je pak rovna 1. Při sdruženém přístupu se SI stanoví jako podíl sdružené inkorporované radioaktivity u jednotlivých exponovaných skupin a sdružené radioaktivity kontrolní skupiny s vehikulem; získá se tak průměrná hodnota SI.

33. Výsledek se považuje za pozitivní, když SI $\geq$ 3. Avšak při rozhodování, zda prohlásit hraniční výsledek za pozitivní, lze použít rovněž intenzitu odezvy na dávku, statistickou významnost a shodnost odezvy při použití rozpouštědla/vehikula a při použití pozitivní kontroly (4) (5) (6).

34. Je-li nezbytné objasnit získané výsledky, měla by se věnovat pozornost různým vlastnostem zkoušené látky včetně toho, zda se její struktura podobá struktuře známých senzibilizátorů kůže, zda u myší způsobuje nadměrné lokální podráždění kůže, a také povaze zjištěné závislosti odezvy na dávce. Těmito faktory a dalšími a. s.pekty, které je třeba zvážit, se podrobně zabývá literatura (7).

35. Shromažďování údajů o radioaktivitě na úrovni jednotlivých myší umožní provést statistickou analýzu, kterou se na základě těchto údajů zjistí existence a míra závislosti odezvy na dávce. Případné statistické hodnocení by mohlo obsahovat posouzení závislosti odezvy na dávce, jakož i vhodně upravená srovnání zkušebních skupin (např. skupiny s párově srovnávaným dávkováním oproti souběžné kontrolní skupině s vehikulem). Statistické analýzy mohou zahrnovat např. lineární regresi nebo Williamsovu zkoušku k posouzení trendů závislosti odezvy na dávce a Dunnettovu zkoušku pro párová srovnání. Při výběru vhodné metody pro statistickou analýzu by si měl být zkoušející vědom možných nestejných odchylek a jiných souvisejících problémů, které si mohou vyžádat transformaci údajů nebo neparametrickou statistickou analýzu. V každém případě může být nezbytné, aby zkoušející provedl výpočty SI a statistické analýzy jednak za použití určitých hodnot (někdy označovaných výrazem „odlehlé hodnoty“) a jednak bez nich.

▼M3

ÚDAJE A VYKAZOVÁNÍ

Údaje

36. Údaje by se měly shrnout do tabulky. Při použití individuálního přístupu se uvedou hodnoty DPM získané za jednotlivá zvířata, průměrná hodnota DPM na zvíře za celou skupinu, příslušný chybový výraz (např. směrodatná odchylka – SD, směrodatná odchylka průměrných hodnot – SEM) a průměrná hodnota SI za každou dávkovou skupinu oproti souběžné kontrolní skupině s vehikulem. Při použití sdruženého přístupu se uvedou průměrné/mediánové hodnoty DPM a průměrná hodnota SI za každou dávkovou skupinu ve srovnání oproti souběžné kontrolní skupině s vehikulem.

Protokol o zkoušce

37. Protokol o zkoušce musí obsahovat tyto informace:

Zkoušené a kontrolní látky:

— identifikační údaje (např. číslo CAS a číslo ES, jsou-li k dispozici, zdroj, čistota, známé nečistoty, číslo šarže),

— skupenství a fyzikálně-chemické vlastnosti (např. prchavost, stálost, rozpustnost),

— jedná-li se o směs, je nutno uvést její složení a poměrné procentuální zastoupení složek.

Rozpouštědlo/vehikulum:

— identifikační údaje (čistota, popřípadě koncentrace, použitý objem),

— zdůvodnění volby vehikula.

Pokusná zvířata:

— zdroj myší z kmene CBA,

— mikrobiologický stav zvířat, je-li znám,

— počet a věk zvířat,

— původ zvířat, podmínky chovu, strava atd.

Zkušební podmínky:

— podrobnosti o přípravě a aplikaci zkoušené látky,

— zdůvodnění volby dávkování (včetně výsledků předběžné screeningové zkoušky, pokud byla provedena),

— použité koncentrace vehikula a zkoušené látky a celkové aplikované množství zkoušené látky,

— podrobnosti o jakosti vody a potravy (včetně druhu/zdroje stravy, zdroje vody),

— podrobnosti o harmonogramech expozice a odběru vzorků,

— metody měření toxicity,

— kritéria pro označení studie za pozitivní nebo negativní,

— údaje o případných odchylkách od protokolu a vysvětlení, jakým způsobem taková odchylka ovlivňuje koncepci studie a její výsledky.

Kontrola spolehlivosti:

— souhrn výsledků nejnovější kontroly spolehlivosti včetně informací o použité zkoušené látce, koncentraci a vehikulu,

— údaje ze souběžných a/nebo dřívějších pozitivních nebo negativních kontrolních skupin zkoušených v dotyčné laboratoři,

▼M3

— pokud souběžná pozitivní kontrola nebyla součástí studie, je nutno uvést datum a laboratorní zprávu nejnovější periodické pozitivní kontroly a podrobnou zprávu s údaji z dřívějších pozitivních kontrol zkoušených v dotyčné laboratoři, které odůvodňují rozhodnutí neprovádět souběžné pozitivní kontroly.

Výsledky:

— hmotnost jednotlivých myší na počátku aplikace a v době plánovaného usmrcení, jakož i průměrná hodnota a příslušný chybový výraz (např. SD, SEM) za každou exponovanou skupinu,

— u každého zvířete časový průběh nástupu příznaků toxicity, včetně podráždění kůže v místě aplikace, pokud k němu dojde,

— tabulka hodnot DPM a hodnot SI od jednotlivých myší (individuální přístup) nebo průměrných/mediánových hodnot (sdružený přístup) za každou exponovanou skupinu,

— průměrná hodnota DPM na zvíře a příslušný chybový výraz (např. SD, SEM) za každou exponovanou skupinu a výsledky analýzy odlehlých hodnot za každou exponovanou skupinu při použití individuálního přístupu,

— vypočtená hodnota SI a příslušná míra variability, která zohledňuje variabilitu mezi jednotlivými zvířaty jak z testování zkoušené látky, tak z kontrolních skupin při použití individuálního přístupu,

— závislost odezvy na dávce,

— případné statistické analýzy.

Rozbor výsledků:

— stručný komentář k výsledkům, k analýze závislosti odezvy na dávce a k případným statistickým analýzám a dále závěr, zda se má zkoušená látka považovat za senzibilizátor kůže.

LITERATURA

(1) OECD (2002), Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay. OECD Guideline for the Testing of Chemicals No 429, Paris. K dispozici na adrese: [http://www.oecd.org/env/testguidelines].

(2) Kimber, I. and Basketter, D.A. (1992), The murine local lymph node a. s.say; collaborative studies and new directions: A commentary, *Food Chem. Toxicol*., 30, 165–169.

(3) Kimber, I., Dearman, R.J., Scholes, E.W. and Basketter, D.A. (1994), The local lymph node a. s.say: developments and applications, *Toxicol*., 93, 13–31.

(4) Kimber, I., Hilton, J., Dearman, R.J., Gerberick, G.F., Ryan, C.A., Basketter, D.A., Lea, L., House, R.V., Ladies, G.S., Loveless, S.E. and Hastings, K.L. (1998), Assessment of the skin sensitisation potential of topical medicaments using the local lymph node a. s.say: An interlaboratory exercise, *J. Toxicol. Environ. Health*, 53, 563–79.

(5) Chamberlain, M. and Basketter, D.A. (1996), The local lymph node a. s.say: status of validation, *Food Chem. Toxicol*., 34, 999–1002.

(6) Basketter, D.A., Gerberick, G.F., Kimber, I. and Loveless, S.E. (1996), The local lymph node a. s.say: A viable alternative to currently accepted skin sensitisation tests, *Food Chem. Toxicol*., 34, 985–997.

(7) Basketter, D.A., Gerberick, G.F. and Kimber, I. (1998), Strategies for identifying false positive responses in predictive sensitisation tests, *Food Chem. Toxicol*., 36, 327–33.

▼M3

(8) Van Och, F.M.M., Slob, W., De Jong, W.H., Vandebriel, R.J. and Van Loveren, H. (2000), A quantitative method for a. s.sessing the sensitising potency of low molecular weight chemicals using a local lymph node a. s.say: employment of a regression method that includes determination of uncertainty margins, *Toxicol*., 146, 49–59.

(9) Dean, J.H., Twerdok, L.E., Tice, R.R., Sailstad, D.M., Hattan, D.G., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node a. s.say: II. Conclusions and recommendations of an independent scientific peer review panel, *Reg. Toxicol. Pharmacol*, 34: 258–273.

(10) Haneke, K.E., Tice, R.R., Carson, B.L., Margolin, B.H., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node a. s.say: III. Data analyses completed by the national toxicology program interagency center for the evaluation of alternative toxicological methods, *Reg. Toxicol. Pharmacol*, 34, 274–286.

(11) Sailstad, D.M., Hattan, D., Hill, R.N., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node a. s.say: I. The ICCVAM review process, *Reg. Toxicol. Pharmacol*, 34: 249–257.

(12) ICCVAM (2009), Recommended Performance Standards: Murine Local Lymph Node Assay, NIH Publication Number 09-7357, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. K dispozici na adrese: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna-ps/LLNAPerfStds.pdf].

(13) OECD (1992), *Skin Sensitisation*. OECD Guideline for Testing of Chemicals No 406, OECD, Paris. K dispozici na adrese: [http://www.oecd.org/env/testguidelines].

(14) OECD (2005), *Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment*, Environment, Health and Safety Monograph, Series on Testing and Assessment No. 34, ENV/JM/MONO(2005)14, OECD, Paris. K dispozici na adrese: [http://www.oecd.org/env/testguidelines].

(15) Dearman, R.J., Hilton, J., Evans, P., Harvey, P., Basketter, D.A. and Kimber, I. (1998), Temporal stability of local lymph node assay responses to hexyl cinnamic aldehyde, *J. Appl. Toxicol*., 18, 281–284.

(16) Kimber, I., Dearman, R.J., Betts, C.J., Gerberick, G.F., Ryan, C.A., Kern, P.S., Patlewicz, G.Y. and Basketter, D.A. (2006), The local lymph node assay and skin sensitisation: a cut-down screen to reduce animal requirements? *Contact Dermatitis*, 54, 181–185.

(17) ESAC (2007), Statement on the Reduced Local Lymph Node Assay (rLLNA), European Commission Directorate General, Joint Research Centre, Institute for Health and Consumer Protection, European Centre for the Validation of Alternative Methods, April 2007. K dispozici na adrese: [http://ecvam.jrc.it/ft_doc/ESAC26_statement_rLLNA_20070525-1.pdf].

(18) ICCVAM (2009), The Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) Test Method Evaluation Report. The Reduced Murine Local Lymph Node Assay: An Alternative Test Method Using Fewer Animals to Assess the Allergic Contact Dermatitis Potential of Chemicals and Products, NIH Publication Number 09-6439, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. K dispozici na adrese: [http://iccvam.niehs.nih.gov/].

(19) ICCVAM (1999), The Murine Local Lymph Node Assay: A Test Method for Assessing the Allergic Contact Dermatitis Potential of Chemicals/Compounds, The Results of an Independent Peer Review Evaluation Coordinated by the Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM), NIH Publication No. 99-4494, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. K dispozici na adrese: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna/llnarep.pdf].

▼M3

(20) Kreiling, R., Hollnagel, H.M., Hareng, L., Eigler, L., Lee, M.S., Griem, P., Dreessen, B., Kleber, M., Albrecht, A., Garcia, C. and Wendel, A. (2008), Comparison of the skin sensitising potential of unsaturated compounds as assessed by the murine local lymph node assay (LLNA) and the guinea pig maximization test (GPMT), Food Chem. Toxicol., 46, 1896–1904.

(21) Basketter, D., Ball, N., Cagen, S., Carrilo, J.C., Certa, H., Eigler, D., Garcia, C., Esch, H., Graham, C., Haux, C., Kreiling, R. and Mehling, A. (2009), Application of a weight of evidence approach to assessing discordant sensitisation datasets: implications for REACH, Reg. Toxicol. Pharmacol., 55, 90–96.

(22) ICCVAM (2009), ICCVAM Test Method Evaluation Report. Assessment of the Validity of the LLNA for Testing Pesticide Formulations and Other Products, Metals, and Substances in Aqueous Solutions, NIH Publication Number 10-7512, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences, K dispozici na adrese: [http://iccvam.niehs.nih.gov/].

(23) ILAR (1996), Institute of Laboratory Animal Research (ILAR) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 7th ed. Washington, DC: National Academies Press.

(24) McGarry, H.F. (2007), The murine local lymph node assay: regulatory and potency considerations under REACH, Toxicol., 238, 71–89.

(25) OECD (2002), Acute Dermal Irritation/Corrosion. OECD Guideline for Testing of Chemicals No. 404, Paris, France. K dispozici na adrese: http://www.oecd.org/document/40/0,3343,en_2649_34377_37051368_1_1_1_1,00.html].

(26) Reeder, M.K., Broomhead, Y.L., DiDonato, L. and DeGeorge, G.L. (2007), Use of an enhanced local lymph node assay to correctly classify irritants and false positive substances, Toxicologist, 96, 235.

(27) ICCVAM (2009), Non-radioactive Murine Local Lymph Node Assay: Flow Cytometry Test Method Protocol (LLNA: BrdU-FC) Revised Draft Background Review Document, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. K dispozici na adrese: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/fcLLNA/BRDcomplete.pdf].

(28) Hayes, B.B., Gerber, P.C., Griffey, S.S. and Meade, B.J. (1998), Contact hypersensitivity to dicyclohexylcarbodiimide and diisopropylcarbodiimide in female B6C3F1 mice, Drug. Chem. Toxicol., 21, 195–206.

(29) Homey, B., von Schilling, C., Blumel, J., Schuppe, H.C., Ruzicka, T., Ahr, H.J., Lehmann, P. and Vohr, V.W. (1998), An integrated model for the differentiation of chemical-induced allergic and irritant skin reactions, *Toxicol. Appl. Pharmacol*., 153, 83–94.

(30) Woolhiser, M.R., Hayes, B.B. and Meade, B.J. (1998), A combined murine local lymph node and irritancy assay to predict sensitisation and irritancy potential of chemicals, *Toxicol. Meth*., 8, 245–256.

(31) Hayes, B.B. and Meade, B.J. (1999), Contact sensitivity to selected acrylate compounds in B6C3F1 mice: relative potency, cross reactivity, and comparison of test methods, *Drug. Chem. Toxicol*., 22, 491–506.

(32) Ehling, G., Hecht, M., Heusener, A., Huesler, J., Gamer, A.O., van Loveren, H., Maurer, T., Riecke, K., Ullmann, L., Ulrich, P., Vandebriel, R. and Vohr, H.W. (2005), A European inter-laboratory validation of alternative endpoints of the murine local lymph node assay: first round. *Toxicol*., 212, 60–68.

(33) Vohr, H.W. and Ahr, H.J. (2005), The local lymph node assay being too sensitive? *Arch. Toxicol*., 79, 721–728.

(34) Patterson, R.M., Noga, E. and Germolec, D. (2007), Lack of evidence for contact sensitisation by Pfiesteria extract, *Environ. Health Perspect*., 115, 1023–1028.

(35) OECD (1987), *Acute Dermal Toxicity*, OECD Guideline for Testing of Chemicals No 402, Paris, France. K dispozici na adrese: [http://www.oecd.org/env/testguidelines].

▼**M3**

(36) ICCVAM (2009), Report on the ICCVAM-NICEATM/ECVAM/JaCVAM Scientific Workshop on Acute Chemical Safety Testing: Advancing In Vitro Approaches and Humane Endpoints for Systemic Toxicity Evaluations. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences, K dispozici na adrese: http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/acutetox/Tox_workshop.htm].

(37) OECD (2000), Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation, Environmental Health and Safety Monograph, Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris. K dispozici na adrese: [http://www.oecd.org/env/testguidelines].

▼M3

Dodatek 1

Standardy funkčnosti k posouzení navrhovaných podobných nebo modifikovaných zkušebních metod LLNA pro zjišťování senzibilizace kůže

ÚVOD

1. Účelem standardů funkčnosti je stanovit základ, podle něhož lze určit, zda nové zkušební metody, a to jak chráněné (chráněné autorskými právy, chráněné ochrannými známkami, registrované), tak nechráněné, mají dostatečnou přesnost a spolehlivost pro konkrétní zkušební účely. Tyto standardy funkčnosti, založené na validovaných a uznávaných zkušebních metodách, lze používat k hodnocení spolehlivosti a přesnosti jiných podobných metod (hovorově označovaných jako zkoušky typu „me-too“), které jsou založeny na podobných vědeckých zásadách a měří nebo predikují tentýž biologický nebo toxický účinek (14).

2. Před přijetím modifikovaných metod (tzn. navrhovaných možných vylepšení schválené zkušební metody) je třeba provést posouzení, které určí dopad navrhovaných změn na funkčnost zkoušky a také míru, v jaké tyto změny ovlivňují údaje, jež jsou k dispozici pro další složky procesu validace. V závislosti na počtu a povaze navrhovaných změn, na výsledných údajích a podkladech pro tyto změny by měly být navrhované metody podrobeny buď témuž procesu validace, jaký je stanoven pro novou zkušební metodu, nebo případně omezenému posouzení spolehlivosti a relevantnosti za použití stávajících standardů funkčnosti (14).

3. Podobné nebo modifikované metody navržené k použití v rámci této ZM by měly být za účelem zjištění jejich spolehlivosti a přesnosti vyhodnoceny za použití chemických látek, které zastupují celou škálu výsledků zkoušky LLNA. Aby se zabránilo neoprávněnému využívání zvířat, důrazně se doporučuje, aby vývojoví pracovníci, kteří model koncipují, konzultovali příslušné orgány před zahájením validačních studií v souladu se standardy funkčnosti a pokyny uvedenými v této ZM.

4. Tyto standardy funkčnosti jsou založeny na harmonizovaných standardech funkčnosti vypracovaných výborem US-ICCVAM (USA), střediskem EC-ECVAM (EU) a střediskem JaCVAM (Japonsko) (12) pro posuzování validity podobných nebo modifikovaných verzí metody LLNA. Standardy funkčnosti jsou tvořeny zásadními složkami zkušební metody, doporučenými srovnávacími látkami a požadavky na přesnost a spolehlivost, jež by navrhovaná metoda měla splňovat nebo převyšovat.

I. **Zásadní složky zkušební metody**

5. Aby se zajistilo, že podobná nebo modifikovaná metoda LLNA je funkčně a mechanicky analogická s metodou LLNA a měří tentýž biologický účinek, měl by protokol zkušební metody obsahovat tyto složky:

— zkoušená látka se myši aplikuje lokálně na obě uši,

— proliferace lymfocytů by se měla měřit v lymfatických uzlinách drenujících místo aplikace zkoušené látky,

— proliferace lymfocytů by se měla měřit během indukční fáze senzibilizace kůže,

▼M3

— u zkoušených látek by se měla nejvyšší zvolená dávka rovnat maximální koncentraci, která nevyvolává systémovou toxicitu a/nebo nadměrné lokální podráždění kůže u myší. U pozitivních srovnávacích látek by měla být nejvyšší dávka alespoň tak vysoká jako hodnoty EC3 odpovídající srovnávací látky pro metodu LLNA (viz tabulka 1), aniž by vyvolala systémovou toxicitu a/nebo nadměrné lokální podráždění kůže u myší,

— v každé studii by měly být zahrnuty souběžné kontroly s vehikulem a případně by se měla použít také souběžná pozitivní kontrola,

— na každou dávkovou skupinu by se měla použít alespoň čtyři zvířata,

— lze shromažďovat údaje za jednotlivá zvířata nebo souhrnné údaje.

Není-li některé z těchto kritérií splněno, potom nelze tyto standardy funkčnosti k validaci podobné nebo modifikované metody použít.

II. **Minimální seznam srovnávacích látek**

6. Harmonizované standardy funkčnosti vypracované výborem US-ICCVAM (USA), střediskem EC-ECVAM (EU) a střediskem JaCVAM (Japonsko) (12) uvádějí 18 minimálních srovnávacích látek, které by se měly používat, a čtyři volitelné srovnávací látky (tzn. látky, které v rámci metody LLNA poskytují buď falešně pozitivní nebo falešně negativní výsledky ve srovnání s výsledky zkoušek na lidech a na morčatech (podle kapitoly B.6 nebo zkušební metodiky OECD č. 406) (13), a proto umožňují prokázat stejnou nebo lepší funkčnost než metoda LLNA) uvedené ve standardech funkčnosti pro metodu LLNA. Kritéria výběru pro určení těchto chemických látek byla následující:

— srovnávací látky uvedené v seznamu zastupovaly druhy látek, u nichž se zpravidla zjišťuje jejich potenciál způsobovat senzibilizaci kůže a řadu reakcí, které lze měřit nebo predikovat pomocí metody LLNA,

— látky měly jasně definovanou chemickou strukturu,

— pro každou látku byly k dispozici údaje ze zkoušek na morčatech za použití metody LLNA (tzn. podle kapitoly B.6 nebo zkušební metodiky OECD č. 406) (13) a (pokud možno) údaje ze zkoušek na lidech a

— látky byly snadno dostupné z komerčního zdroje.

Doporučené srovnávací látky jsou uvedeny v tabulce 1. Studie za použití navrhovaných srovnávacích látek by se měly hodnotit ve vehikulu, s nímž jsou uvedeny v tabulce 1. V situacích, kdy některá uvedená látka nemusí být k dispozici, lze při odpovídající zdůvodnění použít jiné látky, které splňují uvedená kritéria výběru.

▼M3

Tabulka 1

Doporučené Srovnávací látky pro standardy FUNKčnosti k metodě LLNA

Číslo	Chemické látky (1)	Číslo CAS	Skup.	Veh. (2)	EC3 (v %) (3)	N (4)	0,5x – 2,0x EC3	Skut. rozsah EC3	LLNA vs. M	LLNA vs. L
1	5-chlor-2-methyl-4-isothiazolin-3-on (CMI)/2-methyl-4-isothiazolin-3-on (MI) (5)	26172-55-4/ 2682-20-4	kap.	DMF	0,009	1	0,0045–0,018	NC	+/+	+/+
2	DNCB	97-00-7	pev.	AOO	0,049	15	0,025–0,099	0,02–0,094	+/+	+/+
3	benzen-1,4-diamin	106-50-3	pev.	AOO	0,11	6	0,055–0,22	0,07–0,16	+/+	+/+
4	chlorid kobaltnatý	7646-79-9	pev.	DMSO	0,6	2	0,3–1,2	0,4–0,8	+/+	+/+
5	isoeugenol	97-54-1	kap.	AOO	1,5	47	0,77–3,1	0,5–3,3	+/+	+/+
6	2-sulfanylbenzothiazol	149-30-4	pev.	DMF	1,7	1	0,85–3,4	NC	+/+	+/+
7	citral	5392-40-5	kap.	AOO	9,2	6	4,6–18,3	5,1–13	+/+	+/+
8	HCA	101-86-0	kap.	AOO	9,7	21	4,8–19,5	4,4–14,7	+/+	+/+
9	eugenol	97-53-0	kap.	AOO	10,1	11	5,05–20,2	4,9–15	+/+	+/+
10	fenyl-benzoát	93-99-2	pev.	AOO	13,6	3	6,8–27,2	1,2–20	+/+	+/+
11	3-fenyl-propan-2-ol	104-54-1	pev.	AOO	21	1	10,5–42	NC	+/+	+/+
12	imidazolidinyl močovina	39236-46-9	pev.	DMF	24	1	12–48	NC	+/+	+/+
13	methyl-methakrylát	80-62-6	kap.	AOO	90	1	45–100	NC	+/+	+/+
14	chlorbenzen	108-90-7	kap.	AOO	25	1	NA	NA	–/–	–/ (*)
15	propan-2-ol	67-63-0	kap.	AOO	50	1	NA	NA	–/–	–/+

▼M3

Číslo	Chemické látky (1)	Číslo CAS	Skup.	Veh. (2)	EC3 (v %) (3)	N (4)	0,5x – 2,0x EC3	Skut. rozsah EC3	LLNA vs. M	LLNA vs. L
16	kyselina mléčná	50-21-5	kap.	DMSO	25	1	NA	NA	–/–	–/ (*)
17	methyl-salicylát	119-36-8	kap.	AOO	20	9	NA	NA	–/–	–/–
18	kyselina salicylová	69-72-7	pev.	AOO	25	1	NA	NA	–/–	–/–
Volitelné látky k prokázání lepší funkčnosti oproti metodě LLNA										
19	dodecyl sulfát sodný	151-21-3	pev.	DMF	8,1	5	4,05–16,2	1.5–17.1	+/–	+/–
20	ethylenglykol-dimethakrylát	97-90-5	kap.	MEK	28	1	14–56	NC	+/–	+/+
21	xylen	1330-20-7	kap.	AOO	95,8	1	47,9–100	NC	+/ (**)	+/–
22	chlorid nikelnatý	7718-54-9	pev.	DMSO	5	2	NA	NA	–/+	–/+

Zkratky: AOO = aceton s olivovým olejem (v objemovém poměru 4:1); Číslo CAS = Registrační číslo Chemical Abstracts Service; DMF = *N,N*-dimethylformamid; DMSO = dimethylsulfoxid; DNCB = 2,4-dinitrochlorbenzen; EC3 = odhadovaná koncentrace potřebná k dosažení hodnoty 3 indexu stimulace; HCA = 2-benzylidenoktanal; kap. = kapalina; LLNA = výsledek zkoušky s vyšetřením lokálních lymfatických uzlin myší (tzn. podle kapitoly B.6 nebo zkušební metodiky OECD č. 429) (2); M = výsledek zkoušky na morčatech (tzn. podle kapitoly B.6 nebo zkušební metodiky OECD č. 406) (13); MEK = ethyl(methyl)keton; NA = nelze použít, neboť index stimulace je menší než 3; NC = nevypočítává se, protože údaje byly získány z jediné studie; pev. = pevná látka; Skup. = skupenství; Veh. = zkušební vehikulum.

(*) Předpokládá se, že nezpůsobuje senzibilizaci u lidí, protože nebyly zjištěny žádné klinické výsledky náplasťového testu, není obsažen v sadě zkoušených náplasťových alergenů a nebyly zjištěny žádné případové zprávy o senzibilizaci u lidí.

(**) Výsledky zkoušek na morčatech nejsou k dispozici.

(1) Chemické látky by se měly připravovat každý den čerstvé, pokud údaje o stálosti neprokazují přijatelnost jejich skladování.

(2) Vzhledem k tomu, že různá vehikula mohou nepříznivě ovlivňovat funkčnost metody LLNA, by se mělo pro každou srovnávací látku používat doporučené vehikulum (24) (32).

(3) Průměrná hodnota, pokud byla k dispozici více než jedna hodnota EC3. U látek s negativním výsledkem (tzn. jejichž hodnota indexu stimulace je menší než 3; je uvedena nejvyšší zkoušená koncentrace).

(4) Počet studií LLNA, ze kterých byly získány příslušné údaje.

(5) Dostupný na trhu pod názvem Kathon CG (číslo CAS 55965-84-9), což je směs CMI a MI v poměru 3:1. Relativní koncentrace každé složky se pohybují v rozsahu od 1,1 % do 1,25 % (CMI), respektive od 0,3 % do 0,45 % (MI). Neaktivními složkami jsou hořečnaté soli (21,5 % až 24 %) a dusičnan měďnatý (0,15 % až 0,17 %), přičemž zbytek je tvořen 74 % až 77 % vody. Přípravek Kathon CG je snadno dostupný od společností Sigma-Aldrich a Rohm & Haas (nyní Dow Chemical Corporation).

▼M3

III. **Definované požadavky na spolehlivost a přesnost**

7. Přesnost podobné nebo modifikované metody LLNA by při vyhodnocení za pomoci 18 minimálních srovnávacích látek, které se mají používat, měla být stejná nebo vyšší, než je uvedeno ve standardech funkčnosti metody LLNA. Nová nebo modifikovaná metoda by měla vést ke správnému zatřídění zkoušené látky na základě rozhodnutí typu „ano/ne“. Je však možné, že za použití nové nebo modifikované metody nebudou správně zatříděny všechny minimální srovnávací látky, které by se měly používat. Pokud by byla například chybně zatříděna jedna ze slabě senzibilizujících látek, je možno zvážit zdůvodnění chybného zatřídění a vhodné doplňující údaje (např. výsledky zkoušek, které zajišťují správné zatřídění jiných látek s fyzikálními, chemickými a senzibilizujícími vlastnostmi podobnými vlastnostem chybně zatříděné srovnávací látky) k prokázání odpovídající funkčnosti dotyčné metody. Za takových okolností by se stav validace nové nebo modifikované zkušební metody LLNA posuzoval případ od případu.

Vnitrolaboratorní reprodukovatelnost

8. Za účelem zjištění vnitrolaboratorní reprodukovatelnosti by se měla nová nebo modifikovaná metoda LLNA posoudit za použití senzibilizující látky, jejíž charakteristiky při zkoušce LLNA jsou dobře popsány. Proto jsou standardy funkčnosti metody LLNA založeny na variabilitě výsledků z opakovaných zkoušek 2-benzylidenoktanalu (HCA). Pro posouzení vnitrolaboratorní spolehlivosti je nutno odvodit hodnoty odhadované prahové koncentrace (ECt) pro HCA při čtyřech různých příležitostech s prodlevou alespoň jednoho týdne mezi jednotlivými zkouškami. Přijatelnou vnitrolaboratorní reprodukovatelnost indikuje schopnost laboratoře získat v každé zkoušce HCA hodnoty ECt v rozmezí od 5 % do 20 %, což představuje rozsah poloviny až dvojnásobku průměrné hodnoty EC3 stanovené pro HCA (10 %) při použití metody LLNA (viz tabulka 1).

Mezilaboratorní reprodukovatelnost

9. Mezilaboratorní reprodukovatelnost nové nebo modifikované metody LLNA by se měla posoudit za použití dvou senzibilizujících látek, jejichž charakteristiky při zkoušce LLNA jsou dobře popsány. Standardy funkčnosti metody LLNA jsou založeny na variabilitě výsledků zkoušek HCA a 1-chlor-2,4-dinitrochlorbenzenu (DNCB) v různých laboratořích. Hodnoty ECt by měly být odvozeny nezávisle na základě jedné studie provedené nejméně ve třech různých laboratořích. Aby byla prokázána přijatelná mezilaboratorní reprodukovatelnost, měla by každá laboratoř získat hodnoty ECt v rozsahu od 5 % do 20 % pro HCA a v rozsahu od 0,025 % do 0,1 % pro DNCB, což představuje rozsah poloviny až dvojnásobku průměrné hodnoty koncentrací EC3 stanovené pro HCA (10 %) a DNCB (0,05 %), při použití metody LLNA (viz tabulka 1).

▼M3

Dodatek 2

Definice

Přesnost: Blízkost shody mezi výsledky zkušební metody a uznávanými referenčními hodnotami. Je to míra funkčnosti zkušební metody a jeden z aspektů její relevantnosti. Tento výraz se často používá namísto výrazu „soulad“ a rozumí se jím podíl správných výsledků zkušební metody (14).

Srovnávací látka: Senzibilizující nebo nesenzibilizující látka použitá jako standard pro srovnání se zkoušenou látkou. Srovnávací látka by měla mít tyto vlastnosti: i) konzistentní a spolehlivý zdroj (konzistentní a spolehlivé zdroje); ii) strukturální a funkční podobnost s třídou zkoušených látek; iii) známé fyzikálně-chemické vlastnosti; iv) podklady o známých účincích a v) známá účinnost v rozsahu žádoucí odezvy.

Odhadovaná prahová koncentrace (ECt): Odhadovaná koncentrace zkoušené látky potřebná pro dosažení takové hodnoty indexu stimulace, která svědčí o pozitivní odezvě.

Odhadovaná koncentrace tři (EC3): Odhadovaná koncentrace zkoušené látky potřebné pro dosažení hodnoty tři indexu stimulace.

Falešně negativní: Zkoušená látka je zkušební metodou nesprávně označena za negativní nebo neaktivní, ačkoli ve skutečnosti je pozitivní nebo aktivní.

Falešně pozitivní: Zkoušená látka je zkušební metodou nesprávně označena za pozitivní nebo aktivní, ačkoli ve skutečnosti je negativní nebo neaktivní.

Nebezpečnost: Potenciál látky působit nepříznivě na zdraví nebo životní prostředí. Nepříznivý účinek se projevuje pouze při dostatečné úrovni expozice.

Mezilaboratorní reprodukovatelnost: Míra, v jaké mohou různé kvalifikované laboratoře za použití stejného protokolu a při testování stejných zkoušených látek získat kvalitativně a kvantitativně podobné výsledky. Mezilaboratorní reprodukovatelnost se určuje během předvalidačních a validačních postupů a ukazuje, do jaké míry lze zkoušku úspěšně přenášet mezi různými laboratořemi (14).

Vnitrolaboratorní reprodukovatelnost: Určení míry, v jaké může kvalifikovaný personál ve stejné laboratoři jindy úspěšně dosáhnout stejných výsledků za použití určitého protokolu.

Zkouška typu „me-too“: Hovorový výraz pro zkušební metodu, která je strukturálně a funkčně podobná validované a uznávané referenční zkušební metodě. Taková zkušební metoda by byla kandidátem pro dodatečnou validaci. Používá se namísto podobné zkušební metody (14).

Odlehlá hodnota: Odlehlá hodnota je poznatek, který se výrazně liší od ostatních hodnot v náhodném vzorku od celé populace.

Standardy funkčnosti: Standardy založené na validované referenční metodě, které slouží jako základ pro hodnocení srovnatelnosti navrhované zkušební metody, která je funkčně a mechanicky podobná. Patří mezi ně i) zásadní složky zkušební metody, i) minimální seznam srovnávacích látek vybraných z chemických látek používaných k prokázání přijatelné funkčnosti validované referenční metody a iii) srovnatelné hladiny přesnosti a spolehlivosti založené na hodnotách získaných u validované referenční metody, jež by navrhovaná zkušební metoda měla prokázat při vyhodnocení za použití minimálního seznamu srovnávacích látek (14).

Chráněná zkušební metoda: Zkušební metoda, u níž je výroba a distribuce omezena patenty, autorskými právy, ochrannými známkami apod.

▼**M3**

Prokazování kvality: Řídicí proces, v jehož rámci se hodnotí dodržování zkušebních norem a standardů laboratoře, příslušných požadavků a postupů vedení záznamů, jakož i přesnost přenosu údajů, přičemž tyto prvky jsou hodnoceny osobami, které jsou nezávislé na pracovnících, kteří zkoušky provádějí.

Srovnávací látky: Chemické látky zvolené k použití při procesu validace, pro něž jsou již známy odezvy v rámci zkušebního systému *in vitro* nebo *in vivo* nebo odezvy u biologického druhu, který je předmětem zájmu daného zkoumání. Tyto chemické látky by měly být reprezentativními zástupci tříd chemických látek, u nichž se předpokládá používání dotyčné zkušební metody, a měly by představovat celou škálu reakcí, jež lze očekávat u chemických látek, pro něž se může zkušební metoda používat, od silné přes slabou až po negativní odezvu. Pro jednotlivé fáze procesu validace a pro různé zkušební metody a různá použití zkoušek mohou být potřebné rozdílné sady srovnávacích látek (14).

Relevantnost: Popis vztahu zkoušky k účinku, který je předmětem zájmu, a také toho, zda je zkouška smysluplná a použitelná pro konkrétní účel. Vyjadřuje, do jaké míry zkouška správně měří nebo predikuje biologický účinek, který je předmětem zájmu. Relevantnost zahrnuje také posouzení přesnosti (shody) zkušební metody (14).

Spolehlivost: Míra, v jaké lze zkušební metodu provádět reprodukovatelně v rámci téže laboratoře i v rámci různých laboratoří v průběhu doby, jestliže se provádí za použití stejného protokolu. Hodnotí se na základě výpočtu vnitrolaboratorní a mezilaboratorní reprodukovatelnosti (14).

Senzibilizace kůže: Imunologický proces, který nastává, když je vnímavá osoba vystavena místně aplikovanému chemickému alergenu, který vyvolává kožní imunitní odezvu, jež může vést ke vzniku kontaktní senzibilizace.

Index stimulace (SI): Hodnota vypočtená za účelem posouzení potenciálu zkoušené látky vyvolat senzibilizaci kůže. Vyjadřuje poměr hodnoty proliferace u exponovaných skupin k hodnotě proliferace u souběžné kontrolní skupiny s vehikulem.

Zkoušená látka: Jakákoli látka nebo směs, která se zkouší za použití této zkušební metody.

Validovaná zkušební metoda: Zkušební metoda, u níž byly provedeny validační studie k určení její relevantnosti (včetně přesnosti) a spolehlivosti pro konkrétní účel. Je důležité si uvědomit, že validovaná zkušební metoda nemusí mít dostatečnou funkčnost, pokud jde o přesnost a spolehlivost, aby mohla být shledána přijatelnou pro navrhovaný účel (14).

▼B

B.43 ZKOUŠKA NEUROTOXICITY NA HLODAVCÍCH

1. METODA

Tato metoda je rovnocenná metodě OECD TG 424 (1997).

Tato zkušební metoda byla navržena za účelem získání informací, které jsou nezbytné ke schválení nebo k další charakterizaci potenciální neurotoxicity chemických látek u dospělých zvířat. Tuto metodu lze buď kombinovat s již existujícími zkušebními metodami pro studium toxicity po opakovaných dávkách, nebo ji lze provést jako samostatnou zkoušku. Pro usnadnění plánování studií založených na této zkušební metodě se doporučuje prostudovat Doporučení OECD o strategiích a metodách zkoušení neurotoxicity (Neurotoxicity Testing Strategies and Methods) (1). To je zvláště důležité tehdy, je-li třeba zvážit změnu sledování a zkušebních postupů, jak jsou doporučeny pro rutinní používání této metody. Doporučení byla připravena pro usnadnění výběru zkušebních postupů pro specifické podmínky použití.

Posouzení vývojové neurotoxicity není předmětem této metody.

1.1 ÚVOD

Při posuzování a vyhodnocování toxických vlastností chemických látek je velmi důležité zvážit potenciál neurotoxických účinků. Již metoda zkoušení systémové toxicity po opakovaných dávkách zahrnuje sledování, která mají odkrýt potenciální neurotoxicitu. Tuto zkušební metodu lze používat při plánování studie za účelem získání dalších informací o neurotoxických účincích zjištěných při studii systémové toxicity po opakovaných dávkách, nebo pro jejich potvrzení. Z úvah o potenciální neurotoxicitě určitých druhů chemických látek však může vyplynout, že by mohly být vhodněji posouzeny pomocí této metody, pokud neexistují údaje o potenciální neurotoxicitě ze studií systémové toxicity po opakovaných dávkách. Tyto úvahy zahrnují například:

— pozorování neurologických příznaků nebo neuropatologických lézí v jiných studiích toxicity než studiích systémové toxicity po opakovaných dávkách, nebo

— strukturní podobnost nebo jiné informace, které posuzovanou látku spojují se známými neurotoxickými látkami.

Kromě toho mohou existovat i další případy, kdy je použití této metody vhodné; další podrobnosti jsou uvedeny v literatuře (1).

Tato metoda byla navržena tak, aby ji bylo možné přizpůsobit zvláštním potřebám při potvrzování specifické histopatologické a behaviorální neurotoxicity chemických látek a při charakterizaci a kvantifikaci neurotoxických účinků.

▼B

Dříve se za neurotoxicitu považovaly neuropatie zahrnující neuropatologické léze nebo neurologické dysfunkce, jako např. záchvaty, ochrnutí nebo třes. I když jsou neuropatie významným projevem neurotoxicity, dnes je již jasné, že existují mnohé další příznaky toxicity pro nervový systém (např. ztráta motorické koordinace, senzorické výpadky, poruchy učení a paměti), které se nemusí projevovat ani neuropatií, ani v jiných typech zkoušek.

Tato metoda zkoušení neurotoxicity je navržena tak, aby odhalovala závažné neurobehaviorální a neuropatologické účinky na dospělé hlodavce. Zatímco behaviorální účinky i při nepřítomnosti morfologických změn mohou odrážet nepříznivý vliv na organismus, neznamená to, že všechny behaviorální změny jsou specifické pro nervový systém. Z tohoto důvodu by se měly jakékoliv zjištěné změny vyhodnotit v souvislosti s histopatologickými, hematologickými nebo biochemickými údaji, jakož i s údaji o ostatních typech systémové nervové toxicity. Zkoušení požadované v této metodě za účelem charakterizace a kvantifikace neurotoxických odpovědí zahrnuje specifické histopatologické a behaviorální postupy, které lze navíc podpořit elektrofyziologickým a/nebo biochemickým vyšetřením (1, 2, 3, 4).

Neurotoxické látky mohou působit na množství cílových struktur v rámci nervového systému a prostřednictvím různých mechanismů. Protože neexistuje jediná sada zkoušek pro posouzení neurotoxického potenciálu u všech látek, může být nezbytné využít dalších zkoušek *in vivo* nebo *in vitro*, které jsou specifické pro typ pozorované nebo očekávané neurotoxicity.

Tuto zkušební metodu lze použít také společně s doporučeními OECD o strategiích a metodách testování neurotoxicity (OECD Guidance Document on Neurotoxicity Testing Strategies and Methods) (1) při plánování zkoušek určených k další charakterizaci nebo zvýšení citlivosti kvantifikace vztahu dávka-odezva s cílem lépe odhadnout úroveň nevyvolávající pozorovatelné nepříznivé účinky, anebo potvrdit známá nebo očekávaná rizika chemických látek. Lze například navrhnout zkoušky, které by identifikovaly a zhodnotily neurotoxický mechanismus (neurotoxické mechanismy) nebo doplnily údaje, které již byly získány základními neurobehaviorálními a neuropatologickými vyšetřovacími postupy. Takové studie nemusí replikovat údaje použitím standardních postupů doporučených v této metodě, jsou-li takové údaje již k dispozici a nepovažují se za nezbytné k interpretaci výsledků z této studie.

Používá-li se tato zkouška neurotoxicity samotná nebo v kombinaci, poskytuje informace, které mohou:

— určit, zda zkoušené chemické látky ovlivňují nervový systém trvale, nebo vratně,

— přispět k charakterizaci změn nervového systému spojených s expozicí chemické látce a přispět k pochopení mechanismů účinku,

▼B

— stanovit vztahy mezi dávkou a odezvou a časem a odezvou s cílem odhadnout úroveň nevyvolávající pozorovatelné nepříznivé účinky (NOAEL) (kterou lze použít pro vytvoření bezpečnostních kritérií pro chemickou látku).

Tato zkušební metoda používá orální aplikaci zkušební látky. Jiné typy aplikace (např. kožní nebo inhalační) mohou být vhodnější a mohou si také vyžádat modifikaci doporučovaných postupů. Výběr způsobu aplikace závisí na způsobu expozice člověka a na dostupných toxikologických nebo kinetických informacích.

1.2 DEFINICE

Nepříznivý účinek: jakákoliv změna spojená s aplikací, která snižuje schopnost organismu přežít, rozmnožovat se nebo přizpůsobit prostředí.

Dávka: množství podané zkoušené látky. Dávka se vyjadřuje jako hmotnost zkoušené látky (v gramech nebo miligramech) nebo jako hmotnost zkoušené látky na jednotku hmotnosti pokusného zvířete (např. v miligramech na kilogram tělesné hmotnosti) nebo jako konstantní koncentrace v potravě (v ppm nebo v miligramech na kilogram potravy).

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

Neurotoxicita: nepříznivá změna struktury nebo funkce nervového systému, která je výsledkem expozice chemickému, biologickému nebo fyzikálnímu činiteli.

Neurotoxické agens: jakýkoliv chemický, biologický nebo fyzikální činitel, který má neurotoxický potenciál.

NOAEL: zkratka pro hladinu bez pozorovaného nepříznivého účinku; odpovídá nejvyšší úrovni dávky nebo expozice, při které nejsou pozorovány žádné nepříznivé nálezy související s podáním látky.

1.3 PRINCIP ZKUŠEBNÍ METODY

Zkoušená chemická látka se podává orálně v různých dávkách několika skupinám laboratorních hlodavců. Obvykle se vyžaduje podávání opakovaných dávek a dávkovací režim může být buď 28denní, nebo subchronický (90 dnů), nebo chronický (1 rok nebo déle). Postupy stanovené v této zkušební metodě lze použít i při studii akutní neurotoxicity. Zvířata jsou testována za účelem zjištění nebo charakterizace behaviorálních a/nebo neurologických odchylek. Během každého pozorovacího období se hodnotí řada znaků chování, které by mohly být ovlivněny neurotoxickými látkami. Na konci zkoušky se u podskupiny zvířat obou pohlaví z každé skupiny provede perfuze *in situ* a připraví se a vyšetří řezy mozku, míchy a periferních nervů.

Pokud se zkouška provádí jako samostatná zkouška pro vyšetření neurotoxicity nebo charakterizaci neurotoxických účinků, lze zvířata z každé skupiny, která nebyla použita k perfuzi a k následnému histopatologickému vyšetření (viz tabulka 1), použít ke specifickým neurobehaviorálním, neuropatologickými, neurochemickým nebo elektrofyziologickým vyšetřením, která mohou doplnit údaje získané ze standardních vyšetření vyžadovaných v této metodě (1). Tyto doplňující postupy mohou být zvláště užitečné tehdy, jestliže empirická pozorování nebo předpokládané účinky naznačují specifický typ nebo cílovou strukturu neurotoxicity chemické látky. Zbývající zvířata lze případně použít k některým jiným hodnocením, jako jsou např. hodnocení požadovaná ve zkušebních metodách u studií toxicity po opakovaných dávkách na hlodavcích.

▼B

Pokud se postupy této zkušební metody kombinují s postupy jiných zkušebních metod, je nezbytný dostatečný počet zvířat, aby byly splněny požadavky pro pozorování v obou studiích.

1.4 POPIS ZKUŠEBNÍ METODY

1.4.1 **Výběr živočišných druhů**

Upřednostňovaným druhem hlodavce je potkan, s odpovídajícím zdůvodnění lze použít i jiné druhy hlodavců. Mělo by se jednat o běžně používané laboratorní kmeny mladých zdravých dospělých zvířat. Samice musí být nullipary a nesmí být březí. Podávání látky by mělo začít co nejdříve po odstavení, nejlépe když zvířata dosáhnou stáří šesti týdnů a v každém případě dříve, než dosáhnou stáří devíti týdnů. Pokud se však tato zkouška kombinuje s dalšími zkouškami, je možné, že požadavky týkající se stáří zvířat budou vyžadovat určité změny. Na začátku studie by měl být u používaných zvířat jen minimální rozptyl hmotnosti a neměl by překročit 20 % průměrné hmotnosti u jednotlivých pohlaví. Pokud se před dlouhodobou studií provádí orientační krátkodobá studie toxicity po opakovaných dávkách, je třeba u obou studií použít pokusná zvířata ze stejných kmenů a stejného zdroje.

1.4.2 **Podmínky chovu a krmení**

Teplota v místnosti pro pokusná zvířata by měla být 22 ^{o}C (± 3 ^{o}C), relativní vlhkost vzduchu by měla být minimálně 30 % a pokud možno nepřesáhnout 70 %, kromě doby úklidu místnosti, cílem by měla být hodnota 50–60 %. Osvětlení bude umělé se střídáním 12 hodin světla a 12 hodin tmy. Ke krmení lze použít konvenční laboratorní stravu s neomezenou dodávkou pitné vody. Na výběr stravy může mít vliv nutnost zajistit vhodnou přísadu pro zkoušenou látku, je-li látka podávána touto metodou. Zvířata lze chovat jednotlivě, anebo je lze umístit v klecích v malých skupinkách zvířat stejného pohlaví.

1.4.3 **Příprava zvířat**

Zdravá mladá zvířata jsou náhodně rozdělena do experimentálních a kontrolních skupin. Klece by měly být uspořádány tak, aby byl vliv umístění klecí minimalizován. Jednotlivá zvířata se jednoznačně identifikují a umístí se do klecí nejméně pět dnů před začátkem studie, aby si mohla zvyknout na laboratorní podmínky.

1.4.4 **Způsob aplikace a příprava dávek**

V této zkušební metodě se jedná konkrétně o orální způsob aplikace zkoušené látky. Orální aplikaci lze provádět prostřednictvím žaludeční sondy, potravy, pitné vody nebo tobolek. Použít lze i jiné způsoby aplikace (např. kožní nebo inhalační), které si mohou vyžádat modifikaci doporučených postupů. Výběr způsobu aplikace závisí na způsobu expozice člověka a na dostupných toxikologických nebo kinetických informacích. Je třeba uvést důvody pro výběr způsobu aplikace a odpovídající modifikace postupů v rámci této zkušební metody.

▼B

Zkoušená látka se podle potřeby rozpustí nebo suspenduje ve vhodném vehikulu. Je-li to možné, doporučuje se zvážit použití vodného roztoku/suspense, potom použití roztoku/emulze v oleji (např. v kukuřičném oleji) a nakonec roztoku/suspenze v jiném vehikulu. Je třeba znát toxické vlastnosti vehikula. Kromě toho je třeba věnovat pozornost následujícím typickým znakům vehikula: účinku na absorpci, distribuci, metabolismus nebo retenci zkoušené látky a dále účinku na chemické vlastnosti zkoušené látky, které mohou pozměnit její toxické charakteristiky, a účinku na spotřebu potravy nebo vody anebo nutriční stav zvířat.

1.5 POSTUPY

1.5.1 **Počet a pohlaví zvířat**

Pokud se studie provádí jako samostatná studie, je třeba použít v každé dávkové a kontrolní skupině alespoň 20 zvířat (10 samic a 10 samců) pro vyhodnocení podrobných klinických a funkčních pozorování. Alespoň u pěti samců a pěti samic vybraných z těchto deseti samců a samic je třeba na konci zkoušky provést perfúzi *in situ* a použít je k podrobnému neurohistopatologickému vyšetření.V případě, kdy jsou v dané dávkové skupině pozorovány příznaky neurotoxických účinků pouze u omezeného počtu zvířat, je třeba zvážit přiřazení těchto zvířat ke zvířatům vybraným pro perfúzi. Pokud se studie provádí v kombinaci se studií toxicity po opakovaných dávkách, je třeba použít odpovídající počet zvířat, aby bylo možné splnit cíle obou studií. Minimální počet zvířat na skupinu u nejrůznějších kombinací studií je uveden v tabulce 1. Pokud se plánuje utracení ve vložených intervalech nebo vytvoření reparační skupiny ke sledování vratných účinků, perzistence nebo zpožděného výskytu toxických účinků po skončení aplikace, nebo se zvažují dodatečná sledování, je třeba zvýšit počet zvířat, aby se zajistil dostatečný počet zvířat požadovaných ke sledování a k histopatologickému vyšetření.

1.5.2 **Experimentální a kontrolní skupina**

Obecně by měly být použity nejméně tři experimentální a jedna kontrolní skupina; pokud se však podle jiných údajů neočekávají žádné účinky po opakovaných dávkách 1 000 mg/kg tělesné hmotnosti na den, může být provedena limitní zkouška. Nejsou-li k dispozici žádné vhodné údaje, může být provedena předběžná studie pro stanovení rozpětí dávek, které mají být použity. S výjimkou aplikace zkoušené látky je třeba se zvířaty v kontrolní skupině zacházet stejným způsobem jako se zvířaty v experimentální skupině. Pokud se při podávání zkoušené látky používá vehikulum, podává se kontrolní skupině v nejvyšším použitém objemu.

1.5.3 **Kontrola spolehlivosti**

Laboratoř provádějící zkoušku by měla předložit údaje prokazující její způsobilost pro uskutečnění zkoušky a citlivost používaných postupů. Takové údaje by měly poskytnout důkaz o schopnosti odhalit a popřípadě kvantifikovat změny v různých ukazatelích doporučených ke sledování, jako jsou např. vegetativní příznaky, reaktivita na smyslové podněty, síla úchopu a motorická aktivita. Informace o chemických látkách, které způsobují různé typy neurotoxických reakcí a které jsou vhodné jako pozitivní kontrolní látky, lze nalézt v literatuře (2 až 9). Historické údaje lze použít tehdy, pokud zůstanou stejné základní aspekty experimentálních postupů. Doporučuje se pravidelná aktualizace historických údajů. Nové kontrolní údaje by měly být doplněny tehdy, pokud provádějící laboratoř v průběhu zkoušky změní některý základní prvek provádění zkoušky nebo postupu.

▼B

1.5.4 **Výběr dávky**

Úrovně dávek je třeba vybrat s ohledem na předchozí zjištěnou toxicitu a kinetické údaje dostupné pro zkoušenou sloučeninu nebo podobné látky. Nejvyšší úroveň dávky se zvolí tak, aby vyvolala neurotoxické nebo jasné systémové toxické účinky, aby bylo možné prokázat závislost odpovědi na dávkách a úroveň dávky bez pozorovatelného nepříznivého účinku (NOAEL), zvolí se sestupná posloupnost úrovní dávek. V zásadě je třeba stanovit úrovně dávek tak, aby bylo možné odlišit primární toxické účinky na nervový systém od systémové toxicity. Obvykle jsou optimální dva až tři intervaly a často je vhodnější přidání čtvrté zkušební skupiny než používání velkých intervalů mezi jednotlivými dávkami (např. lišících se faktorem 10). Rovněž je třeba vzít v úvahu i odhad úrovně expozice u člověka, je-li k dispozici.

1.5.5 **Limitní zkouška**

Pokud zkouška provedená podle postupů popsaných v této studii při jedné dávce nejméně 1 000 mg/kg tělesné hmotnosti na den nevyvolá pozorovatelné neurotoxické účinky a pokud se na základě údajů o látkách s podobnou strukturou nepředpokládá toxicita, není nezbytné provádět kompletní studii za použití tří úrovní dávek. V některých případech předpokládaná expozice u člověka si vyžádá použití vyšší orální dávky v limitní zkoušce. U dalších způsobů podávání látky, jako je inhalační nebo kožní aplikace, může být maximální dosažitelná úroveň expozice dána fyzikálně-chemickými vlastnostmi zkoušené látky. Při provedení orální akutní zkoušky by dávka pro limitní zkoušku měla činit alespoň 2 000 mg/kg.

1.5.6 **Aplikace dávek**

Zkoušená látka se podává zvířatům denně, 7 dnů v týdnu, po dobu alespoň 28 dnů. Použití 5denního dávkovacího režimu nebo kratší expozice je třeba zdůvodnit. Je-li látka podávána prostřednictvím žaludeční sondy, měla by se podávat v jedné dávce pomocí sondy nebo vhodné intubační kanyly. Maximální množství tekutiny, které lze jednorázově podat, závisí na velikosti pokusného zvířete. Objem by neměl překročit 1 ml/100 g tělesné hmotnosti. V případě vodných roztoků je však možné zvážit i použití až 2 ml/100 g tělesné hmotnosti. Kromě dráždivých nebo žíravých látek, které při vyšších koncentracích obvykle vyvolají silnější účinky, by se měly změny množství zkoušené látky minimalizovat upravením koncentrace, aby se na všech úrovních dávek zajistilo konstantní množství.

U látek podávaných prostřednictvím potravy nebo pitné vody je důležité zajistit, aby množství použité zkoušené látky neovlivnilo vyváženost běžné potravy nebo příjmu vody. Je-li zkoušená látka podávána v potravě, je třeba používat buď konstantní koncentraci v potravě (v ppm), nebo konstantní úrovně dávky, pokud jde o tělesnou hmotnost zvířete. Použití jiné alternativy je třeba zdůvodnit. U látky podávané prostřednictvím žaludeční sondy je třeba dávku podávat každý den přibližně ve stejnou dobu a alespoň jednou týdně ji přizpůsobit tak, aby se udržela konstantní úroveň dávky vzhledem k tělesné hmotnosti zvířete. Provádí-li se studie s opakovanou dávkou jako předběžná studie pro dlouhodobou studii, měla by být v obou studiích používána stejná potrava. Nelze-li v případě studie akutní toxicity použít jednotlivou dávku, je možné podávat dávku po menších částech po dobu, která nepřekročí 24 hodin.

▼B

1.6 POZOROVÁNÍ

1.6.1 **Četnost pozorování a zkoušek**

U studií s opakovanou dávkou by doba pozorování měla pokrýt celé dávkovací období. U studií akutní toxicity pokračuje pozorování ještě 14 dnů po skončení aplikace. U zvířat v satelitních skupinách, která jsou v období po skončení aplikace chována bez expozice, by pozorování mělo zahrnovat i toto období.

Pozorování je třeba provádět dostatečně často, aby se maximalizovala pravděpodobnost odhalení všech behaviorálních a/nebo neurologických anomálií. Pozorování se provádí denně, pokud možno ve stejnou dobu a s přihlédnutím k době očekávaného maxima účinku po podání látky. Četnost klinických pozorování a funkčních zkoušek je shrnuta v tabulce 2. Pokud kinetické nebo jiné údaje získané z předchozích studií naznačují potřebu zvolit časové body pozorování nebo zkoušek nebo období po skončení pozorování, je nutné zvolit takový náhradní plán, na jehož základě lze získat co nejvíce informací. Změny plánu je třeba zdůvodnit.

1.6.1.1 *Pozorování celkového zdravotního stavu a úmrtnosti/nemocnosti*

U všech zvířat se alespoň jednou denně pečlivě zkontroluje jejich zdravotní stav a nejméně dvakrát denně se provede prohlídka všech zvířat za účelem zjištění nemocnosti a úmrtnosti.

1.6.1.2 *Podrobná klinická pozorování*

Podrobná klinická pozorování se provedou u všech zvířat vybraných k těmto účelům (viz tabulka 1) nejprve před první expozicí (aby bylo možné intraindividuální srovnání) a poté v různých intervalech podle trvání studie (viz tabulka 2). Podrobná klinická pozorování u satelitních zotavovacích skupin se provedou na konci zotavovacího období. Podrobná klinická pozorování se provádějí mimo chovnou klec ve standardním pozorovacím prostoru. Pozorování se pečlivě zaznamenají pomocí systémů hodnocení, které zahrnují kritéria nebo bodovací stupnice pro jednotlivá měření v rámci pozorování. Používaná kritéria nebo stupnice musí být explicitně definovány zkušební laboratoří. Je třeba dbát na to, aby byly rozdíly ve zkušebních podmínkách co nejmenší (a nesouvisely systematicky s aplikací) a aby vyšetření prováděly osoby, které nejsou informovány o skupině, do které zvíře patří.

Doporučuje se provádět pozorování strukturovaně, přičemž se u každého zvířete při každém pozorování systematicky používají jasně definovaná kritéria (včetně definice normálního „rozpětí“). „Normální rozpětí“ je třeba dostatečně zdokumentovat. Všechny pozorované příznaky se zaznamenají. Je-li to možné, zaznamená se rovněž závažnost pozorovaných příznaků. Klinická pozorování zahrnují kromě jiného změny kůže, srsti, očí a sliznic, výskyt sekretů a exkretů a autonomních funkcí (slzení, zježení srsti, velikost zornic, nezvyklý průběh dýchání a/nebo dýchání ústy, nezvyklé příznaky močení nebo defekace a zbarvení moči).

▼B

Zaznamenají se rovněž nezvyklé projevy, pokud jde o polohu těla, úroveň aktivity (např. snížené nebo zvýšené zkoumání standardního pozorovacího prostoru) a koordinaci pohybu. Zaznamenají se také změny chůze (např. kolébání, ataxie), polohy (nahrbení hřbetu) a reakce na manipulaci, umístění a další stimuly související s prostředím, dále přítomnost klonických a tonických pohybů, křečí nebo třesu, stereotypů v chování (např. nadměrného čištění, nezvyklých pohybů hlavy nebo opakovaného kroužení) nebo zvláštního chování (např. kousání nebo nadměrného olizování, sebepoškozování, pohybu pozpátku, vydávání zvuků) anebo agresivity.

1.6.1.3 *Funkční zkoušky*

Podobně jako podrobná klinická pozorování se u jednotlivých zvířat vybraných k těmto účelům provedou i funkční zkoušky – nejprve před expozicí a potom vícekrát po jejím provedení (viz tabulka 1). Četnost funkčního testování závisí rovněž na trvání studie (viz tabulka 2). Mimo dobu pozorování stanovenou v tabulce 2 se provede také funkční pozorování satelitní zotavovací skupiny, a to těsně před plánovaným usmrcením. Funkční zkoušky zahrnují reakce na různé smyslové podněty (např. sluchové, zrakové a proprioceptivní podněty (5, 6, 7)), změří se síla úchopu končetiny (8) a motorická aktivita (9). Motorická aktivita se měří pomocí automatického přístroje schopného odhalit jak snížení, tak i zvýšení této aktivity. Pokud se použije jiný systém, měl by být kvantitativní a je třeba prokázat jeho citlivost a spolehlivost. Každý přístroj je nutné otestovat, aby se zajistila jeho spolehlivost po celé časové období a homogenita s ostatními přístroji. Další podrobnosti o postupech, kterými se lze řídit, jsou uvedeny v příslušných odkazech. Pokud neexistují žádné údaje (např. údaje o vztahu mezi strukturou a biologickou aktivitou, epidemiologické údaje, jiné toxikologické studie), které by ukazovaly na potenciální neurotoxické účinky, je nutné za účelem podrobnějšího vyšetření těchto možných účinků zvážit začlenění specializovanějších zkoušek smyslových a motorických funkcí nebo učení a paměti. Další informace o specializovanějších zkouškách a jejich používání je uvedeno v literatuře (1).

Ve výjimečných případech lze zvířata vykazující známky toxicity v takové míře, která by významně narušila provedení funkční zkoušky, z této zkoušky vyřadit. Vyřazení těchto zvířat z funkčních zkoušek je nutné zdůvodnit.

1.6.2 **Tělesná hmotnost a spotřeba potravy a vody**

U studií s délkou trvání do 90 dnů se všechna zvířata váží alespoň jednou týdně a každý týden se rovněž provádí měření spotřeby potravy (měření spotřeby vody se provádí tehdy, je-li zkoušená látka aplikována prostřednictvím tohoto média). U dlouhodobých studií se všechna zvířata váží alespoň jednou týdně během prvních 13 týdnů a poté alespoň jednou za 4 týdny. Během prvních 13 týdnů se měří spotřeba potravy (měření spotřeby vody se provádí tehdy, je-li zkoušená látka aplikována prostřednictvím tohoto média) a poté přibližně v tříměsíčních intervalech, pokud si změny zdravotního stavu nebo změny tělesné hmotnosti nevyžádají jiný interval.

▼B

1.6.3 **Oftalmologické vyšetření**

U studií delších než 28 dnů se před aplikací zkoušené látky a před ukončením studie provede oftalmologické vyšetření pomocí oftalmoskopu nebo jiného vhodného nástroje, a to nejlépe u všech zvířat, alespoň však u všech zvířat ze skupin s vysokou dávkou a z kontrolních skupin. Pokud se zjistí změny na očích nebo pokud klinické příznaky ukazují na nutnost vyšetření očí, vyšetří se všechna zvířata. U dlouhodobých studií se oftalmologické vyšetření provede ve 13. týdnu stáří zvířat. Oftalmologická vyšetření není nutné provádět tehdy, jsou-li již k dispozici údaje z jiných podobně dlouhých studií s podobnými úrovněmi dávek.

1.6.4 **Hematologické a biochemické vyšetření**

Pokud se studie neurotoxicity provádí v kombinaci se studií systémové toxicity po opakovaných dávkách, provede se hematologické vyšetření a stanovení klinických biochemických parametrů tak, jak je uvedeno v příslušné metodě studie systémové toxicity. Odebírání vzorků se provede tak, aby se minimalizovaly jakékoliv účinky na chování.

1.6.5 **Histopatologie**

Neuropatologické vyšetření se navrhne tak, aby doplnilo a rozšířilo pozorování provedená v rámci této studie během fáze *in vivo*. Tkáně alespoň pěti zvířat každého pohlaví z každé skupiny (viz tabulka 1 a další odstavec) se fixují *in situ* za použití obecně uznávaných perfuzních a fixačních technik (viz odkaz na literaturu 3, kapitola 5 a odkaz 4, kapitola 50). Zaznamenají se jakékoliv výrazné změny. Pokud se studie provádí jako samostatná studie neurotoxicity nebo studie charakterizující neurotoxické účinky, lze použít zbytek zvířat buď ke specifickým neurobehaviorálním (10, 11), neuropatologickým (10, 11, 12, 13), neurochemickým (10, 11, 14, 15), nebo elektrofyziologickým (10, 11, 16, 17) postupům, které mohou doplnit zde popsané postupy a vyšetření, anebo zvýšit počet subjektů vyšetřovaných k histopatologickým účelům. Tyto doplňkové postupy jsou zvláště užitečné tehdy, pokud empirická pozorování nebo očekávané účinky ukazují na specifický typ nebo cílovou strukturu neurotoxicity (2, 3). Je také možné zbytek zvířat použít k běžným patologickým hodnocením, která jsou popsána v metodě studií po opakovaných dávkách.

U všech tkáňových vzorků zalitých parafínem se provede běžný postup barvení, např. pomocí hematoxylinu a eosinu (H&E), a mikroskopické vyšetření. Jsou-li pozorovány nebo existuje-li podezření na příznaky periferní neuropatie, vyšetří se vzorky periferních nervů zalitých do pryskyřic (vosků). Klinické příznaky mohou rovněž poukázat na další místa, která je nutné vyšetřit, nebo na nutnost použít speciální postupy barvení. Pokyny k určení dalších míst, která je třeba vyšetřit, lze nalézt v literatuře (3, 4). K prokázání charakteristických typů patologické změny může přispět i odpovídající speciální barvení (18).

▼B

U reprezentativních řezů centrálního a periferního nervového systému se provede histologické vyšetření (viz odkaz na literaturu 3, kapitola 5 a odkaz 4, kapitola 50). Mezi vyšetřované oblasti obvykle patří: přední mozek, střední část mozku, včetně řezu hippocampem, střední mozek, mozeček, Varolův most, prodloužená mícha, oko se zrakovým nervem a sítnicí, mícha v oblasti cervikálního a lumbálního zesílení, dorsální kořenová ganglia, dorsální a ventrální kořenová vlákna, proximální část *n. ischiadicus* a proximální část *n. tibialis* (v oblasti kolena) a *n. tibialis* z oblasti lýtkového svalu. Řezy míchy a periferních nervů by měly zahrnovat jak příčné, tak i podélné řezy. Pozornost je nutné věnovat uspořádání cév v oblasti nervového systému. Rovněž se vyšetří vzorky z kosterního svalstva, a to zvláště z lýtkového svalu. Zvláštní pozornost je nutné věnovat místům s buněčnou a vláknitou strukturou a těm strukturám v oblasti CNS a PNS, o nichž je známo, že na ně mají neurotoxické látky značný vliv.

Informace o neuropatologických změnách, které typicky vznikají v důsledku expozice toxickým látkám, lze nalézt v literatuře (3, 4). Doporučuje se postupné vyšetření tkáňových vzorků, při kterém se porovnají nejprve vzorky řezů ze skupiny s vysokou dávkou se vzorky řezů z kontrolní skupiny. Nejsou-li ve vzorcích z těchto skupin zjištěny žádné neuropatologické změny, není nutné provádět další analýzu. Jsou-li zjištěny ve skupině s vysokou dávkou neuropatologické změny, je třeba následně okódovat a vyšetřit vzorky ze všech potenciálně zasažených tkání ze skupin se střední a nízkou dávkou.

Pokud je během kvalitativního vyšetření zjištěna přítomnost neuropatologických změn, provede se druhé vyšetření všech oblastí nervového systému, které vykazují tyto změny. Okódují se řezy ze všech dávkových skupin ze všech potenciálně zasažených oblastí a vyšetří v náhodném pořadí bez znalosti kódu. Zaznamená se četnost a závažnost všech lézí. Po zhodnocení všech oblastí ze všech dávkových skupin se kód odkryje a provede se statistická analýza za účelem vyhodnocení vztahu dávka-odezva. U každé léze se popíší příklady různých stupňů závažnosti.

Neuropatologické výsledky se vyhodnotí v souvislosti s pozorováním a měřením chování a rovněž spolu s dalšími údaji z předchozích a souběžných studií systémové toxicity zkoušené látky.

2. **ÚDAJE**

2.1 ZPRACOVÁNÍ VÝSLEDKŮ

Uvedou se jednotlivá data, která se shrnou do tabulky, přičemž se pro každou experimentální nebo kontrolní skupinu uvede počet zvířat na začátku zkoušky, počet zvířat uhynulých v průběhu zkoušky nebo počet zvířat usmrcených z humánních důvodů a doba uhynutí nebo humánního usmrcení, počet zvířat vykazujících příznaky toxicity, popis zjištěných příznaků toxicity, včetně doby nástupu, trvání, typu a závažnosti jakýchkoliv příznaků toxicity, počet zvířat vykazujících léze, včetně typu a závažnosti léze (lézí).

▼B

2.2 HODNOCENÍ A INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

Výsledky studie je třeba vyhodnotit z hlediska výskytu, závažnosti a korelace neurobehaviorálních a neuropatologických účinků (rovněž i neurochemických nebo elektrofyziologických účinků, jsou-li provedena doplňující vyšetření) a z hlediska dalších zjištěných nepříznivých účinků. Je-li to možné, je třeba vyhodnotit číselné výsledky vhodnými a obecně uznávanými statistickými metodami. Statistické metody je třeba zvolit během plánování studie.

3. **ZPRÁVY**

3.1 PROTOKOL O ZKOUŠCE

Protokol o zkoušce musí obsahovat tyto informace:

Zkoušená látka:

— fyzikální vlastnosti (včetně isomerie, čistoty a fyzikálně-chemických vlastností),

— identifikační údaje.

Vehikulum (je-li použito):

— zdůvodnění výběru vehikula.

Pokusná zvířata:

— použitý druh/kmen,

— počet, stáří a pohlaví zvířat,

— původ, podmínky chovu, aklimatizace, potrava atd.,

— hmotnost jednotlivých zvířat na začátku zkoušky.

Zkušební podmínky:

— podrobné údaje o úpravě směsi zkoušené látky či přípravě potravy, dosažené koncentraci, stabilitě a homogenitě přípravku,

— specifikace aplikovaných dávek, včetně podrobností o vehikulu, objemu a fyzikální formě aplikovaného materiálu,

— podrobnosti o způsobu podávání zkoušené látky,

— zdůvodnění výběru úrovní dávky,

— zdůvodnění způsobu aplikace a trvání expozice,

— přepočet koncentrace zkoušené látky v potravě nebo pitné vodě (ppm) na skutečnou denní dávku v mg/kg tělesné hmotnosti,

— podrobnosti o potravě a kvalitě vody.

Pozorovací a zkušební postupy:

— podrobnosti o přiřazení zvířat z jednotlivých skupin do podskupin s perfuzí,

— podrobnosti o systémech hodnocení, včetně kritérií a hodnotících stupnic pro jednotlivá měření v rámci podrobných klinických pozorování,

▼B

— podrobnosti o funkčních zkouškách pro měření reakce na různé smyslové podněty (např. sluchové, zrakové a hmatové), pro měření síly úchopu končetiny, motorické aktivity (včetně podrobností o automatických zařízeních pro zjišťování aktivity) a další použité postupy,

— podrobnosti o oftalmologických vyšetřeních, hematologických a klinických biochemických zkouškách s příslušnými výchozími (normálními) hodnotami,

— podrobnosti o specifických neurobehaviorálních, neuropatologických, neurochemických nebo elektrofyziologických postupech.

Výsledky:

— tělesná hmotnost a její změny, včetně tělesné hmotnosti v době usmrcení,

— spotřeba potravy a případně vody,

— údaje o toxických reakcích podle pohlaví a úrovně dávek, včetně popisu příznaků toxicity nebo úmrtnosti,

— povaha, závažnost a trvání (doba nástupu a následný průběh) podrobných klinických nálezů (zda jsou vratné nebo nevratné),

— podrobný popis všech výsledků funkčních testů,

— pitevní nálezy,

— podrobný popis všech neurobehaviorálních, neuropatologických a neurochemických nebo elektrofyziologických výsledků, jsou-li k dispozici,

— údaje o absorpci a metabolismu, jsou-li k dispozici,

— statistické vyhodnocení výsledků, je-li to možné.

Diskuse o výsledcích:

— informace o závislosti účinku na dávce,

— význam jakýchkoliv dalších toxických účinků pro závěry týkající se neurotoxického potenciálu zkoušené chemické látky,

— dávková úroveň bez pozorovatelných nepříznivých účinků (NOAEL).

Závěry:

— je žádoucí uvést konkrétní vyjádření o celkové neurotoxicitě zkoušené chemické látky.

4. **LITERATURA**

1) OECD Giudance Document on Neurotoxicity Testing Strategies and Test Methods. OECD, Paris. Návrh.

2) Test Guideline for a Developmental Neurotoxicity Study, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Návrh.

3) World Health Organization (WHO) (1986). Environmental Health Criteria document 60: Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity associated with Exposure to Chemicals.

4) Spencer, P.S. and Schaumburg, H.H. (1980). Experimental and Clinical Neurotoxicology. Eds. Spencer, P.S. and Schaumburg, H.H. eds. Williams and Wilkins, Baltimore/London.

▼B

5) Tupper, D.E. and Wallace, R.B. (1980). Utility of the Neurological Examination in Rats. Acta Neurobiol. Exp., 40, 999–1003.

6) Gad, S.C. (1982). A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. J. Toxicol. Environ. Health, 9, 691–704.

7) Moser, V.C., McDaniel, K.M. and Phillips, P.M. (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of amitraz. Toxic. Appl. Pharmacol., 108, 267–283.

8) Meyer, O.A., Tilson, H.A., Byrd, W.C. and Riley, M.T. (1979). A Method for the Routine Assessment of Fore- and Hind- limb Grip Strength of Rats and Mice. Neurobehav. Toxicol., 1, 233–236.

9) Crofton, K.M., Haward, J.L., Moser, V.C., Gill, M.W., Reirer, L.W., Tilson, H.A. and MacPhail, R.C. (1991) Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. Neurotoxicol. Teratol., 13, 599–609.

10) Tilson, H.A., and Mitchell, C.L. eds. (1992). Neurotoxicology Target Organ Toxicology Series. Raven Press, New York.

11) Chang, L.W., ed. (1995). Principles of Neurotoxicology. Marcel Dekker, New York.

12) Broxup, B. (1991). Neuopathology as a screen for Neurotoxicity Assessment. J. Amer. Coll. Toxicol., 10, 689–695.

13) Moser, V.C., Anthony, D.C., Sette, W.F. and MacPhail, R.C. (1992). Comparison of Subchronic Neurotoxicity of 2-Hydroxyethyl Acrylate and Acrylamide in Rats. Fund. Appl.Toxicol., 18, 343–352.

14) O'Callaghan, J.P. (1988). Neurotypic and Gliotypic Proteins as Biochemical Markers of Neurotoxicity. Eurotoxicol. Teratol., 10, 445–452.

15) O'Callaghan J.P. and Miller, D.B. (1988). Acute Exposure of the Neonatal Rat to Triethyltin Results in Persistent Changes in Neurotypic and Gliotypic Proteins. J. Pharmacol. Exp. Ther., 244, 368–378.

16) Fox. D.A., Lowndes, H.E. and Birkamper, G.G. (1982). Electrophysiological Techniques in Neurotoxicology. In: Nervous System Toxicology. Mitchell, C.L. ed. Raven Press, New York, s. 299–335.

17) Johnson, B.L. (1980). Electrophysiological Methods in neurotoxicity Testing. In: Experimental and Clinical Neurotoxicology. Spencer, P.S. and Schaumburg, H.H. eds., Williams and Wilkins Co.,. Baltimore/London, s. 726–742.

18) Bancroft, J.D. and Steven A. (1990). Theory and Pratice of Histological Techniques. Chapter 17, Neuropathological Techniques. Lowe, James and Cox, Gordon eds. Churchill Livingstone.

▼B

Tabulka 1

Minimální počet zvířat na skupinu, provádí-li se studie neurotoxicity samostatně nebo v kombinaci s dalšími studiemi

	TYP PROVEDENÉ STUDIE NEUROTOXICITY			
	Samostatná studie	Kombinovaná studie s 28denní studií	Kombinovaná studie s 90denní studií	Kombinovaná studie se studií chronické toxicity
Počet zvířat na skupinu	10 samců a 10 samic	10 samců a 10 samic	15 samců a 15 samic	25 samců a 25 samic
Počet zvířat vybraných k funkčnímu testování, včetně podrobných klinických pozorování	10 samců a 10 samic	10 samců a 10 samic	10 samců a 10 samic	10 samců a 10 samic
Počet zvířat vybraných k perfuzi *in situ* a neurohistopatologickému vyšetření	5 samců a 5 samic	5 samců a 5 samic	5 samců a 5 samic	5 samců a 5 samic
Počet zvířat vybraných k pozorování toxicity po opakované dávce subchronické/chronické, k hematologickému vyšetření, klinickému biochemickému vyšetření, k histopatologickému vyšetření atd., jak je uvedeno v příslušných doporučeních		5 samců a 5 samic	10 samců ([1]) a 10 samic ([1])	20 samců ([1]) a 20 samic ([1])
Případná doplňující pozorování	5 samců a 5 samic			

([1]) Zahrnuto je pět zvířat vybraných k funkčnímu testování a podrobnému klinickému pozorování jako součást studie neurotoxicity.

▼B

Tabulka 2

Četnost klinických pozorování a funkčních testů

Typ pozorování		Délka studie			
		akutní	28denní	90denní	chronická
U všech zvířat	Celkový zdravotní stav	Denně	Denně	Denně	Denně
	Mortalita/morbidita	Dvakrát denně	Dvakrát denně	Dvakrát denně	Dvakrát denně
U všech zvířat vybraných k funkčním pozorováním	Podrobná klinická pozorování	— před první expozicí — v průběhu 8 hodin po podání dávky v době odhadovaného nejvyššího účinku — 7. a 14. den po skončení dávkování	— před první expozicí — poté jednou týdně	— před první expozicí — jednou během prvního nebo druhého týdne expozice — poté měsíčně	— před první expozicí — před první expozicí jednou na konci prvního měsíce expozice — poté každé tři měsíce
	Funkční testy	— před první expozicí — v průběhu 8 hodin po podání dávky v době odhadovaného nejvyššího účinku — 7. a 14. den po skončení dávkování	— před první expozicí — během čtvrtého týdne aplikace co nejblíže ke konci období expozice	— před první expozicí — jednou během prvního nebo druhého týdne expozice — poté měsíčně	— před první expozicí — před první expozicí jednou na konci prvního měsíce expozice — poté každé tři měsíce

▼B

B.44 ABSORPCE KŮŽÍ: METODA *IN VIVO*

1. METODA

Tato zkušební metoda je ekvivalentní testu OECD TG 427 (2004).

1.1 ÚVOD

Expozice mnohým chemickým látkám se děje hlavně cestou přes kůži, zatímco většina toxikologických studií provedených na pokusných zvířatech užívá perorální podání. Perkutánní absorpční studie *in vivo* stanovená tímto návodem skýtá propojení nezbytné pro extrapolaci z perorálních studií na posouzení bezpečnosti po expozicích dermálních.

Látka musí proniknout velkým počtem buněčných vrstev kůže, než se může dostat do krevního oběhu. Vrstvou určující rychlost je pro většinu látek *stratum corneum* (zrohovatělá vrstva) složená z mrtvých buněk. Permeabilita (propustnost) skrz kůži závisí na lipofilitě chemické látky a na tloušťce vnější vrstvy epidermis a také na faktorech, jako je např. molární hmotnost a koncentrace dané látky. Obecně je vrstva kůže potkanů a králíků permeabilnější než kůže lidská, zatímco kůže morčat a opic se kůži lidské podobají více.

Metody měření perkutánní absorpce se dělí do dvou kategorií: *in vivo* a *in vitro*. Metody *in vivo* jsou schopny skýtat dobré informace o absorpci kůží s různými druhy pokusných zvířat. Nedávno byly vyvinuty *in vitro* metody. Ty využívají transport přes plnou či částečnou tloušťku kůže zvířecí či lidské do rezervoáru tekutiny. Metody *in vitro* jsou popsány ve zvláštní metodě zkoušení (1). Doporučuje se brát v úvahu dokument OECD Guidance Document for the Conduct of Skin Absorption Studies (2) na pomoc při výběru nejvhodnější metody pro danou situaci, neboť popisuje podrobněji vhodnost metod *in vivo* a *in vitro*.

Metoda *in vivo* zde popsaná umožňuje stanovení průniku zkoušené látky kůží do systémových kompartmentů. Tento postup je široce používán mnoho let (3, 4, 5, 6, 7). Ačkoli perkutánní absorpční studie *in vitro* mohou být vhodné v mnoha případech, mohou nastat situace, kdy lze získat potřebné údaje pouze studií provedenou *in vivo*.

Výhodou *in vivo* metody je, že využívá fyziologicky a metabolicky intaktní systém, využívá druhy společné mnoha studiím toxicity a může být modifikována pro použití s jinými druhy. Nevýhodou je využívání živých zvířat, potřeba radioznačených materiálů k usnadnění spolehlivých výsledků, potíže se stanovením časné fáze absorpce a rozdíly v permeabilitě kůže preferovaného druhu (potkan) a kůže lidské. Zvířecí kůže je obecně permeabilnější, a proto může být perkutánní absorpce u člověka nadhodnocena (6, 8, 9). Leptavé/žíravé látky by na živých zvířatech zkoušeny být neměly.

▼B

1.2 DEFINICE

Neabsorbovaná dávka: množství smyté z povrchu kůže po expozici a množství, které ulpělo na neuzavírajícím krytu, včetně množství prokazatelně odtěkaného z kůže během expozice.

Absorbovaná dávka (*in vivo*): množství v moči, ve zbytcích v kleci, ve výkalech, ve vydechovaném vzduchu (je-li měřeno), v krvi, v tkáních (jsou-li sbírány) a ve zbývajících částech mrtvých těl po odstranění kůže z místa aplikace.

Absorbovatelná dávka: množství na kůži nebo v kůži po omytí.

1.3 PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

Zkušební látka, nejlépe radioaktivně značená, se aplikuje na zvířecí kůži zbavenou srsti na jedné nebo více vhodných úrovních dávky ve formě reprezentativní pro užívání přípravku. Zkoušený přípravek se ponechá ve styku s kůží po předem určenou dobu pod vhodným krytem (neokluzivním, semiokluzivním či okluzivním), aby nedošlo k požití zkušebního přípravku. Po uplynutí doby expozice se kryt odstraní a kůže se očistí vhodným čisticím činidlem, kryt a čisticí materiály se uchovají pro analýzu a aplikuje se nový kryt. Zvířata jsou držena před expozicí, během ní a po ní v jednotlivých metabolických klecích a jejich exkrementy a vydechovaný vzduch během uvedených období se sbírají pro analýzy. Od sběru vydechovaného vzduchu lze upustit, jsou-li známy dostatečné údaje o tom, že se tvoří jen málo radioaktivních těkavých metabolitů nebo že se netvoří žádné. Každá studie bude obvykle zahrnovat několik skupin zvířat, která budou exponována zkoušenému přípravku. Jedna skupina zvířat bude usmrcena na konci doby expozice. Ostatní skupiny zvířat budou usmrcovány v naplánovaných časových intervalech poté (2). Po uplynutí vzorkovacího období se usmrtí zbývající zvířata, krev se odebere k analýze, místo aplikace se odebere k analýze a těla se analyzují vzhledem k nevyměšenému materiálu. Vzorky se analyzují vhodnými prostředky a odhadne se míra perkutánní absorpce (6, 8, 9).

1.4 POPIS METODY

1.4.1 **Výběr druhu zvířat**

Nejběžnějším používaným druhem je potkan, ale lze používat rovněž kmeny bez srsti a druhy s rychlostí absorpce kůží podobnější lidským (3, 6, 7, 8, 9). Používána by měla být mladá dospělá zdravá zvířata stejného pohlaví (automaticky voleným pohlavím jsou samci) běžně využívaných pokusných kmenů. Na počátku studie by hmotnostní váhové odchylky zvířat váhy neměly přesáhnout ± 20 % střední hmotnosti. Například jsou vhodní samci potkanů o hmotnosti 200–250 g, zvláště v horní polovině uvedeného rozsahu.

▼B

1.4.2 **Počet a pohlaví zvířat**

Pro každý zkoušený přípravek a každý stanovený konečný čas by měla být použita skupina nejméně čtyř zvířat stejného pohlaví. Každá skupina zvířat bude usmrcena po různých časových intervalech, např. na konci expoziční doby (obvykle 6 nebo 24 hodin) a v následných intervalech (např. 48 a 72 hodin). Pokud dostupné údaje prokazují podstatný rozdíl v dermální toxicitě u samců a samic, mělo by být vybráno citlivější pohlaví. Nejsou-li takové údaje dostupné, lze použít obě pohlaví.

1.4.3 **Podmínky útulku a krmení**

Teplota v experimentálních zvířecích místnostech by měla být 22 °C (± 3 °C). Ačkoli relativní vlhkost by měla být nejméně 30 % a přednostně by neměla přesáhnout 70 %, kromě doby čištění místností, žádoucí vlhkost je 50–60 %. Osvětlení by mělo být umělé a mělo by se střídat 12 hodin světla a 12 hodin tmy. Ke krmení může být použita konvenční laboratorní potrava, měla by být volně dostupná spolu s neomezovaným zdrojem pitné vody. Během studie a přednostně rovněž během aklimatizace jsou zvířata držena jednotlivě v metabolických klecích. Protože rozsypaná potrava a rozlitá voda může ohrozit výsledky, měla by být pravděpodobnost takových událostí minimalizována.

1.4.4 **Příprava zvířat**

Zvířata jsou označena způsobem umožňujícím jejich individuální identifikaci a držena v jejich klecích nejméně pět dnů před zahájením studie, aby se aklimatizovala na laboratorní podmínky.

Po aklimatizačním období a přibližně 24 hodin před aplikací dávek je každé zvíře zbaveno srsti na kůži v oblasti plece a zad. Permeabilita poškozené a nepoškození kůže se liší a mělo by se předcházet jejímu odření. Po odstranění srsti a přibližně 24 hodin před aplikací zkoušené látky na kůži (viz bod 1.4.7) by kůže měla být zbavena kožního tuku omytím acetonem. Nedoporučuje se další omytí mýdlem a vodou, protože zbytky mýdla by mohly podpořit absorpci zkoušené látky kůží. Dotyčná oblast musí být dostatečně velká, přednostně nejméně 10 cm^2, aby bylo možno spolehlivě vypočítat absorbované množství zkoušené chemické látky na cm^2. Takto velkou plocha mají potkani o tělesné hmotnosti 200–250 g. Po přípravě jsou zvířata vrácena do metabolických klecí.

1.4.5 **Zkoušená látka**

Zkoušená látka je entita, jejíž penetrační vlastnosti mají být zjištěny. V ideálním případě by zkoušená látka měla být radioaktivně značena.

1.4.6 **Zkoušený přípravek**

Zkoušený látkový přípravek (např. čistý, zředěný, nebo přísadami doplněný materiál obsahující zkoušenou chemickou látku, která je aplikována na kůži) by měl být stejný jako přípravek, kterému lidé nebo jiné potenciálně cílové druhy mohou být exponovány (nebo by měl být jeho realistickou náhražkou). Jakákoli odchylka od užívaného přípravku musí být zdůvodněna. Je-li to nutné, je zkoušená látka rozpuštěna nebo suspendována ve vhodném vehikulu. Pro jiné vehikulum než voda by měly být známy charakteristiky jeho absorpce a potenciální interakce se zkoušenou látkou.

▼B

1.4.7 **Aplikace na kůži**

Na povrchu kůže je definováno místo aplikace se specifickou velikosti povrchu. Na toto místo je rovnoměrně naneseno známé množství zkoušeného přípravku. Toto množství by normálně mělo imitovat potenciální expozici člověka, obvykle 1–5 mg/cm^2 pro tuhé látky a až 10 $\mu l/cm^2$pro kapaliny. Jiná množství by měla být zdůvodněna předpokládanými podmínkami použití, cíli studie nebo fyzikálními vlastnostmi zkoušeného přípravku. Po aplikaci musí být aplikační místo chráněno před setřením. Příklad obvyklého opatření je na obrázku 1. Obvykle je aplikační místo chráněno neuzavřeným krytem (např. překrytím permeabilní nylonovou gázou). Avšak pro neurčité aplikace by aplikační místo mělo být uzavřeno. V případě, že vypařování polotěkavých zkoušených látek snižuje podíl znovuzachycené zkoušené látky až na nepřijatelný rozsah (viz též bod 1.4.10, první odstavec), je nutné zachycovat vypařovanou látku na filtru z aktivního uhlí kryjícím aplikační zařízení (viz obrázek 1). Důležité je, aby žádné aplikační zařízení nepoškozovalo kůži, neabsorbovalo zkoušený přípravek, ani s ním nereagovalo. Zvířata jsou vracena do jednotlivých metabolických klecí ke sběru exkrementů.

1.4.8 **Doba trvání expozice a vzorkování**

Doba trvání expozice (expoziční doba) je časový interval mezi aplikací a odstraněním zkoušeného přípravku omytím kůže. Relevantní expoziční doby (obvykle 6 až 24 hodin) by měly být stanoveny na základě předpokládané doby expozice člověka. Po expoziční dobu jsou zvířata držena v metabolických klecích až do stanoveného ukončení. Zvířata by měla být v pravidelných intervalech po celou dobu trvání studie pozorována, zda nevykazují příznaky toxicity/abnormálních reakcí. Na konci expoziční doby by exponovaná kůže měla být prohlédnuta ke zjištění viditelných příznaků dráždění.

Metabolické klece by měly umožnit separovaný sběr moči a výkalů během studie. Rovněž by měly umožnit sběr oxidu uhličitého s ^{14}C-uhlíkem a těkavé organické sloučeniny s ^{14}C-uhlíkem, které by měly být analyzovány, jestliže jich vzniká množství > 5 %. Moč, výkaly a zachycené plyny (např. oxid uhličitý s ^{14}C a těkavé organické sloučeniny s ^{14}C) by měly být odděleně sbírány pro každou skupinu v každém vzorkovacím čase. Pokud je dostatečně známo, že vzniká málo těkavých radioaktivních metabolitů nebo nevznikají žádné, lze použít otevřené klece.

Exkrementy jsou sbírány během expoziční doby, až 24 hodin od počátečního styku s kůží, a potom denně až do ukončení experimentu. Ačkoli normálně postačí tři intervaly sběru exkrementů, z předpokládaného použití zkoušeného přípravku nebo ze známých kinetických údajů mohou vyplynout vhodnější nebo dodatečné časy sběru exkrementů pro studii.

Po uplynutí expoziční doby je ochranný kryt odstraněn z každého zvířete a uchován pro analýzu odděleně. Exponovaná kůže všech zvířat by měla být omyta nejméně třikrát čisticím činidlem užitím vhodných tamponů. Pečlivě je nutno dbát na to, aby se vyloučila kontaminace jiných částí těla. Čisticí činidlo by mělo představovat obvyklou hygienickou praxi, např. vodný roztok mýdla. Nakonec by měla být kůže vysušena. Veškeré tampony a mycí činidla by měla být zachována pro analýzu. Před vrácením do jednotlivých klecí by měla být exponovaná místa zvířat, která budou zachována pro pozdější pozorování, chráněna čerstvým krytem.

▼B

1.4.9 **Terminální postupy**

V každé skupině budou jednotlivá zvířata usmrcována v plánovaných časových intervalech a krev sbírána k analýze. Ochranný kryt nebo zařízení by mělo být odebráno k analýze. Kůže z aplikačního místa a podobná neexponovaná oblast kůže zbavené srsti by měla být odebrána ke zvláštní analýze z každého zvířete. Kůže z aplikačního místa může být rozdělena oddělením *stratum corneum* od podložní epidermis ke zjištění více údajů o distribuci zkoušené chemické látky. Stanovení časové závislosti této distribuce po expoziční době by mělo poskytnout určité údaje o osudu zkoušené chemické látky v *stratum corneum*. Rozdělení kůže (po posledním omytí kůže a usmrcení zvířete) je usnadněno sejmutím všech ochranných krytů. Kůže z aplikačního místa spolu s prstencem okolní kůže je vyříznuta z potkana a přišpendlena na desku. Na povrch kůže se jemně přitlačí lepící páska a tato pásku se sejme spolu s částí *stratum corneum*. Stejně se použijí další pásky až do stavu, kdy se páska na kůži již nelepí a *stratum corneum* je úplně odstraněno. Pro každé zvíře jsou všechny pásky společně dány do stejného obalu, kam je přidáno digestivum solubilizující *stratum corneum*. Před analýzou absorbované dávky ve zbylém těle z něj lze vyjmout jakoukoli potenciálně cílovou tkáň. Těla jednotlivých zvířat by měla být zachována pro analýzu. Obvykle postačí analýza celkového obsahu. Cílové orgány lze vyjímat pro zvláštní analýzu (pokud tak indikují další studie). Moč z měchýře v plánované době usmrcení by měla být přidána k moči sebrané dříve. Po sběru exkrementů z metabolických klecí v plánovaném době usmrcení by klece a jejich filtry měly být omyty vhodným rozpouštědlem. Podobně by měla být analyzována i další potenciálně kontaminovaná zařízení.

1.4.10 **Analýza**

Ve všech studiích by mělo být dosaženo dostatečného znovuzáchytu (výtěžku) (tj. střední hodnoty 100 ± 10 % radioaktivity). Znovuzáchyty mimo tento rozsah musí být zdůvodněny. Množství podané dávky v každém vzorku musí být analyzováno vhodně validovaným postupem.

Statistické hodnocení by mělo zahrnout míru rozptylu opakovaných měření pro každou aplikaci.

2. **ÚDAJE**

Pro každé zvíře v každém vzorkovacím čase by pro zkoušenou chemickou látku a/nebo metabolity měla být provedena následující měření. Kromě jednotlivých údajů by měly být hlášeny střední hodnoty dat seskupených podle vzorkovacích časů:

— množství spojené s ochrannými prostředky,

— množství, které lze uvolnit z kůže,

— množství na kůži či v kůži, které nelze z kůže smýt,

▼B

— množství ve vzorcích krve,

— množství v exkrementech a vydechovaném vzduchu (je-li to relevantní),

— množství v těle a v orgánech odebraných pro zvláštní analýzy.

Množství zkoušené chemické látky a/nebo metabolity v exkrementech, ve vydechovaném vzduchu, v krvi a v těle umožní stanovení celkového absorbovaného množství v každém vzorkovacím čase. Rovněž lze vyčíslit měrné množství zkoušené chemické látky absorbované jedním cm^2 kůže exponované zkoušené látce během expoziční doby.

3. **ZPRÁVY**

3.1 ZKUŠEBNÍ PROTOKOL

Zkušební protokol musí zahrnout požadavky stanovené protokolem, včetně zdůvodnění použitého zkušebního systému, a měl by obsahovat tyto údaje:

Zkoušená látka:

— identifikační údaje (např. číslo CAS, je-li známo; zdroj; čistota (radiochemická čistota); známé nečistoty; číslo šarže),

— fyzikální povaha, fyzikálně-chemické vlastnosti (např. pH, těkavost, rozpustnost, stabilita, molární hmotnost a rozdělovací koeficient log P_{ow}).

Zkoušený přípravek:

— složení a zdůvodnění použití,

— podrobnosti o zkušebním přípravku, aplikované množství, dosažená koncentrace, vehikulum, stabilita a homogenita.

Pokusná zvířata:

— použitý druh a kmen,

— počet, věk a stáří zvířat,

— zdroj zvířat, podmínky jejich umístění, krmení, atd.,

— hmotnosti jednotlivých zvířat na počátku zkoušky.

Zkušební podmínky:

— podrobnosti podání zkušebního přípravku (místo aplikace, metody analýz, uzavřený/neuzavřený ochranný kryt, objem, extrakce, detekce),

— podrobnosti o jakosti krmení a vody.

Výsledky:

— všechny známky toxicity,

— tabelované absorpční údaje (vyjádřené jako podíl, množství nebo procentní podíl),

▼B

— celkové znovuzachycené množství v experimentu,

— interpretace výsledků, srovnání s dostupnými údaji o perkutánní absorpci zkoušené sloučeniny.

Rozbor výsledků.

Závěry.

4. **LITERATURA**

1) Zkušební metoda B.45 Absorpce kůží: Metoda *in vitro*.

2) OECD (2002). Guidance Document for the Conduct of Skin Absorption Studies. OECD, Paris.

3) ECETOC (1993) Percutaneous Absorption. European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals, Monograph No. 20.

4) Zendzian RP (1989) Skin Penetration Method suggested for Environmental Protection Agency Requirements. *J. Am. Coll. Toxicol*. 8(5), 829–835.

5) Kemppainen BW, Reifenrath WG (1990) Methods for skin absorption. CRC Press Boca Raton, FL, USA.

6) EPA (1992) Dermal Exposure Assessment: Principles and Applications. Exposure Assessment Group, Office of Health and Environmental Assessment.

7) EPA (1998) Health Effects Test Guidelines, OPPTS 870-7600, Dermal Penetration. Office of Prevention, Pedsticides and Toxic Substances.

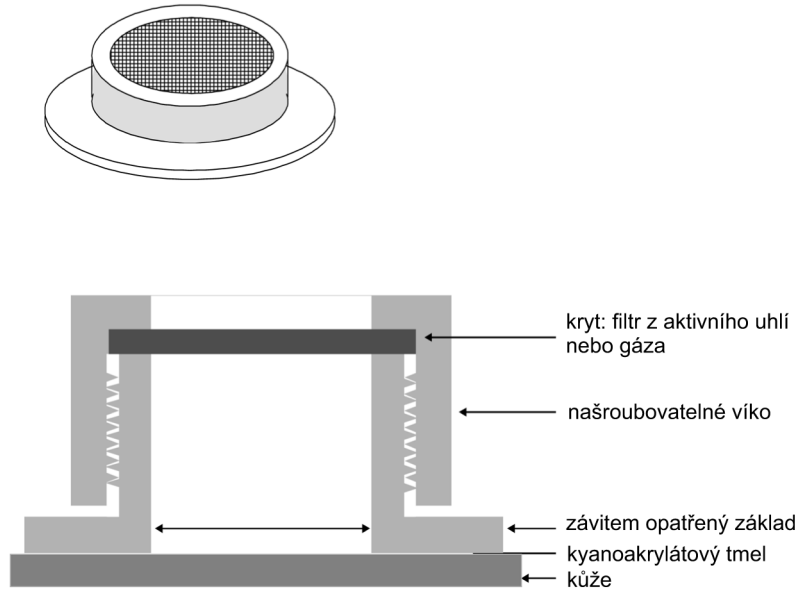
8) Bronaugh RL, Wester RC, Bucks D, Maibach HI and Sarason R (1990) *In vivo* percutaneous absorption of fragrance ingredients in reshus monkeys and humans. *Fd. Chem. Toxic*. 28, 369–373.

9) Feldman RJ and Maibach HI (1970) Absorption of some organic compounds through the skin in man. *J. Invest Dermatol*. 54, 399–404.

▼B

Obrázek 1

Příklad konstrukce typického zařízení k definování a ochraně místa dermální aplikace během studie perkutánní absorpce



▼B

B.45 ABSORPCE KŮŽÍ: METODA *IN VITRO*

1. METODA

Tato zkušební metoda je rovnocenná testu OECD TG 428 (2004).

1.1 ÚVOD

Tato metoda byla určena ke zjištění informací o absorpci zkoušených látek aplikované na vyříznutou kůži. Může být buď kombinována s metodou Absorpce kůží: metoda *in vivo* (1), nebo může být provedena samostatně. Při návrhu studií založených na této metodě se doporučuje se konzultovat dokument OECD Guidance Document for the Conduct of Skin Absorption Studies (2). Tento metodický dokument byl vypracován pro usnadnění výběru vhodných postupů *in vitro* pro specifické podmínky v zájmu zajištění spolehlivosti výsledků získaných touto metodou.

Metody měření absorpce kůží a dermálního přenosu lze dělit do dvou kategorií: *in vivo* a *in vitro*. Metody *in vivo* pro absorpci kůží jsou dobře zavedeny a poskytují farmakokinetické údaje o širokém spektru živočišných druhů. Metoda *in vivo* je samostatně popsána v jiné zkušební metodě (1). Metody *in vitro* jsou používány k měření absorpce kůží po mnoho let. Ačkoli formální validační studie metod *in vitro*, na něž se vztahuje tato zkušební metoda, provedeny nebyly, odborníci OECD se shodli v roce 1999 na tom, že existovaly dostatečné údaje, které byly vyhodnoceny tak, že hovoří ve prospěch této metody *in vitro* (3). Další podrobnosti, které dokládají tuto podporu, včetně značného počtu přímých porovnání metod *in vitro* a *in vivo*, jsou uvedeny v metodickém dokumentu OECD Guidance Document (2). Této problematice se věnuje řada monografií, které uvádějí také podrobné základy pro využívání metod *in vitro* (4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12). Metody *in vitro* umožňují měřit difusi chemických látek do kůže a přes kůži do rezervoáru tekutiny a mohou využívat neživotaschopnou kůži k měření samotné difuse, anebo čerstvou, metabolicky aktivní kůži k současnému měření difuse a kožního metabolismu. Tyto metody našly zvláštní použití při porovnávání přenosu chemických látek do kůže a přes kůži z různých směsí a mohou rovněž skýtat užitečné modely pro posuzování perkutánní absorpce u člověka.

Metody *in vitro* nemusejí být použitelné za všech situací a pro všechny třídy chemických látek. Zkušební metody *in vitro* lze využívat pro počáteční kvalitativní vyhodnocení pronikání kůží. V určitých případech může být nutné poté zjistit údaje *in vivo*. Při dalším rozpracování otázky okolností, za kterých by byly vhodné *in vitro* metody, by měl být brán v úvahu metodický dokument (2). Dodatečné podrobné údaje na podporu rozhodnutí jsou uvedeny v (3).

Tato metoda uvádí obecné zásady měření absorpce kůží a dermálního přenosu zkoušené látky užitím vyříznuté kůže. Lze použít kůži z mnoha savčích druhů, včetně kůže lidské. Permeabilní vlastnosti kůže jsou po jejím vyříznutí z těla zachovány, neboť hlavní barieru pro difusi představuje neživá rohová vrstva *stratum corneum*; aktivní přenos chemických látek kůží nebyl zjištěn. Byla prokázána schopnost kůže metabolizovat určité chemické látky během perkutánní absorpce (6), ale tento proces není určující, pokud jde o rozsah skutečně absorbované dávky, ačkoli může ovlivnit povahu materiálu vstupujícího do krevního řečiště.

▼B

1.2 DEFINICE

Neabsorbovaná dávka: množství smyté z povrchu kůže po expozici a množství, které ulpělo na neuzavírajícím krytu, včetně množství prokazatelně odtěkané z kůže během expozice.

Absorbovaná dávka (*in vitro*): hmotnost zkušební látky proniklé do recepční tekutiny nebo do systémovém oběhu během určitého časového období.

Absorbovatelná dávka (*in vitro*): množství na kůži nebo v kůži po omytí.

1.3 PRINCIP ZKUŠEBNÍ METODY

Zkušební látka, která může být označena radioaktivním izotopem, je aplikována na povrch vzorku kůže oddělující dvě komory difusní cely. Dotyčná chemická látka zůstává na kůži určitou dobu za stanovených podmínek před jejím odstraněním vhodným čisticím postupem. Recepční tekutina je vzorkována ve vhodných časových intervalech během experimentu a analyzována na obsah zkoušené chemické látky a/nebo metabolitů.

Jsou-li použity metabolicky aktivní systémy, mohou být vhodnými metodami analyzovány metabolity zkoušené chemické látky. Po skončení experimentu je případně kvantifikována distribuce zkoušené chemické látky a jejich metabolitů.

Za vhodných podmínek, které jsou popsány v této metodě a v metodickém dokumentu (2), je měřena absorpce zkoušené látky během dané doby analýzou recepční tekutiny a exponované kůže. Zkoušená látka zbývající v kůži by měla být pokládána za absorbovanou, nelze-li prokázat, že absorpci lze stanovit z hodnot recepční tekutiny samotné. Analýza dalších složek (materiálu omytého z kůže a materiálu, který zůstal ve vrstvách kůže) umožňuje další vyhodnocení údajů, včetně celkové distribuce zkušební látky a procentní podíl znovuzáchytu.

V zájmu prokázání funkčnosti a spolehlivosti zkušebního systému v provádějící laboratoři by měly být dostupné výsledky pro relevantní referenční látky v souladu s publikovanými výsledky pro použitou metodu. Tento požadavek by mohl být splněn zkoušením vhodných referenčních látek (přednostně s lipofilitou blízkou zkoušené látce) souběžně se zkoušenou látkou nebo poskytnutím dostatečných stávajících výsledků pro řadu referenčních látek různé lipofility (např. kofein, kyselina benzoová a testosteron).

1.4 POPIS ZKUŠEBNÍ METODY

1.4.1 **Difusní cela**

Difusní cela se skládá z donorové komory a recepční komory, mezi nimiž je umístěna kůže (příklad obvyklé konstrukce je uveden na obrázku 1). Cela by měla zajistit dobré utěsnění okolo kůže, umožňovat snadné vzorkování a dobré promíchávání recepčního roztoku ve styku se spodní vrstvou kůže a dobrou regulaci teploty cely a jejího obsahu. Přijatelné jsou jak statické, tak průtočné difusní cely. Obvykle je ponechána donorová cela neuzavřená během expozice konečné dávce zkušebního preparátu. Avšak pro neurčité aplikace a určité scénáře pro konečnou dávku může být donorová cela uzavřena.

▼B

1.4.2 **Recepční tekutina**

Přednost se dává používání fyziologicky příznivých recepčních tekutin, ačkoliv lze používat i jiné, je-li to odůvodněné. Přesné složení recepční tekutiny by mělo být uvedeno. Měla by být prokázána dostatečná rozpustnost zkoušené chemické látky v recepční tekutině tak, aby netvořily překážku absorpce. Navíc by recepční tekutina neměla poškozovat kožní preparát. V průtočném systému nesmí rychlost toku brzdit difusi zkoušené látky do recepční tekutiny. V systémech statické cely by kapalina měla být neustále míchána a pravidelně vzorkována. Je-li studován metabolismus, musí recepční tekutina během experimentu podporovat životaschopnost kůže.

1.4.3 **Kožní preparáty**

Lze používat kůži z lidských a zvířecích zdrojů. Zohledňuje se, že používání lidské kůže podléhá vnitrostátním a mezinárodním etickým ohledům a podmínkám. Ačkoli je preferována životaschopná kůže, lze též použít kůži neživou za předpokladu, že lze prokázat její neporušenost. Přijatelné jsou buď epidermální membrány (separované enzymaticky, teplem nebo chemicky) nebo kůže s rozštěpenou tloušťkou (štěpený kožní transplantát) (obvykle s tloušťkou 200–400 μm) připravené za použití dermatomu. Plná tloušťka kůže může být použita, ale nadměrná tloušťka (přibližně > 1 mm) by měla být vyloučena, pokud není konkrétně žádoucí pro stanovení zkoušené chemické látky ve vrstvách kůže. Výběr druhů, anatomického místa a postupu preparace musí být zdůvodněn. Požadovány jsou přijatelné údaje nejméně ze čtyř opakování s jedním zkušebním preparátem.

1.4.4 **Neporušenost kožního preparátu**

Je nutné, aby kůže byla řádně preparována. Nevhodná manipulace s kůží může vést k poškození vrstvy *stratum corneum*, proto musí být neporušenost kožního preparátu kontrolována. Je-li zkoumán kožní metabolismus, měla by čerstvě vyříznutá kůže být použita co nejdříve a za podmínek známých jako příznivé pro metabolickou činnost. Obecně se doporučuje čerstvě vyříznutou kůži použít do 24 hodin, avšak přijatelná skladovací doba se může lišit v závislosti na enzymovém systému zapojeném do metabolizace a na teplotě skladování (13). Jsou-li kožní preparáty před použitím skladovány, měly by být uvedeny důkazy o zachování jejich bariérové funkčnosti.

1.4.5 **Zkoušená chemická látka**

Zkoušená látka je entita, jejíž schopnosti pronikání mají být studovány.V ideálním případě by měla být označena radioaktivním izotopem.

1.4.6 **Zkoušený přípravek**

Přípravek zkušební látky (např. čistý, zředěný nebo přísadami doplněný materiál obsahující zkoušenou chemickou látku která je aplikována na kůži) by měl být stejný jako přípravek, kterému lidé nebo jiné potenciálně cílové druhy mohou být exponováni (nebo by měl být jeho realistickou náhražkou). Jakákoli odchylka od užívaného přípravku musí být zdůvodněna.

▼B

1.4.7 **Koncentrace a přípravky zkoušené látky**

Obvykle je použita více než jedna koncentrace zkoušené látky zahrnující maximální potenciální expozice člověka. Podobně by mělo být uváženo zkoušení určitého spektra skladby obvyklých přípravků.

1.4.8 **Aplikace na kůži**

Za běžných podmínek expozice lidí chemickým látkám se obvykle setkáváme s konečnými dávkami. Proto by mělo být aplikováno množství, které imituje expozici člověka, obvykle 1–5 mg/cm^2 kůže pro tuhé látky a až 10 µl/cm^2 pro kapaliny. Aplikované množství by mělo být zdůvodněno předpokládanými podmínkami použití, cíli studie nebo fyzikálními vlastnostmi zkoušeného přípravku. Např. aplikace na povrch kůže může být neurčitá, jsou-li aplikovány velké objemy na jednotku plochy.

1.4.9 **Teplota**

Pasivní difuse chemických látek (a tudíž i jejich absorpce kůží) závisí na teplotě. Difusní komora a kůže by měly být udržovány při konstantní teplotě blízké normální teplotě kůže okolo 32 ± 1 °C. Různé konstrukce cely budou vyžadovat různou vodní lázeň nebo teplotu vyhřívaných bloků k zajištění toho, aby byl dotyčný receptor kůže temperován na svůj fyziologický standard. Vlhkost by měla být přednostně v rozmezí 30 až 70 %.

1.4.10 **Doba trvání expozice a vzorkování**

Expozice kůže zkoušenému přípravku může trvat po celou dobu experimentu nebo po kratší doby (tj. může imitovat specifické typy lidské expozice). Kůže by měla být omytím zbavena nadbytku zkušebního preparátu relevantním čisticím činidlem a tato činidla by měla být sebrána pro účely analýzy. Tyto postupy očištění od zkoušeného přípravku závisí na předpokládaných podmínkách použití a měly by být zdůvodněny. Obvykle se požaduje doba vzorkování 24 hodin, aby bylo možno dostatečně charakterizovat absorpční profil. Doba vzorkování by za normálních okolností neměla přesáhnout 24 hodin, neboť po této době se neporušenost kůže může začít horšit. V případě zkoušených látek rychle pronikající kůží to nemusí být nutné, v případě látek pronikajících kůží pomalu však není vyloučena nutnost delších dob. Frekvence vzorkování recepční tekutiny by měla umožnit grafickou prezentaci absorpční profil zkoušené látky.

1.4.11 **Terminální postupy**

Všechny složky zkušebního systému by měly být analyzovány a měl by být stanoven výtěžek znovuzáchytu. To zahrnuje donorovu komoru, oplachy povrchu kůže, kožní preparát a recepční tekutinu/komoru. V některých případech může být kůže frakcionována na exponovaný povrch kůže a povrch kůže pod přírubou cely a na frakce vrstvy *stratum corneum*, epidermis a dermis k oddděleným analýzám.

1.4.12 **Analýza**

Ve všech studiích by mělo být dosaženo dostatečného znovuzáchytu (cílem by mělo být dosažení střední hodnoty 100 ± 10 % radioaktivity). Množství zkoušené látky v receptorové tekutině, v kožním preparátu, ve zbytcích po očištění povrchu kůže a oplachu aparatury by měly být analyzováno vhodným postupem.

▼B

2. **ÚDAJE**

Prezentovány by měly být údaje o analýze receptorové tekutiny, distribuci zkoušené chemické látky a časové závislosti absorpčního profilu. Pro podmínky expozice konečnou dávkou by mělo být vypočteno množství omyté z kůže, množství spojené s kůží (a v různých vrstvách kůže, je-li analyzováno) a množství obsažené v recepční tekutině (podíl a množství nebo procentní podíl aplikované dávky). Absorpce kůží může být v některých případech vyjádřena pouze užitím údajů o recepční tekutině. Zůstává-li však zkoušená látka v kůži při skončení studie, může být nutné toto množství zahrnout do celkového absorbovaného množství (viz odkaz na literaturu 3, odstavec 66). Pro podmínky expozice neurčitou dávkou mohou údaje umožnit výpočet permeabilní konstanty (Kp). Za těchto podmínek není absorbovaný procentní podíl relevantní.

3. **ZPRÁVY**

3.1 ZKUŠEBNÍ PROTOKOL

Zkušební protokol musí zahrnout požadavky stanovené protokolem, včetně zdůvodnění použitého zkušebního systému, a měl by obsahovat:

Zkoušená látka:

— fyzikální povaha, fyzikálně-chemické vlastnosti (přinejmenším molární hmotnost a rozdělovací koeficient log P_{ow}), čistota (radiochemická čistota),

— identifikační údaje (např. číslo šarže),

— rozpustnost v recepční tekutině.

Zkoušený přípravek:

— složení a zdůvodnění použití,

— homogenita.

Zkušební podmínky:

— zdroj a místo kůže, metoda preparace, podmínky skladování před použitím, všechny předúpravy (čištění, antibiotické ošetření atd.), zjišťování neporušenosti kůže, metabolický status, zdůvodnění použití,

— konstrukce cely, složení recepční tekutiny, rychlost toku recepční tekutiny nebo doby a postupy vzorkování,

— podrobnosti aplikace zkoušeného přípravku a kvantifikace aplikované dávky,

— doba expozice,

— podrobnosti odstranění zkoušeného přípravku z kůže, např. oplachem kůže,

— podrobnosti analýzy kůže a frakcionačních postupů použitých ke zjištění distribuce v kůži,

▼B

— postupy mytí cely a zařízení,

— metody stanovení, extrakční postupy, meze detekce a validace analytických metod.

Výsledky:

— celkový znovuzáchyt experimentu (aplikovaná dávka = obsah v mycích činidlech z kůže + obsah v kůži + obsah v recepční tekutině + obsah v mycích činidlech cely),

— tabelované výsledné znovuzáchyty jednotlivých cel v každém kompartmentu,

— absorpční profil,

— tabelované absorpční údaje (vyjádřené jako podíl, množství nebo procentní podíl).

Rozbor výsledků.

Závěry.

4. **LITERATURA**

1) Zkušební metoda B.44 Absorpce kůží: metoda *in vivo*.

2) OECD (2002). Guidance Document for the Conduct of Skin Absorption Studies. OECD, Paris.

3) OECD (2000). Report of the Meeting of the OECD Extended Steering Committee for Percutaneous Absorption Testing, Annex 1 to ENV/JM/TG(2000)5. OECD, Paris.

4) Kemppainen BW and Reifenrath WG. (1990). Methods for skin absorption. CRC Press, Boca Raton.

5) Bronaugh RL and Collier, SW. (1991). Protocol for *In vitro* Percutaneous Absorption Studies, in *In vitro Percutaneous Absorption: Principles, Fundamentals and Application*s, RL Bronaugh and HI Maibach, Eds., CRC Press, Boca Raton, s. 237–241.

6) Bronaugh RL and Maibach HI. (1991). *In vitro Percutaneous Absorption: Principles, Fundamentals and Application*s. CRC Press, Boca Raton.

7) European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals (1993). Monograph No. 20, Percutaneous Absorption, ECETOC, Brussels.

8) Diembeck W, Beck H, Benech-Kieffer F, Courtellemont P, Dupuis J, Lovell W, Paye M, Spengler J, Steiling W (1999). Test Guidelines for *In Vitro* Assessment of Dermal Absorption and Percutaneous Penetration of Cosmetic Ingredients, Fd Chem Tox, 37, 191–205.

9) Recommended Protocol for *In vitro* Percutaneous Absorption Rate Studies (1996). US Federal Register, Vol. 61, No. 65.

10) Howes D, Guy R, Hadgraft J, Heylings JR *et a*l. (1996). Methods for assessing Percutaneous absorption. ECVAM Workshop Report ATLA 24, 81 R10.

▼B

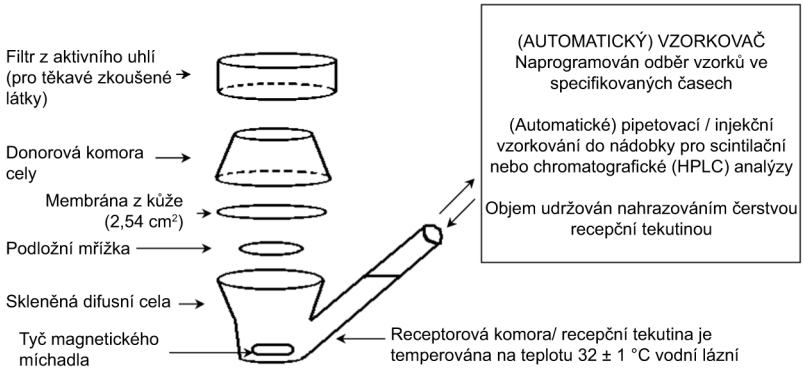
11) Schaefer H and Redelmeier TE. (1996). Skin barrier: principles of percutaneous absorption. Karger, Basel.

12) Roberts MS and Walters KA. (1998). Dermal absorption and toxicity assessment. Marcel Dekker, New York.

13) Jewell, C., Heylings, JR., Clowes, HM. And Williams, FM. (2000). Percutaneous absorption and metabolism of dinitrochlorobenzene in vitro. Arch Toxicol 74: 356–365.

Obrázek 1

Příklad obvyklé konstrukce statické difusní cely pro studie perkutánní absorpce *in vitro*



▼M8

B.46 DRÁŽDĚNÍ KŮŽE *IN VITRO*: ZKUŠEBNÍ METODA ZA POUŽITÍ REKONSTRUOVANÉ LIDSKÉ *EPIDERMIS*

ÚVOD

1. Tato zkušební metoda je rovnocenná Pokynu OECD pro zkoušení (TG) č. 439 (2015). Dráždění kůže znamená tvorbu reverzibilního poškození kůže po aplikaci zkoušené látky v délce až 4 hodin [jak ji definuje globálně harmonizovaný systém klasifikace a označování chemických látek (GHS) OSN] (1) a nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1272/2008 o klasifikaci, označování a balení látek a směsí. (dále jen „nařízení CLP“) ([1]). Tato zkušební metoda stanoví postup *in vitro*, který lze použít k určení nebezpečnosti dráždivých chemikálií (látek a směsí) patřících v rámci systému GHS OSN a nařízení CLP do kategorie 2 (2). V oblastech, které nepřijaly volitelnou kategorii 3 systému GHS OSN (slabě dráždivé látky), se může tato zkušební metoda rovněž používat k identifikaci neklasifikovaných látek. Proto může být v závislosti na regulačním rámci a používaném systému klasifikace tato zkušební metoda užívaná k určení dráždivých účinků chemických látek na kůži jako samostatná zkouška nahrazující zkoušky dráždění kůže *in vivo*, nebo jako částečná náhradní zkouška v rámci strategie zkoušení (3).

2. Hodnocení dráždivých účinků na kůži obvykle zahrnovalo používání laboratorních zvířat [zkušební metoda B.4, rovnocenná Pokynu OECD pro zkoušení č. 404 původně vydanému v roce 1981 a revidovanému v letech 1992, 2002 a 2015] (4). Pro zkoušení leptavých účinků byly přijaty tři validované zkušební metody *in vitro* jako zkušební metoda EU B.40 (rovnocenná Pokynu OECD pro zkoušení č. 430), zkušební metoda OECD B.40a (rovnocenná Pokynu OECD pro zkoušení č. 431) a zkušební metoda B.65 (rovnocenná Pokynu OECD pro zkoušení č. 435) (5) (6) (7). Pokyny OECD k integrovanému přístupu ke zkouškám a posuzování (IATA) dráždivých/leptavých účinků na kůži popisují několik modulů obsahujících informační zdroje a analytické nástroje a poskytují návod i) na integraci a používání stávajících údajů ze zkoušek i jiných údajů pro posouzení potenciálu dráždivých a leptavých účinků chemických látek na kůži a ii) navrhují přístup, když je nutné další zkoušení (3).

3. Tato zkušební metoda se týká sledovaných vlastností dráždivých účinků na kůži z hlediska lidského zdraví. Vychází ze zkušebního systému *in vitro* s využitím rekonstruované lidské *epidermis* (RhE), která věrně napodobuje biochemické a fyziologické vlastnosti svrchních částí lidské kůže, tj. *epidermis*. Zkušební systém používá jako zdroje buněk netransformované keratinocyty získané z lidské epidermis na rekonstrukci epidermálního modelu s reprezentativní histologií a cytoarchitekturou. K dispozici jsou také standardy funkčnosti usnadňující validaci a posuzování podobných a modifikovaných metod založených na použití rekonstruované lidské epidermis v souladu se zásadami uvedenými v pokynu OECD č. 34 (8) (9). Odpovídající pokyn pro zkoušení byl původně přijat v roce 2010, v roce 2013 byl aktualizován o další zkušební modely používající rekonstruovanou lidskou epidermis a dále byl aktualizován v roce 2015 o odkazy na pokyny IATA a bylo zavedeno použití alternativního postupu na měření životaschopnosti.

4. Pro čtyři komerčně dostupné zkušební modely *in vitro* založené na zkušebním systému RhE (citlivost 80 %, specifičnost 70 % a přesnost 75 %) (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20) (21) (22) (23) (24) (25) (26) (27) (28) byly provedeny prevalidační, optimalizační a validační studie. Uvedené čtyři zkušební modely jsou zařazeny v této zkušební

([1]) Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1272/2008 ze dne 16. prosince 2008 o klasifikaci, označování a balení látek a směsí, o změně a zrušení směrnic 67/548/EHS a 1999/45/ES a o změně nařízení (ES) č. 1907/2006, Úř. věst. L 353, 31.12.2008, s. 1.

▼**M8**

metodě a uvedeny v dodatku 2, kde jsou také informace o typu validační studie použité pro validaci příslušných zkušebních metod. Jak se uvádí v dodatku 2, byla pro vývoj stávající zkušební metody a standardů funkčnosti použita validovaná referenční metoda (VRM) (8).

5. Vzájemné uznávání údajů podle OECD bude zaručeno pouze u zkušebních modelů validovaných podle standardů funkčnosti (8), pokud tyto zkušební modely byly podrobeny revizi a pokud je OECD přijala. Zkušební modely zahrnuté do této zkušební metody a odpovídající pokyn OECD pro zkoušení mohou být použity bez rozdílu pro účely požadavků jednotlivých zemí na výsledky zkoušek u zkušebních metod pro dráždivé účinky na kůži *in vitro*, přičemž může být využito vzájemné uznávání údajů.

6. Definice výrazů použitých v tomto dokumentu jsou uvedeny v dodatku 1.

VÝCHOZÍ ÚVAHY A OMEZENÍ

7. Jak prokazuje úplná prospektivní validační studie hodnotící a charakterizující zkušební metody RhE (16), omezením této zkušební metody je to, že neumožňuje klasifikaci chemických látek do volitelné kategorie 3 v rámci systému GHS OSN (slabě dráždivé látky) (1). Jak bude tato zkušební metoda používána určí tedy platný právní rámec členských zemí. Pro EU není kategorie 3 zařazena do nařízení CLP. Pro úplné vyhodnocení lokálních účinků na kůži po jediné kožní expozici je třeba postupovat podle pokynů OECD k integrovanému přístupu ke zkouškám a posuzování (3). Je známo, že použití lidské kůže je předmětem vnitrostátních a mezinárodních etických úvah a podmínek.

8. Tato zkušební metoda se týká sledovaných vlastností dráždivých účinků na kůži z hlediska lidského zdraví. I když tato zkušební metoda neposkytuje odpovídající informace o poleptání kůže, je třeba poznamenat, že zkušební metoda B.40a (rovnocenná Pokynu OECD pro zkoušení č. 431) o poleptání kůže je založena na tomtéž zkušebním systému za použití rekonstruované lidské epidermis, i když podle jiného protokolu (6). Tato zkušební metoda je založena na modelech rekonstruované lidské epidermis s použitím lidských keratinocytů, které proto představují cílový orgán *in vitro* zájmového biologického druhu. Kromě toho se přímo týká prvního stupně zánětlivé kaskády/mechanismu účinku (poškození buněk a tkání vedoucí ke vzniku lokalizovaného traumatu), k němuž dochází při podráždění *in vivo*. Při validaci této zkušební metody byla testována široká škála chemických látek a databáze validační studie obsahuje celkem 58 látek (16) (18) (23). Zkušební metodu lze používat pro pevné látky, kapaliny, polotuhé látky a vosky. Kapaliny mohou být vodné či nevodné, pevné látky mohou být ve vodě rozpustné či nerozpustné. Pevné látky by měly být pokud možno před aplikací rozemlety na jemný prášek, žádná další předběžná úprava vzorku není vyžadována. Plyny a aerosoly dosud nebyly ve validační studii hodnoceny (29). Ačkoli není jejich zkoušení postupem za použití rekonstruované lidské epidermis teoreticky vyloučeno, současná zkušební metoda zkoušení plynů a aerosolů neumožňuje.

9. Před použitím této zkušební metody ke zkoušení směsi s cílem získat údaje pro zamýšlené regulační účely by mělo být zváženo, zda tato metoda může pro tento účel poskytnout přiměřené výsledky, a pokud ano, proč tomu tak je. Takové úvahy nejsou nutné, pokud existuje právní požadavek na zkoušení dané směsi. Avšak vzhledem ke skutečnosti, že směsi zahrnují širokou škálu kategorií a složení a že v současné době jsou k dispozici pouze omezené

▼**M8**

údaje o zkoušení směsí, v případech, kdy lze prokázat nepoužitelnost této zkušební metody pro konkrétní kategorii směsí (např. podle strategie navržené v Eskes *et al.*, 2012 (30)), by se tato zkušební metoda neměla používat pro tuto konkrétní kategorii směsí. Podobně opatrně je třeba postupovat v případě, kdy se zjistí, že konkrétní chemické třídy nebo fyzikálně chemické vlastnosti nejsou u stávající zkušební metody použitelné.

10. Zkoušené chemické látky absorbující světlo ve stejném pásmu jako formazan MTT a zkoušené chemické látky schopné přímé redukce vitálního barviva MTT (na formazan MTT) mohou interferovat s měřením životaschopnosti buněk, proto je třeba pro korekce použít upravené kontroly (viz odstavce 28–34).

11. U zkoušené látky s jednoznačnou klasifikací by mělo stačit jedno provedení zkoušky za použití tří tkáňových replikátů. Avšak v případě hraničních výsledků, jako jsou například nesouhlasné výsledky opakovaných měření a/nebo průměrná hodnota životaschopnosti ve výši 50 ± 5 %, by se mělo zvážit druhé provedení zkoušky, jakož i třetí provedení zkoušky v případě nesouhlasných výsledků mezi prvními dvěma provedeními zkoušky.

PRINCIP ZKOUŠKY

12. Zkoušená látka se místně nanese na trojrozměrný model rekonstruované lidské epidermis tvořené netransformovanými keratinocyty získanými z lidské epidermis, které byly kultivovány tak, aby vytvořily vícevrstvý, vysoce diferenciovaný model lidské *epidermis*. Skládá se z uspořádaných bazálních, výběžkovitých a granulárních vrstev a vícevrstevného *stratum corneum*, jež obsahuje mezibuněčné lamelární lipidové vrstvy představující hlavní třídy lipidů analogické těm, které se nacházejí *in vivo*.

13. Chemicky vyvolané podráždění kůže, které se projevuje zejména zarudnutím (erytém) a otokem (edém), je výsledkem kaskády událostí, která začíná proniknutím chemických látek přes *stratum corneum*, kde mohou poškodit pod ním se nacházející vrstvy keratinocytů a další kožní buňky. Poškozené buňky mohou uvolňovat zánětlivé mediátory, nebo indukovat zánětlivou kaskádu, jež působí také na buňky v *dermis*, zejména na stromatické a endoteliální buňky cév. Jedná se o rozšíření a zvýšení propustnosti endoteliálních buněk, při nichž vzniká pozorovaný erytém a edém (29). Zejména zkušební metody na bázi RhE měří při nepřítomnosti vaskularizace ve zkušebním systému *in vitro* počáteční události kaskády, např. poškození buněk/tkání (16) (17), s využitím životaschopnosti buněk jako odečítané hodnoty.

14. Životaschopnost buněk v modelech RhE se měří enzymatickou přeměnou vitálního barviva MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyl-2H-tetrazolium-bromid, thiazolylová modř, číslo CAS 298-93-1] na sůl modrého formazanu, jehož množství se změří po extrakci z tkání (31). Dráždivé látky se zjišťují na základě jejich schopnosti snižovat životaschopnost buněk pod definované prahové úrovně (tj. ≤ 50 % pro dráždivé látky patřící v rámci systému GHS OSN / nařízení CLP do kategorie 2). V závislosti na právním rámci a použitelnosti zkušební metody lze zkoušené chemické látky, při jejichž použití životaschopnost buněk přesahuje definovanou prahovou úroveň, považovat za nedráždivé (tzn. > 50 %, „bez kategorie“).

▼M8

PROKÁZÁNÍ ZPŮSOBILOSTI

15. Dříve než začnou laboratoře rutinně používat kterýkoli ze čtyř validovaných zkušebních modelů, který dodržuje tuto zkušební metodu (dodatek 2), měly by prokázat svou odbornou způsobilost pomocí deseti vhodných látek uvedených v tabulce 1. V situacích, kdy některá z uvedených látek není k dispozici, lze použít jinou látku, u níž jsou k dispozici odpovídající referenční údaje o použití *in vivo* a *in vitro* (např. ze seznamu referenčních chemických látek (8)), pokud budou použita stejná kritéria výběru jako kritéria popsaná v tabulce 1. Použití alternativní vhodné látky je třeba zdůvodnit.

16. V rámci zkoušení způsobilosti se doporučuje, aby uživatelé po obdržení modelu rekonstruované lidské epidermis ověřili bariérové vlastnosti tkání uvedené jeho výrobcem. To je zvláště důležité v případě, že se tkáně zasílají na dlouhé vzdálenosti nebo že jejich přeprava trvá dlouhou dobu. Pokud je zkušební metoda úspěšně zavedena a je získána a prokázána způsobilost správně tuto metodu používat, není nutno takové ověřování běžně provádět. Při běžném používání zkušební metody se však doporučuje i nadále v pravidelných intervalech posuzovat bariérové vlastnosti.

Tabulka 1

Vhodné látky ([1])

Látka	Číslo CAS	Skóre *in vivo* ([2])	Skupenství	Kategorie GHS OSN
NEKLASIFIKOVANÉ LÁTKY (bez kategorie GHS OSN)				
kyselina naftalen-1-octová	86-87-3	0	Pevná látka	Bez kategorie
isopropylalkohol	67-63-0	0,3	Kapalina	Bez kategorie
methyl-stearát	112-61-8	1	Pevná látka	Bez kategorie
heptyl-butyrát	5870-93-9	1,7	Kapalina	Bez kategorie *(Volitelná kat. 3)* ([3])
hexyl-salicylát	6259-76-3	2	Kapalina	Bez kategorie *(Volitelná kat. 3)* ([3])
KLASIFIKOVANÉ LÁTKY (kategorie 2 GHS OSN)				
cyklamenaldehyd	103-95-7	2,3	Kapalina	Kat. 2
1-bromhexan	111-25-1	2,7	Kapalina	Kat. 2
hydroxid draselný (5 % vod.)	1310-58-3	3	Kapalina	Kat. 2
3-fenyl-1-methylpiperazin	5271-27-2	3,3	Pevná látka	Kat. 2
heptanal	111-71-7	3,4	Kapalina	Kat. 2

([1]) Vhodné látky jsou podskupina látek používaných při validační studii a výběr vychází z těchto kritérií, i) chemické látky jsou komerčně dostupné; ii) jsou reprezentativními zástupci celého rozsahu Draizeho škály dráždivosti (od nedráždivých až po silně dráždivé látky); iii) mají jasně definovanou chemickou strukturu; iv) jsou typickým příkladem chemické funkčnosti používané ve validačním procesu; v) vykázaly reprodukovatelné výsledky *in vitro* v řadě zkoušek a laboratoří; vi) byly správně určeny *in vitro;* a vii) nejsou spojeny s mimořádně toxickým profilem (např. karcinogenní látky, nebo nejde o látky toxické pro reprodukční systém) a nejsou spojeny s neúnosnými náklady na likvidaci.

([2]) Skóre *in vivo* podle zkušební metody B.4 (4).

([3]) V rámci této zkušební metody se látky patřící podle systému GHS OSN do volitelné kategorie 3 (slabě dráždivé látky) (1) považují za látky s označením „bez kategorie“.

▼M8

POSTUP

17. Následuje popis složek a postupů zkušební metody s použitím rekonstruované lidské epidermis při posouzení dráždění kůže (viz také dodatek 3, kde jsou uvedeny parametry týkající se jednotlivých zkušebních modelů). Pro čtyři modely vhodné pro tuto zkušební metodu jsou k dispozici standardní prováděcí postupy (32) (33) (34) (35).

SLOŽKY ZKUŠEBNÍ METODY S POUŽITÍM REKONSTRUOVANÉ LIDSKÉ EPIDERMIS

Obecné podmínky

18. K rekonstrukci epitelu je zapotřebí použít netransformované lidské keratinocyty. Pod funkční vrstvou *stratum corneum* by mělo být přítomno několik vrstev životaschopných epitelových buněk (bazální vrstva, *stratum spinosum*, *stratum granulosum*). *Stratum corneum* by mělo být vícevrstevné a obsahovat profil esenciálních lipidů k vytvoření funkční bariéry robustní natolik, aby vzdorovala rychlému průniku cytotoxických referenčních látek, např. dodecylsulfátu sodného (SDS) nebo přípravku Triton X-100. Bariérová funkce by měla být prokázána a lze ji hodnotit buď určením koncentrace, při níž referenční chemická látka snižuje životaschopnost tkání o 50 % (IC_{50}) po pevně stanovené expoziční době, nebo stanovením expoziční doby potřebné ke snížení životaschopnosti buněk o 50 % (ET_{50}) po aplikaci referenční chemické látky v pevně stanovené koncentraci. Zadržovací vlastnosti modelu rekonstruované lidské *epidermis* by měly zabránit průchodu materiálu v oblasti *stratum corneum* do životaschopné tkáně, což by vedlo k nesprávnému modelování expozice kůže. Model rekonstruované lidské epidermis by neměl být kontaminován bakteriemi, viry, mykoplazmaty ani houbovými mikroorganismy.

Funkční podmínky

Životaschopnost

19. K určení životaschopnosti se používá zkouška MTT (31). Vitální buňky tkáňového modelu dokážou redukovat vitální barvivo MTT na modrou sraženinu formazanu, která je poté z tkáně extrahována pomocí isopropylalkoholu (nebo podobného rozpouštědla). Optická hustota (OD) samotného extrakčního rozpouštědla by měla být dostatečně malá, tzn. OD < 0,1. Extrahovaný formazan MTT může být kvantifikován pomocí standardního měření absorbance (OD) nebo spektrofotometrickým postupem HPLC/UPLC (36). Uživatelé modelu rekonstruované lidské epidermis by měli zajistit, aby každá použitá šarže modelu rekonstruované lidské epidermis splňovala stanovená kritéria pro negativní kontrolu. Rozsah přijatelnosti (horní a dolní mez) hodnot OD negativní kontroly (za podmínek zkušební metody pro dráždění kůže) stanoví subjekt, který model rekonstruované lidské epidermis vyvinul nebo dodává. Rozsahy přijatelnosti pro čtyři validované modely RhE zařazené do této zkušební metody jsou uvedeny v tabulce 2. Uživatel spektrofotometrie HPLC/UPLC by měl jako kritérium přijatelnosti pro negativní kontrolu používat rozsahy OD negativní kontroly uvedené v tabulce 2. Je třeba doložit, že tkáně ošetřené negativní kontrolou jsou stabilně kultivovány (poskytují podobné naměřené hodnoty životaschopnosti) po dobu trvání zkušební doby expozice.

Tabulka 2

Rozsahy přijatelnosti pro hodnoty OD negativní kontroly zkušebních modelů zařazených do této zkušební metody

	Dolní mez přijatelnosti	Horní mez přijatelnosti
EpiSkin™ (SM)	≥ 0,6	≤ 1,5
EpiDerm™ SIT (EPI-200)	≥ 0,8	≤ 2,8

▼**M8**

	Dolní mez přijatelnosti	Horní mez přijatelnosti
SkinEthic™ RHE	≥ 0,8	≤ 3,0
LabCyte EPI-MODEL24 SIT	≥ 0,7	≤ 2,5

Bariérová funkce

20. Lipidové složení s*tratum corneum* by mělo stačit na to, aby odolávalo rychlému průniku cytotoxických referenčních chemických látek (např. SDS nebo Triton X-100) podle odhadu na základě hodnoty IC_{50} nebo ET_{50} (tabulka 3).

Morfologie

21. Mělo by se provést histologické vyšetření modelu rekonstruované lidské epidermis, které prokáže strukturu podobnou lidské epidermis (včetně víceVrstevné vrstvy *stratum corneum*).

Reprodukovatelnost

22. Výsledky pozitivních a negativních kontrol zkušební metody by měly prokázat reprodukovatelnost v průběhu času.

Kontrola kvality

23. Model rekonstruované lidské epidermis by měl být použit pouze v případě, že subjekt, který jej vyvinul nebo dodává, prokáže, že každá použitá šarže modelu RhE splňuje stanovená produkční kritéria pro uvolnění do oběhu, přičemž mezi nejvýznamnější z nich patří kritéria *životaschopnosti* (odstavec 19), *bariérové funkce* (odstavec 20) a *morfologie* (odstavec 21). Tyto údaje by měly být poskytovány uživatelům zkušební metody, aby je mohli uvést v závěrečné zprávě. Rozsah přijatelnosti (horní a dolní mez) pro IC_{50} nebo ET_{50} by měl stanovit subjekt, který model rekonstruované lidské epidermis vyvinul nebo dodává. Pro spolehlivou predikci klasifikace zkoušené látky, pokud jde o dráždivost, mohou být přijatelné pouze výsledky získané za použití náležitých tkání. V tabulce 3 jsou uvedeny rozsahy přijatelnosti pro čtyři zkušební modely zařazené do této zkušební metody.

Tabulka 3

Kvalitativní kritéria pro propouštění šarží zkušebních modelů zařazených do této zkušební metody

	Dolní mez přijatelnosti	Horní mez přijatelnosti
EpiSkin™ (SM) (18 hodin expozice za použití SDS) (32)	IC_{50} = 1,0 mg/ml	IC_{50} = 3,0 mg/ml
EpiDerm™ SIT (EPI-200) (1 % Triton X-100)(33)	ET_{50} = 4,0 hod.	ET_{50} = 8,7 hod.
SkinEthic™ RHE (1 % Triton X-100)(34)	ET_{50} = 4,0 hod.	ET_{50} = 10,0 hod.
LabCyte EPI-MODEL24 SIT (18 hodin expozice za použití SDS) (35)	IC_{50} = 1,4 mg/ml	IC_{50} = 4,0 mg/ml

▼M8

Aplikace zkoušených a kontrolních chemických látek

24. Pro každou zkoušenou chemickou látku a pro kontroly by se při každém provedení zkoušky měly použít alespoň tři replikáty. V případě kapalných a pevných chemických látek je zapotřebí nanést dostatečné množství zkoušené látky, aby rovnoměrně pokryla povrch epidermis, a současně se vyhnout nekonečné dávce, tzn. od 26 do 83 $\mu l/cm^2$ nebo mg/cm^2 (viz dodatek 3). V případě pevných chemických látek je nutno povrch *epidermis* před nanesením zvlhčit deionizovanou nebo destilovanou vodou, aby se zlepšil kontakt zkoušené chemické látky s povrchem *epidermis*. Pevné látky by se měly pokud možno zkoušet ve formě jemného prášku. V některých případech lze použít jako aplikační pomůcku nylonovou síťku (viz dodatek 3). Na konci expoziční doby je nutno zkoušenou látku pečlivě spláchnout z povrchu epidermis vodným pufrem nebo 0,9 % roztokem NaCl. V závislosti na použitém zkušebním modelu RhE se doba expozice pohybuje v rozmezí od 15 do 60 minut a teplota inkubace v rozmezí od 20 do 37 ^{o}C. Tyto expoziční doby a teploty jsou optimalizovány pro každou zkušební metodu s použitím rekonstruované lidské epidermis a představují různé inherentní vlastnosti zkušebních modelů (např. bariérová funkce) (viz dodatek 3).

25. Při každém provedení zkoušky by se měly používat souběžné negativní kontroly (NC) a pozitivní kontroly (PC), aby se prokázalo, že životaschopnost (při použití negativních kontrol), bariérová funkce a výsledná tkáňová citlivost tkání (při použití pozitivní kontroly) jsou v rámci stanoveného rozpětí historických hodnot přijatelnosti. Navrhovanou pozitivní kontrolou je 5 % vodný SDS. Navrhovanými látkami pro negativní kontrolu jsou voda nebo fosfátový pufrový fyziologický roztok (PBS).

Měření životaschopnosti buněk

26. Podle zkušebního postupu je velmi důležité, aby se měření životaschopnosti neprovádělo okamžitě po expozici působení zkoušené chemické látky, ale až po dostatečně dlouhé inkubační době po ošetření po opláchnutí tkáně v čerstvém médiu. Tato doba umožňuje jak regeneraci po slabých dráždivých účincích, tak i vznik jasných známek cytotoxických účinků. V průběhu optimalizace zkoušek dvou zkušebních modelů na bázi RhE pro tuto zkušební metodu bylo zjištěno, že optimální inkubační doba je 42 hodin po expozici (11) (12) (13) (14) (15).

27. Zkouška MTT je standardizovaná kvantitativní metoda, která by se měla používat k měření životaschopnosti buněk podle této zkušební metody. Je slučitelná s použitím trojrozměrné tkáňové soustavy. Vzorek tkáně se na dobu 3 hodin vloží do roztoku MTT o vhodné koncentraci (např. 0,3–1 mg/ml). Životaschopné buňky přemění MTT na modrý formazan. Vysrážený modrý formazan se poté extrahuje z tkáně pomocí rozpouštědla (např. isopropylalkoholu nebo kyselého isopropylalkoholu) a koncentrace formazanu se změří určením OD při vlnové délce 570 nm za použití filtru o pásmové propustnosti nejvýše ±30 nm, nebo spektrofotometrickým postupem HPLC/UPLC (viz odstavec 34) (36).

28. Optické vlastnosti zkoušené látky nebo její chemické působení na MTT (např. chemické látky mohou zabránit zabarvení, změnit zabarvení v opačné, nebo naopak mohou zabarvení způsobit) mohou zkoušku ovlivnit, což vede k nepravdivému odhadu životaschopnosti. K tomu může dojít v případě, že se určitá zkoušená látka opláchnutím z tkáně zcela neodstraní nebo že pronikne do *epidermis*. Jestliže zkoušená látka působí přímo na MTT (např. redukuje MTT), má přirozené zabarvení nebo se zabarví během svého

▼M8

působení na tkáň, pak jsou ke zjištění interference zkoušené chemické látky s postupem měření životaschopnosti buněk a ke korekci této interference zapotřebí dodatečné kontroly (viz odstavce 29 a 33). Podrobný popis, jak korigovat přímou redukci MTT a interference způsobené barvivy, naleznete ve standardních prováděcích postupech výše uvedených čtyř validovaných modelů zařazených do této zkušební metody (32) (33) (34) (35).

29. Aby bylo možné identifikovat přímá redukční činidla MTT, je třeba každou zkoušenou chemickou látku přidávat do čerstvě připraveného roztoku MTT. Jestliže směs MTT obsahující zkoušenou chemickou látku zmodrá/zfialoví, je zkoušená chemická látka považována za přímé redukční činidlo MTT, přičemž je třeba provést další funkční kontrolu na neživotaschopné tkáně RhE nezávisle na použití standardního měření absorbance (OD) nebo spektrofotometrického postupu HPLC/UPLC. Tato další funkční kontrola využívá neživé tkáně, které mají pouze zbytkovou metabolickou aktivitu, ale absorbují zkoušenou chemickou látku podobně jako životaschopné tkáně. Každá zkoušená chemická látka redukující MTT se aplikuje na alespoň dva neživé tkáňové replikáty, které se podrobí celému zkušebnímu postupu, aby došlo k nespecifické redukci MTT (NSMTT) (32) (33) (34) (35). Postačí jedna kontrola NSMTT na zkoušenou chemickou látku bez ohledu na počet provedených nezávislých zkoušek/experimentů. Skutečná životaschopnost tkáně se poté vypočítá jako procentuální životaschopnost tkáně získaná z živých tkání vystavených působení redukčního činidla MTT minus procentuální nespecifická redukce MTT získaná z neživých tkání vystavených stejnému redukčnímu činidlu MTT, počítáno ve vztahu k negativní kontrole prováděné souběžně s korigovanou zkouškou (% NSMTT).

30. Aby bylo možné zjistit potenciální interferenci zabarvených zkoušených chemických látek nebo zkoušených chemických látek, které se zabarvily při kontaktu s vodou nebo isopropylalkoholem, a rozhodnout, zda je nutné provést další kontroly, je třeba provést spektrální analýzu zkoušené chemické látky ve vodě (prostředí v průběhu expozice) anebo v isopropylalkoholu (extrakční roztok). Jestliže zkoušená chemická látka ve vodě anebo isopropylalkoholu absorbuje světlo v pásmu 570 ± 30 nm, je třeba provést další kontroly s barvivy, případně použít spektrofotometrický postup HPLC/UPLC, přičemž v tomto případě nejsou tyto kontroly nutné (viz odstavce 33 a 34). Při provádění standardního měření absorbance (OD) se každá interferující zbarvená zkoušená chemická látka aplikuje na alespoň dva životaschopné tkáňové replikáty, které se podrobí celému zkušebnímu postupu, ale v průběhu inkubačního kroku MTT se inkubují v médiu místo v roztoku MTT za účelem vytvoření kontroly nespecifického zbarvení (NSC_{living}). Vzhledem k inherentní biologické variabilitě živých tkání je třeba kontrolu NSC_{living} provádět souběžně se zkoušením zbarvené chemické látky a v případě většího počtu zkoušek je třeba u každé zkoušky (při každém provedení zkoušky) provést nezávislou kontrolu NSC_{living}. Skutečná životaschopnost tkáně se poté vypočítá jako procentuální životaschopnost tkáně získaná z živých tkání vystavených působení interferující zkoušené chemické látky a inkubovaných v roztoku MTT minus procentuální nespecifické zbarvení získané z živých tkání vystavených působení interferující zkoušené chemické látky a inkubovaných v médiu bez MTT, prováděno souběžně s korigovanou zkouškou (% NSC_{living}).

31. Zkoušené chemické látky, u nichž se zjistí, že přímo redukují MTT (viz odstavec 29) a působí barevné interference (viz odstavec 30), budou při provádění standardního měření absorbance (OD) také vyžadovat třetí sadu kontrol vedle kontrol NSMTT a NSC_{living} popsaných v předchozích odstavcích. Obvykle je tomu tak u tmavě zbarvených zkoušených chemických látek interferujících se zkouškou MTT (např. modré, fialové, černé), protože jejich

▼M8

vlastní barva narušuje posouzení jejich schopnosti přímo redukovat MTT, jak je popsáno v odstavci 29. Tyto zkoušené chemické látky se mohou vázat na živé i neživé tkáně, a proto kontrola NSMTT musí nejen korigovat potenciální přímou redukci MTT způsobenou zkoušenou chemickou látkou, ale také barevnou interferenci vznikající z vazby zkoušené chemické látky na neživé tkáně. Mohlo by to vést k dvojí korekci barevné interference, protože kontrola NSC_{living} již koriguje barevnou interferenci vznikající z vazby zkoušené chemické látky na živé tkáně. Aby byla vyloučena možná dvojí korekce barevné interference, je třeba provést třetí kontrolu na nespecifické zbarvení u neživých tkání (NSC_{killed}). Při této další kontrole se zkoušená chemická látka aplikuje na alespoň dva neživé tkáňové replikáty, které se podrobí celé zkoušce, ale v průběhu inkubačního kroku MTT se inkubují v médiu místo v roztoku MTT. Postačí jedna kontrola NSC_{killed} na zkoušenou chemickou látku bez ohledu na počet provedených nezávislých zkoušek/experimentů, ale tuto kontrolu je třeba provést souběžně s kontrolou NSMTT a pokud možno se stejnou šarží tkáně. Skutečná životaschopnost tkáně se poté vypočítá jako procentuální životaschopnost tkáně získaná z živých tkání vystavených působení zkoušené chemické látky minus % NSMTT minus % NSC_{living} plus procentuální nespecifické zbarvení získané z neživých tkání vystavených působení interferující zkoušené chemické látky a inkubovaných v roztoku bez MTT, počítáno ve vztahu k negativní kontrole prováděné souběžně s korigovanou zkouškou (% NSC_{killed}).

32. Je důležité uvést, že nespecifická redukce MTT a nespecifické barevné interference mohou zvýšit odečty tkáňového extraktu nad rozsah linearity spektrofotometru. Z tohoto důvodu by měla každá laboratoř stanovit rozsah linearity svého spektrofotometru s použitím formazanu MTT (č. CAS 57360-69-7) z komerčního zdroje, než zahájí testování zkoušených chemických látek pro regulační účely. Pro posouzení zkoušených chemikálií, které přímo redukují MTT a působí barevné interference, když je optická hustota tkáňových extraktů zjištěná za použití zkoušené chemikálie bez korekce přímé redukce MTT anebo barevné interference v lineárním rozsahu spektrofotometru, nebo když je nekorigovaná procentuální životaschopnost zjištěná u zkoušené chemické látky již $\leq$ 50 %, je vhodné standardní měření absorbance (OD) pomocí spektrofotometru. Výsledky u zkoušených chemických látek, které dávají % NSMTT anebo % $NSC_{living} \geq$ 50 % negativní kontroly, je třeba posuzovat opatrně, neboť je to hraniční hodnota používaná na odlišení klasifikovaných chemických látek od neklasifikovaných (viz odstavec 36).

33. U barevných zkoušených chemických látek, které nejsou kompatibilní se standardním měřením absorbance (OD) vzhledem k příliš velké interferenci se zkouškou MTT, může být použit alternativní spektrofotometrický postup HPLC/UPLC měření formazanu MTT (viz odstavec 34) (36). Spektrofotometrický systém HPLC/UPLC umožňuje oddělit formazan MTT od zkoušené chemické látky před její kvantifikací (36). Z tohoto důvodu se při použití spektrofotometrie HPLC/UPLC nepožadují kontroly NSC_{living} ani NSC_{killed}, a to nezávisle na zkoušené chemické látce. Kontroly NSMTT by se však měly použít, pokud existuje podezření, že zkoušená chemická látka přímo redukuje MTT, nebo v případě, že má barvu, která znesnadňuje posouzení schopnosti přímé redukce MTT (jak je popsáno v odstavci 29). Při použití spektrofotometrie HPLC/UPLC na měření formazanu MTT se procentuální životaschopnost tkáně vypočítá jako procentuální plocha píku formazanu MTT získaná z živých tkání vystavených působení zkoušené chemické látky ve vztahu k píku formazanu MTT získanému při souběžné negativní kontrole. U zkoušených chemických látek, které dokážou přímo redukovat MTT, se skutečná životaschopnost tkáně vypočítá jako procentuální životaschopnost tkáně získaná z živých tkání vystavených působení zkoušené

▼M8

chemické látky minus % NSMTT. Konečně je třeba uvést, že přímá redukční činidla MTT, jež mohou být také barevně interferující a která zůstanou v tkáních po expozici a redukují MTT tak silně, že to vede k takovým hodnotám optické hustoty (při využití standardního měření OD) nebo plochám píků (při použití spektrofotometrie UPLC/HPLC) zkoušených tkáňových extraktů, které spadají mimo rozsah linearity spektrofotometrie, nelze posuzovat, i když lze očekávat, že k tomu dochází velmi vzácně.

34. Spektrofotometrie HPLC/UPLC může být použita také u všech druhů zkoušených chemických látek (barevných, nebarevných, látek redukujících MTT i látek, které MTT neredukují) pro měření formazanu MTT (36). Vzhledem k různým spektrofotometrickým systémům HPLC/UPLC je třeba prokázat způsobilost spektrofotometrického systému HPLC/UPLC před jeho použitím pro kvantifikaci formazanu MTT z tkáňových extraktů splněním kritérií přijatelnosti pro sadu standardních parametrů způsobilosti vycházejících z parametrů popsaných v pokynu amerického Úřadu pro potraviny a léčiva pro průmysl k validaci bioanalytických metod (36) (37). Tyto klíčové parametry a jejich kritéria přijatelnosti jsou uvedeny v dodatku 4. Po splnění kritérií přijatelnosti definovaných v dodatku 4 je spektrofotometrický systém HPLC/UPLC považován za způsobilý a připravený na měření formazanu MTT za experimentálních podmínek popsaných v této zkušební metodě.

Kritéria přijatelnosti

35. U každé zkušební metody s použitím platných šarží modelu rekonstruované lidské epidermis (viz odstavec 23) by tkáně ošetřené negativní kontrolou měly vykazovat hodnoty OD odrážející kvalitu tkání, která vznikla po všech přepravních a přejímacích krocích a po všech procesech podle závěrečné zprávy. Hodnoty OD kontrol by neměly být pod dosud zjištěnými dolními hranicemi. Podobně by tkáně ošetřené pozitivní kontrolou, tj. 5 % vodným SDS, měly odrážet svou schopnost reagovat na dráždivou chemickou látku v podmínkách zkušební metody (viz dodatek 3 a standardní prováděcí postupy čtyř zkušebních modelů zařazených do tohoto pokynu pro zkoušení (32) (33) (34) (35). Související vhodné hodnoty variability mezi tkáňovými replikáty, tj. směrodatné odchylky (SD), by měly být v mezích přijatelnosti stanovených pro použitý zkušební model (viz dodatek 3).

Interpretace výsledků a predikční model

36. Hodnoty OD získané s každou zkoušenou chemickou látkou lze použít k výpočtu procentuálního podílu životaschopnosti buněk normalizovaného podle negativní kontroly, která je stanovena na 100 %. Při použití spektrofotometrie HPLC/UPLC se procentuální životaschopnost tkáně vypočítá jako procentuální plocha píku formazanu MTT získaná z živých tkání vystavených působení zkoušené chemické látky ve vztahu k píku formazanu MTT získanému při souběžné negativní kontrole. Je zapotřebí jasně vymezit, zdokumentovat a v případě potřeby prokázat mezní hodnotu procentuálního podílu životaschopnosti buněk odlišující dráždivou látku od neklasifikovaných zkoušených chemických látek a statistický postup (statistické postupy) použitý k vyhodnocení výsledků a identifikaci dráždivých látek (viz standardní prováděcí postupy zkušebních modelů, kde jsou uvedeny informace). Mezní hodnoty pro predikci dráždění jsou uvedeny níže:

▼M8

— Zkoušená chemická látka je považována za látku vyžadující klasifikaci a označení podle systému GHS OSN nebo podle nařízení CLP (kategorie 2 nebo kategorie 1), jestliže je střední procentuální životaschopnost tkáně po expozici a inkubaci po ošetření menší nebo rovna (≤) 50 %. Protože zkušební modely RhE zahrnuté v této zkušební metodě nedokážou rozlišovat mezi kategorií 1 a kategorií 2 GHS OSN/CLP, budou nutné další informace o leptavých účincích na kůži, aby bylo možné rozhodnout o její konečné klasifikaci [viz také pokyny OECD k integrovanému přístupu ke zkouškám a posuzování (3)]. Pokud je zjištěno, že je zkoušená chemická látka nežíravá (např. podle zkušebních metod TM.40, B.40a nebo B.65) a vykazuje životaschopnost tkáně po expozici a inkubaci po ošetření menší než nebo rovnou (≤) 50 %, považuje se tato zkoušená chemická látka za dráždivou pro kůži v souladu s kategorií 2 GHS OSN/CLP.

— V závislosti na právním rámci v členských zemích lze zkoušenou chemickou látku považovat za nedráždivou pro kůži v souladu s označením „bez kategorie“ v rámci systému GHS OSN nebo podle nařízení CLP, jestliže je životaschopnost tkáně po expozici a inkubaci po ošetření větší než (>) 50 %.

ÚDAJE A PŘEDKLÁDÁNÍ ZPRÁV

Údaje

37. Za každé provedení zkoušky by se údaje získané za použití jednotlivých tkáňových replikátů (např. hodnoty OD a vypočítané údaje procentuální životaschopnosti buněk pro každou zkoušenou chemickou látku, a to včetně její klasifikace) měly vykazovat ve formě tabulky, popřípadě včetně údajů z opakovaných experimentů. Navíc je za každé provedení zkoušky nutno vykázat průměr ± směrodatnou odchylku. Pozorované interakce s činidlem MTT a barevnými zkoušenými chemickými látkami je nutno uvádět za každou zkoušenou chemickou látku.

ZÁVĚREČNÁ ZPRÁVA

38. Závěrečná zpráva by měla obsahovat tyto informace:

Zkoušená chemická látka a kontrolní chemické látky:

— jednosložková látka: chemická identifikace, např. název podle IUPAC nebo CAS, číslo CAS, kód SMILES nebo InChI, strukturní vzorec, čistota, případně chemická identita nečistot, je-li to prakticky možné, atd.

— vícesložková látka, UVCB a směs: charakterizované pokud možno chemickou identitou (viz výše), kvantitativním výskytem a relevantními fyzikálně-chemickými vlastnostmi složek,

— fyzický vzhled, rozpustnost ve vodě a další relevantní fyzikálně-chemické vlastnosti,

— zdroj, číslo šarže, jsou-li k dispozici,

— případně ošetření zkoušené chemické látky / kontrolních chemických látek před zkoušením (např. zahřátí, mletí),

— stabilita zkoušené chemické látky, datum použitelnosti nebo datum opětovné analýzy, je-li známo,

— podmínky skladování.

Použitý model RhE a protokol (a případné zdůvodnění jeho volby)

▼**M8**

Zkušební podmínky:

— použitý model rekonstruované lidské epidermis (včetně čísla šarže),

— kalibrační údaje o měřicím zařízení (např. spektrofotometrie), (případně) vlnová délka a pásmová propustnost použitá pro kvantifikaci formazanu MTT a rozsah linearity měřicího zařízení, popis metody použité pro kvantifikaci formazanu MTT,

— případně popis způsobilosti spektrofotometrického systému HPLC/UPLC, úplné podklady ke konkrétnímu použitému modelu rekonstruované lidské epidermis včetně jeho chování při zkoušce. Ty by měly zejména zahrnovat:

i) životaschopnost;

ii) bariérovou funkci;

iii) morfologii;

iv) reprodukovatelnost a předvídatelnost;

v) kontroly kvality modelu,

— odkaz na historické údaje modelu. Ty by měly zahrnovat přinejmenším přijatelnost údajů z kontrol kvality s odkazem na historické údaje o šaržích,

— prokázání způsobilosti při provádění zkušební metody před rutinním použitím při zkoušení látek pro prokázání způsobilosti.

Postup zkoušky:

— podrobnosti použitého zkušebního postupu (včetně postupů vymývání použitých po expozici), dávka zkoušené chemické látky a použitých kontrolních chemických látek,

— doba a teplota expozice a doba inkubace po ošetření,

— přehled kontrol použitých pro látky, které přímo redukují MTT, případně pro zbarvující zkoušené chemické látky,

— počet tkáňových replikátů použitých na jednu zkoušenou chemickou látku a kontroly (pozitivní kontrola, negativní kontrola a NSMTT, případně NSC_{living} a NSC_{killed}),

— popis použitých kritérií rozhodování / predikčního modelu podle použitého modelu RhE,

— popis jakýchkoli změn zkušebního postupu (včetně postupů vymývání).

Kritéria přijatelnosti každého provedení zkoušky:

— střední hodnoty pozitivních a negativních kontrol a rozpětí přijatelnosti založené na porovnání s historickými údaji, přijatelná variabilita mezi tkáňovými replikáty pro pozitivní a negativní kontroly,

▼**M8**

— přijatelná variabilita mezi tkáňovými replikáty pro zkoušenou chemickou látku.

Výsledky:

— tabulka s údaji o jednotlivých zkoušených chemických látkách pro každé provedení zkoušky a každé měření replikátů včetně hodnot OD nebo plochy píku formazanu MTT, procentuální životaschopnosti tkáně, střední procentuální životaschopnosti tkáně a běžných odchylek,

— případně výsledky kontrol použitých pro přímá redukční činidla MTT anebo zbarvující zkoušené chemické látky včetně hodnot OD nebo plochy píku formazanu MTT, % NSMTT, % NSC_{living}, % NSC_{killed}, směrodatné odchylky, konečná korigovaná procentuální životaschopnost tkáně,

— výsledky získané u zkoušené chemické látky / zkoušených chemických látek a kontrolních látek ve vztahu k definovaným kritériím přijatelnosti provedení zkoušky,

— popis ostatních pozorovaných účinků,

— odvozená klasifikace s odkazem na použitý predikční model / kritéria rozhodování.

Diskuse o výsledcích

Závěry

LITERATURA

(1) United Nations (UN) (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Second Revised Edition, UN New York and Geneva, 2013 (Globálně harmonizovaný systém klasifikace a označování chemických látek (GHC), druhé revidované vydání, OSN New York a Ženeva). Dostupné na internetových stránkách: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html.

(2) EC EURL-ECVAM (2009). Statement on the „Performance Under UN GHS of Three *In Vitro* Assays for Skin Irritation Testing and the Adaptation of the Reference Chemicals and Defined Accuracy Values of the ECVAM Skin Irritation Performance Standards“, Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC31), 9 April 2009. Dostupné na internetových stránkách: https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/about-ecvam/archive-publications/publication//ESAC31_skin-irritation-statement_20090922.pdf

(3) OECD (2014). Guidance document on Integrated Approaches to Testing and Assessment for Skin Irritation/Corrosion. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (No 203) Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(4) Kapitola B.4 této přílohy, Akutní dráždivé/leptavé účinky na kůži.

(5) Kapitola B.40 této přílohy, Leptavé účinky na kůži *in vitro*: Transkutánní elektrický odpor (TER).

(6) Kapitola B.40a této přílohy, Leptavé účinky na kůži *in vitro*: Zkušební metoda za použití rekonstruované lidské epidermis (RHE).

(7) Kapitola B.65 této přílohy, Zkušební metoda s využitím membránové bariéry *in vitro*.

▼**M8**

(8) OECD (2015). Performance Standards for the Assessment of Proposed Similar or Modified *In Vitro* Reconstructed Human *Epidermis* (RhE) Test Methods for Skin Irritation in Relation to TG 439. Environment, health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 220). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(9) OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 34) Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(10) Fentem, J.H., Briggs, D., Chesné, C., Elliot, G.R., Harbell, J.W., Heylings, J.R., Portes, P., Roguet, R., van de Sandt, J.J. M. and Botham, P. (2001). A Prevalidation Study on *In Vitro* Tests for Acute Skin Irritation, Results and Evaluation by the Management Team, *Toxicol. in Vitro* 15, 57-93.

(11) Portes, P., Grandidier, M.-H., Cohen, C. and Roguet, R. (2002). Refinement of the EPISKIN Protocol for the Assessment of Acute Skin Irritation of Chemicals: Follow-Up to the ECVAM Prevalidation Study, *Toxicol. in Vitro* 16, 765–770.

(12) Kandárová, H., Liebsch, M., Genschow, E., Gerner, I., Traue, D., Slawik, B. and Spielmann, H. (2004). Optimisation of the EpiDerm Test Protocol for the Upcoming ECVAM Validation Study on *In Vitro* Skin Irritation Tests, *ALTEX* 21, 107–114.

(13) Kandárová, H., Liebsch, M., Gerner, I., Schmidt, E., Genschow, E., Traue, D. and Spielmann, H. (2005), The EpiDerm Test Protocol for the Upcoming ECVAM Validation Study on *In Vitro* Skin Irritation Tests – An Assessment of the Performance of the Optimised Test, *ATLA* 33, 351-367.

(14) Cotovio, J., Grandidier, M.-H., Portes, P., Roguet, R. and Rubinsteen, G. (2005). The *In Vitro* Acute Skin Irritation of Chemicals: Optimisation of the EPISKIN Prediction Model Within the Framework of the ECVAM Validation Process, *ATLA* 33, 329-349.

(15) Zuang, V., Balls, M., Botham, P.A., Coquette, A., Corsini, E., Curren, R.D., Elliot, G.R., Fentem, J.H., Heylings, J.R., Liebsch, M., Medina, J., Roguet, R., van De Sandt, J.J.M., Wiemann, C. and Worth, A. (2002). Follow-Up to the ECVAM Prevalidation Study on *In Vitro* Tests for Acute Skin Irritation, The European Centre for the Validation of Alternative Methods Skin Irritation Task Force report 2, *ATLA* 30, 109-129.

(16) Spielmann, H., Hoffmann, S., Liebsch, M., Botham, P., Fentem, J., Eskes, C., Roguet, R., Cotovio, J., Cole, T., Worth, A., Heylings, J., Jones, P., Robles, C., Kandárová, H., Gamer, A., Remmele, M., Curren, R., Raabe, H., Cockshott, A., Gerner, I. and Zuang, V. (2007). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Acute Skin Irritation: Report on the Validity of the EPISKIN and EpiDerm Assays and on the Skin Integrity Function Test, *ATLA* 35, 559-601.

(17) Hoffmann S. (2006). ECVAM Skin Irritation Validation Study Phase II: Analysis of the Primary Endpoint MTT and the Secondary Endpoint IL1-α.

(18) Eskes C., Cole, T., Hoffmann, S., Worth, A., Cockshott, A., Gerner, I. and Zuang, V. (2007). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Acute Skin Irritation: Selection of Test Chemicals, *ATLA* 35, 603-619.

(19) Cotovio, J., Grandidier, M.-H., Lelièvre, D., Roguet, R., Tinois-Tessonneaud, E. and Leclaire, J. (2007). *In Vitro* Acute Skin Irritancy of Chemicals Using the Validated EPISKIN Model in a Tiered Strategy - Results and Performances with 184 Cosmetic Ingredients, *ALTEX*, 14, 351-358.

▼**M8**

(20) EC EURL-ECVAM (2007). Statement on the Validity of *In Vitro* Tests for Skin Irritation, Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC26), 27 April 2007. Dostupné na internetových stránkách: https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/about-ecvam/archive-publications/publication//ESAC26_statement_SkinIrritation_20070525_C.pdf

(21) EURL-ECVAM. (2007). Performance Standards for Applying Human Skin Models to *In Vitro* Skin Irritation Testing. *Poznámka: Jsou to původní standardy funkčnosti použité pro validaci dvou zkušebních metod. Tyto standardy funkčnosti by se již neměly používat, protože nyní je k dispozici aktualizovaná verze (8).*

(22) EURL-ECVAM. (2008). Statement on the Scientific Validity of *In Vitro* Tests for Skin Irritation Testing, Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC29), 5 November 2008. https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/about-ecvam/archive-publications/publication/ESAC_Statement_SkinEthic-EpiDerm-FINAL-0812-01.pdf

(23) OECD (2010). Explanatory Background Document to the OECD Draft Test Guideline on *In Vitro* Skin Irritation Testing. Environment, Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment, (No 137), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(24) Katoh, M., Hamajima, F., Ogasawara, T. and Hata K. (2009). Assessment of Human Epidermal Model LabCyte EPI-MODEL for *In Vitro* Skin Irritation Testing According to European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM)-Validated Protocol, *J Toxicol* Sci, 34, 327-334

(25) Katoh, M. and Hata K. (2011). Refinement of LabCyte EPI-MODEL24 Skin Irritation Test Method for Adaptation to the Requirements of OECD Test Guideline 439, *AATEX*, 16, 111-122

(26) OECD (2011). Validation Report for the Skin Irritation Test Method Using LabCyte EPI-MODEL24. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (No 159) Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(27) OECD (2011). Peer Review Report of Validation of the Skin Irritation Test Using LabCyte EPI-MODEL24. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (No 155) Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(28) Kojima, H., Ando, Y., Idehara, K., Katoh, M., Kosaka, T., Miyaoka, E., Shinoda, S., Suzuki, T., Yamaguchi, Y., Yoshimura, I., Yuasa, A., Watanabe, Y. and Omori, T. (2012). Validation Study of the *In Vitro* Skin Irritation Test with the LabCyte EPI-MODEL24, *Altern Lab Anim*, 40, 33-50.

(29) Welss, T., Basketter, D.A. and Schröder, K.R. (2004). *In Vitro* Skin Irritation: Fact and Future. State of the Art Review of Mechanisms and Models, *Toxicol. In Vitro* 18, 231-243.

(30) Eskes, C. *et al.* (2012). Regulatory Assessment of *In Vitro* Skin Corrosion and Irritation Data within the European Framework: Workshop Recommendations. Regul.*Toxicol*.Pharmacol. 62, 393-403).

(31) Mosmann, T. (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays, *J. Immunol. Methods* 65, 55-63.

▼**M8**

(32) EpiSkin™ (February 2009). SOP, Version 1.8 ECVAM Skin Irritation Validation Study: Validation of the EpiSkin™ Test Method 15 min - 42 hours for the Prediction of acute Skin Irritation of Chemicals

(33) EpiDerm™ (Revised March 2009). SOP, Version 7.0, Protocol for: *In Vitro* EpiDerm™ Skin Irritation Test (EPI-200-SIT), for Use with MatTek Corporation's Reconstructed Human Epidermal Model EpiDerm (EPI-200).

(34) SkinEthic™ RHE (February 2009) SOP, Version 2.0, SkinEthic Skin Irritation Test-42bis Test Method for the Prediction of Acute Skin Irritation of Chemicals: 42 Minutes Application + 42 Hours Post-Incubation.

(35) LabCyte (June 2011). EPI-MODEL24 SIT SOP, Version 8.3, Skin Irritation Test Using the Reconstructed Human Model „LabCyte EPI-MODEL24"

(36) Alépée, N., Barroso, J., De Smedt, A., De Wever, B., Hibatallah, J., Klaric, M., Mewes, K.R., Millet, M., Pfannenbecker, U., Tailhardat, M., Templier, M., and McNamee, P. Use of HPLC/UPLC-Spectrophotometry for Detection of MTT Formazan in *In Vitro* Reconstructed Human Tissue (RhT)-Based Test Methods Employing the MTT Assay to Expand their Applicability to Strongly Coloured Test Chemicals. (Připravovaný rukopis).

(37) US FDA (2001). Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration. May 2001. Dostupné na internetových stránkách: [http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070107.pdf].

(38) Harvell, J.D., Lamminstausta, K., and Maibach, H.I. (1995). Irritant Contact Dermatitis, in: Practical Contact Dermatitis, pp 7-18, (Ed. Guin J. D.). Mc Graw-Hill, New York.

(39) EC EURL-ECVAM (2009). Performance Standards for *In Vitro* Skin Irritation Test Methods Based on Reconstructed Human Epidermis (RhE). *Poznámka: Jde o aktuální verzi standardů funkčnosti ECVAM aktualizovanou v roce 2009 s ohledem na provedení GHS OSN. Tyto standardy funkčnosti by se již neměly používat, protože nyní je k dispozici aktualizovaná verze (8) týkající se tohoto pokynu.*

(40) EURL-ECVAM. (2009). ESAC Statement on the Performance Standards (PS) for *In Vitro* Skin Irritation Testing Using Reconstructed Human Epidermis, Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC31), 8 July 2009.

(41) EC (2001). Směrnice Komise 2001/59/ES ze dne 6. srpna 2001, kterou se po dvacáté osmé přizpůsobuje technickému pokroku směrnice Rady 67/548/EHS o sbližování právních a správních předpisů týkajících se klasifikace, balení a označování nebezpečných látek, *Úřední věstník Evropské unie* L 225, 21.8.2001, s. 1.

▼M8

Dodatek 1

DEFINICE

Přesnost: blízkost shody mezi výsledky zkušební metody a přijatými referenčními hodnotami. Je to míra funkčnosti zkušební metody a jeden z aspektů její relevantnosti. Tento pojem se často používá místo pojmu „soulad“ a rozumí se jím podíl správných výsledků zkušební metody (9).

Životaschopnost buněk: parametr měřící celkovou aktivitu buněčné populace, např. jako schopnost buněčných mitochondriálních dehydrogenáz redukovat vitální barvivo MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyl-2H-tetrazoliumbromid, thiazolylová modř), které v závislosti na naměřené sledované vlastnosti a koncepci použité zkoušky koreluje s celkovým počtem a/nebo vitalitou živých buněk.

Chemická látka: látka nebo směs.

Soulad: je měřítkem funkčnosti u zkušebních modelů, které dává kategorický výsledek a je jedním z aspektů relevantnosti. Tento pojem se někdy používá místo pojmu „přesnost“ a je definován jako podíl všech zkoušených chemických látek, které jsou správně klasifikovány jako pozitivní nebo negativní. Soulad závisí do velké míry na prevalenci pozitivních výsledků u druhů studovaných zkoušených chemických látek (9).

ET_{50}: tuto hodnotu lze odhadnout na základě určení doby expozice potřebné k tomu, aby se životaschopnost buněk snížila o 50 % po aplikaci referenční chemické látky v pevně stanovené koncentraci, viz rovněž IC_{50}.

GHS (Globálně harmonizovaný systém klasifikace a označování chemických látek podle OSN): systém navrhující klasifikaci chemických látek (látek a směsí) podle standardizovaných typů a úrovní fyzikálních, zdravotních a environmentálních nebezpečí a zabývající se příslušnými komunikačními prvky, jako jsou piktogramy, signální slova, výroky o nebezpečí, výroky o bezpečnostních opatřeních a bezpečnostní datové listy, které obsahují informace o jejich nežádoucích účincích s ohledem na ochranu lidí (včetně zaměstnavatelů, pracovníků, přepravců, spotřebitelů a osob reagujících na nouzové situace) a životního prostředí (1).

HPLC: vysokoúčinná kapalinová chromatografie.

IATA: integrovaný přístup ke zkoušení a posuzování.

IC_{50}: tuto hodnotu lze odhadnout na základě určení koncentrace, při níž referenční chemická látka snižuje životaschopnost tkání o 50 % (IC_{50}) po pevně stanovené době expozice, viz rovněž ET_{50}.

Nekonečná dávka: množství zkoušené chemické látky nanesené na *epidermis*, které přesahuje množství potřebné k úplnému a rovnoměrnému pokrytí povrchu *epidermis*.

Směs: směs nebo roztok složený ze dvou nebo více látek.

Jednosložková látka: látka definovaná svým kvantitativním složením, v níž je přítomna jedna hlavní složka v míře alespoň 80 % hmot.

▼M8

MTT: 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyl-2H-tetrazolium-bromid, thiazolylová modř.

Vícesložková látka: látka definovaná svým kvantitativním složením, v níž je přítomna více než jedna hlavní složka v koncentraci ≥ 10 % hmot. a < 80 % hmot. Vícesložková látka je výsledkem výrobního procesu. Rozdíl mezi směsí a vícesložkovou látkou spočívá v tom, že směs se získá smísením dvou nebo více látek bez chemické reakce. Vícesložková látka je výsledkem chemické reakce.

NSC_{killed}: nespecifická barva u neživých tkání.

NSC_{living}: nespecifická barva u živých tkání.

NSMTT: nespecifická redukce MTT.

Standardy funkčnosti: standardy založené na validované zkušební metodě, které slouží jako základ pro hodnocení srovnatelnosti navrhované zkušební metody, která je mechanicky a funkčně podobná. Patří mezi ně: i) zásadní složky zkušební metody; ii) minimální seznam referenčních látek vybraných z chemických látek používaných k prokázání přijatelné funkčnosti validované zkušební metody; a iii) srovnatelné úrovně přesnosti a spolehlivosti založené na hodnotách získaných u validované referenční metody, jež by navrhovaná zkušební metoda měla prokázat při vyhodnocení za použití minimálního seznamu referenčních látek (9).

Pozitivní kontrola (PC): replika obsahující všechny složky zkušebního systému a zkoušená s chemickou látkou, o níž je známo, že způsobuje pozitivní odezvu. Aby se zajistilo, že proměnlivost v odezvě na pozitivní kontrolu v průběhu času bude možné vyhodnotit, neměl by být rozsah pozitivní odezvy nadměrný.

Relevantnost: popis vztahu zkoušky k účinku, který je předmětem zájmu, a také toho, zda je zkouška smysluplná a použitelná pro konkrétní účel. Vyjadřuje, do jaké míry zkouška správně měří nebo predikuje biologický účinek, který je předmětem zájmu. Relevantnost zahrnuje také posouzení přesnosti (shody) zkušební metody (9).

Spolehlivost: měření rozsahu, v jakém může být zkušební metoda v průběhu času reprodukovatelná v laboratořích a mezi laboratořemi, když se provádí s použitím stejného protokolu. Hodnotí se na základě výpočtu vnitrolaboratorní a mezilaboratorní reprodukovatelnosti (9).

Náhradní zkouška: zkouška, která je koncipována tak, aby nahradila běžně používanou a uznávanou zkoušku, která slouží k určení nebezpečnosti a/nebo posouzení rizika a u níž je zjištěno, že poskytuje stejnou nebo lepší úroveň ochrany zdraví lidí nebo zvířat či případně ochrany životního prostředí ve srovnání s uznávanou zkouškou ve všech možných zkušebních situacích a pro všechny zkoušené chemické látky (9).

Provedení zkoušky: jedna či více zkoušených chemických látek se zkouší souběžně s negativní kontrolou a s pozitivní kontrolou.

Citlivost: podíl všech pozitivních/aktivních zkoušených chemických látek, které jsou na základě zkoušky správně klasifikovány. Je měřítkem přesnosti zkušební metody, která poskytuje kategorické výsledky, a je důležitým prvkem při hodnocení relevantnosti zkušební metody (9).

▼**M8**

Dráždění kůže *in vivo*: vyvolání reverzibilního poškození kůže po aplikaci zkoušené chemické látky po dobu až 4 hodin. Dráždění kůže je lokálně vznikající reakce postižené kožní tkáně, která se objevuje krátce po stimulaci (38). Je způsobena lokální zánětlivou reakcí zahrnující vlastní (nespecifický) imunitní systém kožní tkáně. Její hlavní charakteristikou je reverzibilní proces zahrnující zánětlivé reakce a většinu klinických charakteristických příznaků dráždění (erytém, edém, svědění a bolest) v souvislosti se zánětlivým procesem.

Specifičnost: podíl všech negativních/neaktivních zkoušených látek, které jsou na základě zkoušky správně klasifikovány. Je měřítkem přesnosti zkušební metody, která poskytuje kategorické výsledky, a je důležitým prvkem při hodnocení relevantnosti zkušební metody (9).

Látka: chemický prvek a jeho sloučeniny v přírodním stavu nebo získané výrobním postupem, včetně jakýchkoliv aditiv potřebných pro zachování jeho stability a všech nečistot pocházejících z použitého postupu, ale s vyloučením všech rozpouštědel, která je možno oddělit bez ovlivnění stability dané látky nebo změny jejího složení.

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

UPLC: ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie.

UVCB: látky s neznámým nebo proměnlivým složením, komplexní reakční produkty nebo biologický materiál. [[G1]]

▼**M8**

Dodatek 2

ZKUŠEBNÍ MODELY ZAHRNUTÉ DO TÉTO ZKUŠEBNÍ METODY

Č.	Název zkušebního modelu	Druh validační studie	Odkazy
1	EpiSkin™	Úplná prospektivní validační studie (2003–2007). Složky tohoto modelu byly použity na definování základních složek zkušební metody původních a aktualizovaných standardů funkčnosti ECVAM (39) (40) (21) (*). Kromě toho tvořily údaje z této metody týkající se určení neklasifikovaných a klasifikovaných látek hlavní východisko pro definování hodnot specifičnosti a citlivosti původních standardů funkčnosti (*).	(2) (10) (11) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20) (21) (23) (32) (39) (40)
2	EpiDerm™ SIT (EPI-200)	EpiDerm™ (*originál*): Původně prošel tento zkušební model úplnou prospektivní validací společně s č. 1 z let 2003–2007. Složky tohoto modelu byly použity na definování základních složek zkušebních metod původních a aktualizovaných standardů funkčnosti ECVAM (39) (40) (21). (*) **EpiDerm™ SIT (EPI-200):** Modifikace původního modelu EpiDerm™ byla validována v roce 2008 s použitím původních standardů funkčnosti ECVAM (21) (*).	(2) (10) (12) (13) (15) (16) (17) (18) (20) (21) (23) (33) (39) (40) (2) (21) (22) (23) (33)
3	SkinEthic™ RHE	Validační studie vycházející z původních standardů funkčnosti ECVAM (21) v roce 2008 (*).	(2) (21) (22) (23) (31)
4	LabCyte EPI-MODEL24 SIT	Validační studie (2011–2012) vycházející ze standardů funkčnosti podle Pokynu OECD pro zkoušení č. 439 (8), které jsou založeny na aktualizovaných standardech funkčnosti ECVAM (*) (39) (40).	(24) (25) (26) (27) (28) (35) (39) (40) a standardy funkčnosti tohoto pokynu pro zkoušení (8) (*)

(*) Původní standardy funkčnosti ECVAM (21) byly vypracovány v roce 2007 po dokončení prospektivní validační studie (16), která hodnotila funkčnost zkušebních modelů č. 1 a 2 podle klasifikačního systému popsaného v 28. změně směrnice EU o nebezpečných látkách (41). V roce 2008 byly zavedeny globálně harmonizovaný systém klasifikace a označování chemických látek (GHS OSN) (1) a nařízení CLP, které ve skutečnosti posunuly mezní hodnotu pro rozlišování neklasifikovaných látek od klasifikovaných ze skóre *in vivo* 2,0 na 2,3. Za účelem přizpůsobení se tomuto změněnému regulatornímu požadavku byly v roce 2009 aktualizovány hodnoty přesnosti a seznam referenčních chemických látek podle standardů funkčnosti ECVAM (2) (39) (40). Stejně jako původní standardy funkčnosti také aktualizované standardy funkčnosti vycházely do značné míry z údajů z modelů č. 1 a 2 (16), ale kromě toho používaly také údaje o referenčních chemických látkách z modelu č. 3. V roce 2010 byly použity aktualizované standardy funkčnosti ECVAM pro stanovení standardů funkčnosti týkajících se tohoto pokynu pro zkoušení (8). Pro účely této zkušební metody se model EpiSkin™ považuje za validovanou referenční metodu, a to vzhledem ke skutečnosti, že byl použit na vypracování všech kritérií standardů funkčnosti. Podrobné informace o validačních studiích, sbírku vytvořených údajů, jakož i obecné informace o potřebných úpravách standardů funkčnosti v důsledku používání systému GHS OSN/CLP lze najít ve vysvětlujícím podkladovém dokumentu ECVAM/BfR k odpovídajícímu Pokynu OECD pro zkoušení č. 439 (23).

SIT: Zkouška dráždivosti pro kůži

RHE: Rekonstruovaná lidská epidermis

▼**M8**

Dodatek 3

PARAMETRY PROTOKOLU SPECIFICKÉ PRO JEDNOTLIVÉ ZKUŠEBNÍ MODELY ZAHRNUTÉ DO TÉTO ZKUŠEBNÍ METODY

Modely RhE mají velmi podobné protokoly a všechny tyto protokoly používají zejména dobu po inkubaci 42 hodin (32) (33) (34) (35). Odchylky se týkají hlavně tří parametrů souvisejících s různými bariérovými funkcemi zkušebních modelů, které jsou zde uvedeny: A) doba a objem před inkubací, B) aplikace zkoušených chemických látek a C) objem po inkubaci.

	EpiSkin™ (SM)	EpiDerm™ SIT (EPI-200)	SkinEthic RHE™	LabCyte EPI-MODEL24 SIT
A) Předběžná inkubace				
Inkubační doba	18–24 hodiny	18–24 hodiny	< 2 hodiny	15–30 hodin
Střední objem	2 ml	0,9 ml	0,3 nebo 1 ml	0,5 ml
B) Aplikace zkoušené chemické látky				
Na kapaliny	10 µl (26 µl/cm^2)	30 µl (47 µl/cm^2)	16 µl (32 µl/cm^2)	25 µl (83 µl/cm^2)
Na pevné látky	10 mg (26 mg/cm^2) + DW (5 µl)	25 mg (39 mg/cm^2) + DPBS (25 µl)	16 mg (32 mg/cm^2) + DW (10 µl)	25 mg (83 mg/cm^2) + DW (25 µl)
Použití nylonové síťky	Nepoužito	Pokud je třeba	Použito	Nepoužito
Celková doba aplikace	15 minut	60 minut	42 minut	15 minut
Teplota aplikace	RT	a) 25 minut při pokojové teplotě a) 35 minut při 37 °C	RT	RT
C) Objem po inkubaci				
Střední objem	2 ml	0,9 ml x 2	2 ml	1 ml
D) Maximální přípustná variabilita				
Směrodatná odchylka mezi tkáňovými replikáty	SD≤18	SD≤18	SD≤18	SD≤18

RT:: pokojová teplota
DW:: destilovaná voda
DPBS:: Dulbeccův fyziologický roztok ve fosfátovém pufru

▼**M8**

Dodatek 4

KLÍČOVÉ PARAMETRY A KRITÉRIA PŘIJATELNOSTI PRO ZPŮSOBILOST SPEKTROFOTOMETRICKÉHO SYSTÉMU HPLC/UPLC PRO MĚŘENÍ FORMAZANU MTT EXTRAHOVANÉHO Z REKONSTRUOVANÉ LIDSKÉ EPIDERMIS

Parametr	Protokol vycházející z pokynu FDA (36)(37)	Kritéria přijatelnosti
Selektivita	Analýza isopropylalkoholu, slepý pokus s živou tkání (isopropylalkoholový extrakt z živých tkání RhE bez jakékoli expozice), slepý pokus s neživou tkání (isopropylalkoholový extrakt z neživých tkání RhE bez jakékoli expozice)	$plocha_{interference} \leq 20\ \%\ plochy_{LLOQ}$ ([1])
Přesnost	Kontroly kvality (tj. formazan MTT při 1,6 µg/ml, 16 µg/ml a 160 µg/ml) v isopropylalkoholu (n = 5)	CV ≤ 15 % nebo ≤ 20 % pro LLOQ
Přesnost	Kontroly kvality v isopropylalkoholu (n = 5)	%Dev ≤ 15 % nebo ≤ 20 % pro LLOQ
Vlivy matrice	Kontroly kvality ve slepém pokusu s živou tkání (n = 5)	85 % ≤ % vlivu matrice ≤ 115 %
Únik	Analýza isopropylalkoholu podle standardu ULOQ ([2])	$plocha_{interference} \leq 20\ \%\ plochy_{LLOQ}$
Reprodukovatelnost (v rámci dne)	3 nezávislé kalibrační křivky (vycházející z 6 postupných třetinových ředění formazanu MTT v isopropylalkoholu s počátkem při ULOQ, tj. 200 µg/ml); Kontroly kvality v isopropylalkoholu (n = 5)	Kalibrační křivky: %Dev ≤ 15 % nebo ≤ 20 % pro LLOQ Kontroly kvality: %Dev ≤ 15 % a CV ≤ 15 %
Reprodukovatelnost (mezi dny)	1.: den 1 kalibrační křivka a kontroly kvality v isopropylalkoholu (n = 3) 2.: den 1 kalibrační křivka a kontroly kvality v isopropylalkoholu (n = 3) 3.: den 1 kalibrační křivka a kontroly kvality v isopropylalkoholu (n = 3)	
Krátkodobá stabilita formazanu MTT v tkáňovém extraktu RhE	Kontroly kvality ve slepém pokusu s živou tkání (n = 3) analyzované v den přípravy a po 24 hodinách uložení při pokojové teplotě	%Dev ≤ 15 %
Dlouhodobá stabilita formazanu MTT v tkáňovém extraktu RhE, v případě potřeby	Kontroly kvality ve slepém pokusu s živou tkání (n = 3) analyzované v den přípravy a po několika dnech uložení při stanovené teplotě (např. 4 °C, –20 °C, –80 °C)	%Dev ≤ 15 %

([1]) LLOQ: dolní mez stanovitelnosti definovaná tak, aby postihla 1–2 % tkáňovou životaschopnost, tj. 0,8 µg/ml.
([2]) ULOQ: horní mez stanovitelnosti definovaná tak, aby byla alespoň dvakrát vyšší než nejvyšší očekávaná koncentrace formazanu MTT v isopropylalkoholových extraktech z negativních kontrol, tj. 200 µg/ml. [[G1]]

▼M7

B.47 ZKUŠEBNÍ METODA VYUŽÍVAJÍCÍ ZÁKAL A PROPUSTNOST ROHOVKY SKOTU PRO IDENTIFIKACI I) CHEMICKÝCH LÁTEK VYVOLÁVAJÍCÍCH VÁŽNÉ POŠKOZENÍ OČÍ A II) CHEMICKÝCH LÁTEK, KTERÉ NENÍ NUTNÉ KLASIFIKOVAT JAKO LÁTKY MAJÍCÍ DRÁŽDIVÉ ÚČINKY NA OČI NEBO VYVOLÁVAJÍCÍ VÁŽNÉ POŠKOZENÍ OČÍ

ÚVOD

Tato metoda je rovnocenná Pokynu OECD pro zkoušení (TG) č. 437 (2013). Zkušební metodu pro zákal a propustnost rohovky u skotu (BCOP – *Bovine Corneal Opacity and Permeability*) hodnotil Koordinační výbor mezi různými organizacemi pro ověřování platnosti alternativních metod (ICCVAM) spolu s Evropským střediskem pro validaci alternativních metod (ECVAM) a Japonským střediskem pro validaci alternativních metod (JaCVAM) v letech 2006 a 2010 (1) (2). Při prvním hodnocení byla zkušební metoda BCOP hodnocena z hlediska její užitečnosti pro identifikaci chemických látek (látek a směsí) vyvolávajících závažné poškození očí (1). Při druhém hodnocení byla zkušební metoda BCOP hodnocena z hlediska její užitečnosti pro identifikaci chemických látek (látek a směsí), které nejsou klasifikovány jako látky mající dráždivé účinky na oči nebo vyvolávající vážné poškození očí (2). Databáze pro validaci BCOP obsahovala celkem 113 látek a 100 směsí (2) (3). Na základě těchto hodnocení a jejich odborné revize se dospělo k závěru, že tato zkušební metoda může správně identifikovat chemické látky (látky i směsi) vyvolávající vážné poškození očí (kategorie 1) a také látky, které není nutné klasifikovat jako látky mající dráždivé účinky na oči nebo vyvolávající vážné poškození očí, jak je definuje Globálně harmonizovaný systém klasifikace a označování chemických látek (GHS) Organizace spojených národů (OSN) (4) a nařízení (ES) č. 1272/2008 o klasifikaci, označování a balení látek a směsí (CLP) ([1]), a byla proto potvrzena jako vědecky platná pro oba výše uvedené účely. Vážným poškozením očí se rozumí vyvolání poškození oční tkáně nebo zhoršení vidění po aplikaci zkoušené chemické látky na povrch oka, které není plně vratné do 21 dnů po aplikaci. Zkoušené chemické látky vyvolávající vážné poškození očí jsou klasifikovány v kategorii 1 GHS OSN. Chemické látky, které nejsou klasifikovány jako látky mající dráždivé účinky na oči nebo vyvolávající vážné poškození očí, jsou definovány jako chemické látky, které nesplňují požadavky pro klasifikaci v kategorii 1 nebo 2 (2A nebo 2B) GHS OSN, tj. označují se jako chemické látky bez kategorie GHS OSN. V této zkušební metodě je uvedeno doporučené použití i to, jaká jsou omezení zkušební metody BCOP na základě jejích hodnocení. Hlavní rozdíly mezi původní verzí Pokynu OECD pro zkoušení z roku 2009 a aktualizovanou verzí z roku 2013 se mimo jiné týkají: použití zkušení metody BCOP k identifikaci chemických látek, které není nutné klasifikovat podle systému GHS OSN (odstavce 2 a 7); vyjasnění týkajících se použitelnosti zkušební metody BCOP pro testování alkoholů, ketonů a pevných látek (odstavce 6 a 7) a látek a směsí (odstavec 8); vyjasnění toho, jak by měla být testována smáčedla a směsi smáčedel (odstavec 28); aktualizace a vyjasnění týkajících se pozitivních kontrol (odstavce 39 a 40); aktualizace kritérií rozhodování zkušební metody BCOP (odstavec 47); aktualizace kritérií přijatelnosti studie (odstavec 48); aktualizace prvků protokolu o zkoušce (odstavec 49); aktualizace dodatku 1 týkající se definic; vložení dodatku 2 o prediktivní schopnosti zkušební metody BCOP v různých klasifikačních systémech; aktualizace dodatku 3 týkající se seznamu chemických látek pro prokázání způsobilosti; a aktualizace dodatku 4 týkající se držáku rohovky pro zkoušku BCOP (odstavec 1) a opacitometru (odstavce 2 a 3).

([1]) Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1272/2008 ze dne 16. prosince 2008 o klasifikaci, označování a balení látek a směsí, o změně a zrušení směrnic 67/548/EHS a 1999/45/ES a o změně nařízení (ES) č. 1907/2006, Úř. věst. L 353, 31.12.2008, s. 1.

▼M7

V současnosti se obecně uznává, že jediná zkouška dráždivých účinků na oči *in vitro* nemůže v dohledné budoucnosti nahradit Draizeovu oční zkoušku *in vivo*, pokud jde o předpověď celé škály dráždivosti různých tříd chemických látek. Draizeovu oční zkoušku (5) však možná bude možné nahradit strategickou kombinací několika alternativních zkušebních metod v rámci strategie (odstupňovaného) zkoušení. Postup „shora dolů“ (5) má být použit, pokud se na základě existujících informací očekává, že chemická látka má vysokou schopnost vyvolávat dráždivé účinky, zatímco postup „zdola nahoru“ (5) se má použít, jestliže se na základě existujících informací předpokládá, že chemická látka nevyvolává tak intenzivní dráždivé účinky, aby vyžadovaly její klasifikaci. Zkušební metoda BCOP je zkušební metoda *in vitro*, kterou lze za určitých okolností a s některými omezeními použít pro klasifikaci nebezpečnosti chemických látek pro oči a pro označování těchto chemických látek. I když se BCOP nepovažuje za úplnou náhradu za oční test *in vivo* na králících, doporučuje se tuto zkušební metodu použít jako počáteční krok v rámci strategie zkoušení, jako je např. postup „shora dolů“, jejž navrhuje Scott *et al.* (5) pro identifikaci chemických látek vyvolávajících vážné poškození očí, tj. chemických látek, které je třeba klasifikovat v kategorii 1 GHS OSN bez dalšího zkoušení (4). Zkušební metodu BCOP se rovněž doporučuje použít k identifikaci chemických látek, které není nutné klasifikovat jako látky mající dráždivé účinky na oči nebo vyvolávající vážné poškození očí, jak jsou definovány v systému GHS OSN (látky bez kategorie GHS OSN) (4), a to v rámci strategie zkoušení, jako je např. postup „zdola nahoru“ (5). U chemické látky, o níž se na základě výsledků zkušební metody BCOP nepředpokládá, že vyvolává vážné poškození očí nebo naopak nemůže být klasifikována jako látka mající dráždivé účinky na oči / vyvolávající vážné poškození očí (látka bez kategorie), by však pro stanovení konečné klasifikace bylo nutné další zkoušení (*in vitro* a/nebo *in vivo*).

Účelem této zkušební metody je popsat postupy používané k hodnocení potenciálních nebezpečných účinků zkoušené chemické látky na oči měřené její schopností způsobit zákal a zvýšit propustnost v izolované rohovce skotu. Toxické účinky na rohovku se měří: i) sníženou propustností světla (zákal) a ii) zvýšenou propustností barviva fluoresceinu sodného (propustnost). Hodnocení zákalu a propustnosti rohovky po expozici zkoušené chemické látce se kombinují ve výsledné skóre podráždění *in vitro* (IVIS – *In Vitro* Irritancy Score), které se používá pro klasifikaci úrovně dráždivých účinků zkoušené chemické látky.

Definice jsou uvedeny v dodatku 1.

VÝCHOZÍ ÚVAHY A OMEZENÍ

Tato zkušební metoda je založena na protokolu zkušební metody BCOP vypracovaném výborem ICCVAM (6) (7), který byl původně vyvinut na základě informací získaných z protokolu Institutu pro vědu *in vitro* (IIVS) a INVITTOX protokolu č. 124 (8). Protokol INVITTOX byl použit pro studii o předběžném ověřování platnosti sponzorovanou Evropským společenstvím a vypracovanou v letech 1997–1998. Oba tyto protokoly vycházely z metodiky zkušební metody BCOP poprvé publikované Gautheronem *et al.* (9).

Zkušební metodu BCOP je možné použít k identifikaci chemických látek vyvolávajících vážné poškození očí, jak je definováno v systému GHS OSN, tj. chemických látek, které je třeba klasifikovat v kategorii 1 GHS OSN (4). Je-li zkušební metoda BCOP použita pro tento účel, má celkovou přesnost 79 % (150/191), míru falešné pozitivity 25 % (32/126) a míru falešné negativity 14 % (9/65) ve srovnání s údaji ze zkušební metody *in vivo* na očích králíků klasifikovanými podle klasifikačního systému GHS OSN (3) (viz dodatek 2, tabulka 1). Pokud se z databáze vyloučí zkoušené chemické látky v určitých chemických (tj. alkoholy, ketony) nebo fyzikálních třídách (tj. pevné látky), má zkušební metoda BCOP v klasifikačním systému GHS OSN celkovou přesnost 85 % (111/131), míru falešné pozitivity 20 % (16/81) a míru falešné negativity 8 % (4/50) (3). Potenciální nedostatky zkušební metody BCOP, je- li použita k identifikaci chemických

▼M7

látek vyvolávajících vážné poškození očí (kategorie 1 GHS OSN), vyplývají z vysoké míry falešné pozitivity pro alkoholy a ketony a z vysoké míry falešné negativity pro pevné látky sledované v databázi ověřování platnosti (1) (2) (3). Jelikož však ne všechny alkoholy a ketony jsou zkušební metodou BCOP nepřiměřeně určeny a některé jsou správně určeny jako látky v kategorii 1 GHS OSN, nejsou tyto dvě organické funkční skupiny považovány za skupiny nacházející se mimo oblasti použitelnosti této zkušební metody. Je na uživateli této zkušební metody, aby rozhodl, zda případnou nepřiměřenou předpověď u alkoholu nebo ketonu lze akceptovat, nebo zda by mělo být provedeno další zkoušení s použitím přístupu založeného na posuzování závažnosti důkazů. Pokud jde o míru falešné negativity u pevných látek, je třeba poznamenat, že v Draizeově zkoušce dráždivých účinků na oči *in vivo* mohou pevné látky vést k různým a extrémním podmínkám expozice, což může v důsledku vyústit v irelevantní předpovědi jejich skutečné schopnosti vyvolávat dráždivé účinky (10). Nutno též podotknout, že míra falešné negativity zjištěná ve validační databázi ICCVAM (2) (3) v rámci identifikace chemických látek vyvolávajících vážné poškození očí (kategorie 1 GHS OSN) v žádném případě nevedla k hodnotě IVIS $\leq$ 3, což je kritérium používané k identifikaci zkoušené chemické látky jako látky bez kategorie GHS OSN. Míry falešné negativity BCOP v této souvislosti navíc nejsou kriticky důležité, protože všechny zkoušené chemické látky, které indukují hodnotu 3 < IVIS $\leq$ 55, by byly následně zkoušeny dalšími náležitě validovanými zkouškami *in vitro* nebo, jako poslední možnost, na králících, v závislosti na požadavcích právních předpisů, s využitím strategie postupného zkoušení v rámci přístupu hodnocení závažnosti důkazů. Vzhledem k tomu, že některé pevné chemické látky zkušební metoda BCOP správně určuje jako látky v kategorii 1 GHS OSN, ani toto skupenství není považováno za nacházející se mimo oblast použitelnosti této zkušební metody. Zkoušející by mohli zvážit použití této zkušební metody na všechny druhy chemických látek, přičemž hodnota IVIS > 55 by měla být považována za ukazatel reakce indukující vážné poškození očí, které je třeba klasifikovat v kategorii 1 GHS OSN bez dalšího zkoušení. Jak již však bylo uvedeno, kladné výsledky získané u alkoholů a ketonů by se měly z důvodu možné nadhodnocené předpovědi interpretovat opatrně.

Zkušební metodu BCOP lze též použít k identifikaci chemických látek, které není nutné klasifikovat jako látky mající dráždivé účinky na oči nebo vyvolávající vážné poškození očí podle klasifikačního systému GHS OSN (4). Je-li zkušební metoda BCOP použita pro tento účel, má celkovou přesnost 69 % (135/196), míru falešné pozitivity 69 % (61/89) a míru falešné negativity 0 % (0/107) ve srovnání s údaji ze zkušební metody *in vivo* na očích králíků klasifikovanými podle klasifikačního systému GHS OSN (3) (viz dodatek 2, tabulka 2). Zjištěná míra falešné pozitivity (chemické látky bez kategorie GHS OSN ve zkouškách *in vivo* indukují hodnotu IVIS > 3, viz odstavec 47) je značně vysoká, avšak v této souvislosti nikoli kriticky důležitá, protože všechny zkoušené chemické látky, které indukují hodnotu 3 < IVIS $\leq$ 55, by byly následně zkoušeny jinými náležitě validovanými zkouškami *in vitro* nebo, jako poslední možnost, zkouškou na králících, v závislosti na požadavcích právních předpisů, s využitím strategie postupného zkoušení v rámci přístupu posuzování váhy důkazů. Zkušební metoda BCOP nevykazuje žádné specifické nedostatky v případě zkoušení alkoholů, ketonů a pevných látek, pokud je jejím účelem identifikovat chemické látky, které není nutné klasifikovat jako látky mající dráždivé účinky na oči nebo vyvolávající vážné poškození očí (tj. látky bez kategorie GHS OSN) (3). Zkoušející by mohli zvážit použití této zkušební metody na všechny druhy chemických látek, přičemž negativní výsledek (hodnota IVIS $\leq$ 3) by měl být uznán jako ukazatel toho, že látku není nutné klasifikovat (tj. látky bez kategorie GHS OSN). Jelikož zkušební metodou BCOP lze správně identifikovat pouze 31 % chemických látek, které není nutné klasifikovat jako látky mající dráždivé účinky na oči nebo vyvolávající vážné poškození očí, neměla by být tato zkušební metoda první volbou pro zahájení postupu „zdola nahoru“ (5), pokud jsou k dispozici jiné validované a uznané metody *in vitro* s podobně vysokou citlivostí, ale s vyšší specifičností.

▼M7

Databáze pro validaci BCOP obsahovala celkem 113 látek a 100 směsí (2) (3). Zkušební metoda BCOP je proto považována za použitelnou jak ke zkoušení látek, tak ke zkoušení směsí.

Zkušební metoda BCOP se nedoporučuje pro identifikaci zkoušených chemických látek, které by měly být klasifikovány jako látky mající dráždivé účinky na oči (kategorie 2 nebo kategorie 2A GHS OSN), nebo zkoušených chemických látek, které by měly být klasifikovány jako látky mající mírně dráždivé účinky na oči (kategorie 2B GHS OSN), vzhledem k značnému počtu chemických látek kategorie 1 GHS OSN podhodnoceně klasifikovaných v kategorii 2, 2A nebo 2B GHS OSN a látek bez kategorie GHS OSN nadhodnoceně klasifikovaných v kategorii 2, 2A nebo 2B GHS OSN (2) (3). Pro tento účel může být nezbytné další zkoušení s použitím jiné vhodné metody.

V případě všech postupů týkajících se očí skotu a rohovek skotu by se měly dodržovat právní předpisy a postupy pro zacházení s materiály získanými ze zvířat, které kromě jiného zahrnují tkáně a mimobuněčné tekutiny. Doporučují se univerzální laboratorní preventivní opatření (11).

Zkušební metoda nebere v úvahu poškození spojivky a duhovky, ale zabývá se účinky na rohovku, které jsou důležitým faktorem pro stanovení klasifikace *in vivo* při posuzování klasifikace GHS OSN. Reverzibilitu lézí rohovky nelze zkušební metodou BCOP hodnotit samu o sobě. Na základě studií prováděných na očích králíků bylo navrženo, aby se posouzení počáteční hloubky poškození rohovky použilo k identifikaci některých typů nevratných účinků (12). Jsou však nezbytné další vědecké poznatky pro pochopení toho, jakým způsobem dochází k nevratným účinkům, které nejsou spojeny s počáteční vysokou úrovní poškození. A konečně je třeba uvést, že zkušební metoda BCOP neumožňuje posouzení možnosti systémové toxicity spojené s expozicí očí.

Tato zkušební metoda se bude pravidelně aktualizovat, tak jak budou zohledňovány nové informace a údaje. Bude-li například zapotřebí komplexněji charakterizovat poškození rohovky, může být potenciálně užitečná histopatologie. Jak je uvedeno v Dokumentu OECD (GD) č. 160 (13), uživatelům se doporučuje, aby uchovali rohovku a připravili vzorky pro histopatologii, které lze použít pro vytvoření databáze a kritérií rozhodování, jež mohou dále zvýšit přesnost této zkušební metody.

Každá laboratoř, která provádí tuto zkušební metodu poprvé, by měla použít referenční chemické látky uvedené v dodatku 3. Laboratoř může použít tyto chemické látky k prokázání své odborné způsobilosti k provádění zkušební metody BCOP před předložením výsledků získaných zkušební metodou BCOP pro regulační účely klasifikace nebezpečnosti.

PODSTATA ZKOUŠKY

Zkušební metoda BCOP je organotypický model, který zajišťuje krátkodobé udržování běžné fyziologické a biochemické funkce rohovky skotu *in vitro*. V této zkušební metodě se poškození zkoušenou chemickou látkou posuzuje kvantitativním měřením změn v zákalu a propustnosti rohovky za pomoci opacitometru (přístroje na měření průhlednosti) a spektrofotometru, který pracuje ve viditelné oblasti spektra. Obě měření se používají k výpočtu skóre podráždění *in vitro* (IVIS) za účelem přidělení klasifikační kategorie nebezpečnosti z hlediska podráždění *in vitro*, která slouží pro předpovídání potenciálu očního podráždění zkoušenou chemickou látkou *in vivo* (viz kritéria rozhodování v odstavci 48).

Zkušební metoda BCOP používá izolované rohovky z očí čerstvě poráženého skotu. Zákal rohovky se měří kvantitativně jako množství průchodu světla rohovkou. Propustnost se měří kvantitativně jako množství barviva fluoresceinu sodného, které prochází celou tloušťkou rohovky a zjišťuje se v mediu zadní komory. Zkoušené chemické látky se aplikují na epiteliální povrch rohovky

▼M7

přidáním do přední komory držáku rohovky. V dodatku 4 je uveden popis a schématický nákres držáku rohovky používaný ve zkušební metodě BCOP. Držáky rohovky lze komerčně získat z různých zdrojů, nebo je lze zkonstruovat.

Zdroj a věk očí skotu a výběr druhů zvířat

Skot posílaný na jatka se zpravidla poráží buď pro lidskou spotřebu, nebo pro jiná komerční použití. Jako zdroj rohovek pro použití ve zkušební metodě BCOP se používají pouze zdravá zvířata, vyhovující požadavkům pro vstup do lidského potravinového řetězce. Jelikož skot má široký rozsah hmotnosti v závislosti na chovu, věku a pohlaví, neexistuje žádné doporučení týkající se hmotnosti zvířat v době porážky.

Mohou se vyskytnout rozdíly ve velikosti rohovky, když se používají oči od zvířat různého věku. Rohovky o vodorovném průměru > 30,5 mm a s hodnotami základní tloušťky rohovky (CCT) ≥ 1100 μm se obvykle získávají ze skotu staršího osmi let, zatímco rohovky o vodorovném průměru < 28,5 mm a CCT < 900 μm se obvykle získávají ze skotu mladšího pěti let (14). Z těchto důvodů se zpravidla nepoužívají oči ze skotu staršího 60 měsíců. Oči ze skotu mladšího 12 měsíců se tradičně nepoužívají, protože oči se ještě vyvíjejí a tloušťka a průměr rohovky jsou mnohem menší, než jsou zaznamenány u očí dospělého skotu. Používání rohovek z mladých zvířat (tj. 6 až 12 měsíců starých) je však přípustné, jelikož mají určité výhody, např. zvýšená dostupnost, úzký věkový rozsah a nižší nebezpečnost související s potenciální expozicí zaměstnanců bovinní spongiformní encefalopatii (15). Protože by bylo účelné další hodnocení vlivu velikosti nebo tloušťky rohovky na reakci na leptavé a dráždivé chemické látky, uživatelům se doporučuje oznamovat odhadovaný věk a/nebo hmotnost zvířat, které poskytují rohovky používané ve studii.

Získávání a doprava očí do laboratoře

Oči shromažďují zaměstnanci jatek. Aby se minimalizovaly mechanické a jiné druhy poškození očí, měly by se oči odstranit co nejdříve po úmrtí a okamžitě po odstranění i během dopravy by měly být chlazeny. Aby se zamezilo expozici očí potenciálně dráždivým chemickým látkám, zaměstnanci jatek by neměli při oplachování hlavy zvířete používat čisticí prostředky.

Oči by měly být ve vhodně velké nádobě úplně ponořeny do vychlazeného Hanksova vyváženého solného roztoku (HBSS) a dopraveny do laboratoře tak, aby se minimalizovalo poškození a/nebo bakteriální znečištění. Jelikož oči se získávají během procesu porážení, mohou být vystaveny krvi a jiným biologickým materiálům, včetně baktérií a jiných mikroorganismů. Proto je důležité zajistit, aby riziko znečištění bylo minimalizováno (např. držením nádoby, která obsahuje oči, v mokrém ledu, přidáním antibiotik do Hanksova vyváženého solného roztoku (HBSS) použitého k uchování očí během dopravy [např. penicilín se 100 m.j./ml a streptomycin se 100 μg/ml]).

Časový interval mezi získáním očí a použitím rohovky ve zkušební metodě BCOP by měl být co nejkratší (získání a použití se uskutečňuje zpravidla tentýž den) a měl by být prokázán, aby se nenarušily výsledky analýzy. Tyto výsledky jsou založeny na kritériích výběru očí a také na reakcích na pozitivní a negativní kontroly. Všechny oči použité v analýze by měly být ze stejné skupiny očí získaných v určitý den.

Kritéria výběru očí používaných ve zkušební metodě BCOP

Jakmile se oči dostanou do laboratoře, jsou pečlivě vyšetřeny z hlediska vad, včetně zvýšeného zákalu, škrábanců a neovaskularizace. Smějí se používat pouze rohovky z očí, které tyto vady nemají.

▼M7

Kvalita každé rohovky se také hodnotí v pozdějších krocích analýzy. Rohovky, které mají zákal větší než sedm zákalových jednotek nebo zákal odpovídající pro použitý opacitometr a držáky rohovky i po počáteční jednohodinové době vyrovnání, se vyřadí (*POZNÁMKA:* opacitometr by měl být kalibrován podle norem zákalu používaných k určení zákalových jednotek, viz dodatek 4).

Každá zkušební skupina (zkoušená chemická látka, paralelní negativní a pozitivní kontroly) pozůstává nejméně ze třech očí. V případě rohovek pro negativní kontrolu by se ve zkušební metodě BCOP měly používat tři rohovky. Protože všechny rohovky jsou vyříznuty z celé oční koule a vloženy do držáku rohovky, existuje při zpracování možnost vzniku artefaktů, které pak mohou mít vliv na hodnoty zákalu a propustnosti rohovky (včetně negativní kontroly). Kromě toho se hodnoty zákalu a propustnosti rohovek z negativních kontrol používají ke korekci hodnot zákalu a propustnosti rohovek získaných u pozitivních kontrol a u rohovek ovlivněných zkoušenou látkou ve výpočtech IVIS.

POSTUP

Příprava očí

Rohovky, které nemají vady, se vyřezávají s 2 až 3mm okrajem očního bělma, který zůstává a pomáhá v následném ošetření, přičemž se musí dávat pozor, aby se zamezilo poškození epitelu a endotelu rohovky. Oddělené rohovky se zasazují do zvlášť k tomu určených držáků rohovek složených z předních a zadních částí, které které jsou ve styku s epiteliální nebo endoteliální stranou rohovky. Obě komory se úplně zaplní předehřátým Eaglovým minimálním médiem (EMEM = Eagle's Minimum Essential Medium) bez fenolové červeně (nejdříve zadní komora), při tom je třeba zajistit, aby se nevytvořily žádné bubliny. Zařízení se potom temperuje na teplotu 32 ± 1 °C nejméně po dobu jedné hodiny, aby se rohovky mohly teplotně vyrovnat s médiem a dosáhnout v co největším rozsahu běžné metabolické aktivity (přibližná teplota povrchu rohovky *in vivo* je 32 °C).

Po vyrovnání teplot se čerstvé předehřáté médium EMEM bez fenolové červeně přidá do obou komor a pro každou rohovku se změří základní hodnoty zákalu. Všechny rohovky, které vykazují makroskopické poškození tkání (např. poškrábání, pigmentace, neovaskularizace) nebo zákal větší než sedm jednotek zákalu nebo větší než odpovídající hodnota pro použitý opacitometr a držáky rohovky, se vyřadí. Minimálně tři rohovky se vyberou jako rohovky pro negativní kontrolu (nebo pro kontrolu s rozpouštědlem). Zbylé rohovky se potom rozdělí do zkušebních skupin a do skupin pro pozitivní kontrolu.

Jelikož tepelná kapacita vody je ve srovnání se vzduchem vyšší, voda poskytuje stabilnější teplotní podmínky pro inkubaci. Proto se doporučuje používání vodní lázně pro udržování držáku rohovky a jeho obsahu při teplotě 32 ± 1 °C. Vzduchové inkubátory však lze také použít za předpokladu, že budou přijata opatření k zachování tepelné stability (např. předehřátím držáků a médií).

Aplikace zkoušené chemické látky

Používají se dva různé zkušební protokoly, jeden pro tekutiny a smáčedla (pevná nebo tekutá) a jeden pro pevné látky, které nejsou smáčedla.

Tekutiny se zkoušejí neředěné. Obdobně jako tekutiny se zpravidla zkoušejí polotuhé, krémové a voskovité látky. Čistá smáčedla se zkoušejí při koncentraci 10 % (m/V) v 0,9 % roztoku chloridu sodného, destilované vody nebo jiného rozpouštědla, u něhož se prokázalo, že nemá nepříznivé účinky na zkušební systém. U alternativních koncentrací roztoku by mělo být předloženo příslušné

▼M7

zdůvodnění. Směsi obsahující smáčedla by se měly zkoušet nezředěné nebo zředěné na vhodnou koncentraci v závislosti na příslušném scénáři expozice *in vivo*. Pro zkoušenou koncentraci by mělo být předloženo příslušné zdůvodnění. Rohovky jsou vystaveny tekutinám a smáčedlům po dobu 10 minut. Použití jiných dob expozice by mělo být doprovázeno odpovídajícím vědeckým zdůvodněním. Definice smáčedla a směsi obsahující smáčedla jsou uvedeny v dodatku 1.

Pevné látky, které nejsou smáčedla, se zpravidla zkoušejí jako roztoky nebo suspenze při koncentraci 20 % m/V v 0,9 % roztoku chloridu sodného, destilované vody nebo jiného rozpouštědla, u něhož se prokázalo, že nemá nepříznivé účinky na zkušební systém. Za určitých okolností a s náležitým vědeckým zdůvodněním se pevné látky mohou zkoušet také čisté s přímou aplikací na povrch rohovky a s použitím metody otevřených komor (viz odstavec 32). Rohovky jsou vystaveny pevným látkám po dobu čtyř hodin, ale podobně jako u tekutých látek a smáčedel lze s odpovídajícím vědeckým zdůvodněním použít alternativní doby expozice.

Je možné použít různé metody zkoušení v závislosti na fyzické povaze a chemických vlastnostech zkoušené chemické látky (např. pevné látky, tekutiny, viskózní látky versus neviskózní tekutiny). Kritický faktorem je nutnost zajistit, že zkoušená chemická látka náležitě pokrývá epiteliální povrch a že je příslušně odstraněna během oplachování. Metoda uzavřených komor se obvykle používá pro neviskózní až mírně viskózní tekuté zkoušené chemické látky, zatímco metoda otevřených komor se zpravidla používá pro poloviskózní a viskózní tekuté zkoušené chemické látky a pro čisté pevné látky.

V metodě uzavřených komor se dostatečné množství zkoušené chemické látky (750 µL) k pokrytí epiteliální strany rohovky zavádí do přední komory přes dávkovací otvory na horním povrchu komory a otvory jsou potom během expozice uzavřeny komorovými zátkami. Je důležité zajistit, aby každá rohovka byla vystavena zkoušené chemické látce po příslušnou dobu.

V metodě otevřených komor se před zkoušením odstraní z přední komory zajišťovací kroužek okénka a skleněné okénko. Kontrolní nebo zkoušená chemická látka (750 µl nebo dostatečné množství zkoušené chemické látky, aby úplně pokryla rohovku) se aplikuje přímo na epiteliální povrch rohovky pomocí mikropipety. Pokud je zkoušenou látku obtížné pipetovat, lze použít objemovou tlakovou pipetu (positive displacement pipette), což pomůže v dávkování. Špička objemové pipety se zasune do dávkovací špičky injekční stříkačky tak, aby látku bylo možné zavést pod tlakem do špičky vytěsňování. Píst injekční stříkačky se stlačí současně s tím, jak se píst pipety vytahuje nahoru. Pokud se ve špičce pipety objeví vzduchové bubliny, zkoušená chemická látka se odstraní (vytlačí) a postup se opakuje, dokud špička není naplněná bez vzduchových bublin. V případě potřeby lze použít běžnou injekční stříkačku (bez jehly), protože umožňuje měření přesného objemu zkoušené chemické látky a snadnější aplikaci na epiteliální povrch rohovky. Po dávkování se skleněné okénko umístí znovu na přední komoru, aby se obnovil uzavřený systém.

Inkubace po expozici

Po době expozice se zkoušená chemická látka, chemická látka pro negativní kontrolu nebo chemická látka pro pozitivní kontrolu odstraní z přední komory a epitel se nejméně třikrát opláchne (nebo se oplachuje tak dlouho, dokud nepřestanou být viditelné stopy zkoušené chemické látky) médiem EMEM (obsahující fenolovou červeň). Na oplachování se používá médium obsahující fenolovou červeň, protože změnou barvy fenolové červeně lze sledovat, jak účinné bylo oplachování kyselých nebo alkalických zkušebních chemických látek. Rohovky se proplachují více než třikrát, pokud je fenolová červeň ještě zbarvená (do žluta nebo do nachova), nebo pokud je zkoušená chemická látka stále viditelná.

▼M7

Jakmile již v médiu není zkoušená chemická látka, rohovky se naposledy opláchnou médiem EMEM (bez fenolové červeně). EMEM (bez fenolové červeně) se používá na konečný oplach proto, aby se před měřením zákalu zajistilo odstranění fenolové červeně z přední komory. Přední komora se pak naplní čerstvým EMEM bez fenolové červeně.

U tekutin nebo smáčedel se rohovky po oplachu inkubují po dobu dalších dvou hodin při teplotě 32 ± 1 °C. Delší doba po expozici by byla za určitých okolností účelná a mohla by se zvážit případ od případu. Rohovky zkoušené s pevnými látkami se důkladně propláchnou na konci doby čtyřhodinové expozice, ale nevyžadují si další inkubaci.

Zákal a propustnost každé rohovky se v případě tekutých látek a smáčedel zaznamená na konci doby inkubace po expozici a v případě pevných látek, které nejsou smáčedla, na konci doby čtyřhodinové expozice. Každá rohovka se sleduje rovněž vizuálně a případná pozorování se zaznamenají (např. odlupování tkáně, zbytky zkoušené chemické látky, nejednotné struktury rohovky). Tato pozorování by mohla být důležitá, protože mohou souviset se změnami v údajích opacitometru.

Chemické látky pro kontrolu

Do každého pokusu se zařazují souběžné negativní kontroly nebo kontroly s rozpouštědlem/vehikulem a pozitivní kontroly.

Když se zkouší tekutá látka při 100 % koncentraci, souběžná negativní kontrola (např. 0,9 % roztok chloridu sodného nebo destilovaná voda) se zahrne do zkušební metody BCOP, takže jemožné zjistit nespecifické změny ve zkušebním systému a zajistit základní úroveň účinku pro konečné analýzy. Tím se rovněž zajistí, že podmínky analýzy nebudou mít za následek nevhodnou dráždivou reakci.

Když se zkouší rozředěná tekutina, smáčedlo nebo pevná látka, skupina pro souběžnou kontrolu s rozpouštědlem/vehikulem se zahrne do zkušební metody BCOP tak, aby bylo možné zjistit nespecifické změny ve zkušebním systému a zajistit základnu pro koncové body analýzy. Lze použít pouze rozpouštědlo/vehikulum, u kterého se prokázalo, že nemá nepříznivé účinky na zkušební systém.

Do každého pokusu se zařadí chemická látka, o níž se ví, že vyvolává pozitivní reakce, jako souběžná pozitivní kontrola, aby se ověřila integrita zkušebního systému a jeho správné fungování. Aby bylo možné vyhodnotit proměnlivost reakce na pozitivní kontrolu v čase, rozsah dráždivé reakce by neměl být nadměrný.

Příklady pozitivních kontrol pro kapalné zkoušené chemické látky jsou 100 % ethanol nebo 100 % dimethylformamid. Příkladem pevných zkoušených látek pro pozitivní kontrolu je 20 % (m/V) imidazol v 0,9 % roztoku chloridu sodného.

Srovnávací chemické látky jsou účelné pro hodnocení potenciálu podráždění očí neznámými chemickými látkami nebo specifickými třídami chemických látek či produktů nebo pro hodnocení potenciálu relativního podráždění látkou s dráždivými účinky na oči ve specifickém rozmezí dráždivých reakcí.

Měřené koncové účinky

Zákal se určuje množstvím průchodu světla rohovkou. Zákal rohovky se kvantitativně měří za pomoci opacitometru a výsledkem jsou hodnoty zákalu měřené v kontinuálním rozsahu.

Propustnost se určuje množstvím barviva fluoresceinu sodného, které proniká všemi vrstvami buněk rohovky (tj. epitelem na vnějším povrchu rohovky přes endotel na vnitřním povrchu rohovky). Jeden ml roztoku fluoresceinu sodného (4 nebo 5 mg/ml, když se příslušně zkoušejí tekuté látky a smáčedla nebo pevné látky, které nejsou smáčedla) se přidává do přední komory držáku rohovky, která je spojena s epiteliální stranou rohovky, zatímco zadní komora, která je spojena s endoteliální stranou rohovky, se naplní čerstvým médiem EMEM. Držák se

▼M7

potom ve vodorovné poloze inkubuje po dobu 90 ± 5 min. na teplotu 32 ± 1 °C. Množství fluoresceinu sodného, který přechází do zadní komory, se kvantitativně měří za pomoci spektrofotometrie UV/VIS. Spektrofotometrická měření hodnocená ve 490 nm se zaznamenají jako optická hustota (OD_{490}) nebo hodnoty absorbance, které se měří v kontinuálním rozsahu. Hodnoty propustnosti fluoresceinu se stanoví s použitím hodnot OD_{490} na základě spektrofotometru viditelného světla s použitím běžné optické délky 1 cm.

Alternativně se může použít analyzátor destiček s 96 jamkami, pokud i) lze stanovit rozsah linearity měření analyzátoru destiček pro určení hodnot fluoresceinu OD_{490}; a ii) v 96jamkové destičce je použit správný objem vzorků, jehož výsledkem jsou hodnoty OD_{490} odpovídající běžné optické délce 1 cm (to by si mohlo vyžadovat úplně plnou jamku [obvykle 360µL]).

ÚDAJE A PŘEDKLÁDÁNÍ ZPRÁV

Hodnocení údajů

Jakmile se hodnoty zákalu a střední hodnoty propustnosti (OD_{490}) upraví na zákal pozadí a hodnoty propustnosti OD_{490}pro negativní kontrolu, střední hodnoty zákalu a propustnosti OD_{490}pro každou zkušební skupinu by se měly spojit do empiricky odvozeného vzorce, aby se vypočítal stav podráždění *in vitro* (IVIS) pro každou zkušební skupinu takto:

IVIS = střední hodnota zákalu + (15 × střední hodnota propustnosti OD_{490}).

Sina *et al*. uvádějí, že tento vzorec byl odvozen během laboratorních a mezilaboratorních studií. Údaje vytvořené pro řady 36 sloučenin v multilaboratorní studii byly předmětem vícerozměrné analýzy s cílem určit nejvhodnější rovnováhu mezi údaji *in vivo* a *in vitro*. Tuto analýzu provedli vědci ve dvou samostatných firmách a odvodili téměř totožné rovnice.

Hodnoty zákalu a propustnosti by se měly rovněž posuzovat samostatně, aby se určilo, zda zkoušená chemická látka způsobuje poleptání nebo silné podráždění pomocí pouze jednoho nebo dvou koncových účinků (viz kritéria rozhodování).

Kritéria rozhodování

Dále jsou uvedeny hraniční hodnoty IVIS pro identifikaci zkoušených chemických látek vyvolávajících vážné poškození očí (kategorie 1 GHS OSN) a zkoušených chemických látek, které není nutné klasifikovat jako látky mající dráždivé účinky na oči nebo vyvolávající vážné poškození očí (bez kategorie GHS OSN):

IVIS	GHS OSN
≤ 3	Bez kategorie
> 3; ≤ 55	Nelze předpovědět
> 55	Kategorie 1

Kritéria přijatelnosti studie

Zkouška se považuje za přijatelnou, pokud pozitivní kontrola vykazuje IVIS spadající do obvyklých odchylek historické střední hodnoty, kterou je třeba aktualizovat nejméně každé tři měsíce nebo pokaždé, když se přijatelná zkouška vykonává v laboratořích, kde se zkoušky nedělají často (tj. méně než jednou měsíčně). Výsledkem reakce na negativní kontrolu nebo na kontrolu s rozpouštědlem/vehikulem by měly být hodnoty zákalu a propustnosti, které jsou nižší než stanovené horní meze pro hodnoty zákalu pozadí a prostupnosti u rohovek skotu exponované příslušnou negativní kontrolou nebo kontrolou s rozpouštědlem/vehikulem. U zkoušené chemické látky s jednoznačnou výslednou klasifikací

▼M7

by mělo stačit jedno provedení zkoušky za použití alespoň tří rohovek. Avšak v případě hraničních výsledků při prvním provedení zkoušky by se mělo zvážit druhé provedení zkoušky (ale není nezbytně nutné) a v případě nesouhlasných výsledků střední hodnoty IVIS mezi prvními dvěma provedeními zkoušky i třetí provedení zkoušky. V této souvislosti se výsledek prvního provedení zkoušky považuje za hraniční, pokud předpovědi na základě tří rohovek byly nesouhlasné tak, že:

— údaje u dvou ze tří rohovek vedly k nesouhlasným předpovědím oproti předpovědi učiněné na základě střední hodnoty údajů ze všech tří rohovek NEBO

— údaje u jedné ze tří rohovek vedly k nesouhlasné předpovědi oproti předpovědi učiněné na základě střední hodnoty údajů ze všech tří rohovek A tento nesouhlasný výsledek byl >10 jednotek IVIS od hraniční prahové hodnoty 55.

— Pokud opakované provedení zkoušky potvrdí předpověď vzešlou z prvního provedení zkoušky (na základě střední hodnoty IVIS), lze přijmout konečné rozhodnutí bez dalšího zkoušení. Pokud výsledky opakovaného provedení zkoušky vedou k nesouhlasné předpovědi oproti prvnímu provedení zkoušky (na základě střední hodnoty IVIS), mělo by se uskutečnit třetí a poslední provedení zkoušky s cílem vyřešit rozporné předpovědi a dospět ke klasifikaci zkoušené chemické látky. Od dalšího zkoušení za účelem klasifikace a označení může být přípustné upustit v případě, že kterékoli provedení zkoušky vede k předpovědi klasifikace v kategorii 1 GHS OSN.

Závěrečná zpráva

Závěrečná zpráva by měla zahrnovat následující informace, pokud jsou relevantní pro provedení studie:

Zkoušené chemické látky a chemické látky pro kontrolu

— Chemický název (chemické názvy), např. strukturní název podle Chemical Abstracts Service (CAS) spolu s dalšími názvy, jsou-li známy; registrační číslo CAS (CASRN), je-li známo,

— čistota a složení zkušební/kontrolní chemické látky (v hmotnostních procentech), jsou-li tyto informace dostupné,

— fyzikálně chemické vlastnosti, např. fyzikální stav, těkavost, pH, stálost, třída chemických látek, rozpustnost ve vodě odpovídající provádění studie,

— případně ošetření zkoušených chemických látek/kontrolních látek před zkoušením (např. zahřátí, mletí),

— stabilita, je-li známa.

Informace týkající se zadavatele a zkušebního zařízení

— jméno a adresa zadavatele, zkušebního zařízení a vedoucího studie.

Podmínky zkušební metody

— Použitý opacitometr (např. model a specifikace) a nastavení přístroje,

— informace o kalibraci zařízení použitých k měření zákalu a propustnosti (např. opacitometr a spektrofotometr), aby bylo možné zajistit linearitu měření,

— typ použitého držáku rohovky (např. model a specifikace),

▼M7

— popis jiného použitého zařízení,

— postup použitý k zajištění integrity (tj. přesnosti a spolehlivosti) zkušební metody v čase (např. pravidelné zkoušení chemických látek pro prokázání způsobilosti).

Kritéria přijatelnosti zkoušky

— Přijatelné rozsahy souběžných pozitivních a negativních kontrol založené na porovnání s historickými údaji,

— případně přijatelné rozsahy souběžných srovnávacích kontrol na základě historických údajů.

Získávání a příprava očí

— Určení zdroje očí (tj. zařízení, z něhož byly získány),

— průměr rohovek jako měřítko věku zdrojových zvířat a vhodnosti pro studii,

— podmínky skladování a dopravy očí (např. datum a čas získání očí, časový interval před zahájením zkoušení, dopravní prostředky a teplotní podmínky dopravy, všechna použitá antibiotika),

— příprava a upevnění rohovek skotu včetně uvedení jejich kvality, teploty držáků rohovky a kritérií pro výběr rohovek pro zkoušení.

Postup zkoušky

— Počet použitých replik,

— identifikace použitých negativních a pozitivních kontrol (případně také kontrol s rozpouštědlem a srovnávacích kontrol),

— koncentrace zkoušené chemické látky, použitá doba expozice a doba inkubace po expozici,

— popis použitých hodnotících kritérií a kritérií rozhodování,

— popis použitých kritérií přijatelnosti studie,

— popis jakýchkoli úprav zkušebního postupu,

— popis použitých kritérií rozhodování.

Výsledky

— Sestavení údajů z jednotlivých zkušebních vzorků do tabulek (např. hodnoty zákalu OD_{490}a vypočítaný IVIS pro zkoušenou chemickou látku a pozitivní, negativní a srovnávací kontroly [jsou-li zahrnuty] uvedené v tabulkové formě, případně včetně údajů z několikrát opakovaných pokusů a středních hodnot ± běžné odchylky pro každý pokus),

— popis jiných pozorovaných účinků,

— případná odvozená klasifikace GHS OSN *in vitro*.

Diskuse o výsledcích

Závěr

▼**M7**

LITERATURA

1) ICCVAM (2006). Test Method Evaluation Report – *In Vitro* Ocular Toxicity Test Methods for Identifying Ocular Severe Irritants and Corrosives. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No.: 07-4517. Dostupné na: http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmer.htm.

2) ICCVAM (2010). ICCVAM Test Method Evaluation Report: Current Validation Status of *In Vitro* Test Methods Proposed for Identifying Eye Injury Hazard Potential of Chemicals and Products. NIH Publication No.10-7553. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Dostupné na: http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/MildMod-TMER.htm.

3) OECD (2013). Streamlined Summary Document supporting the Test Guideline 437 for eye irritation/corrosion. Series on Testing and Assessment, No.189, OECD, Paris.

4) UN (2011). United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), ST/SG/AC.10/30 Rev 4, New York and Geneva: United Nations. Dostupné na: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev04/04files_e.html.

5) Scott, L., Eskes, C., Hoffmann, S., Adriaens, E., Alépée, N., Bufo, M., Clothier, R., Facchini, D., Faller, C., Guest, R., Harbell, J., Hartung, T., Kamp, H., Le Varlet, B., Meloni, M., McNamee, P., Osborne, R., Pape, W., Pfannenbecker, U., Prinsen, M., Seaman, C., Spielman, H., Stokes, W., Trouba, K., Van den Berghe, C., Van Goethem, F., Vassallo, M., Vinardell, P., and Zuang, V. (2010). A proposed eye irritation testing strategy to reduce and replace *in vivo* studies using Bottom-Up and Top-Down approaches. *Toxicol. in Vitro* 24:1-9.

6) ICCVAM (2006). ICCVAM Recommended BCOP Test Method Protocol. In: ICCVAM Test Method Evaluation Report – *in vitro* Ocular Toxicity Test Methods for Identifying Ocular Severe Irritants and Corrosives. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No.: 07-4517. Dostupné na: http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmer.htm.

7) ICCVAM (2010). ICCVAM Recommended BCOP Test Method Protocol. In: ICCVAM Test Method Evaluation Report – Current Validation Status of *In Vitro* Test Methods Proposed for Identifying Eye Injury Hazard Potential of Chemicals and Products. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No.: 10-7553A. Dostupné na: http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/MildMod-TMER.htm.

8) INVITTOX (1999). Protocol 124: Bovine Corneal Opacity and Permeability Assay – SOP of Microbiological Associates Ltd. Ispra, Italy: Evropské středisko pro validaci alternativních metod (ECVAM).

9) Gautheron, P., Dukic, M., Alix, D. and Sina, J.F. (1992). Bovine corneal opacity and permeability test: An *in vitro* assay of ocular irritancy. *Fundam. Appl. Toxicol.* 18:442-449.

10) Prinsen, M.K. (2006). The Draize Eye Test and *in vitro* alternatives; a left-handed marriage? *Toxicol. in Vitro* 20:78-81.

11) Siegel, J.D., Rhinehart, E., Jackson, M., Chiarello, L., and the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (2007). Guideline for Isolation Precautions: Preventing Transmission of Infectious Agents in Healthcare Settings. Dostupné na: [http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/pdf].

▼**M7**

12) Maurer, J.K., Parker, R.D. and Jester, J.V. (2002). Extent of corneal injury as the mechanistic basis for ocular irritation: key findings and recommendations for the development of alternative assays. *Reg. Tox. Pharmacol.* 36:106-117.

13) OECD (2011). Guidance Document on The Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) and Isolated Chicken Eye (ICE) Test Methods: Collection of Tissues for Histological Evaluation and Collection of Data on Non-severe Irritants. Series on Testing and Assessment, No. 160. Adopted 25. October 2011. Paris: Organisation for Economic Co-operation and Development.

14) Doughty, M.J., Petrou, S. and Macmillan, H. (1995). Anatomy and morphology of the cornea of bovine eyes from a slaughterhouse. *Can. J. Zool.* 73:2159-2165.

15) Collee, J. and Bradley, R. (1997). BSE: A decade on – Part I. The Lancet 349: 636-641.

16) Sina, J.F., Galer, D.M., Sussman, R.S., Gautheron, P.D., Sargent, E.V., Leong, B., Shah, P.V., Curren, R.D., and Miller, K. (1995). A collaborative evaluation of seven alternatives to the Draize eye irritation test using pharmaceutical intermediates. *Fundam. Appl. Toxicol.* 26:20-31.

17) Kapitola B.5 této přílohy, Akutní dráždivé/leptavé účinky na oči.

18) ICCVAM (2006). Current Status of *In Vitro* Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants: Bovine Corneal Opacity and Permeability Test Method. NIH Publication No.: 06-4512. Research Triangle Park: National Toxicology Program. Dostupné na: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_bcop.htm].

19) OECD (1998). Series on Good Laboratory Practice and Compliance Monitoring. No. 1: OECD Principles on Good Laboratory Practice (revised in 1997).

Dostupné na: http://www.oecd.org/document/63/0,3343,en_2649_34381_2346175_1_1_1_1,00.html

▼M7

Dodatek 1

DEFINICE

Přesnost: Přesnost shody mezi výsledky zkušební metody a přijatými referenčními hodnotami. Je to měření výsledku zkušební metody a jednoho aspektu „důležitosti“. Termín se často používá namísto „souladu“, kterým se rozumí podíl správných výsledků zkušební metody.

Srovnávací chemická látka: Látka použitá jako norma pro srovnání se zkoušenou látkou. Srovnávací látka by měla mít tyto vlastnosti: i) nesporný a spolehlivý zdroj (nesporné a spolehlivé zdroje); ii) strukturální a funkční podobnost s třídou zkoušených látek; iii) známé fyzikální/chemické vlastnosti; iv) podpůrné údaje o známých účincích a v) známá síla v rozsahu žádoucí reakce.

Přístup „zdola nahoru“: Přístup zkoušení po krocích používaný u chemických látek, u nichž se předpokládá, že je není nutné klasifikovat jako látky mající dráždivé účinky na oči nebo vyvolávající vážné poškození očí, který začíná odlišením chemických látek, u nichž není nutná klasifikace (negativní výsledek), od ostatních chemických látek (pozitivní výsledek).

Chemická látka: Látka nebo směs.

Rohovka: Průhledná přední část oční bulvy, která zahrnuje duhovku a zornici a propouští světlo dovnitř oka.

Zákal rohovky: Měření rozsahu zákalu rohovky po expozici zkoušené chemické látce. Zvýšený zákal rohovky je příznačný pro poškození rohovky. Zákal lze hodnotit subjektivně, jak se to dělá ve Draizeově oční zkoušce na králících, nebo objektivně s přístrojem jako je „opacitometr“.

Propustnost rohovky: Kvantitativní měření poškození epitelu rohovky určením množství barviva fluoresceinu sodného, který prochází všemi vrstvami buněk rohovky.

Podráždění očí: vyvolání změn na oku po aplikaci zkoušené chemické látky na přední plochu oka, které jsou plně vratné do 21 dní od aplikace. Tento pojem je zaměnitelný s výrazy „vratné účinky na oko“ a „kategorie 2 GHS OSN“ (4).

Míra falešné negativity: Podíl všech pozitivních chemických látek falešně zjištěných zkušební metodou jako negativní. Je to jeden z ukazatelů výsledku zkušební metody.

Míra falešné pozitivity: Podíl všech negativních látek falešně zjištěných zkušební metodou jako pozitivní. Je to jeden z ukazatelů výsledku zkušební metody.

Nebezpečnost: Základní charakteristika látky nebo situace, která má potenciál vyvolat nepříznivé účinky, jsou-li organismus, systém nebo (sub)populace vystaveny této látce.

Skóre podráždění *in vitro* (IVIS): Empiricky odvozený vzorec používaný ve zkušební metodě BCOP, přičemž střední hodnoty zákalu a propustnosti se pro každou zkušební skupinu spojí do jedné hodnoty *in vitro* pro každou zkušební skupinu. IVIS = střední hodnota zákalu + (15 × střední hodnota propustnosti).

Nevratné účinky na oči: Viz „vážné poškození očí“.

▼M7

Směs: Směs nebo roztok tvořený dvěma nebo více látkami, které v něm nereagují (4).

Negativní kontrola: Neovlivněná replika, která obsahuje všechny složky zkušebního systému. Tento vzorek se zpracovává se vzorky zkoušené chemické látky a jinými kontrolními vzorky, aby se zjistilo, zda rozpouštědlo vzájemně reaguje se zkušebním systémem.

Neklasifikované: Chemické látky, které nejsou klasifikované jako látky mající dráždivé účinky na oči (kategorie 2, 2A nebo 2B GHS OSN) nebo jako látky vyvolávající vážné poškození očí (kategorie 1 GHS OSN). Tento pojem je zaměnitelný s pojmem „bez kategorie GHS OSN“.

Opacitometr: Přístroj používaný k měření „zákalu rohovky“ kvantitativním hodnocením světelné propustnosti přes rohovku. Typický přístroj má dvě části, každá s vlastním zdrojem světla a fotobuňkou. Jedna část se používá pro zkoušenou rohovku a druhá pro kalibraci a vynulování přístroje. Světlo z halogenové lampy se posílá přes kontrolní část (prázdná komora bez okének nebo tekutiny) do fotobuňky a vyrovnané se světlem se posílá do fotobuňky přes zkušební část, ve které se nachází komora obsahující rohovku. Rozdíl ve světelné propustnosti z fotobuněk se porovnává a numerická hodnota zákalu se zobrazí na digitální obrazovce.

Pozitivní kontrola: Replika obsahující všechny složky zkušebního systému a zkoušená s chemickou látkou, o níž je známo, že způsobuje pozitivní reakci. Aby se zajistilo, že proměnlivost v reakci na pozitivní kontrolu bude možné časem vyhodnotit, rozsah pozitivní reakce by neměl být nadměrný.

Vratné účinky na oči: Viz „dráždivé účinky na oči“.

Spolehlivost: Měření rozsahu, v jakém může být zkušební metoda časem reprodukovatelná v laboratořích a mezi laboratořemi, když se provádí s použitím stejného protokolu. Hodnotí se to výpočtem laboratorní a mezilaboratorní reprodukovatelnosti a laboratorní opakovatelnosti.

Vážné poškození očí: Tvorba poškození tkání v oku nebo závažné fyzikální slábnutí vidění po aplikaci zkoušené látky na přední plochu oka, které není plně vratné do 21 dní od aplikace. Tento pojem je zaměnitelný s výrazy „nevratné účinky na oči“ a „kategorie 1 GHS OSN“ (4).

Kontrola s rozpouštědlem/vehikulem: Neošetřený vzorek obsahující všechny složky zkušebního systému, včetně rozpouštědla nebo vehikula, který se zpracovává se vzorky exponované zkoušené chemické látky a jinými kontrolními vzorky, aby se zjistila základní reakce vzorků zkoušených se zkoušenou chemickou látkou rozpuštěnou ve stejném rozpouštědle nebo vehikulu. Pokud se vzorek zkouší souběžnou negativní kontrolou, ukazuje také, zda rozpouštědlo nebo vehikul vzájemně reaguje se zkušebním systémem.

Látka: Chemické prvky nebo jejich sloučeniny v přírodním stavu nebo získané výrobním procesem včetně všech přídatných látek nutných k uchování stability výrobku a všech nečistot vznikajících v použitém procesu, ale s vyloučením všech rozpouštědel, která je možno oddělit bez ovlivnění stability látky nebo změny jejího složení (4).

▼M7

Smáčedlo: Nazývané též povrchově aktivní látka, je látka, jako např. detergent, která je schopna snížit povrchové napětí kapaliny a umožnit jí vytvářet pěnu nebo pronikat do pevných látek; je též známa jako surfaktant.

Směs obsahující smáčedla: V kontextu této zkušební metody je to směs obsahující jedno nebo více smáčedel v konečné koncentraci > 5 %.

Přístup „shora dolů“: Přístup zkoušení po krocích používaný u chemických látek, u nichž se předpokládá, že způsobují vážné poškození očí, který začíná odlišením chemických látek vyvolávajících vážné poškození očí (pozitivní výsledek) od jiných chemických látek (negativní výsledek).

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

Strategie postupného zkoušení: Strategie postupného zkoušení, kde se všechny existující informace o zkoušené chemické látce přezkoumávají ve stanoveném pořadí s použitím postupu váhy důkazů na každém stupni, aby se zjistilo, zda je k dispozici dost informací pro rozhodnutí o klasifikaci nebezpečnosti, než se postoupí do dalšího stupně. Pokud potenciál dráždivých účinků zkoušené chemické látky lze určit na základě existujících informací, další zkoušení není nutné. Jestliže potenciál dráždivých účinků zkoušené látky nelze určit na základě existujících informací, použije se stupňovitý postupný postup zkoušení na zvířatech po krocích, dokud se nestanoví jednoznačná klasifikace.

Globálně harmonizovaný systém klasifikace a označování chemických látek Organizace spojených národů (GHC OSN): Systém navrhující klasifikaci látek a směsí podle standardizovaných typů a úrovní fyzikálních, zdravotních a environmentálních nebezpečí a řešící příslušné komunikační prvky, jako jsou piktogramy, signální slova, výroky o nebezpečí, výroky o bezpečnostních opatřeních a bezpečnostní datové listy, které obsahují informace o jejich nežádoucích účincích s ohledem na ochranu lidí (včetně zaměstnavatelů, dělníků, přepravců, spotřebitelů a osob reagujících na havárie) a životního prostředí (4).

Kategorie 1 GHS OSN: Viz „vážné poškození očí“.

Kategorie 2 GHS OSN: Viz „dráždivé účinky na oči“.

Bez kategorie GHS OSN: Chemické látky, které nesplňují požadavky na klasifikaci v kategorii 1 nebo 2 (2A nebo 2B) GHS OSN. Tento pojem je zaměnitelný s výrazem „neklasifikované“.

Validovaná zkušební metoda: Zkušební metoda, u níž byly provedeny validační studie k určení její relevantnosti (včetně přesnosti) a spolehlivosti pro konkrétní účel. Je nutné poznamenat, že validovaná zkušební metoda nemusí poskytnout postačující výsledek z hlediska přesnosti a spolehlivosti, aby byla shledána přijatelnou pro navržený účel.

Závažnost důkazů: Postup zvažování silných a slabých stránek různých informací v dosahování a podpoře závěru týkajícího se potenciálu nebezpečnosti látky.

▼M7

Dodatek 2

PREDIKTIVNÍ SCHOPNOST ZKUŠEBNÍ METODY BCOP

Tabulka 1

Prediktivní schopnost BCOP při identifikaci chemických látek vyvolávajících vážné poškození očí [GHS OSN / CLP EU: kat. 1 versus jiné než kat. 1 (kat. 2 + bez kat.); EPA USA: kat. I versus jiné než kat I (kat. II + kat. III + kat. IV)]

Klasifikační systém	Počet	Přesnost		Citlivost		Falešně negativní		Specifičnost		Falešně pozitivní	
		v %	Počet	v %	Počet	v %	Počet	v %	Počet	v %	Počet
GHS OSN CLP EU	191	78,53	150/ 191	86,15	56/65	13,85	9/65	74,60	94/ 126	25,40	32/126
EPA USA	190	78,95	150/ 190	85,71	54/63	14,29	9/63	75,59	96/ 127	24,41	31/127

Tabulka 2

Prediktivní schopnost BCOP při identifikaci chemických látek, které není nutné klasifikovat jako látky mající dráždivé účinky na oči nebo vyvolávající vážné poškození očí [GHS OSN / CLP EU:. bez kat. versus jiné než bez kat. (kat. 1 + kat. 2); EPA USA: kat. IV versus jiné než kat. IV (kat. I + kat. II + kat. III)]

Klasifikační systém	Počet	Přesnost		Citlivost		Falešně negativní		Specifičnost		Falešně pozitivní	
		v %	Počet	v %	Počet	v %	Počet	v %	Počet	v %	Počet
GHS OSN CLP EU	196	68,88	135/ 196	100	107/ 107	0	0/107	31,46	28/89	68,54	61/89
EPA USA	190	82,11	156/ 190	93,15	136/ 146	6,85	10/ 146	45,45	20/44	54,55	24/44

▼M7

Dodatek 3

CHEMICKÉ LÁTKY PRO PROKÁZÁNÍ ZPŮSOBILOSTI PRO ZKUŠEBNÍ METODU BCOP

Dříve než začnou laboratoře rutinně používat tuto zkušební metodu, měly by prokázat svou odbornou způsobilost správným určením klasifikace nebezpečnosti pro oči u 13 chemických látek doporučených v tabulce 1. Tyto chemické látky byly vybrány tak, aby představovaly rozsah reakcí na nebezpečnost pro oči na základě výsledků oční zkoušky *in vivo* na králících (TG 405) (17) a klasifikačního systému GHS OSN (tj. kategorie 1, 2A, 2B, nebo neklasifikované) (4). Dalšími kritérii výběru bylo to, zda látka je komerčně dostupná, zda jsou k dispozici kvalitní referenční údaje *in vivo* a zda jsou kvalitní údaje *in vitro* získané ze zkušební metody BCOP. Referenční údaje jsou dostupné v publikacích *Streamlined Summary Document* (Racionalizovaný souhrnný dokument) (3) a v *Background Review Document* (Základní dokument o přezkumu) ICCVAM pro zkušební metodu BCOP (2) (18).

Tabulka 1

Doporučené chemické látky pro prokázání způsobilosti k provádění zkušební metody BCOP

Chemická látka	Registrační číslo CAS	Třída chemické látky ([1])	Fyzikální forma	Klasifikace *in vivo* ([2])	Klasifikace BCOP
Benzalkoniumchlorid (5 %)	8001-54-5	Oniová sloučenina	Kapalná	Kategorie 1	Kategorie 1
Chlorhexidin	55-56-1	Amin, amidin	Pevná	Kategorie 1	Kategorie 1
Dibenzoyl-L–tartarová kyselina	2743-38-6	Karboxylová kyselina, ester	Pevná	Kategorie 1	Kategorie 1
Imidazol	288-32-4	Heterocyklická	Pevná	Kategorie 1	Kategorie 1
Kyselina trichloroctová (30 %)	76-03-9	Karboxylová kyselina	Kapalná	Kategorie 1	Kategorie 1
2,6-dichlorbenzoylchlorid	4659-45-4	Acylhalogenid	Kapalná	Kategorie 2A	Nelze přesně/spolehlivě předpovědět
Ethyl-2-methylacetoacetát	609-14-3	Keton, ester	Kapalná	Kategorie 2B	Nelze přesně/spolehlivě předpovědět
Dusičnan amonný	6484-52-2	Anorganická sůl	Pevná	Kategorie 2 ([3])	Nelze přesně/spolehlivě předpovědět
Dihydrát draselné soli kyseliny ethylendiamintetraoctové	25102-12-9	Amin, karboxylová kyselina (sůl)	Pevná	Neklasifikována	Neklasifikována
Tween 20	9005-64-5	Ester, polyether	Kapalná	Neklasifikována	Neklasifikována
2-mercaptopyrimidin	1450-85-7	Acylhalogenid	Pevná	Neklasifikována	Neklasifikována
Fenylbutazon	50-33-9	Heterocyklická	Pevná	Neklasifikována	Neklasifikována

▼**M7**

Chemická látka	Registrační číslo CAS	Třída chemické látky (1)	Fyzikální forma	Klasifikace *in vivo* (2)	Klasifikace BCOP
Polyoxyethylen 23 lauryl ether (BRIJ-35) (10 %)	9002-92-0	Alkohol	Kapalná	Neklasifikována	Neklasifikována

Zkratky: CASRN = Chemical Abstracts Service Registry Number (registrační číslo CAS).

(1) Chemické třídy byly přiděleny každé zkoušené chemické látce s použitím standardního klasifikačníhoschématu na základě klasifikačního systému Národní knihovny názvů léků a léčivých látek (MeSH)(dostupný na: http://www.nlm.nih.gov/mesh).

(2) Založena na oční zkoušce in vivo na králících (OECD TG 405) (17) a s použitím GHS OSN (4).

(3) Klasifikace jako 2A nebo 2B závisí na interpretaci kritéria GHS OSN pro rozlišování mezi těmito dvěmakategoriemi, tj. 1 ze 3 versus 2 ze 3 zvířat s účinky v den 7 nezbytnými pro stanovení klasifikace v kategorii2A Studie in vivo byla provedena na 3 zvířatech. Všechny sledované vlastnosti kromě zčervenání spojivek ujednoho zvířete se ke dni 7 nebo dříve vrátily zpět na nulovou hodnotu. Toto jedno zvíře, které se ke dni 7zcela neuzdravilo, mělo hodnotu zčervenání spojivek 1 (v den 7) a plně se uzdravilo v den 10.

▼M7

Dodatek 4

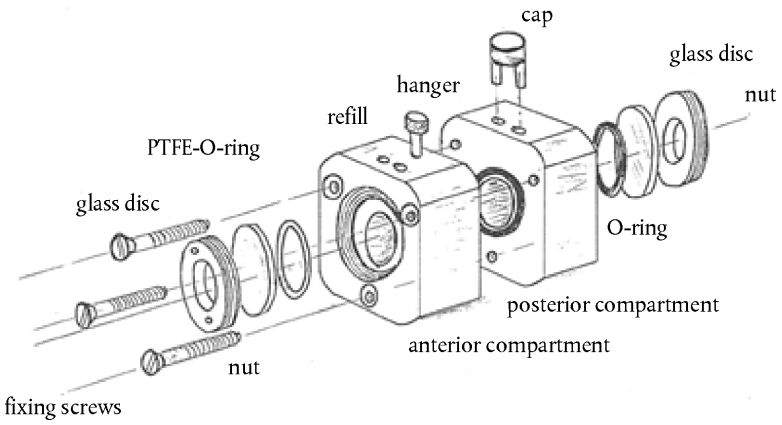
DRŽÁK ROHOVEK BCOP

Držáky rohovek pro BCOP se vyrábějí z inertního materiálu (např. polypropylenu). Držáky se skládají ze dvou polovin (přední a zadní komora) a mají dvě podobné cylindrické vnitřní komory. Každá komora je zkonstruována tak, že pojme objem přibližně 5 ml a končí skleněným okénkem, přes které se zaznamenávají měření zákalu. Každá vnitřní komora má průměr 1,7 cm a hloubku 2,2 cm ([1]). Použije se těsnící kroužek umístěný na zadní komoře, aby se zamezilo úniku látky. Rohovky jsou umístěny na endoteliální straně pod těsnícím kroužkem zadních komor a přední komory se nacházejí na epiteliální straně rohovek. Komory se udržují na místě za pomoci třech šroubů z nerezové oceli umístěných na vnějších okrajích komory. Na konci každé komory se nachází skleněné okénko, které lze odstranit, aby byl snadný přístup k rohovce. Jeden těsnící kroužek je také umístěn mezi skleněným okénkem a komorou, aby se zamezilo úniku látky. Dva otvory v horní části každé komory umožňují zavedení a odstranění média a zkoušených chemických látek. Po dobu zkoušení a inkubace jsou uzavřeny gumovými uzávěry. Průchod světla přes držáky rohovky se potenciálně může měnit, neboť účinky běžného opotřebení nebo nahromadění reziduí určitých chemických látek ve vyvrtaných otvorech nebo na skleněném okénku vnitřní komory mohou ovlivnit rozptyl nebo odrazivost světla. Důsledkem by mohla být zvýšení nebo snížení základního průchodu světla (a tedy snížení nebo zvýšení naměřených údajů zákalu) přes držáky rohovky a ta se mohou projevit jako znatelné změny původně očekávaných naměřených údajů zákalu rohovky v jednotlivých komorách (tj. původní hodnoty zákalu rohovky v konkrétních držácích rohovky se mohou běžně lišit o více než 2 nebo 3 jednotky zákalu od očekávaných základních hodnot). Každá laboratoř by měla zvážit zavedení programu pro hodnocení změn průchodu světla přes držáky rohovky v závislosti na povaze zkoušených chemismů a na frekvenci použití komor. Ke stanovení základních hodnot je možné držáky rohovky před běžným použitím zkontrolovat změřením základních hodnot zákalu (nebo průchodu světla) komor naplněných kompletním médiem bez rohovek. Držáky rohovky se pak pravidelně kontrolují na změny průchodu světla během doby použití. Každá laboratoř může stanovit frekvenci kontrol držáků rohovky na základě zkoušených chemických látek, frekvenci použití a pozorování změn základních hodnot zákalu rohovky. Jsou-li pozorovány znatelné změny průchodu světla přes držáky rohovky, je nutno zvážit přiměřené postupy čištění a/nebo leštění vnitřního povrchu držáku rohovky nebo jejich výměnu.

([1]) Poskytnuté rozměry vycházejí z držáku rohovek, který se používá u krav ve věku od 12 do 60 měsíců. V případě, že se používají zvířata ve věku od 6 do 12 měsíců, držák by musel být zkonstruován tak, aby každá komora měla objem 4 ml a aby každá vnitřní komora měla průměr 1,5 cm a hloubku 2,2 cm. U každého nově zkonstruovaného držáku rohovek je velmi důležité, aby poměr exponované plochy povrchu rohovky k objemu zadní komory byl stejný jako poměr v tradičním držáku rohovek. Je to nutné k zajištění, že hodnoty propustnosti budou stanoveny správně pro výpočet IVIS za pomoci navrženého vzorce.

▼M7

Držák rohovky: viz připojený nákres.



▼M7

Dodatek 5

OPACITOMETR

Opacitometr je přístroj pro měření světelné propustnosti. Například u zařízení OP-KIT od výrobce Electro Design (Riom, Francie), které se používá při hodnocení v rámci zkušební metody BCOP, se světlo z halogenové lampy posílá přes kontrolní část (prázdná komora bez okének nebo tekutiny) do fotobuňky a vyrovnané se světlem se posílá do fotobuňky přes zkušební část, ve které se nachází komora obsahující rohovku. Rozdíl ve světelné propustnosti z fotobuněk se porovnává a numerická hodnota zákalu se zobrazí na digitální obrazovce. Tím se určí zákalové jednotky. Lze použít jiné typy opacitometrů s odlišnou konstrukcí (např. nevyžadující paralelní měření kontrolní a zkušební přihrádky), je-li prokázáno, že poskytnou podobné výsledky jako u validovaného zařízení.

Opacitometr by měl poskytnout lineární odezvu za pomoci řady údajů o zákalu, které zahrnují mezní hodnoty používané pro různé klasifikace popsané v modelu předpovědí (tj. až do mezní hodnoty, která určuje leptavost/silnou dráždivost). Aby se zajistily lineární a přesné údaje až do 75–80 zákalových jednotek, je nutné opacitometr kalibrovat s použitím řady kalibračních přístrojů. Kalibrátory se vloží do kalibrační komory (komora pro rohovku určená k uložení kalibrátorů) a odečítá se údaj na opacitometru. Kalibrační komora je určena k držení kalibrátorů přibližně ve stejné vzdálenosti mezi světlem a fotobuňkou, v jaké se umístí rohovky během měření zákalu. Referenční hodnoty a nastavený počáteční bod závisí na typu použitého zařízení. Lineárnost údajů opacitometru by měla být zajištěna vhodnými postupy (specifickými podle typu přístroje). Například u zařízení OP-KIT od výrobce Electro Design (Riom, Francie) se opacitometr nejprve kalibruje na zákal 0 zákalových jednotek s použitím kalibrační komory bez kalibračního materiálu. Potom se do kalibrační komory umístí jeden po druhém tři různé kalibrátory a měří se zákaly. Výsledkem kalibrátorů 1, 2 a 3 by měly být údaje o zákalu rovnající se příslušně nastaveným hodnotám 75, 150, a 225 zákalových jednotek, ± 5 %.

▼M7

B.48 ZKUŠEBNÍ METODA ODDĚLENÉHO KUŘECÍHO OKA PRO ZJIŠŤOVÁNÍ I) CHEMICKÝCH LÁTEK VYVOLÁVAJÍCÍCH VÁŽNÉ POŠKOZENÍ OČÍ A II) CHEMICKÝCH LÁTEK, KTERÉ NENÍ NUTNÉ KLASIFIKOVAT JAKO LÁTKY MAJÍCÍ DRÁŽDIVÉ ÚČINKY NA OČI NEBO VYVOLÁVAJÍCÍ VÁŽNÉ POŠKOZENÍ OČÍ

ÚVOD

Tato metoda je rovnocenná Pokynu OECD pro zkoušení (TG) č. 438 (2013). Zkušební metodu odděleného kuřecího oka (ICE – *Isolated Chicken Eye*) hodnotil Koordinační výbor mezi různými organizacemi pro ověřování platnosti alternativních metod (ICCVAM) spolu s Evropským střediskem pro validaci alternativních metod (ECVAM) a Japonským střediskem pro validaci alternativních metod (JaCVAM) v letech 2006 a 2010 (1) (2) (3). Při prvním hodnocení byla zkušební metoda ICE schválena jako vědecky platná zkušební metoda, kterou lze použít jako screeningovou zkoušku pro zjišťování chemických látek (látek a směsí) vyvolávajících vážné poškození očí (kategorie 1), jak ho definuje Globálně harmonizovaný systém klasifikace a označování chemických látek (GHS) Organizace spojených národů (OSN) (1) (2) (4) a nařízení (ES) č. 1272/2008 o klasifikaci, označování a balení látek a směsí (nařízení CLP) ([1]). Při druhém hodnocení byla zkušební metoda ICE hodnocena z hlediska jejího použití jako screeningové zkoušky pro identifikaci chemických látek, které nejsou klasifikovány jako látky mající dráždivé účinky na oči nebo vyvolávající vážné poškození očí, jak je definuje GHS OSN (3) (4). Na základě výsledků validační studie a doporučení komise odborné revize bylo ponecháno původní doporučení na používání zkušební metody ICE pro klasifikaci chemických látek vyvolávajících vážné poškození očí (kategorie 1 GHS OSN) a dostupná databáze zůstala od původní validace, kterou provedl výbor ICCVAM, beze změn. V té době nebyla předložena žádná doporučení na rozšíření oblasti použitelnosti zkušební metody ICE také na další kategorie. Bylo provedeno nové hodnocení souboru údajů *in vitro* a *in vivo* použitého při validační studii, se zaměřením na hodnocení užitečnosti zkušební metody ICE pro zjišťování chemických látek, které není nutné klasifikovat jako látky vyvolávající podráždění očí nebo vážné poškození očí (5). Toto nové hodnocení dospělo k závěru, že zkušební metodu ICE lze též použít pro zjišťování chemických látek, které není nutné klasifikovat jako látky mající dráždivé účinky na oči nebo vyvolávající vážné poškození očí, jak je definuje GHS OSN (4) (5). V této zkušební metodě jsou uvedena doporučená použití a omezení zkušební metody ICE na základě těchto hodnocení. Hlavními rozdíly mezi původní verzí z roku 2009 a aktualizovanou verzí Pokynů OECD ke zkoušení z roku 2013 jsou mimo jiné použití zkušební metody ICE pro zjišťování chemických látek, které není nutné klasifikovat podle klasifikačního systému GHS OSN, aktualizace prvků protokolu o zkoušce, aktualizace dodatku 1 týkající se definic a aktualizace dodatku 2 týkající se chemických látek pro prokázání způsobilosti.

V současnosti se obecně uznává, že jediná zkouška dráždivých účinků na oči *in vitro* nemůže v dohledné budoucnosti nahradit Draizeovu oční zkoušku *in vivo*, pokud jde o předpověď celé škály dráždivosti různých tříd chemických látek. Draizeovu oční zkoušku (6) však možná bude možné nahradit strategickou kombinací několika alternativních zkušebních metod v rámci strategie (odstupňovaného) zkoušení. Postup „shora dolů“ (7) má být použit, pokud se na základě existujících informací očekává, že chemická látka má vysokou schopnost vyvolávat dráždivé účinky, zatímco postup „zdola nahoru“ (7) se má použít, jestliže se na základě existujících informací předpokládá, že chemická látka nevyvolává tak intenzivní dráždivé účinky, aby vyžadovaly její klasifikaci. Zkušební metoda ICE je zkušební metoda *in vitro*, kterou lze za určitých okolností a s některými omezeními, jež jsou popsány v odstavcích 8 až 10, použít pro

([1]) Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1272/2008 ze dne 16. prosince 2008 o klasifikaci, označování a balení látek a směsí, o změně a zrušení směrnic 67/548/EHS a 1999/45/ES a o změně nařízení (ES) č. 1907/2006, Úř. věst. L 353, 31.12.2008, s. 1.

▼M7

klasifikaci nebezpečnosti chemických látek pro oči a pro označování chemických látek. I když se zkušební metoda ICE nepovažuje za úplnou náhradu za oční test *in vivo* na králících, doporučuje se tuto zkušební metodu použít jako počáteční krok v rámci strategie zkoušení, jako je např. postup „shora dolů“, jejž navrhuje Scott *et al.* (7) pro identifikaci chemických látek vyvolávajících vážné poškození očí, tj. chemických látek, které je třeba klasifikovat v kategorii 1 GHS OSN bez dalšího zkoušení (4). Zkušební metodu ICE se rovněž doporučuje použít pro zjišťování chemických látek, které není nutné klasifikovat jako látky mající dráždivé účinky na oči nebo vyvolávající vážné poškození očí, jak je definuje systém GHS OSN (látky bez kategorie) (4), a lze ji tedy použít jako počáteční krok v rámci strategie zkoušení postupem „zdola nahoru“ (7). U chemické látky, o níž se na základě použití zkušení metody ICE nepředpokládá, že vyvolává vážné poškození očí nebo že by měla být klasifikována jako látka mající dráždivé účinky na oči / vyvolávající vážné poškození očí, by však pro stanovení konečné klasifikace bylo nutné další zkoušení (*in vitro* a/nebo *in vivo*). Použití zkušební metody ICE v rámci postupu „zdola nahoru“ podle jiných klasifikačních systémů než GHS OSN by mělo být předem konzultováno s příslušnými regulačními orgány.

Účelem této zkušební metody je popsat postupy používané k hodnocení potenciálních nebezpečných účinků zkoušené chemické látky na oči měřené její schopností způsobit či nezpůsobit toxicitu v izolovaném kuřecím oku. Toxické účinky na rohovku se měří i) kvalitativním hodnocením zákalu, ii) kvalitativním hodnocením poškození epitelu na základě aplikace fluoresceinu do oka (zadržování fluoresceinu), iii) kvantitativním měřením zvýšené tloušťky (otok) a iv) kvalitativním hodnocením makroskopického morfologického poškození povrchu. Hodnocení zákalu a otoku rohovky a poškození po expozici zkoušené chemické látce se posuzuje samostatně a potom se spojí za účelem odvození klasifikace dráždivých účinků na oči.

Definice jsou uvedeny v dodatku 1.

VÝCHOZÍ ÚVAHY A OMEZENÍ

Tato zkušební metoda je založena na protokolu doporučeném v pokynu OECD č. 160 (8) zpracovaném v návaznosti na mezinárodní studii ICCVAM o ověřování platnosti (1) (3) (9) s přispěním Evropského střediska pro ověřování platnosti alternativních metod, Japonského střediska pro validaci alternativních metod a oddělení toxikologie a aplikované farmakologie TNO Quality of Life (Nizozemsko). Protokol vychází z informací získaných z uveřejněných protokolů a také z aktuálního protokolu, který používá TNO (10) (11) (12) (13) (14).

Při validaci této zkušební metody byla testována široká škála chemických látek a empirická databáze validační studie obsahuje celkem 152 chemických látek, včetně 72 látek a 80 směsí (5). Zkušební metodu lze použít pro pevné látky, kapaliny, emulze a gely. Kapaliny mohou být vodné či nevodné, pevné látky mohou být ve vodě rozpustné či nerozpustné. Plyny a aerosoly dosud nebyly ve validační studii hodnoceny.

Zkušební metodu ICE je možné použít k identifikaci chemických látek vyvolávajících vážné poškození očí, tj. chemických látek, které je třeba klasifikovat v kategorii 1 GHS OSN (4). Při použití pro tento účel zjištěná omezení zkušební metody ICE vyplývají z vysoké míry falešné pozitivity pro alkoholy a z vysoké míry falešné negativity pro pevné látky a smáčedla (1) (3) (9). Míra falešné pozitivity však v této souvislosti (chemické látky kategorie 1 GHS OSN identifikované jako látky, které nepatří do kategorie 1) není kriticky důležitá, neboť všechny zkoušené chemické látky, jež byly shledány negativními, by byly následně zkoušeny jinou náležitě validovanou zkouškou (zkouškami) *in vitro* nebo, jako poslední možnost, zkouškou na králících, v závislosti na požadavcích

▼M7

právních předpisů, s využitím strategie postupného zkoušení v rámci přístupu založeného na posuzování závažnosti důkazů. Je třeba poznamenat, že v Draizeově zkoušce dráždivých účinků na oči *in vivo* mohou pevné látky vést k různým a extrémním podmínkám expozice, což může v důsledku vyústit v irelevantní předpovědi jejich skutečné schopnosti vyvolávat dráždivé účinky (15). Zkoušející by mohli zvážit použití této zkušební metody na všechny druhy chemických látek, přičemž pozitivní výsledek by měl být považován za ukazatel vážného poškození očí, tj. klasifikace v kategorii 1 GHS OSN, bez dalšího zkoušení. Kladné výsledky získané u alkoholů by se však měly interpretovat opatrně z důvodu rizika nepřiměřené předpovědi.

Je-li zkušební metoda ICE použita pro zjišťování chemických látek vyvolávajících vážné poškození očí (kategorie 1 GHS OSN), má celkovou přesnost 86 % (120/140), míru falešné pozitivity 6 % (7/113) a míru falešné negativity 48 % (13/27) ve srovnání s údaji ze zkušební metody *in vivo* na očích králíků klasifikovanými podle klasifikačního systému GHS OSN (4) (5).

Zkušební metodu ICE lze též použít k identifikaci chemických látek, které není nutné klasifikovat jako látky mající dráždivé účinky na oči nebo vyvolávající vážné poškození očí podle klasifikačního systému GHS OSN (4). Použití zkušební metody ICE v rámci postupu „zdola nahoru“ podle jiných klasifikačních systémů by mělo být předem konzultováno s příslušnými regulačními orgány. Tuto zkušební metodu lze použít pro všechny druhy chemických látek, přičemž negativní výsledek by mohl být uznán pro neklasifikování chemické látky jako látky mající dráždivé účinky na oči a vyvolávající vážné poškození očí. Na základě jednoho výsledku z validační databáze však u barviv s účinkem proti usazeninám obsahujících organická rozpouštědla může dojít k předpovědi podhodnocující jejich potenciál dráždivých účinků (5).

Je-li zkušební metoda ICE použita pro zjišťování chemických látek, které není nutné klasifikovat jako látky vyvolávající dráždivé účinky na oči a vážné poškození očí, má celkovou přesnost 82 % (125/152), míru falešné pozitivity 33 % (26/79) a míru falešné negativity 1 % (1/73) ve srovnání s údaji ze zkušební metody *in vivo* na očích králíků klasifikovanými podle systému GHS OSN (4) (5). Pokud se z databáze vyloučí zkoušené chemické látky v určitých chemických třídách (tj. barviva s účinkem proti usazeninám obsahující organická rozpouštědla), je přesnost zkušební metody ICE v klasifikačním systému GHS OSN 83 % (123/149), míra falešné pozitivity 33 % (26/78) a míra falešné negativity 0 % (0/71) (4) (5).

Zkušební metoda ICE se nedoporučuje pro identifikaci zkoušených chemických látek, které by měly být klasifikovány jako látky mající dráždivé účinky na oči (kategorie 2 nebo kategorie 2A GHS OSN), nebo zkoušených chemických látek, které by měly být klasifikovány jako látky mající mírně dráždivé účinky na oči (kategorie 2B GHS OSN), vzhledem k značnému počtu chemických látek kategorie 1 GHS OSN podhodnoceně klasifikovaných v kategorii 2, 2A nebo 2B GHS OSN a látek bez kategorie GHS OSN nadhodnoceně klasifikovaných v kategorii 2, 2A nebo 2B GHS OSN. Pro tento účel může být nezbytné další zkoušení s použitím jiné vhodné metody.

Veškeré postupy u kuřecích očí by měly dodržovat právní předpisy a postupy pro zacházení s lidskými materiály nebo materiály získanými ze zvířat, které kromě jiného zahrnují tkáně a mimobuněčné tekutiny. Doporučují se univerzální laboratorní preventivní opatření (16).

Zkušební metoda ICE nebere v úvahu poškození spojivky a duhovky, které se hodnotí ve zkušební metodě dráždivosti pro oči u králíků, ale zabývá se účinky na rohovku, které jsou důležitým faktorem pro stanovení klasifikace *in vivo* při posuzování klasifikace GHS OSN. Ačkoli reverzibilitu lézí rohovky nelze ve zkušební metodě ICE hodnotit samu o sobě, na základě studií o očích králíků bylo přesto navrženo, že by se posouzení počáteční hloubky poškození rohovky mohlo použít k určení některých druhů nevratných účinků (17). Jsou zejména nezbytné další vědecké poznatky pro pochopení toho, jakým způsobem dochází

▼M7

k nevratným účinkům, které nejsou spojeny s počáteční vysokou úrovní poškození. A konečně je třeba uvést, že zkušební metoda ICE neumožňuje posouzení potenciálu systémové toxicity spojené s expozicí očí.

Tato zkušební metoda se bude pravidelně aktualizovat, tak jak budou zohledňovány nové informace a údaje. Bude-li například zapotřebí komplexněji charakterizovat poškození rohovky, může být potenciálně užitečná histopatologie. Pro vyhodnocení této možnosti se uživatelům doporučuje, aby uchovali oči a připravili vzorky pro histopatologii, které lze použít pro vytvoření databáze a kritérií rozhodování, jež mohou dále zvýšit přesnost této zkušební metody. Organizace OECD vypracovala pokyny k použití zkušebních metod pro hodnocení oční toxicity *in vitro*, jež zahrnují podrobné postupy při shromažďování histopatologických vzorků a informace, kam mají být vzorky a/nebo histopatologické údaje zasílány (8).

Každá laboratoř, která zavádí tuto analýzu, by měla použít chemické látky pro zkoušení způsobilosti uvedené v dodatku 2. Laboratoř může použít tyto chemické látky k prokázání své odborné způsobilosti v používání zkušební metody ICE před předložením údajů ICE pro regulační účely klasifikace nebezpečí.

PODSTATA ZKOUŠKY

Zkušební metoda ICE je organotypický model, který zajišťuje krátkodobé uchování kuřecího oka *in vitro*. V této zkušební metodě se poškození zkoušenou chemickou látkou posuzuje určením otoku a zákalu rohovky a zadržování fluoresceinu. Zatímco dva poslední parametry se týkají kvalitativního hodnocení, analýza otoku rohovky zajišťuje kvantitativní hodnocení. Každé měření se buď převádí na kvantitativní hodnotu používanou k výpočtu celkového ukazatele podráždění, nebo je přiřazeno kvalitativní kategorizaci, která se používá ke stanovení klasifikace nebezpečnosti pro oči *in vitro* buď v kategorii 1 GHS OSN, nebo jako látky neklasifikované v systému GHS OSN. Každý z těchto výsledků potom může být použit k předpovědi schopnosti zkoušené látky vyvolávat vážné poškození očí *in vivo* nebo k předpovědi, že se nevyžaduje klasifikace nebezpečnosti zkoušené chemické látky pro oči (viz kritéria rozhodování). Není však možné stanovit klasifikaci chemických látek, u nichž nebylo s použitím zkušební metody ICE předpovězeno, že vyvolávají vážné poškození očí nebo že je není nutné klasifikovat.

Zdroj a věk kuřecích očí

Tradičně se pro tuto analýzu používají kuřecí oči získané z jatek, kde se kuřata zabíjejí pro lidskou spotřebu, čímž se eliminuje potřeba laboratorních zvířat. Používají se pouze oči zdravých zvířat, které se považují za vhodné pro vstup do lidského potravinového řetězce.

Ačkoli nebyla zpracována kontrolní studie pro hodnocení optimálního věku kuřat, věk a hmotnost kuřat tradičně používaných v této zkušební metodě odpovídá mladým kuřatům tradičně zpracovávaným na jatkách pro drůbež (tj. přibližně 7 týdnů staré, o váze 1,5–2,5 kg).

Shromažďování a doprava očí do laboratoře

Hlavy by se měly odstranit ihned po usmrcení kuřat obvykle elektrickým šokem a naříznutím krku za účelem zbavení krve. Místní zdroj kuřat blízko laboratoře by měl být umístěn tak, aby hlavy kuřat mohly být dopraveny z jatek do laboratoře dostatečně rychle s cílem minimalizovat poškození a/nebo bakteriální znečištění. Časový interval mezi shromážděním kuřecích hlav, odstraněním očí a jejich umístěním do superfúzní komory by měl být co nejkratší (zpravidla do dvou hodin), aby se zajistilo splnění kritérií přijatelnosti zkoušky. Všechny oči použité v analýze by měly být ze stejné skupiny očí shromážděných v určitý den.

▼M7

Protože oči se oddělují v laboratoři, neporušené hlavy se dopravují z jatek za okolní teploty (obyčejně mezi 18 °C a 25 °C) v umělohmotných krabicích, které jsou navlhčeny ubrousky namočenými v izotonickém fyziologickém roztoku.

Kritéria výběru a počet očí používaných v ICE

Oči, které po enukleaci mají vysoké základní zbarvení fluoresceinem (tj. > 0,5) nebo vysokou hodnotu zákalu rohovky (tj. > 0,5), se vyřadí.

Každá zkušební skupina a souběžná pozitivní kontrola pozůstává nejméně ze třech očí. Skupina pro negativní kontrolu nebo pro kontrolu s rozpouštědlem (používá-li se jiné rozpouštědlo než fyziologický roztok) pozůstává nejméně z jednoho oka.

V případě pevných látek, které vedou k výsledku, kdy látku není nutné klasifikovat v systému GHS OSN, se doporučuje druhé provedení zkoušky se třema očima, která negativní výsledek potvrdí nebo vyvrátí.

POSTUP

Příprava očí

Oční víčka se opatrně vyříznou a přitom se dává pozor, aby se nepoškodila rohovka. Neporušenost rohovky se rychle posoudí kápnutím 2 % (objemové hmotnosti) fluoresceinu sodného aplikovaného na povrch rohovky po dobu několika vteřin, který se potom opláchne izotonickým fyziologickým roztokem. Oči ošetřené fluoresceinem se pak zkoumají pod mikroskopem se štěrbinovou lampou, aby se zajistilo, že se rohovka nepoškodí (tj. hodnoty zadržení fluoresceinu a zákalu rohovky ≤ 0,5).

Není-li oko poškozeno, vyřízne se z lebky a přitom se dává pozor, aby se nepoškodila rohovka. Oční bulbus se vyjme z očnice tak, že se chirurgickou pinzetou pevně uchopí mžurka a oční sval se ustřihne zahnutými tupě zakončenými nůžkami. Je důležité zamezit poškození rohovky nadměrným tlakem (tj. kompresní artefakty).

Když je oko vyjmuto z očnice, viditelná část očního nervu by se měla ponechat. Jakmile se oko vyjme z očnice, položí se na absorpční podložku a mžurka a jiné pojivové tkáně se ustřihnou.

Odstraněné oko se nasadí na držák z nezeravějící oceli s rohovkou ve svislé poloze. Držák se potom přenese do komory superfúzního aparátu (18). Držáky by se měly v tomto speciálním zkušebním přístroji postavit tak, aby se kapky izotonického fyziologického roztoku dostávaly k celé rohovce (3–4 kapky za minutu nebo 0,1 až 0,15 ml/min). Teplota komor přístroje by měla být řízena na 32 ± 1,5 °C. V dodatku 3 je schématický nákres typického superfúzního aparátu a očních držáků, které je možné obchodně získat nebo zkonstruovat. Přístroje mohou být upraveny, aby splňovaly potřeby jednotlivé laboratoře (např. umístění různého počtu očí).

Když se oči vloží do superfúzního aparátu, znovu se prozkoumají pod mikroskopem se štěrbinovou lampou, aby se zjistilo, zda nebyly poškozeny během vyřezávání. Tloušťka rohovky by se v této době měla také měřit na vrcholu rohovky s použitím zařízení pro měření hloubky na mikroskopu se štěrbinovou lampou. Oči s i) hodnotou zadržení fluoresceinu > 0.5; (i) zákalem rohovky > 0.5 nebo iii) jakýmikoli dalšími znaky poškození by se měly vyměnit. V případě očí nevyřazených na základě jakéhokoli z těchto kritérií se musí vyřadit jednotlivé oči s tloušťkou rohovky, která se o víc než 10 % odchyluje od střední hodnoty pro všechny oči. Uživatelé by si měli být vědomi toho, že mikroskopy se štěrbinovou lampou by mohly ukazovat různou tloušťku rohovky, je-li rozdílné nastavení šířky štěrbiny. Šířka štěrbiny by se měla nastavit na 0,095 mm.

▼M7

Poté, co byly oči prozkoumány a schváleny, inkubují se po dobu přibližně 45 až 60 minut, aby se uvedly do rovnováhy se zkušebním systémem před dávkováním. Po době vyrovnání se pro tloušťku rohovky a zákal zaznamená nulové referenční měření, které slouží jako základ (tj. čas = 0). Skóre fluoresceinu stanovené při pitvě je základní hodnotou pro měření tohoto koncového účinku.

Aplikace zkoušené chemické látky

Ihned po nulovém referenčním měření se oči (v držáku) vyjmou ze superfúzního aparátu, postaví se do vodorovné polohy a na rohovku se aplikuje zkoušená chemická látka.

Tekuté zkoušené chemické látky se zpravidla zkoušejí neředěné, mohou se však ředit, pokud se to považuje za nutné (např. jako součást návrhu studie). Preferovaným roupouštědlem pro ředěné chemické látky je fyziologický roztok. Za řízených podmínek lze však také použít alternativní rozpuštědla, ale vhodnost jiných rozpouštědel než fyziologického roztoku by se měla prokázat.

Tekuté zkoušené chemické látky se aplikují na rohovku tak, že celý povrch rohovky se rovnoměrně pokryje zkoušenou chemickou látkou; obvyklý objem je 0,03 ml.

Podle možnosti by se pevné zkoušené chemické látky měly co nejjemněji rozetřít pomocí třecí misky a těrky nebo srovnatelným drticím prostředkem. Prášek se aplikuje na rohovku tak, že se celý povrch rohovky rovnoměrně pokryje zkoušenou chemickou látkou; obvyklé množství je 0,03 g.

Zkoušená chemická látka (tekutá nebo pevná) se aplikuje po dobu 10 vteřin a pak se z oka opláchne izotonickým fyziologickým roztokem (přibližně 20 ml) při okolní teplotě. Oko (v držáku) se potom v původní svislé poloze vrátí do superfúzního aparátu. V případě potřeby lze použít další opláchnutí po desetivteřinové aplikaci a v následných časových intervalech (např. po zjištění reziduí zkoušené chemické látky na rohovce). Množství fyziologického roztoku dodatečně použitého pro opláchnutí obecně není kriticky důležité, ale pozorování přilnutí chemické látky k rohovce je důležité.

Chemické látky pro kontrolu

Do každého pokusu by měly být zařazeny souběžné negativní kontroly nebo kontroly s rozpouštědlem/vehikulem a pozitivní kontroly.

Když se zkoušejí 100 % tekuté látky nebo pevné látky, fyziologický roztok se ve zkušební metodě ICE používá pro souběžnou negativní kontrolu, aby se zjistily nespecifické změny ve zkušebním systému a aby se zajistilo, že podmínky analýzy nebudou mít za následek nevhodnou dráždivou reakci.

Když se zkoušejí zředěné tekuté látky, do zkušební metody se zařadí skupina pro souběžnou kontrolu s rozpouštědlem/vehikulem, aby se zjistily nespecifické změny ve zkušebním systému a aby se zajistilo, že podmínky analýzy nebudou mít za následek nevhodnou dráždivou reakci. Jak je uvedeno v bodě 31, lze použít pouze rozpouštědlo/vehikulum, u kterého se prokázalo, že nemá nepříznivé účinky na zkušební systém.

Do každého pokusu se zařadí známá látka s dráždivými účinky na oči jako souběžná pozitivní kontrola, aby se ověřilo, že je vyvolána odpovídající reakce. Protože analýza ICE se v této zkušební metodě používá ke zjišťování leptavých nebo silných dráždivých látek, pozitivní kontrola by měla být takovou referenční chemickou látkou, která v této zkušební metodě vyvolá silnou reakci. Aby se však zajistilo, že proměnlivost v reakci na pozitivní kontrolu bude možné časem vyhodnotit, rozsah silné reakce by neměl být nadměrný. Měl by se nashromáždit

▼M7

dostatek údajů pro pozitivní kontrolu *in vitro*, aby bylo možné vypočítat statisticky definovaný, přijatelný rozsah pozitivní kontroly. Nejsou-li údaje o zkušební metodě ICE z minulosti pro určitou pozitivní kontrolu k dispozici, bude nutné uskutečnit studie za účelem získání těchto informací.

Příklady tekutých zkoušených chemických látek pro pozitivní kontroly jsou 10 % kyselina octová nebo 5 % benzalkonium chlorid, zatímco příklady pevných zkoušených chemických látek pro pozitivní kontroly jsou hydroxid sodný nebo imidazol.

Srovnávací chemické látky jsou účelné pro hodnocení potenciálu podráždění očí neznámými chemickými látkami nebo specifickými třídami chemických látek či produktů nebo pro hodnocení potenciálu relativního podráždění látkou s dráždivými účinky na oči ve specifickém rozmezí dráždivých reakcí.

Měřené koncové účinky

Zkoušené rohovky se hodnotí před expozicí a po 30, 75, 120, 180 a 240 minutách (± 5 minut) po oplachu po ošetření. Tyto časové body zajišťují odpovídající počet měření během čtyřhodinové doby zkoušení a přitom ponechávají dostatek času mezi měřeními, aby potřebná pozorování byla uskutečněna pro všechny oči.

Hodnocené koncové účinky jsou zákal rohovky, zduření rohovky, zadržení fluoresceinu v rohovce a morfologické účinky (např. tvorba jamek nebo uvolnění epitelu). Všechny koncové účinky kromě zadržování fluoresceinu (který se určuje pouze před expozicí a 30 minut po expozici zkoušené látce) se určují v každém výše uvedeném časovém intervalu.

Doporučují se fotografické snímky, aby se zdokumentoval zákal rohovky, zadržování fluoresceinu, morfologické účinky a histopatologie, pokud se provádí.

Po poslední prohlídce po 4 hodinách se uživatelům doporučuje uložit oči do vhodného fixačního média (např. neutrálního pufrovaného formalínu) pro případné histopatologické zkoumání (podrobněji viz odstavec 14 a odkaz (8)).

Otok rohovky se určuje měřením tloušťky rohovky, které se provádí optickým pachymetrem pod mikroskopem se štěrbinovou lampou. Vyjadřuje se jako procento a vypočítává se z měření tloušťky rohovky podle následujícího vzorce:

$$\left(\frac{\textit{tloušťka rohovky včase } t - \textit{tloušťka rohovky včase} = 0}{\textit{tloušťka rohovky včase} = 0} \right) \times 100$$

Střední procento otoku rohovky se u všech zkoušených očí vypočítává pro všechny časové body pozorování. Na základě nejvyšší střední hodnoty otoku rohovky pozorované v jakémkoli časovém bodu se potom každé zkoušené chemické látce přidělí celková hodnota kategorie (viz odstavec 51).

Zákal rohovky se vyhodnotí s použitím plochy rohovky pro hodnocení, která je nejvíce zakalená, jak je uvedeno v tabulce 1. Střední hodnota zákalu rohovky se u všech zkoušených očí vypočítává pro všechny časové body pozorování. Na základě nejvyšší střední hodnoty zákalu rohovky pozorované v jakémkoli časovém bodě se potom každé zkoušené chemické látce přidělí celková hodnota kategorie (viz odstavec

▼M7

Tabulka 1.

Hodnoty zákalu rohovky.

Hodnota	Pozorování
0	Žádný zákal
0,5	Velmi slabý zákal
1	Rozptýlené nebo roztroušené plochy; detaily duhovky jsou jasně viditelné
2	Snadno rozeznatelná průhledná plocha; detaily duhovky jsou poněkud nejasné
3	Silný zákal rohovky; nejsou viditelné žádné konkrétní detaily duhovky; velikost zornice je stěží rozeznatelná
4	Úplný zákal rohovky; duhovka není viditelná

Zadržení fluoresceinu se hodnotí pouze při měření v časovém intervalu 30 minut, jak je uvedeno v tabulce 2. Střední hodnota zadržování fluoresceinu se poté u všech zkoušených očí vypočítává pro časový interval 30minutového pozorování a používá pro celkovou hodnotu kategorie přidělenou každé zkoušené chemické látce (viz odstavec 51).

Tabulka 2.

Hodnoty zadržování fluoresceinu.

Hodnota	Pozorování
0	Žádné zadržování fluoresceinu
0,5	Velmi slabé zbarvení jednotlivých buněk
1	Zbarvení jednotlivých buněk se rozšířilo po zkoušené ploše rohovky
2	Fokální nebo splývající úplné zbarvení jednotlivých buněk
3	Splývající velké plochy zadržování fluoresceinu rohovky

Morfologické účinky zahrnují „jizvy“ na epiteliálních buňkách rohovky, „uvolňování“ epitelu, „zdrsnění“ povrchu rohovky a „nalepení“ zkoušené látky na rohovku. Tato zjištění se mohou ve své závažnosti měnit a mohou se vyskytovat souběžně. Klasifikace těchto zjištění je subjektivní podle interpretace výzkumníka.

ÚDAJE A PŘEDKLÁDÁNÍ ZPRÁV

Hodnocení údajů

Výsledky ze zákalu a otoku rohovky a zadržování fluoresceinu by se měly hodnotit zvlášť, aby se pro každý koncový účinek vytvořila třída ICE. Třídy ICE pro každý koncový účinek se pak spojí za účelem vytvoření klasifikace dráždivých účinků pro každou zkoušenou chemickou látku.

Kritéria rozhodování

Poté, co byl každý koncový účinek vyhodnocen, lze na základě předem určeného rozmezí přiřadit třídy ICE. Interpretace otoku (tabulka 3) a zákalu rohovky (tabulka 4) a zadržování fluoresceinu (tabulka 5) s použitím čtyř tříd ICE se uskutečňuje podle níže uvedených měřítek. Je důležité poznamenat, že hodnoty otoku rohovky uvedené v tabulce 3 platí pouze v případě, že se tloušťka měří

▼M7

mikroskopem se štěrbinovou lampou (například Haag-Streit BP900) se zařízením pro měření hloubky č. 1 a při nastavení šířky štěrbiny $9\frac{1}{2}$, která se rovná 0,095 mm. Uživatelé by si měli být vědomi, že mikroskopy se štěrbinovou lampou mohou poskytovat různé naměřené hodnoty tloušťky rohovky, je-li nastavena odlišná šířka štěrbiny.

Tabulka 3.

Klasifikační kritéria ICE pro otok rohovky.

Střední otok rohovky (%) (*)	Třída ICE
0 až 5	I
> 5 až 12	II
> 12 až 18 (> 75 min po aplikaci)	II
> 12 až 18 (≤ 75 min po aplikaci)	III
> 18 až 26	III
> 26 až 32 (> 75 min po aplikaci)	III
> 26 až 32 (≤ 75 min po aplikaci)	IV
> 32	IV

(*) Nejvyšší střední hodnota zjištěná v kterémkoli časovém bodě.

Tabulka 4.

Klasifikační kritéria ICE pro zákal.

Maximální střední hodnota zákalu (*)	Třída ICE
0,0–0,5	I
0,6–1,5	II
1,6–2,5	III
2,6–4,0	IV

(*) Maximální střední hodnota zjištěná v kterémkoli časovém bodě (na základě hodnot zákalu uvedených v tabulce 1).

Tabulka 5.

Klasifikační kritéria ICE pro střední zadržování fluoresceinu.

Střední hodnota zadržování fluoresceinu 30 minut po zkoušení (*)	Třída ICE
0,0–0,5	I
0,6–1,5	II
1,6–2,5	III
2,6–3,0	IV

(*) Na základě hodnot uvedených v tabulce 2.

Klasifikace *in vitro* zkoušené chemické látky se hodnotí pomocí klasifikace GHS, která odpovídá kombinaci kategorií získaných pro otok rohovky, zákal rohovky a zadržování fluoresceinu, jak je popsáno v tabulce 6.

▼M7

Tabulka 6.

Celkové klasifikace *in vitro*.

Klasifikace GHS OSN	Kombinace 3 koncových účinků
Bez kategorie	3 × I 2 × I, 1 × II
Nelze předpovědět	Jiné kombinace
Kategorie 1	3 × IV 2 × IV, 1 × III 2 × IV, 1 × II (*) 2 × IV, 1 × I (*) Zákal rohovky ≥ 3 po 30 min (nejméně ve 2 očích) Zákal rohovky = 4 v každém časovém bodě (nejméně ve 2 očích) Silné uvolňování epitelu (nejméně v 1 oku)

(*) Výskyt těchto kombinací je méně pravděpodobný.

Kritéria přijatelnosti studie

Zkouška se považuje za přijatelnou, pokud vede ke zjištění, že souběžné negativní kontroly nebo kontroly s vehikulem/rozpouštědlem odpovídají chemickým látkám neklasifikovaným podle systému GHS a souběžné pozitivní kontroly odpovídají chemickým látkám klasifikovaným v kategorii 1 systému GHS.

Závěrečná zpráva

Závěrečná zpráva by měla zahrnovat následující informace, pokud jsou relevantní pro provedení studie:

Zkoušené chemické látky a chemické látky pro kontrolu

— Chemický název (chemické názvy), např. strukturální název používaný podle Chemical Abstracts Service (CAS), s dalšími názvy, jsou-li známy,

— registrační číslo CAS (CASRN), je-li známo,

— čistota a složení zkoušených/kontrolních chemických látek (v hmotnostních procentech), jsou-li tyto informace k dispozici,

— fyzikálně chemické vlastnosti, např. fyzikální stav, těkavost, pH, stabilita, třída chemických látek, rozpustnost ve vodě odpovídající provádění studie,

— případně ošetření zkoušených chemických látek/látek pro kontrolu před zkoušením (např. zahřátí, mletí),

— stabilita, je-li známa.

Informace týkající se zadavatele a zkušebního zařízení

— Jméno a adresa zadavatele, zkušebního zařízení a vedoucího studie,

— určení zdroje očí (např. zařízení, z něhož byly získány).

Podmínky zkušební metody

— Popis použitého zkušebního systému,

▼M7

— použitý mikroskop se štěrbinovou lampou (např. model) a nastavení přístroje pro použitý mikroskop se štěrbinovou lampou,

— odkaz na historické výsledky negativních a pozitivních kontrol a historické údaje prokazující přijatelné rozsahy případných souběžných referenčních kontrol,

— postup použitý k zajištění integrity (tj. přesnosti a spolehlivosti) zkušební metody v čase (např. pravidelné zkoušení chemických látek pro prokázání způsobilosti).

Získávání a příprava očí

— Věk a hmotnost zvířat a, jsou-li k dispozici, další specifické vlastnosti dárcovských zvířat (např. pohlaví, kmen),

— podmínky skladování a dopravy očí (např. datum a čas shromáždění očí, časový interval mezi získáním kuřecích hlav a vložením odstraněných oči do komor chladicího přístroje),

— příprava a upevnění očí včetně uvedení jejich kvality, teploty komor s očima a kritérií pro výběr očí ke zkoušení.

Postup zkoušky

— Počet použitých replik,

— identifikace použitých negativních a pozitivních kontrol (případně také kontrol s rozpouštědlem a srovnávacích kontrol),

— použitá dávka zkoušené chemické látky, doba aplikace a expozice,

— časové body pozorování (před aplikací a po aplikaci),

— popis použitých hodnotících kritérií a kritérií rozhodování,

— popis použitých kritérií přijatelnosti studie,

— popis jakýchkoli změn zkušebního postupu.

Výsledky

— Hodnoty otoku rohovky, zákalu a zadržování fluoresceinu získané pro každé jednotlivé oko a v každém časovém bodě pozorování, včetně středních hodnot všech testovaných očí v každém čase pozorování, ve formě tabulky,

— nejvyšší zjištěné střední hodnoty otoku rohovky, zákalu a zadržování fluoresceinu (v kterémkoli časovém bodě) a jejich související třída ICE,

— popis jakýchkoli jiných pozorovaných účinků,

— odvozená klasifikace GHS *in vitro*,

— případně fotografické snímky očí.

Diskuse o výsledcích

Závěr

▼**M7**

LITERATURA

1) ICCVAM (2007). Test Method Evaluation Report – *In Vitro Ocular Toxicity* Test Methods for Identifying Ocular Severe Irritants and Corrosives. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No.: 07-4517. Dostupné na: http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmer.htm

2) ESAC (2007). Statement on the conclusion of the ICCVAM retrospective study on organotypic *in vitro* assays as screening tests to identify potential ocular corrosives and severe eye irritants. Dostupné na: http://ecvam.jrc.it/index.htm.

3) ICCVAM (2010). ICCVAM Test Method Evaluation Report – Current Status of *in vitro* Test Methods for Identifying Mild/Moderate Ocular Irritants: The Isolated Chicken Eye (ICE) Test Method. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No.: 10-7553A. Dostupné na: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/MildMod-TMER.htm]

4) United Nations (UN) (2011). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Fourth revised edition, UN New York and Geneva, 2011. Dostupné na: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev04/04files_e.html

5) Streamlined Summary Document Supporting OECD Test Guideline 438 on the Isolated Chicken Eye for Eye Irritation/Corrosion. Series on Testing and Assessment no. 188 (Part 1 and Part 2), OECD, Paris.

6) Kapitola B.5 této přílohy, Akutní dráždivé/leptavé účinky na oči.

7) Scott L, Eskes C, Hoffman S, Adriaens E, Alepee N, Bufo M, Clothier R, Facchini D, Faller C, Guest R, Hamernik K, Harbell J, Hartung T, Kamp H, Le Varlet B, Meloni M, Mcnamee P, Osborn R, Pape W, Pfannenbecker U, Prinsen M, Seaman C, Spielmann H, Stokes W, Trouba K, Vassallo M, Van den Berghe C, Van Goethem F, Vinardell P, Zuang V (2010). A proposed Eye Irritation Testing Strategy to Reduce and Replace *in vivo* Studies Using Bottom-up and Top-down Approaches. Toxicology *In Vitro* 24, 1-9.

8) OECD (2011) Guidance Document on „The Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) and Isolated Chicken Eye (ICE) Test Methods: Collection of Tissues for Histological Evaluation and Collection of Data on Non-Severe Irritants“. Series on Testing and Assessment no. 160, OECD, Paris.

9) ICCVAM. (2006). Background review document: Current Status of *In Vitro* Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants: Isolated Chicken Eye Test Method. NIH Publication No.: 06-4513. Research Triangle Park: National Toxicology Program. Dostupné na: http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_ice.htm

10) Prinsen, M.K. and Koëter, B.W.M. (1993). Justification of the enucleated eye test with eyes of slaughterhouse animals as an alternative to the Draize eye irritation test with rabbits. *Fd. Chem. Toxicol.* 31:69-76.

11) DB-ALM (INVITTOX) (2009). Protocol 80: Chicken enucleated eye test (CEET) / Isolated Chicken Eye Test, 13pp. Dostupné na: http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/.

12) Balls, M., Botham, P.A., Bruner, L.H. and Spielmann H. (1995). The EC/HO international validation study on alternatives to the Draize eye irritation test. *Toxicol. In Vitro* 9:871-929.

13) Prinsen, M.K. (1996). The chicken enucleated eye test (CEET): A practical (pre)screen for the assessment of eye irritation/corrosion potential of test materials. *Food Chem. Toxicol*. 34:291-296.

▼**M7**

14) Chamberlain, M., Gad, S.C., Gautheron, P. and Prinsen, M.K. (1997). IRAG Working Group I: Organotypic models for the assessment/prediction of ocular irritation. *Food Chem. Toxicol.* 35:23-37.

15) Prinsen, M.K. (2006). The Draize Eye Test and *in vitro* alternatives; a left-handed marriage? Toxicology *in Vitro* 20,78-81.

16) Siegel, J.D., Rhinehart, E., Jackson, M., Chiarello, L., and the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (2007). Guideline for Isolation Precautions: Preventing Transmission of Infectious Agents in Healthcare Settings. Dostupné na: http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/pdf/isolation2007.pdf.

17) Maurer, J.K., Parker, R.D. and Jester J.V. (2002). Extent of corneal injury as the mechanistic basis for ocular irritation: key findings and recommendations for the development of alternative assays. *Reg. Tox. Pharmacol.* 36:106-117.

18) Burton, A.B.G., M. York and R.S. Lawrence (1981). The *in vitro* assessment of severe irritants. *Fd. Cosmet.- Toxicol.*- 19, 471-480.

▼M7

Dodatek 1

DEFINICE

Přesnost: Přesnost shody mezi výsledky zkušební metody a přijatými referenčními hodnotami. Je to měření výsledku zkušební metody a jednoho aspektu „důležitosti“. Termín se často používá namísto „souladu“, kterým se rozumí podíl správných výsledků zkušební metody.

Srovnávací chemická látka: Látka použitá jako norma pro srovnání se zkoušenou látkou. Srovnávací látka by měla mít tyto vlastnosti: i) nesporný a spolehlivý zdroj (nesporné a spolehlivé zdroje); ii) strukturální a funkční podobnost s třídou zkoušených látek; iii) známé fyzikální/chemické vlastnosti; iv) podpůrné údaje o známých účincích a v) známá síla v rozsahu žádoucí reakce.

Přístup „zdola nahoru“: Přístup zkoušení po krocích používaný u chemických látek, u nichž se předpokládá, že je není nutné klasifikovat jako látky mající dráždivé účinky na oči nebo vyvolávající vážné poškození očí, který začíná odlišením chemických látek, u nichž není nutná klasifikace (negativní výsledek), od ostatních chemických látek (pozitivní výsledek).

Chemická látka: Látka nebo směs.

Rohovka: Průhledná přední část oční bulvy, která zahrnuje duhovku a zornici a propouští světlo dovnitř oka.

Zákal rohovky: Měření rozsahu zákalu rohovky po expozici zkoušené chemické látce. Zvýšený zákal rohovky je příznačný pro poškození rohovky.

Otok rohovky: Objektivní měření rozsahu zduření rohovky ve zkoušce ICE po expozici zkoušené látce. Vyjadřuje se procentuálně a vypočítává se z měření základní tloušťky rohovky (před dávkováním) a tloušťky zaznamenávané v pravidelných intervalech po vystavení zkoušené chemické látce ve zkoušce ICE. Stupeň otoku rohovky je příznačný pro poškození rohovky.

Dráždivé účinky na oči: Vyvolání změn na oku po aplikaci zkoušené chemické látky na přední plochu oka, které jsou plně vratné do 21 dní od aplikace. Tento pojem je zaměnitelný s výrazy „vratné účinky na oči“ a „kategorie 2 GHS OSN“ (4).

Míra falešné negativity: Podíl všech pozitivních chemických látek falešně zjištěných zkušební metodou jako negativní. Je to jeden z ukazatelů výsledku zkušební metody.

Míra falešné pozitivity: Podíl všech negativních látek falešně zjištěných zkušební metodou jako pozitivní. Je to jeden z ukazatelů výsledku zkušební metody.

Zadržování fluoresceinu: Subjektivní měření rozsahu fluoresceinu sodného ve zkoušce ICE, který je zadržován buňkami epitelu v rohovce po expozici zkoušené látce. Stupeň zadržování fluoresceinu je příznačný pro poškození epitelu rohovky.

Nebezpečnost: Základní charakteristika látky nebo situace, která má potenciál vyvolat nepříznivé účinky, jsou-li organismus, systém nebo (sub)populace vystaveny této látce.

Nevratné účinky na oči: viz „vážné poškození očí“ a „kategorie 1 GMS OSN“.

▼M7

Směs: Směs nebo roztok tvořený dvěma nebo více látkami, které v něm nereagují (4).

Negativní kontrola: Nezkoušená replika, která obsahuje všechny složky zkušebního systému. Tento vzorek se zpracovává se vzorky zkoušené chemické látky a jinými kontrolními vzorky, aby se zjistilo, zda rozpouštědlo vzájemně reaguje se zkušebním systémem.

Neklasifikované: Látky, které nejsou klasifikovány jako látky mající dráždivé účinky na oči (kategorie 2 GHS OSN) nebo jako látky vyvolávající vážné poškození očí (kategorie 1 GHS OSN). Tento pojem je zaměnitelný s pojmem „bez kategorie GHS OSN“.

Pozitivní kontrola: Replika obsahující všechny složky zkušebního systému a zkoušená s chemickou látkou, o níž je známo, že způsobuje pozitivní reakci. Aby se zajistilo, že proměnlivost v reakci na pozitivní kontrolu bude možné časem vyhodnotit, rozsah silné reakce by neměl být nadměrný.

Spolehlivost: Měření rozsahu, v jakém může být zkušební metoda časem reprodukovatelná v laboratořích a mezi laboratořemi, když se provádí s použitím stejného protokolu. Hodnotí se to výpočtem laboratorní a mezilaboratorní reprodukovatelnosti a laboratorní opakovatelnosti.

Vratné účinky na oči: viz „dráždivé účinky na oči“ a „kategorie 2 GMS OSN“.

Vážné poškození očí: Tvorba poškození tkání v oku nebo závažné fyzikální slábnutí vidění po aplikaci zkoušené látky na přední plochu oka, které není plně vratné do 21 dní od aplikace. Tento pojem je zaměnitelný s výrazy „nevratné účinky na oči“ a „kategorie 1 GHS OSN“ (4).

Mikroskop se štěrbinovou lampou: Přístroj používaný k přímému vyšetření oka se zvětšením pod binokulárním mikroskopem a vytvořením stereoskopického, přímého obrazu. Ve zkušební metodě ICE se tento přístroj používá k prohlížení předních struktur kuřecího oka a také k objektivnímu měření tloušťky rohovky s přídavným zařízením na měření hloubky.

Kontrola s rozpouštědlem/vehikulem: Neošetřený vzorek obsahující všechny složky zkušebního systému, včetně rozpouštědla nebo vehikula, který se zpracovává se vzorky exponovaných zkoušených chemických látek a s jinými kontrolními vzorky, aby se zjistila základní reakce vzorků zkoušených se zkoušenou chemickou látkou rozpuštěnou ve stejném rozpouštědle nebo vehikulu. Pokud se vzorek zkouší souběžnou negativní kontrolou, ukazuje také, zda rozpouštědlo nebo vehikul vzájemně reaguje se zkušebním systémem.

Látka: Chemické prvky nebo jejich sloučeniny v přírodním stavu nebo získané výrobním procesem včetně všech přídatných látek nutných k uchování stability výrobku a všech nečistot vznikajících v použitém procesu, ale s vyloučením všech rozpouštědel, která je možno oddělit bez ovlivnění stability látky nebo změny jejího složení (4).

Smáčedlo: Nazývané též povrchově aktivní látka, je látka, jako např. detergent, která je schopna snížit povrchové napětí kapaliny a umožnit jí vytvářet pěnu nebo pronikat do pevných látek; je též známa jako sufraktant.

▼M7

Přístup „shora dolů“: Přístup zkoušení po krocích používaný u chemických látek, u nichž se předpokládá, že způsobují vážné poškození očí, který začíná odlišením chemických látek vyvolávajících vážné poškození očí (pozitivní výsledek) od jiných chemických látek (negativní výsledek).

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

Strategie postupného zkoušení: Strategie postupného zkoušení, kde se všechny existující informace o zkoušené chemické látce přezkoumávají ve stanoveném pořadí s použitím postupu váhy důkazů na každém stupni, aby se zjistilo, zda je k dispozici dost informací pro rozhodnutí o klasifikaci nebezpečnosti, než se postoupí do dalšího stupně. Pokud potenciál dráždivých účinků zkoušené chemické látky lze určit na základě existujících informací, další zkoušení není nutné. Jestliže potenciál dráždivých účinků zkoušené látky nelze určit na základě existujících informací, použije se stupňovitý postupný postup zkoušení na zvířatech po krocích, dokud se nestanoví jednoznačná klasifikace.

Globálně harmonizovaný systém klasifikace a označování chemických látek Organizace spojených národů (GHC OSN): Systém navrhující klasifikaci látek a směsí podle standardizovaných typů a úrovní fyzikálních, zdravotních a environmentálních nebezpečí a řešící příslušné komunikační prvky, jako jsou piktogramy, signální slova, výroky o nebezpečí, výroky o bezpečnostních opatřeních a bezpečnostní datové listy, které obsahují informace o jejich nežádoucích účincích s ohledem na ochranu lidí (včetně zaměstnavatelů, dělníků, přepravců, spotřebitelů a osob reagujících na havárie) a životního prostředí (4).

Kategorie 1 GHS OSN: Viz „vážné poškození očí“ a/nebo „nevratné účinky na oči“.

Kategorie 2 GHS OSN: Viz „dráždivé účinky na oči“ a/nebo „vratné účinky na oči“.

Bez kategorie GHS OSN: Látky, které nesplňují požadavky na klasifikaci v kategorii 1 nebo 2 (2A nebo 2B) GHS OSN. Tento pojem je zaměnitelný s výrazem „neklasifikované“.

Validovaná zkušební metoda: Zkušební metoda, u níž byly provedeny validační studie k určení její relevantnosti (včetně přesnosti) a spolehlivosti pro konkrétní účel. Je nutné poznamenat, že validovaná zkušební metoda nemusí poskytnout postačující výsledek z hlediska přesnosti a spolehlivosti, aby byla shledána přijatelnou pro navržený účel.

Závažnost důkazů: Postup zvažování silných a slabých stránek různých informací v dosahování a podpoře závěru týkajícího se potenciálu nebezpečnosti látky.

▼M7

Dodatek 2

CHEMICKÉ LÁTKY PRO PROKÁZÁNÍ ZPŮSOBILOSTI PRO ZKUŠEBNÍ METODU ICE

Dříve než začnou laboratoře rutinně používat tuto zkušební metodu, která dodržuje tuto zkušební metodu, měly by prokázat svou odbornou způsobilost správným určením klasifikace nebezpečnosti pro oči u 13 chemických látek doporučených v tabulce 1. Tyto chemické látky byly vybrány tak, aby představovaly rozsah reakcí na nebezpečnost pro oči na základě výsledků oční zkoušky *in vivo* na králících (TG 405) a klasifikačního systému GHS OSN (tj. kategorie GHS OSN 1, 2A, 2B, nebo neklasifikované) (4) (6). Dalšími kritérii výběru bylo to, zda je látka komerčně dostupná, zda jsou k dispozici kvalitní referenční údaje *in vivo* a zda jsou kvalitní údaje získané ze zkušební metody ICE *in vitro*. Referenční údaje jsou dostupné v publikacích SSD (Summary Document Supporting OECD Test Guideline 438) (5) a v *Background Review Documents* (Základní dokumenty o přezkumu) ICCVAM pro zkušební metodu ICE (9).

Tabulka 1

Doporučené chemické látky k prokázání odborné způsobilosti pro ICE

Chemická látka	Registrační číslo CAS	Třída chemických látek [1]	Fyzikální forma	Klasifikace *in vivo* [2]	Klasifikace *in vitro* [3]
Benzalkoniumchlorid (5 %)	8001-54-5	Oniová sůl	Kapalná	Kategorie 1	Kategorie 1
Chlorhexidin	55-56-1	Amin, amidin	Pevná	Kategorie 1	Kategorie 1
Dibenzoyl-L–tartarová kyselina	2743-38-6	Karboxylová kyselina, ester	Pevná	Kategorie 1	Kategorie 1
Imidazol	288-32-4	Heterocyklická	Pevná	Kategorie 1	Kategorie 1
Kyselina trichloroctová (30 %)	76-03-9	Karboxylová kyselina	Kapalná	Kategorie 1	Kategorie 1
Dichlorobenzoylchlorid	4659-45-4	Acylhalogenid	Kapalná	Kategorie 2A	Nelze předpovědět [4]
Dusičnan amonný	6484-52-2	Anorganická sůl	Pevná	Kategorie 2A [5]	Nelze předpovědět [4]
Ethyl-2-metyla-ceto–acetát	609-14-3	Keton, ester	Kapalná	Kategorie 2B	Nelze předpovědět [4]
Dimethylsulfoxid	67-68-5	Organická sloučenina síry	Kapalná	Bez kategorie	Bez kategorie
Glycerol	56-81-5	Alkohol	Kapalná	Bez kategorie	Bez kategorie (hraniční)
Methylcyklopentan	96-37-7	Uhlovodík (cyklický)	Kapalná	Bez kategorie	Bez kategorie
n-hexan	110-54-3	Uhlovodík (acyklický)	Kapalná	Bez kategorie	Bez kategorie

▼M7

Chemická látka	Registrační číslo CAS	Třída chemických látek (1)	Fyzikální forma	Klasifikace *in vivo* (2)	Klasifikace *in vitro* (3)
Triacetin	102-76-1	Lipid	Kapalná	Neklasifikována	Bez kategorie

Zkratky: CASRN = *Chemical Abstracts Service Registry Number* (registrační číslo CAS).

(1) Chemické třídy byly přiděleny každé zkoušené chemické látce s použitím standardního klasifikačního schématu na základě klasifikačního systému Národní knihovny názvů léků a léčivých látek (MeSH) (dostupný na: http://www.nlm.nih.gov/mesh).

(2) Založena na oční zkoušce *in vivo* na králících (Pokyn OECD (TG) č. 405) a s použitím GHS OSN (4) (6).

(3) Na základě výsledků ICE uvedených v tabulce 6.

(4) Kombinace jiných hodnot ICE, než jsou hodnoty uvedené v tabulce 6 pro identifikaci chemických látek bez kategorie GHS a chemických látek kategorie 1 GHS (viz tabulka 6).

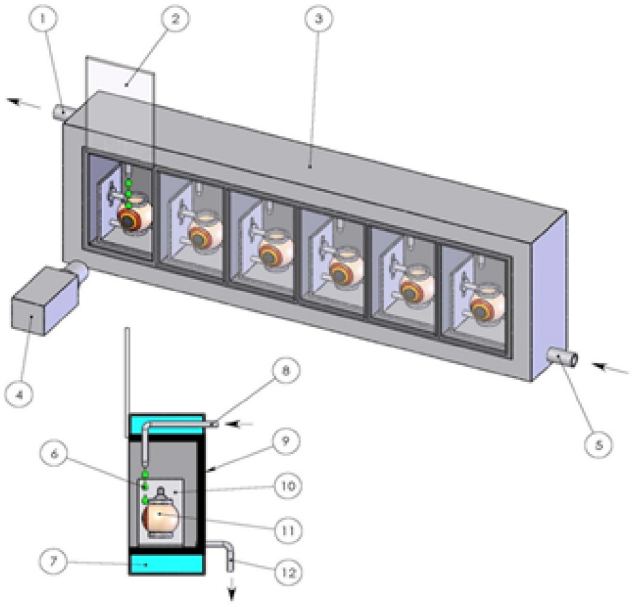
(5) Klasifikace v kategorii 2A nebo 2B závisí na interpretaci kritéria GHS OSN pro rozlišování mezi těmito dvěma kategoriemi, tj. 1 ze 3 versus 2 ze 3 zvířat s účinky v den 7 nezbytnými pro stanovení klasifikace v kategorii 2A. Studie *in vivo* byla provedena na 3 zvířatech. Všechny sledované vlastnosti kromě zčervenání spojivek u jednoho zvířete se ke dni 7 nebo dříve vrátily zpět na nulovou hodnotu. Toto jedno zvíře, které se ke dni 7 zcela neuzdravilo, mělo hodnotu zčervenání spojivek 1 (v den 7) a plně se uzdravilo v den 10.

▼M7

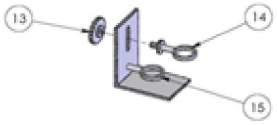
Dodatek 3

SCHÉMATICKÝ NÁKRES SUPERFÚZNÍHO APARÁTU A DRŽÁKŮ OČÍ ICE

(Další generické popisy superfúzního aparátu a držáků očí viz Burton a kol. (18))



CROSS SECTION COMPARTMENT



EYE HOLDER

Položka č.	Popis:	Položka č.	Popis:
1	Odtok teplé vody	9	Komora
2	Posuvný kryt	10	Držák očí
3	Superfúzní aparát	11	Kuřecí oko
4	Optický měřicí přístroj	12	Odvod solného roztoku
5	Přívod teplé vody	13	Šroubová svorka
6	Solný roztok	14	Nastavitelné horní rameno
7	Teplá voda	15	Pevné dolní rameno
8	Přívod solného roztoku		

▼M7

B.49 MIKRONUKLEUS TEST V SAVČÍCH BUŇKÁCH IN VITRO

ÚVOD

Tato zkušební metoda je rovnocenná Pokynu OECD pro zkoušení (TG) č. 487 (2016). Je součástí série zkušebních metod v oblasti genetické toxikologie. Byl vypracován dokument OECD, který obsahuje stručné informace o zkoušení v oblasti genetické toxikologie a přehled posledních změn, které byly v těchto pokynech ke zkoušení provedeny (1).

Mikronukleus test v savčích buňkách in vitro (MNvit) je zkouška genotoxicity pro zjišťování přítomnosti mikrojader v cytoplazmě interfázních buněk. Mikrojádra mohou pocházet z acentrických fragmentů chromozomů (tzn. fragmentů, jimž chybí centromera) nebo z celých chromozomů, které nejsou při buněčném dělení schopny se ve stádiu anafáze rozejít k pólům. Zkouška MNvit je tedy metoda *in vitro*, která poskytuje komplexní základ pro zkoumání *in vitro* schopnosti látek poškozovat chromozomy, protože je možné zjistit aneugeny a rovněž klastogeny v buňkách, které prodělaly buněčné dělení během expozice nebo po expozici zkoušené látce, (2) (3) (podrobněji viz odstavec 13). Mikrojádra představují poškození přenesené na dceřiné buňky, zatímco chromozomové aberace zjištěné v metafázních buňkách se přenášet nemusejí. V obou případech tyto změny nemusí být slučitelné s přežitím buněk.

Tato zkušební metoda umožňuje používat protokoly s inhibitorem polymerace aktinu, cytochalasinem B (cytoB), i bez něho. Přidání cytoB před mitózou vede ke vzniku buněk, které jsou dvoujaderné, a proto umožňuje identifikaci a analýzu mikrojader pouze v buňkách, které prodělaly jednu mitózu (4) (5). Tato zkušební metoda rovněž umožňuje použití protokolů bez blokování cytokineze, pokud existují důkazy, že analyzovaná populace buněk prodělala mitózu.

Kromě použití zkoušky MNvit pro identifikaci chemických látek, které vyvolávají vznik mikrojader, lze další informace o mechanismech poškození chromozomů a tvorbě mikrojader získat rovněž použitím imunochemického značení kinetochorů nebo hybridizace za použití centromerických/telomerických sond (fluorescenční hybridizace *in situ* – FISH) (6) (7) (8) (9) (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16) (17). Postupy značení a hybridizace lze použít, pokud dojde ke zvýšené tvorbě mikrojader a zkoušející chce určit, zda je toto zvýšení výsledkem klastogenního a/nebo aneugenního působení.

Jelikož mikrojádra v interfázních buňkách lze posuzovat poměrně objektivně, laboratorní personál musí pouze zjistit počet dvoujaderných buněk v případě, je-li použit cytoB, a výskyt buněk s mikrojádry v každém případě. Díky tomu lze preparáty vyhodnotit poměrně rychle a analýzu lze automatizovat. Takto lze při každé aplikaci vyhodnotit tisíce namísto stovek buněk, čímž se zvyšuje výkonnost této metody. A konečně, jelikož mikrojádra mohou vznikat z opožděných chromozomů, je možno zjišťovat látky, které vyvolávají aneuploidii a jež lze obtížně studovat za použití běžných zkoušek na chromozomové aberace, např. podle kapitoly B.10 této přílohy (18). Zkouška MNvit popsaná v této zkušební metodě však neumožňuje odlišit chemické látky vyvolávající změny počtu chromozomů a/nebo polyploidii od látek vyvolávajících klastogenicitu bez použití speciálních postupů, jako je například metoda FISH uvedená v odstavci 4.

Zkouška MNvit je spolehlivá a lze ji provádět u široké škály různých typů buněk, za přítomnosti nebo nepřítomnosti cytoB. Existuje množství údajů, jež potvrzují platnost zkoušky MNvit za použití různých druhů buněk (kultur buněčných linií nebo primárních buněčných kultur) (19) (20) (21) (22) (23) (24) (25) (26) (27) (28) (29) (30) (31) (32) (33) (34) (35) (36). Patří mezi ně zejména mezinárodní validační studie koordinované společností *Société Française de Toxicologie Génétique* (SFTG) (19) (20) (21) (22) (23) a zprávy z Mezinárodního

▼M7

semináře o zkoušení genotoxicity (5) (17). Dostupné údaje byly rovněž přehodnoceny v retrospektivní validační studii v rámci přístupu založeného na hodnocení závažnosti důkazů, provedené Evropským střediskem pro validaci alternativních metod (ECVAM) Evropské komise (EK), a zkušební metoda byla potvrzena jako vědecky platná vědeckým poradním výborem ECVAM (ESAC) (37) (38) (39).

Ke zkoušce MNvit na buňkách savců mohou být použity kultury buněčných linií nebo primární buněčné kultury lidského původu nebo pocházející z hlodavců. Jelikož četnost mikrojader v rámci přirozeného pozadí ovlivní citlivost testu, doporučuje se používat druhy buněk se stabilní a definovanou četností tvorby mikrojader v rámci přirozeného pozadí. Použité buňky se vybírají na základě jejich schopnosti dobrého růstu v kultuře, stálosti karyotypu (včetně počtu chromozomů) a spontánní četnosti výskytu mikrojader (40). Údaje, které jsou v současné době k dispozici, neumožňují předkládat jednoznačná doporučení, avšak naznačují, že při hodnocení chemické nebezpečnosti je důležité zvážit stav *p53*, genetickou stálost (stálost karyotypu), reparační schopnost DNA a původ buněk (lidské *versus* pocházející z hlodavců) vybraných ke zkoušení. Uživatelům této zkušební metody se proto doporučuje, aby při detekování indukce mikrojader zvážili vliv těchto i jiných buněčných charakteristik na vlastnosti buněčné linie.

Použité definice jsou uvedeny v dodatku 1.

VÝCHOZÍ ÚVAHY A OMEZENÍ

Zkoušky prováděné *in vitro* zpravidla vyžadují použití exogenního zdroje metabolické aktivace, pokud nejsou buňky metabolicky kompetentní s ohledem na zkoušené chemické látky. Systém exogenní metabolické aktivace zcela nenapodobuje podmínky *in vivo*. Je nutno zabránit vzniku podmínek, které by mohly vést k uměle pozitivním výsledkům, jež neodrážejí genotoxicitu zkoušených chemických látek. Takové podmínky zahrnují změny pH (41) (42) (43) nebo osmolality, interakce s kultivačním médiem (44) (45) nebo nadměrné úrovně cytotoxicity (viz odstavec 29).

Pro analýzu indukce vzniku mikrojader je nezbytné, aby proběhla mitóza v exponovaných i neexponovaných kulturách. Nejinformativnějším stadiem pro hodnocení výskytu mikrojader jsou buňky, které prodělaly jednu mitózu během expozice nebo po expozici zkoušené chemické látce. Při zkoušení vyráběných nanomateriálů je nutné v této zkušební metodě provést určité úpravy, avšak ty v této zkušební metodě nejsou popsány.

Před použitím této zkušební metody na směs za účelem získání údajů pro zamýšlené použití v právních předpisech by se mělo zvážit, zda tato metoda může pro tento účel poskytnout přiměřené výsledky, a pokud ano, proč je tomu tak. Takové úvahy nejsou nutné, pokud existuje právní požadavek na zkoušení dané směsi.

PODSTATA ZKOUŠKY

Buněčné kultury lidského a savčího původu jsou vystaveny zkoušené chemické látce za přítomnosti exogenního zdroje metabolické aktivace i bez něho, pokud ovšem nejsou použity buňky s dostatečnou schopností metabolismu (viz odstavec 19).

Během expozice nebo po expozici zkoušené chemické látce se buňky kultivují dostatečně dlouho, aby poškození chromozomů nebo jiné účinky na buněčný cyklus / dělení buněk vedlo v interfázových buňkách ke vzniku mikrojader. Pro vyvolání aneuploidie by měla být zkoušená chemická látka obvykle přítomna při mitóze. Získané a obarvené interfázní buňky se analyzují na přítomnost mikrojader. V ideálním případě by měla být přítomnost mikrojader zjištěna pouze v těch buňkách, které prodělaly mitózu během expozice zkoušené chemické látce nebo během postexpoziční doby, pokud se používá. V kulturách,

▼M7

které byly ošetřeny blokátorem cytokineze, se toho snadno dosáhne tím, že se zaznamenají pouze dvoujaderné buňky. V případě nepřítomnosti blokátoru cytokineze je nutno prokázat, že analyzované buňky pravděpodobně, na základě nárůstu buněčné expozice, prodělaly buněčné dělení během expozice nebo po expozici zkoušené látce. U všech protokolů je důležité prokázat, že došlo k proliferaci buněk jak v kontrolních, tak v exponovaných kulturách, a také je třeba ve všech kulturách, u nichž se hodnotí výskyt mikrojader, posoudit míru cytotoxicity nebo cytostáze vyvolané zkoušenou chemickou látkou.

POPIS METODY

Buňky

Lze použít kultivované primární lidské nebo savčí lymfocyty z periferní krve (7) (20) (46) (47) a celou řadu buněčných linií pocházejících z hlodavců, např. buňky CHO, V79, CHL/IU a L5178Y, nebo lidské buněčné linie, např. TK6 (19) (20) (21) (22) (23) (26) (27) (28) (29) (31) (33) (34) (35) (36) (viz odstavec 6). Pro testování mikrojader byly použity i jiné buněčné linie, např. HT29 (48), Caco-2 (49), HepaRG (50) (51), HepG2 (52) (53), A549 a primární buňky z embryí syrského křečka (54), avšak dosud nebyly dostatečně validovány. Použití těchto buněčných linií a druhů by proto mělo být odůvodněno na základě jejich prokázané funkčnosti ve zkoušce, jak je popsáno v oddíle „Kritéria přijatelnosti“. Bylo zaznamenáno, že cytoB může potenciálně ovlivnit růst buněk L5178Y, a proto se nedoporučuje jej s touto buněčnou linií používat (23). Použijí-li se primární buňky, mělo by se z důvodu dobrého zacházení se zvířaty tam, kde je to možné, zvážit použití buněk lidského původu a odběr vzorků se provede v souladu s etickými zásadami a předpisy platnými pro člověka.

Lidské lymfocyty z periferní krve by měly být získány od mladých (přibližně ve věku 18–35 let) nekuřáků, o nichž není známo, že by trpěli nemocemi nebo že by byli nedávno vystaveni genotoxickým látkám (např. chemickým látkám, ionizujícímu záření) na úrovních, které by mohly zvýšit výskyt buněk s mikrojádry na pozadí. Tím by se zajistilo, že výskyt buněk s mikrojádry na pozadí bude nízký a stálý. Výskyt buněk s mikrojádry na pozadí se s věkem zvyšuje a tento trend je více patrný u žen než u mužů (55). Pokud se společně používají buňky pocházející od více než jednoho dárce, měl by být počet dárců uveden. Je nezbytné prokázat, že buňky se dělily od počátku ovlivnění zkoušenou chemickou látkou až do odběru buněčných vzorků. Buněčné kultury jsou udržovány ve fázi exponenciálního růstu (buněčné linie) nebo jsou stimulovány k dělení (primární kultury lymfocytů), aby bylo možné exponovat buňky v různých stadiích buněčného cyklu, protože citlivost stadií buněk na zkoušené chemické látky nemusí být známa. Primární buňky, které k dělení potřebují stimulaci mitogenními látkami, během expozice zkoušené chemické látce již zpravidla nejsou synchronizovány (např. lidské lymfocyty po 48hodinové mitogenní stimulaci). Použití synchronizovaných buněk v průběhu expozice zkoušení chemické látce se nedoporučuje, avšak lze je akceptovat v odůvodněných případech.

Média a podmínky kultivace

Pro udržování kultur by se měla používat vhodná kultivační média a inkubační podmínky (kultivační nádoby, případně zvlhčená atmosféra s 5 % CO_2, teplota 37 °C). U buněčných linií by se měla pravidelně kontrolovat stabilita modální hodnoty počtu chromozomů a mělo by se zjišťovat, zda nejsou kontaminovány mykoplasmaty. Pokud jsou buňky kontaminované nebo se modální hodnota počtu chromozomů změnila, neměly by se takové kultury používat. Pro buněčné linie nebo primární kultury použité ve zkušební laboratoři by měla být stanovena normální délka buněčného cyklu, která by měla být v souladu s buněčnými charakteristikami uvedenými v literatuře.

▼M7

Příprava kultur

Buněčné linie: buňky se pomnoží z kmenových kultur, nasadí se do kultivačního média v takové hustotě, aby u buněk v suspenzích nebo v monovrstvách pokračoval exponenciální růst až do sběru buněk (např. mělo by se zamezit konfluenci u buněk rostoucích v monovrstvách).

Lymfocyty: plná krev ošetřená antikoagulantem (např. heparinem) nebo oddělené lymfocyty se před expozicí zkoušené chemické látce a cytoB kultivují (např. 48 hodin v případě lidských lymfocytů) za přítomnosti mitogenu (např. fytohemaglutininu (PHA) v případě lidských lymfocytů), aby se vyvolalo buněčné dělení.

Metabolická aktivace

Při použití buněk s nedostatečnou endogenní metabolickou schopností by se měly použít exogenní metabolizující systémy. Nejčastěji používaným systémem, který je standardně doporučován, pokud není zdůvodněno použití jiného systému, je kofaktorem dotovaná postmitochondriální frakce (S9) připravená z jater hlodavců (zpravidla potkanů) zpracovaná činidlem indukujícím enzymy, jako je Aroclor 1254 (56) (57), nebo směsí fenobarbitalu a b-naftoflavonu (58) (59) (60). Použití uvedené směsi není v rozporu se Stockholmskou úmluvou o perzistentních organických znečišťujících látkách (61) a bylo prokázáno, že je stejně účinná jako Aroclor 1254 pro indukování oxidáz se smíšenou funkcí (58) (59) (60). Frakce S9 je v konečném testovacím médiu obvykle používána v koncentracích od 1 % do 2 % obj., avšak koncentraci je možné zvýšit do 10 %. V průběhu aplikace by se neměly používat produkty, jež snižují mitotický index, zejména komplexotvorná činidla pro vápník (62). Volbu typu a koncentrace systému exogenní metabolické aktivace nebo metabolického induktoru, který se použije, může ovlivnit třída zkoušených chemických látek.

Příprava zkoušené chemické látky

Pevné zkoušené chemické látky by se před aplikací na buňky měly připravit ve vhodných rozpouštědlech a popřípadě zředit. Kapalné látky lze přidat přímo do zkušebních systémů a/nebo je lze před použitím k ošetření zkušebních systémů zředit. Plynné a těkavé zkoušené chemické látky by se měly zkoušet za použití vhodně upravených standardních protokolů, například prostřednictvím ošetření buněk v neprodyšně uzavřených nádobách (63) (64) (65). Měly by se používat čerstvě připravené zkoušené látky, pokud údaje o stálosti neprokazují možnost skladování.

Zkušební podmínky

Rozpouštědla

Rozpouštědlo by mělo být zvoleno tak, aby optimalizovalo rozpustnost zkoušené chemické látky, aniž by nepříznivě ovlivnilo provádění zkoušky, např. měnilo růst buněk, ovlivňovalo integritu zkoušené chemické látky, reagovalo s kultivačními nádobami, narušovalo systém metabolické aktivace. Doporučuje se pokud možno nejprve zvážit použití vodného rozpouštědla (nebo kultivačního média). Dobře zavedenými rozpouštědly jsou voda nebo dimethylsulfoxid (DMSO). Podíl organických rozpouštědel by obvykle neměl být větší než 1 % obj. Je-li cytoB rozpuštěn v DMSO, celkové množství organického rozpouštědla použitého na zkoušenou chemickou látku a na cytoB by nemělo přesahovat 1 % obj., v opačném případě by se měly použít neexponované kontroly, aby se zajistilo, že podíl organického rozpouštědla nebude mít žádný nepříznivý účinek. Podíl vodných rozpouštědel (fyziologického roztoku nebo vody) v konečném expozičním médiu by neměl být větší než 10 % obj. Jsou-li použita jiná než osvědčená rozpouštědla (např. ethanol nebo aceton), mělo by být jejich použití podloženo údaji o jejich kompatibilitě se zkoušenou chemickou látkou a zkušebním systémem a o tom, že nejsou v použité koncentraci genotoxické.

▼M7

Pokud takové podpůrné údaje neexistují, je důležité zařadit neexponované kontroly (viz dodatek 1) a také kontroly s rozpouštědlem, aby se prokázalo, že zvolené rozpouštědlo nevyvolává žádné škodlivé účinky ani účinky na chromozomy (např. aneuploidii nebo klastogenicitu).

Používání cytoB jako blokátoru cytokineze

Jedním z nejdůležitějších hledisek při provádění zkoušky MNvit je zajistit, aby hodnocené buňky prodělaly mitózu během expozice zkoušené látce nebo během postexpoziční inkubační doby, pokud se používá. Proto by se hodnocení výskytu mikrojader mělo omezit pouze na buňky, které prodělaly mitózu během ošetření zkoušenou látkou nebo po něm. CytoB je látka, která se nejčastěji používá k blokování cytokineze, protože inhibuje sestavení aktinu, a tím zabraňuje oddělení dceřiných buněk po mitóze, což vede ke vzniku dvoujaderných buněk (6) (66) (67). Při použití cytoB lze zároveň měřit účinek zkoušené chemické látky na kinetiku buněčné prolifereace. CytoB by se měl používat jako blokátor cytokineze při použití lidských lymfocytů, protože délky trvání buněčného cyklu budou u různých dárců proměnlivé a protože ne všechny lymfocyty budou reagovat na stimulaci PHA. Pro jiné druhy buněk není použití cytoB povinné, pokud je možné stanovit, že prodělaly dělení, jak je popsáno v odstavci 27. CytoB se mimoto obvykle nepoužívá v případech, kdy se výskyt mikrojader ve vzorcích hodnotí pomocí metod průtokové cytometrie.

V laboratoři by se měla stanovit vhodná koncentrace cytoB pro každý druh buněk, aby se dosáhlo optimální četnosti dvoujaderných buněk v kontrolních kulturách s rozpouštědlem, a mělo by se prokázat, že tato koncentrace poskytuje dostatečné množství dvoujaderných buněk pro hodnocení. Vhodná koncentrace cytoB obvykle činí 3 až 6 μg/ml (19).

Měření buněčné proliferace a cytotoxicity a volba expozičních koncentrací

Při určování nejvyšší koncentrace zkušební chemické látky je nutno se vyhnout koncentracím, které mají schopnost produkovat arteficielní pozitivní odezvy, například koncentracím, jež vyvolávají velmi vysokou cytotoxicitu (viz odstavec 29), vysrážení v kultivačním médiu (viz odstavec 30) a výrazné změny pH nebo osmolality (viz odstavec 9). Pokud zkoušená chemická látka v době jejího přidání způsobuje zřetelnou změnu hodnoty pH média, bylo by možné pH upravit pufrováním konečného expozičního média tak, aby nedošlo k falešným pozitivním výsledkům a aby byly zachovány vhodné kultivační podmínky.

Měření buněčné proliferace se provádí proto, aby bylo zajištěno, že dostatek ošetřených buněk prodělal během zkoušky mitózu a že se jednotlivé expozice provádějí při vhodných úrovních cytotoxicity (viz odstavec 29). Cytotoxicita by měla být stanovena v hlavním experimentu s metabolickou aktivací a bez metabolické aktivace za použití vhodné indikace zániku a růstu buněk (viz odstavce 26 a 27). Hodnocení cytotoxicity při počáteční předběžné zkoušce může být užitečné a může napomoci lepšímu stanovení koncentrací, jež mají být použity při hlavní zkoušce, avšak předběžná zkouška není povinná. Pokud se provede, neměla by nahrazovat měření cytotoxicity v hlavním experimentu.

Ošetření kultur cytoB a měření relativních četností jednojaderných, dvoujaderných a vícejaderných buněk v kultuře představuje přesnou metodu kvantifikace účinku na buněčnou proliferaci a cytotoxického nebo cytostatického působení látky použité k ovlivnění kultury (6) a zajišťuje, že se mikroskopicky hodnotí pouze buňky, které prodělaly buněčné dělení během expozice nebo po ní. K odhadu cytotoxického a cytostatického působení za expozice porovnáním

▼M7

hodnot u exponovaných a kontrolních kultur se doporučuje použít proliferační index při blokování cytokineze (CBPI) (6) (27) (68) nebo replikační index (RI) získaný z nejméně 500 buněk v každé kultuře (příslušné vzorce viz dodatek 2). Užitečné informace může poskytnout i hodnocení ostatních ukazatelů cytotoxicity (např. integrity buněk, apoptózy, nekrózy, počítání metafází, buněčný cyklus), avšak tyto ukazatele by neměly být používány namísto CBPI nebo RI.

Ve studiích bez použití cytoB je nutno prokázat, že buňky v kultuře se rozdělily, takže podstatná část z hodnocených buněk prodělala buněčné dělení během expozice zkoušené chemické látce nebo po ní, jinak mohou vznikat falešně negativní odpovědi. K odhadu cytotoxického a cytostatického působení expozice se doporučuje použít měření relativního zdvojnásobení populace (RPD) nebo relativního nárůstu počtu buněk (RICC) (17) (68) (69) (70) (71) (příslušné vzorce viz dodatek 2). Při prodloužení časů odběru vzorků (např. expozice po dobu odpovídající 1,5–2násobku normální délky buněčného cyklu a odebrání po další době odpovídající 1,5–2násobku normální délky buněčného cyklu, což celkově vede k časům odběru delším než doba odpovídající 3–4násobku normální délky buněčného cyklu, jak je popsáno v oddílech 38 a 39) by při použití měření RPD mohlo vést k podhodnocenému odhadu cytotoxicity (71). Za těchto okolností by mohlo být lepším měřítkem RICC nebo by bylo užitečné provést odhad na základě hodnocení cytotoxicity po době odpovídající 1,5–2násobku normální délky buněčného cyklu. Užitečné doplňující informace může poskytnout i hodnocení ostatních ukazatelů cytotoxicity nebo cytostáze (např. integrity buněk, apoptózy, nekrózy, počítání metafází, proliferačního indexu (PI), buněčného cyklu, nukleoplasmatických můstků nebo jaderných pupenů), avšak tyto ukazatele by neměly být používány namísto RPD nebo RICC.

Měly by se vyhodnotit nejméně tři zkušební koncentrace (nepočítaje v to kontroly s rozpouštědlem a pozitivní kontroly), které splňují kritéria přijatelnosti (vhodná cytotoxicita, počet buněk atd.). Bez ohledu na typy buněk (buněčné linie nebo primární kultury lymfocytů) lze pro každou zkušební koncentraci použít repliky nebo jednu exponovanou kulturu. Lze doporučit použití duplicitních kultur, avšak jednu kulturu lze rovněž akceptovat za předpokladu, že v této jediné kultuře nebo v duplicitních kulturách je hodnocen stejný celkový počet buněk. Použití jedné kultury je opodstatněné zejména v případě, že jsou posuzovány více než 3 koncentrace (viz odstavce 44–45). Výsledky získané z nezávislých kultur použitých k opakování při dané koncentraci lze pro účely analýzy údajů sloučit. U zkoušených látek, jež vykazují malou cytotoxicitu nebo nevykazují žádnou cytotoxicitu, budou obvykle vhodné přibližně dvojnásobné až trojnásobné intervaly koncentrací. V případě cytotoxicity by měly zvolené zkušební koncentrace pokrývat rozpětí od koncentrace vyvolávající cytotoxicitu, jak je popsáno v odstavci 29, po koncentrace, při nichž dochází ke střední a nízké cytotoxicitě nebo nedochází k žádné cytotoxicitě. Mnohé zkoušené chemické látky vykazují strmé křivky závislosti odezvy na koncentraci, a aby bylo možné získat údaje při nízké a střední cytotoxicitě nebo podrobně studovat závislost odezvy na dávce, může být nezbytné zvolit menší rozdíly mezi jednotlivými koncentracemi a/nebo více než tři koncentrace (pro jednu kulturu nebo repliky), zejména v situacích, kdy jsou nutné opakované experimenty (viz odstavec 60).

Je-li maximální koncentrace odvozena od cytotoxicity, měla by být nejvyšší koncentrace zvolena tak, aby se dosáhlo 55 ± 5 % cytotoxicity za použití doporučených parametrů cytotoxicity (tj. snížení RICC a RPD u buněčných linií, není-li použit cytoB, a snížení CBPI nebo RI, je-li použit cytoB, na 45 ± 5 % u souběžné negativní kontroly) (72). Je třeba dbát na to, aby byly interpretovány pouze ty pozitivní výsledky, které jsou vykazovány při vyšší hranici tohoto rozmezí cytotoxicity 55 ± 5 % (71).

▼M7

V případě špatně rozpustných zkoušených chemických látek, které nejsou cytotoxické při koncentracích nižších, než je jejich rozpustnost, by nejvyšší analyzovaná koncentrace měla na konci expozice zkoušené chemické látce vyvolat zákal nebo sraženinu viditelnou pouhým okem nebo pomocí inverzního mikroskopu. Dokonce i v případech, kdy k výskytu cytotoxicity dochází při koncentracích vyšších, než je rozpustnost, se doporučuje testovat pouze při jedné koncentraci indukující zákal nebo viditelné sraženiny, neboť sraženina může vést k falešným účinkům. Při koncentraci, kdy vzniká sraženina, je třeba dbát na to, aby sraženina nemohla ovlivňovat provádění zkoušky (např. barvení nebo hodnocení). Užitečné může být stanovit rozpustnost v kultivačním médiu před pokusem.

Není-li pozorována sraženina nebo cytotoxicita omezující hodnocení, měla by největší zkušební koncentrace odpovídat 10 mM, 2 mg/ml nebo 2 µl/ml, podle toho, která z uvedených hodnot je nejnižší (73) (74) (75). Pokud u zkoušené chemické látky není stanoveno její složení, např. u látek s neznámým nebo proměnlivým složením, komplexních reakčních produktů nebo biologického materiálu (UVCB) (76), přírodního extraktu atd., bude možná muset být při nedostatečné cytotoxicitě nejvyšší koncentrace vyšší (např. 5 mg/ml), aby se zvýšila koncentrace každé ze složek. Je však třeba poznamenat, že u humánních léčivých přípravků se tyto požadavky mohou lišit (93).

Kontroly

V okamžiku každého odběru by měly být použity souběžné negativní kontroly (viz odstavec 21) skládající se ze samotného rozpouštědla v kultivačním médiu a zpracované stejným způsobem jako exponované kultury.

K prokázání schopnosti laboratoře stanovit klastogeny a aneugeny za podmínek použitého zkušebního protokolu a účinnosti exogenního systému metabolické aktivace mohou být (případně) nutné souběžné pozitivní kontroly. Příklady pozitivních kontrol jsou uvedeny v tabulce 1 níže. V odůvodněných případech mohou být k pozitivní kontrole použity jiné chemické látky.

V současné době nejsou známy žádné aneugenní látky, které by ke svému genotoxickému působení vyžadovaly metabolickou aktivaci (17). Jelikož zkoušky genetické toxicity savčích buněk *in vitro* při krátkodobé expozici prováděné souběžně s metabolickou aktivací a bez metabolické aktivace s použitím stejné doby trvání expozice jsou již dostatečně standardizovány, je možné použití pozitivních kontrol omezit na testování klastogenu vyžadujícího metabolickou aktivaci. V tomto případě klastogenní reakce jediné pozitivní kontroly prokáže činnost systému metabolické aktivace i citlivost zkušebního systému. Dlouhodobá expozice (bez S9) by však měla mít svou vlastní pozitivní kontrolu a doba trvání expozice bude odlišná než při zkoušce za použití metabolické aktivace. Je-li pro jedinou pozitivní kontrolu při krátkodobé expozici s metabolickou aktivací a bez metabolické aktivace zvolen klastogen, měl by být při dlouhodobé expozici bez metabolické aktivace zvolen aneugen. Pro pozitivní kontroly pro klastogenicitu i pro aneugenicitu by měly být použity metabolicky kompetentní buňky, které nevyžadují S9.

Každá pozitivní kontrola by měla být použita při jedné nebo více koncentracích, u nichž se očekává, že poskytnou reprodukovatelný a detekovatelný nárůst oproti pozadí, čímž se prokáže citlivost testovacího systému (tj. aby byl účinek zřetelný, ale aby při odečtu nevyšla ihned najevo identita kódovaného preparátu), a reakce by neměla být narušena cytotoxicitou přesahující limitní hodnoty stanovené ve zkušební metodě.

▼M7

Tabulka 1.

Referenční chemické látky doporučené pro posouzení způsobilosti laboratoře a pro výběr pozitivních kontrol

Kategorie	Chemická látka	Registrační číslo CAS
1. **Klastogeny působící bez metabolické aktivace**		
	methyl-methansulfonát	66-27-3
	mitomycin C	50-07-7
	4-nitrochinolin-1-oxid	56-57-5
	cytosin arabinosid	147-94-4
2. **Klastogeny vyžadující metabolickou aktivaci**		
	benzo[a]pyren	50-32-8
	cyklofosfamid	50-18-0
3. **Aneugeny**		
	kolchicin	64-86-8
	vinblastin	143-67-9

POSTUP

Harmonogram aplikace

Aby se maximalizovala pravděpodobnost detekce aneugenní nebo klastogenní látky působící v určitém stadiu buněčného cyklu, je důležité, aby byl zkoušené chemické látce vystaven dostatečný počet buněk ve všech fázích jejich buněčného cyklu. Všechny expozice by měly začít a skončit v době exponenciálního růstu buněk a v době odběru vzorků by měl růst buněk pokračovat. Harmonogram aplikace pro buněčné linie a primární buněčné kultury se proto může poněkud lišit od harmonogramu aplikace u lymfocytů, které k zahájení svého buněčného cyklu potřebují mitogenní stimulaci (17). U lymfocytů je nejúčinnějším postupem začít s aplikací zkoušené chemické látky 44–48 hodin po stimulaci PHA, kdy se buňky budou dělit asynchronicky (6).

Publikované údaje (19) ukazují, že většina aneugenních a klastogenních látek bude detekována za použití krátkodobé expozice v trvání 3 až 6 hodin za přítomnosti i nepřítomnosti S9, po níž následuje odstranění zkoušené látky a odběr v době, která odpovídá 1,5–2násobku normální délky buněčného cyklu od zahájení expozice (7).

Pro důkladné hodnocení, které by bylo zapotřebí pro vyvození závěru o negativním výsledku, by měly být splněny všechny tři následující zkušební podmínky za použití krátkodobé expozice s metabolickou aktivací a bez ní a dlouhodobé expozice bez metabolické aktivace (viz odstavce 56, 57 a 58):

— buňky by měly být vystaveny zkoušené chemické látce bez metabolické aktivace na dobu 3–6 hodin a měly by být odebrány po takové době od zahájení aplikace, která odpovídá 1,5–2násobku normální délky buněčného cyklu (19),

— buňky by měly být vystaveny zkoušené chemické látce s metabolickou aktivací na dobu 3–6 hodin a měly by být odebrány po takové době od zahájení aplikace, která odpovídá 1,5–2násobku normální délky buněčného cyklu (19),

▼M7

— buňky by měly být vystaveny nepřetržité expozici bez metabolické aktivace až do odběru v době, která odpovídá 1,5–2násobku normální délky buněčného cyklu.

V případě, že kterákoli z výše uvedených zkušebních podmínek vede k pozitivní odpovědi, je možné, že nebude nutné zkoumat kterýkoli z ostatních režimů aplikace.

Pokud je známo nebo existuje podezření, že zkoušená chemická látka ovlivňuje délku buněčného cyklu (např. při zkoušení analogů nukleosidů), a to zejména u p53 kompetentních buněk (35) (36) (77), lze intervaly odběru vzorků nebo obnovy kultur prodloužit o další dobu odpovídající až 1,5–2násobku normální délky buněčného cyklu (tj. celkem na 3–4násobek délky buněčného cyklu po zahájení krátkodobé a dlouhodobé expozice). Tyto možnosti jsou určeny pro situace, které se týkají možných interakcí mezi zkoušenou chemickou látkou a cytoB. Při použití prodloužených intervalů odběru vzorků (tj. celkově na dobu odpovídající 3–4násobku délky buněčného cyklu kultur) je třeba dbát na to, aby se buňky v této době stále aktivně dělily. Například u lymfocytů může exponenciální růst v čase 96 hodin od stimulace klesat a buněčné kultury v monovrstvách mohou splývat.

Navrhované harmonogramy expozice buněk jsou uvedeny v tabulce 2. Tyto obecné harmonogramy expozice lze upravit (což by mělo být odůvodněno) v závislosti na stabilitě a reaktivitě zkoušené chemické látky nebo zvláštních růstových charakteristikách použitých buněk.

Tabulka 2.

Doby expozic a odběru buněk v rámci zkoušky MNvit

Lymfocyty, primární buňky a buněčné linie ošetřené s cytoB	+ S9 Krátká expozice	Expozice po dobu 3–6 hodin za přítomnosti S9; odstranění S9 a expozičního média; doplnění čerstvého média a cytoB; odběr po uplynutí doby od začátku expozice odpovídající 1,5násobku až 2,0násobku trvání běžných buněčných cyklů.
	– S9 Krátká expozice	Expozice po dobu 3–6 hodin; odstranění expozičního média; doplnění čerstvého média a cytoB; odběr po uplynutí doby od začátku expozice odpovídající 1,5násobku až 2,0násobku trvání běžných buněčných cyklů.
	– S9 Prodloužená expozice	Expozice po dobu odpovídající 1,5násobku až 2násobku trvání běžných buněčných cyklů za přítomnosti cytoB; odběr k vyhodnocení na konci doby expozice.
Buněčné linie ošetřené bez cytoB (Harmonogramy jsou shodné s harmonogramy uvedenými výše s výjimkou toho, že se nepřidává žádný cytoB.)		

Na konci doby expozice v trvání 3–6 hodin se v kulturách v monovrstvách mohou vyskytovat mitotické buňky (které se vyznačují okrouhlým tvarem a odchlipováním od povrchu). Jelikož lze tyto mitotické buňky snadno oddělit, mohou být při odstranění média obsahujícího zkoušenou chemickou látku ztraceny. Pokud v době sklizně existují důkazy podstatného nárůstu počtu mitotických buněk v porovnání s kontrolami, což pravděpodobně ukazuje na zastavení mitózy, pak by buňky měly být odebrány odstředěním a přidány zpět do kultury, aby se zabránilo ztrátě buněk, u nichž probíhá mitóza a tedy může dojít k indukci mikrojader / chromozómových aberací.

▼M7

Odběr buněk a příprava preparátů

Buňky z každé kultury by se měly odebírat a zpracovávat zvlášť. Příprava buněk může zahrnovat hypotonizaci, ale tento krok není nutný, pokud se dosáhne odpovídajícího rozprostření buněk jiným způsobem. Při přípravě preparátů lze použít různé postupy za předpokladu, že zajistí získání vysoce kvalitních buněčných preparátů pro vyhodnocení. Měly by být zachovány buňky s neporušenou buněčnou membránou a neporušenou cytoplazmou, což umožní detekci mikrojader a (při použití metody s blokováním cytokineze) spolehlivou identifikaci dvoujaderných buněk.

Preparáty lze barvit pomocí různých metod, jako je Giemsa nebo fluorescenčními barvivy se specifickou vazbou na DNA. Použitím vhodných fluorescenčních barviv (jako je např. akridinová oranž (78) nebo Hoechst 33258 a pyronin-Y (79)) se lze vyhnout některým artefaktům spojeným s použitím barviva bez specifické vazby na DNA. Je-li zapotřebí získat mechanistické informace o tvorbě mikrojader, lze k identifikaci jejich obsahu použít protilátky proti kinetochorům, hybridizační metodu FISH využívající pan-centrometrické DNA-sondy nebo značení *in situ* pomocí primerů se specifickou pan-centrometrickou vazbou spolu s vhodným kontrastním barvením DNA (celé chromozomy se zbarví, zatímco acentrické fragmenty chromozomů nikoli) (16) (17). K rozlišení mezi klastogeny a aneugeny lze použít i jiné metody, pokud se ukázaly jako účinné a byly validovány. Například u některých buněčných linií by užitečné informace mohlo poskytnout také měření jader sub-2N jako hypodiploidních jevů pomocí takových postupů, jako je analýza obrazu, laserová skenovací cytometrie nebo průtoková cytometrie (80) (81) (82). Také morfologická pozorování jader by mohla odhalit známky možné aneuploidie. Rovněž zkouška chromozomových aberací v metafázi, provedená nejlépe se stejným druhem buněk a podle protokolu se srovnatelnou citlivostí, by mohla být užitečná pro stanovení toho, zda jsou mikrojádra důsledkem poškození chromozomů (vzhledem k tomu, že ztráta chromozomů by při zkoušce chromozomových aberací nebyla zjištěna).

Analýza

Všechny preparáty včetně preparátů z kontrol s rozpouštědlem a z neexponovaných (jsou-li použity) a pozitivních kontrol by před mikroskopickou analýzou četnosti výskytu mikrojader měly být označeny samostatným kódem. Při použití automatizovaného systému hodnocení, jako je např. průtoková cytometrie, laserová skenovací cytometrie nebo analýza obrazu, by měly být použity vhodné techniky, aby se kontrolovalo, zda nedochází k jakémukoli zkreslení či posunu ve výsledcích. Ať už se pro vyčíslení mikrojader používá automatizovaná platforma, či nikoli, měly by být souběžně posouzeny hodnoty CBPI, RI, RPD nebo RICC.

V případě kultur ošetřených pomocí cytoB by se měla analyzovat četnost výskytu mikrojader nejméně u 2 000 dvoujaderných buněk pro každou koncentraci a z každé kontroly (83), které se rovnoměrně rozdělí mezi replikami, jsou-li použity. V případě použití jediné kultury na každou dávku (viz odstavec 28) by se mělo vyhodnotit nejméně 2 000 dvoujaderných buněk na každou kulturu v rámci této jediné kultury (83). Pokud je k dispozici k vyhodnocení pro každou koncentraci podstatně méně než 1 000 dvoujaderných buněk z každé kultury (u duplicitních kultur), nebo než 2 000 (u jedné kultury) a není-li zjištěn výrazný nárůst výskytu mikrojader, musí se zkouška zopakovat za použití většího počtu buněk nebo při méně cytotoxických koncentracích (podle toho, co z těchto dvou možností připadá v úvahu). Je třeba dbát na to, aby se nezapočítávaly dvoujaderné buňky, které mají nepravidelný tvar nebo jejichž dvě jádra se svou velikostí navzájem značně liší. Dále, dvoujaderné buňky by neměly být zaměňovány za špatně rozprostřené mnoho jaderné buňky. Buňky obsahující více než dvě hlavní jádra by se neměly analyzovat na přítomnost mikrojader, jelikož základní četnost mikrojader může být v těchto buňkách vyšší (84). Započtení jednojaderných buněk je přijatelné, pokud se prokáže, že zkoušená chemická látka narušuje působení cytoB. V takových případech by mohla být užitečná opakovaná

▼M7

zkouška bez cytoB. Započtení jednojaderných buněk spolu s hodnocením dvoujaderných buněk by mohlo poskytnout užitečné informace (85) (86), ale není povinné.

V případě buněčných linií testovaných bez cytoB by se měla analyzovat četnost výskytu mikrojader nejméně u 2 000 dvoujaderných buněk pro každou zkušební koncentraci a z každé kontroly (83), které se rovnoměrně rozdělí mezi replikami, jsou-li použity. Pokud je na každou koncentraci použita jediná kultura (viz odstavec 28), mělo by být hodnoceno nejméně 2 000 buněk na kulturu v rámci této jediné kultury. Pokud je k dispozici k vyhodnocení pro každou koncentraci podstatně méně než 1 000 buněk z každé kultury (u duplicitních kultur), nebo než 2 000 (u jedné kultury) a není-li zjištěn výrazný nárůst výskytu mikrojader, musí se zkouška zopakovat za použití většího počtu buněk nebo při méně cytotoxických koncentracích (podle toho, co z těchto dvou možností připadá v úvahu).

Při použití cytoB by se měla určit hodnota CBPI nebo RI k posouzení buněčné proliferace (viz dodatek 2) za použití nejméně 500 buněk z každé kultury. Provádí-li se expozice bez přítomnosti cytoB, je nezbytné prokázat, že buňky v kultuře se rozdělily, jak je vysvětleno v odstavcích 24 až 28.

Způsobilost laboratoře

Aby bylo možné před zahájením rutinního zkoušení zjistit, zda laboratoř má s danou zkouškou dostatečné zkušenosti, měla by provést sérii experimentů s referenčními pozitivními chemickými látkami, jež působí prostřednictvím různých mechanismů (alespoň s jednou látkou s metabolickou aktivací a jednou bez metabolické aktivace a jednou působící prostřednictvím aneugenního mechanismu, které se vyberou ze seznamu chemických látek uvedeného v tabulce 1), a s různými negativními kontrolami (včetně kontrol s neexponovanými kulturami a kontrol s různými rozpouštědly/vehikuly). Odpovědi těchto pozitivních a negativních kontrol by měly být v souladu s odbornou literaturou. Tento požadavek neplatí pro laboratoře, které tuto zkušenost mají, tj. které mají k dispozici historickou databázi historických údajů, jak je definována v odstavcích 49 až 52.

Měl by být zkoumán výběr z chemických látek pro pozitivní kontroly (viz tabulka 1) s krátkou a dlouhou expozicí za nepřítomnosti metabolické aktivace a rovněž s krátkou expozicí za přítomnosti metabolické aktivace, aby byla prokázána způsobilost pro detekci klastogenních a aneugenních chemických látek, stanovení účinnosti systému metabolické aktivace a prokázání vhodnosti postupů hodnocení (mikroskopická vizuální analýza, průtoková cytometrie, laserová skenovací cytometrie nebo analýza obrazu). Rozsah koncentrací by u vybraných chemických látek měl být zvolen tak, aby poskytl opakovatelná zvýšení účinku v závislosti na dávce nad úroveň pozadí, aby se tak prokázala citlivost a dynamické rozpětí testovacího systému.

Historické kontrolní údaje

Laboratoř by měla stanovit:

— historické rozmezí a distribuci pozitivních kontrol,

— historické rozmezí a distribuci negativních kontrol (neexponovaných, s rozpouštědlem).

Při prvním získávání údajů o historické distribuci negativních kontrol by měly být výsledky souběžných negativních kontrol v souladu s publikovanými negativními kontrolními údaji, pokud existují. S tím, jak je do distribuce kontrol přidáváno více údajů z experimentů, měly by být souběžné negativní kontroly v ideálním případě uvnitř 95 % kontrolních limitů této distribuce (87) (88). Nejprve by měla být vybudována historická databáze negativních kontrol dané laboratoře na základě nejméně 10 experimentů, nejlépe však by měla zahrnovat nejméně 20 experimentů provedených za srovnatelných zkušebních podmínek. V laboratořích by měly být uplatňovány metody řízení jakosti, jako např. regulační diagramy (např. takzvané C-charts nebo X-bar charts (88)), z nichž je

▼M7

patrné, jak proměnlivé jsou jejich údaje o pozitivních a negativních kontrolách a že metodika je v dané laboratoři „pod kontrolou“ (83). Další doporučení, jak získat a používat historické údaje (tj. kritéria pro zařazení údajů do historické databáze a jejich vyřazení a kritéria přijatelnosti pro daný experiment), lze najít v literatuře (87).

Jakékoli změny zkušebního protokolu by měly být zvažovány z hlediska jejich souladu se stávajícími historickými kontrolními databázemi laboratoře. Jakákoliv větší změna by měla vést k zavedení nové historické kontrolní databáze.

Údaje o negativních kontrolách by měly zahrnovat výskyt buněk s mikrojádry z jedné kultury nebo ze souhrnu replikovaných kultur, jak je popsáno v odstavci 28. Výsledky souběžných negativních kontrol by v ideálním případě měly spadat do 95 % rozmezí distribuce v historické databázi negativních kontrol laboratoře (87) (88). Pokud jsou údaje ze souběžných negativních kontrol mimo 95 % rozmezí může být přijatelné je zahrnout do dosavadní distribuce kontrol, pokud tyto údaje nejsou mimořádně odlehlé a pokud existují důkazy o tom, že testovací systém je „pod kontrolou“ (viz odstavec 50), a důkazy o tom, že nedošlo k technické nebo lidské chybě.

ÚDAJE A PŘEDKLÁDÁNÍ ZPRÁV

Vyjádření výsledků

Pokud se používá technika blokování cytokineze, slouží k hodnocení indukce vzniku mikrojader jen četnost dvoujaderných buněk s mikrojádry (nezávisle na počtu mikrojader v každé buňce). Samostatně lze podat zprávu o počítání počtu buněk s jedním, dvěma nebo více mikrojádry, které by mohlo poskytnout užitečné informace, ale není povinné.

Souběžně by se mělo provádět měření cytotoxicity a/nebo cytostáze u všech ošetřených kultur a kultur v negativních a pozitivních kontrolách (16). Při použití metody s blokováním cytokineze by se měly vypočítat hodnoty CBPI nebo RI u všech ošetřených a kontrolních kultur jako ukazatele zpoždění buněčného cyklu. V případě nepřítomnosti cytoB by se měly použít hodnoty RPD nebo RICC (viz dodatek 2).

Měly by se uvést údaje za jednotlivé kultury. Kromě toho se všechny údaje shrnou do tabulky.

Kritéria přijatelnosti

Přijetí zkoušky je založeno na následujících kritériích:

— souběžná negativní kontrola je považována za přijatelnou pro přidání do historické databáze negativních kontrol laboratoře, jak je popsáno v odstavci 50,

— souběžné pozitivní kontroly (viz odstavec 50) by měly vyvolat odpovědi, které jsou slučitelné s odpověďmi uvedenými v historické databázi laboratoře pozitivních kontrol, a měly by vyvolat statisticky významný nárůst v porovnání se souběžnou negativní kontrolou,

— měla by být splněna kritéria buněčné proliferace při kontrole s rozpouštědlem (odstavce 25–27),

— byly testovány všechny předepsané experimentální podmínky (viz odstavce 36–40), dokud jedna z nich nevedla k pozitivním výsledkům,

— je analyzovatelný adekvátní počet buněk a koncentrací (odstavce 44–46),

▼M7

— kritéria pro výběr nejvyšší koncentrace jsou v souladu s kritérii popsanými v odstavcích 24–31.

Hodnocení a interpretace výsledků

Za předpokladu, že všechna kritéria přijatelnosti byla splněna, lze zkoušenou chemickou látku považovat za jasně pozitivní, pokud v některém ze zkoumaných experimentálních uspořádání (viz odstavce 36–39):

— alespoň jedna ze zkušebních koncentrací vykazuje statisticky významný nárůst v porovnání se souběžnou negativní kontrolou (89),

— při hodnocení pomocí vhodného statistického trend-testu je tento nárůst alespoň za jednoho experimentálního uspořádání závislý na dávce (viz odstavec 28),

— všechny výsledky jsou mimo distribuci dosavadních údajů o negativních kontrolách (např. 95 % rozmezí distribuce dle Poissonova rozdělení; viz odstavec 52).

Jsou-li všechna tato kritéria splněna, má se za to, že zkoušená chemická látka je schopna vyvolávat poškození chromozomů a/nebo zvýšení či snížení jejich počtu v tomto zkušebním systému. Doporučení ohledně nejvhodnějších statistických metod lze též najít v literatuře (90) (91) (92).

Za předpokladu, že byla splněna všechna kritéria přijatelnosti, se zkoušená chemická látka považuje za jasně negativní, pokud za všech zkoumaných zkušebních podmínek (viz odstavce 36–39):

— žádná ze zkušebních koncentrací nevykazuje statisticky významný nárůst v porovnání se souběžnou negativní kontrolou,

— hodnocení pomocí vhodné zkoušky trendu ukáže, že nedochází k nárůstu v závislosti na koncentraci,

— všechny výsledky spadají do rámce distribuce dosavadních údajů o negativních kontrolách (např. 95 % kontrolních limitů dle Poissonova rozdělení; viz odstavec 52).

Pak se má za to, že zkoušená chemická látka není schopna vyvolávat poškození chromozomů a/nebo zvýšení či snížení počtu chromozomů v tomto zkušebním systému. Doporučení ohledně nejvhodnějších statistických metod lze též najít v literatuře (90) (91) (92).

Ověření jasně pozitivní či jasně negativní odpovědi se nepožaduje.

V případě, že odpověď není ani jasně negativní, ani jasně pozitivní, jak je popsáno výše, nebo s cílem napomoci při stanovení biologického významu výsledku by měly být údaje vyhodnoceny na základě odborného posouzení a/nebo dalším šetřením. Užitečné by mohlo být hodnocení dalších buněk (je-li vhodné) nebo provedení opakovaného experimentu, případně za použití upravených zkušebních podmínek (např. rozsah koncentrací, jiné podmínky metabolické aktivace (např. koncentrace S9 nebo původ S9)).

V ojedinělých případech dokonce ani po dalším šetření nebude možné na základě daného souboru údajů dospět k závěru o pozitivitě či negativitě výsledku, a bude proto učiněn závěr, že výsledek je neurčitý.

Chemické látky, které vyvolávají vznik mikrojader při zkoušce MNvit, mají tento účinek proto, že vyvolávají poškození chromozomů, ztrátu chromozomů nebo kombinaci obou těchto dějů. Při určování, zda je mechanismus vyvolání tvorby mikrojader důsledkem klastogenního a/nebo aneugenního působení, lze uplatnit další analýzy za použití protilátek proti kinetochorům, sond *in situ* se specifickou vazbou na centromery nebo jiných metod.

▼M7

Závěrečná zpráva

Závěrečná zpráva by měla obsahovat následující informace:

Zkoušená chemická látka:

— zdroj, číslo šarže a je-li k dispozici, datum použitelnosti,

— stabilita zkoušené chemické látky samotné, je-li známa,

— reaktivita zkoušených chemických látek s rozpouštědlem/vehikulem nebo médiem pro kultivaci buněk,

— rozpustnost a stabilita zkoušené chemické látky v rozpouštědle, je-li známa,

— měření pH, případně osmolality a sraženiny v kultivačním médiu, do něhož byla přidána zkoušená chemická látka.

Jednosložková látka:

— fyzický vzhled, rozpustnost ve vodě a další důležité fyzikálně-chemické vlastnosti,

— chemická identifikace, jako např. název IUPAC nebo CAS, číslo CAS, kód SMILES nebo InChl, strukturní vzorec, čistota, případně chemická identita nečistot, je-li to prakticky proveditelné, atd.

Vícesložková látka, UVCB a směsi:

— charakterizovaná v co možná největší míře chemickou identitou (viz výše), kvantitativním výskytem a důležitými fyzikálně-chemickými vlastnostmi složek.

Rozpouštědlo:

— zdůvodnění volby rozpouštědla,

— procentuální podíl rozpouštědla v konečném kultivačním médiu.

Buňky:

— druh a zdroj použitých buněk,

— vhodnost použitého druhu buněk,

— nepřítomnost mykoplasmat v případě buněčných linií,

— u buněčných linií informace o délce buněčného cyklu nebo proliferační index,

— jsou-li použity lymfocyty, pohlaví dárců krve, věk a další důležité informace o dárci, zda byla použita plná krev nebo separované lymfocyty, použitý mitogen,

— běžné trvání buněčného cyklu (u negativní kontroly).

— případně počet pasáží v případě buněčných linií,

— metody udržování buněčných kultur v případě buněčných linií,

— modální hodnota počtu chromozomů v případě buněčných linií.

▼**M7**

Zkušební podmínky:

— totožnost látky blokující cytokinezi (např. cytoB), pokud je použita, a její koncentrace a trvání expozice buněk,

— koncentrace zkoušené chemické látky vyjádřená jako konečná koncentrace v kultivačním médiu (např. v μg nebo mg/ml nebo mM kultivačního média),

— zdůvodnění volby koncentrací a počtu kultur včetně údajů o cytotoxicitě a omezeních rozpustnosti,

— složení média, případně koncentrace CO_2, vlhkost,

— koncentrace (a/nebo objem) rozpouštědla a zkoumané chemické látky přidaných do kultivačního média,

— teplota a doba inkubace,

— trvání expozice,

— doba od expozice do odběru buněk k vyhodnocení,

— hustota buněk při naočkování média, pokud připadá v úvahu,

— typ a složení použitého systému metabolické aktivace (zdroj S9, metoda přípravy směsi S9, koncentrace nebo objem směsi S9 a S9 v konečném kultivačním médiu, kontroly jakosti S9, např. enzymatické aktivity, sterilnosti, metabolické schopnosti),

— chemické látky pro pozitivní a negativní kontrolu, konečné koncentrace, podmínky a trvání expozice a interval obnovy kultur,

— metody přípravy preparátů a použitý postup barvení,

— kritéria pro hodnocení buněk s mikrojádry (výběr analyzovatelných buněk a identifikace mikrojádra),

— počty analyzovaných buněk,

— metody měření cytotoxicity,

— jakékoli doplňkové informace týkající se cytotoxicity a použité metody,

— kritéria pro označení studií za pozitivní, negativní nebo neurčité,

— použitá metoda (metody) statistické analýzy,

— tam, kde je to vhodné, je nutno uvést rovněž metody (například využití protilátek proti kinetochorům nebo pan-centrometrických DNA-sond), které slouží k určení toho, zda mikrojádra obsahují celé nebo rozlámané chromozomy,

— metody použité ke stanovení pH, osmolality a sraženiny.

Výsledky:

— vymezení buněk přijatelných pro analýzu,

— při nepřítomnosti cytoB, počet exponovaných buněk a počet odebraných buněk v každé kultuře, jestliže byly použity buněčné linie,

▼M7

— použitý způsob měření cytotoxicity, např. CBPI nebo RI v případě metody blokování cytokineze, respektive RICC nebo RPD, pokud se metody blokování cytokineze nepoužívají, popřípadě jiné poznatky (např. konfluence buněk, apoptóza, nekróza, počítání metafází, četnost dvoujaderných buněk),

— známky srážení a čas jejich stanovení,

— hodnoty pH a osmolality zkušebního média, pokud jsou zjištěny,

— rozložení jednojaderných, dvoujaderných a vícejaderných buněk, pokud se používá metoda blokování cytokineze,

— počet buněk s mikrojádry uvedený zvlášť u každé exponované a kontrolní kultury a případně určení, zda se jedná o dvoujaderné nebo jednojaderné buňky,

— závislost účinku na koncentraci, pokud je to možné,

— údaje o souběžných negativních kontrolách (rozpouštědlo) a pozitivních kontrolách (koncentrace a rozpouštědla),

— historické údaje o negativních (rozpouštědlo) a pozitivních kontrolách s rozpětími, středními hodnotami, směrodatnou odchylkou a 95 % rozmezím distribuce a rovněž počet údajů,

— statistická analýza, případné p hodnoty.

Diskuse o výsledcích.

Závěry.

LITERATURA

1) OECD (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, No. 234, OECD, Paris.

2) Kirsch-Volders, M. (1997). Towards a validation of the micronucleus test. *Mutation Research,* Vol. 392/1-2, s. 1-4.

3) Parry, J.M., A. Sors (1993). The detection and assessment of the aneugenic potential of environmental chemicals: the European Community aneuploidy project. *Mutation Research*, Vol. 287/1, s. 3-15.

4) Fenech, M., A.A. Morley (1985). Solutions to the kinetic problem in the micronucleus assay. *Cytobios,* Vol. 43/172-173, s. 233-246.

5) Kirsch-Volders, M. *et al*. (2000). Report from the *In Vitro* Micronucleus Assay Working Group. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 35/3, s. 167-172.

6) Fenech, M. (2007). Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nature Protocols,* Vol. 2/5, s. 1084-1104.

7) Fenech, M., A.A. Morley (1986). Cytokinesis-block micronucleus method in human lymphocytes: effect of *in-vivo* ageing and low dose X-irradiation. *Mutation Research,* Vol. 161/2, s. 193-198.

8) Eastmond, D.A., J.D. Tucker (1989). Identification of aneuploidy-inducing agents using cytokinesis-blocked human lymphocytes and an antikinetochore antibody. *Environmental and Molecular Mutagenesis,* Vol. 13/1, s. 34-43.

▼M7

9) Eastmond, D.A., D. Pinkel (1990). Detection of aneuploidy and aneuploidy-inducing agents in human lymphocytes using fluorescence *in-situ* hybridisation with chromosome-specific DNA probe. *Mutation Research,* Vol. 234/5, s. 9-20.

10) Miller, B.M. *et al*. (1991). Classification of micronuclei in murine erythrocytes: immunofluorescent staining using CREST antibodies compared to *in situ* hybridization with biotinylated gamma satellite DNA. *Mutagenesis,* Vol. 6/4, s. 297-302.

11) Farooqi, Z., F. Darroudi, A. T. Natarajan (1993). The use of fluorescence *in-situ* hybridisation for the detection of aneugens in cytokinesis-blocked mouse splenocytes. *Mutagenesis,* Vol. 8/4, s. 329-334.

12) Migliore, L. *et al*. (1993). Cytogenetic damage induced in human lymphocytes by four vanadium compounds and micronucleus analysis by fluorescence *in situ* hybridization with a centromeric probe. *Mutation Research,* Vol. 319/3, s. 205-213.

13) Norppa, H., L. Renzi, C. Lindholm (1993). Detection of whole chromosomes in micronuclei of cytokinesis-blocked human lymphocytes by antikinetochore staining and *in situ* hybridization. *Mutagenesis,* Vol. 8/6, s. 519-525.

14) Eastmond, D.A, D.S. Rupa, L.S. Hasegawa (1994). Detection of hyperdiploidy and chromosome breakage in interphase human lymphocytes following exposure to the benzene metabolite hydroquinone using multicolor fluorescence *in situ* hybridization with DNA probes. *Mutation Research,* Vol. 322/1, s. 9-20.

15) Marshall, R.R. *et al*. (1996). Fluorescence *in situ* hybridisation (FISH) with chromosome-specific centromeric probes: a sensitive method to detect aneuploidy. *Mutation Research,* Vol. 372/2, s. 233-245.

16) Zijno, P. *et al*. (1996). Analysis of chromosome segregation by means of fluorescence *in situ* hybridization: application to cytokinesis-blocked human lymphocytes. *Mutation Research,* Vol. 372/2, 211-219.

17) Kirsch-Volders *et al*. (2003). Report from the *in vitro* micronucleus assay working group. *Mutation Research,* Vol. 540/2, s. 153-163.

18) Kapitola B.10 této přílohy: *Zkouška na chromozomové aberace u savců in vitro.*

19) Lorge, E. *et al*. (2006). SFTG International collaborative Study on *in vitro* micronucleus test. I. General conditions and overall conclusions of the study. *Mutation Research,* Vol. 607/1, s. 13-36.

20) Clare, G. *et al*. (2006). SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test. II. Using human lymphocytes. *Mutation Research,* Vol. 607/1, s. 37-60.

21) Aardema, M.J. *et al*. (2006). SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test, III. Using CHO cells. *Mutation Research,* Vol. 607/1, s. 61-87.

22) Wakata, A. *et al*. (2006). SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test, IV. Using CHO/IU cells. *Mutation Research,* Vol. 607/1, s. 88-124.

23) Oliver, J. *et al*. (2006). SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test, V. Using L5178Y cells. *Mutation Research,* Vol. 607/1, s. 125-152.

24) Albertini, S. *et al*. (1997). Detailed data on *in vitro* MNT and *in vitro* CA: industrial experience. *Mutation Research,* Vol. 392/1-2, s. 187-208.

25) Miller, B. *et al*. (1997). Comparative evaluation of the *in vitro* micronucleus test and the *in vitro* chromosome aberration test: industrial experience. *Mutation Research,* Vol. 392/1-2, s. 45-59.

▼**M7**

26) Miller, B. *et al*. (1998). Evaluation of the *in vitro* micronucleus test as an alternative to the *in vitro* chromosomal aberration assay: position of the GUM Working Group on the *in vitro* micronucleus test. Gesellschaft fur Umwelt-Mutations-forschung, *Mutation Research,* Vol. 410, s. 81-116.

27) Kalweit, S. *et al*. (1999). Chemically induced micronucleus formation in V79 cells – comparison of three different test approaches. *Mutation Research,* Vol. 439/2, s. 183-190.

28) Kersten, B. *et al*. (1999). The application of the micronucleus test in Chinese hamster V79 cells to detect drug-induced photogenotoxicity. *Mutation Research,* Vol. 445/1, s. 55-71.

29) von der Hude, W. *et al*. (2000). *In vitro* micronucleus assay with Chinese hamster V79 cells – results of a collaborative study with *in situ* exposure to 26 chemical substances. *Mutation Res*earch, Vol. 468/2, s. 137-163.

30) Garriott, M.L., J.B. Phelps, W.P. Hoffman (2002). A protocol for the *in vitro* micronucleus test, I. Contributions to the development of a protocol suitable for regulatory submissions from an examination of 16 chemicals with different mechanisms of action and different levels of activity. *Mutation Research,* Vol. 517/1-2, s. 123-134.

31) Matsushima, T. *et al*. (1999). Validation study of the *in vitro* micronucleus test in a Chinese hamster lung cell line (CHL/IU). *Mutagenesis,* Vol. 14/6, s. 569-580.

32) Elhajouji, A., E. Lorge (2006). Special Issue: SFTG International collaborative study on *in vitro* micronucleus test. *Mutation Research,* Vol. 607/1, s. 1-152.

33) Kirkland, D. (2010). Evaluation of different cytotoxic and cytostatic measures for the *in vitro*micronucleus test (MNVit): Introduction to the collaborative trial. *Mutation Res*earch, Vol. 702/2, s. 139-147.

34) Hashimoto K. *et al*. (2011). Comparison of four different treatment conditions of extended exposure in the *in vitro* micronucleus assay using TK6 lymphoblastoid cells. *Regulatory Toxicology and Pharmacol*ogy, Vol. 59/1, s. 28-36.

35) Honma, M., M. Hayashi (2011). Comparison of *in vitro* micronucleus and gene mutation assay results for p53-competent versus p53-deficient human lymphoblastoid cells. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 52/5, s. 373-384.

36) Zhang, L.S. *et al*. (1995). A comparative study of TK6 human lymphoblastoid and L5178Y mouse lymphoma cell lines in the *in vitro* micronucleus test. *Mutation Research Letters,* Vol. 347/3-4, s. 105-115.

37) ECVAM (2006). Statement by the European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM) Scientific Advisory Committee (ESAC) on the scientific validity of the *in vitro* micronucleus test as an alternative to the *in vitro* chromosome aberration assay for genotoxicity testing. ESAC 25th meeting, 16-17 November 2006. Dostudné na: http://ecvam.jrc.it/index.htm.

38) ESAC (2006). ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC) Peer Review, Retrospective Validation of the *In Vitro* Micronucleus Test, Summary and Conclusions of the Peer Review Panel. Dostupné na: http://ecvam.jrc.it/index.htm.

39) Corvi, R. *et al*. (2008). ECVAM Retrospective Validation of *in vitro* Micronucleus Test (MNT). *Mutagenesis,* Vol 23/4, s. 271-283.

40) ILSI paper (draft). Lorge, E., M.M. Moore, J. Clements, M. O'Donovan, M. Honma, A. Kohara, J. van Benthem, S. Galloway, M.J. Armstrong, A. Sutter, V. Thybaud, B. Gollapudi, M. Aardema, J. Young-Tannir. Standardized Cell Sources and Recommendations for Good Cell Culture Practices in Genotoxicity Testing. *Mutation Research.*

▼**M7**

41) Scott, D. *et al*. (1991). International Commission for Protection Against Environmental Mutagens and Carcinogens, Genotoxicity under extreme culture conditions. A report from ICPEMC Task Group 9. *Mutation Research,* Vol. 257/2, s. 147-205.

42) Morita, T. *et al*. (1992). Clastogenicity of low pH to various cultured mammalian cells. *Mutation Research,* Vol. 268/2, s. 297-305.

43) Brusick, D. (1986). Genotoxic effects in cultured mammalian cells produced by low pH treatment conditions and increased ion concentrations. *Environmental Mutagenesis*, Vol. 8/6, s. 789-886.

44) Long, L.H. *et al*. (2007). Different cytotoxic and clastogenic effects of epigallocatechin gallate in various cell-culture media due to variable rates of its oxidation in the culture medium. *Mutation Research,* Vol. 634/1-2, s. 177-183.

45) Nesslany, F. *et al*. (2008). Characterization of the Genotoxicity of Nitrilotriacetic Acid. *Environmental and Molecular Mutation.*, Vol. 49, s. 439-452.

46) Fenech, M., A.A. Morley (1985). Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutation Research,* Vol. 147/1-2, s. 29-36.

47) Fenech, M. (1997). The advantages and disadvantages of cytokinesis-blood micronucleus method. *Mutation Research,* Vol. 392, s. 11-18.

48) Payne, C.M. *et al*. (2010). Hydrophobic bile acid-induced micronuclei formation, mitotic perturbations, and decreases in spindle checkpoint proteins: relevance to genomic instability in colon carcinogenesis. *Nutrition and Cancer*, Vol. 62/6, s. 825-840.

49) Bazin, E. *et al*. (2010). Genotoxicity of a Freshwater Cyanotoxin,Cylindrospermopsin, in Two Human Cell Lines: Caco-2 and HepaRG. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 51/3, s. 251-259.

50) Le Hegarat, L. *et al*. (2010). Assessment of the genotoxic potential of indirect chemical mutagens in HepaRG cellsby the comet and the cytokinesis-block micronucleus assays. *Mutagenesis*, Vol. 25/6, s. 555-560.

51) Josse, R. *et al*. (2012). An adaptation of the human HepaRG cells to the *in vitro* micronucleus assay. *Mutagenesis*, Vol. 27/3, s. 295-304.

52) Ehrlich, V. *et al*. (2002). Fumonisin B_1 is genotoxic in human derived hepatoma (HepG2) cells. *Mutagenesis,* Vol. 17/3, s. 257-260.

53) Knasmüller, S. *et al*. (2004). Use of human-derived liver cell lines for the detection of environmental and dietary genotoxicants; current state of knowledge. *Toxicology,* Vol. 198/1-3, s. 315-328.

54) Gibson, D.P. *et al*. (1997). Induction of micronuclei in Syrian hamster embryo cells: comparison to results in the SHE cell transformation assay for National Toxicology Program test chemicals. *Mutation Research,* Vol. 392/1-2, s. 61-70.

55) Bonassi, S. *et al*. (2001). Human MicroNucleus Project: international database comparison for results with the cytokinesis-block micronucleus assay in human lymphocytes, I. Effect of laboratory protocol, scoring criteria and host factors on the frequency of micronuclei. *Environmental and Molecular Mutagenesis,* Vol. 37/1, s. 31-45.

56) Maron, D.M., B.N. Ames (1983). Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutation Research,* Vol. 113/3-4, s. 173-215.

57) Ong, T.-m. *et al*. (1980). Differential effects of cytochrome P450-inducers on promutagen activation capabilities and enzymatic activities of S-9 from rat liver. *Journal of Environmental Pathology and Toxicology,* Vol. 4/1, s. 55-65.

▼**M7**

58) Elliott, B.M. *et al*. (1992). Alternatives to Aroclor 1254-induced S9 in *in-vitro* genotoxicity assays. *Mutagenesis,* Vol. 7, s. 175-177.

59) Matsushima, T. *et al*. (1976). „A safe substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems“, in *In Vitro* Metabolic Activation in Mutagenesis Testing. de Serres, F.J. *et al*. (eds), Elsevier, North-Holland, s. 85-88.

60) Johnson, T.E., D. R. Umbenhauer, S.M. Galloway (1996). Human liver S-9 metabolic activation: proficiency in cytogenetic assays and comparison with phenobarbital/beta-naphthoflavone or Aroclor 1254 induced rat S-9. *Environmental and Molecular Mutagenesis,* Vol. 28, s. 51-59.

61) UNEP (2001). Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants, United Nations Environment Programme (UNEP). Dostupné na: http://www.pops.int/

62) Tucker, J.D., M.L. Christensen (1987). Effects of anticoagulants upon sister-chromatid exchanges, cell-cycle kinetics, and mitotic index in human peripheral lymphocytes. *Mutation Research*, Vol.190/3, s. 225-8.

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

64) Zamora, P.O. *et al*. (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*, Vol. 5/6, s. 795-801.

65) Asakura, M. *et al*. (2008). An improved system for exposure of cultured mammalian cells to gaseous compounds in the chromosomal aberration assay. *Mutation Research*, Vol. 652/2, s. 122-130.

66) Fenech, M. (1993). The cytokinesis-block micronucleus technique: a detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations. *Mutation Research,* Vol. 285/1, s. 35-44.

67) Phelps, J.B., M.L. Garriott, W.P. Hoffman (2002). A protocol for the *in vitro* micronucleus test. II. Contributions to the validation of a protocol suitable for regulatory submissions from an examination of 10 chemicals with different mechanisms of action and different levels of activity. *Mutation Research,* Vol. 521/1-2, s. 103-112.

68) Kirsch-Volders, M. *et al*. (2004). Corrigendum to „Report from the *in vitro* micronucleus assay working group“. *Mutation Research,* 564, 97-100.

69) Lorge, E. *et al*. (2008). Comparison of different methods for an accurate assessment of cytotoxicity in the *in vitro* micronucleus test. I. Theoretical aspects. *Mutation Research,* Vol. 655/1-2, s. 1-3.

70) Surralles, J. *et al*. (1995). Induction of micronuclei by five pyrethroid insecticides in whole-blood and isolated human lymphocyte cultures. *Mutation Research,* Vol. 341/3, s. 169-184.

71) Honma, M. (2011). Cytotoxicity measurement in *in vitro* chromosome aberration test and micronucleus test. *Mutation Research*, Vol. 724, s. 86-87.

72) Pfuhler, S. *et al*. (2011). *In vitro* genotoxicity test approaches with better predictivity: Summary of an IWGT workshop. *Mutation Research*, Vol. 723/2, s. 101-107.

73) OECD (2014). Document supporting the WNT decision to implement revised criteria for the selection of the top concentration in the *in vitro* mammalian cell assays on genotoxicity (Test Guidelines 473, 476 and 487). ENV/JM/TG(2014)17. K dispozici na vyžádání.

▼**M7**

74) Morita T., M. Honma, K. Morikawa (2012). Effect of reducing the top concentration used in the *in vitro* chromosomal aberration test in CHL cells on the evaluation of industrial chemical genotoxicity. *Mutation Research*, Vol. 741, s. 32-56.

75) Brookmire L., J.J. Chen, D.D. Levy (2013). Evaluation of the Highest Concentrations Used in the *in vitro* Chromosome Aberrations Assay. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 54/1, s. 36-43.

76) EPA, Office of Chemical Safety and Pollution Prevention (2011). Chemical Substances of Unknown or Variable Composition, Complex Reaction Products and Biological Materials: UVCB Substances. http://www.epa.gov/opptintr/newchems/pubs/uvcb.txt.

77) Sobol, Z. *et al*. (2012). Development and validation of an *in vitro* micronucleus assay platform in TK6 cells. *Mutation Research, Vol.*746/1, s. 29-34.

78) Hayashi, M., T. Sofuni, M. Jr. Ishidate (1983). An Application of Acridine Orange Fluorescent Staining to the Micronucleus Test. *Mutation Research,* Vol. 120/4, s. 241-247.

79) MacGregor, J. T., C.M. Wehr, R.G. Langlois (1983). A Simple Fluorescent Staining Procedure for Micronuclei and RNA in Erythrocytes Using Hoechst 33258 and Pyronin Y. *Mutation Research,* Vol. 120/4, s. 269-275.

80) Bryce, S.M. *et al*. (2011). Miniaturized flow cytometry-based CHO-K1 micronucleus assay discriminates aneugenic and clastogenic modes of action. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 52/4, s. 280-286.

81) Nicolette, J. *et al*. (2011). *in vitro* micronucleus screening of pharmaceutical candidates by flow cytometry in Chinese hamster V79 cells. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 52/5, s. 355-362.

82) Shi, J., R. Bezabhie, A. Szkudlinska (2010). Further evaluation of a flow cytometric *in vitro* micronucleus assay in CHO-K1 cells: a reliable platform that detects micronuclei and discriminates apoptotic bodies. *Mutagenesis*, Vol. 25/1, s. 33-40.

83) OECD (2014). Statistical analysis supporting the revision of the genotoxicity Test Guidelines. OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on testing and assessment, No.198, OECD Publishing, Paris.

84) Fenech, M. *et al*. (2003). HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutation Research,* Vol. 534/1-2, s. 65-75.

85) Elhajouji, A., M. Cunha, M. Kirsch-Volders (1998). Spindle poisons can induce polyploidy by mitotic slippage and micronucleate mononucleates in the cytokinesis-block assay. *Mutagenesis*, Vol. 13/2, s. 193-8.

86) Kirsch-Volders, M. *et al*. (2011). The *in vitro* MN assay in 2011: origin and fate, biological significance, protocols, high throughput methodologies and toxicological relevance. *Archives of Toxicology,* Vol. 85/8, s. 873-99.

87) Hayashi, M. *et al*. (2010). Compilation and use of genetic toxicity historical control Data. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol.723/2, s. 87-90.

88) Ryan, T. P. (2000). *Statistical Methods for Quality Improvement*. 2nd ed., John Wiley and Sons, New York.

89) Hoffman, W.P., M.L. Garriott, C. Lee (2003). „*In vitro* micronucleus test“, in *Encyclopedia of Biopharmaceutical Statistics*, 2nd ed. Chow, S. (ed.), Marcel Dekker, Inc. New York, s. 463-467.

90) Fleiss, J. L., B. Levin, M.C. Paik (2003). Statistical Methods for Rates and Proportions, 3rd ed. John Wiley & Sons, New York.

91) Galloway, S.M. *et al*. (1987). Chromosome aberration and sister chromatid exchanges in Chinese hamster ovary cells: Evaluation of 108 chemicals. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 10/suppl. 10, s. 1-175.

▼**M7**

92) Richardson, C. *et al*. (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.

93) International Conference on Harmonisation (ICH) Guidance S2 (R1) on Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended For Human Use.

▼M7

Dodatek 1

DEFINICE

Aneugen: jakákoli chemická látka nebo proces, který v interakci se složkami mechanismu mitotického a meiotického cyklu buněčného dělení vede k aneuploidii v buňkách nebo organismech.

Aneuploidie: jakákoli odchylka od normálního diploidního (nebo haploidního) počtu chromozomů o jeden nebo více chromozomů, avšak nikoli o celou sadu (nebo více sad) chromozomů (polyploidie).

Apoptóza: programovaná buněčná smrt, která se vyznačuje řadou kroků vedoucích k rozpadu buněk na membránově vázané části, které jsou poté odstraněny fagocytózou nebo rozkladem.

Buněčná proliferace: zvyšování počtu buněk v důsledku jejich mitotického dělení.

Centromera: oblast DNA v chromozomu, kde se stýkají obě chromatidy a k níž jsou bok po boku připojeny oba kinetochory.

Chemická látka: chemická substance nebo směs.

Koncentrace: odkazuje na konečné koncentrace zkoušené chemické látky v kultivačním médiu.

Klastogen: jakákoli chemická látka nebo děj, který způsobuje strukturní chromozomové aberace v populacích buněk nebo eukaryotických organismů.

Cytokineze: proces rozdělení buňky ihned po mitóze, čímž vzniknou dvě dceřiné buňky, z nichž každá obsahuje jedno jádro.

Proliferační index při blokování cytokineze (CBPI): podíl počtu buněk z druhého dělení v ošetřené populaci k jejich počtu v neošetřené kontrole (příslušný vzorec viz dodatek 2).

Cytostáze: inhibice růstu buněk (příslušný vzorec viz dodatek 2).

Cytotoxicita: u zkoušek prováděných podle této zkušební metody za přítomnosti cytochalasinu B se cytotoxicita vyjadřuje jako snížení proliferačního indexu při blokování cytokineze (CBPI) nebo replikačního indexu (RI) exponovaných buněk v porovnání s negativní kontrolou (viz odstavec 26 a dodatek 2).

U zkoušek prováděných podle této zkušební metody prováděných za nepřítomnosti cytochalasinu B se cytotoxicita vyjadřuje jako snížení relativního zdvojnásobení populace (RPD) nebo relativního nárůstu počtu buněk (RICC) exponovaných buněk v porovnání s negativní kontrolou (viz odstavec 27 a dodatek 2).

Genotoxický: obecný termín zahrnující všechny typy poškození DNA nebo chromozomů včetně jejich rozlámání, delecí, aduktů, modifikací a propojení nukleotidů, přestavby, genových mutací, chromozomových aberací a aneuploidie. Ne všechny druhy genotoxických účinků způsobují mutace nebo stálé poškození chromozomů.

Interfázní buňky: buňky, které se nenacházejí ve stádiu mitózy.

Kinetochor: struktura obsahující proteiny, jež se vytváří u centromery chromozomu, na kterou se při dělení buněk napojují vlákna dělicího vřeténka, což umožňuje správný pohyb dceřiných chromozomů k pólům dceřiných buněk.

▼M7

Mikrojádra: malá jádra existující odděleně od hlavních jader a vedle nich, vytvářená během telofáze mitózy (meiózy) nereplikujícími se (lagging) chromozomovými fragmenty nebo celými chromozomy.

Mitóza: proces dělení buněčného jádra, který se obvykle člení na profázi, prometafázi, metafázi, anafázi a telofázi.

Mitotický index: poměr buněk v metafázi vydělený celkovým počtem buněk zjištěných v populaci buněk; udává stupeň buněčné proliferace této populace.

Mutagenní: produkující dědičné změny sekvence (sekvencí) párů bází DNA v genech nebo struktury chromozomů (chromozomové aberace).

Nondisjunkce: děj, při kterém se párové chromatidy nerozloučí a správně nerozdělí do vznikajících dceřiných buněk, což vede ke vzniku dceřiných buněk s abnormálními počty chromozomů.

Stav p53: protein p53 se podílí na regulaci buněčného cyklu, apoptóze a reparaci DNA. Buňky, jež mají nedostatek funkčního proteinu p53, nejsou schopny zastavovat buněčný cyklus nebo odstraňovat poškozené buňky prostřednictvím apoptózy nebo jiných mechanismů (např. indukcí reparace DNA) souvisejících s funkcemi p53 v reakci na poškození DNA, by teoreticky měly být náchylnější ke genové mutaci nebo chromozómovým aberacím.

Polyploidie: numerické chromozomální aberace v buňkách nebo organismech, které se týkají celé sady (celých sad) chromozomů, na rozdíl od jednoho chromozomu nebo jednotlivých chromozomů (aneuploidie).

Proliferační index (PI): metoda pro měření cytotoxicity bez použití cytoB (příslušný vzorec viz dodatek 2).

Relativní nárůst počtu buněk (RICC): metoda pro měření cytotoxicity bez použití cytoB (příslušný vzorec viz dodatek 2).

Relativní zdvojnásobení populace (RPD): metoda pro měření cytotoxicity bez použití cytoB (příslušný vzorec viz dodatek 2).

Replikační index (RI): odíl počtu dokončených cyklů buněčného dělení v ošetřené kultuře v porovnání s jejich počtem v neošetřené kontrole během expoziční doby a obnovy kultury (příslušný vzorec viz dodatek 2).

S9 jaterní frakce: supernatant homogenátu jater po odstředění při 9 000 g, tj. surový jaterní extrakt.

Směs S9: směs S9 jaterní frakce a kofaktorů nezbytných pro metabolickou aktivaci enzymů.

Kontrola s rozpouštědlem: obecný termín k označení kontrolních kultur, ke kterým se přidává pouze rozpouštědlo používané k rozpuštění zkoušené chemické látky.

Zkoušená chemická látka: jakákoli chemická substance nebo směs, která se zkouší za použití této zkušební metody.

Neexponovaná/neošetřená kontrola: kultury, které se neexponují (tj. ani chemické látce, ani rozpouštědlu), ale zpracovávají se souběžně stejným způsobem jako kultury, k nimž se se přidává zkoušená chemická látka.

▼M7

Dodatek 2

VZORCE PRO HODNOCENÍ CYTOTOXICITY

Při použití cytoB by mělo být hodnocení cytotoxicity založeno na **proliferačním indexu při blokování cytokineze (CBPI)** nebo na **replikačním indexu (RI)** (17) (69). Hodnota CBPI udává průměrný počet jader na buňku a lze ji použít k výpočtu proliferace buněk. Hodnota RI udává relativní počet buněčných cyklů na buňku v době jejího vystavení cytochalasinu B v ošetřených kulturách ve srovnání s kontrolními kulturami a lze ji použít k výpočtu procenta cytostáze:

$$\% \text{ cytostáze} = 100 - 100\{(\text{CBPI}_T - 1) \div (\text{CBPI}_C - 1)\}$$

přičemž:

T = kultura ošetřená zkoušenou látkou

C = kontrolní kultura

kde:

$$\text{CBPI} = \frac{((\text{poč.jednojader.buněk}) + (2 \times \text{poč.dvoujader.buněk}) + (3 \times \text{poč.vícejader.buněk}))}{(\text{celkový počet buněk})}$$

Hodnota CBPI = 1 (všechny buňky jsou jednojaderné) tedy odpovídá 100 % cytostázi.

Cytostáze = 100 – RI

$$\text{RI} = \frac{((\text{poč.dvoujaderných buněk}) + (2 \times \text{poč.vícejaderných buněk}))/(\text{celkový počet buněk})_T}{((\text{poč.dvoujaderných buněk}) + (2 \times \text{poč.vícejaderných buněk}))/(\text{celkový počet buněk})_C} \times 100$$

T = ošetřené kultury

C = kontrolní kultury

Hodnota RI = 53 % tedy znamená, že v porovnání s počtem buněk, z nichž v kontrolní kultuře vznikly rozdělením dvoujaderné a vícejaderné buňky, se v ošetřené kultuře rozdělilo pouze 53 % tohoto počtu, což znamená 47 % cytostázi.

Když se cytoB nepoužije, doporučuje se hodnotit cytotoxicitu na základě **relativního nárůstu počtu buněk (RICC)** nebo **relativního zdvojnásobení populace (RPD)** (69), jelikož oba tyto ukazatele zohledňují poměr buněčné populace, která se rozdělila.

$$\textbf{RICC}(\%) = \frac{(\text{Nárůst počtu buněk vexponovaných kulturách}(\text{konečný-počáteční}))}{(\text{Nárůst počtu buněk vkontrolních kulturách}(\text{konečný-počáteční}))} \times 100$$

$$\textbf{RPD}(\%) = \frac{(\text{Počet zdvojnásobení populace vexponovaných kulturách})}{(\text{Počet zdvojnásobení populace vkontrolních kulturách})} \times 100$$

kde:

Zdvojnásobení populace = [log (počet buněk po ošetření ÷ počáteční počet buněk)] ÷ log 2

Hodnota RICC nebo RPD ve výši 53 % tedy znamená 47 % cytotoxicitu/cytostázi.

▼**M7**

Za použití **indexu proliferace (PI)** lze posoudit cytotoxicitu spočítáním klonů tvořených 1 buňkou (cl1), 2 buňkami (cl2), 3 až 4 buňkami (cl4) a 5 až 8 buňkami (cl8).

$$\mathrm{PI} = \frac{((1 \times \mathrm{cl1}) + (2 \times \mathrm{cl2}) + (3 \times \mathrm{cl4}) + (4 \times \mathrm{cl8}))}{(\mathrm{cl1} + \mathrm{cl2} + \mathrm{cl4} + \mathrm{cl8})}$$

Hodnota PI se používá jako cenný a spolehlivý parametr cytotoxicity i pro buněčné linie kultivované *in vitro* bez přítomnosti cytoB (35) (36) (37) (38) a lze ji považovat za užitečný doplňkový parametr.

V každém případě by počet buněk před expozicí měl být v exponované kultuře a v negativní kontrolní kultuře stejný.

V minulosti byl jako parametr cytotoxicity užíván RCC (tj. počet buněk v exponovaných kulturách / počet buněk v kontrolních kulturách), nyní se již nedoporučuje, protože může cytotoxicitu podhodnotit.

Při použití automatizovaných systémů hodnocení, například průtokové cytometrie, laserové skenovací cytometrie nebo analýzy obrazu, lze počet buněk ve vzorci nahradit počtem jader.

V negativních kontrolních kulturách by zdvojnásobení populace nebo replikační index měly být slučitelné s požadavkem na odběr buněčných vzorků po expozici v čase odpovídajícím přibližně 1,5–2násobku normální délky buněčného cyklu.

▼M3

B.50 SENZIBILIZACE KŮŽE: ZKOUŠKA S VYŠETŘENÍM LOKÁLNÍCH LYMFATICKÝCH UZLIN: DA

ÚVOD

1. Metodiky OECD pro testování chemických látek a zkušební metody EU jsou pravidelně přezkoumávány s ohledem na vědecký pokrok, změny regulačních potřeb a dobré životní podmínky zvířat. První zkušební metoda (ZM) (kapitola B.42 této přílohy) pro stanovení senzibilizace kůže u myší, tzv. zkouška s vyšetřením lokálních lymfatických uzlin (LLNA; zkušební metodika OECD č. 429) byla revidována (1). Podrobnosti o validaci metody LLNA a přehled souvisejících prací byly publikovány (2)(3) (4) (5) (6) (7) (8) (9). V rámci metody LLNA se k měření proliferace lymfocytů využívají radioizotopy thymidinu nebo jódu, a proto má tato zkouška omezené použití, pokud získání, používání nebo likvidace radioaktivních látek představují problém. Metoda LLNA: DA (kterou vyvinula firma Daicel Chemical Industries, Ltd.) je neradioaktivní modifikací metody LLNA, která kvantifikuje obsah adenosintrifosfátu (ATP) prostřednictvím bioluminiscence, jež slouží jako indikátor proliferace lymfocytů. Zkušební metoda LLNA: DA byla ověřena, přezkoumána a doporučena mezinárodní komisí pro vzájemné hodnocení jakožto metoda, která je s určitými omezeními považována za užitečnou pro identifikaci chemických látek způsobujících nebo naopak nezpůsobujících senzibilizaci kůže (10) (11) (12) (13). Tato ZM je určena k hodnocení potenciálu chemikálií (látek a směsí) způsobovat senzibilizaci kůže u zvířat. Zkušební metoda podle kapitoly B.6 této přílohy a zkušební metodiky OECD č. 406 využívá zkoušek na morčatech, a to zvláště maximalizační zkoušku na morčatech a Bühlerův test (14). Zkušební metoda LLNA (podle kapitoly B.42 této přílohy a zkušební metodiky OECD č. 429 a její dvě neradioaktivní modifikace, metoda LLNA DA (podle kapitoly B.50 této přílohy a zkušební metodiky OECD č. 442 A) a metoda LLNA: BrdU-ELISA (podle kapitoly B.51 této přílohy a zkušební metodiky OECD č. 442 B) poskytují výhody ve srovnání se zkouškami na morčatech podle kapitoly B.6 a zkušební metodiky OECD č. 406 (14), pokud jde o snížení počtu využívaných zvířat a zdokonalení způsobu jejich využívání.

2. Podobně jako metoda LLNA i metoda LLNA: DA zkoumá indukční fázi senzibilizace kůže a poskytuje kvantitativní údaje, které jsou vhodné pro hodnocení závislosti odezvy na dávce. Schopnost detekovat látky senzibilizující kůži bez nutnosti použití radioizotopů pro značení DNA navíc odstraňuje možnost expozice radioaktivitě při práci a problémy s likvidací odpadů. To zase může umožnit zvýšené využívání myší k detekování látek senzibilizujících kůži, což by mohlo dále snížit využívání morčat k testování potenciálu chemických látek způsobovat senzibilizaci kůže (tzn. metodou podle kapitoly B.6 a zkušební metodiky OECD č. 406 (14).

DEFINICE

3. Použité definice jsou uvedeny v dodatku 1.

VÝCHOZÍ ÚVAHY A OMEZENÍ

4. Zkušební metoda LLNA: DA je modifikovanou metodou LLNA, která s určitými omezeními slouží k identifikaci chemických látek, jež mohou způsobovat senzibilizaci kůže. To však nutně neznamená, že by se metoda LLNA: DA měla používat ve všech případech namísto metody LLNA nebo namísto zkoušek na morčatech (tzn. podle kapitoly B.6 této přílohy a zkušební metodiky OECD č. 406 (14); znamená to spíše, že tato metoda má stejnou hodnotu a že ji lze použít jako alternativní metodu, jejíž pozitivní ani negativní výsledky obvykle již nevyžadují žádné další potvrzování (10) (11). Zkušební laboratoř by měla před provedením studie zohlednit

▼M3

všechny dostupné informace o zkoušené látce. Mezi tyto informace patří totožnost a chemická struktura zkoušené látky, její fyzikálně-chemické vlastnosti, výsledky jakýchkoli jiných zkoušek toxicity *in vitro* a *in vivo* za použití zkoušené látky a toxikologické údaje o strukturně příbuzných látkách. Tyto informace je nutno posoudit, aby se zjistilo, zda je metoda LLNA: DA vhodná pro danou látku (s ohledem na neslučitelnost některých druhů chemických látek s metodou LLNA: DA (viz odstavec 5)), a také aby se usnadnila volba dávkování.

5. Zkušební metoda LLNA: DA je metodou *in vivo*, a tudíž neeliminuje používání zvířat při hodnocení alergického kontaktního senzibilizujícího působení. Umožňuje však omezit využívání zvířat pro tento účel ve srovnání se zkouškami na morčatech (podle kapitoly B.6 a zkušební metodiky OECD č. 406 (14). Kromě toho metoda LLNA: DA nabízí podstatné zlepšení způsobu zacházení se zvířaty (méně bolesti a utrpení), která se využívají ke zkoušení kontaktní alergické senzibilizace, jelikož na rozdíl od metody podle kapitoly B.6 a zkušební metodiky OECD č. 406 metoda LLNA: DA nevyžaduje umělé vyvolání kožní přecitlivělosti. Ale i přes výhody, které má metoda LLNA: DA ve srovnání s metodou popsanou v kapitole B.6 a zkušební metodice OECD č. 406 (14), existují určitá omezení, která si mohou vyžádat použití metody popsané v kapitole B.6 nebo zkušební metodice OECD č. 406 (např. falešně negativní výsledky při použití metody LLNA pro určité kovy, falešně pozitivní výsledky u určitých látek způsobujících podráždění kůže (jako jsou například některé chemikálie typu povrchově aktivních látek) (6) (1 a kapitola B.42 této přílohy) nebo rozpustnost zkoušené látky). Kromě toho si použití zkoušek na morčatech (tzn. podle kapitoly B.6 této přílohy nebo zkušební metodiky OECD č. 406 (14) mohou vyžádat také některé třídy chemických látek nebo látky obsahující funkční skupiny, u nichž je prokázáno, že mohou způsobovat zkreslení výsledků (16). Doporučuje se, aby se omezení zjištěná u metody LLNA (1 a kapitola B.42 této přílohy) vztahovala rovněž na metodu LLNA: DA (10). Použití metody LLNA: DA navíc nemusí být vhodné pro zkoušení látek, které ovlivňují hladiny ATP (např. látek, jež působí jako inhibitory ATP), nebo látek, které ovlivňují přesnost měření intracelulárního ATP (např. přítomnost enzymů snižujících hladinu ATP nebo přítomnost extracelulárního ATP v lymfatických uzlinách). S výjimkou těchto známých omezení by měla být metoda LLNA: DA použitelná k testování jakýchkoli látek, nejsou-li s těmito látkami spojeny vlastnosti, které mohou nepříznivě ovlivnit přesnost metody LLNA: DA. Kromě toho je třeba zvážit možnost hraničních pozitivních výsledků při získání hodnot indexu stimulace (SI) v rozmezí od 1,8 do 2,5 (viz odstavce 31 až 32). To je založeno na validační databázi 44 látek za použití hodnot SI ≥ 1,8 (viz odstavec 6), u kterých metoda LLNA: DA správně identifikovala všech 32 látek identifikovaných jako senzibilizující látky metodou LLNA, ale nesprávně identifikovala tři z 12 látek identifikovaných metodou LLNA jako nesenzibilizující látky s hodnotami SI v rozmezí od 1,8 do 2,5 (tzn. hraniční pozitivní) (10). Jelikož však byl stejný soubor údajů použit k stanovení hodnot SI a k výpočtu prediktivních vlastností zkoušky, mohou uvedené výsledky představovat nadhodnocení skutečných prediktivních vlastností této metody.

PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

6. Základní podstata metody LLNA: DA spočívá v tom, že senzibilizující látky vyvolávají proliferaci lymfocytů v lymfatických uzlinách drenujících místo aplikace zkoušené látky. Tato proliferace je úměrná dávce a potenciálu aplikovaného alergenu a představuje jednoduchý prostředek k získání kvantitativního údaje o míře senzibilizace. Proliferace se měří porovnáním průměrné proliferace u každé zkušební skupiny s průměrnou proliferací u kontrolní skupiny s vehikulem. Určí se poměr průměrné proliferace u každé z exponovaných skupin k průměrné proliferaci u souběžně testované kontrolní skupiny s vehikulem, nazývaný index stimulace (SI), přičemž jeho hodnota by měla být ≥ 1,8, aby bylo oprávněné další hodnocení zkoušené látky jako potenciálního senzibilizátoru kůže. Zde popsané postupy jsou založeny na použití měření obsahu ATP za použití bioluminescence (o níž je známo, že její intenzita je úměrná počtu živých buněk) 17) k indikaci zvýšeného počtu

▼M3

proliferujících buněk lymfatických uzlin drenujících aurikulární oblast (18) (19). Bioluminescenční metoda využívá enzym luciferázu ke katalyzaci tvorby světla z ATP a luciferin v rámci této reakce:

$$ATP + Luciferin + O_2 \xrightarrow{Luciferase} Oxyluciferin + AMP + PP_i + CO_2 + Light$$

Intenzita vyzařovaného světla je přímo úměrná koncentraci ATP a měří se pomocí luminometru. Zkouška založená na použití luciferinu a luciferázy je citlivou metodou pro určení množství ATP, která se používá k široké škále účelů (20).

POPIS ZKOUŠKY

Volba druhu zvířat

7. Vhodným druhem pro tuto zkoušku je myš. Validační studie metody LLNA: DA byly prováděny výhradně s kmenem CBA/J, který je proto považován za upřednostňovaný kmen (12) (13). Používají se mladé dospělé samice myší, které musí být nullipary a nesmějí být březí. Při zahájení studie by zvířata měla být přibližně 8 až 12 týdnů stará, přičemž odchylky v hmotnosti zvířat by měly být pouze minimální a neměly by překročit 20 % průměrné hmotnosti. Případně lze používat i jiné kmeny a samce, pokud je k dispozici dostatek údajů, které dokazují, že v rámci reakcí neexistují u metody LLNA: DA významné specifické odlišnosti mezi kmeny a/nebo pohlavími.

Podmínky chovu a krmení

8. Myši by měly být chovány ve skupinách (21), není-li předloženo dostatečné vědecké zdůvodnění, proč by měly být chovány jednotlivě. Teplota v místnosti pro pokusná zvířata by měla být 22 ± 3 °C. Ačkoli by relativní vlhkost vzduchu měla být minimálně 30 % a pokud možno by kromě doby úklidu místnosti neměla přesáhnout 70 %, cílem by měla být hodnota 50–60 %. Osvětlení by mělo být umělé se střídáním 12 hodin světla a 12 hodin tmy. Ke krmení lze používat běžnou laboratorní stravu a k pití by měly mít myši k dispozici neomezené množství vody.

Příprava zvířat

9. Zvířata se náhodně vyberou, pro usnadnění individuální identifikace se označí (nesmí se však použít žádná forma značení uší) a chovají se v klecích minimálně pět dnů před začátkem aplikování zkoušené látky, aby se mohla přizpůsobit laboratorním podmínkám. Před začátkem aplikace látky se všechna zvířata vyšetří, aby se ověřilo, že nemají žádné pozorovatelné kožní léze.

Příprava dávkovacích roztoků

10. Pevné chemické látky by se měly před nanesením na ucho myši rozpustit nebo suspendovat ve vhodných rozpouštědlech nebo vehikulech a popřípadě zředit. Kapalné látky lze aplikovat bez přísad nebo je lze před dávkováním rozpustit. Nerozpustné látky, jaké se nejčastěji používají k výrobě zdravotnických prostředků, by měly být vystaveny intenzívní extrakci ve vhodném rozpouštědle, aby se před nanesením na ucho myši odhalily všechny extrahovatelné složky, které je nutno testovat. Zkoušené látky by se měly připravovat každý den čerstvé, pokud údaje o stálosti neprokazují přijatelnost jejich skladování.

▼M3

Kontrola spolehlivosti

11. K prokázání řádné funkčnosti zkoušky slouží pozitivní kontrolní chemikálie, a to tak, že reagují s dostatečnou a reprodukovatelnou citlivostí na zkoušenou senzibilizující látku, u níž je dobře popsána síla odezvy. Zařazení souběžné pozitivní kontroly se doporučuje proto, že prokazuje způsobilost laboratoře úspěšně provést každou zkoušku a umožňuje posoudit vnitrolaboratorní a mezilaboratorní reprodukovatelnost a srovnatelnost. Některé regulační orgány také vyžadují při každé studii pozitivní kontrolu, a proto se uživatelům doporučuje před provedením zkoušky LLNA: DA příslušné orgány konzultovat. Doporučuje se tudíž běžně používat souběžnou pozitivní kontrolu, aby nebylo nutné další zkoušení na zvířatech ke splnění požadavků, které by mohly vzniknout při používání periodické pozitivní kontroly (viz odstavec 12). Pozitivní kontrola by měla v rámci metody LLNA: DA vyvolat pozitivní odezvu při úrovni expozice, u které se očekává zvýšení indexu stimulace (SI) > 1,8 ve srovnání s negativní kontrolní skupinou. Dávka pozitivní kontroly by měla být zvolena tak, aby nevyvolala nadměrné podráždění kůže nebo systémovou toxicitu a přitom aby indukce byla reprodukovatelná, avšak nikoli nadměrná (tzn. že hodnota SI > 10 by byla považována za příliš velkou). K upřednostňovaným látkám pro pozitivní kontrolu patří 25 % roztok 2-benzylidenoktanalu (reg. č. Chemical Abstracts Service (CAS) 101-86-0) nebo eugenolu (číslo CAS 97-53-0) v acetonu s olivovým olejem (v objemovém poměru 4:1). Mohou existovat určité okolnosti, za nichž lze při řádném zdůvodnění použít i jiné pozitivní kontrolní látky, které splňují výše uvedená kritéria.

12. I když se zařazení skupiny souběžných pozitivních kontrol doporučuje, mohou existovat situace, kdy může být periodické testování (tzn. v intervalech ≤ 6 měsíců) pozitivních kontrol vhodné u laboratoří, které provádějí zkoušky LLNA: DA pravidelně (tzn. nejméně jednou měsíčně) a mají k dispozici databázi dřívějších údajů pozitivních kontrol, která prokazuje schopnost laboratoře získat při použití pozitivních kontrol reprodukovatelné a přesné výsledky. Odpovídající zběhlost v používání metody LLNA: DA lze úspěšně prokázat dosažením shodných pozitivních výsledků při použití pozitivní kontroly alespoň v 10 nezávislých zkouškách provedených během přiměřené doby (tzn. během méně než jednoho roku).

13. Skupina souběžných pozitivních kontrol by se měla zařadit vždy, když dojde k procedurální změně metody LLNA: DA (např. při změně složení vyškoleného personálu, při změně materiálů a/nebo činidel či vybavení, jež se používají v rámci zkušební metody, nebo při změně zdroje pokusných zvířat), přičemž takové změny by se měly vždy zdokumentovat v laboratorních zprávách. Při určování nezbytnosti vytvořit novou databázi ke zdokumentování shodnosti výsledků pozitivních kontrol by se měl zvážit dopad těchto změn na přiměřenost dosavadní databáze.

14. Zkoušející by si měli uvědomit, že rozhodnutí používat pozitivní kontroly periodicky namísto souběžně má závažné dopady na přiměřenost a přijatelnost negativních výsledků studie získaných bez souběžných pozitivních kontrol během intervalu mezi jednotlivými periodickými použitími pozitivních kontrol. Například obdržení falešně negativního výsledku při periodickém používání pozitivních kontrol může zpochybnit negativní výsledky zkoušené látky získané v období mezi poslední přijatelnou periodickou studií pozitivních kontrol a nepřijatelnou periodickou studií pozitivních kontrol. Důsledky, jež z toho vyplývají, je třeba pečlivě zvážit při rozhodování, zda do zkoumání zařadit souběžné pozitivní kontroly, nebo používat pouze periodické pozitivní kontroly. Je také nutno vzít v úvahu možnost použít v rámci skupiny souběžných pozitivních kontrol méně zvířat, jestliže je to vědecky opodstatněné a jestliže laboratoř na základě svých vlastních dosavadních údajů prokáže, že lze používat méně myší (22).

▼M3

15. Ačkoli by se pozitivní kontroly měly zkoušet ve vehikulu, o němž je známo, že vždy vyvolává shodnou reakci (např. aceton s olivovým olejem v objemovém poměru 4:1), mohou nastat určité situace, kdy je z důvodů požadovaných v právních předpisech nezbytné provést zkoušku s použitím nestandardního vehikula (klinicky/chemicky relevantní složení) (23). Pokud se souběžná pozitivní kontrola zkouší v jiném vehikulu než zkoušená látka, měla by být součástí zkoušky se souběžnou pozitivní kontrolou také samostatná kontrola s vehikulem.

16. V případech, kdy se hodnotí látky, které patří do určité třídy chemických látek nebo vykazují určitou škálu odezev, mohou být užitečné také srovnávací látky, jelikož mohou prokázat, že zkušební metoda je schopna správně zjistit potenciál těchto druhů látek vyvolávat senzibilizaci kůže. Vhodné srovnávací látky by měly mít tyto vlastnosti:

— strukturální a funkční podobnost s třídou, do níž patří zkoušená látka,

— známé fyzikálně-chemické vlastnosti,

— podklady ze zkoušky LLNA: DA,

— podklady získané při použití jiných zvířecích modelů a/nebo lidí.

ZKUŠEBNÍ POSTUP

Počet zvířat a dávkování

17. Na každou dávkovou skupinu se použijí alespoň čtyři zvířata, přičemž se použijí minimálně tři koncentrace zkoušené látky, dále se použije souběžná negativní kontrolní skupina, k jejíž expozici se použije pouze vehikulum zkoušené látky, a pozitivní kontrola (souběžná nebo z nedávné jiné zkoušky – v závislosti na postupech dané laboratoře při zohlednění odstavců 11–15). Mělo by se zvážit zkoušení většího počtu dávek pozitivní kontroly, a to zejména v případě, že se pozitivní kontrola nepoužívá soustavně. Se zvířaty v kontrolních skupinách by se s výjimkou aplikace zkoušené látky mělo zacházet stejně jako se zvířaty v exponovaných skupinách.

18. Volba dávkování a vehikula by měla být založena na doporučeních uvedených v literatuře – (2) a (24). Po sobě jdoucí dávky se běžně vybírají z vhodné řady koncentrací, například 100 %, 50 %, 25 %, 10 %, 5 %, 2,5 %, 1 %, 0,5 % atd. Volba této řady koncentrací by měla být dostatečně vědecky zdůvodněna. Při výběru tří po sobě jdoucích koncentrací je třeba zvážit veškeré existující toxikologické informace (např. o akutní toxicitě a kožní dráždivosti) a informace o struktuře a fyzikálně-chemických vlastnostech zkoušené látky (a/nebo strukturně příbuzných látek), jsou-li k dispozici, aby nejvyšší koncentrace maximalizovala expozici, aniž by současně vyvolala systémovou toxicitu a/nebo nadměrné lokální podráždění kůže (24) (25). Nejsou-li takové informace k dispozici, může být nezbytné provést úvodní předběžnou screeningovou zkoušku (viz odstavce 21 až 24).

19. Vehikulum by nemělo nepříznivě ovlivňovat ani jinak zkreslovat výsledky zkoušky a mělo by být vybráno tak, aby se maximalizovala rozpustnost umožňující dosáhnout nejvyšší možné koncentrace a zároveň připravit roztok nebo suspenzi, jež jsou vhodné pro aplikaci zkoušené látky. K doporučeným vehikulům patří aceton s olivovým olejem (v objemovém poměru 4:1), *N,N*-dimethylformamid, ethyl(methyl)keton, propan-1,2-diol a dimethylsulfoxid (6), avšak při dostatečném vědeckém zdůvodnění lze použít i jiná vehikula. V určitých situacích může být nezbytné použít jako doplňující kontrolu klinicky relevantní rozpouštědlo nebo běžně prodejný přípravek obsahující zkoušenou látku. Zvláště je třeba dbát na to, aby byly hydrofilní látky zapracovány do takového vehikula, které zvlhčí kůži a nesteče ihned z pokožky. Toho lze dosáhnout použitím vhodných solubilizérů (jako je např. 1 % Pluronic® L92). Není tudíž vhodné používat zcela vodná vehikula.

▼M3

20. Zpracování lymfatických uzlin z jednotlivých myší umožňuje posoudit variabilitu mezi jednotlivými zvířaty a provést statistické porovnání rozdílu mezi hodnotami zkoušené látky a hodnotami naměřenými u kontrolní skupiny se samotným vehikulem (viz odstavec 33). Posoudit možnost snížit počet myší v pozitivní kontrolní skupině je kromě toho vhodné jen tehdy, když se zaznamenávají údaje od jednotlivých zvířat (22). Sběr údajů od jednotlivých zvířat navíc vyžadují i některé regulační orgány. Pravidelný sběr údajů od jednotlivých zvířat je výhodnější z hlediska dobrých životních podmínek zvířat, jelikož nevyžaduje duplicitní zkoušení, které by bylo nezbytné, pokud by výsledky pro určitou zkoušenou látku, jež byly původně shromážděny jedním způsobem (např. za použití souhrnných údajů od všech zvířat), měly být později posouzeny regulačními orgány s jinými požadavky (např. vyžadujícími použití údajů od jednotlivých zvířat).

Předběžná screeningová zkouška

21. Nejsou-li k dispozici informace pro stanovení nejvyšší dávky, která má být předmětem zkoušky (viz odstavec 18), měla by se provést předběžná screeningová zkouška umožňující vymezit vhodné dávkování, které se bude metodou LLNA: DA zkoušet. Účelem předběžné screeningové zkoušky je poskytnout vodítko pro volbu maximálního dávkování, které se má použít v hlavní studii LLNA: DA, pokud nejsou k dispozici informace o koncentraci, která vyvolává systémovou toxicitu (viz odstavec 24) a/nebo nadměrné lokální podráždění kůže (viz odstavec 23). Maximální zkoušenou dávkou by mělo být 100 % zkoušené látky v případě kapalin, respektive maximální možná koncentrace v případě pevných látek nebo suspenzí.

22. Předběžná screeningová zkouška se provádí za stejných podmínek jako hlavní studie LLNA: DA až na to, že se nehodnotí proliferace buněk z lymfatických uzlin a lze použít méně zvířat na dávkovou skupinu. Navrhuje se počet jednoho až dvou zvířat na dávkovou skupinu. Všechny myši se denně pozorují, zda nevykazují klinické příznaky systémové toxicity nebo lokálního podráždění v místě aplikace. Před zahájením zkoušky a před jejím ukončením (den 8) se zaznamenají hodnoty tělesné hmotnosti zvířat. Na obou uších každé myši se sleduje výskyt erytému, který se vyhodnotí podle tabulky 1 (25). Tloušťka ucha se změří tloušťkoměrem (např. digitálním mikrometrem nebo tloušťkoměrem s kruhovou stupnicí) v den 1 (před aplikací první dávky), v den 3 (přibl. 48 hodin po první dávce) a v den 7 (24 hodin před ukončením) a v den 8. Kromě toho lze v den 8 určit tloušťku ucha na základě stanovení hmotnosti části ucha vyseknuté speciálními kleštěmi, což by se mělo provádět až poté, co se zvířata humánně usmrtí. Známkou nadměrného lokálního podráždění je zarudnutí ohodnocené 3 nebo více body a/nebo zvýšení tloušťky ucha o 25 % nebo více v kterýkoli den měření (26) (27). Jako nejvyšší dávka se pro hlavní studii LLNA: DA zvolí nejbližší nižší dávka v rámci řady koncentrací zjištěných při předběžné screeningové zkoušce (viz odstavec 18), která nevyvolává systémovou toxicitu a/nebo nadměrné lokální podráždění kůže.

Tabulka 1

Bodové hodnocení erytému

Pozorované příznaky	Bodové ohodnocení
Žádný erytém	0
Velmi slabý erytém (sotva patrný)	1
Zřetelně viditelný erytém	2

▼M3

Pozorované příznaky	Bodové ohodnocení
Mírný až výrazný erytém	3
Těžký erytém (silné zarudnutí) nebo tvorba příškvaru znemožňující posouzení erytému	4

23. Kromě 25 % zvýšení tloušťky ucha (26) (27) se k identifikaci dráždivých látek při zkoušce LLNA používá také statisticky významné zvýšení tloušťky ucha u myší ze zkušební skupiny ve srovnání s kontrolními zvířaty (28) (29) (30) (31) (32) (33) (34). Ačkoli mohou nastat případy statisticky významného zvýšení, i když se tloušťka ucha zvýší o méně než 25 %, nebyly tyto případy spojeny výhradně s nadměrným podrážděním (30) (31) (32) (33) (34).

24. O systémové toxicitě (35) mohou při použití v rámci integrovaného hodnocení svědčit tyto poznatky z klinického pozorování, a tudíž mohou indikovat maximální dávku, která by se měla použít v hlavní studii LLNA: DA: změny fungování nervového systému (např. piloerekce, ataxie, třes a křeče), změny chování (např. agresivita, změna činností týkajících se péče o srst, výrazná změna úrovně aktivity), změny způsobů dýchání (tj. změny frekvence a intenzity dýchání, např. dušnost, lapání po dechu a chropy) a změny v přijímání potravy a vody. Při hodnocení je navíc nutno brát v úvahu známky letargie a/nebo absence reagování, veškeré klinické příznaky více než mírné nebo momentální bolesti či utrpení nebo snížení tělesné hmotnosti ode dne 1 do dne 8 o více než 5 % a také úmrtnost. Umírající zvířata nebo zvířata, která jeví známky silné bolesti a utrpení, by se měla humánně usmrtit (36).

Harmonogram zkoušek v rámci hlavní studie

25. Harmonogram zkoušky je následující:

— *Den 1:* Každé zvíře se zváží a zaznamená se jeho hmotnost a jakékoli poznatky z klinického pozorování. Na hřbet každého ucha se čtyřmi až pěti tahy štětečku namočeného do 1 % vodného roztoku natrium-dodecyl-sulfátu (SLS) nanese tento roztok tak, aby pokryl celou plochu hřbetu ucha. Jednu hodinu po nanesení roztoku SLS se na hřbet každého ucha aplikuje 25 µl vhodně zředěného roztoku zkoušené látky, samotné vehikulum nebo pozitivní kontrola (tu lze provádět buď souběžně, nebo lze použít pozitivní kontrolu z nedávné jiné zkoušky – v závislosti na postupech dané laboratoře při zohlednění odstavců 11–15).

— *Den 2, den 3 a den 7:* Zopakuje se postup předběžného ošetření 1 % vodným roztokem SLS a nanesení zkoušené látky provedený v den 1.

— *Den 4, den 5 a den 6:* Žádná aplikace.

— *Den 8:* Zaznamená se hmotnost každého zvířete a jakékoli poznatky z klinického pozorování. Přibližně 24 až 30 hodin po zahájení aplikace v den 7 se zvířata humánně usmrtí. U každé myši se vyjmou lymfatické uzliny drenující aurikulární oblast obou uší a zpracují se ve fosfátovém pufrovém fyziologickém roztoku (PBS) od každého zvířete zvlášť. Podrobnosti a grafické znázornění vyhledání uzlin a jejich disekce lze nalézt v literatuře (22). Pro účely dalšího sledování lokální kožní reakce v rámci hlavní studie lze do protokolu studie zařadit i další parametry, jako je bodové ohodnocení erytému ucha nebo údaje o tloušťce ucha (získané buď pomocí tloušťkoměru, nebo na základě stanovení hmotnosti části ucha vyseknuté speciálními kleštěmi při pitvě).

▼M3

Příprava buněčných suspenzí

26. Od každé myši se připraví jednobuněčná suspenze obsahující buňky z vyňatých lymfatických uzlin drenujících oblast obou uší; suspenze se připraví tak, že se lymfatické uzliny vloží mezi dvě podložná sklíčka a lehkým tlakem se rozdrtí. Po potvrzení, že je tkáň rozprostřena v tenké vrstvě, se sklíčka odtáhnou od sebe. Tkáně z obou sklíček se suspendují v roztoku PBS tak, že se každé sklíčko podrží nakloněné nad Petriho miskou a oplachuje se roztokem PBS při současném seškrabování tkáně ze sklíčka stěrkou na buňky. Kromě toho jsou lymfatické uzliny u zvířat z negativní kontrolní skupiny malé, takže je třeba postupovat opatrně, aby se zabránilo jakémukoli umělému ovlivnění hodnot SI. K opláchnutí obou sklíček by se měl použít celkový objem 1 ml PBS. Suspenzi buněk lymfatických uzlin je nutno v Petriho misce zlehka homogenizovat stěrkou na buňky. Mikropipetou se pak nabere 20μL poměrný díl suspenze buněk z lymfatických uzlin – přičemž je třeba nenabrat membránu, která je viditelná pouhým okem – a následně se smísí s 1,98 ml PBS, abychom dostali 2 ml vzorku. Druhý vzorek o objemu 2 ml se pak připraví stejným způsobem, aby vzniky od každého zvířete dva vzorky.

Stanovení buněčné proliferace (měření obsahu ATP v lymfocytech)

27. Zvýšení obsahu ATP v lymfatických uzlinách se zjišťuje metodou, která je založena na použití luciferinu a luciferázy, za pomoci soupravy pro měření obsahu ATP, která měří bioluminescenci v relativních jednotkách luminiscence (RLU). U všech jednotlivých zvířat je nutno dodržet stejnou dobu od usmrcení do změření obsahu ATP, která by měla činit přibližně 30 minut, protože se má za to, že obsah ATP postupně klesá v závislosti na době uplynulé od usmrcení zvířete 12). Proto je nutno celou řadu úkonů od vynětí aurikulárních lymfatických uzlin až do změření obsahu ATP dokončit do 20 minut podle předem stanoveného harmonogramu, který je u každého zvířete stejný. Luminescenci ATP je nutno změřit u každého 2 ml vzorku, takže se získají dvě hodnoty ATP za každé zvíře. Pak se určí průměrná luminescence ATP, která se použije v následných výpočtech (viz odstavec 30).

ZÍSKANÉ POZNATKY

Poznatky z klinického pozorování

28. Každá myš se jednou denně pečlivě vyšetří, zda nevykazuje jakékoli klinické příznaky lokálního podráždění v místě aplikace nebo příznaky systémové toxicity. Všechny získané poznatky se systematicky zaznamenají, přičemž záznamy se vedou zvlášť za každou myš. Plány sledování by měly obsahovat kritéria umožňující rychle identifikovat myši, jež vykazují známky systémové toxicity, nadměrného lokálního podráždění pokožky nebo poleptání kůže, aby mohly být usmrceny (36).

Hodnoty tělesné hmotnosti

29. Jak je uvedeno v odstavci 25, tělesnou hmotnost jednotlivých zvířat je nutno zjistit na začátku zkoušky a v době plánovaného humánního usmrcení zvířete.

VÝPOČET VÝSLEDKŮ

30. Výsledky za každou exponovanou skupinu se vyjádří jako průměrný index stimulace (SI). Hodnota SI se stanoví jako podíl průměrné hodnoty RLU na zvíře jak u každé exponované skupiny, tak u pozitivní kontrolní skupiny, a průměrné hodnoty RLU na zvíře u kontrolní skupiny s rozpouštědlem/vehikulem. Průměrná hodnota SI u kontrolních skupin s vehikulem je pak rovna 1.

▼M3

31. Při rozhodování o výsledku zkoušky se za pozitivní výsledek považuje, pokud hodnota SI ≥ 1,8 10). Při rozhodování, zda hraniční výsledek (tzn. hodnotu SI v rozmezí od 1,8 do 2,5) prohlásit za pozitivní, lze také použít míru závislosti odezvy na dávce, statistickou významnost a jednotnost výsledků kontrol s rozpouštědlem/vehikulem a pozitivních kontrol (2) (3) (37).

32. U hraniční pozitivní odezvy v rozmezí hodnot SI od 1,8 do 2,5 mohou uživatelé zvážit další informace, například závislost odezvy na dávce, známky systémové toxicity nebo nadměrného podráždění, a tam, kde je to vhodné, také statistickou významnost spolu s hodnotami SI, aby se potvrdilo, že jsou takové výsledky pozitivní (10). Měla by se rovněž věnovat pozornost různým vlastnostem zkoušené látky včetně toho, zda se její struktura podobá struktuře známých senzibilizátorů kůže, zda u myší způsobuje nadměrné lokální podráždění kůže, a také povaze zjištěné závislosti odezvy na dávce. Těmito faktory a dalšími aspekty, které je třeba zvážit, se podrobně zabývá literatura (4).

33. Shromažďování údajů úrovni jednotlivých myší umožní provést statistickou analýzu, kterou se na základě těchto údajů zjistí existence a míra závislosti odezvy na dávce. Případné statistické hodnocení by mohlo obsahovat posouzení závislosti odezvy na dávce, jakož i vhodně upravená srovnání zkušebních skupin (např. skupiny s párově srovnávaným dávkováním oproti souběžné kontrolní skupině s rozpouštědlem/vehikulem). Statistické analýzy mohou zahrnovat např. lineární regresi nebo Williamovu zkoušku k posouzení trendů závislosti odezvy na dávce a Dunnettovu zkoušku pro párová srovnání. Při výběru vhodné metody pro statistickou analýzu by si měl být zkoušející vědom možných nestejných odchylek a jiných souvisejících problémů, které si mohou vyžádat transformaci údajů nebo neparametrickou statistickou analýzu. V každém případě může být nezbytné, aby zkoušející provedl výpočty SI a statistické analýzy jednak za použití určitých krajních hodnot (někdy označovaných výrazem „odlehlé hodnoty“) a jednak bez nich.

ÚDAJE A VYKAZOVÁNÍ

Údaje

34. Údaje je nutno shrnout do tabulky s hodnotami RLU od jednotlivých zvířat, průměrnou hodnotou RLU na zvíře za celou skupinu, příslušným chybovým výrazem (např. směrodatnou odchylkou – SD, směrodatnou odchylkou průměrných hodnot – SEM) a průměrnou hodnotou SI za každou dávkovou skupinu oproti souběžné kontrolní skupině s rozpouštědlem nebo vehikulem.

Protokol o zkoušce

35. Protokol o zkoušce musí obsahovat tyto informace:

Zkoušená látka a kontrolní látka:

— identifikační údaje (např. číslo CAS a číslo ES, jsou-li k dispozici, zdroj, čistota, známé nečistoty, číslo šarže),

— skupenství a fyzikálně-chemické vlastnosti (např. prchavost, stálost, rozpustnost),

— jedná-li se o směs, je nutno uvést její složení a poměrné procentuální zastoupení složek.

Rozpouštědlo/vehikulum:

— identifikační údaje (čistota, popřípadě koncentrace, použitý objem),

— zdůvodnění volby vehikula.

▼M3

Pokusná zvířata:

— zdroj myší z kmene CBA,

— mikrobiologický stav zvířat, je-li znám,

— počet a věk zvířat,

— původ zvířat, podmínky chovu, strava atd.

Zkušební podmínky:

— zdroj, číslo šarže a údaje od výrobce soupravy pro měření obsahu ATP, které se týkají prokazování a kontroly kvality,

— podrobnosti o přípravě a aplikaci zkoušené látky,

— zdůvodnění volby dávkování (včetně výsledků předběžné screeningové zkoušky, pokud byla provedena),

— použité koncentrace vehikula a zkoušené látky a celkové aplikované množství zkoušené látky,

— podrobnosti o jakosti vody a potravy (včetně druhu/zdroje stravy, zdroje vody),

— podrobnosti o harmonogramech expozice a odběru vzorků,

— metody měření toxicity,

— kritéria pro označení studie za pozitivní nebo negativní,

— údaje o případných odchylkách od protokolu a vysvětlení, jakým způsobem taková odchylka ovlivňuje koncepci studie a její výsledky.

Kontrola spolehlivosti:

— souhrn výsledků nejnovější kontroly spolehlivosti včetně informací o použité zkoušené látce, koncentraci a vehikulu,

— údaje ze souběžných a/nebo dřívějších pozitivních nebo negativních kontrolních skupin (s rozpouštědlem/vehikulem) zkoušených v dotyčné laboratoři,

— pokud souběžná pozitivní kontrola nebyla součástí studie, je nutno uvést datum a laboratorní zprávu nejnovější periodické pozitivní kontroly a podrobnou zprávu s údaji z dřívějších pozitivních kontrol zkoušených v dotyčné laboratoři, které odůvodňují rozhodnutí neprovádět souběžné pozitivní kontroly.

Výsledky:

— hmotnost jednotlivých myší na počátku aplikace a v době plánovaného usmrcení, jakož i průměrná hodnota a příslušný chybový výraz (např. SD, SEM) za každou exponovanou skupinu,

— u každého zvířete časový průběh nástupu příznaků toxicity, včetně podráždění kůže v místě aplikace, pokud k němu dojde,

— doba usmrcení a doba změření množství ATP u každého zvířete,

— tabulka hodnot RLU a hodnot SI od jednotlivých myší za každou exponovanou skupinu,

— průměrná hodnota RLU na zvíře a příslušný chybový výraz (např. SD, SEM) za každou exponovanou skupinu a výsledky analýzy odlehlých hodnot za každou exponovanou skupinu,

▼M3

— vypočtená hodnota SI a příslušná míra variability, která zohledňuje variabilitu mezi jednotlivými zvířaty jak z testování zkoušené látky, tak z kontrolních skupin,

— závislost odezvy na dávce,

— případné statistické analýzy.

Rozbor výsledků:

— stručný komentář k výsledkům, k analýze závislosti odezvy na dávce a k případným statistickým analýzám a dále závěr, zda se má zkoušená látka považovat za senzibilizátor kůže.

LITERATURA

(1) OECD (2010), Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay, Test Guideline No. 429, Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD, Paris. K dispozici na adrese: [http://www.oecd.org/env/testguidelines].

(2) Chamberlain, M. and Basketter, D.A. (1996), The local lymph node assay: status of validation. Food Chem, Toxicol., 34, 999–1002.

(3) Basketter, D.A., Gerberick, G.F., Kimber, I. and Loveless, S.E. (1996), The local lymph node assay: A viable alternative to currently accepted skin sensitisation tests. Food Chem, Toxicol., 34, 985–997.

(4) Basketter, D.A., Gerberick, G.F. and Kimber, I. (1998), Strategies for identifying false positive responses in predictive sensitisation tests. Food Chem. Toxicol., 36, 327–333.

(5) Van Och, F.M.M., Slob, W., De Jong, W.H., Vandebriel, R.J. and Van Loveren, H. (2000), A quantitative method for assessing the sensitising potency of low molecular weight chemicals using a local lymph node assay: employment of a regression method that includes determination of uncertainty margins. Toxicol., 146, 49–59.

(6) ICCVAM (1999), The murine local lymph node Assay: A test method for assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals/compounds: The results of an independent peer review evaluation coordinated by the Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICETAM). NIH Publication No: 99-4494. Research Triangle Park, N.C. K dispozici na adrese: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna/llnarep.pdf].

(7) Dean, J.H., Twerdok, L.E., Tice, R.R., Sailstad, D.M., Hattan, D.G., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: II. Conclusions and recommendations of an independent scientific peer review panel. Reg. Toxicol. Pharmacol. 34, 258–273.

(8) Haneke, K.E., Tice, R.R., Carson, B.L., Margolin, B.H., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: III. Data analyses completed by the national toxicology program interagency center for the evaluation of alternative toxicological methods. Reg. Toxicol. Pharmacol. 34, 274–286.

(9) Sailstad, D.M., Hattan, D., Hill, R.N., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: I. The ICCVAM review process. Reg. Toxicol. Pharmacol. 34, 249–257.

(10) ICCVAM (2010), ICCVAM Test Method Evaluation Report. Nonradioactive local lymph node assay: modified by Daicel Chemical Industries, Ltd., based on ATP content test method protocol (LLNA: DA). NIH Publication No. 10-7551 A/B. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. K dispozici na adrese: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/llna-DA/TMER.htm].

▼M3

(11) ICCVAM (2009), Independent Scientific Peer Review Panel Report: Updated validation status of new versions and applications of the murine local lymph node assay: a test method for assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals and products. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. K dispozici na adrese: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/LLNA-PRPRept2009.pdf].

(12) Idehara, K., Yamagishi, G., Yamashita, K. and Ito, M. (2008), Characterization and evaluation of a modified local lymph node assay using ATP content as a non-radio isotopic endpoint. J. Pharmacol. Toxicol. Meth., 58, 1–10.

(13) Omori, T., Idehara, K., Kojima, H., Sozu, T., Arima, K., Goto, H., Hanada, T., Ikarashi, Y., Inoda, T., Kanazawa, Y., Kosaka, T., Maki, E., Morimoto, T., Shinoda, S., Shinoda, N., Takeyoshi, M., Tanaka, M., Uratani, M., Usami, M., Yamanaka, A., Yoneda, T., Yoshimura, I. and Yuasa, A. (2008), Interlaboratory validation of the modified murine local lymph node assay based on adenosine triphosphate measurement. J. Pharmacol. Toxicol. Meth., 58, 11–26.

(14) OECD (1992), Skin Sensitisation, Test Guideline No. 406, Guidelines for Testing of Chemicals, OECD, Paris. K dispozici na adrese: [http://www.oecd.org/env/testguidelines].

(15) Kreiling, R., Hollnagel, H.M., Hareng, L., Eigler, L., Lee, M.S., Griem, P., Dreessen, B., Kleber, M., Albrecht, A., Garcia, C. and Wendel, A. (2008), Comparison of the skin sensitising potential of unsaturated compounds as assessed by the murine local lymph node assay (LLNA) and the guinea pig maximization test (GPMT). Food Chem. Toxicol., 46, 1896–1904.

(16) Basketter, D., Ball, N., Cagen, S., Carrillo, J.C., Certa, H., Eigler, D., Garcia, C., Esch, H., Graham, C., Haux, C., Kreiling, R. and Mehling, A. (2009), Application of a weight of evidence approach to assessing discordant sensitisation datasets: implications for REACH. Reg. Toxicol. Pharmacol., 55, 90–96.

(17) Crouch, S.P., Kozlowski, R., Slater, K.J. and Fletcher J. (1993), The use of ATP bioluminescence as a measure of cell proliferation and cytotoxicity. J. Immunol. Meth., 160, 81–88.

(18) Ishizaka, A., Tono-oka, T. and Matsumoto, S. (1984), Evaluation of the proliferative response of lymphocytes by measurement of intracellular ATP. J. Immunol. Meth., 72, 127–132.

(19) Dexter, S.J., Cámara, M., Davies, M. and Shakesheff, K.M. (2003), Development of a bioluminescent ATP assay to quantify mammalian and bacterial cell number from a mixed population. Biomat., 24, 27–34.

(20) Lundin A. (2000), Use of firefly luciferase in ATP-related assays of biomass, enzymes, and metabolites. Meth. Enzymol., 305, 346–370.

(21) ILAR (1996), Institute of Laboratory Animal Research (ILAR) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. 7th ed. Washington, DC: National Academies Press.

(22) ICCVAM (2009), Recommended Performance Standards: Murine Local Lymph Node Assay, NIH Publication Number 09-7357, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Science. K dispozici na adrese: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna-ps/LLNAPerfStds.pdf]

(23) McGarry, H.F. (2007), The murine local lymph node assay: regulatory and potency considerations under REACH. Toxicol., 238, 71–89.

(24) Kimber, I., Dearman, R.J., Scholes E.W. and Basketter, D.A. (1994), The local lymph node assay: developments and applications. Toxicol., 93, 13–31.

(25) OECD (2002), Acute Dermal Irritation/Corrosion, Test Guideline No. 404, Guidelines for Testing of Chemicals, OECD, Paris. K dispozici na adrese: [http://www.oecd.org/env/testguidelines].

▼**M3**

(26) Reeder, M.K., Broomhead, Y.L., DiDonato, L. and DeGeorge, G.L. (2007), Use of an enhanced local lymph node assay to correctly classify irritants and false positive substances. Toxicologist, 96, 235.

(27) ICCVAM (2009), Nonradioactive Murine Local Lymph Node Assay: Flow Cytometry Test Method Protocol (LLNA: BrdU-FC) Revised Draft Background Review Document. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. K dispozici na adrese: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/fcLLNA/BRDcomplete.pdf].

(28) Hayes, B.B., Gerber, P.C., Griffey, S.S. and Meade, B.J. (1998), Contact hypersensitivity to dicyclohexylcarbodiimide and diisopropylcarbodiimide in female B6C3F1 mice. Drug. Chem. Toxicol., 21, 195–206.

(29) Homey, B., von Schilling, C., Blumel, J., Schuppe, H.C., Ruzicka, T., Ahr, H.J., Lehmann, P. and Vohr, V.W. (1998), An integrated model for the differentiation of chemical-induced allergic and irritant skin reactions. Toxicol. Appl. Pharmacol., 153, 83–94.

(30) Woolhiser, M.R., Hayes, B.B. and Meade, B.J. (1998), A combined murine local lymph node and irritancy assay to predict sensitisation and irritancy potential of chemicals. Toxicol. Meth., 8, 245–256.

(31) Hayes, B.B. and Meade, B.J. (1999), Contact sensitivity to selected acrylate compounds in B6C3F1 mice: relative potency, cross reactivity, and comparison of test methods. Drug Chem. Toxicol., 22, 491–506.

(32) Ehling, G., Hecht, M., Heusener, A., Huesler, J., Gamer, A.O., van Loveren, H., Maurer, T., Riecke, K., Ullmann, L., Ulrich, P., Vandebriel, R. and Vohr, H.W. (2005), A European inter-laboratory validation of alternative endpoints of the murine local lymph node assay: first round. Toxicol., 212, 60–68.

(33) Vohr, H.W. and Ahr, H.J. (2005), The local lymph node assay being too sensitive? Arch. Toxicol., 79, 721–728.

(34) Patterson, R.M., Noga, E. and Germolec, D. (2007), Lack of evidence for contact sensitisation by Pfiesteria extract. Environ. Health Perspect., 115, 1023–1028.

(35) ICCVAM (2009), Report on the ICCVAM-NICEATM/ECVAM/JaCVAM Scientific Workshop on Acute Chemical Safety Testing: Advancing In Vitro Approaches and Humane Endpoints for Systemic Toxicity Evaluations. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. K dispozici na adrese: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/acutetox/Tox_workshop.htm].

(36) OECD (2000), Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation, Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris. K dispozici na adrese: [http://www.oecd.org/env/testguidelines].

(37) Kimber, I., Hilton, J., Dearman, R.J., Gerberick, G.F., Ryan, C.A., Basketter, D.A., Lea, L., House, R.V., Ladies, G.S., Loveless, S.E. and Hastings, K.L. (1998), Assessment of the skin sensitisation potential of topical medicaments using the local lymph node assay: An interlaboratory exercise. J. Toxicol. Environ. Health, 53 563–79.

(38) OECD (2005), Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment, Environment, Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 34, ENV/JM/MONO(2005)14, OECD, Paris. K dispozici na adrese: [http://www.oecd.org/env/testguidelines].

▼M3

Dodatek 1

DEFINICE

Přesnost: Blízkot shody mezi výsledky zkušební metody a uznávanými referenčními hodnotami. Je to míra funkčnosti zkušební metody a jeden z aspektů její relevantnosti. Tento výraz se často používá namísto výrazu „soulad“ a rozumí se jím podíl správných výsledků zkušební metody (38).

Srovnávací látka: Senzibilizující nebo nesenzibilizující látka použitá jako standard pro srovnání se zkoušenou látkou. Srovnávací látka by měla mít tyto vlastnosti: i) konzistentní a spolehlivý zdroj (konzistentní a spolehlivé zdroje); ii) strukturální a funkční podobnost s třídou zkoušených látek; iii) známé fyzikálně-chemické vlastnosti; iv) podklady o známých účincích a v) známá účinnost v rozsahu žádoucí odezvy.

Falešně negativní: Látka je zkušební metodou nesprávně označena za negativní nebo neaktivní, ačkoli ve skutečnosti je pozitivní nebo aktivní.

Falešně pozitivní: Látka je zkušební metodou nesprávně označena za pozitivní nebo aktivní, ačkoli ve skutečnosti je negativní nebo neaktivní.

Nebezpečnost: Potenciál látky působit nepříznivě na zdraví nebo životní prostředí. Nepříznivý účinek se projevuje pouze při dostatečné úrovni expozice.

Mezilaboratorní reprodukovatelnost: Míra, v jaké mohou různé kvalifikované laboratoře za použití stejného protokolu a při testování stejných zkoušených látek získat kvalitativně a kvantitativně podobné výsledky. Mezilaboratorní reprodukovatelnost se určuje během předvalidačních a validačních postupů a ukazuje, do jaké míry lze zkoušku úspěšně přenášet mezi různými laboratořemi (38).

Vnitrolaboratorní reprodukovatelnost: Určení míry, v jaké může kvalifikovaný personál ve stejné laboratoři jindy úspěšně dosáhnout stejných výsledků za použití určitého protokolu (38).

Odlehlá hodnota: Odlehlá hodnota je poznatek, který se výrazně liší od ostatních hodnot v náhodném vzorku od celé populace.

Prokazování kvality: Řídicí proces, v jehož rámci se hodnotí dodržování zkušebních norem a standardů laboratoře, příslušných požadavků a postupů vedení záznamů, jakož i přesnost přenosu údajů, přičemž tyto prvky jsou hodnoceny osobami, které jsou nezávislé na pracovnících, kteří zkoušky provádějí.

Spolehlivost: Míra, v jaké lze zkušební metodu provádět reprodukovatelně v rámci téže laboratoře i v rámci různých laboratoří v průběhu doby, jestliže se provádí za použití stejného protokolu. Hodnotí se na základě výpočtu vnitrolaboratorní a mezilaboratorní reprodukovatelnosti (38).

Senzibilizace kůže: Imunologický proces, který nastává, když je vnímavá osoba vystavena místně aplikovanému chemickému alergenu, který vyvolává kožní imunitní odezvu, jež může vést ke vzniku kontaktní senzibilizace.

Index stimulace (SI): Hodnota vypočtená za účelem posouzení potenciálu zkoušené látky vyvolat senzibilizaci kůže. Vyjadřuje poměr hodnoty proliferace u exponovaných skupin k hodnotě proliferace u souběžné kontrolní skupiny s vehikulem.

Zkoušená látka: Jakákoli látka nebo směs, která se zkouší za použití této zkušební metody.

▼M3

B.51 SENZIBILIZACE KŮŽE: ZKOUŠKA S VYŠETŘENÍM LOKÁLNÍCH LYMFATICKÝCH UZLIN: BRDU-ELISA

ÚVOD

1. Metodiky OECD pro testování chemických látek a zkušební metody EU jsou pravidelně přezkoumávány s ohledem na vědecký pokrok, změny regulačních potřeb a dobré životní podmínky zvířat. První zkušební metoda (ZM) (kapitola B.42 této přílohy) pro stanovení senzibilizace kůže u myší, tzv. zkouška s vyšetřením lokálních lymfatických uzlin (LLNA; zkušební metodika OECD č. 429) byla revidována (1 a kapitola B.42 této přílohy). Podrobné údaje o validaci metody LLNA a přehled prací spojených s touto metodou byly publikovány (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9). V rámci metody LLNA se k měření proliferace lymfocytů využívají radioizotopy thymidinu nebo jódu, a proto má tato zkouška omezené použití, pokud získání, používání nebo likvidace radioaktivních látek představují problém. Zkušební metoda LLNA: BrdU-ELISA [Enzyme-Linked Immunosorbent Assay] je neradioaktivní modifikace zkušební metody LLNA, která k měření proliferace lymfocytů využívá neradioaktivně značený 5-brom-2-deoxyuridin (BrdU) (Reg. č. Chemical Abstracts Service [CAS] 59-14-3) v rámci systému založeném na zkoušce ELISA. Metoda LLNA: BrdU-ELISA byla ověřena, přezkoumána a doporučena mezinárodní vědeckou komisí pro vzájemné hodnocení jakožto metoda, která je s určitými omezeními považována za užitečnou pro identifikaci chemických látek způsobujících nebo naopak nezpůsobujících senzibilizaci kůže (10) (11) (12). Tato ZM je určena k hodnocení potenciálu chemikálií (látek a směsí) způsobovat senzibilizaci kůže u zvířat. Zkušební metoda podle kapitoly B.6 této přílohy a zkušební metodiky OECD č. 406 využívá zkoušek na morčatech, a to zvláště maximalizační zkoušku na morčatech a Bühlerův test (13). Metoda LLNA (kapitola B.42 této přílohy; zkušební metodika OECD č. 429) a její dvě neradioaktivní modifikace, metoda LLNA: BrdU-ELISA (kapitola B.51 této přílohy; zkušební metodika OECD č. 442 B) a metoda LLNA: DA (kapitola B.50 této přílohy; zkušební metodika OECD č. 442 A) poskytují výhody ve srovnání se zkouškami na morčatech podle kapitoly B.6 a zkušební metodiky OECD č. 406 (13), pokud jde o snížení počtu využívaných zvířat a zdokonalení způsobu jejich využívání.

2. Podobně jako metoda LLNA i metoda LLNA: BrdU-ELISA zkoumá indukční fázi senzibilizace kůže a poskytuje kvantitativní údaje, které jsou vhodné pro hodnocení závislosti odezvy na dávce. Schopnost detekovat látky senzibilizující kůži bez nutnosti použití radioizotopů pro značení DNA navíc odstraňuje možnost expozice radioaktivitě při práci a problémy s likvidací odpadů. To zase může umožnit zvýšené využívání myší k detekování látek senzibilizujících kůži, což by mohlo dále snížit využívání morčat k testování potenciálu chemických látek způsobovat senzibilizaci kůže (tzn. metodou podle kapitoly B.6 a zkušební metodiky OECD č. 406) (13).

DEFINICE

3. Použité definice jsou uvedeny v dodatku 1.

VÝCHOZÍ ÚVAHY A OMEZENÍ

4. Zkušební metoda LLNA: BrdU-ELISA je modifikovanou metodou LLNA, která s určitými omezeními slouží k identifikaci chemických látek, jež mohou způsobovat senzibilizaci kůže. To však nutně neznamená, že by se metoda LLNA: BrdU-ELISA měla používat ve všech případech namísto metody LLNA nebo namísto zkoušek na morčatech (tzn. podle kapitoly B.6 této přílohy a zkušební metodiky OECD č. 406) (13); znamená to spíše, že tato metoda má stejnou hodnotu a že ji lze použít jako alternativní metodu, jejíž pozitivní ani negativní výsledky obvykle již nevyžadují žádné další potvrzování (10) (11). Zkušební laboratoř by měla před provedením studie

▼M3

zohlednit všechny dostupné informace o zkoušené látce. Mezi tyto informace patří totožnost a chemická struktura zkoušené látky, její fyzikálněchemické vlastnosti, výsledky jakýchkoli jiných zkoušek toxicity *in vitro* a *in vivo* za použití zkoušené látky a toxikologické údaje o strukturně příbuzných látkách. Tyto informace je nutno posoudit, aby se zjistilo, zda je metoda LLNA: BrdU-ELISA vhodná pro danou látku (s ohledem na neslučitelnost některých druhů chemických látek s metodou LLNA: BrdU-ELISA [viz odstavec 5]), a také aby se usnadnila volba dávkování.

5. Zkušební metoda LLNA: BrdU-ELISA je metodou *in vivo*, a tudíž neeliminuje používání zvířat při hodnocení alergického kontaktního senzibilizujícího působení. Umožňuje však omezit využívání zvířat pro tento účel ve srovnání se zkouškami na morčatech (podle kapitoly B.6 a zkušební metodiky OECD č. 406) (13). Kromě toho metoda LLNA: BrdU-ELISA nabízí podstatné zlepšení způsobu zacházení se zvířaty, která se využívají ke zkoušení kontaktní alergické senzibilizace, jelikož na rozdíl od metody podle kapitoly B.6 a zkušební metodiky OECD č. 406 metoda LLNA: BrdU-ELISA nevyžaduje umělé vyvolání kožní přecitlivělosti. Kromě toho metoda LLNA: BrdU-ELISA nevyžaduje ani používání adjuvantu, jak je tomu v případě maximalizační zkoušky na morčatech (podle kapitoly B.6 této přílohy) (13). Díky tomu metoda LLNA: BrdU-ELISA snižuje utrpení zvířat. Ale i přes výhody, které má metoda LLNA: BrdU-ELISA ve srovnání s metodou popsanou v kapitole B.6 a zkušební metodice OECD č. 406 (13), existují určitá omezení, která si mohou vyžádat použití metody popsané v kapitole B.6 nebo zkušební metodice OECD č. 406 (např. zkoušení některých kovů, falešně pozitivní výsledky u určitých látek způsobujících podráždění kůže (jako jsou například některé chemikálie typu povrchově aktivních látek) (6) (1 a kapitola B.42 této přílohy) nebo rozpustnost zkoušené látky). Kromě toho si použití zkoušek na morčatech (tzn. podle kapitoly B.6 nebo zkušební metodiky OECD č. 406) (13) mohou vyžádat také některé třídy chemických látek nebo látky obsahující funkční skupiny, u nichž je prokázáno, že mohou způsobovat zkreslení výsledků (15). Doporučuje se, aby se omezení zjištěná u metody LLNA (1 a kapitola B.42 této přílohy) vztahovala rovněž na metodu LLNA: BrdU-ELISA (10). S výjimkou těchto známých omezení by měla být metoda LLNA: BrdU-ELISA použitelná k testování jakýchkoli látek, nejsou-li s těmito látkami spojeny vlastnosti, které mohou nepříznivě ovlivnit přesnost metody LLNA: BrdU-ELISA. Kromě toho je třeba zvážit možnost hraničních pozitivních výsledků při získání hodnot indexu stimulace (SI) v rozmezí od 1,6 do 1,9 (viz odstavce 31 až 32). To je založeno na validační databázi 43 látek za použití hodnot SI ≥ 1,6 (viz odstavec 6), u kterých metoda LLNA: BrdU-ELISA správně identifikovala všech 32 látek identifikovaných jako senzibilizující látky metodou LLNA, ale nesprávně identifikovala dvě z 11 látek identifikovaných metodou LLNA jako nesenzibilizující látky s hodnotami SI v rozmezí od 1,6 do 1,9 (tzn. hraniční pozitivní) (10). Jelikož však byl stejný soubor údajů použit k stanovení hodnot SI a k výpočtu prediktivních vlastností zkoušky, mohou uvedené výsledky představovat nadhodnocení skutečných prediktivních vlastností této metody.

PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

6. Základní podstata metody LLNA: BrdU-ELISA spočívá v tom, že senzibilizující látky vyvolávají proliferaci lymfocytů v lymfatických uzlinách drenujících místo aplikace zkoušené látky. Tato proliferace je úměrná dávce a potenciálu aplikovaného alergenu a představuje jednoduchý prostředek k získání kvantitativního údaje o míře senzibilizace. Proliferace se měří porovnáním průměrné proliferace u každé zkušební skupiny s průměrnou proliferací u kontrolní skupiny s vehikulem. Určí se poměr průměrné proliferace u každé z exponovaných skupin k průměrné proliferaci u souběžně testované kontrolní skupiny s vehikulem, nazývaný index stimulace (SI), přičemž jeho hodnota by měla být ≥ 1,6, aby bylo oprávněné další hodnocení zkoušené látky jako potenciálního senzibilizátoru kůže. Zde popsané postupy jsou založeny na použití měření obsahu BrdU

▼M3

k indikaci zvýšeného počtu proliferujících buněk v lymfatických uzlinách drenujících aurikulární oblast. Látka BrdU je analogem thymidinu a začleňuje se podobným způsobem do DNA proliferujících buněk. Začlenění BrdU se měří metodou ELISA, která využívá protilátku specifickou pro BrdU, která je rovně značí peroxidázou. Po přidání substrátu peroxidáza reaguje se substrátem při vzniku barevného produktu, jehož množství se určuje při určité absorbanci za použití čtečky mikrotitračních destiček.

POPIS ZKOUŠKY

Volba druhu zvířat

7. Vhodným druhem pro tuto zkoušku je myš. Validační studie metody LLNA: BrdU-ELISA byly prováděny výhradně s kmenem CBA/JN, který je proto považován za upřednostňovaný kmen (10) (12). Používají se mladé dospělé samice myší, které musí být nullipary a nesmějí být březí. Při zahájení studie by zvířata měla být přibližně 8 až 12 týdnů stará, přičemž odchylky v hmotnosti zvířat by měly být pouze minimální a neměly by překročit 20 % průměrné hmotnosti. Případně lze používat i jiné kmeny a samce, pokud je k dispozici dostatek údajů, které dokazují, že v rámci reakcí neexistují u metody LLNA: BrdU-ELISA významné specifické odlišnosti mezi kmeny a/nebo pohlavími.

Podmínky chovu a krmení

8. Myši by měly být chovány ve skupinách (16), není-li předloženo dostatečné vědecké zdůvodnění, proč by měly být chovány jednotlivě. Teplota v místnosti pro pokusná zvířata by měla být 22 ± 3 °C. Ačkoli by relativní vlhkost vzduchu měla být minimálně 30 % a pokud možno by kromě doby úklidu místnosti neměla přesáhnout 70 %, cílem by měla být hodnota 50–60 %. Osvětlení by mělo být umělé se střídáním 12 hodin světla a 12 hodin tmy. Ke krmení lze používat běžnou laboratorní stravu a k pití by měly mít myši k dispozici neomezené množství vody.

Příprava zvířat

9. Zvířata se náhodně vyberou, pro usnadnění individuální identifikace se označí (nesmí se však použít žádná forma značení uší) a chovají se v klecích minimálně pět dnů před začátkem aplikování zkoušené látky, aby se mohla přizpůsobit laboratorním podmínkám. Před začátkem aplikace látky se všechna zvířata vyšetří, aby se ověřilo, že nemají žádné pozorovatelné kožní léze.

Příprava dávkovacích roztoků

10. Pevné chemické látky by se měly před nanesením na ucho myši rozpustit nebo suspendovat ve vhodných rozpouštědlech nebo vehikulech a popřípadě zředit. Kapalné látky lze aplikovat bez přísad nebo je lze před dávkováním rozpustit. Nerozpustné látky, jaké se nejčastěji používají k výrobě zdravotnických prostředků, by měly být vystaveny intenzívní extrakci ve vhodném rozpouštědle, aby se před nanesením na ucho myši odhalily všechny extrahovatelné složky, které je nutno testovat. Zkoušené látky by se měly připravovat každý den čerstvé, pokud údaje o stálosti neprokazují přijatelnost jejich skladování.

Kontrola spolehlivosti

11. K prokázání řádné funkčnosti zkoušky slouží pozitivní kontrolní chemikálie, a to tak, že reagují s dostatečnou a reprodukovatelnou citlivostí na zkoušenou senzibilizující látku, u níž je dobře popsána síla odezvy. Zařazení souběžné pozitivní kontroly se doporučuje proto, že prokazuje způsobilost laboratoře úspěšně provést každou zkoušku a umožňuje posoudit vnitrolaboratorní a mezilaboratorní reprodukovatelnost a srovnatelnost. Některé regulační orgány také vyžadují při každé studii pozitivní kontrolu, a proto se uživatelům doporučuje před provedením zkoušky LLNA: BrdU-ELISA příslušné orgány konzultovat. Doporučuje se tudíž běžně používat souběžnou pozitivní kontrolu, aby nebylo nutné další zkoušení na zvířatech ke splnění požadavků, které by mohly vzniknout při používání periodické pozitivní kontroly (viz odstavec 12). Pozitivní kontrola by měla v rámci metody LLNA: BrdU-ELISA vyvolat pozitivní odezvu při úrovni expozice, u které se očekává zvýšení indexu stimulace (SI) > 1,6 ve srovnání s negativní kontrolní skupinou. Dávka pozitivní kontroly by měla být zvolena tak, aby nevyvolala nadměrné podráždění

▼M3

kůže nebo systémovou toxicitu a přitom aby indukce byla reprodukovatelná, avšak nikoli nadměrná (tzn. že hodnota SI > 14 by byla považována za příliš velkou). K upřednostňovaným látkám pro pozitivní kontrolu patří 25 % roztok 2-benzylidenoktanalu (č. CAS 101-86-0) nebo eugenolu (číslo CAS 97-53-0) v acetonu s olivovým olejem (v objemovém poměru 4:1). Mohou existovat určité okolnosti, za nichž lze při řádném zdůvodnění použít i jiné pozitivní kontrolní látky, které splňují výše uvedená kritéria.

12. I když se zařazení skupiny souběžných pozitivních kontrol doporučuje, mohou existovat situace, kdy může být periodické testování (tzn. v intervalech ≤ 6 měsíců) pozitivních kontrol vhodné u laboratoří, které provádějí zkoušky LLNA: BrdU-ELISA pravidelně (tzn. nejméně jednou měsíčně) a mají k dispozici databázi dřívějších údajů pozitivních kontrol, která prokazuje schopnost laboratoře získat při použití pozitivních kontrol reprodukovatelné a přesné výsledky. Odpovídající zběhlost v používání metody LLNA: BrdU-ELISA lze úspěšně prokázat dosažením shodných pozitivních výsledků při použití pozitivní kontroly alespoň v 10 nezávislých zkouškách provedených během přiměřené doby (tzn. během méně než jednoho roku).

13. Skupina souběžných pozitivních kontrol by se měla zařadit vždy, když dojde k procedurální změně metody LLNA: BrdU-ELISA (např. při změně složení vyškoleného personálu, při změně materiálů a/nebo činidel či vybavení, jež se používají v rámci zkušební metody, nebo při změně zdroje pokusných zvířat), přičemž takové změny by se měly vždy zdokumentovat v laboratorních zprávách. Při určování nezbytnosti vytvořit novou databázi ke zdokumentování shodnosti výsledků pozitivních kontrol by se měl zvážit dopad těchto změn na přiměřenost dosavadní databáze.

14. Zkoušející by si měli uvědomit, že rozhodnutí používat pozitivní kontroly periodicky namísto souběžně má závažné dopady na přiměřenost a přijatelnost negativních výsledků studie získaných bez souběžných pozitivních kontrol během intervalu mezi jednotlivými periodickými použitími pozitivních kontrol. Například obdržení falešně negativního výsledku při periodickém používání pozitivních kontrol může zpochybnit negativní výsledky zkoušené látky získané v období mezi poslední přijatelnou periodickou studií pozitivních kontrol a nepřijatelnou periodickou studií pozitivních kontrol. Důsledky, jež z toho vyplývají, je třeba pečlivě zvážit při rozhodování, zda do zkoumání zařadit souběžné pozitivní kontroly, nebo používat pouze periodické pozitivní kontroly. Je také nutno vzít v úvahu možnost použít v rámci skupiny souběžných pozitivních kontrol méně zvířat, jestliže je to vědecky opodstatněné a jestliže laboratoř na základě svých vlastních dosavadních údajů prokáže, že lze používat méně myší (17).

15. Ačkoli by se pozitivní kontroly měly zkoušet ve vehikulu, o němž je známo, že vždy vyvolává shodnou reakci (např. aceton s olivovým olejem v objemovém poměru 4:1), mohou nastat určité situace, kdy je z důvodů požadovaných v právních předpisech nezbytné provést zkoušku s použitím nestandardního vehikula (klinicky/chemicky relevantní složení) (18). Pokud se souběžná pozitivní kontrola zkouší v jiném vehikulu než zkoušená látka, měla by být součástí zkoušky se souběžnou pozitivní kontrolou také samostatná kontrola s vehikulem.

▼M3

16. V případech, kdy se hodnotí zkoušené látky, které patří do určité třídy chemických látek nebo vykazují určitou škálu odezev, mohou být užitečné také srovnávací látky, jelikož mohou prokázat, že zkušební metoda je schopna správně zjistit potenciál těchto druhů zkoušených látek vyvolávat senzibilizaci kůže. Vhodné srovnávací látky by měly mít tyto vlastnosti:

— strukturální a funkční podobnost s třídou, do níž patří zkoušená látka,

— známé fyzikálně-chemické vlastnosti,

— podklady ze zkoušky LLNA: BrdU-ELISA,

— podklady získané při použití jiných zvířecích modelů a/nebo lidí.

ZKUŠEBNÍ POSTUP

Počet zvířat a dávkování

17. Na každou dávkovou skupinu se použijí alespoň čtyři zvířata, přičemž se použijí minimálně tři koncentrace zkoušené látky, dále se použije souběžná negativní kontrolní skupina, k jejíž expozici se použije pouze vehikulum zkoušené látky, a pozitivní kontrolní skupina (souběžná nebo z nedávné jiné zkoušky – v závislosti na postupech dané laboratoře při zohlednění odstavců 11–15). Mělo by se zvážit zkoušení většího počtu dávek pozitivní kontroly, a to zejména v případě, že se pozitivní kontrola nepoužívá soustavně. Se zvířaty v kontrolních skupinách by se s výjimkou aplikace zkoušené látky mělo zacházet stejně jako se zvířaty v exponovaných skupinách.

18. Volba dávkování a vehikula by měla být založena na doporučeních uvedených v literatuře – (2) a (19). Po sobě jdoucí dávky se běžně vybírají z vhodné řady koncentrací, například 100 %, 50 %, 25 %, 10 %, 5 %, 2,5 %, 1 %, 0,5 % atd. Volba této řady koncentrací by měla být dostatečně vědecky zdůvodněna. Při výběru tří po sobě jdoucích koncentrací je třeba zvážit veškeré existující toxikologické informace (např. o akutní toxicitě a kožní dráždivosti) a informace o struktuře a fyzikálně-chemických vlastnostech zkoušené látky (a/nebo strukturně příbuzných látek), jsou-li k dispozici, aby nejvyšší koncentrace maximalizovala expozici, aniž by současně vyvolala systémovou toxicitu a/nebo nadměrné lokální podráždění kůže (19) (20 a kapitola B.4 této přílohy). Nejsou-li takové informace k dispozici, může být nezbytné provést úvodní předběžnou screeningovou zkoušku (viz odstavce 21 až 24).

19. Vehikulum by nemělo nepříznivě ovlivňovat ani jinak zkreslovat výsledky zkoušky a mělo by být vybráno tak, aby se maximalizovala rozpustnost umožňující dosáhnout nejvyšší možné koncentrace a zároveň připravit roztok nebo suspenzi, jež jsou vhodné pro aplikaci zkoušené látky. K doporučeným vehikulům patří aceton s olivovým olejem (v objemovém poměru 4:1), *N,N*-dimethylformamid, ethyl(methyl)keton, propan-1,2-diol a dimethylsulfoxid (6), avšak při dostatečném vědeckém zdůvodnění lze použít i jiná vehikula. V určitých situacích může být nezbytné použít jako doplňující kontrolu klinicky relevantní rozpouštědlo nebo běžně prodejný přípravek obsahující zkoušenou látku. Zvláště je třeba dbát na to, aby byly hydrofilní zkoušené látky zapracovány do takového vehikula, které zvlhčí kůži a nesteče ihned z pokožky. Toho lze dosáhnout použitím vhodných solubilizérů (jako je např. 1 % Pluronic® L92). Není tudíž vhodné používat zcela vodná vehikula.

▼M3

20. Zpracování lymfatických uzlin z jednotlivých myší umožňuje posoudit variabilitu mezi jednotlivými zvířaty a provést statistické porovnání rozdílu mezi zkoušenou látkou a hodnotami naměřenými u kontrolní skupiny se samotným vehikulem (viz odstavec 33). Posoudit možnost snížit počet myší v pozitivní kontrolní skupině je kromě toho vhodné jen tehdy, když se zaznamenávají údaje od jednotlivých zvířat (17). Sběr údajů od jednotlivých zvířat navíc vyžadují i některé regulační orgány. Pravidelný sběr údajů od jednotlivých zvířat je výhodnější z hlediska dobrých životních podmínek zvířat, jelikož nevyžaduje duplicitní zkoušení, které by bylo nezbytné, pokud by výsledky pro určitou zkoušenou látku, jež byly původně shromážděny jedním způsobem (např. za použití souhrnných údajů od všech zvířat), měly být později posouzeny regulačními orgány s jinými požadavky (např. vyžadujícími použití údajů od jednotlivých zvířat).

Předběžná screeningová zkouška

21. Nejsou-li k dispozici informace pro stanovení nejvyšší dávky, která má být předmětem zkoušky (viz odstavec 18), měla by se provést předběžná screeningová zkouška umožňující vymezit vhodné dávkování, které se bude metodou LLNA: BrdU-ELISA zkoušet. Účelem předběžné screeningové zkoušky je poskytnout vodítko pro volbu maximálního dávkování, které se má použít v hlavní studii LLNA: BrdU-ELISA, pokud nejsou k dispozici informace o koncentraci, která vyvolává systémovou toxicitu (viz odstavec 24) a/nebo nadměrné lokální podráždění kůže (viz odstavec 23). Maximální zkoušenou dávkou by měla být 100 % koncentrace zkoušené látky v případě kapalin, respektive maximální možná koncentrace v případě pevných látek nebo suspenzí.

22. Předběžná screeningová zkouška se provádí za stejných podmínek jako hlavní studie LLNA: BrdU-ELISA až na to, že se nehodnotí proliferace buněk z lymfatických uzlin a lze použít méně zvířat na dávkovou skupinu. Navrhuje se počet jednoho až dvou zvířat na dávkovou skupinu. Všechny myši se denně pozorují, zda nevykazují klinické příznaky systémové toxicity nebo lokálního podráždění v místě aplikace. Před zahájením zkoušky a před jejím ukončením (den 6) se zaznamenají hodnoty tělesné hmotnosti zvířat. Na obou uších každé myši se sleduje výskyt erytému, který se vyhodnotí podle tabulky 1 (20 a kapitola B.4 této přílohy). Tloušťka ucha se změří tloušťkoměrem (např. digitálním mikrometrem nebo tloušťkoměrem s kruhovou stupnicí) v den 1 (před aplikací první dávky), v den 3 (přibl. 48 hodin po první dávce) a v den 6. Kromě toho lze v den 6 určit tloušťku ucha na základě stanovení hmotnosti části ucha vyseknuté speciálními kleštěmi, což by se mělo provádět až poté, co se zvířata humánně usmrtí. Známkou nadměrného lokálního podráždění je zarudnutí ohodnocené 3 nebo více body a/nebo zvýšení tloušťky ucha o 25 % nebo více v kterýkoli den měření (21) (22). Jako nejvyšší dávka se pro hlavní studii LLNA: BrdU-ELISA v rámci řady koncentrací zjištěných při předběžné screeningové zkoušce (viz odstavec 18) zvolí nejbližší nižší dávka, která nevyvolává systémovou toxicitu a/nebo nadměrné lokální podráždění kůže.

Tabulka 1

Bodové hodnocení erytému

Pozorované příznaky	Bodové ohodnocení
Žádný erytém	0
Velmi slabý erytém (sotva patrný)	1
Zřetelně viditelný erytém	2

▼M3

Pozorované příznaky	Bodové ohodnocení
Mírný až výrazný erytém	3
Těžký erytém (silné zarudnutí) nebo tvorba příškvaru znemožňující posouzení erytému	4

23. Kromě 25 % zvýšení tloušťky ucha (21) (22) se k identifikaci dráždivých látek při zkoušce LLNA používá také statisticky významné zvýšení tloušťky ucha u myší ze zkušební skupiny ve srovnání s kontrolními zvířaty (22) (23) (24) (25) (26) (27) (28). Ačkoli mohou nastat případy statisticky významného zvýšení, i když se tloušťka ucha zvýší o méně než 25 %, nebyly tyto případy spojeny výhradně s nadměrným podrážděním (25) (26) (27) (28) (29).

24. O systémové toxicitě (30) mohou při použití v rámci integrovaného hodnocení svědčit tyto poznatky z klinického pozorování, a tudíž mohou indikovat maximální dávku pro hlavní studii LLNA: BrdU-ELISA: změny fungování nervového systému (např. piloerekce, ataxie, třes a křeče), změny chování (např. agresivita, změna činností týkajících se péče o srst, výrazná změna úrovně aktivity), změny způsobů dýchání (tj. změny frekvence a intenzity dýchání, např. dušnost, lapání po dechu a chropy) a změny v přijímání potravy a vody. Při hodnocení je navíc nutno brát v úvahu známky letargie a/nebo absence reagování, veškeré klinické příznaky více než mírné nebo momentální bolesti či utrpení nebo snížení tělesné hmotnosti ode dne 1 do dne 6 o více než 5 % a také úmrtnost. Umírající zvířata nebo zvířata, která jeví známky silné bolesti a utrpení, by se měla humánně usmrtit (31).

Harmonogram zkoušek v rámci hlavní studie

25. Harmonogram zkoušky je následující:

— *Den 1:* Každé zvíře se zváží a zaznamená se jeho hmotnost a jakékoli poznatky z klinického pozorování. Na hřbet každého ucha se aplikuje 25 µl vhodně zředěného roztoku zkoušené látky, samotné vehikulum nebo pozitivní kontrola (tu lze provádět buď souběžně, nebo lze použít pozitivní kontrolu z nedávné jiné zkoušky – v závislosti na postupech dané laboratoře při zohlednění odstavců 11 až 15).

— *Den 2 a den 3:* Zopakuje se postup aplikace provedený v den 1.

— *Den 4:* Žádná aplikace.

— *Den 5:* Injekčně se intraperitoneálně aplikuje 0,5 ml (5 mg/myš) roztoku BrdU (10 mg/ml).

— *Den 6:* Zaznamená se hmotnost každého zvířete a jakékoli poznatky z klinického pozorování. Přibližně 24 hodin (24 hod.) po injekčním podání BrdU se zvířata humánně usmrtí. U každé myši se vyjmou lymfatické uzliny drenující aurikulární oblast obou uší a zpracují se ve fosfátovém pufrovém fyziologickém roztoku (PBS) od každého zvířete zvlášť. Podrobnosti a grafické znázornění vyhledání uzlin a jejich disekce lze nalézt v literatuře (17). Pro účely dalšího sledování lokální kožní reakce v rámci hlavní studie lze do protokolu studie zařadit i další parametry, jako je bodové ohodnocení erytému ucha nebo údaje o tloušťce ucha (získané buď pomocí tloušťkoměru, nebo na základě stanovení hmotnosti části ucha vyseknuté speciálními kleštěmi při pitvě).

▼M3

Příprava buněčných suspenzí

26. Od každé myši se připraví jednobuněčná suspenze obsahující buňky z vyňatých lymfatických uzlin drenujících oblast obou uší; suspenze se připraví jemnou mechanickou deagregací přes 200 μm sítko z korozivzdorné oceli nebo jiným přijatelným postupem vytvoření jednobuněčné suspenze (např. rozdrcením lymfatických uzlin za použití jednorázové plastové paličky a následným protlačením tkáně nylonovým sítkem # 70). Postup přípravy suspenze buněk z lymfatických uzlin je v této zkoušce rozhodující, a proto by si měl každý pracovník osvojit tuto dovednost předem. Kromě toho jsou lymfatické uzliny u zvířat z negativní kontrolní skupiny malé, takže je třeba postupovat opatrně, aby se zabránilo jakémukoli umělému ovlivnění hodnot SI. V každém případě je nutno cílový objem suspenze buněk z lymfatických uzlin upravit na stanovený optimální objem (přibližně 15 ml). Optimální objem je založen na dosažení průměrné absorbance negativní kontrolní skupiny v rozmezí 0,1–0,2.

Stanovení buněčné proliferace (měření obsahu BrdU v DNA lymfocytů)

27. Obsah BrdU se měří metodou ELISA za použit komerční soupravy (např. Roche Applied Science, Mannheim, Německo, katalogové číslo 11 647 229 001). Postup lze stručně popsat tak, že 100 ml suspenze buněk z lymfatických uzlin se nakape do jamek tří mikrotitračních destiček s plochým dnem. Po fixaci a denaturaci buněk z lymfatických uzlin se do každé jamky přidá protilátka proti BrdU a obsah jamek se nechá zreagovat. Následně se protilátka proti BrdU odstraní vymytím, přidá se roztok substrátu a nechá se vzniknout chromogen. Pak se změří absorbance při vlnové délce 370 nm s referenční vlnovou délkou 492 nm. Ve všech případech je nutno optimalizovat zkušební podmínky (viz odstavec 26).

ZÍSKANÉ POZNATKY

Poznatky z klinického pozorování

28. Každá myš se jednou denně pečlivě vyšetří, zda nevykazuje jakékoli klinické příznaky lokálního podráždění v místě aplikace nebo příznaky systémové toxicity. Všechny získané poznatky se systematicky zaznamenají, přičemž záznamy se vedou zvlášť za každou myš. Plány sledování by měly obsahovat kritéria umožňující rychle identifikovat myši, jež vykazují známky systémové toxicity, nadměrného lokálního podráždění pokožky nebo poleptání kůže, aby mohly být usmrceny (31).

Hodnoty tělesné hmotnosti

29. Jak je uvedeno v odstavci 25, tělesnou hmotnost jednotlivých zvířat je nutno zjistit na začátku zkoušky a v době plánovaného humánního usmrcení zvířete.

VÝPOČET VÝSLEDKŮ

30. Výsledky za každou exponovanou skupinu se vyjádří jako průměrný index stimulace (SI). Hodnota SI se stanoví jako podíl průměrné hodnoty indexu značení BrdU na zvíře jak u každé exponované skupiny, tak u pozitivní kontrolní skupiny, a průměrné hodnoty indexu značení BrdU na zvíře u kontrolní skupiny s rozpouštědlem/vehikulem. Průměrná hodnota SI u kontrolních skupin s vehikulem je pak rovna 1.

Index značení BrdU je definován jako:

$$\text{Index značení BrdU} = (ABS_{em} - ABS\ blank_{em}) - (ABS_{ref} - ABS\ blank_{ref})$$

kde: em = vlnová délka záření; ref = referenční vlnová délka.

▼M3

31. Při rozhodování o výsledku zkoušky se za pozitivní výsledek považuje, pokud hodnota SI ≥ 1,6 (10). Při rozhodování, zda hraniční výsledek (tzn. hodnotu SI v rozmezí od 1,6 do 1,9) prohlásit za pozitivní, lze také použít míru závislosti odezvy na dávce, statistickou významnost a jednotnost výsledků kontrol s rozpouštědlem/vehikulem a pozitivních kontrol (3) (6) (32).

32. U hraniční pozitivní odezvy v rozmezí hodnot SI od 1,6 do 1,9 mohou uživatelé zvážit další informace, například závislost odezvy na dávce, známky systémové toxicity nebo nadměrného podráždění, a tam, kde je to vhodné, také statistickou významnost spolu s hodnotami SI, aby se potvrdilo, že jsou takové výsledky pozitivní (10). Měla by se rovněž věnovat pozornost různým vlastnostem zkoušené látky včetně toho, zda se její struktura podobá struktuře známých senzibilizátorů kůže, zda u myší způsobuje nadměrné lokální podráždění kůže, a také povaze zjištěné závislosti odezvy na dávce. Těmito body a dalšími aspekty, které je třeba zvážit, se podrobně zabývá literatura (4).

33. Shromažďování údajů úrovni jednotlivých myší umožní provést statistickou analýzu, kterou se na základě těchto údajů zjistí existence a míra závislosti odezvy na dávce. Případné statistické hodnocení by mohlo obsahovat posouzení závislosti odezvy na dávce, jakož i vhodně upravená srovnání zkušebních skupin (např. skupiny s párově srovnávaným dávkováním oproti souběžné kontrolní skupině s rozpouštědlem/vehikulem). Statistické analýzy mohou zahrnovat např. lineární regresi nebo Williamsovu zkoušku k posouzení trendů závislosti odezvy na dávce a Dunnettovu zkoušku pro párová srovnání. Při výběru vhodné metody pro statistickou analýzu by si měl být zkoušející vědom možných nestejných odchylek a jiných souvisejících problémů, které si mohou vyžádat transformaci údajů nebo neparametrickou statistickou analýzu. V každém případě může být nezbytné, aby zkoušející provedl výpočty SI a statistické analýzy jednak za použití určitých krajních hodnot (někdy označovaných výrazem „odlehlé hodnoty“) a jednak bez nich.

ÚDAJE A VYKAZOVÁNÍ

Údaje

34. Údaje je nutno shrnout do tabulky s hodnotami indexu značení BrdU od jednotlivých zvířat, průměrnou hodnotou indexu značení BrdU na zvíře za celou skupinu, příslušným chybovým výrazem (např. směrodatnou odchylkou – SD, směrodatnou odchylkou průměrných hodnot – SEM) a průměrnou hodnotou SI za každou dávkovou skupinu oproti souběžné kontrolní skupině s rozpouštědlem nebo vehikulem.

Protokol o zkoušce

35. Protokol o zkoušce musí obsahovat tyto informace:

Zkoušená látka a kontrolní látka:

— identifikační údaje (např. číslo CAS a číslo ES, jsou-li k dispozici, zdroj, čistota, známé nečistoty, číslo šarže),

— skupenství a fyzikálně-chemické vlastnosti (např. prchavost, stálost, rozpustnost),

— jedná-li se o směs, je nutno uvést její složení a poměrné procentuální zastoupení složek.

Rozpouštědlo/vehikulum:

— identifikační údaje (čistota, popřípadě koncentrace, použitý objem),

— zdůvodnění volby vehikula.

▼M3

Pokusná zvířata:

— zdroj myší z kmene CBA,

— mikrobiologický stav zvířat, je-li znám,

— počet a věk zvířat,

— původ zvířat, podmínky chovu, strava atd.

Zkušební podmínky:

— zdroj, číslo šarže a údaje od výrobce soupravy ELISA, které se týkají prokazování a kontroly kvality (citlivost a specifičnost detekce protilátek a mez detekce),

— podrobnosti o přípravě a aplikaci zkoušené látky,

— zdůvodnění volby dávkování (včetně výsledků předběžné screeningové zkoušky, pokud byla provedena),

— použité koncentrace vehikula a zkoušené látky a celkové aplikované množství zkoušené látky,

— podrobnosti o jakosti vody a potravy (včetně druhu/zdroje stravy, zdroje vody),

— podrobnosti o harmonogramech expozice a odběru vzorků,

— metody měření toxicity,

— kritéria pro označení studie za pozitivní nebo negativní,

— údaje o případných odchylkách od protokolu a vysvětlení, jakým způsobem taková odchylka ovlivňuje koncepci studie a její výsledky.

Kontrola spolehlivosti:

— souhrn výsledků nejnovější kontroly spolehlivosti včetně informací o použité zkoušené látce, koncentraci a vehikulu,

— údaje ze souběžných a/nebo dřívějších pozitivních nebo negativních kontrolních skupin (s rozpouštědlem/vehikulem) zkoušených v dotyčné laboratoři,

— pokud souběžná pozitivní kontrola nebyla součástí studie, je nutno uvést datum a laboratorní zprávu nejnovější periodické pozitivní kontroly a podrobnou zprávu s údaji z dřívějších pozitivních kontrol zkoušených v dotyčné laboratoři, které odůvodňují rozhodnutí neprovádět souběžné pozitivní kontroly.

Výsledky:

— hmotnost jednotlivých myší na počátku aplikace a v době plánovaného humánního usmrcení, jakož i průměrná hodnota a příslušný chybový výraz (např. SD, SEM) za každou exponovanou skupinu,

— u každého zvířete časový průběh nástupu příznaků toxicity, včetně podráždění kůže v místě aplikace, pokud k němu dojde,

— tabulka hodnot indexu značení BrdU a hodnot SI od jednotlivých myší za každou exponovanou skupinu;

— průměrná hodnota indexu značení BrdU na zvíře a příslušný chybový výraz (např. SD, SEM) za každou exponovanou skupinu a výsledky analýzy odlehlých hodnot za každou exponovanou skupinu,

▼M3

— vypočtená hodnota SI a příslušná míra variability, která zohledňuje variabilitu mezi jednotlivými zvířaty jak z testování zkoušené látky, tak z kontrolních skupin,

— závislost odezvy na dávce,

— případné statistické analýzy.

Rozbor výsledků:

— stručný komentář k výsledkům, k analýze závislosti odezvy na dávce a k případným statistickým analýzám a dále závěr, zda se má zkoušená látka považovat za senzibilizátor kůže.

LITERATURA

(1) OECD (2010), Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay, Test Guideline No. 429, Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD, Paris. K dispozici na adrese: [http://www.oecd.org/env/testguidelines].

(2) Chamberlain, M. and Basketter, D.A. (1996), The local lymph node assay: status of validation. Food Chem. Toxicol., 34, 999–1002.

(3) Basketter, D.A., Gerberick, G.F., Kimber, I. and Loveless, S.E. (1996), The local lymph node assay: A viable alternative to currently accepted skin sensitisation tests. Food Chem. Toxicol., 34, 985–997.

(4) Basketter, D.A., Gerberick, G.F. and Kimber, I. (1998), Strategies for identifying false positive responses in predictive sensitisation tests. Food Chem. Toxicol., 36, 327–33.

(5) Van Och, F.M.M., Slob, W., De Jong, W.H., Vandebriel, R.J. and Van Loveren, H. (2000), A quantitative method for assessing the sensitising potency of low molecular weight chemicals using a local lymph node assay: employment of a regression method that includes determination of uncertainty margins. Toxicol., 146, 49–59.

(6) ICCVAM (1999), The murine local lymph node Assay: A test method for assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals/compounds: The results of an independent peer review evaluation coordinated by the Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICETAM). NIH Publication No: 99-4494. Research Triangle Park, N.C. K dispozici na adrese: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna/llnarep.pdf].

(7) Dean, J.H., Twerdok, L.E., Tice, R.R., Sailstad, D.M., Hattan, D.G., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: II. Conclusions and recommendations of an independent scientific peer review panel. Reg. Toxicol. Pharmacol., 34(3), 258–273.

(8) Haneke, K.E., Tice, R.R., Carson, B.L., Margolin, B.H., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: III. Data analyses completed by the national toxicology program interagency center for the evaluation of alternative toxicological methods. Reg. Toxicol. Pharmacol., 34(3), 274–286.

(9) Sailstad, D.M., Hattan, D., Hill, R.N., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: I. The ICCVAM review process. Reg. Toxicol. Pharmacol., 34(3), 249–257.

(10) ICCVAM (2010), ICCVAM Test Method Evaluation Report. Nonradioactive local lymph node assay: BrdU-ELISA Test Method Protocol (LLNA: BrdU-ELISA). NIH Publication No. 10-7552 A/B. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. K dispozici na adrese: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/llna-ELISA/TMER.htm].

▼**M3**

(11) ICCVAM (2009), Independent Scientific Peer Review Panel Report: Updated validation status of new versions and applications of the murine local lymph node assay: a test method for assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals and products. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. K dispozici na adrese: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/LLNA-PRPRept2009.pdf].

(12) Takeyoshi, M., Iida, K., Shiraishi, K. and Hoshuyama, S. (2005), Novel approach for classifying chemicals according to skin sensitising potency by non-radioisotopic modification of the local lymph node assay. J. Appl. Toxicol., 25, 129–134.

(13) OECD (1992), Skin Sensitisation, Test Guideline No. 406, Guidelines for Testing of Chemicals, OECD, Paris. K dispozici na adrese: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(14) Kreiling, R., Hollnagel, H.M., Hareng, L., Eigler, L., Lee, M.S., Griem, P., Dreessen, B., Kleber, M., Albrecht, A., Garcia, C. and Wendel, A. (2008), Comparison of the skin sensitising potential of unsaturated compounds as assessed by the murine local lymph node assay (LLNA) and the guinea pig maximization test (GPMT). Food Chem. Toxicol., 46, 1896–1904.

(15) Basketter, D., Ball, N., Cagen, S., Carrilo, J.C., Certa, H., Eigler, D., Garcia, C., Esch, H., Graham, C., Haux, C., Kreiling, R. and Mehling, A. (2009), Application of a weight of evidence approach to assessing discordant sensitisation datasets: implications for REACH. Reg. Toxicol. Pharmacol., 55, 90–96.

(16) ILAR (1996), Institute of Laboratory Animal Research (ILAR) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. 7th ed. Washington, DC: National Academies Press.

(17) ICCVAM (2009), Recommended Performance Standards: Murine Local Lymph Node Assay. NIH Publication Number 09-7357. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. K dispozici na adrese: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna-ps/LLNAPerfStds.pdf].

(18) McGarry, H.F. (2007), The murine local lymph node assay: regulatory and potency considerations under REACH. Toxicol., 238, 71–89.

(19) Kimber, I., Dearman, R.J., Scholes E.W. and Basketter, D.A. (1994), The local lymph node assay: developments and applications. Toxicol., 93, 13–31.

(20) OECD (2002), Acute Dermal Irritation/Corrosion, Test Guideline No. 404, Guidelines for Testing of Chemicals, OECD, Paris. K dispozici na adrese: [http://www.oecd.org/env/testguidelines].

(21) Reeder, M.K., Broomhead, Y.L., DiDonato, L. and DeGeorge, G.L. (2007), Use of an enhanced local lymph node assay to correctly classify irritants and false positive substances. Toxicologist, 96, 235.

(22) ICCVAM (2009), Nonradioactive Murine Local Lymph Node Assay: Flow Cytometry Test Method Protocol (LLNA: BrdU-FC) Revised Draft Background Review Document. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. K dispozici na adrese: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/fcLLNA/BRDcomplete.pdf].

(23) Hayes, B.B., Gerber, P.C., Griffey, S.S. and Meade, B.J. (1998), Contact hypersensitivity to dicyclohexylcarbodiimide and diisopropylcarbodiimide in female B6C3F1 mice. Drug Chem. Toxicol., 21, 195–206.

(24) Homey, B., von Schilling, C., Blumel, J., Schuppe, H.C., Ruzicka, T., Ahr, H.J., Lehmann, P. and Vohr, V.W. (1998), An integrated model for the differentiation of chemical-induced allergic and irritant skin reactions. Toxicol. Appl. Pharmacol., 153, 83–94.

(25) Woolhiser, M.R., Hayes, B.B. and Meade, B.J. (1998), A combined murine local lymph node and irritancy assay to predict sensitisation and irritancy potential of chemicals. Toxicol. Meth., 8, 245–256.

▼**M3**

(26) Hayes, B.B. and Meade, B.J. (1999), Contact sensitivity to selected acrylate compounds in B6C3F1 mice: relative potency, cross reactivity, and comparison of test methods. Drug. Chem. Toxicol., 22, 491–506.

(27) Ehling, G., Hecht, M., Heusener, A., Huesler, J., Gamer, A.O., van Loveren, H., Maurer, T., Riecke, K., Ullmann, L., Ulrich, P., Vandebriel, R. and Vohr, H.W. (2005), A European inter- laboratory validation of alternative endpoints of the murine local lymph node assay: first round. Toxicol., 212, 60–68.

(28) Vohr, H.W. and Ahr, H.J. (2005), The local lymph node assay being too sensitive? Arch. Toxicol., 79, 721–728.

(29) Patterson, R.M., Noga, E. and Germolec D. (2007), Lack of evidence for contact sensitisation by Pfiesteria extract. Environ. Health Perspect., 115, 1023–1028.

(30) ICCVAM (2009), Report on the ICCVAM-NICEATM/ECVAM/JaCVAM Scientific Workshop on Acute Chemical Safety Testing: Advancing *In Vitro* Approaches and Humane Endpoints for Systemic Toxicity Evaluations. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. K dispozici na adrese: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/acutetox/Tox_workshop.htm].

(31) OECD (2000), Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation, Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris. K dispozici na adrese: [http://www.oecd.org/env/testguidelines].

(32) Kimber, I., Hilton, J., Dearman, R.J., Gerberick, G.F., Ryan, C.A., Basketter, D.A., Lea, L., House, R.V., Ladies, G.S., Loveless, S.E. and Hastings, K.L. (1998), Assessment of the skin sensitisation potential of topical medicaments using the local lymph node assay: An interlaboratory exercise. J. Toxicol. Environ.l Health, 53, 563–79.

(33) OECD (2005), Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment, Environment, Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 34, ENV/JM/MONO(2005)14, OECD, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines].

▼**M3**

Dodatek 1

DEFINICE

Přesnost: Blízkost shody mezi výsledky zkušební metody a uznávanými referenčními hodnotami. Je to míra funkčnosti zkušební metody a jeden z aspektů její relevantnosti. Tento výraz se často používá namísto výrazu „soulad“ a rozumí se jím podíl správných výsledků zkušební metody (33).

Srovnávací látka: Senzibilizující nebo nesenzibilizující látka použitá jako standard pro srovnání se zkoušenou látkou. Srovnávací látka by měla mít tyto vlastnosti: i) konzistentní a spolehlivý zdroj (konzistentní a spolehlivé zdroje); ii) strukturální a funkční podobnost s třídou zkoušených látek; iii) známé fyzikálně-chemické vlastnosti; iv) podklady o známých účincích a v) známá účinnost v rozsahu žádoucí odezvy.

Falešně negativní: Zkoušená látka je zkušební metodou nesprávně označena za negativní nebo neaktivní, ačkoli ve skutečnosti je pozitivní nebo aktivní (33).

Falešně pozitivní: Zkoušená látka je zkušební metodou nesprávně označena za pozitivní nebo aktivní, ačkoli ve skutečnosti je negativní nebo neaktivní (33).

Nebezpečnost: Potenciál látky působit nepříznivě na zdraví nebo životní prostředí. Nepříznivý účinek se projevuje pouze při dostatečné úrovni expozice.

Mezilaboratorní reprodukovatelnost: Míra, v jaké mohou různé kvalifikované laboratoře za použití stejného protokolu a při testování stejné zkoušené látky získat kvalitativně a kvantitativně podobné výsledky. Mezilaboratorní reprodukovatelnost se určuje během předvalidačních a validačních postupů a ukazuje, do jaké míry lze zkoušku úspěšně přenášet mezi různými laboratořemi (33).

Vnitrolaboratorní reprodukovatelnost: Určení míry, v jaké může kvalifikovaný personál ve stejné laboratoři jindy úspěšně dosáhnout stejných výsledků za použití určitého protokolu (33).

Odlehlá hodnota: Odlehlá hodnota je poznatek, který se výrazně liší od ostatních hodnot v náhodném vzorku od celé populace.

Prokazování kvality: Řídicí proces, v jehož rámci se hodnotí dodržování zkušebních norem a standardů laboratoře, příslušných požadavků a postupů vedení záznamů, jakož i přesnost přenosu údajů, přičemž tyto prvky jsou hodnoceny osobami, které jsou nezávislé na pracovnících, kteří zkoušky provádějí.

Spolehlivost: Míra, v jaké lze zkušební metodu provádět reprodukovatelně v rámci téže laboratoře i v rámci různých laboratoří v průběhu doby, jestliže se provádí za použití stejného protokolu. Hodnotí se na základě výpočtu vnitrolaboratorní a mezilaboratorní reprodukovatelnosti (33).

Senzibilizace kůže: Imunologický proces, který nastává, když je vnímavá osoba vystavena místně aplikovanému chemickému alergenu, který vyvolává kožní imunitní odezvu, jež může vést ke vzniku kontaktní senzibilizace.

Index stimulace (SI): Hodnota vypočtená za účelem posouzení potenciálu zkoušené látky vyvolat senzibilizaci kůže. Vyjadřuje poměr hodnoty proliferace u exponovaných skupin k hodnotě proliferace u souběžné kontrolní skupiny s vehikulem.

Zkoušená látka: Jakákoli látka nebo směs, která se zkouší za použití této zkušební metody.

▼M4

B.52 AKUTNÍ INHALAČNÍ TOXICITA – METODA STANOVENÍ TŘÍDY AKUTNÍ TOXICITY

ÚVOD

1. Tato zkušební metoda odpovídá Pokynům OECD pro zkoušení (TG) 436 (2009). První pokyny k akutní inhalační toxicitě TG 403 byly schváleny v roce 1981 a od té doby byly revidovány (viz kapitola B.2 této přílohy (1)). Po schválení revidované metody stanovení třídy akutní toxicity (ATC) u orální toxicity (kapitola B.1 *tris* této přílohy) (5) se považovalo za vhodné vyvinout metodu ATC u inhalační toxicity (2), (3), (4). Retrospektivní zhodnocení funkčnosti zkušební metody ATC pro akutní inhalační toxicitu prokázalo, že je tato metoda vhodná pro použití k účelům klasifikace a označení (6). Inhalační ATC zkušební metoda umožní použít sérii kroků o fixních cílových koncentracích k získání klasifikace toxicity zkoušené chemické látky. Jako základní cílový parametr se používá letalita, nicméně zvířata trpící závažnou bolestí nebo strádáním, utrpením či blížícím se uhynutím by se měla humánním způsobem utratit, aby se minimalizovalo jejich utrpení. Pokyny k humánním cílovým parametrům jsou k dispozici v Pokynech OECD č. 19 (7).

2. Pokyny k provádění a interpretaci této zkušební metody naleznete v pokynech č. 39 – Guidance Document No. 39 on Acute Inhalation Toxicity Testing (GD 39) (8).

3. Definice použité v kontextu této zkušební metody naleznete v dodatku 1 a v GD 39 (8).

4. Tato zkušební metoda poskytuje informace o nebezpečných vlastnostech a umožňuje zařadit a klasifikovat zkoušenou chemickou látku podle nařízení (ES) č. 1272/2008 pro klasifikaci chemických látek, které způsobují akutní toxicitu (9). V případě, že jsou zapotřebí bodové odhady hodnot LC_{50} nebo analýzy odezvy na koncentraci, je vhodnou zkušební metodou, která by se měla použít, kapitola B.2 této přílohy (1). Další pokyny k výběru zkušební metody naleznete v dokumentu GD 39 (8). Tato zkušební metoda není výslovně určena pro zkoušky speciálních materiálů, jako jsou špatně rozpustné izometrické nebo vláknité materiály či vyráběné nanomateriály.

VÝCHOZÍ ÚVAHY

5. Před zamýšlením provést zkoušky v souladu s touto zkušební metodou by měla laboratoř provádějící zkoušky vzít v úvahu veškeré dostupné informace o zkoušené chemické látce, včetně stávajících studií, jejichž výsledky by podpořily neprovádění dalších zkoušek, aby se minimalizovalo použití zvířat. Informace, které mohou pomoci při výběru nejvhodnějších druhů, kmenů, pohlaví, způsobu expozice a vhodných zkušebních koncentrací, se týkají identity, chemické struktury a fyzikálně-chemických vlastností zkoušené chemické látky, výsledků jakýchkoli testů toxicity *in vitro* nebo *in vivo*, předpokládaného použití a potenciální expozice u člověka, dostupných údajů (Q)SAR a toxikologických údajů o strukturně příbuzných chemických látkách. Koncentrace, u nichž se očekává, že způsobí intenzivní bolest a utrpení vzhledem k žíravým ([1]) nebo silně dráždivým účinkům, by se neměly touto zkušební metodou testovat [viz GD 39 (8)].

([1]) Vyhodnocení žíravosti by se mělo zakládat na odborném posudku s použitím např. těchto podkladů: zkušenosti u člověka a zvířat, stávající (in vitro) údaje, např. kapitola B.40 (10), B.40 bis (11) této přílohy nebo OECD TG 435 (12), hodnoty pH, informace o podobných chemických látkách nebo jakékoli jiné relevantní údaje.

▼M4

PODSTATA ZKOUŠKY

6. Podstatou zkoušky je, že se pomocí postupu prováděného po krocích získají dostatečné informace o akutní inhalační toxicitě zkoušené chemické látky během 4hodinového období expozice, které umožní její klasifikaci. Pro specifické regulační účely mohou být použity i jiné doby trvání expozice. V každém kroku s definovanou koncentrací se testují 3 zvířata od každého pohlaví. V závislosti na mortalitě a/nebo stavu agónie zvířat lze o akutní toxicitě zkoušené chemické látky rozhodnout průměrně na základě 2 kroků. Jsou-li k dispozici důkazy, že je jedno pohlaví citlivější než druhé, pak je možné ve zkoušce pokračovat pouze s citlivějším pohlavím. Výsledek předchozího kroku určí následující krok tak, že:

   a) nebudou nutné žádné další zkoušky;

   b) provede se zkouška u tří zvířat od každého pohlaví, nebo

   c) provede se zkouška se 6 zvířaty pouze citlivějšího pohlaví, tj. nižší mezní odhady toxické třídy by se měly zakládat na 6 zvířatech v každé skupině se zkoušenou koncentrací, bez ohledu na pohlaví.

7. Umírající zvířata nebo zvířata, která zjevně projevují příznaky bolesti nebo značného a přetrvávajícího utrpení, by se měla humánně utratit a při analýze výsledků se hodnotí jako zvířata uhynulá při zkoušce. Kritéria rozhodování o utracení umírajících nebo značně trpících zvířat a pokyny týkající se rozpoznání předvídatelného nebo blížícího se uhynutí jsou předmětem Pokynů č. 19 o humánních cílových parametrech (7).

POPIS METODY

Výběr zvířecích druhů

8. Měla by se použít mladá zdravá dospělá zvířata běžně používaných laboratorních kmenů. Upřednostňovaným druhem je potkan, a pokud se použijí jiné druhy, mělo by se uvést odůvodnění.

Příprava zvířat

9. Samice musí být nullipary a nesmí být březí. V den expozice by mělo jít o mladé dospělé jedince ve stáří 8 až 12 týdnů a jejich tělesná hmotnost by se měla pohybovat v rozmezí ± 20 % průměrné hmotnosti pro každé pohlaví již dříve exponovaných zvířat stejného stáří. Zvířata jsou náhodně vybrána a označena pro potřeby individuální identifikace. Zvířata se umístí do klecí nejméně 5 dnů před začátkem studie, aby si mohla zvyknout na laboratorní podmínky. Zvířata by se také měla nechat po krátkou dobu před zahájením zkoušky zvyknout na zkušební zařízení, neboť to sníží stres způsobený novým prostředím.

Zvířecí chov

10. Teplota zkušební místnosti, v níž se uchovávají zvířata, by měla být 22 ± 3 °C. Relativní vlhkost by se měla ideálně udržovat v rozmezí 30 až 70 %, ačkoliv to nemusí být možné, používá-li se jako nosič voda. Před expozicí a po ní by se měla zvířata držet v klecích rozdělena do skupin podle pohlaví a koncentrace, avšak počet zvířat v jedné kleci by neměl bránit jasnému pozorování každého zvířete a měl by minimalizovat ztráty v důsledku kanibalismu nebo bojů. Jsou-li zvířata vystavena látce pouze nazální cestou, může být nutné nechat je zvyknout si na omezující trubičky. Omezující trubičky by neměly zvířatům způsobovat přílišný fyzický, termální nebo imobilizační stres. Zábrana může ovlivnit fyziologické cílové parametry,

▼M4

jako je tělesná teplota (hypertermie) a/nebo minutový dechový objem. Jsou-li k dispozici obecné údaje, které prokazují, že k takovým změnám nedochází ve značné míře, není předběžná adaptace na omezující trubičky nutná. Zvířata, jež jsou vystavena aerosolu celým tělem, by se měla držet během expozice odděleně, aby se zabránilo pronikání zkoušeného aerosolu z jejich těla do srsti ostatních zvířat v kleci. Mohou se používat konvenční a certifikovaná laboratorní krmiva, kromě období expozice, podávaná s neomezeným množstvím pitné vody z vodovodu. Osvětlení by mělo být umělé a mělo by se střídat 12 hodin světla a 12 hodin tmy.

Inhalační komory

11. Při výběru inhalační komory by se měla zvážit povaha zkoušené chemické látky a cíl zkoušky. Upřednostňuje se expozice pouze nazální cestou (přičemž tento termín zahrnuje i výrazy pouze-hlava, pouze-nos, pouze-čenich). Expozice pouze nazální cestou se obecně upřednostňuje u studií kapalných nebo pevných aerosolů a par, které mohou kondenzací vytvářet aerosoly. Speciálních cílů studie lze snáze dosáhnout, použije-li se celotělová expozice, avšak tato skutečnost by se měla zdůvodnit ve zprávě o studii. Pro zajištění stability atmosféry v komoře pro celotělovou expozici by neměl celkový objem zaplněný pokusnými zvířaty přesáhnout 5 % objemu komory. Principy techniky expozice pouze nazální cestou a celotělové expozice a jejich konkrétní výhody a nevýhody jsou popsány v dokumentu GD 39 (8).

PODMÍNKY EXPOZICE

Podání koncentrací

12. Doporučuje se fixní doba expozice čtyři hodiny, nepočítaje v to dobu potřebnou k dosažení rovnováhy. K splnění specifických požadavků mohou být třeba jiné délky trvání expozice, avšak mělo by se pro ně uvést zdůvodnění ve zprávě o studii [viz GD 39 (8)]. Zvířata vystavená látce v komorách pro celotělovou expozici by se měla držet odděleně, aby se zabránilo pozření zkoušené látky při vzájemné péči o srst s ostatními zvířaty v kleci. Během expozice by se mělo pozastavit krmení zvířat. Během celotělové expozice je možno zvířatům podávat vodu.

13. Zvířata jsou vystavena zkoušené chemické látce ve formě plynu, páry, aerosolu nebo jejich směsi. Skupenství látky, které se má zkoušet, závisí na fyzikálně-chemických vlastnostech zkoušené chemické látky, zvolené koncentraci a/nebo fyzické formě, v níž se bude zkoušená chemická látka s největší pravděpodobností nacházet při manipulaci a používání. Hygroskopické a chemicky reaktivní zkoušené chemické látky by se měly zkoušet v podmínkách suchého vzduchu. Je třeba pečlivě zabránit vzniku explozivních koncentrací.

Distribuce velikosti částic

14. U všech aerosolů a par, které mohou kondenzací vytvořit aerosoly, by se mělo provést stanovení velikosti částic. Aby byla možná expozice všech důležitých částí dýchací soustavy, doporučují se aerosoly s hodnotami hmotnostního mediánu aerodynamického průměru (MMAD) v rozmezí 1 až 4 μm a s geometrickou směrodatnou odchylkou (σ_g) v rozmezí 1,5 až 3,0 (8), (13), (14). Přestože by se mělo vynaložit dostatečné úsilí k splnění této normy, není-li to možné, je třeba poskytnout odborný posudek. Například kovové výpary mohou být menší, než je tato norma, a nabité částice, vlákna a hygroskopické materiály (které ve vlhkém prostředí dýchacích cest nabývají na velikosti) mohou tuto normu překročit.

▼M4

Příprava zkoušené chemické látky na nosiči

15. K dosažení vhodné koncentrace a velikosti částic zkoušené chemické látky v ovzduší lze použít nosič. Zpravidla by se měla dávat přednost vodě. Částicový materiál se může zpracovat mechanickými postupy, aby se dosáhlo požadované distribuce velikosti částic, avšak mělo by se zajistit, že nedojde k rozkladu nebo přeměně zkoušené chemické látky. Domníváteli se, že mechanické postupy změnily chemické složení zkoušené látky (např. extrémně vysoká teplota v důsledku frikce při intenzivním mletí), mělo by se složení zkoušené chemické látky ověřit analyticky. Je třeba dostatečně zabezpečit, aby nedošlo ke kontaminaci zkoušené chemické látky. Nedrolivé zrnité materiály, které jsou záměrně zformulovány tak, aby je nebylo možno vdechnout, není třeba zkoušet. K prokázání skutečnosti, že při manipulaci se zrnitým materiálem nevznikají vdechovatelné částice, by se měla použít zkouška otěru. Pokud při zkoušce otěru vzniknou vdechovatelné částice, měla by se provést zkouška inhalační toxicity.

Kontrolní zvířata

16. Souběžná negativní (vystavena pouze vzduchu) kontrolní skupina není nutná. Používá-li se k vytvoření zkušební atmosféry jiný nosič než voda, měla by se kontrolní skupina s nosičem použít pouze tehdy, nejsou-li k dispozici historické údaje o inhalační toxicitě nosiče. Jestliže studie toxicity zkoušené chemické látky formulované na nosiči neodhalí žádnou toxicitu, vyplývá z toho, že nosič je při zkoušené koncentraci netoxický a kontrola s nosičem tudíž není nutná.

MONITOROVÁNÍ PODMÍNEK EXPOZICE

Proudění vzduchu komorou

17. Proudění vzduchu komorou by se mělo pečlivě řídit, neustále sledovat a zaznamenávat alespoň v hodinových intervalech při každé expozici. Monitorování koncentrace látky ve zkušební atmosféře (nebo stability) je nedílnou součástí měření všech dynamických parametrů a poskytuje nepřímý prostředek k řízení všech důležitých parametrů generování dynamické atmosféry. V komorách určených k expozici pouze nazální cestou by se měl brát zvláštní ohled na to, aby se zamezilo opětovnému vdechování, v případech, kdy proudění vzduchu expozičním systémem není dostačující k zajištění dynamického proudění zkušební chemické atmosféry. Existují předepsané metodiky, které lze použít k prokázání skutečnosti, že za vybraných provozních podmínek nedochází k opětovnému vdechování (8), (15). Koncentrace kyslíku by měla být alespoň 19 % a koncentrace oxidu uhličitého by neměla přesáhnout 1 %. Existuje-li důvod se domnívat, že tyto normy nelze splnit, měly by se koncentrace kyslíku a oxidu uhličitého měřit.

Teplota a relativní vlhkost v komoře

18. Teplota v komoře by se měla udržovat na 22 ± 3 °C. Relativní vlhkost v zóně, kde zvířata dýchají, jak při expozici pouze nazální cestou, tak při celotělové expozici, by se měla sledovat a zaznamenat alespoň třikrát při trvání expozice až 4 hodiny a každou hodinu při kratších expozicích. Relativní vlhkost by se měla v ideálním případě udržovat v rozmezí 30 až 70 %, to však nemusí být proveditelné (např. při zkoušení směsí na bázi vody) nebo ji nemusí být možné změřit v důsledku interference zkoušené chemické látky se zkušební metodou.

▼M4

Zkoušená chemická látka: nominální koncentrace

19. Je-li to možné, měla by se vypočítat a zaznamenat nominální koncentrace zkoušené chemické látky v expoziční komoře. Nominální koncentrace je hmotnost generované zkoušené chemické látky vydělená celkovým objemem vzduchu procházejícím komorovým systémem. Nominální koncentrace se nepoužívá k charakterizaci expozice zvířat, avšak porovnání nominální koncentrace a skutečné koncentrace je ukazatelem výkonnosti zkušebního systému při generování zkušební atmosféry, a tudíž ji lze použít k odhalení problémů při generování.

Zkoušená chemická látka: skutečná koncentrace

20. Skutečná koncentrace je koncentrace zkoušené chemické látky v zóně, kde zvířata dýchají, v inhalační komoře. Skutečné koncentrace lze změřit specifickými metodami (např. přímý odběr vzorků, adsorpční metody nebo metody založené na chemické reakci a následná analytická charakterizace) nebo nespecifickými metodami, jako je vážková analýza (gravimetrie). Použití gravimetrie je přípustné pouze u práškových aerosolů obsahujících jedinou složku nebo u aerosolů z kapalin s nízkou těkavostí a mělo by se podložit příslušnou specifickou charakterizací zkoušené chemické látky před provedením studie. Koncentraci práškového aerosolu sestávajícího z více složek lze rovněž stanovit gravimetricky. Vyžaduje to však analytické údaje, které prokazují, že složení materiálu ve vzduchu je podobné složení výchozího materiálu. Nejsou-li tyto informace k dispozici, může být nutné provádět během studie v pravidelných intervalech opakovanou analýzu zkoušené chemické látky (ideálně ve vzdušné formě). U látek v aerosolové formě, které se mohou vypařovat nebo sublimovat, by se mělo prokázat, že byly vybranou metodou zachyceny všechny fáze. Ve zprávě o studii by se měly uvést cílové, nominální a skutečné koncentrace, avšak k výpočtu hodnot letální koncentrace ve statistických analýzách se použijí pouze skutečné koncentrace.

21. Měla by se použít pokud možno jedna šarže zkoušené chemické látky a zkoušený vzorek by se měl uchovávat za podmínek, které udržují jeho čistotu, homogenitu a stabilitu. Před zahájením studie by se měla provést charakterizace zkoušené chemické látky, včetně určení její čistoty a, je-li to technicky proveditelné, identity a množství identifikovaných kontaminujících látek a nečistot. Je možné to prokázat mimo jiné těmito údaji: retenční čas a relativní šířka píku, molekulová hmotnost z hmotnostní spektroskopie nebo plynové chromatografie nebo jiné odhady. Přestože určení identity zkoušeného vzorku není povinností laboratoře provádějící zkoušku, bývá rozumné, ověřit si charakterizaci látky poskytnutou zadavatelem, a sice alespoň omezeným způsobem (např. barva, fyzikální povaha atd.).

22. Expoziční atmosféra by se měla udržovat co možná nejstálejší a měla by se monitorovat buď nepřetržitě, nebo v pravidelných intervalech v závislosti na analytické metodě. Používá-li se odběr vzorků v pravidelných intervalech, měly by se vzorky atmosféry v komoře odebrat ve čtyřhodinové studii alespoň dvakrát. Není-li to v důsledku omezené rychlosti proudění vzduchu nebo nízké koncentrace možné, může se během celého období expozice odebrat jeden vzorek. Objeví-li se výrazné výkyvy mezi jednotlivými vzorky, měly by se u dalších zkoušených koncentrací použít čtyři vzorky na každou expozici. Jednotlivé vzorky k stanovení koncentrace v komoře by se neměly lišit od průměrné hodnoty koncentrace v komoře o více než ± 10 % u plynů a par a o více než ± 20 % u kapalných nebo pevných aerosolů. Měla by se vypočítat a zaznamenat doba potřebná k dosažení rovnovážného stavu v komoře (t_{95}). Doba trvání expozice zahrnuje i dobu, během níž je zkoušená chemická látka generována, a ta bere v úvahu dobu nutnou k dosažení t_{95}. Pokyny k výpočtu t_{95} naleznete v dokumentu GD 39 (8).

▼M4

23. U vysoce komplexních směsí složených z par/plynů a aerosolů (např. atmosféry obsahující produkty spalování a zkoušené chemické látky vystřikované z účelových výrobků/zařízení pro koncové použití) se může každá fáze chovat v inhalační komoře odlišně, proto by se pro každou fázi (pára/plyn a aerosol) měla zvolit alespoň jedna indikační látka (analyt), obvykle hlavní účinná látka ve směsi. Je-li zkoušená chemická látka směsí, měla by se uvést analytická koncentrace celkové směsi, a nikoliv pouze účinné látky nebo složky (analytu). Další informace týkající se skutečných koncentrací naleznete v dokumentu GD 39 (8).

Zkoušená chemická látka: distribuce velikosti částic

24. Distribuce velikosti částic aerosolů by se měla během čtyřhodinové expozice stanovit alespoň dvakrát pomocí kaskádového impaktoru nebo jiného přístroje, např. aerodynamického spektrometru částic. Je-li možné prokázat shodu výsledků získaných pomocí kaskádového impaktoru nebo jiného přístroje, může se tento jiný přístroj používat v průběhu celé studie. Kromě primárního přístroje by se měl použít ještě druhý přístroj, např. gravimetrický filtr nebo impinger/plynová promývačka, k ověření účinnosti záchytu primárním přístrojem. Hmotnostní koncentrace získaná analýzou velikosti částic by měla ležet v přiměřeném rozmezí hmotnostní koncentrace získané vážkovou analýzou [viz dokument GD 39 (8)]. Je-li možné v časné fázi studie prokázat jejich rovnocennost, lze od dalších potvrzujících měření upustit. Z důvodu zajištění dobrých životních podmínek zvířat by se měly podniknout kroky k minimalizaci neprůkazných údajů, které mohou vést k nutnosti opakovat expozici. U par by se mělo provést měření velikosti částic, pokud existuje možnost, že kondenzace páry povede ke vzniku aerosolu nebo pokud jsou v parách detekovány částice s potenciálem pro tvorbu smíšených fází (viz odstavec 14).

POSTUP

Hlavní zkouška

25. Pro každý krok se použijí tři zvířata od každého pohlaví nebo šest zvířat citlivějšího pohlaví. Jsou-li k expozici pouze nazální cestou použity jiné druhy hlodavců než potkani, je možno upravit maximální doby trvání expozice za účelem minimalizace druhově specifického utrpení. Úroveň koncentrace, která se má použít jako počáteční dávka, se vybere z jedné ze čtyř fixních úrovní, přičemž by počáteční úroveň koncentrace měla být ta, jež u některých z exponovaných zvířat nejpravděpodobněji způsobí toxicitu. Schémata zkoušek pro plyny, páry a aerosoly (zahrnutá v dodatcích 2–4) představují zkoušky s mezními hodnotami pro kategorie 1–4 dle nařízení CLP (9) pro plyny (100, 500, 2 500, 20 000 ppm/4 h) (dodatek 2), pro páry (0,5, 2, 10, 20 mg/l/4 h) (dodatek 3) a pro aerosoly (0,05, 0,5, 1,5 mg/l/4 h) (dodatek 4). Kategorie 5, která není v nařízení (ES) č. 1272/2008 zavedena (9), se týká koncentrací přesahujících příslušné mezní koncentrace. Pro každou počáteční koncentraci se používá příslušné schéma zkoušky. Postup zkoušení se řídí naznačenými šipkami v závislosti na počtu humánně utracených nebo uhynulých zvířat, dokud není možné provést kategorizaci.

26. Časový interval mezi exponovanými skupinami závisí na době nástupu, trvání a závažnosti příznaků toxicity. S expozicí zvířat další úrovni koncentrace by se mělo vyčkat, dokud není dostatečná jistota, že dříve zkoušená zvířata přežila. Mezi jednotlivými expozicemi na každé úrovni koncentrace se doporučuje ponechat dobu tří nebo čtyř dnů, aby bylo umožněno pozorování zpožděné toxicity. Časový interval lze podle potřeby upravit, např. v případě neprůkazné odezvy.

▼M4

Limitní zkouška

27. Limitní zkouška se používá v případě, že je o zkoušené chemické látce známo nebo se o ní předpokládá, že je prakticky netoxická, tj. vyvolává toxickou reakci pouze při koncentraci vyšší, než je regulační mezní koncentrace. Informace o toxicitě zkoušené chemické látky lze získat ze znalostí o podobných zkoušených látkách či podobných směsích, vezme-li se v úvahu identita a procento složek, o nichž se ví, že jsou toxikologicky významné. V situacích, kdy existuje jen málo informací nebo vůbec žádné informace o toxicitě nebo kdy se očekává, že zkoušená chemická látka bude toxická, by se měla provést hlavní zkouška [další pokyny naleznete v dokumentu GD 39 (8)].

28. Při použití obvyklého postupu se tři zvířata od každého pohlaví nebo šest zvířat citlivějšího pohlaví vystaví koncentracím 20 000 ppm u plynů, 20 mg/l u par a 5 mg/l u prachů/mlh (jsou-li dosažitelné), což slouží jako limitní zkouška pro tuto zkušební metodu. Při zkoušení aerosolů by mělo být primárním cílem dosažení vdechovatelné velikosti částic (tj. MMAD = 1–4 μm). U většiny zkoušených chemických látek toho lze dosáhnout při koncentraci 2 mg/l. Zkoušení aerosolů při koncentracích větších než 2 mg/l by se mělo provádět pouze tehdy, lze-li dosáhnout vdechovatelné velikosti částic [viz dokument GD 39 (8)]. V souladu s GHS (16) se nedoporučuje provádět zkoušky při koncentracích přesahujících mezní koncentraci z důvodu zajištění dobrých životních podmínek zvířat. O zkoušce v GHS kategorii 5 (16), která není zavedena v nařízení (ES) č. 1272/2008 (9), by se mělo uvažovat pouze v případě, existuje-li velká pravděpodobnost, že výsledky takové zkoušky budou mít přímý význam pro ochranu lidského zdraví, a ve zprávě ze studie se uvede zdůvodnění. V případě potenciálně výbušných zkoušených chemických látek je třeba se pečlivě vyvarovat podmínek příznivých pro explozi. Aby se zamezilo zbytečnému použití zvířat, měla by se před limitní zkouškou provést jedna zkouška bez zvířat, aby se zajistilo, že lze v komoře dosáhnout podmínek pro limitní zkoušku.

POZOROVÁNÍ

29. Během období expozice by se měla zvířata často klinicky sledovat. Po expozici by se měla v den expozice provést klinická pozorování alespoň dvakrát nebo častěji, pokud to naznačuje odezva zvířat na expozici a poté alespoň jednou denně po dobu celkem 14 dní. Délka období sledování není fixní, nýbrž by se měla určit na základě povahy a doby nástupu klinických příznaků a délky období zotavení. Doba, kdy se příznaky toxicity objeví a vymizí, je důležitá zejména v případě tendence ke zpožděným příznakům toxicity. Všechna sledování se systematicky zaznamenávají, přičemž záznamy se vedou zvlášť pro každé zvíře. Umírající zvířata a zvířata se známkami prudkých bolestí nebo s přetrvávajícími příznaky značného utrpení by se měla humánně utratit z důvodu zajištění dobrých životních podmínek zvířat. Při vyšetřování klinických příznaků toxicity je třeba dbát na to, aby se počáteční špatný stav a přechodné respirační změny v důsledku postupu expozice neinterpretovaly mylně jako účinky spojené se zkoušenou chemickou látkou. Měly by se vzít v úvahu principy a kritéria shrnuté v dokumentu o humánních parametrech (7). Pokud jsou zvířata z humánních důvodů utracena nebo je zjištěn jejich úhyn, je nutné dobu uhynutí zaznamenat co nejpřesněji.

▼M4

30. Pozorování v kleci se soustřeďují na změny na kůži, na srsti, na očích, na sliznicích a rovněž změny dýchání, krevního oběhu, změny funkce autonomní a centrální nervové soustavy, somatomotorické aktivity a chování. Je-li to možné, měly by se zaznamenat jakékoli rozdíly mezi místními a systémovými účinky. Pozornost je třeba věnovat pozorování tremoru, křečí, slinění, průjmu, letargie, spánku a kómatu. Měření rektální teploty může poskytnout podpůrné důkazy pro reflexní bradypnoe nebo hypo/hypertermii spojenou s expozicí nebo držením v kleci.

Tělesné hmotnosti

31. Hmotnosti jednotlivých zvířat by se měly zaznamenat jednou během období aklimatizace, v den expozice před expozicí (den 0) a minimálně 1., 3. a 7. den (a poté jednou týdně) a v době uhynutí nebo utracení, pokud k němu dojde po dni 1. Tělesná hmotnost je uznávaná jako zásadní ukazatel toxicity a zvířata vykazující přetrvávající úbytek hmotnosti $\geq$ 20 % v porovnání s hodnotami před studií by se měla pečlivě sledovat. Na konci období po expozici se zvířata, která přežila, zváží a humánně utratí.

Patologie

32. Všechna pokusná zvířata, včetně těch, která v průběhu zkoušky uhynula nebo byla utracena z důvodu zajištění dobrého zacházení se zvířaty, by se měla podrobit pitvě. Není-li možno pitvu provést ihned po objevení uhynulého zvířete, mělo by se zvíře uchovávat v chladicím boxu (nikoli zmrazené) při teplotách dostatečně nízkých k minimalizaci autolýzy. Pitvy by se měly provést co možná nejdříve, obvykle během jednoho nebo dvou dnů. U každého zvířete by se měly zaznamenat všechny makroskopické patologické nálezy, přičemž se věnuje zvláštní pozornost jakýmkoli nálezům v dýchacích cestách.

33. Další vyšetření zahrnutá *a priori* v návrhu lze zvážit za účelem rozšíření interpretační hodnoty studie, např. měření hmotnosti plic přeživších potkanů a/nebo poskytnutí důkazů o podráždění pomocí mikroskopického vyšetření dýchacích cest. Mezi vyšetřované orgány mohou patřit ty, které vykazují makroskopické patologické známky u zvířat přežívajících po 24 či více hodin a orgány, o nichž je známo nebo se očekává, že budou postiženy. Mikroskopické vyšetření celých dýchacích cest může poskytnout užitečné informace u zkoušených chemických látek, které reagují s vodou, například u kyselin a hygroskopických zkoušených materiálů.

ÚDAJE A JEJICH PŘEDKLÁDÁNÍ

Údaje

34. Měly by se uvést údaje o tělesné hmotnosti a pitevních nálezech pro každé jednotlivé zvíře. Údaje z klinického sledování by se měly shrnout do tabulky, přičemž se u každé zkušební skupiny uvede počet použitých zvířat, počet zvířat vykazujících příznaky toxicity, počet zvířat uhynulých v průběhu zkoušky nebo utracených z humánních důvodů, doba uhynutí jednotlivých zvířat, popis, časový průběh a vratnost toxických účinků a pitevní nálezy.

▼M4

Protokol o zkoušce

35. Protokol o zkoušce by měl obsahovat následující informace:

Pokusná zvířata a podmínky chovu

— popis podmínek v klecích uvádějící: počet (nebo změnu počtu) zvířat v každé kleci, materiál podestýlky, teplotu a relativní vlhkost prostředí, světelné období a druh stravy,

— použitý druh/kmen a odůvodnění použití jiného druhu než potkana,

— počet, věk, a pohlaví zvířat,

— metoda randomizace,

— podrobnosti o jakosti vody a krmiva (včetně druhu/zdroje stravy, zdroje vody),

— popis jakékoliv přípravy před zkouškou včetně stravy, karantény a léčby onemocnění.

Zkoušená chemická látka

— fyzikální povaha, čistota a tam, kde je to podstatné, fyzikálně-chemické vlastnosti (včetně izomerizace),

— identifikační údaje a číslo v registru Chemical Abstract Services (CAS), je-li známo.

Nosič

— zdůvodnění použití nosiče a zdůvodnění výběru nosiče (pokud se nepoužije voda),

— historické nebo současné údaje prokazující, že nosič neovlivňuje výsledek studie.

Inhalační komora

— popis inhalační komory včetně jejích rozměrů a objemu,

— zdroj a popis zařízení použitého pro expozici zvířat a rovněž pro generování atmosféry,

— zařízení pro měření teploty, vlhkosti, velikosti částic a skutečné koncentrace,

— zdroj vzduchu, úprava dodávaného/odsávaného vzduchu a systém použitý pro klimatizaci,

— metody použité ke kalibraci zařízení k zajištění homogenní zkušební atmosféry,

— rozdíl tlaků (kladný nebo záporný),

— počet expozičních otvorů v každé komoře (nazální expozice), umístění zvířat v systému (celotělová expozice),

— homogenita/stabilita zkušební atmosféry v čase,

— umístění teplotních čidel a čidel vlhkosti a odběr vzorků zkušební atmosféry v komoře,

— průtokové rychlosti vzduchu, průtoková rychlost vzduchu/expoziční otvor (nazální expozice) nebo množství zvířat/komora (celotělová expozice),

— informace o zařízení použitém k měření kyslíku a oxidu uhličitého, používá-li se,

▼**M4**

— doba nutná k dosažení rovnovážného stavu v inhalační komoře (t_{95}),

— počet změn objemu za hodinu,

— měřicí přístroje (používají-li se).

Údaje o expozici

— zdůvodnění výběru cílové koncentrace v hlavní studii,

— nominální koncentrace (celková hmotnost zkoušené chemické látky generované do inhalační komory vydělená objemem vzduchu prošlým komorou),

— skutečné koncentrace zkoušené chemické látky naměřené v dýchací zóně zvířat. U zkoušených směsí, které vytvářejí heterogenní fyzikální formy (plyny, páry, aerosoly), je možné analyzovat každou zvlášť,

— veškeré koncentrace látky ve vzduchu by se měly uvádět v hmotnostních jednotkách (např. mg/l, mg/m^3, atd.), v závorce lze uvést také hodnotu v objemových jednotkách (např. ppm, ppb),

— distribuce velikosti částic, hmotnostní medián aerodynamického průměru (MMAD) a geometrická směrodatná odchylka (σ_g), včetně metod jejich výpočtu. Měly by se uvést jednotlivé analýzy velikosti částic.

Zkušební podmínky

— podrobné údaje o přípravě zkoušené chemické látky včetně postupů použitých k snížení velikosti částic pevných látek nebo k přípravě roztoků zkoušené chemické látky. V případě, kdy mohly mechanické postupy změnit chemické složení zkoušené látky, uveďte také výsledky analýz ověřujících složení zkoušené chemické látky,

— popis (pokud možno obsahující nákres) zařízení použitého ke generování zkušební atmosféry k expozici zvířat zkušební atmosféře,

— podrobné údaje o použité chemické analytické metodě a validaci metody (včetně účinnosti výtěžnosti zkoušené chemické látky ze vzorkovaného média),

— zdůvodnění výběru zkoušených koncentrací.

Výsledky

— tabulka s údaji o teplotě, vlhkosti a průtoku vzduchu v komoře,

— tabulka s údaji o nominální a skutečné koncentraci v komoře,

— tabulka s údaji o velikosti částic včetně údajů o odběru analytických vzorků, distribuce velikosti částic a výpočtů MMAD a σ_g,

— tabulka s údaji o reakci a úrovni koncentrace u každého zvířete (tj. zvířata vykazující příznaky toxicity, včetně mortality, charakteru, závažnosti a trvání účinků),

— hmotnosti jednotlivých zvířat naměřené ve dnech studie, datum a čas uhynutí, pokud k němu došlo před plánovaným utracením, časový průběh nástupu příznaků toxicity a zda byly vratné u každého ze zvířat,

▼M4

— pitevní a histopatologické nálezy pro každé zvíře, pokud jsou k dispozici,

— klasifikační kategorie dle nařízení CLP a mezní hodnota LC_{50}.

Diskuse a interpretace výsledků

— měl by se klást zvláštní důraz na popis metod použitých ke splnění kritérií této zkušební metody, např. mezní koncentrace nebo velikost částic,

— je třeba zabývat se vdechovatelností částic s ohledem na celkové nálezy, zejména pokud nebylo možno splnit kritéria pro velikost částic,

— v celkovém hodnocení studie by se měla uvést konzistentnost metod použitých k stanovení nominálních a skutečných koncentrací a vztah mezi aktuální a skutečnou koncentrací,

— měla by se uvést pravděpodobná příčina úhynu a převládající mechanismus účinku (systémový nebo místní),

— mělo by se uvést vysvětlení, pokud bylo nutno humánně utratit zvířata trpící bolestí nebo vykazující známky intenzivního a přetrvávajícího utrpení, na základě kritérií uvedených v dokumentu OECD o humánních parametrech (7).

LITERATURA:

1) Kapitola B.2 této přílohy, Akutní toxicita (inhalační).

2) Holzhütter H-G, Genschow E, Diener W, and Schlede E (2003). Dermal and Inhalation Acute Toxicity Class Methods: Test Procedures and Biometric Evaluations for the Globally Harmonized Classification System. *Arch. Toxicol.* 77: 243-254.

3) Diener W, Kayser D and Schlede E (1997). The Inhalation Acute-Toxic-Class Method; Test Procedures and Biometric Evaluations. *Arch. Toxicol.* 71: 537-549.

4) Diener W and Schlede E (1999). Acute Toxic Class Methods: Alternatives to LD/LC_{50} Tests. *ALTEX* 1: 129-134.

5) Kapitola B.1 tris této přílohy, Akutní orální toxicita - metoda stanovení třídy akutní toxicity.

6) OECD (2009). Report on Biostatistical Performance Assessment of the Draft TG 436 Acute Toxic Class Testing Method for Acute Inhalation Toxicity. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 105, OECD, Paris. Dostupné na: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

7) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 19. Dostupné na: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

8) OECD (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 39, OECD, Paris. Dostupné na: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

9) Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1272/2008 ze dne 16. prosince 2008 o klasifikaci, označování a balení látek a směsí, o změně a zrušení směrnic 67/548/EHS a 1999/45/ES a o změně nařízení (ES) č. 1907/2006, Úř. věst. L 353, 31.12.2008, s. 1.

▼**M4**

10) Kapitola B.40 této přílohy, Leptavé účinky na kůži in vitro: Zkouška trans-kutánního elektrického odporu (TER).

11) Kapitola B.40 bis této přílohy, Leptavé účinky na kůži in vitro: Zkouška pomocí modelu lidské kůže.

12) OECD (2005). In Vitro Membrane Barrier Test Method for Skin Corrosion. OECD Guideline for testing of chemicals No. 435, OECD, Paris. Dostupné na: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

13) Phalen RF (2009). Inhalation Studies: Foundations and Techniques. (2nd Edition) Informa Healthcare, New York.

14) SOT (1992). Technical Committee of the Inhalation Specialty Section, Society of Toxicology (SOT). Recommendations for the Conduct of Acute Inhalation Limit Tests. *Fund. Appl. Toxicol.* 18: 321-327.

15) Pauluhn J and Thiel A (2007). A Simple Approach to Validation of Directed-Flow Nose-Only Inhalation Chambers. J. Appl. Toxicol. 27: 160-167

16) UN (2007), United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), ST/SG/AC.10/30, UN New York and Geneva. Dostupné na: [http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_welcome_e.html]

▼**M4**

Dodatek 1

DEFINICE

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

▼M4

Dodatek 2

Postup, který je nutno dodržet u každé z výchozích koncentrací u plynů (ppm/4h)

Obecné poznámky ([1])

Systém zkoušení u každé výchozí koncentrace obsažený v této příloze nastiňuje postup, který je třeba sledovat.

Dodatek 2a: Výchozí koncentrace je 100 ppm

Dodatek 2b: Výchozí koncentrace je 500 ppm

Dodatek 2c: Výchozí koncentrace je 2 500 ppm

Dodatek 2d: Výchozí koncentrace je 20 000 ppm

Postup zkoušení se řídí naznačenými šipkami v závislosti na počtu humánně utracených nebo uhynulých zvířat.

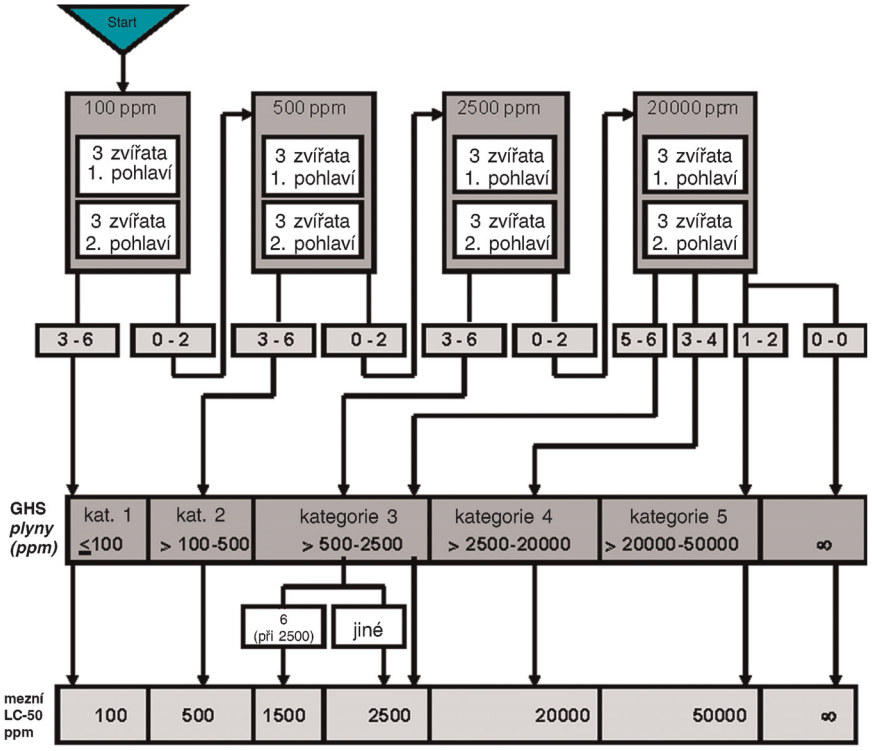
([1]) V následujících tabulkách je uveden odkaz na GHS (globálně harmonizovaný systém klasifikace a označování chemických látek). V EU mu odpovídá nařízení (ES) č. 1272/2008. V případě akutní inhalační toxicity nařízení (ES) č. 1272/2008 (9) nezavádí kategorii 5.

▼M4

Dodatek 2a

Testy akutní toxicity:

Zkušební postupy s výchozí koncentrací plynů 100 ppm/4h



— 3 ♂ + 3 ♀, or 6 nebo 6 zvířat citlivějšího pohlaví na jeden krok

— 0-6: počet umírajících nebo uhynulých zvířat / zkoušenou koncentraci

— GHS: Globally Harmonized Classification System

— ∞: neklasifikováno

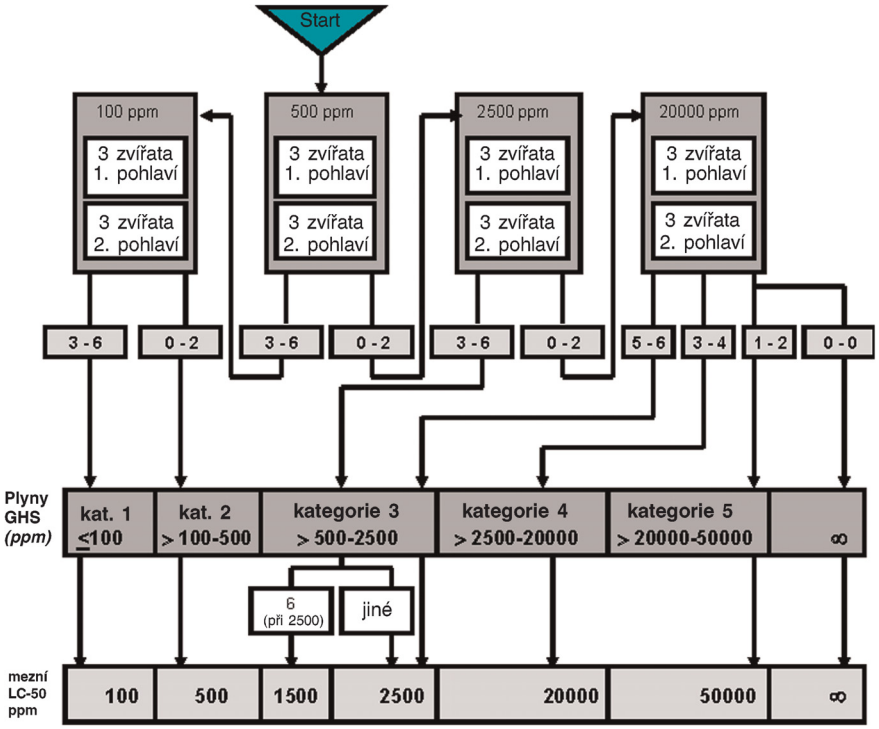
— zkoušeno při = 20 000 ppm/4h: viz pokyny 39 (8)

▼M4

Dodatek 2b

Akutní inhalační toxicita:

Zkušební postup s výchozí koncentrací plynů 500 ppm/4h



— 3 ♂ + 3 ♀, nebo 6 zvířat citlivějšího pohlaví na jeden krok

— 0-6: počet umírajících nebo uhynulých zvířat / zkoušenou koncentraci

— GHS: globálně harmonizovaný systém klasifikace a označov ání chemických látek

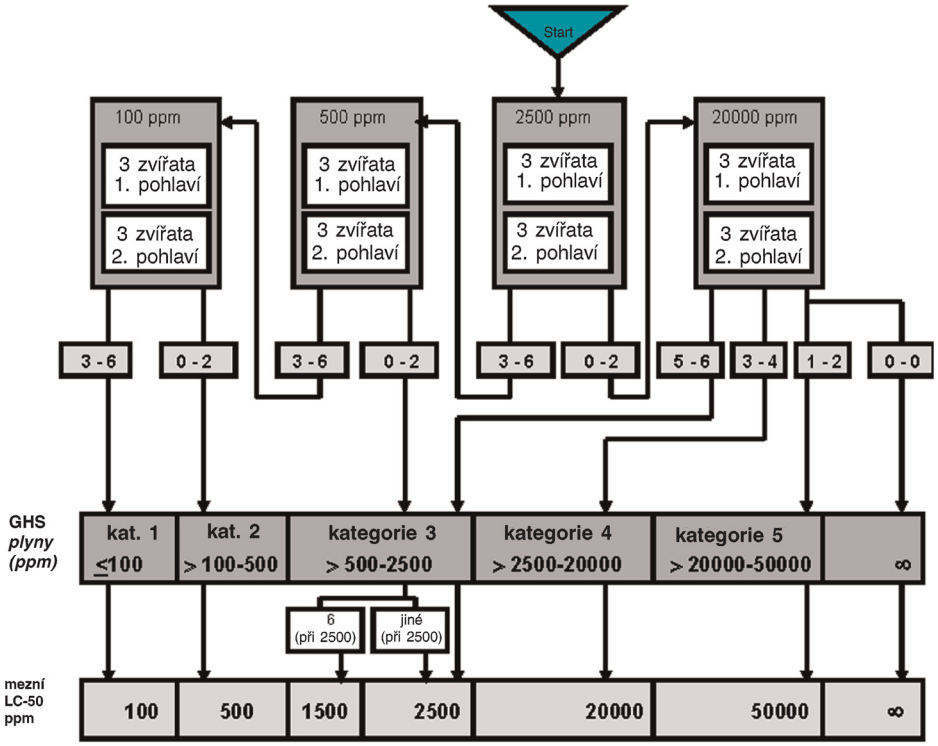
— zkoušeno při ≥ 20000 ppm/4h: viz pokyny 39 (8)

▼M4

Dodatek 2c

Akutní inhalační toxicita:

Zkušební postup s výchozí koncentrací plynů 2 500 ppm/4h



— 3 ♂ + 3 ♀, or 6 nebo 6 zvířat citlivějšího pohlaví na jeden krok

— 0–6: počet umírajících nebo uhynulých zvířat / zkoušenou koncentraci

— GHS: globálně harmoniovaný systém klasifikace a označování chemických látek

— ∞: neklasifikováno

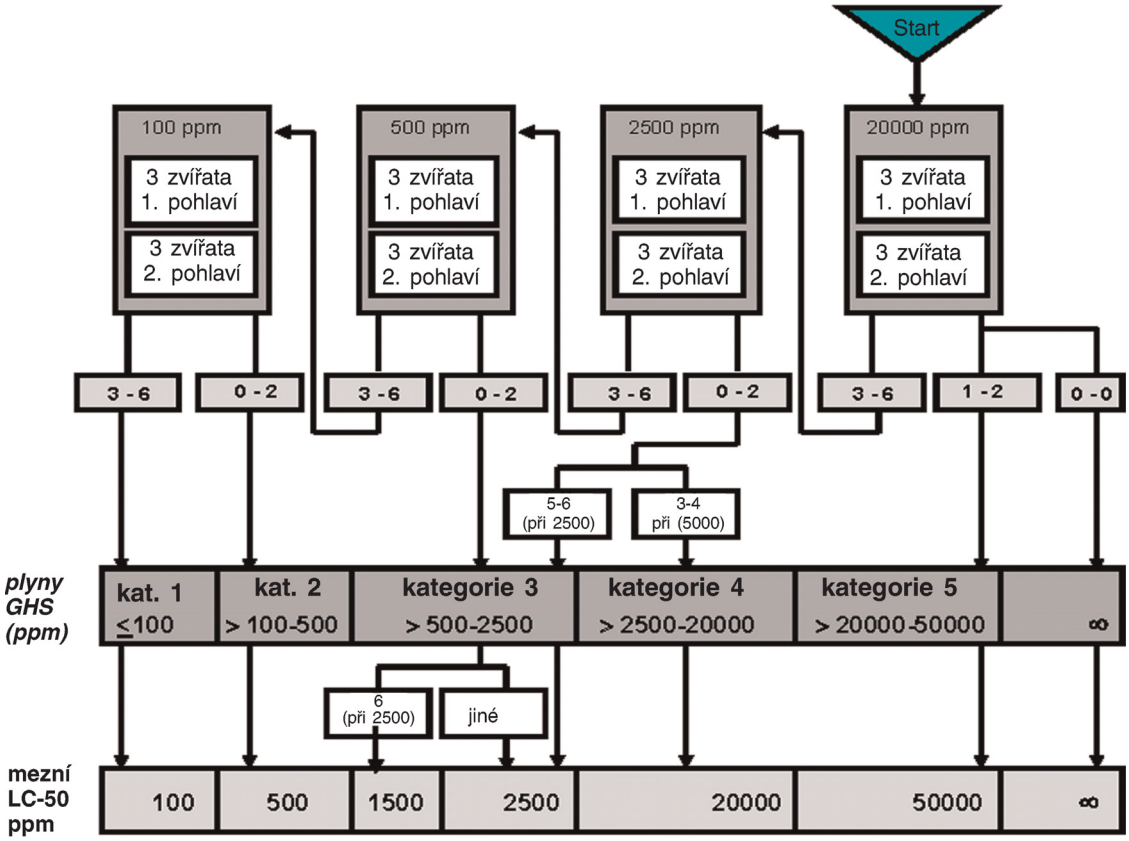
— zkoušeno při ≥ 20000 ppm/4h: viz pokyny 39 (8)

▼M4

Dodatek 2d

Akutní inhalační toxicita:

Zkušební postup s výchozí koncentrací plynů 20 000 ppm/4h



— 3 ♂ + 3 ♀, or 6 nebo 6 zvířat citlivějšího pohlaví na jeden krok

— 0-6: počet umírajících nebo uhynulých zvířat / zkoušenou koncentraci

— GHS: globálně harmoniovaný systém klasifikace a označování chemických látek

— ∞: neklasifikováno

— zkoušeno při ≥ 20000 ppm/4h: viz pokyny 39 (8)

▼M4

Dodatek 3

Postup, který je nutno dodržet u každé z výchozích koncentrací u par (mg/1/4h)

Obecné poznámky ([1])

Systém zkoušení u každé výchozí koncentrace obsažený v této příloze nastiňuje postup, který je třeba sledovat.

Dodatek 3a: Výchozí koncentrace je 0,5 mg/l

Dodatek 3b: Výchozí koncentrace je 2,0 mg/l

Dodatek 3c: Výchozí koncentrace je 10 mg/l

Dodatek 3d: Výchozí koncentrace je 20 mg/l

Postup zkoušení se řídí naznačenými šipkami v závislosti na počtu humánně utracených nebo uhynulých zvířat.

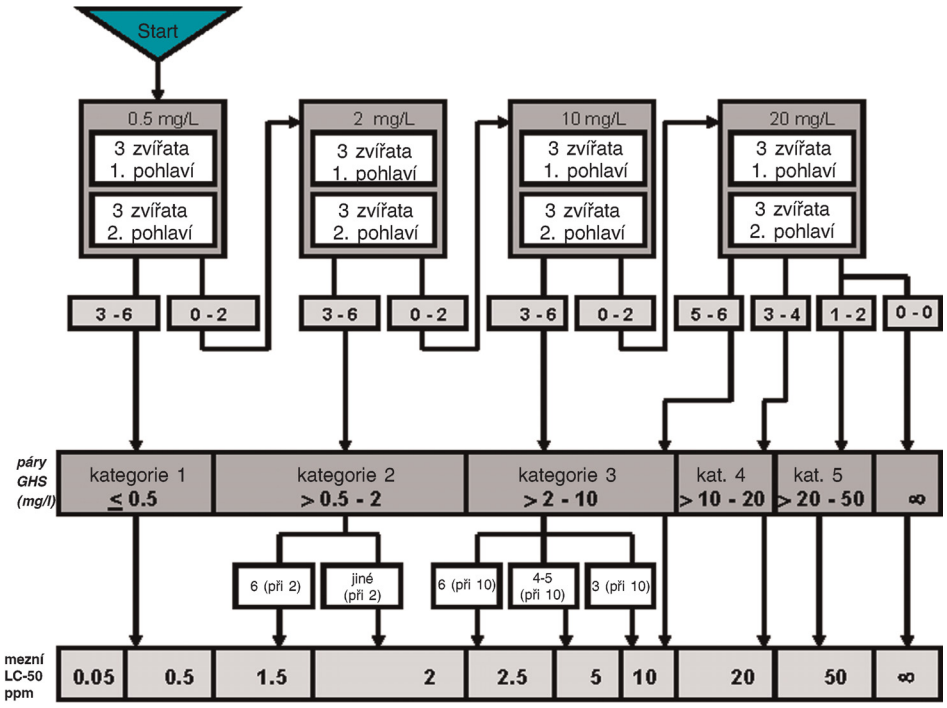
([1]) V následujících tabulkách je uveden odkaz na GHS (globálně harmonizovaný systém klasifikace a označování chemických látek). V EU mu odpovídá nařízení (ES) č. 1272/2008. V případě akutní inhalační toxicity nařízení (ES) č. 1272/2008 (9) nezavádí kategorii 5.

▼**M4**

Dodatek 3a

Akutní inhalační toxicita:

Zkušební postup s výchozí koncentrací par 0,5 mg/l/4h



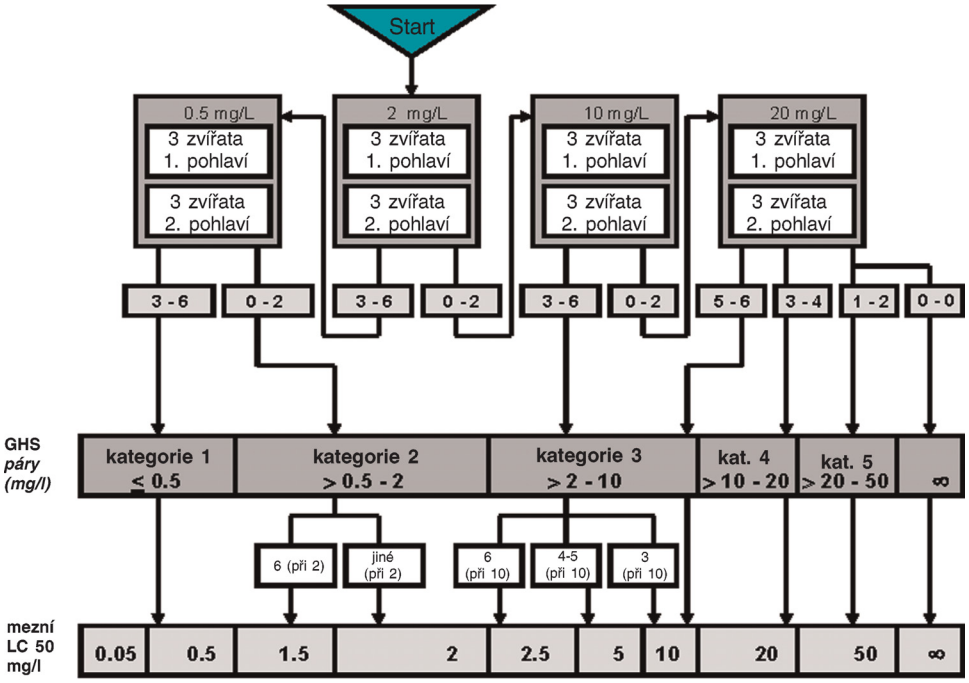
— 3 ♂ + 3 ♀, or 6 nebo 6 zvířat citlivějšího pohlaví na jeden krok
— 0-6: počet umírajících nebo uhynulých zvířat / zkoušenou koncentraci
— GHS: globálně harmoniovaný systém klasifikace a označování chemických látek
— ∞: neklasifikováno
— zkoušeno při 50 mg/l/4h: viz pokyny 39 (8)

▼M4

Dodatek 3b

Akutní inhalační toxicita:

Zkušební postup s výchozí koncentrací par 2 mg/l/4h



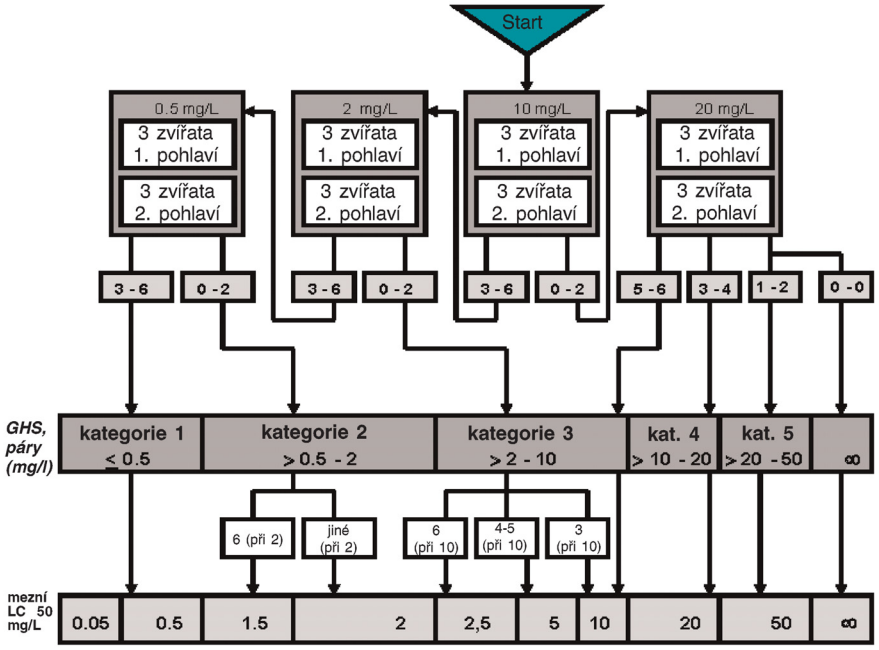
— 3 ♂ + 3 ♀, or 6 nebo 6 zvířat citlivějšího pohlaví na jeden krok
— 0–6: počet umírajících nebo uhynulých zvířat / zkoušenou koncentraci
— GHS: globálně harmoniovaný systém klasifikace a označování chemických látek
— ∞: neklasifikováno
— zkoušeno při 50 mg/l/4h: viz pokyny 39 (8)

▼M4

Dodatek 3c

Akutní inhalační toxicita:

Zkušební postup s výchozí koncentrací par 10 mg/L/4h



— 3 ♂ + 3 ♀, or 6 nebo 6 zvířat citlivějšího pohlaví na jeden krok

— 0–6: počet umírajících nebo uhynulých zvířat / zkoušenou koncentraci

— GHS: globálně harmoniovaný systém klasifikace a označování chemických látek

— ∞: neklasifikováno

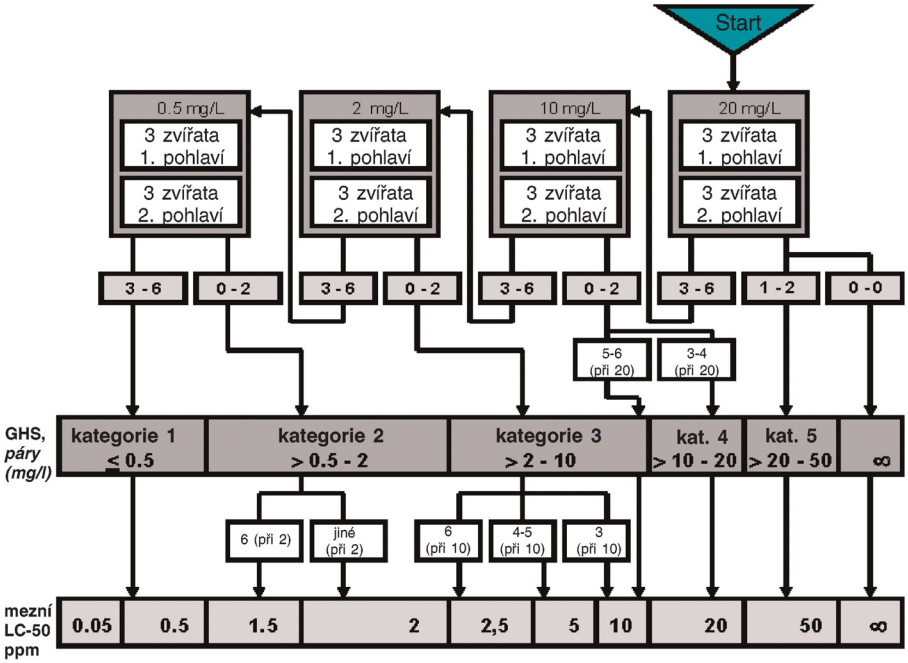
— zkoušeno při 50 mg/l/4h: viz pokyny 39 (8)

▼M4

Dodatek 3d

Akutní inhalační toxicita:

Zkušebnní postup s výchozí koncentrací par 20 mg/l/4h



— 3 ♂ + 3 ♀, nebo 6 zvířat citlivějšího pohlaví na jeden krok

— 0-6: počet umírajících nebo uhynulých zvířat / zkoušenou koncentraci

— GHS: globálně harmoniovaný systém klasifikace a označování chemických látek

— ∞: neklasifikováno

— zkoušeno při 50 mg/l/4h: viz pokyny 39 (8)

▼M4

Dodatek 4

Postup, který je nutno dodržet u každé z výchozích koncentrací u aerosolů (mg/1/4h)

Obecné poznámky ([1])

Systém zkoušení u každé výchozí koncentrace obsažený v této příloze nastiňuje postup, který je třeba sledovat.

Dodatek 4a: Výchozí koncentrace je 0,05 mg/l

Dodatek 4b: Výchozí koncentrace je 0,5 mg/l

Dodatek 4c: Výchozí koncentrace je 1 mg/l

Dodatek 4d: Výchozí koncentrace je 5 mg/l

Postup zkoušení se řídí naznačenými šipkami v závislosti na počtu humánně utracených nebo uhynulých zvířat.

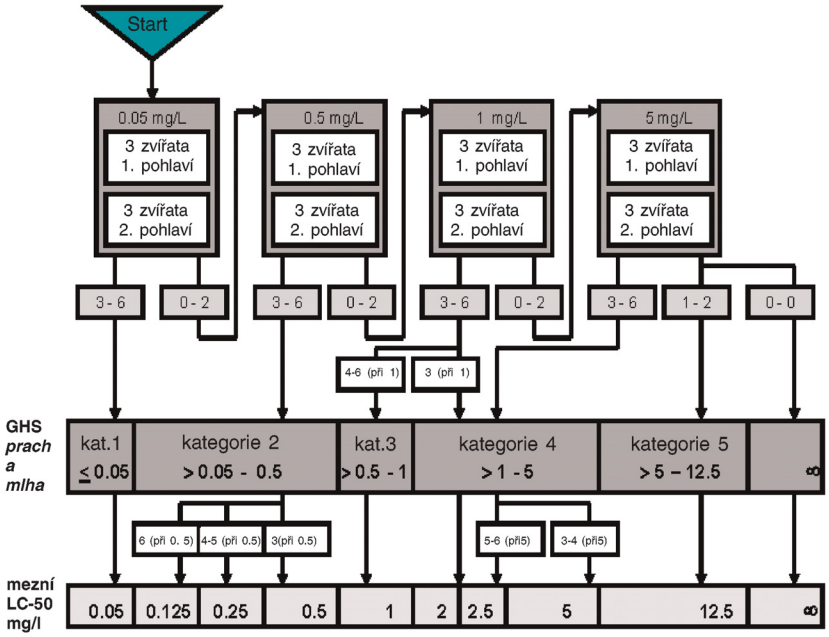
([1]) V následujících tabulkách je uveden odkaz na GHS (globálně harmonizovaný systém klasifikace a označování chemických látek). V EU mu odpovídá nařízení (ES) č. 1272/2008. V případě akutní inhalační toxicity nařízení (ES) č. 1272/2008 (9) nezavádí kategorii 5.

▼M4

Dodatek 4a

Akutní inhalační toxicita:

Zkušební postup s výchozí koncentrací par 0,05 mg/L/4h



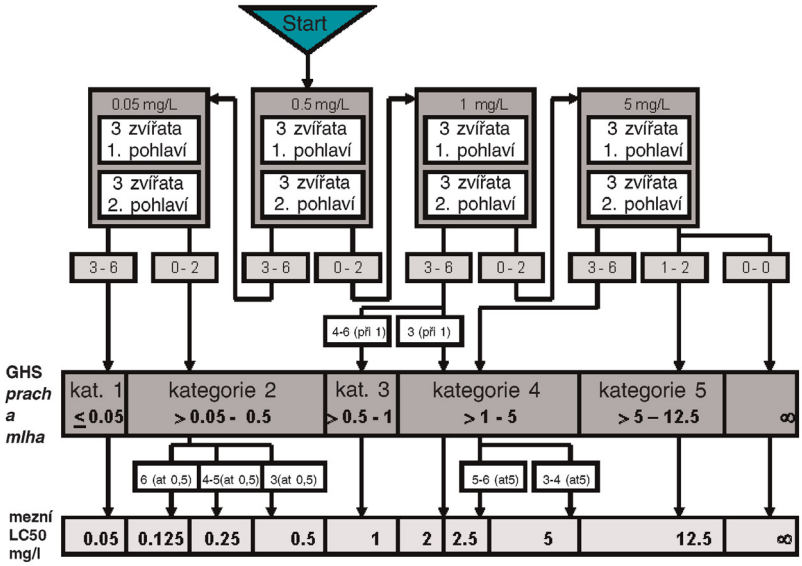
— 3 ♂ + 3 ♀, nebo 6 zvířat citlivějšího pohlaví na jeden krok
— 0-6: počet umírajících nebo uhynulých zvířat / zkoušenou koncentraci
— GHS: globálně harmoniovaný systém klasifikace a označování chemických látek
— ∞: neklasifikováno
— zkoušeno při 12,5 mg/l/4h: viz pokyny 39 (8)

▼M4

Dodatek 4b

Akutní inhalační toxicita:

Zkušební postup s výchozí konkcentrací aerosolů 0,5 mg/l/4h



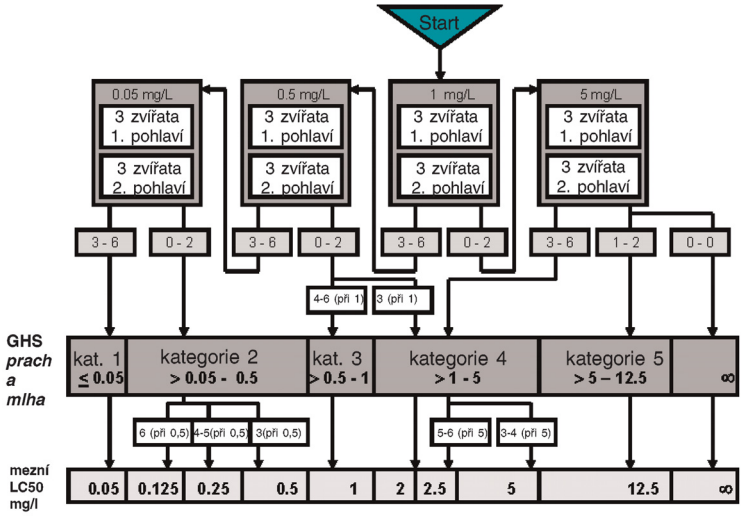
— 3 ♂ + 3 ♀, nebo 6 zvířat citlivějšího pohlaví na jeden krok
— 0-6: počet zvířat umírajících nebo uhynulých / zkoušenou koncentraci
— GHS: Globally harmonizovaný systém klasifikace a označování chemických látek
— ∞: neklasifikováno
— zkoušeno při 12.5 mg/l/4h: viz pokyny 39 (8)

▼M4

Dodatek 4c

Akutní inhalační toxicita:

Zkušební postup s výchozí konkcentrací aerosolů 1 mg/l/4h



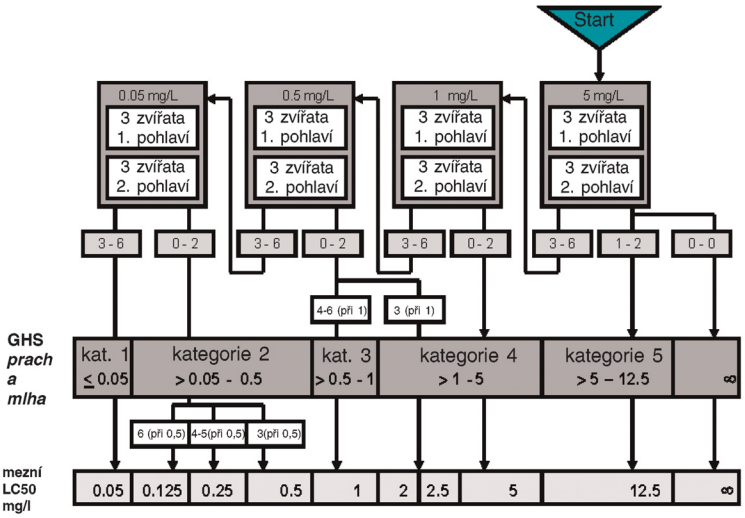
— 3 ♂ + 3 ♀, nebo 6 zvířat citlivějšího pohlaví na jeden krok
— 0-6: počet zvířat umírajících nebo uhynulých / zkoušenou koncentraci
— GHS: Globally harmonizovaný systém klasifikace a označování chemických látek
— ∞: neklasifikováno
— zkoušeno při 12.5 mg/l/4h: viz pokyny 39 (8)

▼M4

Dodatek 4d

Akutní inhalační toxicita:

Zkušební postup s výchozí koncentrací aerosolů 5 mg/l/4h



— 3 ♂ + 3 ♀, nebo 6 zvířat citlivějšího pohlaví na jeden krom
— 0-6: počet zvířat umírajících nebo uhynulých / zkoušenou koncentraci
— GHS: Globally harmonizovaný systém klasifikace a označování chemických látek
— ∞: neklasifikováno
— zkoušeno při 12.5mg/l/4h: viz pokyny 39 (8)“

▼M5

B.53 STUDIE VÝVOJOVÉ NEUROTOXICITY

ÚVOD

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

VÝCHOZÍ ÚVAHY

2. Je známo, že některé chemické látky mají vývojové neurotoxické účinky na člověka a další druhy (10)(11)(12)(13). Aby bylo možno posoudit a zhodnotit toxické vlastnosti určité chemické látky, může být nutné stanovit, jaká je její schopnost vývojové neurotoxicity. Studie vývojové neurotoxicity jsou koncipovány s cílem poskytnout údaje, včetně charakterizace vztahu dávka-odpověď, o možných funkčních a morfologických účincích na vývoj nervové soustavy potomstva, jež mohou vzniknout v důsledku expozice *in utero* a v časném postnatálním období života.

3. Studii vývojové neurotoxicity lze provádět jako samostatnou studii, začlenit ji do studie reprodukční toxicity a/nebo neurotoxicity dospělých zvířat (např. zkušební metody B.34 (14), B.35 (15), B.43 (16)) nebo ji připojit ke studii prenatální vývojové toxicity (např. zkušební metoda B.31 (17)). Je-li studie vývojové neurotoxicity začleněna do jiné studie nebo připojena k jiné studii, musí být bezpodmínečně zachována integrita obou typů studií. Všechny zkoušky musí splňovat platné právní předpisy nebo státní a institucionální pokyny pro používání laboratorních zvířat ve výzkumu (např. (18)).

4. Zkušební laboratoř by před provedením studie měla vzít v úvahu veškeré dostupné informace o zkoušené chemické látce. Součástí těchto informací je totožnost a struktura chemické látky, její fyzické a chemické vlastnosti, výsledky jiných zkoušek toxicity dané chemické látky *in vitro* nebo *in vivo*, toxikologické údaje o strukturně příbuzných chemických látkách a očekávané použití chemické látky. Tyto informace jsou nezbytné k tomu, aby byli všichni zainteresovaní přesvědčeni, že zkouška má význam pro ochranu lidského zdraví a pomůže při výběru vhodné výchozí dávky.

▼M5

PODSTATA ZKOUŠKY

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

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

PŘÍPRAVA NA ZKOUŠKU

Výběr druhu zvířat

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

Podmínky chovu a krmení

8. Teplota v místnosti pro pokusná zvířata by měla být 22 °C (± 3 °C). Relativní vlhkost by měla být nejméně 30 % a pokud možno nepřesáhnout 70 %, kromě doby úklidu místností; avšak cílem by měla být hodnota 50–60 %. Osvětlení by mělo být umělé a mělo by se střídat 12 hodin světla a 12 hodin tmy. Před pářením a po dobu trvání studie lze rovněž světelný cyklus obrátit, aby bylo možné posoudit sledované funkční a behaviorální vlastnosti za tmy (pod červeným světlem), tj. v době, kdy jsou zvířata za běžných podmínek aktivní (22). Veškeré změny v rytmu světla a tmy by měly zahrnovat přiměřenou dobu na aklimatizaci, aby se zvířatům umožnilo přizpůsobit se novému rytmu. Ke krmení lze použít konvenční laboratorní stravu s neomezenou dodávkou pitné vody. Druhy krmiva a vody by měly být zaznamenány a měly by být analyzovány na přítomnost kontaminujících látek.

▼M5

9. Zvířata lze chovat jednotlivě nebo je umístit do klecí v malých skupinkách zvířat stejného pohlaví. Páření by mělo probíhat v klecích, které jsou k tomuto účelu vhodné. Po spáření nebo nejpozději v 15. den březosti by oplodněné samice měly být umístěny individuálně do klecí určených k vrhu nebo chovu mláďat. Klece by měly být uspořádány tak, aby byl vliv umístění klecí minimalizován. S blížící se dobou vrhu by oplodněným samicím měl být poskytnut odpovídající a přesně stanovený materiál pro tvorbu hnízda. Je známo, že nevhodné zacházení nebo stres v době březosti může vést k nepříznivým následkům, včetně prenatální ztráty a změněného vývoje plodu a postnatálního vývoje. S cílem zabránit prenatálním ztrátám z důvodů, které nesouvisí s expozicí, by se mělo se zvířaty během březosti zacházet opatrně a zamezit stresu způsobenému zevními faktory, jako je např. nadměrný vnější hluk.

Příprava zvířat

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

POSTUP

Počet a pohlaví zvířat

11. V každé zkušební a kontrolní skupině by měl být dostatečný počet březích samic, které budou exponovány zkoušené chemické látce, aby se zajistilo, že se narodí dostatečný počet potomků pro hodnocení neurotoxicity. Pro každou úroveň dávky se doporučuje použít celkem 20 vrhů. Jsou povoleny režimy s opakovaným a stupňovitým podáváním, pokud je dosažen celkový počet vrhů v každé skupině a pokud jsou použity vhodné statistické metody zohledňující opakování.

12. Ve 4. postnatální den nebo dříve (postnatální den 0 je den vrhu) musí být velikost každého vrhu upravena odstraněním nadbytečných mláďat, aby byla dosažena stejná velikost všech vrhů (3). Velikost vrhu by neměla přesahovat průměrnou velikost vrhu u použitého kmene hlodavců (8–12 mláďat). Ve vrhu by měl být pokud možno stejný počet mladých samců a samic. Selektivní odstraňování mláďat, např. na základě tělesné hmotnosti, není vhodné. Po standardizaci velikosti vrhů (utracení) a před dalším zkoušením sledovaných funkčních ukazatelů by jednotlivá mláďata, která jsou určena pro zkoušky před odstavením a po odstavení, měla být jednoznačně identifikována pomocí jakékoli vhodné humánní metody pro identifikaci mláďat (např. (24)).

▼M5

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

13. Tato zkušební metoda umožňuje různé způsoby přiřazení zvířat exponovaných *in utero* a prostřednictvím laktace pro funkční a behaviorální zkoušky, určení pohlavní zralosti, stanovení váhy mozku a neuropatologické hodnocení (25). V jednotlivých případech lze přidat i jiné zkoušky neurobehaviorálních funkcí (např. sociálního chování), neurochemie nebo neuropatologie, pokud nebude ohrožena integrita původně požadovaných zkoušek.

14. Z každé exponované skupiny se ve 4. postnatální den nebo později vyberou mláďata a přiřadí se pro posouzení sledovaných vlastností. Výběr mláďat by měl být prováděn tak, aby při všech zkouškách byla v každé exponované skupině v největším možném rozsahu rovnoměrně zastoupena obě pohlaví z každého vrhu. Pro zkoušky motorické aktivity by měla být použita stejná dvojice mláďat samec-samice v každém zkoumaném věku před odstavením (viz odstavec 35). Pro všechny ostatní zkoušky lze pro různé behaviorální zkoušky použít tytéž páry mláďat nebo páry různé pro každou zkoušku. Pro zkoušky poznávacích funkcí odstavených mláďat v porovnání s dospělými zvířaty bude možná nutné přiřadit odlišná mláďata, aby se zamezilo zkreslujícím účinkům věku a předchozího návyku na tato měření (26)(27). Při odstavení (21. postnatální den) lze mláďata, která nebyla vybrána ke zkouškám, humánně usmrtit. Veškeré změny v přiřazení mláďat musí být zaznamenány. Statistickou jednotkou pro vyhodnocování výsledků by měl být vrh (nebo samice), a nikoli mládě.

15. Existují různé způsoby přiřazování mláďat k vyšetřením před odstavením a po odstavení, zkouškám poznávacích schopností, patologickým vyšetřením atd. (o obecném konceptu viz obrázek 1 a příklady přiřazení viz dodatek 1). Doporučené minimální počty zvířat v každé exponované skupině pro vyšetření před odstavením a po odstavení jsou tyto:

Klinická pozorování a tělesná hmotnost	Všechna zvířata
Podrobná klinická pozorování	20 od každého pohlaví (1 od každého pohlaví a vrhu)
Hmotnost mozku (po fixaci) 11.–22. postnatální den	10 od každého pohlaví (1 z každého vrhu)
Hmotnost mozku (nefixovaného) ~ 70. postnatální den	10 od každého pohlaví (1 z každého vrhu)
Neuropatologie (fixace ponořením do fixačního roztoku nebo perfuzí) 11.–22. postnatální den	10 od každého pohlaví (1 z každého vrhu)
Neuropatologie (fixace perfuzí) ~ 70. postnatální den	10 od každého pohlaví (1 z každého vrhu)
Pohlavní zralost	20 od každého pohlaví (1 od každého pohlaví a vrhu)
Jiné vývojové znaky (není povinné)	Všechna zvířata
Behaviorální ontogeneze	20 od každého pohlaví (1 od každého pohlaví a vrhu)
Motorická aktivita	20 od každého pohlaví (1 od každého pohlaví a vrhu)
Motorické a smyslové funkce	20 od každého pohlaví (1 od každého pohlaví a vrhu)
Učení a paměť	10 od každého pohlaví ([a]) (1 z každého vrhu)

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

▼M5

Dávkování

16. Použijí se alespoň tři dávky a souběžná kontrolní skupina. Úrovně dávek se rozloží tak, aby byly toxické účinky odstupňovány. Pokud neexistuje žádné omezení vyplývající z fyzikálně-chemické podstaty nebo biologických vlastností chemické látky, zvolí se nejvyšší dávka s cílem vyvolat určitou toxicitu u březí samice (např. klinické znaky, snížení přírůstku tělesné hmotnosti (ne více než o 10 %) a/nebo projevy limitní toxické dávky pro cílový orgán). Nejvyšší dávku lze s určitými výjimkami omezit na 1 000 mg na 1 kg tělesné hmotnosti za den. Avšak například velikost očekávané expozice člověka může vyvolat potřebu použití vyšší dávky. Jinak by měly být provedeny předběžné studie nebo předběžné orientační zkoušky s cílem určit, jaké nejvyšší dávkování má být použito, aby způsobilo minimální stupeň toxicity pro matku. Pokud se ve standardní studii vývojové toxicity nebo v předběžné studii ukázalo, že zkoušená chemická látka je vývojově toxická, měla by nejvyšší úrovní dávky být maximální dávka, která nevyvolá nadměrnou toxicitu pro potomstvo, nebo toxicitu *in utero* nebo neonatální toxicitu, popřípadě malformace v míře znemožňující provést smysluplné hodnocení neurotoxicity. Nejnižší dávka by neměla vyvolat žádné známky toxicity pro matku ani žádné známky vývojové toxicity, včetně neurotoxicity. Měla by být zvolena sestupná řada úrovní dávek s cílem prokázat účinky související s dávkou a nepřítomnost nepříznivých účinků při nejnižší úrovni dávky (NOAEL) nebo by měly být použity dávky blížící se mezi detekovatelnosti, které by umožnily stanovení referenční dávky. Často je pro stanovení sestupných úrovní dávek optimální dvoj- až čtyřnásobný interval mezi dávkami a je vhodnější přidat čtvrtou exponovanou skupinu než použít velmi velké intervaly (odpovídající např. faktoru většímu než 10) mezi dávkami.

17. Při výběru dávek je třeba brát v úvahu veškeré existující údaje o toxicitě a také další informace o metabolismu a toxikokinetice zkoušené chemické látky nebo látek příbuzných. Tyto informace mohou rovněž pomoci při prokazování přiměřenosti dávkovacího režimu. Přímé podávání mláďatům by mělo být zváženo na základě informací o expozici a farmakokinetických informací (28)(29). Před prováděním studií s přímým dávkováním by měly být pečlivě zváženy přínosy a nevýhody (30).

18. Souběžnou kontrolní skupinou by měla být kontrolní skupina s napodobeným podáváním nebo kontrolní skupina s vehikulem, pokud se vehikulum při podávání zkoušené chemické látky používá. Normálně by měl být všem zvířatům podáván stejný objem zkoušené chemické látky nebo vehikula na základě tělesné hmotnosti. Pokud se pro usnadnění dávkování používá vehikulum nebo jiná přísada, je třeba vzít v úvahu následující možnosti: vliv na absorpci, distribuci, metabolismus nebo retenci zkoušené chemické látky; vliv na chemické vlastnosti zkoušené chemické látky, které mohou ovlivnit její toxický účinek, a vliv na spotřebu potravy nebo vody anebo na nutriční stav zvířat. Vehikulum by nemělo vyvolávat účinky, které by mohly ovlivnit interpretaci studie, nemělo by být neurobehaviorálně toxické a nemělo by mít vliv na rozmnožování nebo vývoj. V případě nových vehikul by kromě kontrolní skupiny s vehikulem měla být zařazena také kontrolní skupina s napodobeným podáváním. Se zvířaty v kontrolní skupině (skupinách) se zachází stejně jako se zvířaty ve zkušební skupině.

▼M5

Podávání dávek

19. Zkoušená chemická látka nebo vehikulum by měly být podávány cestami nejvhodnějšími z hlediska potenciální expozice člověka a na základě dostupných informací o metabolismu a distribuci u zkušebních zvířat. Podávány budou zpravidla orální cestou (např. sondou nebo v potravě či v pitné vodě), ale lze použít i jiné cesty (např. dermální expozici, inhalaci) v závislosti na vlastnostech a očekávaných nebo známých způsobech expozice člověka (další pokyny jsou uvedeny v Pokynu OECD č. 43 (8)). Zvolený způsob podávání je třeba zdůvodnit. Zkoušená chemická látka se podává každý den přibližně ve stejnou dobu.

20. Obvykle by dávka podávaná jednotlivým zvířatům měla vycházet z aktuálně zjištěné tělesné hmotnosti. Velkou pozornost je však třeba věnovat úpravě dávek během posledního trimestru březosti. Pokud je u experimentálních samic zaznamenána nadměrná toxicita, tato zvířata se humánně utratí.

21. Zkoušená chemická látka nebo vehikulum by měly být podávány oplodněným samicím nejméně jednou denně od doby implantace (6. den gestace) po celé období laktace (21. postnatální den), takže mláďata jsou zkoušené chemické látce exponována během prenatálního i postnatálního neurologického vývoje. Věk, ve kterém se začne dávka podávat, a trvání a frekvenci podávání dávky lze upravit, pokud existují poznatky, že jiné experimentální uspořádání je vhodnější z hlediska expozice člověka. Pro jiné druhy je podávání dávek nutno přizpůsobit tak, aby se zajistila expozice během všech raných období vývoje mozku (tj. odpovídajících prenatálnímu a raně postnatálnímu růstu lidského mozku). Podávání dávek může začít od vyvolání březosti (nultý den gestace), avšak měla by být zvážena schopnost zkoušené chemické látky způsobit preimplantační ztráty. Podávání od 6. dne gestace by toto riziko vyloučilo, ale nebyla by podchycena stadia vývoje mezi nultým a 6. dnem gestace. Jestliže laboratoř nakupuje zvířata spářená ve stejnou dobu, začínat podávání dávky v nultý den gestace je nepraktické, a vhodným počátečním dnem by proto byl 6. den gestace. Zkušební laboratoř by měla stanovit režim dávkování na základě příslušných informací o účincích zkoušené chemické látky, předchozích zkušeností a s ohledem na logistické zajištění; to může zahrnovat prodloužení podávání dávek po odstavení. Dávky by neměly být podávány v den vrhu těm zvířatům, která nevrhla celé své potomstvo. Obecně se předpokládá, že k expozici mláďat dojde prostřednictvím mateřského mléka; v případech, kdy není dostatek důkazů o kontinuální expozici potomstva, by však mělo být zváženo přímé dávkování potomstvu. Důkazy o kontinuální expozici lze čerpat např. z farmakokinetických informací, toxicity potomstva nebo změn v biologických markerech (28).

POZOROVÁNÍ

Pozorování samic

22. U všech samic se alespoň jednou denně pečlivě zkontroluje jejich zdravotní stav, včetně nemocnosti a úmrtnosti.

23. V období aplikace a pozorování by mělo být periodicky (nejméně dvakrát za období podávání látky za březosti a dvakrát za období podávání látky v době laktace) prováděno podrobnější klinické pozorování nejméně deseti samic na každé úrovni dávky. Zvířata by měla být pozorována mimo chovnou klec kvalifikovanými laboranty, kteří nejsou informováni o tom, do jaké experimentální skupiny zvíře patří, a s použitím standardizovaných postupů, které mají minimalizovat stres u zvířat a neobjektivnost pozorovatele a maximalizovat spolehlivost jednotlivých pozorovatelů. Je žádoucí, aby pozorování v rámci dané studie prováděl pokud možno stejný laborant.

▼M5

24. Přítomnost zpozorovaných příznaků se zaznamená. Je-li to možné, zaznamená se rovněž závažnost zpozorovaných příznaků. Klinická pozorování by se měla mimo jiné zaměřit na změny kůže, srsti, očí a sliznic, výskyt sekretů a autonomní funkce (slzení, zježení srsti, velikost zornic, nezvyklý průběh dýchání a/nebo dýchání ústy, nezvyklé příznaky močení nebo defekace).

25. Zaznamenají se rovněž nezvyklé projevy, pokud jde o polohu těla, úroveň aktivity (např. snížené nebo zvýšené zkoumání standardního prostoru) a koordinaci pohybu. Zaznamenají se také změny chůze (např. kolébání, ataxie), polohy (nahrbení hřbetu) a reakce na manipulaci, umístění a další stimuly související s prostředím, dále přítomnost klonických a tonických pohybů, křečí, třesu, stereotypů v chování (např. nadměrného čištění, nezvyklých pohybů hlavy nebo opakovaného kroužení) nebo zvláštního chování (např. kousání nebo nadměrného olizování, sebepoškozování, pohybu pozpátku, vydávání zvuků) anebo agresivity.

26. Zaznamenají se příznaky toxicity, včetně dne jejich nástupu, denní doby, stupně a trvání.

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

Pozorování potomstva

28. Veškeré potomstvo se nejméně jednou denně bedlivě pozoruje, aby se zjistily příznaky toxicity, nemocnost a úmrtnost.

29. Během doby aplikace a pozorování by mělo být prováděno podrobnější klinické pozorování potomstva. Pozorování potomstva (nejméně jedno mládě od každého pohlaví a vrhu) by měli provádět kvalifikovaní laboranti, kteří nejsou informováni o tom, do které experimentální skupiny zvířata patří, a s použitím standardizovaných postupů s cílem minimalizovat neobjektivnost pozorovatele a maximalizovat spolehlivost jednotlivých pozorovatelů. Je žádoucí, aby pozorování prováděl pokud možno stejný laborant. Sledují se přinejmenším sledované vlastnosti popsané v odstavci 24 a 25 podle potřeby vývojového stadia, které je pozorováno.

30. Zaznamenají se veškeré příznaky toxicity u potomstva, včetně dne nástupu, denní doby, stupně a trvání.

Fyzické a vývojové znaky

31. Změny ve vývojových znacích v období před odstavením (např. otevření uší a očí, prořezávání řezáků) úzce souvisejí s tělesnou hmotností (30)(31). Tělesná hmotnost může být nejlepším ukazatelem fyzického vývoje. Měření vývojových znaků se proto doporučuje provádět pouze tehdy, jestliže existují dřívější poznatky, že tyto sledované vlastnosti poskytnou doplňující informace. Časový rozvrh pro posuzování těchto parametrů je uveden v tabulce 1. Lze doporučit, aby v závislosti na očekávaných účincích a na výsledcích počátečních měření byly doplněny další časové body nebo byla prováděna měření v jiných vývojových stadiích.

▼M5

32. Při posuzování fyzického vývoje se doporučuje použít postkoitální věk, a nikoli postnatální věk (33). Jsou-li mláďata testována v den odstavení, doporučuje se, aby byly tyto zkoušky prováděny před skutečným odstavením, aby se vyloučil zkreslující účinek stresu spojeného s odstavením. V období po odstavení by kromě toho neměly být prováděny žádné zkoušky během dvou dnů po odstavení.

Tabulka 1

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

Období věku / Sledované vlastnosti	Před odstavením ([b])	Dospívání ([b])	Mladá dospělost ([b])
Fyzické a vývojové znaky			
Tělesná hmotnost a klinická pozorování	týdně ([c])	nejméně jednou za dva týdny	nejméně jednou za dva týdny
Hmotnost mozku	22. postnatální den ([d])		při ukončení studie
Neuropatologie	22. postnatální den ([d])		při ukončení studie
Pohlavní zralost	—	podle vhodnosti	—
Další vývojové znaky ([e])	podle vhodnosti	—	—
Sledované funkční/behaviorální vlastnosti			
Behaviorální ontogeneze	nejméně dvě měření		
Motorická aktivita (včetně přivykání)	1–3krát ([f])	—	jednou
Motorické a smyslové funkce	—	jednou	jednou
Učení a paměť	—	jednou	jednou

([a]) Tato tabulka uvádí minimální počet měření, jež by měla být prováděna. Lze doporučit, aby na základě očekávaných účinků a výsledků počátečních měření byly doplněny další časové body (např. starší zvířata) nebo byla prováděna měření v jiných vývojových stadiích.
([b]) Doporučuje se, aby mláďata nebyla testována v prvních dvou dnech po odstavení (viz odstavec 32). Doporučený věk pro testování dospívajících je: učení a paměť = 25. postnatální den ± 2; motorické a smyslové funkce = 25. postnatální den ± 2. Doporučený věk pro testování mladých dospělých je 60.–70. postnatální den.
([c]) Tělesná hmotnost by měla být měřena nejméně dvakrát týdně při přímém dávkování mláďatům za účelem upravení dávek v době rychlého nárůstu tělesné hmotnosti.
([d]) Hmotnost mozku a neuropatologii lze případně posuzovat poněkud dříve (např. 11. postnatální den) (viz odstavec 39).
([e]) Případně by kromě tělesné hmotnosti měly být zaznamenány i jiné vývojové znaky (např. otevření očí) (viz odstavec 31).
([f]) Viz odstavec 35.

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

▼M5

Behaviorální ontogeneze

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

Motorická aktivita

35. Motorická aktivita by měla být sledována (41)(42)(43)(44)(45) v období před odstavením a v dospělosti. Ke zkoušení v době odstavení viz odstavec 32. Zkušební sezení by mělo být dostatečně dlouhé, aby bylo možno prokázat přivykání neexponovaných kontrolních skupin v průběhu sezení. Behaviorální ontogenezi se důrazně doporučuje posuzovat pomocí motorické aktivity. Je-li prováděna zkouška behaviorální ontogeneze, měla by být při všech sezeních v období před odstavením použita stejná zvířata. Zkoušky by měly být prováděny dostatečně často, aby bylo možno posoudit ontogenezi přivykání v průběhu sezení (44). To může vyžadovat tři nebo více časových období před odstavením včetně dne odstavení (např. 13., 17. a 21. postnatální den). Testování stejných zvířat nebo sourozenců z vrhu by mělo být prováděno také v dospělosti nedlouho před ukončením studie (např. 60.–70. postnatální den). Podle potřeby lze provádět zkoušky i v dalších dnech. Motorická aktivita by měla být sledována přístrojem s automatizovaným zaznamenáváním aktivity, který by měl být schopen zjistit zvýšení i poklesy aktivity (tj. výchozí aktivita naměřená tímto zařízením by neměla být tak nízká, aby bránila zjištění zvýšení, ani tak vysoká, aby bránila zjištění poklesu aktivity. Každý přístroj by měl být odzkoušen standardními postupy, aby se zajistila co největší spolehlivost měření všemi přístroji a v různých dnech. Experimentální skupiny by měly být mezi přístroje rozděleny pokud možno vyváženě. Každé zvíře se testuje jednotlivě. Experimentální skupiny by měly být testovány vyváženě v různou denní dobu s cílem vyloučit zkreslení denními rytmy aktivity. Je třeba dbát na to, aby byly rozdíly ve zkušebních podmínkách co nejmenší a nesouvisely automaticky s aplikací. Mnohá měření chování včetně měření motorické aktivity mohou ovlivnit takové proměnné, jako je úroveň zvuku, velikost a tvar zkušební klece, teplota, relativní vlhkost, světelné podmínky, zápachy, použití chovné klece nebo nové, zkušební klece a odchylky v prostředí.

Motorické a smyslové funkce

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

▼M5

Zkoušky učení a paměti

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

Pitva

38. Matky lze po odstavení potomstva utratit.

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

Zpracování tkáňových vzorků

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

▼M5

zamezilo artefaktům vzniklým smrštěním, ke kterému může dojít v souvislosti s dlouhým uchováváním ve fixativu.

Neuropatologické vyšetření

41. Účelem kvalitativního vyšetření je:

i) zjistit oblasti nervové soustavy vykazující známky neuropatologických změn;

ii) zjistit typy neuropatologických změn vyplývajících z expozice zkoušené chemické látce; a

iii) stanovit míru závažnosti těchto neuropatologických změn.

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

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

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

▼M5

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

— změny v absolutní velikosti nebo tvaru čichových laloků, mozku nebo mozečku,

— změny v relativní velikosti různých oblastí mozku, včetně zvětšené nebo zmenšené velikosti oblastí vyplývající ze ztráty nebo přetrvávání normálně přechodných populací buněk nebo z axonálních projekcí (např. vnější zárodečná vrstva mozečku, kalózní těleso),

— změny v proliferaci, migraci a diferenciaci ověřené podle oblastí nadměrné apoptózy nebo nekrózy, klastrů nebo rozptýlených populací ektopických, dezorientovaných nebo malformovaných neuronů, nebo změny v relativní velikosti různých vrstev kortikálních struktur,

— změny v myelinaci, včetně snížení celkové velikosti nebo odlišného zbarvení myelinových struktur,

— příznaky hydrocefalu, zejména zvětšení komor, stenóza cerebrálního akvaduktu a zúžení cerebrálních hemisfér.

Analýza neuropatologických změn z hlediska vztahu dávka-odpověď

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

ÚDAJE A ZPRÁVy

Údaje

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

▼M5

Hodnocení a interpretace výsledků

47. Studie vývojové neurotoxicity bude obsahovat informace o účincích opakované expozice určité chemické látce během vývoje *in utero* a raně postnatálního vývoje. Vzhledem k tomu, že důraz je kladen na ukazatele všeobecné toxicity i na ukazatele vývojové neurotoxicity, umožní výsledky této studie rozlišení mezi účinky na vývoj nervové soustavy vyskytujícími se za nepřítomnosti všeobecné toxicity u matek a mezi účinky vyvolanými pouze na úrovních, které jsou toxické i pro březí samice. V důsledku složitých vzájemných souvislostí mezi koncepcí studie, statistickou analýzou a biologickým významem údajů, bude odpovídající interpretace údajů o vývojové neurotoxicitě zahrnovat odborný posudek (107)(109). Při interpretaci výsledků zkoušek by měl být uplatněn přístup založený na existujících průkazných faktech (20)(92)(93)(94). Uvede se charakteristika behaviorálních nebo morfologických nálezů, pokud jsou přítomny, a poznatky o vztahu dávka-reakce. Tato charakterizace by měla zahrnovat údaje ze všech studií, které mají význam pro hodnocení vývojové neurotoxicity, včetně epidemiologických studií nebo případových studií u lidí a studií na pokusných zvířatech (např. toxikokinetické údaje, informace o vztahu struktura-účinek, údaje z jiných studií toxicity). Patří sem i vztah mezi dávkami zkoušené chemické látky a přítomností či nepřítomností, četností a rozsahem jakýchkoli neurotoxických účinků na každé pohlaví (20)(95).

48. Hodnocení údajů by mělo zahrnovat rozbor výsledků z hlediska jejich biologického i statistického významu. Na statistickou analýzu je nutno pohlížet jako nástroj k řízení, a nikoli nástroj předurčující interpretaci údajů. Nedostatečná statistická významnost by neměla být jediným odůvodněním pro učinění závěru o neexistenci účinku souvisejícího s expozicí, stejně tak jako statistická významnost by neměla být jediným odůvodněním pro vyvození závěru o existenci účinku souvisejícího s expozicí. Aby se zamezilo případným falešně negativním výsledkům a přirozeným potížím při „prokazování negativního“, měly by být podrobeny rozboru dostupné pozitivní a historické kontrolní údaje, zejména pokud neexistují žádné účinky související s expozicí (102)(106). Pravděpodobnost falešně pozitivních výsledků by měla být analyzována s ohledem na celkové statistické hodnocení údajů (96). Hodnocení by mělo zahrnovat vztah mezi pozorovanými neuropatologickými a behaviorálními změnami, pokud takový vztah existuje.

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

Protokol o zkoušce

50. Protokol o zkoušce musí obsahovat tyto informace:

Zkoušená chemická látka:

— fyzikální povaha a tam, kde je to podstatné, fyzikálně-chemické vlastnosti,

— identifikační údaje, včetně zdroje,

▼M5

— čistota přípravku a známé a/nebo předpokládané nečistoty.

Vehikulum (je-li použito):

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

Pokusná zvířata:

— použitý druh a kmen a zdůvodnění použití jiných pokusných zvířat, není-li použit potkan,

— dodavatel pokusných zvířat,

— počet, věk na začátku a pohlaví zvířat;

— původ, podmínky chovu, strava, voda atd.,

— hmotnost jednotlivých zvířat na začátku zkoušky.

Podmínky pro provádění zkoušky:

— zdůvodnění volby dávek,

— zdůvodnění způsobu podání a doby podávání dávek,

— specifikace aplikovaných dávek, včetně podrobností o vehikulu, objemu a fyzikální formě aplikovaného materiálu,

— podrobnosti o složení zkoušené chemické látky/úpravě potravy, o použité koncentraci, stálosti a homogenitě přípravku,

— metoda použitá pro jednoznačnou identifikaci samic a potomstva,

— podrobný popis postupu (postupů) náhodného výběru použitých pro přiřazení samic do experimentálních skupin, výběru mláďat pro utracení a zařazení mláďat do exponovaných skupin,

— podrobnosti o podávání zkoušené chemické látky,

— popřípadě přepočet koncentrace zkoušené látky v potravě/pitné vodě nebo inhalaci (ppm) na skutečnou denní dávku (mg na 1 kg tělesné hmotnosti),

— podmínky prostředí,

— podrobné údaje o stravě a kvalitě vody (např. vodovodní, destilovaná),

— datum zahájení a datum ukončení studie.

Pozorování a zkušební postupy:

— podrobný popis postupů použitých pro standardizaci pozorování a postupů, jakož i operativních definic pro pozorování s bodovacím systémem hodnocení účinků,

— seznam všech použitých zkušebních postupů a zdůvodnění jejich použití,

— podrobnosti o použitých behaviorálních/funkčních, patologických, neurochemických nebo elektrofyziologických postupech, včetně informací a podrobností o automatických zařízeních,

— postupy pro kalibrování a zajištění rovnocennosti zařízení a vyvážení experimentálních skupin v rámci zkušebních postupů,

— stručné zdůvodnění všech rozhodnutí obsahujících profesionální úsudky.

▼**M5**

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

— počet zvířat na začátku studie a na konci studie,

— počet zvířat a vrhů použitých pro každou zkušební metodu,

— identifikační číslo každého zvířete a vrhu, z kterého pochází,

— velikost vrhu a střední hmotnost při narození podle pohlaví,

— údaje o tělesné hmotnosti a o změnách tělesné hmotnosti, včetně konečné tělesné hmotnosti samic a potomstva,

— údaje o spotřebě potravy a popřípadě o spotřebě vody (např. pokud je zkoušená látka podávána s pitnou vodou),

— údaje o toxických reakcích podle pohlaví a úrovně dávky, včetně příznaků toxicity nebo úmrtnosti, popřípadě doba a příčina úmrtí,

— povaha, závažnost, trvání, den nástupu, denní doba a následný průběh podrobných klinických pozorování,

— bodové hodnocení každého vývojového znaku (hmotnost, pohlavní zralost a behaviorální ontogeneze) v každé době pozorování,

— podrobný popis všech behaviorálních, funkčních, neuropatologických, neurochemických, elektrofyziologických nálezů podle pohlaví, včetně nárůstů a poklesů v porovnání s kontrolními skupinami;

— pitevní nálezy,

— hmotnosti mozků,

— jakékoli diagnózy vyvozené z neurologických znaků a lézí, včetně přirozeně se vyskytujících chorob nebo stavů,

— zobrazení exemplárních nálezů,

— zobrazení s nízkým rozlišením pro posouzení homologie řezů použitých pro morfometrii,

— údaje o absorpci a metabolismu, včetně doplňujících údajů ze samostatné toxikokinetické studie, je-li k dispozici,

— statistické zpracování výsledků, včetně statistických modelů použitých pro analýzu údajů, a výsledky, bez ohledu na to, zda byly významné, či nikoli,

— seznam personálu studie, včetně jeho odborné kvalifikace.

Rozbor výsledků:

— informace o reakci na dávky podle pohlaví a skupin,

— význam veškerých dalších toxických účinků pro závěry týkající se neurotoxického potenciálu zkoušené chemické látky podle pohlaví a skupin,

— dopad toxikokinetických informací na závěry,

— podobnost účinků jakýmkoli známým látkám schopným vyvolat neurotoxicitu,

▼M5

— údaje podporující spolehlivost a citlivost zkušební metody (tj. pozitivní a historické kontrolní údaje).

— souvislosti, existují-li, mezi neuropatologickými a funkčními účinky,

— NOAEL (hodnota dávky bez pozorovaného nepříznivého účinku) nebo referenční dávka pro samice a potomstvo podle pohlaví a skupiny.

Závěry:

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

LITERATURA

1) OECD (1995). Draft Report of the OECD *Ad Hoc* Working Group on Reproduction and Developmental Toxicity. Kodaň, Dánsko, 13.–14. června 1995.

2) US EPA (1998). U.S. Environmental Protection Agency Health Effects Test Guidelines. OPPTS 870.6300. Developmental Neurotoxicity Study. US EPA 712-C-98-239. Dostupné na: [http://www.epa.gov/opptsfrs/OPPTS_Harmonized/870_Health_Effects_Test_Guidelines/Series/].

3) US EPA (1998). Guidelines for Neurotoxicity Risk Assessment. US EPA 630/R-95/001F. Dostupné na: [http://cfpub.epa.gov/ncea/cfm/recordisplay.cfm?PrintVersion=True&deid=12479].

4) Cory-Slechta, D.A., Crofton, K.M., Foran, J.A., Ross, J.F., Sheets, L.P., Weiss, B., Mileson, B. (2001). Methods to identify and characterize developmental neurotoxicity for human health risk assessment: I. Behavioral effects. Environ. Health Perspect., 109, 79–91.

5) Dorman, D.C., Allen, S.L., Byczkowski, J.Z., Claudio, L., Fisher, J.E. Jr., Fisher, J.W., Harry, G.J., Li, A.A., Makris, S.L., Padilla, S., Sultatos, L.G., Mileson, B.E. (2001). Methods to identify and characterize developmental neurotoxicity for human health risk assessment: III. Pharmacokinetic and pharmacodynamic considerations. Environ. Health Perspect., 109, 101–111.

6) Garman, R.H., Fix,A.S., Jortner, B.S., Jensen, K.F., Hardisty, J.F., Claudio, L., Ferenc, S. (2001). Methods to identify and characterize developmental neurotoxicity for human health risk assessment: II. Neuropathology. Environ. Health Perspect., 109, 93–100.

7) OECD (2003). Report of the OECD Expert Consultation Meeting on Developmental Neurotoxicity Testing. Washington D.C., US, 23–25 October 2000.

8) OECD (2008). OECD Environment, Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 43. Guidance Document on Mammalian Reproductive Toxicity Testing and Assessment. Environment Directorate, OECD, Paris. July 2008. Dostupné na: [http://search.oecd.org/officialdocuments/displaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono(200816&doclanguage=en)].

9) OECD (2003). OECD Environment, Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 20. Guidance Document for Neurotoxicity Testing. Environment Directorate, OECD, Paris, September 2003. Dostupné na: [http://www.oecd.org/document/22/0,2340,en_2649_34377_1916054_1_1_1_1,00.html].

10) Kimmel, C.A., Rees, D.C., Francis, E.Z. (1990) Qualitative and quantitative comparability of human and animal developmental neurotoxicity. Neurotoxicol. Teratol., 12, 173–292.

11) Spencer, P.S., Schaumburg, H.H., Ludolph, A.C. (2000) *Experimental and Clinical Neurotoxicology, 2nd Edition,* ISBN 0195084772, Oxford University Press, New York.

▼M5

12) Mendola, P., Selevan, S.G., Gutter, S., Rice, D. (2002) Environmental factors associated with a spectrum of neurodevelopmental deficits. Ment. Retard. Dev. Disabil. Res. Rev. 8, 188–197.

13) Slikker, W.B., Chang, L.W. (1998) *Handbook of Developmental Neurotoxicology*, *1st Edition*, ISBN 0126488606, Academic Press, New York.

14) Kapitola B.34 této přílohy, Jednogenerační zkouška toxicity pro reprodukci.

15) Kapitola B.35 této přílohy, Dvougenerační studie reprodukční toxicity.

16) Kapitola B.43 této přílohy, Studie neurotoxicity na hlodavcích.

17) Kapitola B.31 této přílohy, Studie prenatální vývojové toxicity.

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

19) WHO (1986) *Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals*, (Environmental Health Criteria 60), Albany, New York: World Health Organization Publications Center, USA. Dostupné na: [http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc060.htm].

20) WHO (2001) *Neurotoxicity Risk Assessment for Human Health: Principles and Approaches,* (Environmental Health Criteria 223), World Health Organization Publications, Geneva. Dostupné na: [http://www.intox.org/databank/documents/supplem/supp/ehc223.htm].

21) Chang, L.W., Slikker, W. (1995) *Neurotoxicology: Approaches and Methods*, *1st Edition*, ISBN 012168055X, Academic Press, New York.

22) De Cabo, C., Viveros, M.P. (1997) Effects of neonatal naltrexone on neurological and somatic development in rats of both genders. Neurotoxicol. Teratol., 19, 499–509.

23) Agnish, N.D., Keller, K.A. (1997) The rationale for culling of rodent litters. Fundam. Appl. Toxicol., 38, 2–6.

24) Avery, D.L., Spyker, J.M. (1977) Foot tattoo of neonatal mice. Lab. Animal Sci., 27, 110–112.

25) Wier, P.J., Guerriero, F.J., Walker, R.F. (1989) Implementation of a primary screen for developmental neurotoxicity. Fundam. Appl. Toxicol., 13, 118–136.

26) Spear, N.E., Campbell, B.A. (1979) *Ontogeny of Learning and Memory*. ISBN 0470268492, Erlbaum Associates, New Jersey.

27) Krasnegor, N.A., Blass, E.M., Hofer, M.A., Smotherman, W. (1987) *Perinatal Development: A Psychobiological Perspective.* Academic Press, Orlando.

28) Zoetis, T., Walls, I. (2003) *Principles and Practices for Direct Dosing of Pre-Weaning Mammals in Toxicity Testing and Research*. ILSI Press, Washington, DC.

29) Moser, V., Walls, I., Zoetis, T. (2005) Direct dosing of preweaning rodents in toxicity testing and research: Deliberations of an ILSI RSI expert working group. Int. J. Toxicol., 24, 87–94.

30) Conolly, R.B., Beck, B.D., Goodman, J.I. (1999) Stimulating research to improve the scientific basis of risk assessment. Toxicol. Sci., 49: 1–4.

31) ICH (1993) ICH Harmonised Tripartite Guideline: Detection of Toxicity to Reproduction for Medical Products (S5 A). Mezinárodní konference o harmonizaci technických požadavků na registraci humánních léčivých přípravků.

32) Lochry, E.A. (1987) Concurrent use of behavioral/functional testing in existing reproductive and developmental toxicity screens: Practical considerations. J. Am. Coll. Toxicol., 6, 433–439.

▼**M5**

33) Tachibana, T., Narita, H., Ogawa, T., Tanimura, T. (1998) Using postnatal age to determine test dates leads to misinterpretation when treatments alter gestation length, results from a collaborative behavioral teratology study in Japan. Neurotoxicol. Teratol., 20, 449–457.

34) Gallavan, R.H. Jr., Holson, J.F., Stump, D.G., Knapp, J.F., Reynolds, V.L. (1999) Interpreting the toxicologic significance of alterations in anogenital distance: potential for confounding effects of progeny body weights. Reprod. Toxicol., 13, 383–390.

35) Gray, L.E. Jr., Ostby, J., Furr, J., Price, M., Veeramachaneni, D.N., Parks, L. (2000) Perinatal exposure to the phthalates DEHP, BBP, and DINP, but not DEP, DMP, or DOTP, alters sexual differentiation of the male rat. Toxicol. Sci., 58, 350–365.

36) Adams, J., Buelke-Sam, J., Kimmel, C.A., Nelson, C.J., Reiter, L.W., Sobotka, T.J., Tilson, H.A., Nelson, B.K. (1985) Collaborative behavioral teratology study: Protocol design and testing procedure. Neurobehav. Toxicol. Teratol., 7, 579–586.

37) Korenbrot, C.C., Huhtaniemi, I.T., Weiner, R.W. (1977) Preputial separation as an external sign of pubertal development in the male rat. Biol. Reprod., 17, 298–303.

38) Spear, L.P. (1990) Neurobehavioral assessment during the early postnatal period. Neurotoxicol. Teratol., 12, 489-495.

39) Altman, J., Sudarshan, K. (1975) Postnatal development of locomotion in the laboratory rat. Anim. Behav., 23, 896–920.

40) Adams, J. (1986) Methods in Behavioral Teratology. In: *Handbook of Behavioral Teratology.* Riley, E.P., Vorhees, C.V. (eds.) Raven Press, New York, s. 67–100.

41) Reiter, L.W., MacPhail, R.C. (1979) Motor activity: A survey of methods with potential use in toxicity testing. Neurobehav. Toxicol., 1, 53–66.

42) Robbins, T.W. (1977) A critique of the methods available for the measurement of spontaneous motor activity, *Handbook of Psychopharmacology*, Vol. 7, Iverson, L.L., Iverson, D.S., Snyder, S.H., (eds.) Raven Press, New York, s. 37–82.

43) Crofton, K.M., Peele, D.B., Stanton, M.E. (1993) Developmental neurotoxicity following neonatal exposure to 3,3'-iminodipropionitrile in the rat. Neurotoxicol. Teratol., 15, 117-129.

44) Ruppert, P.H., Dean, K.F., Reiter, L.W. (1985) Development of locomotor activity of rat pups in figure-eight mazes. Dev. Psychobiol., 18, 247-260.

45) Crofton, K.M., Howard, J.L., Moser, V.C., Gill, M.W., Reiter, L.W., Tilson, H.A., MacPhail, R.C. (1991) Interlaboratory comparison of motor activity experiments: Implications for neurotoxicological assessments. Neurotoxicol. Teratol., 13, 599–609.

46) Ross, J. F., Handley, D. E., Fix, A. S., Lawhorn, G. T., Carr, G. J. (1997) Quantification of the hind-limb extensor thrust response in rats. Neurotoxicol. Teratol., 19, 1997. 405–411.

47) Handley, D.E., Ross, J.F., Carr, G.J. (1998) A force plate system for measuring low-magnitude reaction forces in small laboratory animals.Physiol. Behav., 64, 61–669.

48) Edwards, P.M., Parker, V.H. (1977) A simple, sensitive, and objective method for early assessment of acrylamide neuropathy in rats. Toxicol. Appl. Pharmacol., 40, 589–591.

49) Davis, M. (1984) The mammalian startle response. In: *Neural Mechanisms of Startle Behavior*, Eaton, R.C. (ed), Plenum Press, New York, s. 287–351.

50) Koch, M. (1999) The neurobiology of startle. Prog. Neurobiol., 59, 107–128.

51) Crofton, K.M. (1992) Reflex modification and the assessment of sensory dysfunction. In *Target Organ Toxicology Series: Neurotoxicology*, Tilson, H., Mitchell, C. (eds). Raven Press, New York, s. 181–211.

▼**M5**

52) Crofton, K.M., Sheets, L.P. (1989) Evaluation of sensory system function using reflex modification of the startle response. J. Am. Coll. Toxicol., 8, 199–211.

53) Crofton, K.M, Lassiter, T.L, Rebert, C.S. (1994) Solvent-induced ototoxicity in rats: An atypical selective mid-frequency hearing deficit. Hear. Res.,80, 25–30.

54) Ison, J.R. (1984) Reflex modification as an objective test for sensory processing following toxicant exposure. *Neurobehav. Toxicol. Teratol.,* 6, 437–445.

55) Mattsson, J.L., Boyes, W.K., Ross, J.F. (1992) Incorporating evoked potentials into neurotoxicity test schemes. In: *Target Organ Toxicology Series: Neurotoxicity*, Tilson, H., Mitchell, C., (eds.), Raven Press, New York. s. 125–145.

56) Peele, D.B., Allison, S.D., Crofton, K.M. (1990) Learning and memory deficits in rats following exposure to 3,3'-iminopropionitrile. Toxicol. Appl. Pharmacol., 105, 321–332.

57) Bammer, G. (1982) Pharmacological investigations of neurotransmitter involvement in passive avoidance responding: A review and some new results. Neurosci. Behav. Rev., 6, 247–296.

58) Bushnell, P.J. (1988) Effects of delay, intertrial interval, delay behavior and trimethyltin on spatial delayed response in rats. Neurotoxicol. Teratol., 10, 237–244.

59) Green, R.J., Stanton, M.E. (1989) Differential ontogeny of working memory and reference memory in the rat. Behav. Neurosci., 103, 98–105.

60) Kucharski, D., Spear, N.E. (1984) Conditioning of aversion to an odor paired with peripheral shock in the developing rat. Develop. Psychobiol., 17, 465–479.

61) Morris, R. (1984) Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. J. Neurosci. Methods, 11, 47–60.

62) Brandeis, R., Brandys, Y., Yehuda, S. (1989) The use of the Morris water maze in the study of memory and learning. Int. J. Neurosci., 48, 29–69.

63) D'Hooge, R., De Deyn, P.P. (2001) Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory. Brain Res. Rev, 36, 60–90.

64) Vorhees, C.V. (1987) Maze learning in rats: A comparison of performance in two water mazes in progeny prenatally exposed to different doses of phenytoin. Neurotoxicol. Teratol., 9, 235–241.

65) Vorhees, C.V. (1997) Methods for detecting long-term CNS dysfunction after prenatal exposure to neurotoxins. Drug Chem. Toxicol., 20, 387–399.

66) Akaike, M., Tanaka, K., Goto, M., Sakaguchi, T. (1988) Impaired Biel and Radial arm maze learning in rats with methyl-nitrosurea induced microcephaly. Neurotoxicol. Teratol., 10, 327–332.

67) Cory-Slechta, D.A., Weiss, B., Cox, C. (1983) Delayed behavioral toxicity of lead with increasing exposure concentration. Toxicol. Appl. Pharmacol., 71, 342–352.

68) Campbell, B.A., Haroutunian, V. (1981) Effects of age on long-term memory: Retention of fixed interval responding. *J. Gerontol.,* 36, 338–341.

69) Fix, A.S, Garman, R.H. (2000) Practical aspects of neuropathology: A technical guide for working with the nervous system. Toxicol. Pathol., 28, 122–131.

70) Prophet, E.B., Mills, B., Arrington, J.B., Sobin, L.H. (1994) *Laboratory Methods in Histotechnology*, American Registry of Pathology, Washington, DC, s. 84–107.

71) Bancroft, J.D., Gamble, M. (2002) *Theory and Practice of Histological Techniques*, 5th edition, Churchill Livingstone, London.

▼M5

72) Fix, A.S., Ross, J.F., Stitzel, S.R., Switzer, R.C. (1996) Integrated evaluation of central nervous system lesions: stains for neurons, astrocytes, and microglia reveal the spatial and temporal features of MK-801-induced neuronal necrosis in the rat cerebral cortex. Toxicol. Pathol., 24, 291–304.

73) Schmued, L.C., Hopkins, K.J. (2000) Fluoro-Jade B: A high affinity tracer for the localization of neuronal degeneration. Brain Res., 874, 123–130.

74) Krinke, G.J., Classen, W., Vidotto, N., Suter, E., Wurmlin, C.H. (2001) Detecting necrotic neurons with fluoro-jade stain. Exp. Toxic. Pathol., 53, 365–372.

75) De Olmos, I.S., Beltramino, C.A., and de Olmos de Lorenzo, S. (1994) Use of an amino-cupric-silver technique for the detection of early and semiacute neuronal degeneration caused by neurotoxicants, hypoxia and physical trauma. Neurotoxicol. Teratol., 16, 545–561.

76) De Groot, D.M.G., Bos-Kuijpers, M.H.M., Kaufmann, W.S.H., Lammers, J.H.C.M., O'Callaghan, J.P., Pakkenberg, B., Pelgrim, M.T.M., Waalkens-Berendsen, I.D.H., Waanders, M.M., Gundersen, H.J. (2005a) Regulatory developmental neurotoxicity testing: A model study focusing on conventional neuropathology endpoints and other perspectives. Environ. Toxicol. Pharmacol., 19, 745–755.

77) De Groot, D.M.G., Hartgring, S., van de Horst, L., Moerkens, M., Otto, M., Bos-Kuijpers, M.H.M., Kaufmann, W.S.H., Lammers, J.H.C.M., O'Callaghan, J.P., Waalkens-Berendsen, I.D.H., Pakkenberg, B., Gundersen, H.J. (2005b) 2D and 3D assessment of neuropathology in rat brain after prenatal exposure to methylazoxymethanol, a model for developmental neurotoxicity. Reprod. Toxicol., 20, 417–432.

78) Rodier, P.M., Gramann, W.J. (1979) Morphologic effects of interference with cell proliferation in the early fetal period. *Neurobehav. Toxicol.*, 1, 129–135.

79) Howard, C.V., Reed, M.G. (1998) *Unbiased Stereology: Three-Dimensional Measurement in Microscopy*, Springer-Verlag, New York.

80) Hyman, B.T., Gomez-Isla, T., Irizarry, M.C. (1998) Stereology: A practical primer for neuropathology. J. Neuropathol. Exp. Neurol., 57, 305–310.

81) Korbo, L., Andersen, B.B., Ladefoged, O., Møller, A. (1993) Total numbers of various cell types in rat cerebellar cortex estimated using an unbiased stereological method. Brain Res., 609, 262–268.

82) Schmitz, C. (1997) Towards more readily comprehensible procedures in disector stereology. J. Neurocytol., 26, 707–710.

83) West, M.J. (1999) Stereological methods for estimating the total number of neurons and synapses: Issues of precision and bias. Trends Neurosci., 22, 51–61.

84) Schmitz, C., Hof, P.R. (2005) Design-based stereology in neuroscience. Neuroscience, 130, 813–831.

85) Gavin, C.E., Kates, B., Gerken, L.A., Rodier, P.M. (1994) Patterns of growth deficiency in rats exposed *in utero* to undernutrition, ethanol, or the neuroteratogen methylazoxymethanol (MAM). Teratology, 49, 113–121.

86) Ohno, M., Aotani, H., Shimada, M. (1995) Glial responses to hypoxic/ischemic encephalopathy in neonatal rat cerebrum. Develop. Brain Res., 84, 294–298.

87) Jensen, K.F., Catalano, S.M. (1998) Brain morphogenesis and developmental neurotoxicology. In: *Handbook of Developmental Neurotoxicology*, Slikker, Jr. W., Chang, L.W. (eds) Academic Press, New York, s. 3–41.

88) Ikonomidou, C., Bosch, F., Miksa, M., Bittigau, P., Vöckler, J., Dikranian, K., Tenkova, T.I., Stefovska, V., Turski, L., Olney, J.W. (1999) Blockade of NMDA receptors and apoptotic neurodegeneration in the developing brain. Science, 283, 70–74.

▼M5

89) Ikonomidou, C., Bittigau, P., Ishimaru, M.J., Wozniak, D.F., Koch, C., Genz, K., Price, M.T., Sefovska, V., Hörster, F., Tenkova, T., Dikranian, K., Olney, J.W. (2000) Ethanol-induced apoptotic degeneration and fetal alcohol syndrome. Science, 287, 1056-1060.

90) Friede, R.L. (1989) *Developmental Neuropathology*. Second edition. Springer-Verlag, Berlin.

91) House, D.E., Berman, E., Seeley, J.C., Simmons, J.E. (1992) Comparison of open and blind histopathologic evaluation of hepatic lesions. Toxicol. Let., 63, 127–133.

92) Tilson, H.A., MacPhail, R.C., Crofton, K.M. (1996) Setting exposure standards: a decision process. Environ. Health Perspect., 104, 401–405.

93) US EPA (2005) Guidelines for Carcinogen Risk Assessment. US EPA NCEA-F-0644 A.

94) US EPA (1996) Guidelines for Reproductive Toxicity Risk Assessment, Federal Register 61(212): 56274–56322.

95) Danish Environmental Protection Agency (1995) *Neurotoxicology.* Review of Definitions, Methodology, and Criteria. Miljøprojekt nr. 282. Ladefoged, O., Lam, H.R., Østergaard, G., Nielsen, E., Arlien-Søborg, P.

96) Muller, K.E., Barton, C.N., Benignus, V.A. (1984). Recommendations for appropriate statistical practice in toxicologic experiments. Neurotoxicology, 5, 113–126.

97) Gad, S.C. (1989) Principles of screening in toxicology with special emphasis on applications to Neurotoxicology. J. Am. Coll. Toxicol., 8, 21–27.

98) Abby, H., Howard, E. (1973) Statistical procedures in developmental studies on a species with multiple offspring. Dev. Psychobiol., 6, 329–335.

99) Haseman, J.K., Hogan, M.D. (1975) Selection of the experimental unit in teratology studies. Teratology, 12, 165–172.

100) Holson, R.R., Pearce, B. (1992) Principles and pitfalls in the analysis of prenatal treatment effects in multiparous species. Neurotoxicol. Teratol., 14, 221–228.

101) Nelson, C.J., Felton, R.P., Kimmel, C.A., Buelke-Sam, J., Adams, J. (1985) Collaborative Behavioral Teratology Study: Statistical approach. Neurobehav. Toxicol. Teratol., 7, 587–590.

102) Crofton, K.M., Makris, S.L., Sette, W.F., Mendez, E., Raffaele, K.C. (2004) A qualitative retrospective analysis of positive control data in developmental neurotoxicity studies. Neurotoxicol. Teratol., 26, 345–352.

103) Bolon, B., Garman, R., Jensen, K., Krinke, G., Stuart, B., and an *ad hoc* working group of the STP Scientific and Regulatory Policy Committee. (2006) A 'best practices' approach to neuropathological assessment in developmental neurotoxicity testing – for today. Toxicol. Pathol. 34, 296–313.

104) Tamura, R.N., Buelke-Sam, J. (1992) The use of repeated measures analysis in developmental toxicology studies. Neurotoxicol. Teratol., 14(3), 205–210.

105) Tukey, J.W., Ciminera, J.L., Heyse, J.F. (1985) Testing the statistical certainty of a response to increasing doses of a drug. Biometrics, 41, 295–301.

106) Crofton, K.M., Foss, J.A., Haas, U., Jensen, K., Levin, E.D., and Parker, S.P. (2008) Undertaking positive control studies as part of developmental neurotoxicity testing: report from the ILSI Research Foundation/Risk Science Institute expert working group on neurodevelopmental endpoints. *Neurotoxicology and Teratology*, 30(4), 266–287.

107) Raffaele, K.C., Fisher, E., Hancock, S., Hazelden, K., and Sobrian, S.K. (2008) Determining normal variability in a developmental neurotoxicity test: report from the ILSI Research Foundation/Risk Science Institute expert working group on neurodevelopmental endpoints. *Neurotoxicology and Teratology*, 30(4), 288–325.

▼**M5**

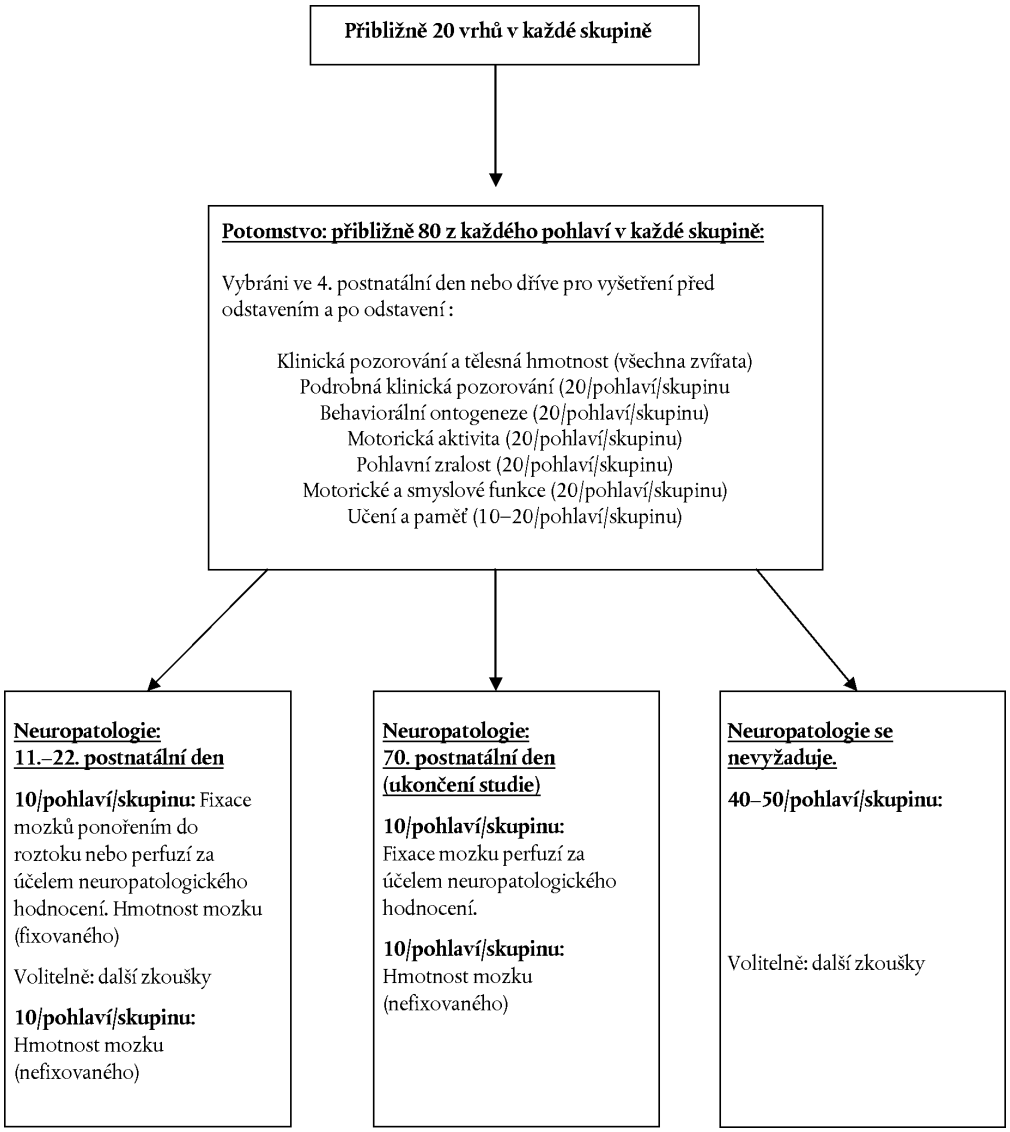
108) Holson, R.R., Freshwater, L., Maurissen, J.P.J., Moser, V.C., and Phang, W. (2008) Statistical issues and techniques appropriate for developmental neurotoxicity testing: a report from the ILSI Research Foundation/Risk Science Institute expert working group on neurodevelopmental endpoints. *Neurotoxicology and Teratology*, 30(4), 326–348.

109) Tyl, R.W., Crofton, K.M., Moretto, A., Moser, V.C., Sheets, L.P., and Sobotka, T.J. (2008) Identification and interpretation of developmental neurotoxicity effects: a report from the ILSI Research Foundation/Risk Science Institute expert working group on neurodevelopmental endpoints *Neurotoxicology and Teratology*, 30(4), 349–381.

▼M5

Obrázek 1

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



▼M5

Dodatek 1

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

Příklad č. 1

2. Pro zkoušky behaviorální ontogeneze před odstavením se použije jedna sada 20 mláďat od každého pohlaví a každé úrovně dávky (tj. 1 samec a 1 samice z každého vrhu). Z těchto zvířat se v 22. postnatální den humánně usmrtí 10 mláďat od každého pohlaví a každé úrovně dávky (tj. 1 samec nebo 1 samice z každého vrhu). Mozky se vyjmou, zváží a zpracují pro histopatologické hodnocení. Kromě toho se shromáždí údaje o hmotnosti mozku s použitím nefixovaných mozků ostatních 10 samců a 10 samic z každé úrovně dávky.

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

4. Pro zkoušky poznávacích funkcí u mladých dospělých (např. 60.–70. postnatální den) se použije třetí sada 20 mláďat od každého pohlaví a každé úrovně dávky (tj. 1 samec a 1 samice z každého vrhu). Z těchto zvířat se 10 zvířat od každého pohlaví a každé skupiny (1 samec nebo 1 samice z každého vrhu) při ukončení studie usmrtí a mozek se vyjme a zváží.

5. Zbývajících 20 zvířat od každého pohlaví a každé skupiny se ponechá v záloze pro případné další zkoušky.

Tabulka 1

Mládě č. [a]		Počet mláďat zařazených do zkoušky	Vyšetření/zkouška
♂	♀		
1	5	20 ♂ + 20 ♀	Behaviorální ontogeneze
		10 ♂ + 10 ♀	Hmotnost/neuropatologie/ morfometrie mozku, 22. postnatální den
		10 ♂ + 10 ♀	Hmotnost mozku, 22. postnatální den
2	6	20 ♂ + 20 ♀	Podrobná klinická pozorování
		20 ♂ + 20 ♀	Motorická aktivita
		20 ♂ + 20 ♀	Pohlavní zralost
		20 ♂ + 20 ♀	Motorické a smyslové funkce
		20 ♂ + 20 ♀	Učení a paměť (25. postnatální den)
		10 ♂ + 10 ♀	Hmotnost/neuropatologie/ morfometrie mozku mladých dospělých ~ 70. postnatální den)

▼**M5**

Mládě č. [a]		Počet mláďat zařazených do zkoušky	Vyšetření/zkouška
♂	♀		
3	7	20 ♂ + 20 ♀	Učení a paměť (mladí dospělí)
		10 ♂ + 10 ♀	Hmotnost mozku mladých dospělých ~ 70. postnatální den)
4	8	—	Zvířata v rezervě pro nahrazení nebo další zkoušky

[a] Pro tento příklad jsou z vrhů vybráni 4 samci + 4 samice; sameči jsou očíslováni čísly 1 až 4, samičky čísly 5 až 8.

Příklad č. 2

6. Pro zkoušky behaviorální ontogeneze před odstavením se použije jedna sada 20 mláďat od každého pohlaví a každé úrovně dávky (tj. 1 samec a 1 samice z každého vrhu). Z těchto zvířat se v 11. postnatální den 10 mláďat od každého pohlaví a každé úrovně dávky (tj. 1 samec nebo 1 samice z každého vrhu) humánně usmrtí. Mozky se vyjmou, zváží a zpracují pro histopatologické hodnocení.

7. Další sada 20 zvířat od každého pohlaví a každé úrovně dávky (1 samec a 1 samice z každého vrhu) se použije pro vyšetření po odstavení (podrobná klinická pozorování, motorická aktivita, posouzení věku pohlavní zralosti a motorické a smyslové funkce). Z těchto zvířat se 10 zvířat od každého pohlaví a každé úrovně dávky (tj. 1 samec nebo 1 samice z každého vrhu) anestetizuje a fixuje perfuzí při ukončení studie (přibližně v 70. postnatální den). Po další fixaci *in situ* se vyjme mozek, zváží se a zpracuje pro neuropatologické hodnocení.

8. Pro testování poznávacích funkcí u dospívajících a mladých dospělých se použije 10 mláďat od každého pohlaví a každé úrovně dávky (tj. 1 samec nebo 1 samice z každého vrhu). Pro zkoušky poznávacích funkcí v 23. postnatální den a u mladých dospělých se použijí odlišná zvířata. Při ukončení se 10 zvířat od každého pohlaví a každé skupiny, která byla testována jako dospělá, usmrtí, mozek se vyjme a zváží.

9. Zbývajících 20 zvířat od každého pohlaví a každé skupiny, která nebyla vybrána pro zkoušky, se při odstavení usmrtí a vyloučí.

Tabulka 2

Mládě č. [a]		Počet mláďat zařazených do zkoušky	Vyšetření/zkouška
♂	♀		
1	5	20 ♂ + 20 ♀	Behaviorální ontogeneze
		10 ♂ + 10 ♀	Hmotnost/neuropatologie/morfometrie mozku, 11. postnatální den
2	6	20 ♂ + 20 ♀	Podrobná klinická pozorování
		20 ♂ + 20 ♀	Motorická aktivita
		20 ♂ + 20 ♀	Pohlavní zralost
		20 ♂ + 20 ♀	Motorické a smyslové funkce
		10 ♂ + 10 ♀	Hmotnost/neuropatologie/morfometrie mozku mladých dospělých ~ 70. postnatální den)

▼**M5**

Mládě č. [a]		Počet mláďat zařazených do zkoušky	Vyšetření/zkouška
♂	♀		
3	7	10 ♂ + 10 ♀ [b]	Učení a paměť (23. postnatální den)
3	7	10 ♂ + 10 ♀ [b]	Učení a paměť (mladí dospělí) Hmotnost mozku mladých dospělých
4	8	—	Zvířata usmrcená a vyloučená, 21. postnatální den

[a] Pro tento příklad jsou z vrhů vybráni 4 samci + 4 samice; sameči jsou očíslováni čísly 1 až 4, samičky čísly 5 až 8.

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

Příklad č. 3

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

11. Další sada 20 zvířat od každého pohlaví a každé úrovně dávky (tj. 1 samec a 1 samice z každého vrhu) se použije pro testování behaviorální ontogeneze (motorická aktivita), vyšetření po odstavení (motorická aktivita a posouzení věku pohlavní zralosti) a testování poznávacích funkcí u dospívajících.

12. Další sada 20 zvířat od každého pohlaví a každé úrovně dávky (tj. 1 samec a 1 samice z každého vrhu) se použije pro zkoušky motorických a smyslových funkcí (úleková reakce na zvukový podnět) a pro podrobná klinická pozorování. Z těchto zvířat se 10 zvířat od každého pohlaví a každé úrovně dávky (tj. 1 samec nebo 1 samice z každého vrhu) anestetizuje a fixuje perfuzí při ukončení studie (přibližně v 70. postnatální den). Po další fixaci *in situ* se vyjme mozek, zváží se a zpracuje pro neuropatologické hodnocení.

13. Další sada 20 mláďat od každého pohlaví a každé úrovně dávky (tj. 1 samec a 1 samice z každého vrhu) se použije pro zkoušení poznávacích funkcí u mladých dospělých. Z těchto zvířat se 10 zvířat od každého pohlaví a každé skupiny (tj. 1 samec nebo 1 samice z každého vrhu) usmrtí při ukončení studie, mozek se vyjme a zváží.

Tabulka 3

Mládě č. [a]		Počet mláďat zařazených do zkoušky	Vyšetření/zkouška
♂	♀		
1	5	10 ♂ + 10 ♀	Hmotnost/neuropatologie/ morfometrie mozku v 11. postnatální den
		10 ♂ + 10 ♀	Hmotnost mozku v 11. postnatální den
2	6	20 ♂ + 20 ♀	Behaviorální ontogeneze (motorická aktivita)
		20 ♂ + 20 ♀	Motorická aktivita
		20 ♂ + 20 ♀	Pohlavní zralost
		20 ♂ + 20 ♀	Učení a paměť (27. postnatální den)

▼**M5**

Mládě č. [a]		Počet mláďat zařazených do zkoušky	Vyšetření/zkouška
♂	♀		
3	7	20 ♂ + 20 ♀	Úleková reakce (dospívající a mladí dospělí)
		20 ♂ + 20 ♀	Podrobná klinická pozorování
		10 ♂ + 10 ♀	Hmotnost/neuropatologie/ morfometrie mozku mladých dospělých ~ 70. postnatální den
4	8	20 ♂ + 20 ♀	Učení a paměť (mladí dospělí)
		10 ♂ + 10 ♀	Hmotnost mozku mladých dospělých

[a] Pro tento příklad jsou z vrhů vybráni 4 samci + 4 samice; samečci jsou očíslováni čísly1 až 4, samičky čísly 5 až 8.

▼**M5**

Dodatek 2

Definice

Chemická látka: látka nebo směs.

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

▼M5

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

ÚVOD

1. Tato zkušební metoda je rovnocenná Pokynu OECD pro zkoušení (TG) 440 (2007). Organizace OECD v roce 1998 zahájila činnost s vysokou prioritou zaměřenou na revizi stávajících pokynů a vypracování nových pokynů pro screening a zkoušení potenciálních endokrinních disruptorů (1). Jedním z prvků této činnosti bylo vypracovat metodický návod pro provádění uterotrofní biologické zkoušky u hlodavců. Uterotrofní biologická zkouška u hlodavců poté prošla rozsáhlým validačním programem, který mimo jiné zahrnoval sestavení podrobného podkladového dokumentu (2)(3) a provedení rozsáhlých vnitrolaboratorních a mezilaboratorních studií, aby se prokázal význam a reprodukovatelnost biologické zkoušky s účinným referenčním estrogenem, slabými agonisty estrogenního receptoru, silným antagonistou estrogenního receptoru a negativní referenční chemickou látkou (4)(5)(6)(7)(8)(9). Tato zkušební metoda B.54 vychází ze zkušeností získaných během programu validačních zkoušek a z výsledků těchto zkoušek s agonisty estrogenů.

2. Uterotrofní biologická zkouška je krátkodobá screeningová zkouška, která pochází z 30. let 20. století (27)(28) a standardizovanou screeningovou metodou se stala na základě rozhodnutí expertního výboru v roce 1962 (32)(35). Je založena na zvýšení hmotnosti dělohy neboli uterotrofní reakce (přehled viz 29). Hodnotí schopnost chemické látky vyvolávat biologické aktivity odpovídající agonistům nebo antagonistům přírodních estrogenů (např. 17-beta-estradiolu), avšak její použití pro zjištění antagonistních látek je mnohem méně obvyklé než pro zjištění agonistních látek. Děloha reaguje na estrogeny dvojím způsobem: Počáteční reakcí je zvýšení hmotnosti v důsledku nasáknutí vodou. Po této reakci následuje nárůst hmotnosti v důsledku růstu tkáně (30). Reakce dělohy u potkanů a u myší jsou kvalitativně srovnatelné.

3. Tato biologická zkouška slouží jako screeningová zkouška *in vivo* a na její provedení je třeba pohlížet v kontextu „Koncepčního rámce OECD pro zkoušky a posuzování chemických látek narušujících činnost endokrinních žláz“ (dodatek 2). V tomto koncepčním rámci je uterotrofní biologická zkouška zařazena na úroveň 3 jako zkouška *in vivo* poskytující údaje o jediném endokrinním mechanismu, tj. estrogenitě.

4. Předpokládá se zařazení uterotrofní biologické zkoušky do baterie zkoušek *in vitro* a *in vivo* za účelem zjištění chemických látek schopných interakce s endokrinním systémem, která nakonec bude sloužit k posouzení rizik pro lidské zdraví nebo životní prostředí. V rámci validačního programu OECD byli používáni silní a slabí agonisté estrogenu s cílem zhodnotit schopnost zkoušky identifikovat estrogenní chemické látky (4)(5)(6)(7)(8). Tímto způsobem byla jasně prokázána citlivost tohoto zkušebního postupu z hlediska agonistů estrogenu, jakož i dobrá vnitrolaboratorní a mezilaboratorní reprodukovatelnost.

5. Pokud jde o negativní chemické látky, byla do validačního programu zařazena pouze jedna „negativní“ referenční chemická látka, u které byly známy negativní výsledky z uterotrofní zkoušky a dalších zkoušek *in vitro* s využitím receptorů a vazby na receptory. Avšak byly zhodnoceny i další zkušební údaje nesouvisející s validačním programem OECD, jež dále podpořily specifičnost uterofrofní biologické zkoušky pro screening agonistů estrogenů (16).

▼**M5**

VÝCHOZÍ ÚVAHY A OMEZENÍ

6. Agonisté a anatagonisté estrogenů působí jako ligandy pro alfa a beta receptory estrogenů a mohou aktivovat nebo potlačovat transkripční aktivitu receptorů. To může potenciálně vést k nepříznivým zdravotním důsledkům, včetně účinků na reprodukci a vývoj. Proto existuje potřeba rychlého posouzení a zhodnocení chemické látky jakožto možného agonisty nebo antagonisty estrogenů. Afinita ligandu k estrogenovému receptoru nebo aktivace transkripce reporterových genů *in vitro*, byť informativní, je pouze jedním z několika určujících faktorů možného nebezpečí. Jiné určující faktory mohou zahrnovat aktivaci a deaktivaci metabolismu po vstupu do organismu, distribuci do cílových tkání a odstranění z těla, což přinejmenším zčásti závisí na způsobu podávání a na zkoušené chemické látce. Z toho vyplývá potřeba zjištění možné aktivity chemické látky *in vivo* za určitých podmínek, pokud dostatečné informace neposkytují již vlastnosti ADME (absorpce – distribuce – metabolismus – eliminace) dané chemické látky. Děložní tkáně reagují na stimulaci estrogeny rychlým a mohutným růstem, zejména u laboratorních hlodavců, kde estrální cyklus trvá přibližně čtyři dny. Druhy hlodavců, zejména potkan, se rovněž široce používají ve studiích toxicity za účelem charakterizace nebezpečí. Děloha hlodavců je proto vhodným cílovým orgánem pro zjišťování estrogenních agonistů a antagonistů *in vivo*.

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

8. S ohledem na zásadu dobrého zacházení se zvířaty by měla být upřednostňována metoda používající nezralé potkany, kdy nedochází k chirurgické předúpravě zvířat a nedochází také k případnému nepoužití těch zvířat, která vykazují příznaky estru (říje) (viz odstavec 30).

▼**M5**

9. Uterotrofní reakce není čistě estrogenního původu, tj. reakci mohou vyvolat i jiné chemické látky než agonisté nebo antagonisté estrogenů. Například ke stimulativní reakci mohou vést poměrně vysoké dávky progesteronu, testosteronu nebo různých syntetických progestinů (30). Jakoukoli reakci lze analyzovat histologicky z hlediska keratinizace a kornifikace vaginy (30). Bez ohledu na možný původ reakce by pozitivní výsledek uterotrofní biologické zkoušky měl běžně vyvolat kroky zaměřené na další vyjasnění. Další poznatky o estrogenitě by mohly přinést studie *in vitro*, jako jsou studie vazby na estrogenní receptory a studie transkripční aktivace, nebo jiné *in vivo* studie, jako např. studie puberty u samic.

10. Vzhledem k tomu, že uterotrofní biologická zkouška slouží jako screeningová zkouška *in vivo*, byla při validaci zaměřena pozornost hlavně na dobré zacházení se zvířaty a stupňovitou strategii zkoušení. Proto bylo úsilí zaměřeno na přísné ověření reprodukovatelnosti a citlivosti zkoušky na estrogenitu – což je hlavním zájmem u mnoha chemických látek – a složce antiestrogenity této zkoušky byla věnována malá pozornost. Zkoušen byl pouze jeden antiestrogen se silným působením, jelikož počet chemických látek s jasným antiestrogenním profilem (nezastíněným určitým estrogenním působením) je velmi omezený. Tato zkušební metoda je tudíž určena pro estrogenní protokol a protokol popisující antagonistní stránku zkoušky je obsažen v Pokynech (37). Reprodukovatelnost a citlivost zkoušky v případě chemických látek s čistě antiestrogenním působením bude přesněji stanovena později, až bude tento zkušební postup po nějakou dobu běžně používán a bude identifikováno více chemických látek s tímto druhem působení.

11. Má se za to, že veškeré postupy založené na zvířatech budou splňovat normy jednotlivých zemí v oblasti péče o zvířata. Popis péče a zacházení, který je stanoven níže, představuje minimální požadavky a bude nahrazen místními předpisy, např. směrnicí Evropského parlamentu a Rady 2010/63/EU ze dne 22. září 2010 o ochraně zvířat používaných pro vědecké účely (38). Další pokyny týkající se humánního zacházení se zvířaty stanovila organizace OECD (25).

12. Stejně jako u všech zkoušek používajících živá zvířata je nezbytné před zahájením zkoušek zajistit, že údaje jsou skutečně nezbytné. Dvě podmínky, kdy mohou být údaje nutné, jsou například tyto:

— vysoký expoziční potenciál (úroveň 1 koncepčního rámce, dodatek 2) nebo příznaky estrogenity (úroveň 2), aby se zjistilo, zda takový účinek může nastat *in vivo*,

— účinky naznačující estrogenitu na úrovni 4 nebo 5 zkoušení *in vivo*, aby se potvrdilo, že tyto účinky souvisely s estrogenním mechanismem, který nelze objasnit použitím zkoušky *in vitro*.

13. Definice použité při této zkušební metodě jsou uvedeny v dodatku 1.

▼M5

PODSTATA ZKOUŠKY

14. Uterotrofní biologická zkouška je z hlediska své citlivosti založena na systému testování zvířat, při kterém hypothalamo-hypofýzo-ovariální osa není funkční, což vede k nízkým endogenním úrovním cirkulujícího estrogenu. To zajistí nízkou výchozí hmotnost dělohy a maximální šíři reakce na podávané estrogeny. Tento požadavek splňují dva stavy samic hlodavců, kdy jsou citlivé na estrogeny:

i) nezralé samice po odstavení a před pubertou; a

ii) mladé dospělé samice po odstranění vaječníků s dostatečnou dobou na to, aby se děložní tkáně mohly vrátit do původního stavu.

15. Zkoušená chemická látka je podávána denně žaludeční sondou nebo subkutánní injekcí. Odstupňované dávky zkoušené chemické látky se podávají nejméně dvěma experimentálním skupinám (pro pokyny viz odstavec 33) pokusných zvířat s použitím jedné úrovně dávky na každou skupinu a dobu aplikace tři po sobě jdoucí dny v případě použití metody nezralých mláďat a nejméně tři po sobě jdoucí dny v případě metody dospělého zvířete s odstraněnými vaječníky. Přibližně 24 hodin po poslední dávce se zvířata podrobí pitvě. U agonistů estrogenu se posoudí střední hmotnost dělohy experimentálních skupin zvířat v porovnání se skupinou s vehikulem s cílem zjistit, zda došlo ke statisticky významnému zvýšení. Statisticky významné zvýšení střední hmotnosti dělohy experimentální skupiny ukazuje na pozitivní reakci v této biologické zkoušce.

POPIS METODY

Výběr druhu zvířat

16. Lze použít běžně užívané kmeny laboratorních hlodavců. Při validaci byly například použity kmeny potkanů Sprague-Dawley a Wistar. Neměly by se používat kmeny, o kterých se ví nebo předpokládá, že mají méně reaktivní dělohu. Laboratoř by měla prokázat citlivost použitého kmene, jak je popsáno v odstavcích 26 a 27.

17. Od 30. let 20. století jsou k uterotrofní biologické zkoušce běžně používáni potkani a myši. Validační studie OECD byly prováděny pouze na potkanech na základě toho, že existuje obecná shoda, jež předpokládá, že oba druhy jsou rovnocenné, a proto by v zájmu úspory zdrojů a zvířat měl pro celosvětové ověření postačovat jeden druh. Ve většině studií reprodukční a vývojové toxicity je zvoleným druhem potkan. Vzhledem k tomu, že u myší existuje rozsáhlá historická databáze a aby působnost zkušební metody pro provádění uterotrofní biologické zkoušky na hlodavcích byla rozšířena i na použití myší jako zkušebního druhu, byla provedena zkrácená následná validační studie na myších (16). V souladu s původním záměrem úspory zdrojů a zvířat byl vybrán překlenovací přístup s omezeným počtem zkoušených chemických látek, zúčastněných laboratoří a bez testování kódovaných vzorků. Tato překlenovací validační studie ukazuje, že v případě uterotrofní biologické zkoušky na mladých dospělých myších s odstraněnými vaječníky jsou údaje získané u potkanů a myší kvalitativně i kvantitativně v souladu. To umožňuje v případech, kdy výsledek uterotrofní biologické zkoušky může předcházet dlouhodobé studii, použít v obou studiích zvířata stejného kmene a původu. Překlenovací přístup byl omezen na myši s odstraněnými vaječníky a zpráva neposkytuje spolehlivý soubor údajů pro ověření modelu s nezralými mláďaty, a tudíž model s nezralými mláďaty u myší se do stávající zkušební metody nezahrnuje.

▼M5

18. V některých případech tedy mohou být místo potkanů použity myši. Výběr tohoto druhu je třeba zdůvodnit na základě toxikologických, farmakokinetických a/nebo jiných kritérií. U myší mohou být nezbytné změny v testovacím postupu. Například spotřeba potravy na základě tělesné hmotnosti je u myší vyšší než u potkanů, a obsah fytoestrogenu v potravě by proto měl být u myší nižší než u potkanů (9)(20)(22).

Podmínky chovu a krmení

19. Veškeré postupy by měly vyhovovat místním normám péče o laboratorní zvířata. Zde uvedené popisy péče a zacházení představují minimální požadavky a budou nahrazeny místními právními předpisy, např. směrnicí Evropského parlamentu a Rady 2010/63/EU ze dne 22. září 2010 o ochraně zvířat používaných pro vědecké účely (38). Teplota v místnosti pro pokusná zvířata by měla být 22 °C (s přibližným rozpětím ± 3 °C). Relativní vlhkost by měla být minimálně 30 % a pokud možno nepřesáhnout 70 %, kromě doby úklidu místnosti. Cílem by měla být relativní vlhkost 50–60 %. Osvětlení by mělo být umělé. Mělo by se střídat 12 hodin světla a 12 hodin tmy.

20. Laboratorní stravu a pitnou vodu dostávají zvířata *ad libitum*. Mladá dospělá zvířata lze chovat jednotlivě nebo v klecích po skupinách, maximálně tříčlenných. Vzhledem k nízkému věku nezralých zvířat se doporučuje chov v sociálních skupinách.

21. Je známo, že vysoká úroveň fytoestrogenů v laboratorní stravě zvyšuje hmotnost dělohy u hlodavců v míře, která může narušit uterotrofní biologickou zkoušku (13)(14)(15). Vysoká úroveň fytoestrogenů a metabolizovatelné energie v laboratorní stravě může mít rovněž za následek časný nástup puberty, jestliže se používají nezralá zvířata. Přítomnost fytoestrogenů vyplývá především ze zařazení produktů ze sóji a vojtěšky do laboratorní stravy a ukázalo se, že koncentrace fytoestrogenů v jednotlivých šaržích standardní laboratorní stravy je různá (23). Důležitou proměnnou je tělesná hmotnost, neboť množství spotřebované potravy souvisí s tělesnou hmotností. Skutečná dávka spotřebovaných fytoestrogenů ze stejné stravy se proto může lišit podle druhu a podle věku (9). U nezralých samic potkana může být spotřeba potravy na jednotku tělesné hmotnosti přibližně dvojnásobně vyšší než u mladých dospělých samic s odstraněnými vaječníky. U mladých dospělých myší může být spotřeba potravy na jednotku tělesné hmotnosti přibližně čtyřnásobně vyšší než u mladých dospělých samic potkana s odstraněnými vaječníky.

22. Výsledky uterotrofní biologické zkoušky (9)(17)(18)(19) však ukazují, že omezené množství fytoestrogenů ve stravě je přijatelné a nesnižuje citlivost biologické zkoušky. Určitým vodítkem může být, že u nezralých samic potkana Sprague-Dawley a Wistar by úroveň fytoestrogenů ve stravě neměla přesáhnout 350 μg ekvivalentů genisteinu na gram laboratorní stravy (6)(9). Taková strava by měla být vhodná i při zkouškách na mladých dospělých potkanech s odstraněnými vaječníky, protože spotřeba potravy měřená na jednotku tělesné hmotnosti je u mladých dospělých nižší než u nezralých zvířat. Mají-li být použity dospělé myši s odstraněnými vaječníky nebo potkani citlivější na fytoestrogeny, musí být zváženo úměrné snížení úrovně fytoestrogenů v stravě (20). Rozdíly v dostupné metabolizovatelné energii z různé stravy navíc mohou vést k časovým posunům v nástupu puberty (21)(22).

▼M5

23. Před studií je nutný pečlivý výběr stravy bez zvýšené úrovně fytoestrogenů (jako vodítko viz (6)(9)) nebo zvýšené úrovně metabolizovatelné energie, jež mohou zkreslit výsledky (15)(17)(19)(22)(36). Pro zajištění náležité výkonnosti zkušebního systému, který laboratoř použije, jak stanoví odstavec 26 a 27, je důležité zkontrolovat oba tyto faktory. Pro jistotu by v souladu se zásadami správné laboratorní praxe (SLP) měly být z každé sady stravy podávané během studie odebrány reprezentativní vzorky pro případnou analýzu obsahu fytoestrogenů (např. v případě vysoké kontrolní hmotnosti dělohy ve srovnání s historickými kontrolami nebo nepřiměřené reakce na referenční estrogen, 17-alfa-ethinylestradiol). Vzorky by měly být analyzovány během studie nebo zmrazené na –20 °C nebo ošetřené takovým způsobem, aby se zabránilo změně složení před analýzou.

24. Některá steliva mohou obsahovat přirozeně se vyskytující estrogenní nebo antiestrogenní chemické látky (např. je známo, že kukuřičný klas ovlivňuje cykličnost u potkanů a podle všeho je antiestrogenní). Zvolené stelivo by mělo obsahovat minimální úroveň fytoestrogenů.

Příprava zvířat

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

POSTUP

Ověření odborné způsobilosti laboratoře

26. Odbornou způsobilost laboratoře lze ověřit dvěma různými způsoby:

— pravidelné ověřování založené na počáteční výchozí studii s pozitivní kontrolní látkou (viz odstavec 27). Nejméně každých 6 měsíců – a pokaždé, když dojde ke změně, která může ovlivnit provedení studie (např. nové složení stravy, změna personálu provádějícího sekce, změna kmene nebo dodavatele zvířat apod.) – by měla být ověřena reakční schopnost zkušebního systému (modelu zvířat) pomocí vhodné dávky (na základě výchozí studie s pozitivní kontrolní látkou popsané v odstavci 27) referenčního estrogenu: 17-alfa-ethinylestradiolu (číslo CAS 57-63-6)(EE).

— použití souběžných kontrol tak, že se do každé zkoušky zařadí skupina, které je podávána vhodná dávka referenčního estrogenu.

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

▼M5

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

Počet a stav zvířat

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

Věk nezralých zvířat

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

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

Postup odstranění vaječníků

30. U samic potkana a myši (experimentální skupina a kontrolní skupina), kterým mají být odstraněny vaječníky, by k odstranění vaječníků mělo dojít mezi 6. a 8. týdnem věku. U potkanů by mezi odstraněním vaječníků a prvním dnem podávání mělo uplynout nejméně 14 dnů, aby se umožnil návrat dělohy do minimálního, stabilního výchozího stavu. U myší by mezi odstraněním vaječníků a prvním dnem podávání mělo uplynout nejméně 7 dnů. Jelikož pro vyvolání významné cirkulující úrovně estrogenů (3) postačí malé množství tkáně vaječníků, zvířata by před použitím měla být nejméně po pět po sobě jdoucích dnů (např. u potkanů v 10.–14. den po odstranění vaječníků) zkoušena pozorováním epiteliálních buněk získaných výtěrem z vaginy. Pokud zvířata vykazují jakékoli příznaky, že vstupují do estru, neměla by být použita. Dále by při pitvě měly být zkoumány zbytky vaječníků, zda neexistují příznaky přítomnosti vaječníkové tkáně. Pokud ano, dané zvíře by nemělo být použito pro výpočty (3).

31. Při zahájení postupu odstranění vaječníků je zvíře ve ventrální poloze poté, co bylo řádně anestetizováno. Řez otevírající dorzo-laterální stěnu břišní by měl být přibližně 1 cm dlouhý, od středu mezi spodním okrajem žeber a hřebenem kosti kyčelní a několik milimetrů vedle bočního okraje bederního svalu. Vaječník se vyjme z břišní dutiny a položí na aseptickou podložku. Vaječník se oddělí ve spojení vejcovodu s tělem dělohy. Po ujištění, že nedochází k masivnímu krvácení, by břišní stěna měla být uzavřena suturou a kůže klipsy nebo vhodným stehem. Místa podvazu jsou schematicky ukázány na obrázku 1. Mělo by být použito vhodné pooperační tišení bolesti v souladu s doporučením veterinárního lékaře se zkušenostmi v oblasti péče o hlodavce.

▼M5

Tělesná hmotnost

32. Při metodě dospělých samic s odstraněnými vaječníky tělesná hmotnost a hmotnost dělohy spolu nekorelují, protože hmotnost dělohy je ovlivňována hormony, např. estrogeny, ale nikoli růstovými faktory, které regulují velikost těla. Naopak v modelu s nezralými zvířaty tělesná hmotnost s hmotností dělohy souvisí, dokud dospívají (34). V okamžiku zahájení studie by tak v modelu nezralých zvířat měla být odchylka v jejich hmotnosti minimální a neměla by překročit ± 20 % střední hodnoty hmotnosti. To znamená, že velikost vrhu by měla být chovatelem standardizována, aby se zajistilo, že potomstvo různých mateřských zvířat bude krmeno přibližně stejně. Zvířata by měla být přiřazena ke skupinám (kontrolním a experimentálním) náhodným rozdělením z hlediska hmotnosti, takže střední tělesná hmotnost každé skupiny se nebude statisticky lišit od kterékoli jiné skupiny. Mělo by se dbát na to, aby nedošlo k přiřazení sourozenců z vrhu do stejné experimentální skupiny, pokud možno bez zvyšování počtu vrhů, jež mají být používány při vyšetřeních.

Dávkování

33. K tomu, aby se zjistilo, zda zkoušená chemická látka může mít estrogenní účinek *in vivo*, běžně postačí dvě exponované skupiny a jedna kontrolní skupina, a s ohledem na zásadu dobrého zacházení se zvířaty je proto upřednostňováno toto uspořádání. Je-li záměrem získat křivku dávka-odpověď nebo extrapolovat na nižší dávky, jsou zapotřebí nejméně tři exponované skupiny. Jsou-li požadovány informace vycházející za rámec zjištění estrogenního působení (např. odhad potence), měl by být zvážen odlišný režim dávkování. S výjimkou podávání zkoušené chemické látky se se zvířaty v kontrolní skupině zachází stejně jako se zvířaty v experimentální skupině. Pokud se při podávání zkoušené chemické látky používá vehikulum, podává se kontrolní skupině ve stejném objemu, který byl použit v experimentálních skupinách (nebo v nejvyšším objemu použitém v exponovaných skupinách, pokud je u jednotlivých skupin rozdílný).

34. V případě uterotrofní biologické zkoušky je cílem vybrat dávky, které zaručují přežití zvířat a nezpůsobují významnou toxicitu nebo utrpení zvířat po uplynutí tří po sobě jdoucích dnů podávání chemické látky, až do maximální dávky 1 000 mg/kg/den. Při výběru všech úrovní dávek by měly být zohledněny veškeré existující údaje o toxických a toxikokinetických vlastnostech, které jsou pro zkoušenou chemickou látku nebo příbuzné materiály dostupné. Nejvyšší úroveň dávky by měla především zohlednit hodnotu LD50 a/nebo informace o akutní toxicitě, aby nedošlo k úmrtí, vážnému poškození nebo utrpení zvířat (24)(25)(26). Nejvyšší dávka by měla představovat maximální tolerovanou dávku; přijata by byla i studie provedená s úrovní dávky, jež vyvolala pozitivní uterotrofní reakci. V rámci screeningu jsou obecně přijatelné velké intervaly v dávkování (např. jedna polovina logaritmických jednotek, což odpovídá zvyšování dávky po 3,2, nebo dokonce až do 1 logaritmické jednotky). Nejsou-li dostupné žádné vhodné údaje, může být provedena předběžná studie pro zjištění rozmezí dávek, aby se podle ní určily dávky, které mají být použity.

35. Alternativně, pokud může být estrogenní potence agonistní látky odhadnuta podle údajů získaných *in vitro* (nebo *in silico*), mohou být pro výběr dávky vzaty v úvahu tyto údaje. Například množství zkoušené chemické látky, které by vyvolalo uterotrofní reakce ekvivalentní referenční agonistní látce (ethinylestradiolu), se odhaduje podle jejích relativních *in vitro* potencí vůči ethinylestradiolu. Nejvyšší zkušební dávka by byla získána vynásobením této ekvivalentní dávky vhodným koeficientem, např. 10 nebo 100.

▼M5

Experimentální zjištění rozmezí dávek

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

Podávání látky

37. Zkoušená chemická látka je podávána ústní sondou nebo subkutánní injekcí. Při volbě způsobu podávání musí být zohledněny zásady dobrého zacházení se zvířaty, jakož i toxikologické aspekty, jako je vhodnost zvoleného způsobu podávání z hlediska expozice člověka dané chemické látce (např. ústní sonda pro modelování požití, subkutánní injekce pro modelování inhalace nebo adsorpce kůží), fyzikálně-chemické vlastnosti zkoušené chemické látky, a zvláště pak existující toxikologické informace a údaje o metabolismu a kinetice (např. potřeba vyhnout se metabolismu prvního průchodu, lepší účinnost při konkrétním způsobu podávání).

38. Kdykoliv to bude možné, doporučuje se nejprve zvážit použití vodného roztoku/suspenze. Jelikož však většina estrogenních ligandů nebo jejich metabolických prekursorů má tendenci být hydrofobní, nejčastějším postupem je použití roztoku/emulze v oleji (např. v kukuřičném, arašídovém, sezamovém nebo olivovém oleji). Tyto oleje však mají různou kalorickou hodnotu a obsah tuku, a vehikulum by tak mohlo ovlivnit celkový příjem metabolizovatelné energie, což by mohlo změnit měřené sledované vlastnosti, např. hmotnost dělohy, zvláště při použití metody s nezralými zvířaty (33). Každé vehikulum, které má být použito, by mělo být před studií testováno oproti kontrolní skupině bez vehikula. Zkoušené chemické látky lze rozpustit v minimálním množství 95 % ethanolu nebo jiných vhodných rozpouštědel a zředit na konečnou pracovní koncentraci ve zkušebním vehikulu. Musí být známa toxická charakteristika daného rozpouštědla a měla by být prověřena na kontrolní skupině vystavené pouze působení rozpouštědla. Je-li zkoušená chemická látka považována za stabilní, lze rozpuštění zkoušené chemické látky napomoci mírným ohřátím a intenzivním mechanickým působením. Měla by být určena stálost zkoušené chemické látky ve vehikulu. Je-li zkoušená chemická látka po dobu studie stálá, lze připravit jeden zásobní roztok zkoušené chemické látky a denně připravovat roztok podle stanoveného dávkování.

39. Nastavení dávkování bude záviset na použitém modelu (viz odstavec 29 o modelu nezralých zvířat a odstavec 30 o modelu dospělých zvířat s odstraněnými vaječníky). Nezralým samicím potkana se denně podává zkoušená chemická látka po dobu tří po sobě jdoucích dnů. Třídenní expozice se doporučuje také u samic potkana s odstraněnými vaječníky, ale delší expozice jsou přijatelné a mohou zlepšit detekci slabě působících chemických látek. U samic myší s odstraněnými vaječníky by aplikace po dobu 3 dnů měla být dostatečná s tím, že prodloužení až na sedm dnů by v případě silných agonistů estrogenů nepřineslo významnou výhodu. Avšak u slabých estrogenů podle výsledků validační studie (16) toto neplatí a dávkování u dospělých myší s odstraněnými vaječníky by mělo být prodlouženo až na 7 po sobě jdoucích dnů.Dávky je třeba podávat každý den přibližně ve stejnou dobu. Měly by být přizpůsobeny tak, aby se udržela konstantní úroveň dávky vzhledem k tělesné hmotnosti zvířete (např. miligram zkoušené chemické látky na kilogram tělesné hmotnosti za den). Pokud jde o zkušební objem, jeho variabilita by na základě tělesné hmotnosti měla být minimalizována nastavením koncentrací podávaného roztoku tak, aby byl zajištěn konstantní objem ve vztahu k tělesné hmotnosti při všech úrovních dávky a při jakémkoli způsobu podávání.

▼M5

40. Pokud se zkoušená chemická látka podává sondou, podává se zvířatům v jediné denní dávce za použití žaludeční sondy nebo vhodné intubační kanyly. Maximální objem tekutiny, kterou lze podat najednou, závisí na velikosti pokusného zvířete. Je třeba dodržovat místní pokyny týkající se péče o zvířata, avšak objem by neměl překročit 5 ml na 1 kg tělesné hmotnosti, s výjimkou vodných roztoků, kdy lze použít 10 ml na 1 kg tělesné hmotnosti.

41. Pokud se zkoušená chemická látka podává subkutánní injekcí, podává se v jedné denní dávce. Dávky by měly být aplikovány do dorsální skapulární nebo lumbální oblasti sterilní jehlou (např. velikosti 23- nebo 25-gauge) a tuberkulinovou injekční stříkačkou. Oholení místa vpichu je dobrovolné. Jakékoli ztráty, únik v místě vpichu nebo neúplné dávkování se zaznamenají. Celkový objem vstříknutý jednomu potkanovi za den by neměl překročit 5 ml na 1 kg tělesné hmotnosti, rozdělený do dvou míst vpichu, s výjimkou vodných roztoků, kdy lze použít 10 ml na 1 kg tělesné hmotnosti.

Pozorování

Obecná a klinická pozorování

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

Tělesná hmotnost a spotřeba potravy

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

Sekce a měření hmotnosti dělohy

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

45. Před sekcí bude vyšetřena vagina, jaký je stav jejího otevření u nezralých zvířat. Postup sekce začíná otevřením břišní stěny počínaje od srůstu stydké kosti. Poté se od dorzální břišní stěny oddělí roh dělohy a vaječníky. Od ventrální a laterální strany dělohy a vaginy se oddělí močový měchýř a močovody. Odděluje se fibrózní adheze mezi rektem a vaginou dokud nelze identifikovat spojení poševního vchodu s perineální kůží. Děloha a vagina se oddělí od těla naříznutím poševní stěny těsně nad spojením mezi perineální kůží, jak je ukázáno na obrázku 2. Děloha by měla být oddělena od bočního svalstva jemným odříznutím děložního okruží v bodě jeho připojení po celé délce dorzálně laterálního aspektu každého děložního rohu. Po oddělení od těla by s dělohou mělo být zacházeno dostatečně rychle, aby se zamezilo vysychání tekutin. U malých tkání, jako je děloha, ztráta hmotnosti v důsledku vysychání nabývá na významu (23). Jsou-li přítomny vaječníky, oddělí se ve vejcovodu, čímž se zamezí ztráty luminální tekutiny z děložního rohu. Pokud byly u zvířete vaječníky odstraněny, měly by být pahýly vyšetřeny, zda nejsou přítomny tkáně vaječníků. Přebytečný tuk a spojovací

▼M5

tkáň by měly být odstraněny. Vagina se oddělí od dělohy těsně pod děložním hrdlem, takže hrdlo zůstane s tělem dělohy, jak je ukázáno na obrázku 2.

46. Každá děloha by měla být přenesena do jednoznačně označené a zvážené nádobky (např. Petriho misky nebo plastové misky vah), přičemž je nadále třeba dbát na to, aby nedošlo k vysychání před zvážením (např. do nádobky lze umístit filtrační papír slabě navlhčený fyziologickým roztokem). Děloha s luminální tekutinou se zváží s přesností na 0,1 mg (hmotnost dělohy ve vlhkém stavu).

47. Každá děloha pak bude jednotlivě zpracována za účelem odstranění luminální tekutiny. Oba děložní rohy budou propíchnuty nebo podélně rozříznuty. Děloha se položí na slabě zvlhčený filtrační papír (např. Whatman č. 3) a jemně se stlačí druhým kusem slabě navlhčeného filtračního papíru tak, aby luminální tekutina byla zcela odstraněna. Děloha bez luminálního obsahu se zváží s přesností na 0,1 mg (hmotnost dělohy ve vysušeném stavu).

48. Hmotnost dělohy při ukončení studie lze použít pro potvrzení toho, že nebyl překročen vhodný věk u nezralého intaktního potkana, avšak rozhodující v tomto směru jsou historické údaje o kmeni potkanů použitém laboratoří (viz odstavec 56 pro interpretaci výsledků).

Volitelná vyšetření

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

ÚDAJE A ZPRÁVY

Údaje

50. Údaje o studii by měly zahrnovat:

— počet zvířat na začátku studie,

— počet a identifikaci zvířat nalezených uhynulých nebo zvířat utracených během zkoušky z humánních důvodů a datum a čas každého úmrtí nebo humánního usmrcení,

— počet a identifikaci zvířat vykazujících příznaky toxicity a popis zjištěných příznaků toxicity, včetně doby nástupu, doby trvání a závažnosti toxických účinků, a

— počet a identifikaci zvířat vykazujících léze a popis typu lézí.

▼M5

51. U jednotlivých zvířat by měly být zaznamenány údaje o tělesné hmotnosti, hmotnosti dělohy ve vlhkém stavu a hmotnosti dělohy ve vysušeném stavu. Jednotné statistické analýzy agonistních látek by měly být použity ke stanovení toho, zda podávání zkoušené chemické látky vedlo ke statisticky významnému ($p < 0,05$) zvýšení hmotnosti dělohy. Měly by být provedeny vhodné statistické analýzy za účelem zjištění, zda v souvislosti s aplikací došlo ke změnám hmotnosti dělohy ve vlhkém a ve vysušeném stavu. Údaje lze například hodnotit pomocí metody analýzy kovariance (ANCOVA), kdy kovariátou (doprovodnou proměnnou) bude tělesná hmotnost při pitvě. Před analýzou údajů lze provést logaritmickou transformaci údajů o děloze stabilizující rozptyl. Pro provedení párových srovnání každé exponované skupiny s kontrolními skupinami, kterým bylo podáváno vehikulum, a pro výpočet intervalů spolehlivosti je vhodné použít Dunnettova a Hsuova testu. Pro zjištění případných odlehlých hodnot a posouzení homogenity rozptylů lze použít metodu *Studentised residual plots*. Tyto postupy byly použity ve validačním programu OECD za použití postupu PROC GLM v systému statistické analýzy (SAS Institute, Cary, NC), verze 8 (6)(7).

52. Závěrečná zpráva musí obsahovat:

Zkušební zařízení:

— odpovědní pracovníci a jejich odpovědnost v rámci studie,

— údaje z výchozí zkoušky s pozitivní kontrolní látkou a údaje z pravidelných pozitivních kontrol (viz odstavce 26 a 27).

Zkoušená chemická látka:

— charakterizace zkoušených chemických látek,

— fyzikální povaha a tam, kde je to podstatné, fyzikálně-chemické vlastnosti,

— metoda a frekvence přípravy roztoků,

— veškeré získané údaje o stabilitě,

— veškeré analýzy roztoků použitých k aplikaci

Vehikulum:

— charakterizace vehikula použitého při zkoušce (povaha, dodavatel a šarže),

— zdůvodnění výběru vehikula (pokud není použita voda).

Pokusná zvířata:

— druh a kmen a zdůvodnění jejich výběru,

— dodavatel a konkrétní dodavatelské zařízení,

— věk při dodání s datem narození,

— v případě nezralých zvířat, zda byla dodána s matkou nebo adoptivní matkou, či nikoli, a datum odstavení,

— podrobnosti o postupu aklimatizace zvířat,

— počet zvířat v každé kleci,

— podrobnosti a metoda identifikace jednotlivých zvířat a skupin.

Podmínky zkoušky:

— podrobnosti o procesu náhodného výběru (tj. použitá metoda),

— zdůvodnění výběru dávek,

▼M5

— podrobnosti o složení zkoušené chemické látky, její dosažené koncentrace, stabilita a homogenita,

— podrobnosti o podávání zkoušené chemické látky a zdůvodnění volby způsobu expozice,

— strava (název, typ, dodavatel, obsah a úroveň fytoestrogenů, je-li známa),

— zdroj vody (např. vodovodní voda nebo filtrovaná voda) a dodávka (potrubím z velké nádrže, v lahvích apod.),

— stelivo (název, typ, dodavatel, obsah),

— záznam o podmínkách chovu v kleci, interval osvětlení, teplota a vlhkost v místnosti, úklid místnosti,

— podrobný popis postupů pitvy a vážení dělohy,

— popis statistických postupů.

Výsledky

U jednotlivých zvířat:

— všechny denní tělesné hmotnosti jednotlivých zvířat (od přidělení do skupin až do pitvy) (s přesností na 0,1 g),

— věk každého zvířete (ve dnech, den narození se počítá jako den 0) při zahájení podávání zkoušené chemické látky,

— datum a čas podání každé dávky,

— vypočtený objem a velikost podávaných dávek a pozorování ztrát látky během podávání nebo po podání,

— denní záznamy o stavu zvířete, včetně významných příznaků a pozorování,

— předpokládaná příčina smrti (pokud byla zvířata během studie nalezena ve stavu agónie nebo uhynulá),

— datum a čas humánního usmrcení s časovým intervalem od posledního podání dávky,

— hmotnost dělohy ve vlhkém stavu (s přesností na 0,1 mg) a jakékoli zjištěné ztráty luminální tekutiny během sekce a přípravy na vážení,

— hmotnost dělohy ve vysušeném stavu (s přesností na 0,1 mg).

U každé skupiny zvířat:

— průměrná denní tělesná hmotnost (s přesností na 0,1 g) a směrodatná odchylka (od přiřazení ke skupinám až do pitvy),

— průměrná hmotnost vlhké dělohy a průměrná hmotnost usušené dělohy (s přesností na 0,1 mg) a směrodatné odchylky,

— denní spotřeba potravy, je-li měřena (vypočítaná jako gramy spotřebované potravy na každé zvíře),

▼M5

— výsledky statistických analýz srovnávajících hmotnosti dělohy ve vlhkém a ve vysušeném stavu u experimentálních skupin se stejnými měřeními v kontrolních skupinách s vehikulem,

— výsledky statistické analýzy srovnávající celkovou tělesnou hmotnost a přírůstek tělesné hmotnosti experimentálních skupin se stejnými měřeními v kontrolních skupinách s vehikulem.

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

	Potkani	**Myši**
Zvířata		
Kmen	Běžně užívaný kmen laboratorních hlodavců	
Počet zvířat	Nejméně 6 zvířat v každé exponované skupině	
Počet skupin	Nejméně 2 zkušební skupiny (viz pokyny v odstavci 33) a 1 skupina negativní kontroly Pokyny týkající se skupin pozitivní kontroly viz odstavec 26 a 27)	
Podmínky chovu a krmení		
v místnosti pro zvířata	22 °C ± 3 °C	
Relativní vlhkost	50–60 %, nejméně 30 % a nejvýše 70 %	
Denní střídání osvětlení	12 hodin světla, 12 hodin tmy	
Strava a pitná voda	Ad libitum	
Chov	Jednotlivě nebo ve skupinách až do tří zvířat (u nezralých zvířat se doporučuje chov v sociálních skupinách)	
Strava a stelivo	Doporučuje se nízká úroveň fytoestrogenů ve stravě a stelivu	
Postup		
Metoda	Metoda s nezralými zvířaty bez odstranění vaječníků (upřednostňovaná metoda) Metoda s dospělými samicemi s odstraněnými vaječníky	Metoda s dospělými samicemi s odstraněnými vaječníky
Věk podávání dávek u nezralých zvířat	Nejdříve v 18. postnatální den. Podávání by mělo být ukončeno před 25. postnatálním dnem.	V rámci stávající zkušební metody není relevantní.
Věk odstranění vaječníků	6. až 8. týden věku.	
Věk podávání dávek u zvířat s odstraněnými vaječníky	Mezi odstraněním vaječníků a 1. dnem podávání by mělo uplynout nejméně 14 dnů.	Mezi odstraněním vaječníků a 1. dnem podávání by mělo uplynout nejméně 7 dnů.
Tělesná hmotnost	Rozdíly v tělesné hmotnosti by měly být minimální a od střední hmotnosti by se měly lišit nejvýše o ± 20 %.	

▼M5

	Potkani	Myši
Dávkování		
Způsob podání	Orální sondou nebo subkutánní injekcí.	
Četnost podávání	Jedna denní dávka	
Objem látky pro sondu nebo injekci	≤ 5 ml na 1 kg tělesné hmotnosti (nebo až 10 ml na 1 kg tělesné hmotnosti v případě vodného roztoku) (ve 2 injekcích při subkutánním způsobu)	
Trvání podávání	3 po sobě jdoucí dny u modelu s nezralými Nejméně 3 po sobě jdoucí dny u modelu s odstraněnými vaječníky	7 po sobě jdoucích dnů u modelu s odstraněnými vaječníky
Doba pitvy	Přibližně 24 hodin po poslední dávce	
Výsledky		
Pozitivní reakce	Statisticky významné zvýšení střední hmotnosti dělohy (ve vlhkém a/nebo ve vysušeném stavu)	
Referenční estrogen	17-alfa-ethinylestradiol	

POKYNY PRO INTERPRETACI A PLATNOST VÝSLEDKŮ

54. Obecně by zkouška estrogenity měla být považována za pozitivní, jestliže existuje statisticky významné zvýšení hmotnosti dělohy ($p < 0,05$) přinejmenším při vysoké úrovni dávky v porovnání s kontrolní skupinou vystavenou pouze působení rozpouštědla. Pozitivní výsledek je dále podpořen prokázáním biologicky přijatelného vztahu mezi dávkou a velikostí odezvy s přihlédnutím k tomu, že tvar křivky dávka-odpověď může ovlivnit překrývající se estrogenní a antiestrogenní působení zkoušené chemické látky.

55. Musí se dbát na to, aby nebyla překročena maximální tolerovaná dávka, aby bylo možno provést smysluplnou interpretaci údajů. V této souvislosti je třeba pečlivě posoudit snížení tělesné hmotnosti, klinické příznaky a jakékoli další nálezy.

56. Důležitým faktorem pro přijetí údajů získaných při uterotrofní biologické zkoušce jsou hmotnosti dělohy v kontrolní skupině s vehikulem. Vysoké kontrolní hodnoty mohou zpochybnit citlivost biologické zkoušky a schopnost odhalit velmi slabé agonisty estrogenu. Literární rešerše a údaje získané při validaci uterotrofní biologické zkoušky naznačují, že k případům vysokých kontrolních hodnot dochází spontánně, zejména u nezralých zvířat (2)(3)(6)(9). Jelikož hmotnost dělohy nezralých potkanů závisí na mnoha proměnných, jako je kmen nebo tělesná hmotnost, nelze pro hmotnost dělohy s konečnou platností stanovit žádnou horní hranici. Jako určité vodítko může posloužit, že pokud jsou hmotnosti dělohy ve vysušeném stavu u nezralých potkanů v kontrolní skupině v rozmezí 40 až 45 mg, měly by být výsledky považovány za podezřelé, a hmotnosti dělohy vyšší než 45 mg mohou vést k provedení nové zkoušky. Toto však musí být zváženo v každém jednotlivém případě (3)(6)(8). Při zkouškách s dospělými potkany neúplné odstranění vaječníků ponechá vaječníkovou tkáň, která může produkovat endogenní estrogen a brzdit návrat hmotnosti dělohy do původního stavu.

▼**M5**

57. Hmotnosti dělohy ve vysušeném stavu u zvířat z kontrolní skupiny s vehikulem, které jsou nižší než 0,09 % tělesné hmotnosti pro nezralé samice potkana a nižší než 0,04 % tělesné hmotnosti pro mladé dospělé samice s odstraněnými vaječníky, podle všeho znamenají přijatelné výsledky [viz tabulka 31 (2)]. Jestliže jsou hmotnosti dělohy v kontrolní skupině vyšší než tyto hodnoty, měly by být přezkoumány různé faktory včetně věku zvířat, řádného odstranění vaječníků, obsahu fytoestrogenů ve stravě atd. a negativní výsledky zkoušky (žádné příznaky estrogenní aktivity) by měly být používány s obezřetností.

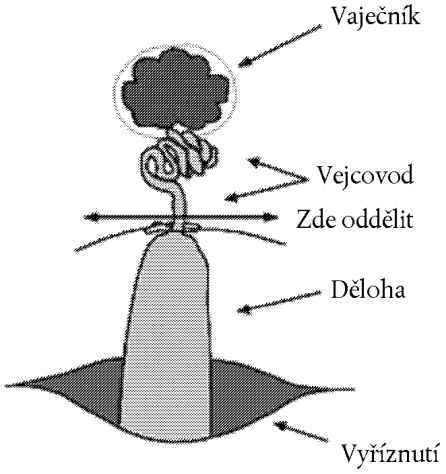
58. V laboratoři by měly být uchovávány historické údaje o kontrolních skupinách s vehikulem. V laboratoři by rovněž měly být uchovávány historické údaje o reakcích na pozitivní referenční estrogeny, jako je 17-alfa-ethinylestradiol. Laboratoře též mohou zkoušet reakce na známé slabé agonisty estrogenů. Všechny tyto údaje je možné porovnat s dostupnými údaji (2)(3)(4)(5)(6)(7)(8), aby bylo zaručeno, že metody používané laboratoří zajišťují dostatečnou citlivost.

59. Hmotnosti děloh ve vysušeném stavu v průběhu validační studie OECD vykazovaly menší variabilitu než hmotnosti děloh ve vlhkém stavu (6)(7). Výrazná reakce při kterémkoli měření by však ukazovala na to, že zkoušená chemická látka je z hlediska estrogenního působení pozitivní.

60. Uterotrofní reakce není zcela estrogenního původu, avšak pozitivní výsledek uterotrofní biologické zkoušky by obecně měl být interpretován jako důkaz estrogenního potenciálu *in vivo* a měl by normálně vyvolat kroky směřující k dalšímu vyjasnění (viz odstavec 9 a „OECD Conceptual Framework for the Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals“, příloha 2).

Obrázek 1

Schematický diagram ukazující chirurgické odstranění vaječníků



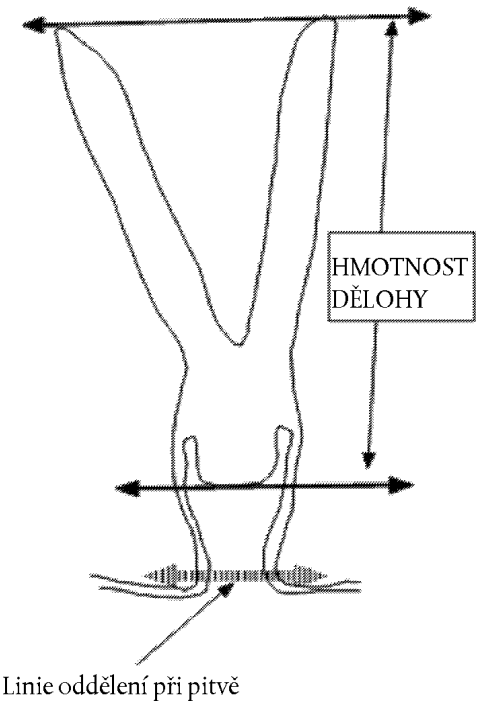
Mesometrium, vaskulatura a tukový polštář nejsou znázorněny

Postup začíná otevřením dorzo-laterální stěny břišní ve středním bodě mezi spodním okrajem žeber a hřebenem kosti kyčelní, několik milimetrů vedle bočního okraje bederního svalu. Uvnitř břišní dutiny by měly být umístěny vaječníky. Na aseptickém poli se vaječníky poté fyzicky oddělí od břišní dutiny, mezi vaječník a dělohu se umístí podvaz za účelem kontroly krvácení a vaječník se nad podvazem oddělí řezem ve spojení vejcovodu s každým děložním rohem. Po ujištění, že nepřetrvává žádné výrazné krvácení, se břišní stěna uzavře suturou a kůže se uzavře např. klipy nebo suturou. Zvířatům by mělo být umožněno zotavení a návrat hmotnosti dělohy do původního stavu po dobu nejméně 14 dnů před použitím.

▼**M5**

Obrázek 2

Odstranění a zpracování děložních tkání pro měření hmotnosti



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

▼**M5**

Dodatek 1

DEFINICE

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

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

Datum narození: je 0. postnatální den.

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

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

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

Chemická látka: znamená látku nebo směs.

Maximální tolerovaná dávka (MTD): je nejvyšší množství chemické látky, které, je-li zavedeno do těla, zkušební zvířata neusmrtí (označuje se jako LD_0) (IUPAC, 1993).

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

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

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

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

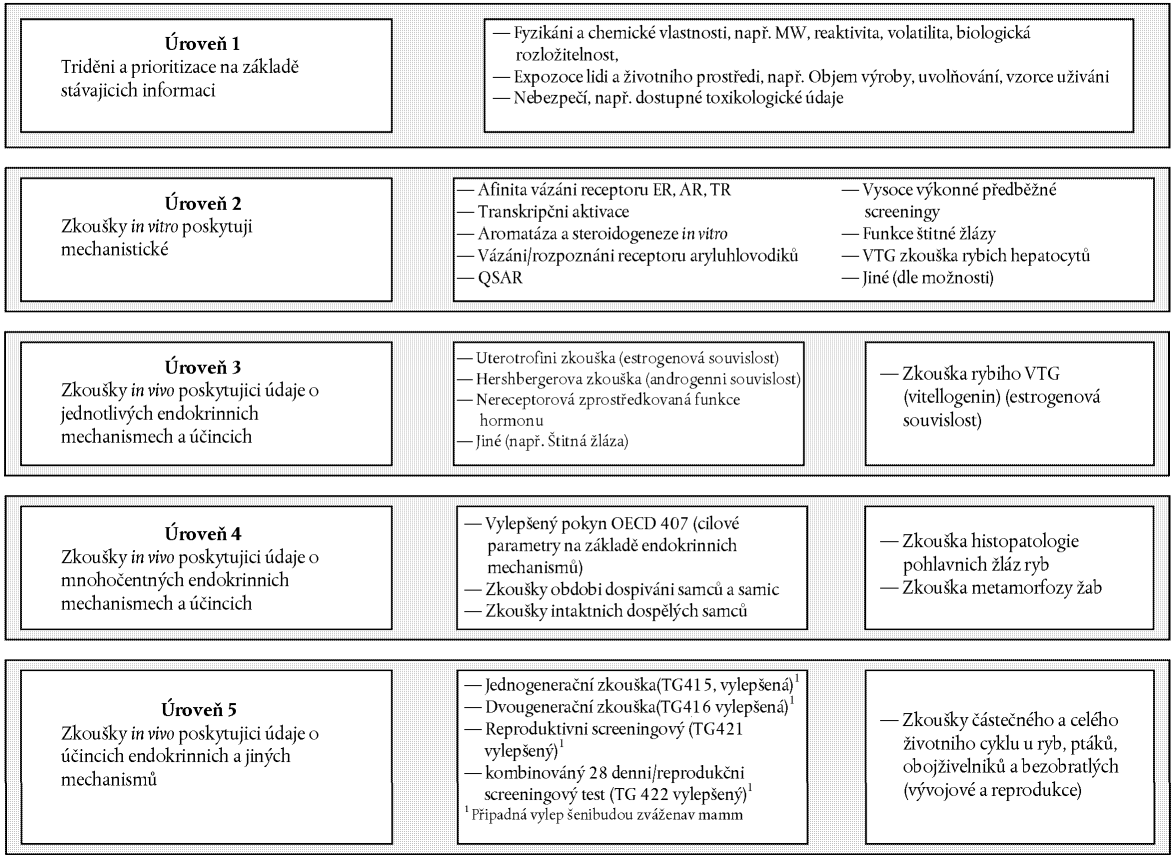
Zkoušená chemická látka: znamená jakoukoli látku nebo směs zkoušenou touto zkušební metodou.

▼M5

Dodatek 2

Poznámka: Dokument vyhotovil sekretariát programu zkušebnich pokynů na základě dohody dosažené na 6. zasedáni pracovni skupiny EDTA

OECD Koncepčni rámec pro zkoušky a hodnoceni endokrinnich distruptorů



VMG mamm: Skupina pro řízeni validace zkoušek prováděných na savcích

02008R0440 — CS — 16.10.2019 — 008.001 — 911

▼**M5**

POZNÁMKY KE KONCEPČNÍMU RÁMCI

Poznámka 1: Vstupy a výstupy na všech úrovních jsou možné a závisejí na aktuální potřebě informací pro účely posouzení nebezpečí a rizika.

Poznámka 2: Na úrovni 5 by ekotoxikologie měla zahrnovat účinky, které ukazují na mechanismy negativních účinků a potenciální poškození populace.

Poznámka 3: Pokud multimodální model zahrnuje několik zkoušek pro jednotlivý účinek, pak by uvedený model nahradil použití těchto jednotlivých zkoušek.

Poznámka 4: Hodnocení každé chemické látky by mělo být specifické pro každý případ a mělo by brát v úvahu všechny dostupné informace s přihlédnutím k úrovni v koncepčním rámci.

Poznámka 5: Uvedený koncepční rámec by v současnosti neměl být považován za vyčerpávající. Na úrovni 3, 4 a 5 obsahuje zkoušky, které jsou buď dostupné, nebo u kterých probíhá validace. Pokud jde o druhou jmenovanou skupinu, jsou tyto zkoušky zahrnuty prozatímně. Jakmile budou vyvinuty a validovány, budou do rámce formálně přidány.

Poznámka 6: U úrovně 5 nelze mít za to, že obsahuje pouze konečné zkoušky. Zkoušky zahrnuté do této úrovně přispívají k obecnému posouzení nebezpečí a rizik.

▼M5

LITERATURA

1) OECD (1998). Report of the First Meeting of the OECD Endocrine Disrupter Testing and Assessment (EDTA) Task Force, 10^{th}-11^{th} March 1998, ENV/MC/CHEM/RA(98)5.

2) OECD (2003). Detailed Background Review of the Uterotrophic Bioassay: Summary of the Available Literature in Support of the Project of the OECD Task Force on Endocrine Disrupters Testing and Assessment (EDTA) to Standardise and Validate the Uterotrophic Bioassay. OECD Environmental Health and Safety Publication Series on Testing and Assessment No. 38. ENV/JM/MONO(2003)1.

3) Owens, J.W., Ashby J. (2002). Critical Review and Evaluation of the Uterotrophic Bioassay for the Identification of Possible Estrogen Agonists and Antagonists: In Support of the Validation of the OECD Uterotrophic Protocols for the Laboratory Rodent. Crit. Rev. Toxicol. 32, 445–520.

4) OECD (2006). OECD Report of the Initial Work Towards the Validation of the Rodent Uterotrophic Assay – Phase 1. OECD Environmental Health and Safety Publication Series on Testing and Assessment No. 65. ENV/JM/MONO(2006)33.

5) Kanno, J., Onyon, L., Haseman, J., Fenner-Crisp, P., Ashby, J., Owens, W. (2001). The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay to screen compounds for *in vivo* estrogenic responses: Phase 1. Environ Health Perspect. 109, 785–94.

6) OECD (2006). OECD Report of the Validation of the Rodent Uterotrophic Bioassay: Phase 2 – Testing of Potent and Weak Oestrogen Agonists by Multiple Laboratories. OECD Environmental Health and Safety Publication Series on Testing and Assessment No. 66. ENV/JM/MONO(2006)34.

7) Kanno, J., Onyon, L., Peddada, S., Ashby, J., Jacob, E., Owens, W. (2003). The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay: Phase Two – Dose Response Studies. Environ. Health Persp.111, 1530–1549.

8) Kanno, J., Onyon, L., Peddada, S., Ashby, J., Jacob, E., Owens, W. (2003). The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay: Phase Two – Coded Single Dose Studies. Environ. Health Persp.111, 1550–1558.

9) Owens, W., Ashby, J., Odum, J., Onyon, L. (2003). The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay: Phase Two – Dietary phytoestrogen analyses. Environ. Health Persp. 111, 1559–1567.

10) Ogasawara, Y., Okamoto, S., Kitamura, Y., Matsumoto, K. (1983). Proliferative pattern of uterine cells from birth to adulthood in intact, neonatally castrated, and/or adrenalectomized mice assayed by incorporation of [I^{125}]iododeoxyuridine. Endocrinology113, 582–587.

11) Branham, W.S., Sheehan, D.M., Zehr, D.R., Ridlon, E., Nelson, C.J. (1985). The postnatal ontogeny of rat uterine glands and age-related effects of 17β-estradiol. Endocrinology117, 2229–2237.

12) Schlumpf, M., Berger, L., Cotton, B., Conscience-Egli, M., Durrer, S., Fleischmann, I., Haller, V., Maerkel, K., Lichtensteiger, W. (2001). Estrogen active UV screens. *SÖFW-J.* 127, 10–15.

13) Zarrow, M.X., Lazo-Wasem, E.A., Shoger, R.L. (1953). Estrogenic activity in a commercial animal ration. Science, 118, 650–651.

14) Drane, H.M., Patterson, D.S.P., Roberts, B.A., Saba, N. (1975). The chance discovery of oestrogenic activity in laboratory rat cake. Fd. *Cosmet. Toxicol.* 13, 425–427.

15) Boettger-Tong, H., Murphy, L., Chiappetta, C., Kirkland, J.L., Goodwin, B., Adlercreutz, H., Stancel, G.M., Makela, S. (1998). A case of a laboratory animal feed with high estrogenic activity and its impact on *in vivo* responses to exogenously administered estrogens. *Environ. Health Perspec.* 106, 369–373.

▼**M5**

16) OECD (2007). Additional data supporting the Test Guideline on the Uterotrophic Bioassay in rodents. OECD Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 67.

17) Degen, G.H., Janning, P., Diel, P., Bolt, H.M.. (2002). Estrogenic isoflavones in rodent diets. Toxicol. Lett. 128, 145–157.

18) Wade, M.G., Lee, A., McMahon, A., Cooke, G., Curran, I. (2003). The influence of dietary isoflavone on the uterotrophic response in juvenile rats. Food Chem. Toxicol. 41, 1517–1525.

19) Yamasaki, K., Sawaki, M., Noda, S., Wada, T., Hara, T., Takatsuki, M. (2002). Immature uterotrophic assay of estrogenic compounds in rats given different phytoestrogen content diets and the ovarian changes in the immature rat uterotrophic of estrogenic compounds with ICI 182,780 or antide. Arch. Toxicol. 76, 613–620.

20) Thigpen, J.E., Haseman, J.K., Saunders, H.E., Setchell, K.D.R., Grant, M.F., Forsythe, D. (2003). Dietary phytoestrogens accelerate the time of vaginal opening in immature CD-1 mice. Comp. Med. 53, 477–485.

21) Ashby, J., Tinwell, H., Odum, J., Kimber, I., Brooks, A.N., Pate, I., Boyle, C.C. (2000). Diet and the aetiology of temporal advances in human and rodent sexual development. *J. Appl. Toxicol.* 20, 343–347.

22) Thigpen, J.E., Lockear, J., Haseman, J., Saunders, H.E., Caviness, G., Grant, M.F., Forsythe, D.B. (2002). Dietary factors affecting uterine weights of immature CD-1 mice used in uterotrophic bioassays. Cancer Detect. Prev. 26, 381–393.

23) Thigpen, J.E., Li, L-A., Richter, C.B., Lebetkin, E.H., Jameson, C.W. (1987). The mouse bioassay for the detection of estrogenic activity in rodent diets: I. A standardized method for conducting the mouse bioassay. Lab. Anim. Sci.37, 596–601.

24) OECD (2008). Acute oral toxicity – up-and-down procedure. OECD Guideline for the Testing of Chemicals No 425, Paris.

25) OECD (2000). Guidance document on the recognition, assessment and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 19. ENV/JM/MONO(2000)7.

26) OECD (2001). Guidance document on acute oral toxicity. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 24. ENV/JM/MONO(2001)4.

27) Bulbring, E., and Burn, J.H. (1935). The estimation of oestrin and of male hormone in oily solution. J. Physiol. 85, 320–333.

28) Dorfman, R.I., Gallagher, T.F. and Koch, F.C (1936). The nature of the estrogenic substance in human male urine and bull testis. Endocrinology 19, 33–41.

29) Reel, J.R., Lamb IV, J.C. and Neal, B.H. (1996). Survey and assessment of mammalian estrogen biological assays for hazard characterization. Fundam. Appl. Toxicol. 34, 288–305.

30) Jones, R.C. and Edgren, R.A. (1973). The effects of various steroid on the vaginal histology in the rat. Fertil. Steril. 24, 284–291.

31) OECD (1982). Organization for Economic Co-operation and Development – Principles of Good Laboratory Practice, ISBN 92-64-12367-9, Paris.

32) Dorfman, R.I. (1962). Methods in Hormone Research, Vol. II, Part IV: Standard Methods Adopted by Official Organization. New York, Academic Press.

33) Thigpen, J.E. et al. (2004). Selecting the appropriate rodent diet for endocrine disruptor research and testing studies. ILAR J 45(4), 401–416.

▼**M5**

34) Gray, L.E. and Ostby, J. (1998). Effects of pesticides and toxic substances on behavioral and morphological reproductive development: endocrine versus non-endocrine mechanism. Toxicol Ind Health. 14(1–2), 159–184.

35) Booth, A.N., Bickoff, E.M. and Kohler, G.O. (1960). Estrogen-like activity in vegetable oils and mill by-products. Science, 131, 1807–1808.

36) Kato, H., Iwata, T., Katsu, Y., Watanabe, H., Ohta, Y., Iguchi, T. (2004). Evaluation of estrogenic activity in diets for experimental animals using in vitro assay. J. Agric Food Chem. 52, 1410–1414.

37) OECD (2007). Guidance Document on the Uterotrophic Bioassay Procedure to Test for Antioestrogenity. Series on Testing and Assessment. No. 71.

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

▼M5

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

ÚVOD

1. Tato zkušební metoda je rovnocenná Pokynu OECD pro zkoušení (TG) 441 (2009). Organizace OECD v roce 1998 zahájila činnost s vysokou prioritou zaměřenou na revizi stávajících pokynů a vypracování nových pokynů pro zjišťování a zkoušení látek, které mohou narušovat činnost endokrinních žláz (1). Jedním z prvků této činnosti bylo vypracovat zkušební zásady pro provádění Hershbergerovy biologické zkoušky na potkanech. Po několika desetiletích využívání ve farmaceutickém odvětví byla tato zkouška poprvé standardizována oficiálním expertním výborem v roce 1962 jakožto nástroj pro zjišťování androgenních chemických látek (2). V letech 2001–2007 prošla Hershbergerova biologická zkouška na potkanech rozsáhlým validačním programem, jehož součástí mimo jiné bylo vytvoření Základního hodnotícího dokumentu (23), sestavení podrobného metodického listu (3), vypracování návodu pro pitvu (21) a provedení rozsáhlých vnitrolaboratorních a mezilaboratorních studií za účelem prokázání spolehlivosti a reprodukovatelnosti této biologické zkoušky. Tyto validační studie byly provedeny s účinným referenčním androgenem (testosteron propionát (TP)), dvěma účinnými syntetickými androgeny (trenbolon acetát a methyltestosteron), účinnou antiandrogenní farmaceutickou látkou (flutamid), účinným inhibitorem syntézy (finasterid) přírodního androgenu (dihydrotestosteron (DHT)), několika slabými antiandrogenními pesticidy (linuron, vinklozolin, procymidon, p,p'-DDE), účinným inhibitorem 5-alfa-reduktázy (finasterid) a dvěma známými negativními chemickými látkami (dinitrofenol a nonylfenol) (4)(5)(6)(7)(8). Tato zkušební metoda je výsledkem dlouholetých historických zkušeností s touto biologickou zkouškou a zkušeností získaných během programu validačních zkoušek a z jejich výsledků.

2. Hershbergerova biologická zkouška je krátkodobá screeningová zkouška *in vivo* s použitím přídatných tkání samčího reprodukčního traktu. Zkouška vznikla ve 30. letech 20. století a byla ve 40. letech pozměněna tak, aby zahrnovala svaly v samčím reprodukčním traktu reagující na androgeny (2) (9–15). V 60. letech bylo pomoci standardizované verze protokolu hodnoceno více než 700 možných androgenů (2)(14) a použití této zkoušky bylo v 60. letech považováno za standardní metodu zjišťování androgenních i antiandrogenních látek (2)(15). Stávající biologická zkouška je založena na změnách v hmotnosti pěti tkání závislých na androgenech u kastrovaných samců potkanů v peripubertálním období. Hodnotí schopnost chemické látky vyvolat biologické aktivity odpovídající agonistům a antagonistům androgenů a inhibitorům 5-alfa-reduktázy. Pět cílových tkání závislých na androgenech, které jsou zahrnuty do této zkušební metody, jsou ventrální prostata (VP), semenný váček (SV) (spolu s tekutinami a koagulačními žlázami), svaly m. ligator ani a m. bulbocavernosus (LABC), pár Cowperových žláz (COW) a žalud penisu (GP). U kastrovaných samců potkanů v peripubertálním období všech těchto pět tkání reaguje na androgeny růstem absolutní hmotnosti. Jsou-li tytéž tkáně podáváním účinného referenčního androgenu stimulovány k nárůstu hmotnosti, na antiandrogeny všech těchto pět tkání reaguje snížením absolutní hmotnosti. Primárním modelem pro Hershbergerovu biologickou zkoušku byl chirurgicky kastrovaný samec v peripubertálním období, což bylo validováno ve fázi 1, 2 a 3 programu validace Hershbergerovy zkoušky.

3. Hershbergerova biologická zkouška slouží jako mechanistická screeningová zkouška ke zjišťování agonistů androgenů, antagonistů androgenů a inhibitorů 5-alfa-reduktázy *in vivo* a její provedení je nutno posuzovat v kontextu „Koncepčního rámce OECD pro zkoušky a posuzování chemických látek narušujících činnost endokrinních žláz“ (dodatek 2). V tomto koncepčním rámci je Hershbergerova biologická zkouška zařazena na úroveň 3 jako zkouška *in vivo* poskytující údaje o jednom endokrinním mechanismu, tj. androgenitě/antiandrogenitě. Předpokládá se její zařazení do série zkoušek *in vitro* a *in vivo*, jejichž účelem je zjišťování chemických látek schopných

▼M5

interakce s endokrinním systémem a které v konečném důsledku vedou k posouzení nebezpečí a rizik pro lidské zdraví nebo životní prostředí.

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

VÝCHOZÍ ÚVAHY A OMEZENÍ

5. Agonisté a antagonisté androgenů působí jako ligandy na receptor androgenu a mohou aktivovat (agonisté) nebo potlačovat (antagonisté) transkripci genů, kterou tento receptor kontroluje. Některé chemické látky kromě toho potlačují přeměnu testosteronu na více účinný přirozený androgen, dihydrotestosteron, v některých androgenních cílových tkáních (inhibitory 5-alfa-reduktázy). Působení takových chemických látek může vést k nepříznivým zdravotním důsledkům, včetně účinků na reprodukci a vývoj. Proto existuje regulační potřeba rychlého posouzení a zhodnocení chemické látky jakožto možného agonisty nebo antagonisty androgenů nebo inhibitoru 5-alfa-reduktázy. Afinita ligandu k androgennímu receptoru měřená vazbou na receptor nebo aktivací transkripce reporterových genů *in vitro*, byť informativní, není jediným určujícím faktorem možného nebezpečí. Jinými určujícími faktory jsou např. aktivace a deaktivace metabolismu po vstupu do organismu, distribuce chemické látky do cílových tkání a vymizení z těla. Proto je potřeba zjišťovat možné aktivity chemické látky *in vivo* za příslušných podmínek a expozice. Hodnocení *in vivo* má méně zásadní význam, jsou-li známy typické znaky absorpce, distribuce, metabolismu a eliminace (ADME) dané chemické látky. Tkáně závislé na androgenech reagují na stimulaci androgeny rychlým a mohutným růstem, zejména u kastrovaných samců potkanů v peripubertálním období. Druhy hlodavců, zejména potkan, jsou široce používány také ve studiích toxicity pro charakterizaci nebezpečnosti chemických látek. Proto je verze zkoušky používající kastrované potkany v peripubertálním věku a pět cílových tkání vhodná pro zjišťování agonistů a antagonistů androgenů a inhibitorů 5-alfa-reduktázy *in vivo*.

6. Tato zkušební metoda je založena na těch zkušebních postupech použitých při validační studii OECD, u kterých byla při vnitrolaboratorních a mezilaboratorních studiích prokázána jejich spolehlivost a reprodukovatelnost. V této zkušební metodě jsou prezentovány jak androgenní, tak antiandrogenní postupy.

7. V dávce TP použité jednotlivými laboratořemi v rámci programu OECD pro validaci Hershbergerovy biologické zkoušky se vyskytla určitá odchylka (0,2 mg oproti 0,4 mg na 1 kilogram tělesné hmotnosti za den, při podávání subkutánní injekcí), avšak obě tyto varianty protokolu se jen málo lišily ve schopnosti detekovat slabou či silnou antiandrogenní aktivitu. Je však jasné, že dávka TP by neměla být příliš vysoká, aby neblokovala účinek slabých antagonistů androgenového receptoru, ani tak nízká, aby androgenní tkáně i bez spolupodávání antiandrogenů vykazovaly slabou růstovou reakci.

▼M5

8. Růstová reakce jednotlivých tkání závislých na androgenech není zcela androgenního původu, tj. hmotnost určitých tkání mohou změnit i jiné chemické látky než agonisté androgenů. Avšak růstová reakce některých tkání je doprovodným jevem specifičtějšího působení androgenního mechanismu. Například vysoké dávky účinných estrogenů mohou zvýšit hmotnost semenných váčků; jiné tkáně závislé na androgenech však při studii podobným způsobem nereagovaly. Antiandrogenní chemické látky mohou působit buď jako antagonistní látky androgenních receptorů, nebo jako inhibitory 5-alfa-reduktázy. Inhibitory 5-alfa-reduktázy mají variabilní účinek, protože přeměna na více účinný dihydrotestosteron se liší podle jednotlivých tkání. Antiandrogeny potlačující 5-alfa-reduktázu, např. finasterid, mají výraznější účinek na ventrální prostatu než na jiné tkáně, na rozdíl od účinného antagonisty androgenního receptoru, jako je flutamid. Tato rozdílná reakce tkání může být využita pro rozlišení mezi způsoby působení zprostředkovanými androgenním receptorem a působení zprostředkovaného 5-alfa-reduktázou. Androgenní receptor kromě toho vývojově souvisí s receptory jiných steroidních hormonů a některých dalších hormonů, které, jsou-li podávány na vysokých, suprafyziologických úrovních dávkování, mohou vázat a antagonizovat účinky TP podporující růst. Dále je také reálné, že zesílený steroidní metabolismus a následné snížení testosteronu v séru by mohly růst tkání závislých na androgenech oslabit. Jakýkoli pozitivní výsledek Hershbergerovy biologické zkoušky by proto měl být normálně hodnocen metodou posuzování závažnosti všech dostupných údajů, včetně zkoušek *in vitro*, jako jsou zkoušky vazby receptorů androgenů a receptorů estrogenů a zkoušky odpovídající transkripční aktivace, nebo údajů z jiných zkoušek *in vivo*, které zkoumají podobné androgenní cílové tkáně, jako jsou zkoušky na samcích v pubertálním věku, 15denní studie na intaktních dospělých samcích nebo 28denní či 90denní studie s opakovanými dávkami.

9. Zkušenosti ukazují, že xenobiotické androgeny jsou vzácnější než xenobiotické antiandrogeny. Předpokládá se tedy, že Hershbergerova biologická zkouška se bude nejčastěji používat pro zjišťování antiandrogenů. Nicméně postup pro zkoušení androgenů by se měl používat u steroidů nebo steroidům podobných chemických látek nebo u chemických látek, kde byly známky možných androgenních účinků zjištěny metodami uvedenými uvedených na úrovni 1 nebo 2 koncepčního rámce (dodatek 2). Podobně mohou být nepříznivé účinky spojené s androgenními/antiandrogenními profily pozorovány při zkouškách na úrovni 5, což by mělo vést k posouzení, zda určitá chemická látka působí endokrinně.

10. Uznává se, že veškeré postupy založené na zvířatech by měly splňovat místní normy v oblasti péče o zvířata; popisy péče a zacházení, které jsou stanoveny níže, jsou minimální výkonnostní normy a budou nahrazeny místními předpisy, např. směrnicí Evropského parlamentu a Rady 2010/63/EU ze dne 22. září 2010 o ochraně zvířat používaných pro vědecké účely (26). Další pokyny týkající se humánního zacházení se zvířaty stanovila organizace OECD (17).

11. Jako při každé biologické zkoušce, při které jsou použita zkušební zvířata, by se mělo pečlivě zvážit, zda je nezbytné tuto studii provádět. Pro takové rozhodnutí mohou být v zásadě dva důvody:

— vysoká možnost expozice (úroveň 1 koncepčního rámce) nebo příznaky androgenity/antiandrogenity zjištěné při zkouškách *in vitro* (úroveň 2), kdy by se následně mělo zjistit, zda takové účinky mohou nastat *in vivo*,

— účinky odpovídající androgenitě/antiandrogenitě zjištěné při zkouškách *in vivo* na úrovni 4 nebo 5, kdy by se měl dále zkoumat specifický způsob účinku, to jest stanovit, zda účinky byly vyvolány androgenním/antiandrogenním mechanismem.

▼M5

12. Definice použité v této zkušební metodě jsou uvedeny v dodatku 1.

PODSTATA ZKOUŠKY

13. Hershbergerova biologická zkouška dosahuje své citlivosti díky použití samců s minimální endogenní produkcí androgenů. Toho je dosaženo použitím kastrovaných samců za předpokladu, že po kastraci se poskytne dostatek času, aby se cílové tkáně mohly vrátit k minimální a jednotné výchozí hmotnosti. Při zjišťování potenciální androgenní aktivity tak existují nízké endogenní úrovně cirkulujících androgenů, hypothalamo-hypofýzo-gonadální osa není schopna prostřednictvím mechanismů zpětné vazby zajistit kompenzaci, maximalizuje se reaktivní schopnost tkání a minimalizuje se variabilita výchozích hmotností tkání. Při zjišťování potenciální antiandrogenní aktivity lze dosáhnout stabilnějšího přírůstku hmotnosti tkání, jsou-li tkáně stimulovány referenčním androgenem. Vzhledem k uvedeným skutečnostem Hershbergerova biologická zkouška vyžaduje pouze 6 zvířat v každé exponované skupině, zatímco při jiných zkouškách s intaktními pubertálními nebo dospělými samci se doporučuje použít 15 samců v každé exponované skupině.

14. Kastrace samců potkanů v peripubertálním období by měla být provedena vhodným způsobem, s použitím schválených anestetik a aseptickou technikou. Několik prvních dnů po operaci by měla být podávána analgetika s cílem eliminovat pooperační utrpení. Pokud jde detekci slabých androgenů a antiandrogenů, kastrace zvyšuje přesnost zkoušky tím, že vyřazuje kompenzační mechanismy endokrinní zpětné vazby přítomné u intaktního zvířete, které mohou účinky podávaných androgenů a antiandrogenů oslabit, a odstraňuje značné rozdíly v úrovni testosteronu v séru jednotlivých zvířat. Kastrace tedy snižuje počet zvířat požadovaný pro zjištění těchto endokrinních aktivit.

15. Při zjišťování potenciální androgenní aktivity se zkoušená chemická látka podává denně orální sondou nebo subkutánní injekcí po dobu deseti po sobě jdoucích dnů. Zkoušené chemické látky se podávají nejméně dvěma experimentálním skupinám zkušebních zvířat, přičemž každé skupině je aplikována jiná úroveň dávky. Přibližně po 24 hodinách od poslední dávky se zvířata podrobí pitvě. Statisticky významný nárůst hmotnosti dvou nebo více cílových orgánů ve skupinách, jimž byla podávána zkoušená chemická látka, v porovnání s kontrolní skupinou s vehikulem ukazuje, že zkoušená chemická látka je z hlediska potenciální androgenní aktivity pozitivní (viz odstavec 60). Androgeny, jako například trenbolon, které nemohou být redukovány 5-alfa-reduktázou, mají výraznější účinek na LABC a GP, než má TP, avšak zvýšený růst by měly vykázat všechny tkáně.

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

▼M5

POPIS METODY

Výběr druhu a kmene

17. Od 30. let 20. století je při Hershbergerově biologické zkoušce běžně používán potkan. Ačkoli je z biologického hlediska možné, že potkan i myš by vykázaly podobné reakce, je na základě 70letých zkušeností s modelem potkanů pro Hershbergerovu biologickou zkoušku upřednostňovaným druhem potkan. Navíc, jelikož údaje získané při Hershbergerově biologické zkoušce mohou být předběžnými údaji pro dlouhodobou vícegenerační studii, je možné použít při obou studiích zvířata stejného druhu, kmene a původu.

18. Tento zkušební postup umožňuje, aby si laboratoř pro použití v této zkoušce vybrala kmen potkanů, který by obecně měl být stejný jako kmen historicky používaný v této laboratoři. Použity mohou být běžně používané kmeny laboratorních potkanů; neměly by však být použity kmeny, které pohlavně dozrávají výrazně později než ve věku 42 dnů, jelikož kastrace těchto samců ve věku 42 dnů věku by mohla znemožnit měření hmotnosti žaludu penisu, které může být provedeno teprve po odpojení předkožky od těla penisu. Neměly by tedy, až na vzácné případy, být použity kmeny odvozené od potkanů Fisher 344. Potkani Fisher 344 mají jiný časový průběh pohlavního vývoje než jiné, běžněji používané kmeny, např. kmeny Sprague Dawley nebo Wistar (16). Má-li být takový kmen použit, měla by laboratoř tato zvířata kastrovat v poněkud pozdějším věku a měla by být schopna prokázat citlivost použitého kmene. Výběr kmene potkanů by laboratoř měla jasně zdůvodnit. Tam, kde screeningová zkouška může být předběžnou studií pro studii s opakovaným podáváním dávky orální cestou, pro reprodukční a vývojovou studii nebo pro dlouhodobou studii, měla by být ve všech studiích přednostně používána zvířata stejného kmene a původu.

Podmínky chovu a krmení

19. Veškeré postupy by měly vyhovovat všem místním normám péče o laboratorní zvířata. Tyto popisy péče a zacházení jsou minimálními normami a budou nahrazeny přísnějšími místními nařízeními, např. směrnicí Evropského parlamentu a Rady 2010/63/EU ze dne 22. září 2010 o ochraně zvířat používaných pro vědecké účely (26). Teplota v místnosti pro pokusná zvířata by měla být 22 °C (s přibližným rozpětím ± 3 °C). Relativní vlhkost by měla být minimálně 30 % a neměla by pokud možno přesáhnout 70 %, kromě doby úklidu místnosti. Cílem musí být relativní vlhkost 50–60 %. Osvětlení by mělo být umělé. Mělo by se střídat 12 hodin světla a 12 hodin tmy.

20. Skupinový chov se upřednostňuje před izolací vzhledem k mladému věku zvířat a ke skutečnosti, že potkani jsou společenská zvířata. Chov po dvou nebo třech zvířatech v každé kleci zamezí stísněným podmínkám a s nimi spojenému stresu, který může ovlivnit hormonální kontrolu vývoje přídatné tkáně pohlavních orgánů. Klece by měly být pečlivě čištěny, aby se odstranily možné kontaminující látky, a uspořádány tak, aby byl možný vliv umístění klecí minimalizován. Klece náležité velikosti (~ 2 000 cm^2) zabrání stísněným podmínkám.

21. Každé zvíře musí být jednotlivě označeno (např. ušní známkou nebo štítkem) humánním způsobem. Metoda označení se zaznamená.

▼M5

22. Laboratorní stravu a pitnou vodu dostávají zvířata v libovolném množství. Laboratoře provádějící Hershbergerovu biologickou zkoušku by měly používat laboratorní stravu, kterou běžně používají při své práci zkoušení chemických látek. Při validačních studiích pro tuto biologickou zkoušku nebyly pozorovány žádné účinky nebo variabilita, které by bylo možné přičíst stravě. Použitá strava se zaznamená a vzorek laboratorní stravy se uchová pro případnou budoucí analýzu.

Kritéria hmotnosti orgánů závislých na androgenech

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

24. Z jednotlivých kmenů potkanů, které byly úspěšně použity v rámci validačního programu, vykazují těžší kmeny potkanů vyšší hmotnosti orgánů závislých na androgenech než lehčí kmeny. Proto kritéria pro Hershbergerovu biologickou zkoušku neobsahují absolutní očekávané hmotnosti orgánů pro pozitivní a negativní kontrolní skupiny.

25. Vzhledem k existenci vztahu nepřímé úměry mezi variačním koeficientem (CV) pro určitou tkáň a statistickou váhou údajů, jsou kritéria Hershbergerovy biologické zkoušky založena na maximálních hodnotách variačního koeficientu pro každou tkáň (Tabulka 1). Variační koeficienty jsou odvozeny z validačních studií OECD. V případě negativních výsledků by laboratoře měly zkoumat variační koeficienty z kontrolní skupiny a z experimentální skupiny, které byly podávány vysoké dávky, a stanovit, zda nebyla překročena kritéria pro maximální variační koeficient.

26. Studie my měla být zopakována, pokud: 1) tři nebo více z deseti možných variačních koeficientů u jednotlivých zvířat v kontrolní skupině a ve skupině, které byly podávány vysoké dávky, překročí maximum stanovené pro studie agonistů a antagonistů uvedené v tabulce 1 a 2) nejméně dvě cílové tkáně byly marginálně insignifikantní, tj. hodnoty ρ byly mezi 0,05 a 0,10.

Tabulka 1

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

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

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

▼M5

POSTUP

Dodržování právních předpisů a laboratorní ověření

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

Počet a stav zvířat

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

Kastrace

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

Aklimatizace po kastraci

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

Tělesná hmotnost a náhodný výběr do skupin

31. Rozdíly v tělesné hmotnosti jednotlivých zvířat jsou zdrojem variability v hmotnosti tkání v rámci skupin zvířat i mezi těmito skupinami. Rostoucí variabilita v hmotnosti tkání vede k vyššímu variačnímu koeficientu (CV) a snižuje statistickou váhu zkoušky (někdy označovanou jako citlivost zkoušky). Variace tělesné hmotnosti by proto měly být experimentálně i statisticky kontrolovány.

32. Experimentální kontrola zahrnuje dosažení malých variací tělesné hmotnosti v rámci studijních skupin a mezi těmito skupinami. Zaprvé, neobvykle malá nebo neobvykle velká zvířata by měla být vyloučena a neměla by být umísťována do studijní kohorty. Při zahájení studie by variace hmotnosti použitých zvířat neměla převyšovat ± 20 % střední hodnoty hmotnosti (např. 175 g ± 35 g pro kastrované potkany v peripubertálním věku). Zadruhé, zvířata by měla být přiřazena do skupin (kontrolní a experimentální) náhodnou hmotnostní distribucí, takže střední hodnota tělesné hmotnosti každé skupiny se nebude statisticky lišit od kterékoli jiné skupiny. Použitý postup blokové randomizace je třeba zaznamenat.

▼M5

33. Jelikož toxicita může snížit tělesnou hmotnost exponovaných skupin v porovnání s kontrolní skupinou, mohla by jako statistický kovariát být použita tělesná hmotnost v první den podávání zkoušené chemické látky, a nikoli tělesná hmotnost při pitvě.

Dávkování

34. K tomu, aby se zjistilo, zda zkoušená chemická látka může mít androgenní účinek *in vivo*, běžně postačují dvě skupiny exponované zkoušené chemické látce a dále pozitivní kontrolní skupina a negativní kontrolní skupina s vehikulem (viz odstavec 43), S ohledem na zásadu dobrého zacházení se zvířaty je upřednostňováno uvedené uspořádání. Je-li záměrem získat křivku dávka-reakce nebo extrapolovat na nižší dávky, jsou zapotřebí nejméně 3 exponované skupiny. Jsou-li požadovány informace vycházející za rámec zjišťování androgenní aktivity (např. odhad potence), měly by být zváženy odlišné režimy dávkování. Při zkoušce na antiandrogeny se zkoušená chemická látka podává spolu s referenčním agonistou androgenů. Měly by být použity nejméně 3 zkušební skupiny s různými dávkami zkoušené chemické látky a pozitivní a negativní kontrolní skupina (viz odstavec 44). S výjimkou podávání zkoušené chemické látky se se zvířaty v kontrolní skupině zachází stejně jako se zvířaty ve zkušební skupině. Pokud se při podávání zkoušené chemické látky používá vehikulum, měla by kontrolní skupina dostávat vehikulum v nejvyšším objemu, jaký je použit ve zkušebních skupinách.

35. Při navrhování a výběru všech úrovní dávek by měly být zohledněny veškeré existující údaje o toxických a toxikokinetických vlastnostech, které jsou pro zkoušenou chemickou látku nebo příbuzné materiály dostupné. Nejvyšší úroveň dávky by měla zaprvé zohlednit LD_{50} a/nebo informace o akutní toxicitě, aby se předešlo úmrtím, bolestivému strádání nebo utrpení zvířat (17)(18)(19)(20), a za druhé by měla zohlednit dostupné informace o dávkách použitých v subchronických a chronických studiích. Obecně by nejvyšší dávka neměla vyvolat snížení konečné tělesné hmotnosti zvířat o více než 10 % v porovnání s hmotností kontrolní skupiny. Nejvyšší dávka by měla být buď 1) nejvyšší dávka, která zaručuje přežití zvířat a která nezpůsobuje významnou toxicitu nebo utrpení zvířat po uplynutí 10 po sobě jdoucích dnů od podávání, až po maximální dávku 1 000 mg na 1 kilogram tělesné hmotnosti za den (viz odstavec 36), nebo 2) dávka vyvolávající androgenní/antiandrogenní účinky podle toho, která dávka je nižší. V rámci screeningu jsou přijatelné velké intervaly v dávkování, např. po 0,5 log (což odpovídá odstupňování dávky v intervalech po 3,2) nebo dokonce v jednotkách logaritmické škály. Nejsou-li žádné vhodné údaje dostupné, může být provedena předběžná studie pro stanovení rozmezí dávek (viz odstavec 37), aby se podle ní stanovily dávky, které mají být použity ve vlastní studii.

Limitní dávka

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

Důvody pro zjištění rozmezí dávek

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

▼M5

podávání proveditelné, lze přibližně po 24 hodinách od podání poslední dávky vyjmout cílové tkáně a zvážit je. Tyto údaje by pak mohly být podpůrně použity při výběru dávek pro hlavní studii.

Referenční chemické látky a vehikulum

38. Referenčním agonistou androgenů by měl být testosteron propionát (TP), č. CAS 57-82-5. Dávka referenčního TP může být 0,2 mg/kg tělesné hmotnosti za den nebo 0,4 mg/kg tělesné hmotnosti za den. Referenčním antagonistou androgenů by měl být flutamid (FT), č. CAS 1311-84-7. Dávka referenčního FT by měla být 3 mg na 1 kg tělesné hmotnosti za den a FT by měl být podáván spolu s dávkou referenčního TP.

39. Je-li to možné, doporučuje se nejprve zvážit použití vodného roztoku/suspenze. Jelikož však mnohé androgenní ligandy nebo jejich metabolické prekursory mají tendenci být hydrofobní, nejčastějším postupem je použití roztoku/suspenze v oleji (např. v kukuřičném, arašídovém, sezamovém nebo olivovém oleji). Zkoušené chemické látky lze rozpustit v minimálním množství 95 % ethanolu nebo jiných vhodných rozpouštědel a zředit ve zkušebním vehikulu na konečnou pracovní koncentraci. Měly by být známy typické toxické znaky daného rozpouštědla a měly by být prověřeny na kontrolní skupině vystavené pouze působení rozpouštědla. Je-li zkoušená chemická látka považována za stálou, lze jejímu rozpuštění napomoci mírným ohřátím a intenzivním mechanickým působením. Měla by být stanovena stálost zkoušené chemické látky ve vehikulu. Je-li zkoušená chemická látka po dobu studie stálá, lze připravit jeden výchozí alikvotní podíl zkoušené chemické látky a denně připravovat roztok podle stanoveného dávkování, přičemž je třeba dbát na to, aby nedošlo ke kontaminaci a znehodnocení vzorků.

Podávání dávek

40. TP by měl být podáván subkutánní injekcí a FT by měl být podáván orální sondou.

41. Zkoušená chemická látka se podává orální sondou nebo subkutánní injekcí. Při výběru způsobu podávání musí být zohledněna zásada dobrého zacházení se zvířaty a fyzikálně-chemické vlastnosti zkoušené chemické látky. Je-li dosaženo pozitivních výsledků pomocí injekce, před zahájením rozsáhlého, dlouhodobého zkoušení by měly být zohledněny také toxikologické aspekty, jako je relevantnost z hlediska způsobu expozice člověka dané chemické látce (např. orální sonda pro modelování požití, subkutánní injekce pro modelování inhalace nebo adsorpce kůží), a existující toxikologické informace a údaje o metabolismu a kinetice (např. potřeba vyhnout se metabolismu prvního průchodu, lepší účinnost při určitém způsobu podávání).

42. Dávky by měly být zvířatům podávány stejným způsobem a ve stejné časové posloupnosti po dobu deseti po sobě jdoucích dnů přibližně v 24hodinových intervalech. Úroveň dávek by měla být denně upravována na základě souběžně prováděných denních měření tělesné hmotnosti. Objem dávky a doba jejího podávání by v každém dni expozice měly být zaznamenány. Je zapotřebí dbát na to, aby nebyla překročena maximální dávka uvedená v odstavci 35, aby bylo možno provést smysluplnou interpretaci údajů. V této souvislosti je třeba pečlivě posoudit snížení tělesné hmotnosti, klinické příznaky a veškeré další nálezy. Při podávání orální sondou by měla být použita žaludeční sonda nebo vhodná intubační kanyla. Maximální

▼M5

objem tekutiny, kterou lze podat najednou, závisí na velikosti pokusného zvířete. Je třeba dodržovat místní pokyny v oblasti péče o zvířata, avšak objem by neměl překročit 5 ml na 1 kg tělesné hmotnosti, s výjimkou vodných roztoků, kdy lze použít 10 ml na 1 kg tělesné hmotnosti. Při podávání subkutánní injekcí by dávky měly být aplikovány do dorsální skapulární nebo lumbální oblasti sterilní jehlou (např. velikosti 23- nebo 25-gauge) a tuberkulinovou injekční stříkačkou. Oholení místa vpichu je dobrovolné. Jakékoli ztráty, únik v místě vpichu nebo neúplné dávkování se zaznamenají. Celkový objem vstříknutý jednomu potkanovi za den by neměl překročit 0,5 ml na 1 kg tělesné hmotnosti.

Specifické postupy pro agonisty androgenů

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

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

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

POZOROVÁNÍ

Poznatky z klinického pozorování

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

46. Všechna zvířata nalezená uhynulá se odeberou a odstraní bez další analýzy údajů. V záznamu o studii by měla být uvedena veškerá uhynutí zvířat před pitvou, spolu se zjevnými příčinami uhynutí. Zvířata v agónii se humánně utratí. Zvířata v agónii a následně usmrcená se uvedou v záznamu o studii, spolu se zjevnými příčinami nemocnosti.

▼M5

Tělesná hmotnost a spotřeba potravy

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

Pitva a měření hmotnosti tkání a orgánů

48. Přibližně po 24 hodinách od posledního podání zkoušené chemické látky se potkani usmrtí, nechají vykrvácet v souladu s běžnými postupy provádějící laboratoře a provede se pitva. V závěrečné zprávě laboratoře by měla být uvedena metoda humánního usmrcení.

49. Ideálně by pořadí pitev mělo být určeno náhodným výběrem mezi skupinami, aby nedošlo k lineárnímu pořadí od nejméně exponované skupiny k nejvíce exponované skupině, či naopak, což by mohlo ovlivnit údaje. Veškeré pitevní nálezy, tj. patologické změny/viditelné léze by měly být zaznamenány a uvedeny ve zprávě.

50. Zváží se pět tkání závislých na androgenech (ventrální prostata (VP), semenné váčky (SV), svaly m. ligator ani a m. bulbocavernosus (LABC), Cowperovy žlázy (COW), žalud penisu GP)), Tyto tkáně se vyříznou, opatrně zbaví nadbytečných ulpělých tkání a tuku a stanoví se jejich hmotnost v čerstvém (nefixovaném) stavu. S každou tkání je nutno zacházet s obzvláštní pečlivostí, aby nedošlo ke ztrátě tekutin a aby nedošlo k vysychání, což může způsobit významné chyby a variabilitu v důsledku snížení zaznamenávaných hmotností. Některé tkáně mohou být velmi malé nebo jejich oddělení může být obtížné, a to je zdrojem variability. Je proto důležité, aby osoby provádějící pitvu přídatných pohlavních tkání byly obeznámeny se standardními postupy pitvání těchto tkání. K dispozici je příručka standardních operačních postupů (SOP) pro pitvu vydaná OECD (21). Pečlivý výcvik v souladu s příručkou minimalizuje potenciální zdroj variací ve studii. Za pitvu dané tkáně by měl být ideálně odpovědný tentýž pracovník, aby se zabránilo rozdílům ve zpracování tkání různými osobami. Není-li to možné, měla by být pitva uspořádána tak, že každý pracovník provádí sekci dané tkáně ze všech experimentálních skupin, a nikoli aby jedna osoba prováděla sekci všech tkání z kontrolní skupiny a někdo jiný byl odpovědný za exponované skupiny. Každá přídatná pohlavní tkáň se před osušením zváží s přesností na 0,1 mg a hmotnosti naměřené u každého zvířete se zaznamenají.

51. Některé tkáně mohou být velmi malé nebo jejich oddělení může být obtížné, a to je zdrojem variability. Z předchozí práce vyplynula řada variačních koeficientů (CV), které se podle všeho liší podle odborné způsobilosti té či oné laboratoře. V několika málo případech byly zjištěny velké rozdíly v absolutních hmotnostech tkání, např. VP a COW, v rámci jedné konkrétní laboratoře.

52. Měření hmotnosti jater, párových ledvin a párových nadledvinek je volitelné. Tkáně by opět měly být zbaveny fascií adherens a tuku. Játra se zváží a hmotnost se zaznamená s přesností na 0,1 g a párové ledviny a párové nadledvinky se zváží a hmotnost se zaznamená s přesností na 0,1 mg. Játra, ledviny a nadledvinky jsou nejen ovlivněny androgeny; poskytují také užitečné důkazy systémové toxicity.

▼**M5**

53. Měření luteinizačního hormonu (LH), folikulárního stimulujícího hormonu (FSH) a testosteronu (T) v séru je fakultativní. Úrovně T v séru jsou užitečné pro stanovení, zda zkoušená chemická látka vyvolává metabolismus testosteronu v játrech a snižuje úrovně séra. Bez údajů o T by se takový účinek mohl jevit jako výsledek antiandrogenního mechanismu. Úrovně LH poskytují informace o schopnosti určitého antiandrogenu nejen snižovat hmotnost orgánů, ale také ovlivňovat hypothalamo-hypofyzární funkci, což při dlouhodobých studiích může vyvolávat nádory varlat. FSH je hormon důležitý pro spermatogenezi. Dobrovolná jsou rovněž měření séra T4 a T3, která mohou poskytnout užitečné doplňující informace o schopnosti narušovat homeostázu thyroidních hormonů. Mají-li být prováděna hormonální měření, potkani se před pitvou anestetizují a odebere se jim krev srdeční punkcí, přičemž metoda anestezie by měla být pečlivě zvolena tak, aby neovlivnila hormonální měření. Metoda přípravy séra, zdroj souprav pro radioimunologický test nebo jiná měření, analytické postupy a výsledky se zaznamenají. Úrovně LH se zaznamenají v ng na 1 ml séra a rovněž hodnota T se uvede v ng na 1 ml séra.

54. Pitva tkání je popsána dále, přičemž podrobný návod pro pitvu s fotografiemi byl zveřejněn v rámci validačního programu jako doplňující materiál (21). Na webových stránkách Korea Food and Drug Administration je k dispozici také videozáznam pitvy (22).

— Se zvířetem ve ventrální poloze určete, zda se předkožka penisu odpojila od žaludu. Pokud ano, stáhněte předkožku nazad a oddělte žalud, zvažte ho (s přesností na 0,1 mg) a hmotnost zaznamenejte.

— Otevřete kůži na břiše a břišní stěnu, obnažte vnitřnosti. Pokud se provádí volitelné vážení dalších orgánů, oddělte játra a zvažte je s přesností na 0,1 g, oddělte žaludek a střeva, oddělte párové ledviny a párové nadledvinky a zvažte je s přesností na 0,1 mg. Touto sekcí se obnaží močový měchýř a začíná sekce cílových samčích přídatných tkání.

— Pro oddělení VP oddělte močový měchýř od vrstvy ventrálního svalu odříznutím spojovací tkáně podél osy. Odsuňte měchýř anteriorně směrem k semenným váčkům (SV), čímž se odkryje levý a pravý lalok ventrální prostaty (pokryté vrstvou tuku). Opatrně očistěte pravý a levý lalok VP od tuku. Jemně oddalte pravý lalok VP od močové trubice a odřízněte lalok od močové trubice. Zatímco stále držíte pravý lalok VP, jemně oddalte levý lalok VP od močové trubice a poté odřízněte; zvažte s přesností na 0,1 mg a hmotnost zaznamenejte.

— Při sekci SVCG odsuňte močový měchýř kaudálním směrem, čímž se odkryje chámovod a pravé a levé lalůčky semenných váčků spolu s koagulačními žlázami (SVCG). Zabraňte úniku tekutiny nasazením hemostatu v basi SVCG, kde se chámovod napojuje na močovou trubici. SVCG opatrně odřízněte, s nasazeným hemostatem stále na místě odstraňte tuk a připojené orgány, vložte do tárované misky vah, sejměte hemostat, zvažte s přesností na 0,1 mg a hmotnost zaznamenejte.

▼M5

— Při sekci svalů m. levator ani a m. bulbocavernosus (LABC) se odkryjí svaly a kořen penisu. Svaly LA obtáčejí tračník a svaly LA anterior a BC jsou připojeny k bulbu penisu. Odstraní se kůže a připojené orgány z perianální oblasti, která se táhne od kořene penisu až po anteriorní konec konečníku. Od bulbu a tkání penisu se postupně odříznou svaly BC. Tračník se rozřízne na dvě části a lze odříznout a oddělit celé LABC. LABC se zbaví tuku a připojených orgánů, zváží s přesností na 0,1 mg a hmotnost se zaznamená.

— Po odstranění LABC jsou vidět zaoblené Cowperovy nebo též bulbouretrální žlázy (COW) při basi bulbu penisu, poněkud dorzálně. Je nutný opatrný řez, aby nedošlo k prořízntutí tenkého váčku a zamezilo se úniku tekutiny. Zvažte párové COW s přesností na 0,1 mg a hmotnost zaznamenejte.

— Dojde-li během pitvy a sekce ke ztrátě tekutiny z kterékoli žlázy, je třeba to zaznamenat.

55. Jestliže hodnocení každé chemické látky vyžaduje pitvu většího počtu zvířat, než kolik se dá stihnout za jeden den, může být začátek studie rozložen do dvou po sobě jdoucích dnů, což vede k rozložení pitvy a související práce na dva dny. Pokud k takovému rozložení dojde, měla by být každý den použita polovina zvířat z každé experimentální skupiny.

56. Zbývající části mrtvých těl se po pitvě vhodným způsobem zlikvidují.

PŘEKLÁDÁNÍ ZPRÁV

Údaje

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

58. Závěrečná zpráva by měla obsahovat:

Zkušební zařízení:

— název a místo zařízení,

— vedoucí studie a ostatní pracovníci a jejich odpovědnost v rámci studie,

— datum zahájení a datum ukončení studie, tj. první den podávání zkoušené chemické látky a poslední den pitvy.

Zkoušená chemická látka:

— původ, číslo šarže/sady, identifikace, čistota, plná adresa dodavatele a charakterizace zkoušené chemické látky (látek),

— fyzikální povaha a tam, kde je to podstatné, fyzikálně-chemické vlastnosti,

— podmínky skladování a metoda a frekvence přípravy roztoku,

— veškeré získané údaje o stálosti,

— veškeré analýzy dávkování roztoků/suspenzí.

▼**M5**

Vehikulum:

— charakterizace vehikula (identifikace, dodavatel a číslo šarže),

— zdůvodnění výběru vehikula (pokud není použita voda).

Pokusná zvířata a postupy chovu zvířat:

— druh/kmen a zdůvodnění jejich výběru,

— zdroj nebo dodavatel zvířat, včetně plné adresy,

— počet a stáří dodaných zvířat,

— podmínky chovu (teplota, osvětlení apod.),

— strava (název, typ, dodavatel, číslo šarže, obsah a úroveň fytoestrogenů, je-li známa),

— stelivo (název, typ, dodavatel, obsah),

— podmínky chovu v kleci a počet zvířat v jedné kleci.

Podmínky zkoušky:

— věk při kastraci a trvání aklimatizace po kastraci,

— hmotnost jednotlivých zvířat na začátku studie (s přesností na 0,1 g),

— proces náhodného výběru a záznam o přidělení do skupiny s vehikulem, do referenční skupiny, do skupiny, které se podává zkoušená chemická látka, a do klecí,

— střední hodnota a směrodatná odchylka tělesných hmotností u každé skupiny za každý den vážení po celou dobu studie,

— zdůvodnění výběru úrovní dávek,

— podrobnosti o podávání zkoušené chemické látky a zdůvodnění volby způsobu expozice,

— v případě zkoušky na antiandrogenitu, expozice TP (dávka a objem),

— expozice zkoušené chemické látce (dávka a objem),

— doba podávání dávek,

— pitevní postupy, včetně způsobů vykrvení a veškeré anestezie,

— pokud jsou prováděny analýzy séra, měly by být uvedeny podrobnosti o metodě. Je-li například použita metoda radioimunologické analýzy (RIA), měl by být uveden postup RIA, zdroj souprav RIA, datum použitelnosti souprav, postup scintilační spektrometrie a standardizace.

Výsledky:

— každodenní pozorování každého zvířete během podávání dávky, včetně:

— tělesné hmotnosti (s přesností na 0,1 g),

— klinických příznaků (existují-li),

— veškerých měření spotřeby potravy nebo poznámek k ní,

— pozorování při pitvě každého zvířete, včetně:

▼M5

— data pitvy,

— experimentální skupiny zvířat,

— identifikačního čísla,

— jména pracovníka provádějícího pitvu,

— denní doby, kdy byla provedena pitva a sekce,

— věku zvířete,

— konečné tělesné hmotnosti při pitvě, s uvedením veškerých statisticky významných zvýšených nebo snížených hodnot,

— pořadí vykrvácení zvířete a sekcí při pitvě,

— hmotnosti pěti cílových tkání závislých na androgenech:

— ventrální prostata (s přesností na 0,1 mg),

— semenné váčky spolu s koagulačními žlázami, včetně tekutiny (páru, s přesností na 0,1 mg),

— svalový komplex m. levator ani spolu s m. bulbocarvernosus (s přesností na 0,1 mg),

— Cowperovy žlázy (čerstvá hmotnost – párové, s přesností na 0,1 mg),

— žalud penisu (čerstvá hmotnost, s přesností na 0,1 mg),

— hmotnosti tkání měřených fakultativně, provádí-li se:

— játra (s přesností na 0,1 g),

— ledviny (pár, s přesností na 0,1 mg),

— nadledvinky (pár, s přesností na 0,1 mg),

— obecné poznámky a komentáře.

— analýzy hormonů v séru, provádějí-li se

— sérový LH (fakultativní – ng na 1 ml séra) a

— sérový T (fakultativní – ng na 1 ml séra)

— obecné poznámky a komentáře.

Shrnutí údajů

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

Diskuse výsledků

Analýza výsledků

59. Tělesné hmotnosti a hmotnosti orgánů při pitvě se statisticky analyzují za účelem zjištění takových charakteristik, jako je homogenita rozptylu s vhodnou transformací údajů podle potřeby. Experimentální skupiny by měly být porovnány s kontrolní skupinou pomocí technik jako je ANOVA s následnými párovými srovnáními (např. Dunnettův jednostranný test) a porovnáním s kritériem pro hodnocení statistických rozdílů, např. $p \leq 0,05$. Měly by být určeny ty skupiny, které dosahují statistické významnosti. „Relativní hmotnost orgánů“ by však neměla být použita vzhledem k neplatným statistickým předpokladům pro tuto manipulaci s daty.

▼**M5**

60. V případě androgenního agonismu by kontrolní skupinou měla být zkušební skupina, které je podáváno pouze vehikulum. Charakteristiky působení zkoušené chemické látky mohou vést k rozdílným relativním reakcím jednotlivých tkání, například trenbolon, který nemůže být redukován 5-alfa-reduktázou, má výraznější účinky na LABC a GP, než jsou účinky TP. Statisticky významné zvýšení ($p \leq 0,05$) hmotností dvou nebo více z pěti cílových tkání závislých na androgenech (VP, LABC, GP, COW a SVCG) by mělo být považováno za pozitivní výsledek androgenního agonismu a určitý stupeň zvýšení hmotnosti by měly vykazovat všechny tyto cílové tkáně. Společného hodnocení reakcí všech tkání přídatných pohlavních orgánů by mohlo být dosaženo pomocí vhodné multivariační analýzy dat. To by mohlo zlepšit analýzu, zejména v případech, kdy statisticky významná reakce byla zjištěna pouze u jediné tkáně.

61. V případě androgenního antagonismu by kontrolní skupinou měla být zkušební skupina, které je podáván pouze referenční androgen (testosteron propionát). Typické znaky působení zkoušené chemické látky mohou vést k rozdílným relativním reakcím jednotlivých tkání; například inhibitory 5-alfa-reduktázy, jako finasterid, mají výraznější účinek na ventrální prostatu než na jiné tkáně ve srovnání s účinnými antagonisty androgenních receptorů, jako je flutamid. Statisticky významné snížení ($p \leq 0,05$) hmotností dvou nebo více z pěti cílových tkání závislých na androgenech (VP, LABC, GP, COW a SVCG) související s aplikací pouze TP by mělo být považováno za pozitivní výsledek androgenního antagonismu a určitý stupeň snížení hmotnosti by měly vykazovat všechny tyto cílové tkáně. Společného hodnocení reakcí všech tkání přídatných pohlavních orgánů by mohlo být dosaženo pomocí vhodné multivariační analýzy dat. To by mohlo zlepšit analýzu, zejména v případech, kdy statisticky významná reakce byla zjištěna pouze u jediné tkáně.

62. Údaje by měly být shrnuty v tabulce obsahující střední hodnotu (průměr), střední chybu průměru (SE) (přijatelná by byla i směrodatná odchylka – SD) a velikost vzorku v každé skupině. Přiloženy by měly být také tabulky s údaji o jednotlivých zvířatech. Individuální hodnoty, střední hodnota, SE (SD) a variační koeficient (CV) pro zvířata kontrolní skupiny by měly být posouzeny, zda splňují stanovená kritéria shody s historickými hodnotami. Variační koeficienty, které převyšují hodnoty CV pro hmotnost každého orgánu uvedené v tabulce 1 (viz odstavce 25 a 26), ukazují, že mohlo dojít k chybě při zaznamenávání nebo vkládání údajů nebo že laboratoř dosud nezvládla přesnou pitvu tkání závislých na androgenech a je nutný další výcvik/praxe. Obecně platí, že variační koeficienty (CV = směrodatná odchylka dělená střední hodnotou hmotnosti orgánu) jsou reprodukovatelné v různých laboratořích a v různých studiích. Předkládané údaje by měly zahrnovat přinejmenším údaje o hmotnostech ventrální prostaty, semenných váčků, svalů m. levator ani a m. bulbocavernosus, Cowperových žláz, žaludu penisu, jater a o tělesné hmotnosti a změně tělesné hmotnosti od začátku podávání dávek až do pitvy. Předloženy mohou být také údaje po kovariační úpravě tělesné hmotnosti, ale to by nemělo nahradit předložení neupravených údajů. Dále, nedojde-li v žádné ze skupin k odpojení předkožky, výskyt odpojení předkožky by měl být zaznamenán a mělo by být provedeno jeho statistické srovnání s kontrolní skupinou pomocí *Fisher Exact* testu.

▼**M5**

63. Při ověřování správnosti údajů vložených do počítače porovnáním s původními záznamy by hodnoty hmotností orgánů, které nejsou biologicky reálné nebo se od středních hodnot této experimentální skupiny liší více než o trojnásobek směrodatné odchylky, měly být pečlivě zkontrolovány a možná budou muset být vyloučeny, neboť se pravděpodobně jedná o chyby v záznamu.

64. Porovnání výsledků studie s hodnotami variačních koeficientů OECD (v tabulce 1) je často důležitým krokem při interpretaci validity výsledků studie. V laboratoři by měly být uchovávány historické údaje o kontrolních skupinách s vehikulem. V laboratoři by rovněž měly být uchovávány historické údaje o reakcích na pozitivní referenční chemické látky, jako je testosteron propionát a flutamid. Laboratoře mohou rovněž periodicky testovat reakci na známé slabé agonisty a antagonisty androgenů a tyto údaje uchovávat. Tyto údaje mohou být porovnávány s dostupnými údaji OECD, aby se zajistilo, že metody používané laboratoří mají dostatečnou statistickou přesnost a sílu.

▼**M5**

Dodatek 1

DEFINICE

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

Antiandrogenní je schopnost chemické látky potlačit působení TP u savců.

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

Datem narození se rozumí postnatální den 0.

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

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

Chemickou látkou se rozumí látka nebo směs.

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

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

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

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

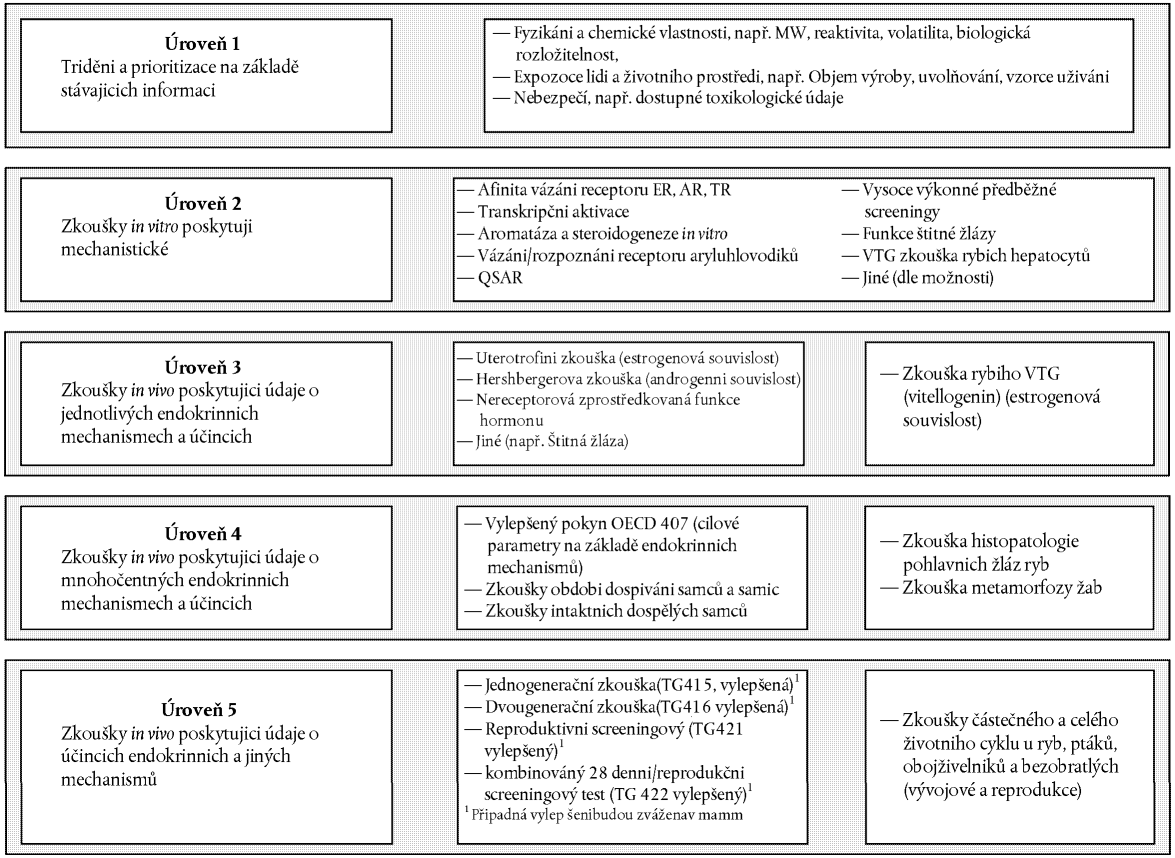
Zkoušenou chemickou látkou se rozumí jakákoli látka nebo směs zkoušená pomocí této zkušební metody.

▼M5

Dodatek 2

Poznámka: Dokument vyhotovil sekretariát programu zkušebnich pokynů na základě dohody dosažené na 6. zasedáni pracovni skupiny EDTA

OECD Koncepční rámec pro zkoušky a hodnoceni endokrinnich distruptorů



VMG mamm: Skupina pro řízení validace zkoušek na savcích

02008R0440 — CS — 16.10.2019 — 008.001 — 934

▼M5

POZNÁMKY KE KONCEPČNÍMU RÁMCI

Poznámka 1: Vstupy a výstupy na všech úrovních jsou možné a závisejí na aktuální potřebě informací pro účely posouzení nebezpečí a rizika.

Poznámka 2: Na úrovni 5 by ekotoxikologie měla zahrnovat účinky, které ukazují na mechanismy negativních účinků a potenciální poškození populace.

Poznámka 3: Pokud multimodální model zahrnuje několik zkoušek pro jednotlivý účinek, pak by uvedený model nahradil použití těchto jednotlivých zkoušek.

Poznámka 4: Hodnocení každé chemické látky by mělo být specifické pro každý případ a mělo by brát v úvahu všechny dostupné informace s přihlédnutím k úrovni v koncepčním rámci.

Poznámka 5: Uvedený koncepční rámec by v současnosti neměl být považován za vyčerpávající. Na úrovni 3, 4 a 5 obsahuje zkoušky, které jsou buď dostupné, nebo u kterých probíhá validace. Pokud jde o druhou jmenovanou skupinu, jsou tyto zkoušky zahrnuty prozatímně. Jakmile budou vyvinuty a validovány, budou do rámce formálně přidány.

Poznámka 6: U úrovně 5 nelze mít za to, že obsahuje pouze konečné zkoušky. Zkoušky zahrnuté do této úrovně přispívají k obecnému posouzení nebezpečí a rizik.

LITERATURA

1) OECD (1998). Report of the First Meeting of the OECD Endocrine Disrupter Testing and Assessment (EDTA) Task Force, 10.–11. března 1998, ENV/MC/CHEM/RA(98)5.

2) Dorfman RI (1962). Standard methods adopted by official organization. Academic Press, NY.

3) Gray LE Jr, Furr J and Ostby JS (2005). Hershberger assay to investigate the effects of endocrine disrupting compounds with androgenic and antiandrogenic activity in castrate-immature male rats. In: *Current Protocols in Toxicology* 16.9.1–16.9.15. J Wiley and Sons Inc.

4) OECD (2006). Final OECD report of the initial work towards the validation of the rat Hershberger assay. Phase 1. Androgenic response to testosterone propionate and anti-androgenic effects of flutamide. Environmental Health and Safety, Monograph Series on Testing and Assessment N^{o} 62. ENV/JM/MONO(2006)30.

5) OECD (2008). Report of the OECD Validation of the Rat Hershberger Bioassay: Phase 2: Testing of Androgen Agonists, Androgen Antagonists and a 5α-Reductase Inhibitor in Dose Response Studies by Multiple Laboratories. Environmental Health and Safety, Monograph Series on Testing and Assessment N^{o} 86. ENV/JM/MONO(2008)3.

6) OECD (2007). Report of the Validation of the Rat Hershberger Assay: Phase 3: Coded Testing of Androgen Agonists, Androgen Antagonists and Negative Reference Chemicals by Multiple Laboratories. Surgical Castrate Model Protocol. Environmental Health and Safety, Monograph Series on Testing and Assessment N^{o} 73. ENV/JM/MONO(2007)20.

7) Owens, W, Zeiger E, Walker M, Ashby J, Onyon L, Gray, Jr, LE (2006). The OECD programme to validate the rat Hershberger bioassay to screen compounds for *in vivo* androgen and antiandrogen responses. Phase 1: Use of a potent agonist and a potent antagonist to test the standardized protocol. Env. Health Persp. 114:1265–1269.

▼**M5**

8) Owens W, Gray LE, Zeiger E, Walker M, Yamasaki K, Ashby J, Jacob E (2007). The OECD program to validate the rat Hershberger bioassay to screen compounds for *in vivo* androgen and antiandrogen responses: phase 2 dose-response studies. Environ Health Perspect. 115(5):671–8.

9) Korenchevsky V (1932). The assay of testicular hormone preparations. Biochem J26:413–422.

10) Korenchevsky V, Dennison M, Schalit R (1932). The response of castrated male rats to the injection of the testicular hormone. Biochem J26:1306–1314.

11) Eisenberg E, Gordan GS (1950). The levator ani muscle of the rat as an index of myotrophic activity of steroidal hormones. J Pharmacol Exp Therap 99:38–44.

12) Eisenberg E, Gordan GS, Elliott HW (1949). Testosterone and tissue respiration of the castrate male rat with a possible test for mytrophic activity. Endocrinology 45:113–119.

13) Hershberger L, Shipley E, Meyer R (1953). Myotrophic activity of 19-nortestosterone and other steroids determined by modified levator ani muscle method. Proc Soc Exp Biol Med 83:175–180.

14) Hilgar AG, Vollmer EP (1964). Endocrine bioassay data: Androgenic and myogenic. Washington DC: United States Public Health Service.

15) Dorfman RI (1969). Androgens and anabolic agents. In: Methods in Hormone Research, volume IIA. (Dorfman RI, ed.) New York:Academic Press, 151–220.

16) Massaro EJ (2002). Handbook of Neurotoxicology, volume I. New York: Humana Press, s. 38.

17) OECD (2000). Guidance document on the recognition, assessment and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No 19. ENV/JM/MONO(2000)7.

18) OECD (1982). Organization for Economic Co-operation and Development – Principles of Good Laboratory Practice, ISBN 92-64-12367-9, Paris.

19) OECD (2008). Acute oral toxicity – up-and-down procedure. OECD Guideline for the testing of chemicals No 425.

20) OECD (2001). Guidance document on acute oral toxicity. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No 24. ENV/JM/MONO(2001)4.

21) Supplemental materials for Owens et al. (2006). The OECD programme to validate the rat Hershberger bioassay to screen compounds for *in vivo* androgen and antiandrogen responses. Phase 1: Use of a potent agonist and a potent antagonist to test the standardized protocol. Env. Health Persp. 114:1265-1269. See, section II, The dissection guidance provided to the laboratories: http://www.ehponline.org/docs/2006/8751/suppl.pdf.

22) Korea Food and Drug Administration. Visual reference guide on Hershberger assay procedure, including a dissection video. http://rndmoa.kfda.go.kr/endocrine/reference/education_fr.html.

23) OECD (2008). Background Review Document on the Rodent Hershberger Bioassay. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No 90. ENV/JM/MONO(2008)17.

24) OECD (2008). Draft Validation report of the Intact, Stimulated, Weanling Male Rat Version of the Hershberger Bioassay.

25) OECD (2009). Guidance Document on the Weanling Hershberger Bioassay in rats: A shortterm screening assay for (anti)androgenic properties. Series on Testing and Assessment, Number 115.

▼**M5**

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

27) Následující kapitoly v této příloze:

B.1a, akutní orální toxicita – metoda fixní dávky

B.1b, akutní orální toxicita – metoda stanovení třídy akutní toxicity

▼M5

B.56 ROZŠÍŘENÁ JEDNOGENERAČNÍ STUDIE TOXICITY PRO REPRODUKCI

ÚVOD

1. Tato zkušební metoda odpovídá Pokynu OECD pro zkoušení (TG) 443 (2012). Vychází z návrhu Institutu pro vědy o živé přírodě (ILSI), Institutu pro zdravotní a environmentální vědy (HESI) a Technického výboru pro posuzování zemědělsko-chemické bezpečnosti (ACSA), týkajícího se rozšířené jednogenerační studie reprodukce v F_1 generaci publikovaném v dokumentu Cooper et al., 2006 (1). Struktura studie zaznamenala několik vylepšení a vyjasnění s cílemzajistit flexibilitu a zdůraznit, že je důležité začít se stávajícími poznatky, a současně používat průběžná pozorování v životním cyklu k organizaci a modifikaci provádění zkoušek. Tato zkušební metoda poskytuje podrobný popis rozšířené jednogenerační studie toxicity pro reprodukci. Zkušební metoda popisuje tři kohorty zvířat F_1 generace:

kohorta 1: posuzuje reprodukční/vývojové ukazatele; tuto kohortu lze rozšířit o F_2 generaci.

kohorta 2: posuzuje případný dopad expozice chemické látce na vyvíjející se nervovou soustavu.

kohorta 3: posuzuje případný dopad expozice chemické látce na vyvíjející se imunitní systém.

2. Rozhodnutí o tom, zda hodnotit druhou generaci a vypustit kohortu vývojové neurotoxicity a/nebo kohortu vývojové imunotoxicity, by se měla opírat o stávající poznatky o hodnocené chemické látce, stejně jako o potřeby různých regulačních orgánů. Účelem této zkušební metody je poskytnout podrobné údaje o tom, jak lze studii provádět a jak vyřešit způsob hodnocení jednotlivých kohort.

3. Pro regulační orgány, které pro rozhodování o povinném zařazení druhé generace do postupu testování používají tzv. vnitřních příkazů, byl pro tyto účely vydán pokyn OECD č. 117 (39).

VÝCHOZÍ ÚVAHY A CÍLE

4. Hlavním cílem rozšířené jednogenerační studie toxicity pro reprodukci je zhodnotit konkrétní životní stadia, která nejsou zahrnuta do jiných typů studií toxicity, a otestovat účinky, které se mohou vyskytnout v důsledku expozice chemické látce v prenatálním a postnatálním stadiu. V případě reprodukčních ukazatelů se předpokládá, že pokud jsou takové údaje dostupné, tak jako první krok jsou pro odhalení účinků na reproduktivní orgány samců a samic použity informace ze studií opakovaného dávkování, např. OECD TG 422 (32)), nebo krátkodobých screeningových zkoušek endokrinních disruptorů, (např. Uterotrofní zkouška – zkušební metoda B.54 (36) a Hershbergerova zkouška – zkušební metoda B.55 (37)). To může zahrnovat údaje o spermatogenezi (histopatologické vyšetření varlat) u samců a estrální cyklus, počty folikulů/zrání oocytů a integrita vaječníků (histopatologické vyšetření) u samic. Rozšířená jednogenerační studie toxicity pro reprodukci poté slouží jako zkouška reprodukčních ukazatelů, které vyžadují interakci samců se samicemi, samic se zárodkem a samic s potomstvem a F_1 generací až do doby po dosažení pohlavní zralosti (viz pokyn OECD č. 151 podporující tuto zkušební metodu (40)).

▼**M5**

5. Tato zkušební metoda má poskytnout hodnocení prenatálních a postnatálních účinků chemických látek na vývoj, jakož i důkladné zhodnocení systémové toxicity u březích samic a samic v době laktace a u mladého a dospělého potomstva. Očekává se, že při podrobném zkoumání klíčových vývojových ukazatelů, jakými jsou životaschopnost potomstva, neonatální zdraví, vývojový stav při narození a fyzický a funkční vývoj do dospělosti, budou určeny konkrétní cílové orgány v potomstvu. Studie navíc poskytne a/nebo potvrdí informace o účincích zkoušené chemické látky na integritu a výkonnost rozmnožovací soustavy dospělých samců a samic. V úvahu jsou brány konkrétně, nikoli však výlučně tyto parametry: funkce pohlavních žláz, estrální cyklus, zrání epididymálních spermií, způsob chování při páření, plození, březost, vrh a laktace. Dále budou informace získané z posouzení vývojové neurotoxicity a vývojové imunotoxicity charakterizovat potenciální účinky v těchto systémech. Údaje odvozené z těchto zkoušek by měly umožnit určení dávek bez pozorovaného nepříznivého účinku (*No-Observed Adverse Effect Levels* – NOAEL), dávek s nejnižším pozorovaným nepříznivým účinkem (*Lowest Observed Adverse Effect Levels* – LOAEL) a/nebo referenčních dávek pro různé ukazatele a/nebo by měly být využity k charakterizaci účinků zjištěných v předchozích studiích s opakovaným dávkováním a/nebo by měly sloužit jako návod pro následné zkoušky.

6. Schéma zkušebního postupu obsahuje obrázek 1. Zkoušená chemická látka je podávána nepřetržitě ve stupňovaných dávkách několika skupinám pohlavně zralých samců a samic. Této rodičovské generaci (P) jsou dávky podávány po stanovené období před pářením (vybráno na základě dostupných informací pro zkoušenou chemickou látku, ale minimálně po dobu dvou týdnů) a po dvoutýdenní období páření. Samcům z P generace jsou dávky podávány dále nejméně až do odstavení generace F_1. Dávky by měli dostávat minimálně 10 týdnů. Je-li nutné objasnit účinky na reprodukci, mohou dávky dostávat déle. Podávání dávek samicím P generace pokračuje během březosti a laktace až do utracení po odstavení jejich vrhu (tj. 8–10 týdnů aplikace). Potomstvo z generace F_1 dostává další dávky zkoušené chemické látky od odstavení až do dospělosti. Pokud je hodnocena druhá generace (viz pokyn OECD č. 117 (39)), potomci z generace F_1 budou dávky dostávat až do odstavení generace F_2 nebo až do ukončení studie.

7. U všech zvířat se provádějí klinická pozorování a patologická vyšetření příznaků toxicity, a to se zvláštním důrazem na integritu a výkonnost samčí a samičí rozmnožovací soustavy a na zdraví, růst, vývoj a funkci jejich potomstva. Při odstavení jsou vybraní potomci zařazeni do konkrétních podskupin (kohorty č. 1–3, viz odstavce 33 a 34 a obrázek 1), kde jsou dále zkoumáni, včetně pohlavní zralosti, integrity a funkce reprodukčních orgánů, ukazatelů v oblasti neurologie a chování a funkcí imunity.

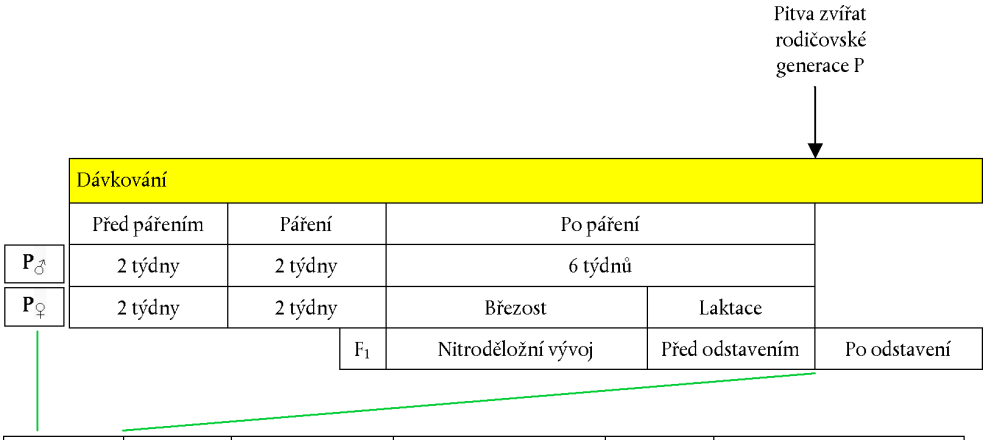
8. Při realizaci studie by měly být respektovány hlavní zásady a aspekty stanovené v pokynu OECD č. 19 o uznávání, posuzování a používání klinických znaků jako humánních ukazatelů pro pokusná zvířata používaná při hodnocení bezpečnosti (34).

▼M5

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

Obrázek 1

Schéma rozšířené jednogenerační studie toxicity pro reprodukci



Rodičovská generace	Kohorta	Pojmenování	Počet zvířata/kohortu	Pohlavní zralost	Přibližné stáří při pitvě (v týdnech)
Cílem je 20 vrhů na skupinu	1A	Reprodukční	20 samců + 20 samic	Ano	13
	1B	Reprodukční	20 samců + 20 samic	Ano	14 nebo 20-25, pokud dojde k vyvolání
	2A	Neurotoxicita	10 samců + 10 samic @	Ano	11-12
	2B	Neurotoxicita	10 samců + 10 samic @	Ne	3
	3	Imunotoxicita	10 samců + 10 samic @	Ano	8
	Přebytek	Náhrady		Ne	3

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

POPIS METODY/PŘÍPRAVY NA ZKOUŠKU

Zvířata

Výběr živočišných druhů a kmenů

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

Kritéria pro stáří, tělesnou hmotnost a zařazení do skupin

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

▼M5

Podmínky chovu a krmení

12. Teplota v místnosti pro pokusná zvířata by měla být 22 °C (± 3°). Relativní vlhkost by se měla pohybovat mezi 30 a 70 %, přičemž ideální je rozmezí od 50 do 60 %. Umělé osvětlení by mělo svítit 12 hodin a 12 hodin by měla být tma. Může být použita konvenční laboratorní potrava s neomezeným přístupem k pitné vodě. Zvláštní pozornost by se měla věnovat obsahu fytoestrogenů ve stravě, jelikož vysoká míra fytoestrogenu ve stravě by mohla ovlivnit některé reproduktivní ukazatele. Je doporučena standardizovaná strava s nestanoveným složením, v níž byly omezeny látky obsahující estrogeny (2) (30). Výběr potravy může být ovlivněn potřebou zajistit dostatečné promísení s testovanou látkou, je-li látka podávána touto cestou. Měl by být ověřen obsah, homogenita a stabilita zkoušené chemické látky v potravě. Měla by být pravidelně prováděna analýza krmiva a pitné vody z hlediska příměsí. Vzorky každé šarže potravy používané během studie by měly být až do dokončení zprávy uchovávány za vhodných podmínek (např. zmrazené při – 20 °C) pro případ, že bude nutné provést další analýzu složek potravy.

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

Počet a identifikace zvířat

14. Každá zkušební a kontrolní skupina by měla obsahovat dostatečný počet spářených párů, aby mohlo být dosaženo alespoň dvaceti březích samic v jedné dávkové skupině. Cílem je získat dostatečný počet březích samic a tím zajistit smysluplné hodnocení schopnosti dané chemické látky ovlivnit plodnost, březost, chování samic generace P, růst a vývoj potomstva generace F_1 od početí až do dospělosti. Nepodaří-li se však dosáhnout požadovaného počtu březích zvířat, nemusí to nutně znamenat znehodnocení studie, a proto by hodnocení mělo vždy probíhat individuálně případ od případu s uvážením možného příčinného vztahu ke zkoušené chemické látce.

15. Každému zvířeti P generace se před podáváním dávek přiřadí vlastní identifikační číslo. Naznačují-li laboratorní historické údaje, že významná část samic nemusí vykazovat pravidelný (čtyřdenní nebo pětidenní) estrální cyklus, je doporučeno provést před aplikací posouzení estrálního cyklu. Případně lze velikost skupiny zvýšit, aby bylo zajištěno, že alespoň dvacet samic v každé skupině bude mít při zahájení aplikace pravidelný (čtyřdenní nebo pětidenní) estrální cyklus. Veškeré potomstvo z F_1 generace dostane vlastní identifikaci při první prohlídce novorozených mláďat v postnatální den (PND) 0 nebo 1. Záznamy označující vrh, z kterého pochází, by měly být uchovávány pro všechna zvířata F_1 generace, příp. zvířata F_2 generace po celou dobu studie.

▼M5

Zkoušená chemická látka

Dostupné informace o zkoušené chemické látce

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

Zohlednění toxikokinetických údajů

17. Ačkoli to není vyžadováno, toxikokinetické údaje z dříve provedených předběžných studií pro stanovení rozmezí dávek nebo jiných studií jsou mimořádně užitečné při plánování struktury studie, volbě úrovní dávek a interpretaci výsledků. Užitečné jsou zejména ty údaje, které: 1) ověřují expozici vyvíjejících se plodů a mláďat zkoušené chemické látce (nebo příslušným metabolitům), 2) poskytují odhad interní dozimetrie, a 3) hodnotí potenciální saturaci kinetických procesů v závislosti na dávkách. Jsou-li k dispozici, měly by být zohledněny i další toxikokinetické údaje, jako jsou profily metabolitů, vývoj koncentrace v čase atd. Během hlavní studie lze shromáždit i doplňující toxikokinetické údaje za předpokladu, že tento sběr nezasahuje do sběru a interpretace ukazatelů hlavní studie.

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

— pozdní březost (např. den gestace 20) – krev matky a krev plodu,

— střední laktace (PND 10) – krev matky, krev mláděte a/nebo mléko,

— brzké odstavení (např. PND 28) – krevní vzorky odstaveného mláděte.

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

▼M5

Způsob podání

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

Volba vehikula

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

Výběr dávky

20. Studie by zpravidla měla obsahovat nejméně tři úrovně dávek a souběžnou kontrolu. Při výběru vhodných úrovní dávek by experimentátor měl zvážit všechny dostupné informace, včetně informací o dávkování z předchozích studií, toxikokinetických údajů získaných z březích nebo nebřezích zvířat, rozsahu laktačního transferu a odhadů expozice člověka. Jsou-li k dispozici toxikokinetické údaje, které uvádějí saturaci toxikokinetických procesů v závislosti na dávkách, je zapotřebí se vyvarovat vysokých úrovní dávek, které jasně ukazují saturaci, ovšem za předpokladu, že se očekává, že expozice lidí budou výrazně nižší než bod saturace. V takových případech by nejvyšší úroveň dávek měla být na úrovni inflexního bodu pro přechod na nelineární toxikokinetické chování nebo jen mírně nad ním.

21. Nejsou-li k dispozici příslušné toxikokinetické údaje, úrovně dávek by měly vycházet z toxických účinků, nejsou-li omezeny fyzikální/chemickou povahou zkoušené chemické látky. Pokud se úrovně dávek opírají o toxicitu, nejvyšší dávka by měla být vybrána s cílem vyvolat určitou systémovou toxicitu, ne však uhynutí nebo velké utrpení zvířat.

22. Měla by být zvolena sestupná řada úrovní dávek s cílem prokázat účinky související s dávkou a stanovit hodnotu dávky bez pozorovaného nepříznivého účinku (NOAEL) nebo dávky blízko limitu detekce, které by umožnily odvození referenční dávky pro nejcitlivější ukazatel(e). S cílem předejít velkým rozmezím dávek mezi NOAEL a LOAEL jsou často optimální dvojnásobné až čtyřnásobné intervaly. Často je vhodnější přidat čtvrtou experimentální skupinu než použít velmi velký interval (např. odpovídající faktoru většímu než 10) mezi dávkami.

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

▼M5

Limitní zkouška

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

POSTUPY

Expozice potomstva

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

Plán dávkování a podávání dávek

26. Z předchozích studií toxicity při opakovaném dávkování, které měly adekvátní trvání, mohou být k dispozici určité informace o estrálních cyklech, histopatologických vyšetřeních samčího a samičího pohlavního ústrojí a analýze varlat/epididymálních spermií. Délka expozice před pářením v rámci rozšířené jednogenerační studie toxicity pro reprodukci se tudíž zaměřuje na odhalení účinků na funkční změny, které mohou zasáhnout do způsobu chování při páření a do oplodnění. Expozice před pářením by měla být dostatečně dlouhá kvůli tomu, aby bylo dosaženo stálých podmínek expozice u samců i samic P generace. Ve většině případů se za adekvátní pro obě pohlaví považuje dvoutýdenní expozice před pářením. U samic zahrnuje tři až čtyři celé estrální cykly a měla by stačit k odhalení jakýchkoli negativních účinků na cykly. U samců toto trvání odpovídá době požadované pro epididymální přechod zrajících spermií a mělo by umožnit odhalení posttestikulárních účinků na spermie při páření (během konečných stadií spermiace a epididymálního zrání spermií). V době utracení, kdy je naplánováno histopatologické vyšetření varlat a nadvarlat a analýza parametrů spermií, budou samci P a F_1 generace mít za sebou expozici pro nejméně jeden celý spermatogenní proces ((6) (7) (8) (9) a pokyn OECD č. 151 (40)).

▼**M5**

27. Scénáře expozice samců před pářením lze přizpůsobit, pokud v předchozích studiích byla jasně identifikována toxicita pro varlata (zhoršení spermatogeneze) nebo účinky na integritu a funkci spermatu. Podobně i u samic mohou známé účinky zkoušené chemické látky na estrální cyklus, a tudíž i pohlavní citlivost odůvodnit různé scénáře expozice před pářením. Ve zvláštních případech lze akceptovat, aby aplikace u samic P generace byla zahájena až po získání stěru pozitivního na spermie (viz pokyn OECD č. 151 (40)).

28. Po stanovení období podávání dávek před pářením by měla být zvířatům zkoušená chemická látka podávána nepřetržitě po dobu sedmi dnů v týdnu až do pitvy. Všem zvířatům by měly být dávky podávány stejným způsobem. Podávání dávek by mělo pokračovat během dvoutýdenního páření a u samic P generace po dobu gestace a laktace až do jejich utracení po odstavení mláďat. U samců by aplikace měla probíhat stejným způsobem až do utracení v době, kdy jsou zvířata F_1 generace odstavena. U pitvy by přednost měla být dána samicím, které by měly být pitvány ve stejném/přibližně stejném dni laktace. Pitvu samců lze v závislosti na laboratorních možnostech rozložit na dobu většího počtu dnů. Nebylo-li přímé podávání dávek vybraným samcům a samicím F_1 generace zahájeno již během období laktace, mělo by začít při odstavení a mělo by pokračovat až do naplánované pitvy v závislosti na zařazení do kohorty.

29. U chemických látek podávaných v potravě nebo v pitné vodě je důležité zajistit, aby množství použité zkoušené chemické látky neovlivňovalo normální výživu nebo vodní rovnováhu. Pokud je zkoušená chemická látka podávána v potravě, lze uplatňovat buď konstantní koncentraci v potravě (ppm) nebo konstantní úroveň dávek z hlediska tělesné hmotnosti zvířete; vybraná možnost by měla být specifikována.

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

▼M5

Páření

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

Velikost vrhu

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

Výběr mláďat pro studie po odstavení (viz obrázek 1)

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

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

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

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

kohorta 3 = zkoušení vývojové imunotoxicity.

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

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

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

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

▼M5

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

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

Druhé páření zvířat P generace

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

POZOROVÁNÍ ŽIVÝCH ZVÍŘAT

Poznatky z klinického pozorování

36. U zvířat P generace a vybraných zvířat F_1 generace se všeobecné klinické pozorování provádí jednou denně. V případě podávání dávek žaludeční sondou by klinické pozorování mělo proběhnout před podáním a po podání dávky (za účelem zjištění případných známek toxicity spojených se špičkovou koncentrací plazmy). Zaznamenají se významné změny chování, známky ztíženého nebo prodlužovaného vrhu a všechny příznaky toxicity. Dvakrát denně, o víkendech jednou denně, se provede vyšetření všech zvířat za účelem zjištění závažné toxicity, morbidity a mortality.

37. Navíc se jednou týdně provede podrobnější vyšetření všech zvířat P a F_1 generace (po odstavení), přičemž toto vyšetření lze příhodně provádět při vážení zvířete, což by minimalizovalo stres z manipulace. Pozorování by měla být prováděna pečlivě a měla by být zaznamenávána pomocí systémů hodnocení, které byly definovány zkušební laboratoří. Je třeba se pokusit zajistit, aby rozdíly mezi podmínkami zkoušek byly minimální. Vyšetření by mělo mimo jiné zahrnovat změny kůže, srsti, očí a sliznic, výskyt sekretů a exkretů a vegetativních funkcí (např.slzení, zježení srsti, velikost zornic, nezvyklé dýchání). Zaznamenávat by se měly změny chůze, polohy a reakce na manipulaci, dále přítomnost klonických a tonických pohybů, stereotypů v chování (např.vytrvalých čistících pohybů nebo opakovaného kroužení) nebo bizarního chování (např.sebepoškozování, pohybu pozpátku).

▼M5

Tělesná hmotnost a spotřeba potravy a vody

38. Zvířata P generace jsou vážena první den podání dávky a poté nejméně jednou týdně. Kromě toho jsou samice P generace váženy během laktace ve stejné dny, ve které probíhá vážení mláďat z jejich vrhů (viz odstavec 44). Všechna zvířata F_1 generace jsou vážena individuálně při odstavení (PND 21) a poté nejméně jednou týdně. Tělesná hmotnost je také zaznamenána v den, kdy dosáhnou puberty (dokončení odloučení předkožky nebo vaginální průchodnost). Všechna zvířata jsou vážena při utracení.

39. Během studie je nejméně jednou týdně ve stejné dny jako vážení tělesné hmotnosti zvířat (s výjimkou období kohabitace) zaznamenávána spotřeba potravy a vody (v případě podávání zkoušené chemické látky v pitné vodě). Spotřeba potravy v každé kleci zvířat F_1 generace je počínaje výběrem do příslušné kohorty zaznamenávána jednou týdně.

Estrální cykly

40. Předběžné informace o účincích zkoušené chemické látky na estrální cyklus mohou být k dispozici již z předchozích studií toxicity při opakovaném dávkování a lze je použít při sestavování zkušebního postupu specifického pro zkoušenou chemickou látku, který se týká rozšířené jednogenerační studie toxicity pro reprodukci. Hodnocení estrálních cyklů (při vaginální cytologii) začne zpravidla na začátku období expozice a bude pokračovat až do potvrzení páření nebo do konce dvoutýdenního období páření. Pokud před aplikací proběhl screening samic z hlediska normálního estrálního cyklu, je pak vhodné pokračovat se stěry i po zahájení aplikace. Pokud však existuje podezření na nespecifické účinky při zahájení expozice (např. počáteční výrazné snížení spotřeby potravy), může být zvířatům dána možnost adaptace na expozici po dobu až dvou týdnů před zahájením dvoutýdenního období odběru stěrů trvajícího až do páření. Pokud je období expozice látce samicím takto prodlouženo (tj. na čtyřtýdenní aplikaci před pářením), měl by být zvážen nákup mladších zvířat a prodloužení období expozice samců před pářením. Při získávání vaginálních/cervikálních buněk je třeba neporušit sliznice a následně tak nevyvolat stav falešné březosti (10) (11).

41. Vaginální stěry by měly být od začátku vaginální průchodnosti zkoumány každý den u všech samic F_1 generace v kohortě 1 A, dokud nebude zaznamenán první stěr zrohovatělých buněk, aby bylo možno určit časový interval mezi těmito dvěma událostmi. Estrální cykly všech samic F_1 generace v kohortě 1 A by měly být monitorovány po dobu dvou týdnů, a to přibližně od PND 75. Kromě toho, bude-li nutné páření F_1 generace, bude po období spárování až okamžiku odhalení důkazů o spáření následovat vaginální cytologie v kohortě 1B.

Páření a březost

42. Kromě standardních ukazatelů (např. tělesná hmotnost, spotřeba potravy, klinická pozorování včetně kontroly mortality/morbidity), jsou zaznamenána data páření, datum oplodnění a datum vrhu a vypočítá se prekoitální interval (páření až oplodnění) a trvání březosti (oplodnění až vrh). Samice P generace by měly být v době očekávaného vrhu pečlivě prohlédnuty, zda nevykazují známky dystokie. Měly by být zaznamenány jakékoli anomálie při tvorbě hnízda nebo péči o mláďata.

▼M5

43. Den, kdy dojde k vrhu, je pro samici nultý den laktace (LD 0) a pro potomstvo nultý postnatální den (PND 0). Případně mohou veškerá srovnání vycházet také z postkoitální doby, aby se eliminovaly nejasnosti v údajích o postnatálním vývoji na základě rozdílů v trvání březosti; mělo by být však zaznamenáno i načasování v souvislosti s vrhem. To je důležité zejména tehdy, když zkoušená chemická látka vykazuje vliv na trvání březosti.

Parametry potomstva

44. Vrhy se vyšetří co nejdříve po vrhu (PND 0 nebo 1), aby bylo možno stanovit počet a pohlaví mláďat, počet mrtvě a živě narozených mláďat a přítomnost nápadných anomálií (z vnějšku patrné anomálie, mezi něž patří rozštěp patra, podkožní krevní výrony, abnormální barva nebo textura kůže, přítomnost pupeční šňůry, nedostatek mléka v žaludku, přítomnost suchých sekretů). Kromě toho první klinické vyšetření novorozených mláďat zahrnuje kvalitativní hodnocení tělesné teploty, stav aktivity a reakci na manipulaci. Mláďata, která byla nalezena mrtvá v PND 0 nebo později, se vyšetří na možné defekty a příčinu smrti. Živá mláďata se spočítají, každé se zváží v PND 0 nebo PND 1 a poté v pravidelných intervalech, např. alespoň v PND 4, 7, 14 a 21. Klinické vyšetření dle stáří zvířat se zopakuje při vážení potomstva nebo častěji, pokud byly při narození učiněny specifické nálezy. Zaznamenané příznaky by mohly mimo jiné zahrnovat externí anomálie, změny kůže, srsti, očí, sliznic, výskyt sekretů a exkretů a vegetativních funkcí. Zaznamenávat by se měly změny chůze, polohy a reakce na manipulaci, dále přítomnost klonických a tonických pohybů, stereotypů v chování nebo bizarního chování.

45. U každého mláděte je třeba nejméně jednou v době od PND 0 do PND 4 změřit anogenitální vzdálenost (AGD). V den měření AGD by měla být zjištěna tělesná hmotnost mláděte a AGD by měla být normalizována na nějakou míru velikosti mláďat, nejlépe třetí odmocninu tělesné hmotnosti (12). V PND 12 nebo 13 se zkontroluje přítomnost bradavek/prsních dvorců u mladých samců.

46. Všechna vybraná zvířata F_1 generace jsou každý den posuzována z hlediska odpojení předkožky u samců nebo vaginální prostupnosti u samic, anebo tato pozorování mohou započít před dnem, kdy se očekává dosažení těchto ukazatelů, aby se zjistilo, zda pohlavní zralost nastane brzy. Zaznamenají se jakékoli anomálie pohlavních orgánů, jako je perzistentní vaginální vlákno, hypospadie nebo rozštěp penisu. Pohlavní zralost zvířat F_1 generace je porovnána s fyzickým vývojem při určení stáří a tělesné hmotnosti v případě odpojení předkožky u samců nebo vaginální prostupnosti u samic (13).

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

47. Pro posouzení neurotoxicity se použije deset samců a deset samic z kohorty 2 A a deset samců a deset samic z kohorty 2B z každé experimentální skupiny (za každou kohortu: jeden samec nebo jedna samice z vrhu; všechny vrhy zastoupené nejméně jedním mladým jedincem; náhodný výběr). U zvířat z kohorty 2 A jsou posuzovány reakce na nečekané zvukové podněty, je provedena funkční pozorovací baterie, je provedeno vyšetření motorické činnosti (viz odstavce 48–50) a neuropatologická vyšetření (viz odstavce 74–75). Je třeba zajistit, aby byly rozdíly ve zkušebních podmínkách jen minimální a nesouvisely systematicky s aplikací. Mezi proměnnými, které mohou ovlivnit chování, jsou hladina zvuku (např. přerušovaný hluk), teplota, vlhkost, osvětlení, zápachy, denní

▼M5

doba a odchylky v životním prostředí. Výsledky zkoušek neurotoxicity by měly být interpretovány v souvislosti s náležitými historickými kontrolními referenčními rozmezími. Zvířata kohorty 2B by měla být použita k neuropatologickému posouzení v PND 21 nebo 22 (viz odstavce 74–75).

48. Zkouška odezvy na nečekané zvukové podněty se provede v PND 24 (± 1 den) na zvířatech z kohorty 2 A. Den zkoušek by měl být rovnoměrně rozložen napříč skupinami, jimž je podávána daná chemická látka, a kontrolními skupinami. Každá sekce je tvořena 50 pokusy. Při provádění zkoušky reakce na nečekané zvukové podněty se stanoví střední reakční amplituda v každém bloku deseti pokusů (pět bloků o deseti pokusech), přičemž zkušební podmínky by měly být optimalizovány tak, aby byla zajištěna habituace uvnitř sekce. Tyto postupy by měly být konzistentní se zkušební metodou B.53 (35).

49. Ve vhodnou dobu mezi PND 63 a PND 75 jsou zvířata z kohorty 2 A podrobena funkční pozorovací baterii a automatizované zkoušce motorické činnosti. Tyto postupy by měly být konzistentní se zkušebními metodami B.43 (33) a B.53 (35). Součástí funkční pozorovací baterie je důkladný popis vzhledu, chování a funkční integrity subjektu. Tyto parametry se hodnotí na základě pozorování v chovné kleci, po přesunu do standardního pozorovacího prostoru (otevřený prostor), kde se zvíře pohybuje volně, a při manipulačních zkouškách. Při zkouškách se postupuje od té nejméně až po tu nejvíce interaktivní. Seznam sledovaných parametrů je uveden v dodatku 1. Všechna zvířata by měla být pečlivě pozorována zkušenými pracovníky, kteří nemají informaci o skupině, do které zvíře patří, za použití standardizovaných postupů, které by měly minimalizovat variabilitu způsobenou pozorovatelem. Doporučuje se, aby zvířata hodnotila v dané zkoušce pokud možno tatáž osoba. Není-li to možné, je potřebné mít nějaký odhad spolehlivosti mezi osobami provádějících vyšetření. U každého parametru funkční pozorovací baterie se používají explicitní definované stupnice a kritéria hodnocení. Pro ukazatele, kde se používá subjektivní posouzení, je třeba definovat objektivní kvantitativní kritéria. V případě motorické činnosti je každé zvíře testováno individuálně. Zkouška by měla trvat dostatečně dlouho na to, aby u kontrolní skupiny mohla být prokázána habituace v rámci sekce. Motorická činnost se monitoruje pomocí zařízení pro automatický záznam aktivity, které je schopno odhalit nárůst i pokles aktivity (tj. základní aktivita změřená zařízením by neměla být tak nízká, aby bylo vyloučeno odhalení poklesů, ani tak vysoká, aby bylo vyloučeno odhalení nárůstu činnosti). Každé zařízení by mělo být otestováno standardními postupy, aby byla v možném rozsahu zajištěna spolehlivost provozu zařízení v příslušné dny. Pokud jde o zařízení, experimentální skupiny by měly být co nejvyváženější. Experimentální skupiny by měly být vyváženě zastoupeny ve zkušebních časech, aby se předešlo zkreslení denním rytmem činnosti.

50. Pokud stávající informace naznačují potřebu dalších funkčních zkoušek (např. smyslových, sociálních, kognitivních), měly by takové zkoušky být zařazeny tak, aby nebyla ohrožena integrita ostatních hodnocení prováděných v rámci studie. Pokud jsou tyto zkoušky prováděny u stejných zvířat, u kterých byly prováděny standardní zkoušky reakce na nečekané zvukové podněty, hodnocení funkční pozorovací baterie a zkoušky motorické činnosti, měly by být naplánovány jiné zkoušky, aby se minimalizovalo riziko ohrožení integrity těchto zkoušek. Pokud empirické pozorování, předpokládané účinky nebo mechanismus/způsob účinku naznačují specifický typ neurotoxicity, mohou být obzvláště užitečné doplňující postupy.

▼M5

Posouzení potenciální vývojové imunotoxicity (kohorta 3)

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

Následné hodnocení potenciální toxicity pro reprodukci (kohorta 1B)

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

KONEČNÁ POZOROVÁNÍ

Klinická biochemická/hematologická vyšetření

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

▼M5

následující parametry: vzhled, objem, osmolalita nebo hustota, pH, přítomnost bílkovin, glukózy, krve a krvinek, buněčné zbytky. Moč lze také odebrat pro účely monitorování vylučování zkoušené chemické látky a/nebo metabolitu/ů.

54. U zvířat F_1 generace se sledují systémové účinky. Při utracení jsou deseti náhodně vybraným samcům a samicím z kohorty 1 A z každé dávkové skupiny odebrány nalačno krevní vzorky z definovaného místa, které jsou uloženy za vhodných podmínek a podrobeny standardnímu klinickému biochemickému vyšetření, včetně posouzení sérových hladin hormonů štítné žlázy (T4 a TSH), hematologického vyšetření (celkový a diferenciální počet leukocytů a počet erytrocytů) a vyšetření moči.

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

Parametry spermatu

56. Parametry spermatu se změří u všech samců P generace, pokud dostupné údaje neukazují, že během devadesátidenní studie parametry spermií nebyly postiženy. Parametry spermií se zkoumají u všech samců z kohorty 1 A.

57. Při ukončení studie je u všech samců P a F_1 generace (kohorta 1 A) zaznamenána hmotnost varlat a nadvarlat. Nejméně jedno varle a jedno nadvarle je vyhrazeno pro histopatologické vyšetření. Zbývající nadvarle se použije ke spočítání zásoby spermií v ocasu nadvarlete (16) (17). Kromě toho se z ocasu nadvarlete (nebo chámovodu) pro účely posouzení motility a morfologie spermií odebere sperma pomocí metod, které minimalizují poškození.

58. Motilitu spermií lze vyhodnotit buď bezprostředně po utracení, nebo lze provést záznam pro pozdější analýzu. Procento progresivně pohyblivých spermií se stanoví subjektivně, nebo objektivně pomocí počítačové analýzy pohyblivosti (19) (20) (21) (22) (23) (24). Pro účely hodnocení morfologie spermií se vzorky epididymálních spermií (nebo spermií z chámovodu) vyšetří jako fixované nebo vlhké (25) a (minimálně 200 na vzorek) klasifikují se jako normální (jako normální se jeví hlava i střední část/bičík), nebo abnormální. Příklady morfologických odchylek spermií zahrnují spojení, izolované hlavičky a zdeformované hlavičky a/nebo bičíky (26). Zdeformované nebo velké hlavičky spermií mohou poukazovat na defekty tvorby spermií.

59. Pokud jsou vzorky spermií při pitvě zmraženy, stěry zakonzervovány a pořízeny obrazové záznamy pro analýzu motility spermií (27), lze následnou analýzu omezit na kontrolní samce a na samce, jimž byly podávány vysoké dávky. Pokud se však zjistí účinky spojené s aplikací, je nutné zhodnotit i skupiny s nižšími dávkami.

▼M5

Celková pitva

60. Po utracení nebo uhynutí během studie jsou všechna zvířata P a F_1 generace podrobena pitvě a vyšetřena makroskopicky na jakékoliv strukturální anomálie anebo patologické změny. Speciální pozornost je třeba věnovat orgánům rozmnožovací soustavy. U mláďat, která jsou humánním způsobem utracena ve stavu agónie, a u mrtvých mláďat, která nejsou rozložena, se provede záznam o této skutečnosti a vyšetření za účelem zjištění možných defektů a/nebo příčiny uhynutí.

61. U samic P a F_1 generace se v den pitvy vyšetří vaginální stěr s cílem určit stadium estrálního cyklu a umožnit korelaci s histopatologickým vyšetřením pohlavních orgánů. Děloha všech samic P generace (a případně F_1) se vyšetří na přítomnost a počet zachycených vajíček v děloze způsobem, který nebude mít vliv na histopatologické hodnocení.

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

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

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

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

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

— semenné váčky s koagulačními žlázami a jejich tekutinami (jako jedna jednotka),

— mozek, játra, ledviny, slezina, brzlík, hypofýza, štítná žláza (po fixaci), nadledvinky a známé cílové orgány nebo tkáně.

63. Kromě orgánů uvedených výše se za vhodných podmínek uchovají vzorky periferního nervu, svalů, míchy, oka s očním nervem, trávicí soustavy, močového měchýře, plic, průdušnice (s připojenou štítnou žlázou a příštítnými tělísky), kostní dřeně, chámovodu (samci), prsní žlázy (samci a samice) a vaginy.

64. Všechny orgány zvířat kohorty 1 A se zváží a uchovají pro účely histopatologického vyšetření.

65. Pro účely zkoumání prenatálně a postnatálně indukovaných imunotoxických účinků bude deset samců a deset samic z kohorty 1 A z každé exponované skupiny (jeden samec nebo jedna samice z vrhu, všechny vrhy zastoupené nejméně jedním mladým jedincem; náhodný výběr) podrobeno při utracení následujícím krokům:

— vážení lymfatických uzlin spojených i nespojených se způsobem expozice (kromě hmotnosti nadledvinek, brzlíku a sleziny již zvážených u všech zvířat z kohorty 1 A),

▼M5

— analýza subpopulace lymfocytů ve slezině (CD4+ a CD8+ T lymfocyty, B lymfocyty a NK buňky) v jedné polovině sleziny, druhá polovina bude uložena pro histopatologické posouzení.

Analýza subpopulací lymfocytů ve slezině u neimunizovaných zvířat (kohorta 1 A) stanoví, zda expozice souvisí se změnou v imunologické rovnovážné distribuci „pomocných“ (CD4+) nebo cytotoxických (CD8+) lymfocytů odvozených z brzlíku nebo NK buněk (rychlé reakce na neoplastické buňky a patogeny).

66. U zvířat kohorty 1 A se zváží následující orgány a odpovídající tkáně se zpracují do stadia bločků:

— vagina (nevážená),

— děloha s děložním hrdlem,

— vaječníky,

— varlata (alespoň jedno),

— nadvarlata,

— semenné váčky a koagulační žlázy,

— prostata,

— hypofýza,

— určené cílové orgány.

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

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

Hmotnost orgánů a uchování tkání – odstavení potomci generace F_1

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

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

▼M5

Histopatologická vyšetření – zvířata P generace

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

Histopatologická vyšetření – zvířata F_1 generace

Zvířata kohorty 1

70. U všech dospělých zvířat kohorty 1 A z kontrolní skupiny a skupiny s vysokou dávkou je provedeno celkové histologické vyšetření orgánů vyjmenovaných v odstavcích 62 a 63. Všechny vrhy by měly být zastoupeny nejméně jedním mládětem od každého pohlaví. Na pomoc při určování NOAEL by u všech zvířat ze skupin s nižšími dávkami měly být vyšetřeny orgány a tkáně vykazující změny související s aplikací a všechny tkáně s výraznými lézemi. Pro hodnocení prenatálně a postnatálně indukovaných účinků na lymfatické orgány bude u deseti samců a deseti samic z kohorty 1 A provedeno vedle histopatologického hodnocení brzlíku, sleziny a nadledvinek, které bylo již provedeno u všech zvířat 1 A, také histopatologické vyšetření odebraných lymfatických uzlin a kostní dřeně.

71. V případě podezření na reprodukční nebo endokrinní toxikanty by měly být vyšetřeny reproduktivní a endokrinní tkáně všech zvířat kohorty 1B zpracované do stadia bločků, jak je uvedeno v odstavci 66. Zvířata kohorty 1B by také měla být podrobena histologickému vyšetření, pokud jsou výsledky z kohorty 1 A nejednoznačné.

72. Vaječníky dospělých samic by měly obsahovat primordiální a rostoucí folikuly i žlutá tělíska. Z tohoto důvodu by histopatologické vyšetření mělo být zaměřeno na kvantitativní hodnocení primordiálních a malých rostoucích folikulů i žlutých tělísek u samic F_1 generace. Je nutné mít statisticky odpovídající počet zvířat, výběr řezů vaječníků a velikost vzorků řezů pro použitý způsob hodnocení. Nejprve může být proveden výpočet počtu folikulů u zvířat z kontrolní skupiny a skupiny s vysokou dávkou a v případě nepříznivých účinků by měly být potom hodnoceny i skupiny s nižšími dávkami. Pro porovnání exponovaných a kontrolních vaječníků by měl být zjišťován počet primordiálních folikulů, což může být kombinováno s počítáním malých rostoucích folikulů (viz pokyn OECD č. 151 (40)). Posouzení žlutých tělísek je třeba provést souběžně s hodnocením estrálních cyklů, aby mohlo být při posouzení vzato v úvahu stadium cyklu. Vejcovod, děloha a vagina jsou vyšetřeny, zda u nich proběhl patřičný vývoj typický pro daný orgán.

73. U samců F_1 generace jsou provedena podrobná histopatologická vyšetření varlat s cílem identifikovat účinky související s aplikací na diferenciaci a vývoj varlat a na spermatogenezi (38). Pokud je to možné, měly by být vyšetřeny řezy sítí *rete testis*. Hlava, tělo a ocas nadvarlete a chámovod jsou vyšetřeny, zda u nich proběhl patřičný vývoj typický pro daný orgán, jakož i z hlediska parametrů požadovaných pro samce P generace.

▼M5

Zvířata kohorty 2

74. U všech zvířat skupiny s vysokou dávkou a u kontrolní skupiny z kohorty 2 A obou pohlaví se po dokončení neurobehaviorálních zkoušek (po PND 75, nejpozději však v PND 90) provede neurohistopatologické vyšetření. U všech zvířat skupiny s vysokou dávkou a u kontrolní skupiny z kohorty 2B obou pohlaví se v PND 21 nebo PND 22 provede histopatologické vyšetření mozku. Orgány nebo tkáně vykazující změny související s aplikací by měly být vyšetřeny u zvířat ze skupin s nižší dávkou s cílem pomoci při určování NOAEL. U zvířat kohorty 2 A a 2B je vyšetřeno více řezů mozku, aby bylo možno vyšetřit čichový bulbus, mozkovou kůru, hippocampus, bazální ganglia, thalamus, hypothalamus, střední mozek (tectum, tegmentum a pedunculi cerebrales), mozkový kmen a mozeček. Pouze u kohorty 2 A jsou vyšetřeny oči (sítnice a oční nerv) a vzorky periferního nervu, svalu a míchy. Všechny neurohistologické postupy by měly být konzistentní se zkušební metodou B.53 (35).

75. V reprezentativních částech mozku (homologické řezy pečlivě vybrané na základě spolehlivých mikroskopických vývojových znaků) by měla být provedena morfometrická (kvantitativní) hodnocení, která mohou zahrnovat lineární a/nebo plošná měření konkrétních částí mozku. Na každé úrovni by měly být provedeny nejméně tři po sobě jdoucí řezy s cílem vybrat co nejvíce homologní a reprezentativní řez pro konkrétní hodnocenou část mozku. Neuropatolog by měl náležitě posoudit, zda řezy připravené k měření jsou homologní s ostatními v souboru vzorků, a tudíž je vhodné je zahrnout, jelikož zejména lineární měření se mohou v relativně krátké vzdálenosti změnit (28). Neměly by se používat nehomologické řezy. Ačkoli cílem je odebrat vzorky všem zvířatům vyčleněným pro tento účel (10/pohlaví/úroveň dávky), mohou i přesto být adekvátní menší počty. Avšak vzorky od méně než šesti zvířat jednoho pohlaví a jedné dávky by pro účely této zkušební metody nebyly považovány za dostatečné. Pro identifikaci účinků souvisejících s aplikací na parametry, jako je objem nebo počet buněk pro konkrétní neuroanatomické oblasti, lze použít stereologii. Všechny aspekty přípravy vzorků tkání, od fixace tkáně, přes sekci vzorků tkání, zpracování tkání a obarvení preparátů, by měly být vyváženě organizovány tak, aby každá šarže obsahovala reprezentativní vzorky z každé dávkové skupiny. Když mají být provedeny morfometrické nebo stereologické analýzy, pak by měla být mozková tkáň zalita do příslušného média u všech dávkových skupin současně, aby se zamezilo vzniku artefaktů smrštěním, k čemuž dochází v souvislosti s dlouhým uchováváním ve fixativu.

PODÁVÁNÍ ZPRÁV

Údaje

76. Údaje jsou předkládány pro každé jednotlivé zvíře zvlášť a jsou shrnuty ve formě tabulek. Kde je to vhodné, jsou pro každou zkušební skupinu a každou generaci předkládány následující údaje: počet zvířat na začátku zkoušky, počet zvířat nalezených uhynulých v průběhu zkoušky nebo utracených z humánních důvodů a doba úmrtí nebo humánního utracení, počet plodných zvířat, počet březích samic, počet samic s vrhem a počet zvířat vykazujících příznaky toxicity. Měl by být uváděn i popis toxických příznaků, včetně doby nástupu, trvání a závažnosti.

77. Číselné výsledky by měly být pokud možno vyhodnoceny vhodnou a uznávanou statistickou metodou. Statistické metody se zvolí jako součást plánu studie a měly by náležitě hodnotit i údaje s jinou než normální distribucí (např. údaje o počtech), ohraničené údaje (např. omezený čas pozorování), závislost proměnných (např. účinky na vrh a opakovaná měření) a rozdílnost rozptylů. Generalizované lineární smíšené modely a modely závislosti účinku na dávce zahrnují širokou skupinu analytických nástrojů, které mohou být vhodné pro údaje vygenerované v rámci této zkušební metody. Zpráva by měla obsahovat dostatečné informace o použité metodě analýzy

▼M5

a počítačovém programu, aby mohl tuto analýzu vyhodnotit/znovu vyhodnotit nezávislý posuzovatel/statistik.

Vyhodnocení výsledků

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

Závěrečná zpráva

79. Závěrečná zpráva by měla obsahovat tyto údaje z provedené studie o zvířatech P a F_1 generace, popř. také F_2 generace:

Zkoušená chemická látka:

— veškeré dostupné informace o chemických, toxikokinetických a toxikodynamických vlastnostech zkoušené chemické látky,

— identifikační údaje,

— čistota.

Vehikulum (je-li použito):

— zdůvodnění výběru vehikula, pokud není použita voda.

Pokusná zvířata:

— použitý živočišný druh/kmen,

— počet, stáří a pohlaví zvířat,

— původ, podmínky chovu, strava, materiál na výrobu hnízda atd.,

— hmotnost jednotlivých zvířat na začátku zkoušky,

— údaje o vaginálních stěrech u samic P generace před zahájením aplikace (pokud byly stěry v tuto dobu prováděny),

— záznamy o párování zvířat P generace s uvedením samičího a samčího partnera a úspěch páření,

— u dospělých zvířat F_1 generace záznam o vrhu, ze kterého pocházejí.

Zkušební podmínky:

— zdůvodnění zvolených úrovní dávek,

— podrobné údaje o složení aplikační formy zkoušené chemické látky nebo o přípravě směsi s krmivem, o dosažené koncentraci,

▼M5

— stabilita a homogenita přípravku ve vehikulu nebo nosiči (*např.* strava, pitná voda), v krvi a/nebo mléku za podmínek použití a uložení mezi jednotlivými použitími,

— podrobnosti o způsobu podávání zkoušené chemické látky,

— v případě potřeby přepočet koncentrace zkoušené chemické látky (ppm) ve stravě/pitné vodě na skutečnou dávku (mg na kg tělesné hmotnosti na den), je-li to možné,

— podrobnosti o jakosti vody a potravy (včetně složení krmné směsi, je-li k dispozici),

— podrobný popis postupů randomizace při výběru mláďat pro třídění a rozdělení mláďat do zkušebních skupin,

— podmínky prostředí,

— seznam pracovníků provádějících zkoušky, včetně odborného školení.

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

— spotřeba potravy, spotřeba vody (je-li k dispozici), využití potravy (přírůstek tělesné hmotnosti na gram spotřebované potravy, kromě období kohabitace a laktace) a spotřeba zkoušené chemické látky (podle způsobu podávání potravy/pitné vody) u zvířat P a F_1 generace,

— údaje o absorpci (jsou-li k dispozici),

— údaje o tělesné hmotnosti zvířat P generace,

— údaje o tělesné hmotnosti u vybraných zvířat F_1 generace po odstavení,

— den úhynu během studie nebo údaj, že zvířata přežila až do dne utracení,

— povaha, závažnost a trvání klinických pozorování (zda příznaky jsou vratné, či ne),

— údaje o hematologickém vyšetření, vyšetření moči a klinickém chemickém vyšetření včetně TSH a T4,

— fenotypická analýza slezinných buněk (T, B, NK buňky),

— celularita kostní dřeně,

— údaje o toxických reakcích,

— počet samic P a F_1 generace s normálním nebo abnormálním estrálním cyklem a trváním cyklu,

— čas do páření (prekoitální interval, počet dnů mezi spárováním a spářením),

— toxické nebo jiné účinky na reprodukci, včetně počtu a procenta zvířat, která se spářila, jsou březí, vrhla a mají laktaci, samců, kteří přivodili březost, samic se známkami dystokie/prodlužovaného nebo ztíženého vrhu,

— trvání březosti, a proběhl-li, údaj o vrhu,

— počty implantovaných plodů, velikost vrhu a procento samčích mláďat,

— počet a procento postimplantačních ztrát, živě a mrtvě narozených mláďat,

▼M5

— údaje o hmotnosti vrhu a hmotnosti mláďat (samci, samice a dohromady), počet zakrslých mláďat, byl-li stanoven,

— počet mláďat s nápadnými strukturálními abnormalitami,

— toxické nebo jiné účinky na potomstvo, postnatální růst, životaschopnost apod.,

— údaje o fyzických vývojových milnících u mláďat a další údaje o postnatálním vývoji,

— údaje o pohlavní zralosti zvířat F_1 generace,

— případně údaje o funkčním pozorování mláďat a dospělých zvířat,

— tělesná hmotnost při utracení a údaje o absolutní a relativní hmotnosti orgánů u zvířat P generace a dospělých zvířat F_1 generace,

— pitevní nálezy,

— podrobný popis všech histopatologických nálezů,

— celkový počet kaudálních epididymálních spermií, procento progresivně pohyblivých spermií, procento morfologicky normálních spermií a procento spermií se všemi identifikovanými anomáliemi u samců P a F_1 generace,

— případně počty a maturační stadia folikulů ve vaječnících u samic P a F_1 generace,

— generace výpočet počtu žlutých tělísek ve vaječnících samic F_1 generace,

— statistické vyhodnocení výsledků, kde je to možné.

Parametry kohorty 2:

— Podrobný popis postupů použitých ke standardizaci pozorování a postupů, jakož i definice pro hodnocení s použitím skóre,

— seznam všech použitých zkušebních postupů a odůvodnění jejich použití,

— podrobnosti o behaviorálních/funkčních, neuropatologických a morfometrických postupech, včetně informací a podrobností o automatických zařízeních,

— postupy pro kalibraci a zajištění ekvivalence u těchto zařízení a proporcionálním složení experimentálních skupin při zkušebních postupech,

— krátké odůvodnění vysvětlující jakákoli rozhodnutí zahrnující profesní úsudek,

— podrobný popis všech behaviorálních/funkčních, neuropatologických a morfometrických nálezů ve skupinách podle pohlaví a podle dávky, včetně nárůstu a poklesů u kontrolních skupin,

— hmotnost mozku,

— jakékoli diagnózy odvozené od neurologických známek a lézí, včetně přirozeně se vyskytujících chorob nebo podmínek,

— optické záznamy typických nálezů,

— optické záznamy s nízkofrekvenčními filtry pro posouzení shodnosti řezů použitých k morfometrii,

▼M5

— statistické zpracování výsledků, včetně statistických modelů použitých k analýze údajů a výsledků bez ohledu na to, zda jsou významné či nikoli,

— význam jakýchkoliv dalších toxických účinků pro závěry týkající se neurotoxického potenciálu zkoušené chemické látky, ve skupinách podle pohlaví a podle dávky,

— vliv jakýchkoli toxikokinetických údajů na závěry,

— údaje podporující spolehlivost a citlivost zkušební metody (*tj.* pozitivní a historické kontrolní údaje),

— vztahy, existují-li, mezi neuropatologickými a funkčními účinky,

— NOAEL nebo referenční dávka pro samice a potomstvo podle pohlaví a dávkové skupiny,

— diskuse o celkové interpretaci údajů na základě výsledků, včetně závěru, zda daná chemická látka způsobila vývojovou neurotoxicitu či nikoli, a NOAEL.

Parametry kohorty 3:

— titry protilátek IgM v séru (senzibilizace na SRBC nebo KLH) nebo PFC jednotky IgM ve slezině (senzibilizace na SRBC),

— správné provádění metody TDAR by mělo být u laboratoře, která vykonává zkoušku poprvé, prokázáno v procesu optimalizace metody, u všech laboratoří pak pravidelně (např. jednou ročně),

— diskuse o celkové interpretaci údajů na základě výsledků, včetně závěru, zda daná chemická látka způsobila vývojovou imunotoxicitu či nikoli, a NOAEL.

Diskuse o výsledcích

Závěry včetně hodnot NOAEL pro účinky na rodiče a potomstvo

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

Interpretace výsledků

80. Rozšířená jednogenerační studie toxicity pro reprodukci poskytne v případě potřeby informace o účincích opakované expozice chemické látce během všech fází reprodukčního cyklu. Studie zejména poskytne informace o reprodukčním systému a o vývoji, růstu, přežití a funkčních ukazatelích potomstva do PND 90.

81. Při interpretaci výsledků studie by měly být vzaty v úvahu všechny dostupné informace o chemické látce, včetně fyzikálně-chemických, toxikokinetických a toxikodynamických vlastností, dostupné podstatné informace o analogických strukturách a výsledky předchozích studií toxicity se zkoušenou chemickou látkou (např. akutní toxicita, toxicita po opakovaném podání, mechanistické studie a studie posuzující, zda existují podstatné kvalitativní a kvantitativní rozdíly mezi druhy, pokud jde o metabolické procesy *in vivo* a *in vitro*). Je-li to proveditelné, zhodnotí se výsledky celkové pitvy a hmotnosti orgánů v souvislosti s výsledky zjištěnými v jiných studiích s opakovaným dávkováním. Při zpomalení růstu u potomstva by mohl být brán v úvahu vliv zkoušené chemické látky na složení mléka (29).

▼M5

Kohorta 2 (vývojová neurotoxicita)

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

Kohorta 3 (vývojová imunotoxicita)

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

84. Jako pomůcka při interpretaci výsledků v oblasti reprodukce a neurotoxicity by měl posloužit pokyn OECD č. 43 (26).

LITERATURA

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

2) Thigpen, J.E., K.D.R. Setchell, K.B. Ahlmark, J. Locklear, T. Spahr, G.F. Leviness, M.F. Goelz, J.K. Haseman, R.R. Newbold, and D.B. Forsythe (1999), 'Phytoestrogen Content of Purified Open and Closed Formula Laboratory Animal Diets', *Lab. Anim. Sci.*, 49, 530–536.

3) Zoetis, T. and I. Walls (2003), Principles and Practices for Direct Dosing of Pre-Weaning Mammals in Toxicity Testing and Research, ILSI Press, Washington, DC.

4) Moser, V.C., I. Walls and T. Zoetis (2005), 'Direct Dosing of Preweaning Rodents in Toxicity Testing and Research: Deliberations of an ILSI RSI Expert Working Group', International Journal of Toxicology, 24, 87–94.

5) Conolly, R.B., B.D. Beck, and J.I. Goodman (1999), 'Stimulating Research to Improve the Scientific Basis of Risk Assessment', *Toxicological Sciences*, 49, 1–4.

6) Ulbrich, B. and A.K. Palmer (1995), 'Detection of Effects on Male Reproduction – a Literature Survey', *Journal of the American College of Toxicologists*, 14, 293–327.

7) Mangelsdorf, I., J. Buschmann and B. Orthen (2003), 'Some Aspects Relating to the Evaluation of the Effects of Chemicals on Male Fertility', *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 37, 356–369.

▼**M5**

8) Sakai, T., M. Takahashi, K. Mitsumori, K. Yasuhara, K. Kawashima, H. Mayahara and Y. Ohno (2000). 'Collaborative work to evaluate toxicity on male reproductive organs by repeated dose studies in rats – overview of the studies', *Journal of Toxicological Sciences*, 25, 1–21.

9) Creasy, D.M. (2003), 'Evaluation of Testicular Toxicology: A Synopsis and Discussion of the Recommendations Proposed by the Society of Toxicologic Pathology', *Birth Defects Research*, Part B, 68, 408–415.

10) Goldman, J.M., A.S. Murr, A.R. Buckalew, J.M. Ferrell and R.L. Cooper (2007), 'The Rodent Estrous Cycle: Characterization of Vaginal Cytology and its Utility in Toxicological Studies', *Birth Defects Research*, Part B, 80 (2), 84–97.

11) Sadleir, R.M.F.S. (1979), 'Cycles and Seasons', in C.R. Auston and R.V. Short (eds.), *Reproduction in Mammals: I. Germ Cells and Fertilization*, Cambridge, New York.

12) Gallavan, R.H. Jr, J.F. Holson, D.G. Stump, J.F. Knapp and V.L. Reynolds (1999), 'Interpreting the Toxicologic Significance of Alterations in Anogenital Distance: Potential for Confounding Effects of Progeny Body Weights', *Reproductive Toxicology,* 13: 383–390.

13) Korenbrot, C.C., I.T. Huhtaniemi and R.I. Weiner (1977), 'Preputial Separation as an External Sign of Pubertal Development in the Male Rat', *Biological Reproduction*, 17, 298–303.

14) Ladics, G.S. (2007), 'Use of SRBC Antibody Responses for Immunotoxicity Testing', *Methods*, 41, 9–19.

15) Gore, E.R., J. Gower, E. Kurali, J.L. Sui, J. Bynum, D. Ennulat and D.J. Herzyk (2004), 'Primary Antibody Response to Keyhole Limpet Hemocyanin in Rat as a Model for Immunotoxicity Evaluation', *Toxicology*, 197, 23–35.

16) Gray, L.E., J. Ostby, J. Ferrell, G. Rehnberg, R. Linder, R. Cooper, J. Goldman, V. Slott and J. Laskey (1989), 'A Dose-Response Analysis of Methoxychlor-Induced Alterations of Reproductive Development and Function in the Rat', *Fundamental and Applied Toxicology*, 12, 92–108.

17) Robb, G.W., R.P. Amann and G.J. Killian (1978), 'Daily Sperm Production and Epididymal Sperm Reserves of Pubertal and Adult Rats', *Journal of Reproduction and Fertility*,54, 103–107.

18) Klinefelter, G.R., L.E. Jr Gray and J.D. Suarez (1991), 'The Method of Sperm Collection Significantly Influences Sperm Motion Parameters Following Ethane Dimethanesulfonate Administration in the Rat'. *Reproductive Toxicology*,5, 39–44.

19) Seed, J., R.E. Chapin, E.D. Clegg., L.A. Dostal, R.H. Foote, M.E. Hurtt, G.R. Klinefelter, S.L. Makris, S.D. Perreault, S. Schrader, D. Seyler, R. Sprando, K.A. Treinen, D.N. Veeramachaneni and L.D. Wise (1996), 'Methods for Assessing Sperm Motility, Morphology, and Counts in the Rat, Rabbit, and Dog: a Consensus Report', *Reproductive Toxicology*, 10, 237–244.

20) Chapin, R.E., R.S. Filler, D. Gulati, J.J. Heindel, D.F. Katz, C.A. Mebus, F. Obasaju, S.D. Perreault, S.R. Russell and S. Schrader (1992), 'Methods for Assessing Rat Sperm Motility', *Reproductive Toxicology*, 6, 267–273.

21) Klinefelter, G.R., N.L. Roberts and J.D. Suarez (1992), 'Direct Effects of Ethane Dimethanesulphonate on Epididymal Function in Adult Rats: an *In Vitro* Demonstration', *Journal of Andrology*, 13, 409–421.

22) Slott, V.L., J.D. Suarez and S.D. Perreault (1991), 'Rat Sperm Motility Analysis: Methodologic Considerations', *Reproductive Toxicology*, 5, 449–458.

▼**M5**

23) Slott, V.L., and S.D. Perreault (1993), ‘Computer-Assisted Sperm Analysis of Rodent Epididymal Sperm Motility Using the Hamilton-Thorn Motility Analyzer’, *Methods in Toxicology, Part A*, Academic, Orlando, Florida. s. 319–333.

24) Toth, G.P., J.A. Stober, E.J. Read, H. Zenick and M.K. Smith (1989), ‘The Automated Analysis of Rat Sperm Motility Following Subchronic Epichlorhydrin Administration: Methodologic and Statistical Considerations’, *Journal of Andrology*, 10, 401–415.

25) Linder, R.E., L.F. Strader, V.L. Slott and J.D. Suarez (1992), ‘Endpoints of Spermatoxicity in the Rat After Short Duration Exposures to Fourteen Reproductive Toxicants’, *Reproductive Toxicology*, 6, 491–505.

26) OECD (2008), *Guidance Document on Mammalian Reproductive Toxicity Testing and Assessment*, Series on Testing and Assessment, No. 43, ENV/JM/MONO(2008)16, OECD, Paris.

27) Working, P.K., M. Hurtt (1987), ‘Computerized Videomicrographic Analysis of Rat Sperm Motility’ *Journal of Andrology*, 8, 330–337.

28) Bolin, B., R. Garman, K. Jensen, G. Krinke, B. Stuart, and an ad Hoc Working Group of the STP Scientific and Regulatory Policy Committee (2006), ‘A 'Best Practices' Approach to Neuropathologic Assessment in Developmental Neurotoxicity Testing – for Today’, *Toxicological Pathology*, 34, 296–313.

29) Stütz, N., B. Bongiovanni, M. Rassetto, A. Ferri, A.M. Evangelista de Duffard, and R. Duffard (2006), ‘Detection of 2,4-dichlorophenoxyacetic Acid in Rat Milk of Dams Exposed During Lactation and Milk Analysis of their Major Components’, *Food Chemicals Toxicology*, 44, 8–16.

30) Thigpen, JE, K.D.R. Setchell, J.K. Haseman, H.E. Saunders, G.F. Caviness, G.E. Kissling, M.G. Grant and D.B. Forsythe (2007), ‘Variations in Phytoestrogen Content between Different Mill Dates of the Same Diet Produces Significant Differences in the Time of Vaginal Opening in CD-1 Mice and F344 Rats but not in CD Sprague Dawley Rats’, *Environmental health perspectives,* 115(12), 1717–1726.

31) Tyl, R.W., K. Crofton, A. Moretto, V. Moser, L.P. Sheets and T.J. Sobotka (2008), ‘Identification and Interpretation of Developmental Neurotoxicity Effects: a Report from the ILSI Research Foundation/Risk Science Institute Expert Working Group on Neurodevelopmental Endpoints’, *Neurotoxicology and Teratology*, 30: 349–381.

32) OECD (1996), *Combined Repeated Dose Toxicity Study with the Reproduction/Developmental Toxicity Screening Test*, OECD Guideline for Testing of Chemicals, No. 422, OECD, Paris.

33) Kapitola B.43 této přílohy, Studie neurotoxicity na hlodavcích.

34) OECD (2000), *Guidance Document on the recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluations*, Series on Testing and Assessment, No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris.

35) Kapitola B.53 této přílohy, Studie vývojové neurotoxicity.

36) Kapitola B.54 této přílohy, Uterotrofní biologická zkouška na hlodavcích: Krátkodobá screeningová zkouška estrogenních vlastností.

37) Kapitola B.55 této přílohy, Hershbergerova biologická zkouška na potkanech: Krátkodobá screeningová zkouška androgenních/antiandrogenních vlastností.

▼**M5**

38) OECD (2009), Guidance Document for Histologic Evalution of Endocrine and Reproductive Test in Rodents, Series on Testing and Assessment, No. 106, OECD, Paris.

39) OECD (2011), Guidance Document on the Current Implementation of Internal Triggers in the Extended One Generation Reproductive Toxicity Study in the United States and Canada, Series on Testing and Assessment, No. 117, ENV/JM/MONO(2011)21, OECD, Paris.

40) OECD (2013), Guidance Document supporting TG 443: Extended One Generation Reproductive Toxicity Study, Series on Testing and Assessment, No. 151, OECD, Paris.

▼**M5**

Dodatek 1

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

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

▼**M5**

Dodatek 2

DEFINICE

Chemická látka: látka nebo směs.

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

▼M5

B.57 ZKOUŠKA STEROIDOGENEZE H295R

ÚVOD

1. Tato zkušební metoda je rovnocenná pokynu OECD pro zkoušení (TG) 456 (2011). V roce 1998 zahájila OECD činnost vysoké priority, jejíž podstatou je revize stávajících a vytvoření nových pokynů pro screening a zkoušení potenciálních endokrinních disruptorů. Koncepční rámec OECD z roku 2002 pro zkoušení a posuzování endokrinních disruptorů je tvořen pěti úrovněmi, které odpovídají různým úrovním biologické komplexnosti (1). Zkouška steroidogeneze *in vitro* H295R (zkouška H295R) popsaná v této zkušební metodě využívá lidskou buněčnou linii adrenálního karcinomu (buňky NCI-H295R) a představuje úroveň 2 koncepčního rámce: „zkoušky *in vitro* poskytující mechanistické údaje“ pro účely screeningu a stanovení priorit. Vývoj a standardizace zkoušky jako screeningu pro chemické účinky na steroidogenezi, konkrétně na produkci estradiolu (E2) a testosteronu (T), proběhly formou vícestupňového procesu. Zkouška H295R byla optimalizována a validována (2) (3) (4) (5).

2. Cílem zkoušky steroidogeneze H295R je odhalit chemické látky, které mají vliv na produkci hormonů E2 a T. Cílem zkoušky H295R je identifikovat xenobiotika, která mají jako své cílové místo, případně cílová místa, endogenní složky, které zahrnují nitrobuněčnou biochemickou dráhu začínající řadou reakcí počínaje cholesterolem až po produkci E2 a/nebo T. Účelem zkoušky H295R není identifikovat chemické látky, které mají vliv na steroidogenezi z důvodu účinků na osu hypotalamus – hypofýza – pohlavní žlázy (HPG). Cílem zkoušky je poskytnout odpověď ANO/NE, pokud jde o potenciál chemické látky vyvolávat nebo tlumit produkci hormonů T a E2. V některých případech však mohou být získány kvantitativní výsledky (viz odstavce 53 a 54). Výsledky zkoušky jsou vyjádřeny jako relativní změny v produkci hormonu v porovnání s kontrolami pomocí rozpouštědel (SC). Účelem zkoušky není poskytnout specifické mechanistické informace týkající se interakce zkoušené chemické látky s endokrinním systémem. Proběhly výzkumy, které používaly tuto buněčnou linii k identifikaci účinků na specifické enzymy a meziproduktové hormony, např. progesteron (2).

3. Definice a zkratky používané v této zkušební metodě jsou popsány v dodatku. Podrobný pracovní postup včetně pokynů, jak připravit roztoky, kultivovat buňky a provádět různé aspekty zkoušek, je k dispozici v dodatku I–III dokumentu OECD ‘Multi-Laboratory Validation of the H295R Steroidogenesis Assay to Identify Modulators of Testosterone and Estradiol Production’ (4).

VÝCHOZÍ ÚVAHY A OMEZENÍ

4. Biosyntézy pohlavních steroidních hormonů se účastní pět různých enzymů, které působí jako katalyzátor v šesti různých reakcích. Enzymatická konverze cholesterolu na pregnenolon cytochromem P450 (CYP), konkrétně štěpením cholesterolového bočního řetězce enzymem CYP11 A, představuje úvodní krok v sérii biochemických reakcí, které vrcholí syntézou steroidních konečných produktů. V závislosti na pořadí dalších dvou reakcí se steroidogenní dráha rozdvojí, na Δ^5-hydroxysteroidní dráhu a Δ^4-ketosteroidní dráhu, které se sbíhají v produkci androstendionu (obrázek 1).

5. Androstendion se přeměňuje na testosteron (T) působením 17β-hydroxysteroid dehydrogenasou (17β-HSD). Testosteron je meziprodukt i konečný produkt/hormon. V mužském těle se T může přeměnit na dihydrotestosteron (DHT) díky 5α-reduktáze, která se nachází v buněčných membránách, jaderném obalu a endoplazmatickém retikulu cílových tkání androgenního působení, např. v prostatě a semenných váčcích. DHT je jako androgen výrazně účinnější než T a je též považován za konečný hormon. Zkouška H295R nedetekuje DHT (viz odstavec 10).

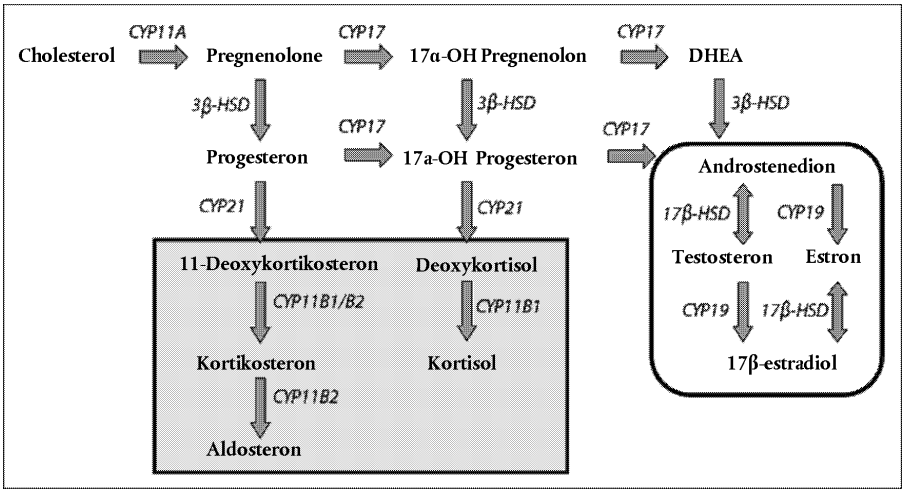
▼M5

6. Enzym na steroidogenní dráze, který přeměňuje androgenní chemické látky na estrogenní chemické látky, je aromatáza (CYP19). CYP19 přeměňuje T na 17β-estradiol (E2) a androstendion na estron. E2 a T jsou považovány za konečné hormony steroidogenní dráhy.

7. Specifičnost činnosti lyázy CYP17 se mezi druhy liší z hlediska intermediálních substrátů. U lidí enzym upřednostňuje substráty Δ^5-hydroxysteroidní dráhy (pregnenolon), zatímco substráty na Δ^4-ketosteroidní dráze (progesteron) jsou upřednostňovány u potkanů (19). Takové rozdíly v činnosti lyázy CYP17 mohou vysvětlovat některé rozdíly závislé na daném živočišné druhu v reakci na chemické látky, které mění steroidogenezi *in vivo* (6). Bylo prokázáno, že buňky H295 nejblíže odrážejí expresi adrenálního enzymu a vzorec produkce steroidů u dospělých osob (20), ale je známo, že zajišťují expresi enzymů jak pro Δ^5-hydroxysteroidní, tak pro Δ^4-ketosteroidní dráhu androgenní syntézy (7) (11) (13) (15).

Obrázek 1

Steroidogenní dráha v buňkách H295R



Poznámka:

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

8. Lidská buněčná linie adrenálního karcinomu H295R je užitečným modelem *in vitro* pro zkoumání účinků na syntézu steroidních hormonů (2) (7) (8) (9) (10). Buněčná linie H295R má exprimovány geny, které kódují všechny klíčové enzymy pro steroidogenezi uvedenou výše (11) (15) (obrázek 1). To je jedinečná vlastnost, protože exprese těchto genů *in vivo* je specifická z hlediska tkáně a vývojového stadia, přičemž zpravidla žádná tkáň ani žádné vývojové stadium neexprimuje všechny geny účastnící se steroidogeneze (2). Buňky H295R mají fyziologické charakteristiky zonálně nediferencovaných adrenálních buněk lidského plodu (11). Tyto buňky představují jedinečný systém *in vitro v* tom, že mají schopnost produkovat veškeré steroidní hormony, které se nacházejí v kůře nadledvin a v pohlavních žlázách, což umožňuje provést zkoušky jak účinků na kortikosteroidovou syntézu, tak účinků na produkci pohlavních steroidních hormonů, jako jsou androgeny a estrogeny, ačkoli zkouška byla validována pouze pro detekci hormonů T a E2. Změny, které tento zkušební systém zaznamenává ve formě změn v produkci T a E2, mohou být výsledkem velkého množství různých interakcí zkoušených chemických látek se steroidogenními funkcemi, které probíhají v buňkách H295R. Patří mezi ně modulace exprese, syntézy nebo funkce enzymů, které se účastní produkce, přeměny nebo

▼M5

eliminace steroidních hormonů (12) (13) (14). Inhibice produkce hormonů může být způsobena přímou kompetitivní vazbou na enzym v této dráze účinkem na kofaktory jako jsou NADPH (nikotinamidadenindinukleotidfosfát) a cAMP (cyklický adenosinmonofosfát), a/nebo zvýšením metabolismu steroidů nebo potlačením genové exprese určitých enzymů v dráze steroidogeneze. Zatímco inhibice může být funkcí jak přímých, tak nepřímých procesů účastnících se produkce hormonů, indukce má zpravidla nepřímý charakter, například ovlivňuje kofaktory, jako jsou NADPH a cAMP (stejně jako v případě forskolinu), snižuje metabolismus steroidů (13) a/nebo zvyšuje steroidogenní genovou expresi.

9. Zkouška H295R má několik výhod:

— umožňuje odhalení nárůstů i poklesů v produkci T i E2,

— dovoluje přímé zhodnocení případného vlivu chemické látky na buněčnou životaschopnost/cytotoxicitu. To je důležitá vlastnost, protože umožňuje rozlišení účinků, které jsou vyvolány cytotoxicitou, a účinků, které jsou vyvolány přímou interakcí chemických látek se steroidogenními drahami, což není možné v systémech tkáňových explantátů, které jsou tvořeny mnoha buněčnými typy s proměnlivou citlivostí a funkčností,

— není nutné využívat zvířata,

— buněčná linie H295R je komerčně dodávána.

10. Základní omezení zkoušky jsou následující:

— Není známa její metabolická schopnost, ale pravděpodobně je dost omezená; chemické látky, které musí být metabolicky aktivovány, pravděpodobně nebudou v této zkoušce zachyceny.

— Jelikož je H295R získávána z tkáně nadledvin, obsahuje enzymy schopné produkovat gluko- a mineralokortikoidy, stejně jako pohlavní hormony. Z tohoto důvodu by účinky na produkci gluko- a mineralokortikoidů mohly ovlivnit úrovně hormonů T a E2 pozorované ve zkoušce.

— Neměří DHT, a tudíž se neočekává, že by při ní byly odhaleny chemické látky, které inhibují 5α-reduktázu. V takovém případě lze použít Hershbergerovu zkoušku (16).

— Zkouška H295R neodhalí chemické látky, které zasahují do steroidogeneze tím, že postihují osu hypotalamus – hypofýza – pohlavní žlázy (HPG), protože tu lze studovat pouze u zvířat *in vivo*.

PODSTATA ZKOUŠKY

11. Účelem této zkoušky je odhalit chemické látky, které mají vliv na produkci T a E2. T je také meziproduktem na dráze k produkci E2. Zkouška může odhalit chemické látky, které zpravidla inhibují anebo indukují enzymy dráhy steroidogeneze.

▼M5

12. Zkouška se obvykle provádí za standardních podmínek kultivace buněk v 24jamkových kultivačních destičkách. Případně lze k provedení zkoušky použít jiné velikosti destiček. Nasazení buněk a experimentální podmínky by však měly být podle toho upraveny tak, aby byl zachován soulad s kritérii provedení testu.

13. Po aklimatizačním období v délce 24 hodin ve vícejamkových destičkách jsou buňky po dobu 48 hodin vystaveny sedmi koncentracím zkoušené chemické látky, alespoň ve třech souběžných experimentech/opakováních. Rozpouštědlo a známý inhibitor a induktor produkce hormonů v určené koncentraci jsou použity jako negativní a pozitivní kontroly. Na konci období expozice je médium ze všech jamek odstraněno. Bezprostředně po odstranění média je analyzována životaschopnost buněk v každé jamce. Koncentrace hormonů v médiu lze měřit pomocí celé řady metod včetně komerčně dostupných sad k měření hormonů a/nebo přístrojových technik, jako je kombinace kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií (LC-MS). Údaje jsou vyjádřeny jako násobná změna vztažená k negativní kontrole (rozpouštědlo) a jako nejnižší koncentrace testované látky, při které jsou pozorovány účinky (*Lowest-Observed-Effect-Concentration*, LOEC). Je-li zkouška negativní, je nejvyšší testovaná koncentrace označena jako nejvyšší koncentrace testovaného vzorku nevyvolávající žádné pozorovatelné účinky (*No-Observed-Effect-Concentration*, NOEC). Závěry týkající se schopnosti chemické látky ovlivnit steroidogenezi by měly vycházet nejméně ze dvou nezávislých pokusů. První pokus může fungovat jako pokus zjišťující rozmezí dávek případně s následnou úpravou koncentrací pro pokusy 2 a 3, pokud se objeví problémy s rozpustností nebo cytotoxicitou nebo pokud se zdá, že aktivita chemické látky je na hranici rozpětí zkoušených koncentrací.

KULTIVACE

Buněčná linie

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

Úvod

15. Z důvodu změn schopnosti buněk produkovat E2 se zvyšujícím se stářím/počtem pasáží (2) by kultivace buněk měla před jejich použitím probíhat v souladu s konkrétním pracovním postupem a měl by být zaznamenán počet pasáží od rozmrazení buněk i číslo/pořadí pasáže, v níž byly buňky zmraženy a umístěny do kapalného dusíku. První číslo uvádí skutečný počet buněčných pasáží a druhé číslo popisuje číslo pasáže, v níž byly buňky zmraženy a uloženy. Například buňky, které byly zmraženy po pasáži pět a rozmraženy a poté byly třikrát rozděleny (čtyři pasáže počítající čerstvě rozmražené buňky se počítají jako pasáž 1) by poté, co byly opět kultivovány, byly označeny jako pasáž 4,5. Příklad schématu číslování je uveden v dodatku I validační zprávy (4).

16. Jako základ pro obohacené médium a mrazicí médium se použije zásobní médium. Obohacené médium je nezbytnou součástí kultivace buněk. Mrazicí médium je speciálně navrženo tak, aby umožnilo ničím nedotčené zmrazení buněk pro dlouhodobé skladování. Před použitím by z hlediska základních koncentrací T a E2 měla proběhnout analýza Nu-séra (nebo srovnatelného séra se stejnými vlastnostmi, kde bylo prokázáno, že splňuje požadavky na provedení zkoušky a kontrolu kvality), které je součástí obohaceného média. Příprava těchto roztoků je popsána v dodatku II validační zprávy (4).

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

▼M5

17. Po zahájení kultivace buněk H295R z původní dodávky z ATCC by buňky měly růst po pět pasáží (tj. buňky jsou rozděleny čtyřikrát). Buňky pasáže 5 jsou poté zmraženy v kapalném dusíku a uskladněny. Před zmrazením buněk je na destičce pro kontrolu kvality (QC-destičce) odebrán vzorek buněk předchozí pasáže 4 (viz odstavec 36 a 37), aby se ověřilo, zda bazální produkce hormonů a reakce pozitivní kontrolní látky splňují kritéria kontroly kvality zkoušky definovaná v tabulce 5.

18. Buňky H295R musí být kultivovány, zmraženy a uchovávány v kapalném dusíku, aby bylo zajištěno, že pro účely kultivace a použití budou vždy k dispozici buňky příslušné pasáže/stáří. Aby to bylo přijatelné pro zkoušku H295R, tak pasáží po odebrání nové ([1]) nebo zmrazené ([2]) dodávky buněk do kultury by nemělo být více než deset. Například přijatelné pasáže pro kultury buněk z dávky zmrazené v pasáži 5 by byly 4,5 až 10,5. U buněk kultivovaných z těchto zmrazených dávek by měl být dodržen postup popsaný v odstavci 19. Tyto buňky by se měly před použitím kultivovat alespoň čtyři (4) další pasáže (pasáž 4,5).

Aktivace buněk ze zmrazené zásoby

19. Postup pro aktivaci buněk ze zmrazené zásoby se uplatňuje tehdy, když se z uskladnění v kapalném dusíku vyjme pro účely kultivace a zkoušení nová dávka buněk. Podrobnosti o tomto postupu jsou stanoveny v dodatku III validační zprávy (4). Buňky jsou vyjmuty ze skladovacích nádob s kapalným dusíkem, rychle jsou rozmraženy, umístěny do obohaceného média v centrifugační zkumavce, odstředěny při pokojové teplotě, opětovně suspendovány v obohaceném médiu a přeneseny do kultivační baňky. Médium by mělo být následující den vyměněno. Buňky H295R se kultivují v inkubátoru při teplotě 37 °C s 5 % CO_2 ve vzduchové atmosféře a médium se obnovuje 2–3krát týdně. Jakmile buňky dosáhnou konfluence přibližně 85–90 %, měly by být rozděleny. Rozdělení buněk je nezbytné pro zajištění zdraví a růstu buněk a pro zachování buněk pro účely provádění biologických zkoušek. Buňky jsou třikrát opláchnuty ve fyziologickém roztoku ve fosfátovém pufru (PBS, bez Ca^{2+} Mg^{2+}) a vyňaty z kultivační baňky přidáním vhodného odlučovacího enzymu, např. trypsinu, do PBS (bez Ca^{2+} Mg^{2+}). Bezprostředně po vynětí buněk z kultivační baňky by působení enzymu mělo být zastaveno přidáním obohaceného média v poměru trojnásobku objemu použitého pro aplikaci enzymu. Buňky jsou umístěny do centrifugační zkumavky, odstředěny při pokojové teplotě, je odstraněn supernatant a sediment buněk se resuspenduje v obohaceném médiu. Příslušné množství buněčné suspenze se umístí do nové kultivační baňky. Toto množství buněčné suspenze by se mělo upravit tak, aby buňky dosáhly do 5–7 dnů konfluence. Doporučený subkultivační poměr je 1:3 až 1:4. Destička by měla být pečlivě označena. Buňky jsou nyní připraveny k použití při zkoušce a přebytečné buňky by měly být podle odstavce 20 zmraženy v kapalném dusíku.

([1]) „Novou dávkou“ se rozumí čerstvá dávka buněk obdržená od ATCC.

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

▼M5

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

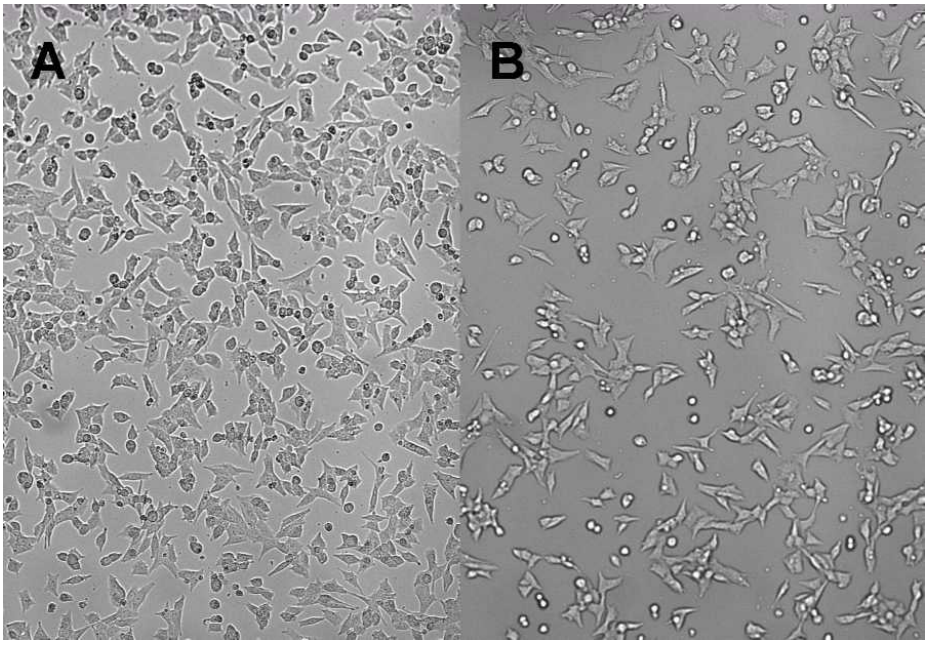
20. Pro přípravu buněk H295R na zmrazení je zapotřebí dodržet postup popsaný výše u dělení buněk až do kroku resuspenze sedimentu buněk na dně odstředivkové zkumavky. Zde je sediment buněk resuspendován v mrazicím médiu. Roztok je přenesen do řádně označené kryogenní ampulky a zmražen při teplotě – 80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

Umístění buněk na destičky a preinkubace před zkoušením

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

Obrázek 2

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



22. Médium je rozpipetováno z kultivační baňky a buňky jsou třikrát propláchnuty sterilním PBS (bez $Ca^{2+}Mg^{2+}$). Je přidán roztok enzymu (v PBS) pro oddělení buněk od kultivační baňky. Po uplynutí náležité doby pro oddělení buněk by působení enzymu mělo být zastaveno přidáním obohaceného média v poměru trojnásobku objemu použitého pro aplikaci enzymu. Buňky jsou umístěny do centrigugační zkumavky, odstředěny při pokojové

▼M5

teplotě, odstraní se supernatant a sediment buněk se resuspenduje v obohaceném médiu. Hustota buněk se vypočítá např. pomocí hemocytometru nebo počítače buněk. Buněčná suspenze by měla být zředěna na požadovanou hustotu pro destičku a důkladně rozmíchána, aby byla zajištěna homogenní hustota buněk. Buňky by měly být umístěny na destičky s 1 ml buněčné suspenze na jamku a destičky a jamky by měly být označeny. Destičky s nasazenými buňkami se inkubují při teplotě 37 °C ve vzduchové atmosféře s 5 % CO_2 na dobu 24 hodin, aby se buňky mohly přichytit k jamkám.

POŽADAVKY KONTROLY KVALITY

23. Je velmi důležité, aby během dávkování byl do jamek umístěn přesný objem roztoků a vzorků, protože tento objem určuje koncentrace používané při počítání výsledků zkoušky.

24. Před zahájením kultivace buněk a jakýmkoli následným zkoušením by každá laboratoř měla doložit citlivost svého systému měření hormonů (odstavce 29–31).

25. Používají-li se zkoušky měření hormonu na základě protilátek, musí být před zahájením zkoušení provedena analýza zkoušených chemických látek, aby se zjistilo, zda mají potenciál působit rušivě na systém měření používaný ke kvantifikaci T a E2 podle odstavce 32.

26. Doporučovaným rozpouštědlem pro zkoušku je DMSO. Pokud se používá alternativní rozpouštědlo, je zapotřebí stanovit toto:

— rozpustnost zkoušené chemické látky, forskolinu a prochlorazu v rozpouštědle, a

— cytotoxicitu jako funkci koncentrace rozpouštědla.

Doporučuje se, aby maximální přípustná koncentrace rozpouštědla nepřekročila desetinásobek zředění nejmenší cytotoxické koncentrace rozpouštědla.

27. Před prvním provedením zkoušky by laboratoř měla provést kvalifikační pokus prokazující, že laboratoř je schopna udržet a dosáhnout vhodných kultivačních a experimentálních podmínek, které jsou požadovány pro zkoušení chemické látky podle odstavců 33–35.

28. Na začátku zkoušení při použití nové dávky buněk by před použitím nové dávky buněk ke zkoušení měl být proveden kontrolní experiment (destička pro kontrolu kvality – *QC plate*) ke zhodnocení vlastností buněk podle odstavců 36 a 37.

Fungování systému měření hormonů

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

29. Každá laboratoř může k analýze produkce T a E2 buňkami H259R používat systém měření hormonů dle své volby, pokud splňuje kritéria provedení zkoušky, včetně meze kvantifikace (LOQ). Nominálně to je 100 pg/ml pro T a 10 pg/ml pro E2, které vycházejí z bazálních hladin hormonů

▼M5

pozorovaných ve validačních studiích. Avšak v závislosti na bazálních hladinách hormonů dosažených v provádějící laboratoři mohou být vhodné vyšší nebo nižší hladiny. Před zahájením pokusů s destičkou pro kontrolu kvality a pokusů v rámci zkoušky by laboratoř měla prokázat, že při uplatněné zkoušce hormonů lze změřit koncentrace hormonů v obohaceném médiu s dostatečnou přesností a precizností, aby mohla být při analýze obohaceného média doplněné o interní kontrolu hormonů splněna kritéria kontroly kvality specifikovaná v tabulkách 1 a 5. Obohacené médium by mělo být doplněno nejméně o tři koncentrace každého hormonu (např. 100, 500 a 2 500 pg/ml hormonu T; 10, 50 a 250 pg/ml hormonu E2; nebo pro nejnižší obohacené koncentrace T a E2 lze použít nejnižší možné koncentrace na základě limitů zjištění vybraného systému měření hormonů) a analyzováno. Naměřené koncentrace hormonů u neextrahovaných vzorků by měly spadat do rozmezí 30 % nominálních koncentrací a rozdíl mezi opakovanými měřeními téhož vzorku by neměl překročit 25 % (viz rovněž tabulka 8, kde jsou uvedena další kritéria kontroly kvality). Pokud jsou tato kritéria kontroly kvality splněna, předpokládá se, že vybraná metoda měření hormonů je dostatečně přesná, precizní a nedochází při ní ke křížové reakci se složkami média (matrice vzorků), tak, že by se očekával významný vliv na výsledek zkoušky. V tomto případě není vyžadována extrakce vzorků před měřením hormonů.

30. V případě, že kritéria kontroly kvality v tabulkách 1 a 8 nejsou splněna, může se objevit významný účinek matrice a měl by být proveden pokus s extrahovaným obohaceným médiem. Příklad postupu extrakce je popsán v dodatku II validační zprávy (4). Měření koncentrací hormonů v extrahovaných vzorcích by měla být provedena trojmo. ([1]) Pokud lze dokázat, že po extrakci nenarušují složky média metodu zjišťování hormonů podle kritérií kontroly kvality, měly by být všechny další pokusy uskutečněny pomocí extrahovaných vzorků. Pokud kritéria kontroly kvality nelze po extrakci splnit, použitý systém měření hormonů není pro účely zkoušky steroidogeneze H295R vhodný a měla by se použít alternativní metoda zjišťování hormonů.

Standardní křivka

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

Zkouška interference chemické látky

32. Pokud se k měření hormonů použijí metody založené na protilátkách, jako jsou enzymové imunoanalýzy s enzymem vázaným na imunosorbent (ELISA) a radio-imunoanalýzy (RIA), měla by být každá chemická látka otestována z hlediska potenciální interference se systémem měření hormonů, který bude použit, a to ještě před zahájením vlastního zkoušení chemických látek (dodatek III validační zprávy (4)), protože některé chemické látky mohou s těmito zkouškami interferovat (17). Dochází-li k interferenci, která je ≥ 20 % bazální produkce hormonů pro T a/nebo E2, jak stanoví analýza hormonů, měl by u všech ředění zásobního roztoku zkoušené chemické látky proběhnout test interference chemické látky s hormony při zkoušce (např. jak je popsáno v dodatku III validační zprávy (4) oddílu 5.0) s cílem určit prahovou dávku, při níž dochází k významné interferenci (≥ 20 %). Pokud je interference menší než 30 %, výsledky lze opravit. Pokud interference přesáhne 30 %, údaje jsou neplatné a údaje pro tyto koncentrace by měly být odstraněny. Pokud při více než jedné necytotoxické koncentraci dochází k významné interferenci zkoušené chemické

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

▼M5

látky se systémem měření hormonů, měl by se použít jiný systém měření hormonů. Aby se předešlo interferenci s kontaminujícími chemickými látkami, je doporučeno, aby hormony byly z média extrahovány pomocí vhodného rozpouštědla. Možné metody lze najít ve validační zprávě (4).

Tabulka 1

Kritéria provedení pro systémy měření hormonů

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

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

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

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

Test způsobilosti laboratoře

33. Před zkoušením neznámých chemických látek by laboratoř měla provedením testu způsobilosti prokázat, že je schopna dosáhnout náležitých podmínek pro kultivaci buněk a zkušebních podmínek, které jsou požadovány pro úspěšné provedení zkoušky, a udržet je. Jelikož uskutečnění zkoušky je přímo spojeno s pracovníky laboratoře, kteří budou danou zkoušku provádět, měly by být tyto postupy částečně zopakovány, pokud dojde ke změně laboratorního personálu.

34. Tento test způsobilosti bude uskutečněn za podmínek uvedených v odstavcích 38 až 40 tak, že buňky budou vystaveny sedmi rostoucím koncentracím silných, mírných a slabých induktorů a inhibitorů, jakož i negativní chemické látce (viz tabulka 2). Mezi chemické látky, které mají být zkoušeny, patří konkrétně silný induktor forskolin (č. CAS 66575-29-9), silný inhibitor prochloraz (č. CAS 67747-09-5), mírný induktor atrazin (č. CAS 1912-24-9), mírný inhibitor aminoglutethimid (č. CAS 125-84-8), slabý induktor (produkce E2) a slabý inhibitor (produkce T) bisfenol A (č. CAS 80-05-7) a negativní chemická látka choriogonadotropin (HCG) (č. CAS 9002-61-3) (viz tabulka 2). Pomocí formátu podle tabulky 6 jsou

▼M5

všechny chemické látky umísťovány do oddělených destiček. U chemických látek pro test způsobilosti by měla být v každém dnu zkoušení zařazena jedna QC-destička (tabulka 4, odstavce 36–37).

Tabulka 2

Chemické látky pro test způsobilosti a expoziční koncentrace

Chemická látka pro test způsobilosti	Expoziční koncentrace [μM]
Prochloraz	0 ([a]); 0,01; 0,03; 0,1; 0,3; 1; 3; 10
Forskolin	0 ([a]); 0,03; 0,1; 0,3; 1; 3; 10; 30
Atrazin	0 ([a]); 0,03; 0,1; 1; 3; 10; 30; 100
Aminoglutethimid	0 ([a]); 0,03; 0,1; 1; 3; 10; 30; 100
Bisfenol A	0 ([a]); 0,03; 0,1; 1; 3; 10; 30; 100
HCG	0 ([a]); 0,03; 0,1; 1; 3; 10; 30; 100

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

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

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

Tabulka 3

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

	Číslo CAS	LOEC [μM]		Klasifikace výsledku	
		T	E2	T	E2
Prochloraz	67747-09-5	≤ 0,1	≤ 1,0	+ ([a]) (Inhibice)	+ (Inhibice)
Forskolin	66575-29-9	≤ 10	≤ 0,1	+ (Indukce)	+ (Indukce)
Atrazin	1912-24-9	≤ 100	≤ 10	+ (Indukce)	+ (Indukce)
Aminoglute-thimid	125-84-8	≤ 100	≤ 100	+ (Inhibice)	+ (Inhibice)

▼M5

	Číslo CAS	LOEC [μM]		Klasifikace výsledku	
		T	E2	T	E2
Bisfenol A	80-05-7	≤ 10	≤ 10	+ (Inhibice)	+ (Indukce)
HCG	9002-61-3	nepoužije se	nepoužije se	negativní	negativní

([a]) +, pozitivní
nepoužije se – vzhledem k tomu, že po expozici necytotoxickým koncentracím negativní kontroly by nemělo dojít k žádným změnám.

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

36. QC-destička se používá k ověření chování buněk H295R za standardních podmínek kultivace a k vytvoření dosavadní databáze koncentrací hormonů při kontrolách rozpouštědel, pozitivních a negativních kontrolách a při jiných opatřeních kontroly kvality v průběhu času.

— Chování buněk H295R by mělo být posuzováno pomocí QC-destičky pro každou novou dávku ATCC nebo po prvním použití dříve zmrazené zásoby buněk, pokud test způsobilosti laboratoře (odstavce 32–34) proběhl s touto dávkou buněk.

— QC-destička zajišťuje kompletní posouzení podmínek zkoušky (např. životaschopnost buněk, kontroly rozpouštědel, negativní a pozitivní kontroly, jakož i rozdíly v rámci zkoušky a mezi zkouškami) při zkoušení chemických látek a měla by být součástí každé zkoušky.

37. Test kontroly kvality se provádí v 24jamkové destičce a probíhá stejnými postupy inkubace, dávkování, životaschopnosti buněk/cytotoxicity, extrakce hormonů a analýzy hormonů, které jsou popsány v odstavcích 38 až 46 pro zkoušení chemických látek. QC-destička obsahuje slepé pokusy, kontroly rozpouštědla a dvě koncentrace známého induktoru (forskolin, 1, 10 μM) a inhibitoru (prochloraz, 0,1, 1 μM) syntézy E2 a T. Kromě toho se ve vybraných jamkách používá jako pozitivní kontrola pro zkoušku životaschopnosti/cytotoxicity MeOH. Podrobný popis rozvržení destičky obsahuje tabulka 4. Kritéria, která musí QC-destička splňovat, jsou vyjmenována v tabulce 5. Minimální bazální produkce hormonu u T a E2 by měla být splněna jak při kontrole rozpouštědla, tak v jamkách pro slepé pokusy.

Tabulka 4

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

	1	2	3	4	5	6
A	Slepý pokus ([a])	Slepý pokus ([a])	Slepý pokus ([a])	Slepý pokus ([a]) (+ MeOH) ([b])	Slepý pokus ([a]) (+ MeOH) ([b])	Slepý pokus ([a]) (+ MeOH) ([b])
B	DMSO ([c]) 1 μl	DMSO ([c]) 1 μl	DMSO ([c]) 1 μl	DMSO ([c]) 1 μl (+ MeOH) ([b])	DMSO ([c]) 1 μl (+ MeOH) ([b])	DMSO ([c]) 1 μl (+ MeOH) ([b])

▼M5

	1	2	3	4	5	6
C	FOR 1 μM	FOR 1 μM	FOR 1 μM	PRO 0,1 μM	PRO 0,1 μM	PRO 0,1 μM
D	FOR 10 μM	FOR 10 μM	FOR 10 μM	PRO 1 μM	PRO 1 μM	PRO 1 μM

([a]) Buňky v jamkách pro slepý pokus dostanou pouze médium (tj. žádné rozpouštědlo).
([b]) Metanol (MeOH) bude přidán **až po** ukončení expozice a odstranění média z těchto jamek.
([c]) Kontrola rozpouštědla DMSO (1 μl/jamku).

Tabulka 5

Kritéria výsledků pro QC-destičku

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

POSTUP EXPOZICE CHEMICKÉ LÁTCE

38. Preinkubované buňky se vyjmou z inkubátoru (odstavec 21) a zkontrolují pod mikroskopem, aby před dávkováním bylo jisté, že jsou v dobrém stavu (přichycení, morfologie).

39. Buňky jsou umístěny do biologické bezpečnostní skříně (laminární box) a obohacené médium je odstraněno a nahrazeno novým obohaceným médiem (1 ml/jamku). Pro tuto zkušební metodu se jako rozpouštědlo upřednostňuje DMSO. Pokud je však důvod pro použití jiných rozpouštědel, mělo by být popsáno vědecké zdůvodnění. Buňky jsou vystaveny zkoušené chemické látce přidáním 1 μl vhodného zásobního roztoku v DMSO (viz dodatek II validační zprávy (4)) na 1 ml obohaceného média (objem jamky). Výsledkem toho je konečná koncentrace 0,1 % DMSO v jamkách. Pro zajištění odpovídající směsi se obecně upřednostňuje, aby byl vhodný zásobní roztok zkoušené chemické látky v DMSO smíchán s obohaceným médiem, aby se dosáhlo požadované konečné koncentrace pro každou dávku a aby směs byla přidána do každé jamky bezprostředně po odstranění starého média. Je-li použita tato možnost, měla by koncentrace DMSO (0,1 %) zůstat ve všech jamkách stejná. U jamek obsahujících dvě největší koncentrace se vizuálně pomocí stereomikroskopu posoudí, zda se vytvořily sraženiny nebo zákal, což je známka neúplné rozpustnosti zkoušené chemické látky. Pokud jsou takové podmínky (zákal, tvorba sraženin) pozorovány, jsou přezkoumány i jamky obsahující další nižší koncentrace (a tak dále) a koncentrace, kde se látka zcela nerozpustila, musí být vyloučeny pro účely dalšího hodnocení a analýzy. Destička se na 48 hodin vrátí do inkubátoru při teplotě 37 °C ve vzduchové atmosféře s 5 % CO_2. Rozvržení destičky se zkoušenou chemickou látkou je uvedeno v tabulce 6. Zásoby 1–7 ukazují umístění rostoucích dávek zkoušené chemické látky.

▼M5

Tabulka 6

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

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

40. Po 48 hodinách jsou expoziční destičky vyňaty z inkubátoru a každá jamka se zkontroluje pod mikroskopem ohledně stavu buněk (přichycení, morfologie, stupeň konfluence) a známek cytotoxicity. Médium z každé jamky je rozděleno na dvě stejná množství (každé přibližně 490 µl) a přeneseno do dvou samostatných, řádně označených ampulek (tj. jeden díl poskytuje pro každou jamku náhradní vzorek). Aby se předešlo vyschnutí buněk, odstraňuje se médium po řadách nebo sloupcích najednou a nahrazuje se médiem pro zkoušku životaschopnosti/cytotoxicity buněk. Pokud je nutné životaschopnost/cytotoxicitu buněk změřit okamžitě, je do každé jamky přidáno 200 µl PBS s Ca^{2+} a Mg^{2+}. Média se zmrazí při teplotě – 80 °C až do dalšího zpracování pro analýzu koncentrací hormonů (viz odstavce 44–46). I když hormony T a E2 uchovávané v médiu při teplotě – 80 °C jsou obecně stálé po dobu nejméně tří měsíců, měla by být v každé laboratoři zdokumentována stálost hormonů během uskladnění.

41. Okamžitě po odstranění média se pro každou expoziční destičku určí životaschopnost buněk/cytotoxicita.

Určení životaschopnosti buněk

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

▼M5

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

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

Analýza hormonů

44. Každá laboratoř může pro analýzu T a E2 použít systém měření hormonů podle své volby. Zbylé podíly média z každé experimentální skupiny lze použít pro přípravu dalších ředění tak, aby byly k dispozici koncentrace pro lineární část standardní křivky. Jak je uvedeno v odstavci 29, každá laboratoř by měla prokázat soulad svého systému měření hormonů (např. ELISA, RIA, LC-MS, LC-MS/MS) s kritérii pro kontrolu kvality tak, že provede analýzu obohaceného média doplněnou o vnitřní kontrolu hormonů před provedením pokusů pro kontrolu kvality nebo zkoušením chemických látek. Aby bylo zajištěno, že součásti systému zkoušení nebudou rušivě zasahovat do měření hormonů, bude možná zapotřebí hormony před jejich měřením z média extrahovat (viz odstavec 30 s podmínkami, za kterých je nebo není extrakce požadována). Doporučuje se provést extrakci v souladu s postupy uvedenými v dodatku III validační zprávy (4).

45. Pokud se k měření produkce hormonů používá komerční zkušební sada (*kit*), měla by být provedena analýza hormonů v souladu s manuály, které dodal výrobce zkušební sady. Většina výrobců má jedinečný postup, kterým se mají analýzy hormonů provádět. Roztoky vzorků je třeba upravit, aby očekávané koncentrace hormonů pro kontroly roztoků spadaly do středu lineárního rozmezí standardní křivky konkrétní zkušební sady (dodatek III validační zprávy (4)). Hodnoty, které leží mimo lineární část standardní křivky, by měly být zamítnuty.

46. Konečné koncentrace hormonů se vypočítají takto:

Příklad:

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

▼M5

Výběr zkušebních koncentrací

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

Tabulka 7

Matice rozhodnutí pro možné výsledné scénáře

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

▼M5

Pokus 1	Pokus 2		Pokus 3		Rozhodnutí	
Scénář	Rozhodnutí	Scénář	Rozhodnutí	Scénář	Pozitivní	Negativní
Negativní	Potvrdit ([a])	Pozitivní	Upřesnit ([b])	Pozitivní	X	
Pozitivní	Upřesnit ([b])	Pozitivní	Konec		X	

([a]) Potvrdit předchozí pokus pomocí stejné struktury experimentu.
([b]) Provést zkoušku znovu s intervalem koncentrací 1/2-log (stanovení meze u koncentrace, která při předchozím experimentu dopadla výrazně jinak).
([c]) Násobná změna při jedné koncentraci se ze statistického hlediska výrazně liší od kontrolní hodnoty.

Kontrola kvality testu

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

Tabulka 8

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

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

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

([a]) Odkazuje na opakovaná měření téhož vzorku

▼M5

ANALÝZA ÚDAJŮ A ZPRÁVY

Analýza údajů

49. Pro vyhodnocení relativního nárůstu/poklesu chemicky změněné produkce hormonů by se výsledky měly normalizovat na střední hodnotu kontroly s rozpouštědlem (*solvent control*, SC) u každé zkušební destičky a výsledky by se měly vyjádřit jako změny relativní k SC v každé zkušební destičce. Veškeré údaje musí být vyjádřeny jako střední hodnoty ± 1 směrodatná odchylka (*standard deviation*, SD).

50. Do analýzy údajů by měly být zahrnuty pouze údaje o hormonech z jamek, v nichž byla cytotoxicita nižší než 20 %. Relativní změny by se měly vypočítat takto:

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

51. Pokud se na základě vizuální prohlídky jamky nebo dle důkazů ze zkoušky životaschopnosti/cytotoxicity popsané v odstavci 42 zdá, že narostl počet buněk, je nutné zdánlivý nárůst ověřit. Je-li nárůst počtu buněk ověřen, mělo by to být uvedeno v závěrečné zprávě.

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

53. Pokud více než dva údaje leží v lineární části křivky a pokud lze vypočítat maximální účinnost (jak se předpokládá u některých z druhých pokusů, které se provádějí pomocí semilogaritmických intervalů expozičních koncentrací), měl by být pro výpočet účinných koncentrací použit probitový, logitový nebo jiný vhodný regresní model (např. EC50 a EC20).

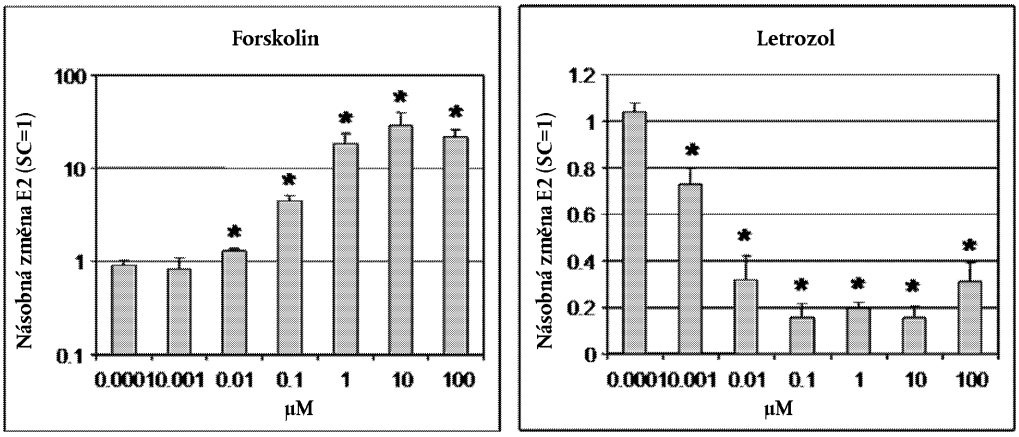
54. Výsledky by měly být prezentovány v grafickém (sloupcové diagramy vyjadřující střední hodnotu ± 1 SD) a tabulkovém formátu (LOEC/NOEC, směr účinku a síla maximální odpovědi, která je součástí údajů typu dávka–reakce) (viz např. obrázek 3). Posouzení údajů se považuje za platné pouze v případě, že se opírá nejméně o dva nezávisle provedené pokusy. Experiment nebo pokus se považuje za nezávislý, pokud byl proveden v jiný den za pomoci nového souboru roztoků a kontrol. Rozmezí koncentrací použitých v pokusech 2 a 3 (v případě potřeby) lze upravit na základě výsledků pokusu 1 tak, aby bylo lépe definováno rozmezí závislosti dávka-odpověď zahrnující LOEC (viz odstavec 47).

▼M5

Obrázek 3

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

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



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

Postup při interpretaci údajů

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

Závěrečná zpráva

56. Závěrečná zpráva by měla obsahovat následující informace:

Zkušební zařízení

— název a adresa zařízení,

— vedoucí studie a další pracovníci a jejich povinnosti v rámci studie,

— data zahájení a ukončení studie.

▼M5

Zkoušená chemická látka, chemická činidla a kontroly

— totožnost (název, příp. číslo CAS), zdroj, číslo šarže, čistota, dodavatel a charakterizace zkoušené chemické látky, chemických činidel a kontrol,

— fyzikální povaha a příslušné fyzikálně-chemické vlastnosti zkoušené chemické látky,

— podmínky uskladnění a metoda a četnost přípravy zkoušených chemických látek, chemických činidel a kontrol,

— stabilita zkoušené chemické látky.

Buňky

— zdroj a typ buněk,

— počet buněčných pasáží (identifikátor buněčné pasáže) buněk použitých při zkoušce,

— popis postupů uchovávání buněčných kultur.

Požadavky před zkouškou (je-li to relevantní)

— popis a výsledky testu chemické interference hormonů,

— popis a výsledky měření účinnosti extrakce hormonů,

— standardní a kalibrační křivky pro všechny analytické zkoušky, které budou provedeny,

— limity detekce pro vybrané analytické zkoušky.

Zkušební podmínky

— složení média,

— koncentrace zkoušené chemické látky,

— hustota buněk (odhadované nebo změřené buněčné koncentrace během 24 hodin a 48 hodin),

— rozpustnost zkoušené chemické látky (limit rozpustnosti, je-li určen),

— inkubační doba a podmínky.

Výsledky zkoušek

— prvotní údaje týkající se jednotlivých jamek pro kontroly a testované látky – každé opakované měření ve formě původních údajů získaných z přístroje použitého k měření produkce hormonů (např. OD, fluorescenční jednotky, DPM atd.),

— prokázání normality rozdělení nebo vysvětlení transformace údajů,

— průměrná odpověď ± 1 SD pro každou měřenou jamku,

— údaje o cytotoxicitě (zkoušené koncentrace, které způsobily cytotoxicitu),

— potvrzení, že byly splněny požadavky kontroly kvality,

▼M5

— relativní účinek v porovnání s kontrolou s rozpouštědlem po korekci na cytotoxicitu,

— sloupcový graf ukazující vztah (násobnou změnu) při každé koncentraci, SD a statistickou významnost, jak je uvedeno v odstavcích 49–54.

Interpretace údajů

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

Diskuse

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

Závěry

LITERATURA

1) OECD (2002), OECD Conceptual Framework for the Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals, v dodatku 2 kapitoly B.54 této přílohy.

2) Hecker, M., Newsted, J.L., Murphy, M.B., Higley, E.B., Jones, P.D., Wu, R. and Giesy, J.P. (2006), Human adrenocarcinoma (H295R) cells for rapid in vitro determination of effects on steroidogenesis: Hormone production, *Toxicol. Environ. Pharmacol.,* 217, 114–124.

3) Hecker, M., Hollert, H., Cooper, R., Vinggaard, A.-M., Akahori, Y., Murphy, M., Nellemann, C., Higley, E., Newsted, J., Wu, R., Lam, P., Laskey, J., Buckalew, A., Grund, S., Nakai, M., Timm, G., and Giesy, J. P. (2007), The OECD validation program of the H295R steroidgenesis assay for the identification of in vitro inhibitors or inducers of testosterone and estradiol production, Phase 2: inter laboratory pre-validation studies. *Env. Tecn. Pollut. Res*., 14, 23–30.

4) OECD (2010), *Multi-Laboratory Validation of the H295R Steroidogenesis Assay to Identify Modulators of Testosterone and Estradiol Production*, OECD Series of Testing and Assessment No. 132, ENV/JM/MONO(2010)31, Paris. K dispozici na internetové adrese [http://www.oecd.org/document/30/0,3746,en_2649_34377_1916638_1_1_1_1,00.html]

5) OECD (2010), *Peer Review Report of the H295R Cell-Based Assay for Steroidogenesis,* OECD Series of Testing and Assessment No. 133, ENV/JM/MONO(2010)32, Paris. K dispozici na adrese: [http://www.oecd.org/document/30/0,3746,en_2649_34377_1916638_1_1_1_1,00.html]

6) Battelle (2005), Detailed Review Paper on Steroidogenesis, k dispozici na adrese: [http://www.epa.gov/endo/pubs/edmvs/steroidogenesis_drp_final_3_29_05.pdf]

7) Hilscherova, K., Jones, P. D., Gracia, T., Newsted, J. L., Zhang, X., Sanderson, J. T., Yu, R. M. K., Wu, R. S. S. and Giesy, J. P. (2004), Assessment of the Effects of Chemicals on the Expression of Ten Steroidogenic Genes in the H295R Cell Line Using Real-Time PCR, *Toxicol. Sci.* 81, 78–89.

8) Sanderson, J. T., Boerma, J., Lansbergen, G. and Van den Berg, M. (2002), Induction and inhibition of aromatase (CYP19) activity by various classes of pesticides in H295R human adrenocortical carcinoma cells, *Toxicol. Environ. Pharmacol.,* 182, 44–54.

9) Breen, M.S., Breen, M., Terasaki, N., Yamazaki, M. and Conolly, R.B. (2010), Computational model of steroidogenesis in human H295R cells to predict biochemical response to endocrine-active chemicals: Model development for metyrapone, *Environ. Health Perspect.,* 118: 265–272.

▼**M5**

10) Higley, E.B., Newsted, J.L., Zhang, X., Giesy, J.P. and Hecker, M. (2010), Assessment of chemical effects on aromatase activity using the H295R cell line, *Environ. Tecn. Poll. Res.,* 17:1137–1148.

11) Gazdar, A. F., Oie, H. K., Shackleton, C. H., Chen, T. R., Triche, T. J., Myers, C. E., Chrousos, G. P., Brennan, M. F., Stein, C. A. and La Rocca, R. V. (1990), Establishment and characterization of a human adrenocortical carcinoma cell line that expresses Multiple pathways of steroid biosynthesis, *Cancer Res.,* 50, 5488–5496.

12) He, Y.H., Wiseman, S.B., Zhang, X.W., Hecker, M., Jones, P.D., El-Din, M.G., Martin, J.W. and Giesy, J.P. (2010), Ozonation attenuates the steroidogenic disruptive effects of sediment free oil sands process water in the H295R cell line, *Chemosphere,* 80:578–584.

13) Zhang, X.W., Yu, R.M.K., Jones, P.D., Lam, G.K.W., Newsted, J.L., Gracia, T., Hecker, M., Hilscherova, K., Sanderson, J.T., Wu, R.S.S. and Giesy, J.P. (2005), Quantitative RT-PCR methods for evaluating toxicant-induced effects on steroidogenesis using the H295R cell line, *Environ. Tecn. Technol.,* 39:2777–2785.

14) Higley, E.B., Newsted, J.L., Zhang, X., Giesy, J.P. and Hecker, M. (2010), Differential assessment of chemical effects on aromatase activity, and E2 and T production using the H295R cell line, *Environ. Tecn. Ind. Res.,* 17:1137–1148.

15) Rainey, W. E., Bird, I. M., Sawetawan, C., Hanley, N. A., Mccarthy, J. L., Mcgee, E. A., Wester, R. and Mason, J. I. (1993), Regulation of human adrenal carcinoma cell (NCI-H295) production of C19 steroids, *J. Clin. Endocrinol. Metab.,* 77, 731–737.

16) Kapitola B.55 této přílohy: Hershbergerova biologická zkouška na potkanech: Krátkodobá screeningová zkouška androgenních/antiandrogenních vlastností.

17) Shapiro, R., and Page, L.B. (1976), Interference by 2,3-dimercapto-1-propanol (BAL) in angiotensin I radioimmunoassay, *J. Lab. Clin. Med.,* 2, 222–231.

18) Mosmann, T. (1983), Rapid colorimetric assay for growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, *J. Immunol. Methods.,* 65, 55–63.

19) Brock, B.J., Waterman, M.R. (1999). Biochemical differences between rat and human cytochrome P450c17 support the different steroidogenic needs of these two species, Biochemistry. 38:1598–1606.

20) Oskarsson, A., Ulleras, E., Plant, K., Hinson, J. Goldfarb, P.S., (2006), Steroidogenic gene expression in H295R cells and the human adrenal gland: adrenotoxic effects of lindane in vitro, J. Appl. Toxicol., 26:484–492.

▼M5

Dodatek

DEFINICE

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

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

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

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

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

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

Chemickou látkou se rozumí látka nebo směs.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

PBS je Dulbeccův fyziologický roztok ve fosfátovém pufru.

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

▼**M5**

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

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

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

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

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

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

▼M5

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

ÚVOD

1. Tato zkušební metoda odpovídá pokynu OECD pro zkoušení (TG) 488 (2013). Zkušební metody EU jsou k dispozici pro širokou škálu *in vitro* testů mutagenity, které jsou schopny odhalit chromozomové a/nebo genové mutace. Existují zkušební metody pro testování *in vivo* (ty detekují chromozomové aberace a neplánovanou syntézu DNA), ale pro genové mutace takové metody dosud nebyly k dispozici. Zkoušky mutací u transgenních hlodavců (*Transgenic Rodent*, TGR) splňují potřebu praktických a obecně dostupných zkoušek *in vivo* pro genové mutace.

2. O zkouškách mutací u TGR existují rozsáhlé přehledové dokumenty (24) (33). Tyto zkoušky používají transgenní potkany a myši, jejichž organismy obsahují velké množství kopií chromozomově integrovaných plazmidových nebo fágových shuttle vektorů. Transgeny obsahují reporterové geny pro zjišťování různých typů mutací indukovaných *in vivo* zkoušenými chemickými látkami.

3. Mutace, k nimž dochází u hlodavců, se získávají pomocí obnovy/odkrytí transgenu a analýzy fenotypu reporterového genu v bakteriálním hostiteli, který postrádá reporterový gen. Zkoušky genových mutací u TGR posuzují mutace indukované u geneticky neutrálních genů znovu získaných v podstatě z jakékoli tkáně hlodavce. Tyto analýzy tudíž obcházejí mnohá ze stávajících omezení spojených se studiem genových mutací *in vivo* u endogenních genů (např. omezení na tkáně vhodné pro analýzu, negativní/pozitivní selekce proti mutacím).

4. Posouzení závažnosti důkazů naznačuje, že transgeny reagují na mutageny podobně jako endogenní geny, zejména pokud se týká detekce substituce párů bází, posunových mutací a malých delecí a insercí (24).

5. Mezinárodní semináře o zkoušení genotoxicity (International Workshops on Genotoxicity Testing, IWGT) schválily zařazení zkoušek genových mutací u TGR mezi metody zjišťování genových mutací *in vivo* a doporučily postup pro jejich provádění (15) (29). Tato zkušební metoda (B.58) se opírá o tato doporučení. Další analýzu podporující používání tohoto postupu lze najít v (16).

6. Předpokládá se, že v budoucnu bude možné zkombinovat zkoušky genových mutací u TGR se studií toxicity při opakované aplikaci (kapitola B.7 této přílohy). Je však třeba mít další údaje, aby bylo zajištěno, citlivost zkoušek genových mutací u TGR nebude ovlivněna kratším, jednodenním intervalem mezi ukončením aplikace a odběrem vzorků, jak je tomu u studie toxicity s opakovanou aplikací v porovnání s třídenním intervalem používaným při zkouškách genových mutací u TGR. Je také nutné mít údaje o tom, že provedení studie s opakovaným podáváním látky nebude negativně ovlivněno použitím transgenního kmene namísto tradičních kmenů hlodavců. Až tyto údaje budou k dispozici, bude tato zkušební metoda aktualizována.

7. Definice nejdůležitějších výrazů jsou uvedeny v dodatku.

▼**M5**

VÝCHOZÍ ÚVAHY

8. Zkoušky genových mutací u TGR, pro které je k dispozici dostatek údajů, aby mohly být zařazeny v této zkušební metodě, jsou tyto: myš s bakteriofágem *lacZ* (Muta™Mouse); myš s plazmidem *lacZ*, delta myš a potkan *gpt* (*gpt* a Spi⁻), myš a potkan *lacI* (Big Blue®), prováděné podle standardních podmínek. Kromě toho lze pro posouzení mutací v modelech Big Blue® a Muta™Mouse použít zkoušku pozitivní selekce *cII*. Mutageneze v modelech TGR se zpravidla posuzuje jako četnost mutací; v případě potřeby však může další informace dodat molekulární analýza mutací (viz odstavec 24).

9. Tyto zkoušky genových mutací *in vivo* u hlodavců jsou při posuzování mutagenního rizika důležité zejména proto, že účinky zjištěné v těchto zkouškách jsou závislé na metabolismu *in vivo*, farmakokinetice, procesech opravy DNA a translézní syntéze DNA, ačkoli ty se mohou u jednotlivých druhů, tkání a typů poškození DNA lišit. Zkouška *in vivo* pro genové mutace je užitečná pro další šetření mutagenního účinku zjištěného systémem *in vitro* a pro následné monitorování výsledků testů pomocí jiných cílových parametrů *in vivo* (24). Vedle toho, že jsou genové mutace příčinným vztahem spojeny se vznikem rakoviny, jsou také významným parametrem pro predikci nezhoubných onemocnění způsobených mutacemi v somatických tkáních (12) (13), jakož i pro onemocnění přenášená zárodečnými buňkami.

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

PODSTATA ZKOUŠKY

11. Ve zkouškách popsaných v odstavci 8 je cílový gen původně bakteriální nebo bakteriofágový a prostředkem pro znovuzískání genu z genomické DNA hlodavců je začlenění transgenu do bakteriofágu λ nebo plazmidového shuttle vektoru. Proces zahrnuje extrakci genomické DNA ze sledované tkáně hlodavců, zpracování genomické DNA *in vitro* (tj. sbalování vektorů λ nebo ligace a elektroporace plazmidů pro obnovu shuttle vektoru) a následné zjištění mutací v bakteriálních hostitelích za vhodných podmínek. Zkoušky využívají neutrální transgeny, které lze snadno znovu získat z většiny tkání.

12. Základní experiment zkoušky genových mutací u TGR zahrnuje podávání chemické látky hlodavcům po určité časové období. Chemické látky mohou být podávány jakýmkoli vhodným způsobem, včetně implantace (např. zkoušení lékařských přístrojů). Celkové období, během kterého je zvířeti látka podávána, se nazývá doba aplikace. Po aplikaci obvykle následuje období před utracením, během kterého není chemická látka podávána a kdy jsou neopravené léze DNA fixovány do stálých mutací. V literatuře je toto období označováno různě: jako doba manifestace, doba fixace nebo doba exprese; toto období končí odběrem vzorků(15) (29). Po utracení zvířete je genomická DNA izolována ze sledované tkáně (tkání) a vyčištěna.

▼M5

13. Údaje pro jednu tkáň z jednoho zvířete z více sbalení/ligací jsou obvykle agregovány a četnost mutací je obecně hodnocena pomocí celkového počtu cca 10^5 až 10^7 jednotek tvořících plak nebo kolonii. Při používání metod pozitivní selekce počet jednotek tvořících plak určen pomocí samostatného souboru neselektivních destiček.

14. Metody pozitivního selektivního výběru byly vyvinuty s cílem usnadnit zjišťování mutací v genu *gpt* [myš a potkan *gpt*, fenotyp *gpt*⁻ (20) (22) (28)] a genu *lacZ* [Muta™Mouse nebo myš s plazmidem *lacZ* (3) (10) (11) (30)]; zatímco mutace genu *lacI* ve zvířatech Big Blue® jsou zjišťovány prostřednictvím neselektivní metody, která identifikuje mutace pomocí tvorby barevných (modrých) plaků. Metodika pozitivní selekce se používá i k zjišťování bodových mutací vznikajících v genu *cII* shuttle vektoru bakteriofágu λ [myš nebo potkan Big Blue® a Muta™Mouse (17)] a mutací vyvolaných delecí v genech λ *red* a *gam* [selekce Spi ⁻ u delta myši a potkana *gpt* (21) (22) (28)]. Četnost mutacíse vypočítá vydělením počtu plaků/plazmidů obsahujících mutace v transgenu celkovým počtem plaků/plazmidů získaných z téhož vzorku DNA. Ve studiích genových mutací TGR je četnost mutací výsledným parametrem. Četnost mutací lze navíc určit jako frakci buněk nesoucích nezávislé mutace; pro tento výpočet je požadována korekce pro klonální expanzisekvenováním obnovených mutací (24).

15. Mutace hodnocené v zkouškách bodových mutací *lacI, lacZ, cII* a *gpt* jsou tvořeny primárně mutacemi substitucí páru bází, posunovými mutacemi a malými insercemi/delecemi. Relativní podíl těchto typů mutací mezi spontánními mutacemi je podobný podílu, který je pozorován u endogenního genu *Hprt*. Velké delece jsou zjišťovány pouze u selekce Spi ⁻ genu a zkoušek plazmidů *lacZ* (24). Předmětem zájmu jsou zde mutace *in vivo*, které vznikají u myší nebo potkanů. Mutace *in vitro* a *ex vivo*, které mohou vzniknout během znovuzískávání, replikace nebo opravy fágu/plazmidu, jsou relativně vzácné a v některých systémech mohou být speciálně identifikovány nebo vyloučeny systémem pozitivní selekce u bakteriálního hostitele.

POPIS METODY

Přípravy

Volba druhu zvířat

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

Podmínky chovu a krmení

17. Teplota v místnosti s pokusnými zvířaty by měla být v ideálním případě 22 °C (± 3 °C). Ačkoli by relativní vlhkost vzduchu měla být minimálně 30 % a pokud možno by, kromě doby úklidu místnosti, neměla přesáhnout 70 %, cílem by mělo být dosažení relativní hodnoty 50–60 %. Osvětlení by mělo být umělé s každodenním střídáním 12 hodin světla a 12 hodin tmy. Ke krmení lze používat běžnou laboratorní potravu a k pití by mělo být k dispozici neomezené množství vody. Výběr druhu potravy může být ovlivněn její dostatečnou mísitelností se zkoušenou chemickou látku, je-li

▼M5

látka podávána touto cestou. Zvířata by měla být umístěna v klecích v malých skupinkách (maximálně pět zvířat) stejného pohlaví, pokud se neočekává agresivní chování. Je-li to z vědeckého hlediska důvodné, mohou být zvířata v klecích individuálně.

Příprava zvířat

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

Příprava dávek

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

Zkušební podmínky

Rozpouštědlo/vehikulum

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

Pozitivní kontroly

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

▼M5

Tabulka 1

Příklady pozitivních kontrolních látek a některé z jejich cílových tkání

Chemická látka a číslo CAS	Název a číslo Einecs	Charakteristika	Cílová tkáň pro mutace	
			Potkan	Myš
1-ethyl-1-nitrosomočovina [č. CAS 759-73-9]	1-ethyl-1-nitrosomočovina [212-072-2]	Přímo působící mutagen	Játra, plíce	Kostní dřeň, tračník, epitel tračníku, střevo, játra, plíce, slezina, ledvina, buňky zrnité membrány na vaječnících, samčí zárodečné buňky
Ethyl-karbamát (uretan) [č. CAS 51-79-6]	Uretan [200-123-1]	Mutagen, vyžaduje metabolismus, ale produkuje pouze slabé účinky		Kostní dřeň, předžaludek, tenké střevo, játra, plíce, slezina
2,4-diaminotoluen [č. CAS 95-80-7]	4-methyl-1,3-fenylendiamin [202-453-1]	Mutagen, vyžaduje metabolismus, také pozitivní při zkoušce Spi^-	Játra	Játra
Benzo[e]pyren [CAS č. 50-32-8]	Benzo[def]chrysen [200-028-5]	Mutagen, vyžaduje metabolismus	Játra, předstěra,	Kostní dřeň, prsa, tračník, předžaludek, žláznatý žaludek, srdce, játra, plíce, samčí zárodečné buňky

Negativní kontroly

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

Ověření způsobilosti laboratoře

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

Sekvenování mutací

24. Při použití výsledku zkoušky pro legislativní účely není vyžadováno sekvenování DNA mutací, obzvláště pak tam, kde bylo dosaženo jasného pozitivního nebo negativního výsledku. Údaje o sekvenování však mohou být užitečné při pozorování rozdílu mezi jedinci. V těchto případech lze sekvenování použít k vyloučení možnosti vzniku jackpotů nebo klonálních událostí identifikací podílu jedinečných mutací z konkrétní tkáně. Sekvenování přibližně 10 mutací na tkáň a zvíře by mělo být dostatečné pro jednoduché určení, zda klonální mutace přispívají k četnosti mutací. Sekvenování až 25 mutací bude možná nutné pro matematickou korekci četnosti mutací na klonalitu. O sekvenování mutací lze také uvažovat při zjištění malého nárůstu četnosti mutací (tj. mírné překročení hodnot kontrol bez aplikace). Rozdíly ve spektru mutací mezi koloniemi mutací ze zvířat, jimž je a není

▼M5

podávána látka, mohou podpořit rozhodnutí o mutagenním účinku (29). Spektra mutací mohou být rovněž užitečná pro formulování mechanistických hypotéz. Má-li být sekvenování zahrnuto do provedení studie, je třeba věnovat speciální pozornost plánování takových studií, zvláště s ohledem na počet mutací sekvenovaných na jeden vzorek, aby bylo možné dosáhnout adekvátní síly experimentu vzhledem k použitému statistickému modelu (viz odstavec 43).

POSTUP

Počet a pohlaví zvířat

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

Doba podávání

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

Dávkování

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

▼M5

dávek a každý případ by měl být hodnocen individuálně. Použité dávky by měly pokrývat rozpětí dané maximální a minimální toxicitou, případně nulovou toxicitou.

Limitní zkouška

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

Podávání dávek

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

Doba odběru vzorků

Somatické buňky

30. Doba odběru vzorků je kritická proměnná, protože je určována dobou potřebnou pro fixaci mutací. Toto období závisí na příslušné tkáni a zdá se, že souvisí s dobou obratu buněčné populace, přičemž kostní dřeň a střevo reagují rychle a játra jsou mnohem pomalejší. Vhodným kompromisem pro měření četností mutací v rychle a pomalu se množících tkáních je 28 po sobě jdoucích každodenních aplikací (jak je uvedeno v odstavci 26) a odběr vzorků tři dny po konečné aplikaci, ačkoli za těchto podmínek se maximální četnost mutací v pomalu rostoucích tkáních nemusí projevit. Pokud jsou pomalu rostoucí tkáně obzvláště důležité, pak bude možná vhodnější pozdější doba odběru vzorků, a to 28 dní následujících po 28denní době podávání. V takových případech by pozdější doba odběru vzorků nahradila třídenní dobu odběru a musela by být vědecky odůvodněna.

▼M5

Zárodečné buňky

31. Zkoušky TGR jsou velmi vhodné pro studii indukce genových mutací v samčích zárodečných buňkách (7) (8) (27), kde je dobře definováno načasování a kinetika spermatogeneze (27). Nízké počty vajíček dostupných pro analýzu, dokonce i po superovulaci, a skutečnost, že v oocytu neprobíhá žádná syntéza DNA, vylučují detekci mutací v samičích zárodečných buňkách pomocí transgenních zkoušek (31).

32. Doby odběru vzorků pro samčí zárodečné buňky by měly být zvoleny tak, aby byl pokryt celý rozsah exponovaných buněčných typů po celou dobu vývoje zárodečných buněk a pro buňky ve stadiu zachyceném dobou odběru byla zajištěna dostatečná expozice. Progrese vývoje zárodečných buněk ze spermatogonálních kmenových buněk ve zralou spermii, která se dostane do chámovodu/ocasu nadvarletetrvá ~49 dnů u myší (36) a ~70 dnů u potkanů (34) (35). Po 28denní expozici s následnou třídenní dobou odběru vzorků budou akumulované spermie odebrané z chámovodu/ocasu nadvarlete (7)(8) představovat populaci buněk, které byly předmětem expozice přibližně během druhé poloviny spermatogeneze, která zahrnuje meiotické a postmeiotické období, nikoli však spermatogonální období nebo období kmenových buněk. Pro adekvátní odběr vzorků buněk z chámovodu/ocasu nadvarlete, které byly během období expozice spermatogonálními kmenovými buňkami, je vyžadována další doba odběru vzorků v minimální délce sedmi týdnů (myši) nebo deseti týdnů (potkani) po ukončení aplikace.

33. Buňky vypuzené ze semenných tubulů po režimu 28 + 3 dny zahrnují smíšenou populaci obohacenou pro všechna stadia vývoje zárodečných buněk (7) (8). Odběr vzorků těchto buněk pro detekci genových mutací nezajišťuje tak přesné posouzení stadií, v nichž jsou indukovány mutace zárodečných buněk, jakého lze dosáhnout při odběru vzorků spermií z chámovodu/ocasu nadvarlete (z tubulů se totiž odebírají vzorky celé řady typů zárodečných buněk a tato buněčná populace bude kontaminována určitými somatickými buňkami). Odběr vzorku buněk ze semenných tubulů vedle spermií z chámovodu/ocasu nadvarlete po režimu odběru 28 + 3 dny by ale zajistil určité pokrytí buněk exponovaných ve většině fází vývoje zárodečných buněk a může být užitečný pro zjišťování určitých mutagenů zárodečných buněk.

Pozorování

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

▼M5

Odběr tkání

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

Uskladnění tkání a DNA

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

Výběr tkání pro analýzu mutací

37. Výběr tkání by měl vycházet z úvah jako: 1) způsob podání nebo místo prvního kontaktu (např. žláznatý žaludek, dochází-li k orální aplikaci, plíce, probíhá-li aplikace formou inhalace, nebo kůže, pokud byla použita místní aplikace); a 2) farmakokinetické parametry pozorované ve studiích obecné toxikologie, které ukazují na distribuci ve tkáních, retenci nebo akumulaci nebo cílové orgány pro toxicitu. Pokud jsou studie prováděny s cílem navázat na studie karcinogenity, měly by být zváženy cílové tkáně pro karcinogenitu. Výběr tkání pro analýzu by měl maximalizovat zjišťování účinků chemických látek, které jsou přímo působícími mutageny *in vitro*, které jsou rychle metabolizované, vysoce reaktivní nebo nedostatečně absorbované, nebo ty, pro které je cílová tkáň určena způsobem aplikace (6).

38. Nejsou-li k dispozici základní informace, a s přihlédnutím k místu kontaktu z důvodu způsobu aplikace by měla být mutagenita detekována v játrech a nejméně jedné rychle se dělící tkáni (např. žláznatý žaludek nebo kostní dřeň). Ve většině případů lze výše uvedených požadavků dosáhnout analýzou dvou pečlivě vybraných tkání, avšak někdy budou zapotřebí tři nebo více tkání. Existují-li důvody specifického zájmu o účinky na zárodečné buňky, včetně pozitivních výsledků získaných v somatických buňkách, pak měly být mutace zjišťovány i v zárodečných buňkách.

Metody měření

39. Pro doporučené transgenní modely jsou k dispozici standardní laboratorní nebo publikované metody pro zjišťování mutací: lambda bakteriofág a plazmid *lacZ* (30), myš *lacI* (2) (18), delta myš *gpt* (22), delta potkan *gpt* (28), *cII* (17). Modifikace by měly být odůvodněny a náležitě zdokumentovány. Lze agregovat a k dosažení vhodného počtu plaků nebo kolonií

▼M5

použít údaje z několika sbalení. Potřeba velkého počtu sbalování pro dosažení vhodného počtu plaků může být známkou nízké kvality DNA. V takových případech by údaje měly být brány v úvahu obezřetně, protože mohou být nespolehlivé. Optimální celkový počet plaků nebo kolonií na jeden vzorek DNA je upravován podle statistické pravděpodobnosti zjištění dostatečných počtů mutací při dané spontánní četnosti mutací. Obecně je požadováno minimálně 125 000 až 300 000 plaků, pokud spontánní četnost mutací je v řádu 3×10^{-5} (15). U zkoušky Big Blue® *lacI* je důležité prokázat, že celý rozsah barevných fenotypů mutací lze zjistit zahrnutím příslušných barevných kontrol souběžných s každým nanesením. Tkáně a výsledné vzorky (položky) by se měly zpracovávat a analyzovat pomocí blokového přístupu, kde jsou položky z kontrolní skupiny vehikulum/rozpouštědlo, ze skupiny pozitivní kontroly (je-li použita) nebo DNA pozitivní kontroly (je-li to relevantní) a z každé experimentální skupiny zpracovány společně.

ÚDAJE A ZPRÁVY

Zpracování výsledků

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

Statistické vyhodnocení a interpretace výsledků

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

42. Zkoušená chemická látka, pro kterou výsledky nesplňují výše uvedená kritéria v žádné tkáni, je v této zkoušce považována za nemutagenní. Pro potvrzení biologického významu negativního výsledku by měla být prokázána expozice tkáně.

43. Pro výsledky získané sekvenováním DNA je k dispozici celá řada statistických přístupů, které jsou nápomocny při interpretaci výsledků (1) (5) (9) (19).

44. Při hodnocení biologického významu reakce může být vodítkem posouzení, zda jsou zjištěné hodnoty uvnitř nebo vně rozsahu historických kontrolních hodnot (32).

▼M5

Závěrečná zpráva

45. Závěrečná zprávaby měla obsahovat následující informace:

Zkoušená chemická látka:

— identifikační údaje a číslo CAS, je-li známo,

— zdroj, číslo šarže, je-li k dispozici,

— skupenství a čistota,

— fyzikálně-chemické vlastnosti významné pro provedení studie,

— stabilita zkoušené chemické látky, je-li známa.

Rozpouštědlo/vehikulum:

— zdůvodnění volby vehikula,

— rozpustnost a stabilita zkoušené chemické látky v rozpouštědle/vehikulu, je-li známa,

— příprava potravy, pitné vody nebo inhalačních aplikačních forem,

— analytická stanovení aplikační formy (např. stabilita, homogenita, nominální koncentrace).

Pokusná zvířata:

— použitý druh/kmen a odůvodnění výběru,

— počet, stáří a pohlaví zvířat,

— zdroj, podmínky chovu, potrava atd.,

— individuální hmotnost zvířat na počátku zkoušky, včetně rozpětí tělesné hmotnosti, střední hodnoty a směrodatné odchylky pro každou skupinu.

Zkušební podmínky:

— údaje o pozitivní a negativní (vehikulum/rozpouštědlo) kontrole,

— údaje ze studie pro stanovení rozmezí dávek,

— zdůvodnění zvolených úrovní dávek,

— podrobnosti o přípravě zkoušené chemické látky,

— podrobnosti o způsobu podávání zkoušené chemické látky,

— zdůvodnění způsobu podávání,

— metody zjišťování toxicity, včetně případně histopatologických nebo hematologických analýz a četnosti, s jakou jsou prováděna pozorování zvířat, a četnosti vážení,

— metody ověřování, zda se zkoušená chemická látka dostala k cílové tkáni, nebo ověřování obecné cirkulace, pokud byly získány negativní výsledky,

▼M5

— skutečná dávka (mg/kg tělesné hmotnosti na den) vypočítaná z koncentrace zkoušené chemické látky v potravě/pitné vodě (ppm) a ze spotřeby, je-li to relevantní,

— podrobnosti o jakosti krmení a vody,

— podrobný popis harmonogramů aplikace a odběru vzorků a odůvodnění výběru konkrétního schématu,

— způsob utracení,

— postupy izolace a uchovávání tkání,

— metody izolace genomické DNA hlodavců, získání transgenu z genomické DNA a přenos transgenní DNA do bakteriálního hostitele,

— zdroje a čísla šarží všech buněk, sad a chemických činidel (je-li to relevantní),

— metody počítání mutací,

— metody molekulární analýzy mutací a použití při korekci pro klonalitu a/nebo výpočet četností mutací, jsou-li použitelné.

Výsledky:

— stav zvířat před zkouškou a během zkoušky, včetně známek toxicity,

— tělesná hmotnost a hmotnost orgánů při utracení,

— pro každou tkáň/zvíře počet mutací, počet hodnocených plaků nebo kolonií, četnost mutací,

— pro každou tkáň/skupinu zvířat počet reakcí sbalování na jeden vzorek DNA, celkový počet mutací, střední četnost mutací, směrodatná odchylka,

— podle možnosti závislost odpovědi na dávce,

— pro každou tkáň/zvíře počet nezávislých mutací a střední četnost mutací, pokud byla provedena molekulární analýza mutací,

— souběžné a dosavadní údaje o negativní kontrole s rozpětími, středními hodnotami a směrodatnými odchylkami,

— údaje o souběžné pozitivní kontrole (nebo nesouběžné pozitivní kontrole DNA),

— analytická stanovení, jsou-li k dispozici (např. koncentrace DNA použité při sbalování, údaje o sekvenování DNA),

— použité statistické analýzy a metody.

Diskuse o výsledcích

Závěr

▼**M5**

LITERATURA

1) *Adams,* W.T. and T.R. *Skopek* (1987), 'Statistical *Test* for the Comparison of Samples from Mutational Spectra', *J. Mol. Biol*., 194: 391–396.

2) Bielas, J.H. (2002), 'A more Efficient Big Blue® Protocol Improves Transgene Rescue and Accuracy in an Adduct and Mutation Measurement', *Mutation Res*., 518: 107–112.

3) Boerrigter, M.E., M.E. Dollé, H.-J. Martus, J.A. Gossen and J. Vijg (1995), 'Plasmid-based Transgenic Mouse Model for Studying *in vivo* Mutations' *Nature*, 377(6550): 657–659.

4) Carr, G.J. and N.J. Gorelick (1995), 'Statistical Design and Analysis of Mutation Studies in Transgenic Mice*', Environ. Mol. Mutagen*, 25(3): 246–255.

5) Carr, G.J. and N.J. Gorelick (1996), 'Mutational Spectra in Transgenic Animal Research: Data Analysis and Study Design Based upon the Mutant or Mutation Frequency', *Environ. Mol. Mutagen,* 28: 405–413.

6) Dean, S.W., T.M. Brooks, B. Burlinson, J. Mirsalis, B. Myhr, L. Recio and V. Thybaud (1999), 'Transgenic Mouse Mutation Assay Systems can Play an important Role in Regulatory Mutagenicity Testing *in vivo* for the Detection of Site-of-contact Mutagens', *Mutagenesis*, 14(1): 141–151.

7) Douglas, G.R., J. Jiao, J.D. Gingerich, J.A. Gossen and L.M. Soper(1995), 'Temporal and Molecular Characteristics of Mutations Induced by Ethylnitrosourea in Germ Cells Isolated from Seminiferous Tubules and in Spermatozoa of *lacZ* Transgenic Mice', *Proc. Proc. Acad. Sci. Tecn. USA*, 92: 7485–7489.

8) Douglas, G.R*.,* J.D. Gingerich, L.M. Soper and J. Jiao (1997), 'Toward an Understanding of the Use of Transgenic Mice for the Detection of Gene Mutations in Germ Cells', *Mutation Res*., 388(2-3): 197–212.

9) Dunson, D.B. and K.R. Tindall (2000), 'Bayesian Analysis of Mutational Spectra', *Genetics*, 156: 1411–1418.

10) Gossen, J.A., W.J. de Leeuw, C.H. Tan, E.C. Zwarthoff, F. Berends, P.H. Lohman, D.L. Knook and J. Vijg(1989), 'Efficient Rescue of Integrated Shuttle Vectors from Transgenic Mice: a Model for Studying Mutations *in vivo', Proc. Proc. Acad. Sci. Tecn. USA,* 86(20): 7971–7975.

11) Gossen, J.A. and J. Vijg (1993), 'A Selective System for lacZ-Phage using a Galactose-sensitive *E. coli* Host', *Biotechniques*, 14(3): 326, 330.

12) Erikson, R.P. (2003), 'Somatic Gene Mutation and Human Disease other than Cancer', *Mutation Res*., 543: 125–136.

13) Erikson, R.P. (2010), 'Somatic Gene Mutation and Human Disease other than Cancer: an Update', *Mutation Res.*, 705: 96–106.

14) Fung, K.Y., G.R. Douglas and D. Krewski (1998), 'Statistical Analysis of *lacZ* Mutant Frequency Data from Muta™Mouse Mutagenicity Assays', *Mutagenesis*, 13(3): 249–255.

15) Heddle, J.A., S. Dean, T. Nohmi, M. Boerrigter, D. Casciano, G.R. Douglas, B.W. Glickman, N.J. Gorelick, J.C. Mirsalis, H.-J Martus, T.R. Skopek, V. Thybaud, K.R.Tindall and N. Yajima (2000), '*In vivo* Transgenic Mutation Assays', *Environ. Mol. Mutagen*., 35: 253–259.

16) Heddle, J.A., H.-J. Martus and G.R. Douglas (2003), 'Treatment and Sampling Protocols for Transgenic Mutation Assays', *Environ. Mol. Mutagen.*, 41: 1–6.

▼**M5**

17) Jakubczak, J.L., G. Merlino, J.E. French, W.J. Muller, B. Paul, S. Adhya and S. Garges (1996), ‚Analysis of Genetic Instability during Mammary Tumor Progression using a novel Selection-based Assay for *in vivo* Mutations in a Bacteriophage λ Transgene Target', *Proc. Proc. Acad. Sci. Tecn. USA*, 93(17): 9073–9078.

18) Kohler, S.W., G.S. Provost, P.L. Kretz, A. Fieck, J.A. Sorge and J.M. Short (1990), 'The Use of Transgenic Mice for Short-term, *in vivo* Mutagenicity Testing', Genet. Anal. Tech. Appl., 7(8): 212–218.

19) Lewis P.D., B. Manshian, M.N. Routledge, G.B. Scott and P.A. Burns (2008), 'Comparison of Induced and Cancer-associated Mutational Spectra using Multivariate Data Analysis', Carcinogenesis, 29(4): 772–778.

20) Nohmi, T., M. Katoh, H. Suzuki, M. Matsui, M. Yamada, M. Watanabe, M. Suzuki, N. Horiya, O. Ueda, T. Shibuya, H. Ikeda and T. Sofuni (1996), 'A new Transgenic Mouse Mutagenesis Test System using Spi – and 6-thioguanine Selections', Environ. Mol. Mutagen., 28(4): 465–470.

21) Nohmi, T., M. Suzuki, K. Masumura, M. Yamada, K. Matsui, O. Ueda, H. Suzuki, M. Katoh, H. Ikeda and T. Sofuni (1999), 'Spi $^-$ Selection: an Efficient Method to Detect γ-ray-induced Deletions in Transgenic Mice', *Environ. Mol. Mutagen*., 34(1): 9–15.

22) Nohmi, T., T. Suzuki and K.I. Masumura (2000), 'Recent Advances in the Protocols of Transgenic Mouse Mutation Assays', *Mutation Res.*, 455(1–2): 191–215.

23) OECD (2000), Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation, Series on Testing and Assessment, N^{o}19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris.

24) OECD (2009), Detailed Review Paper on Transgenic Rodent Mutation Assays, Series on Testing and Assessment, N^o 103, ENV/JM/MONO(2009)7, OECD, Paris.

25) Piegorsch, W.W., B.H. Margolin, M.D. Shelby, A. Johnson, J.E. French, R.W. Tennant and K.R. Tindall (1995), 'Study Design and Sample Sizes for a lacI Transgenic Mouse Mutation Assay', Environ. Mol. Mutagen., 25(3): 231–245.

26) Piegorsch, W.W., A.C. Lockhart, G.J. Carr, B.H. Margolin, T. Brooks, ... G.R. Douglas, U.M. Liegibel, T. Suzuki, V. Thybaud, J.H. van Delft and N.J. Gorelick (1997), 'Sources of Variability in Data from a Positive Selection lacZ Transgenic Mouse Mutation Assay: an Interlaboratory Study', Mutation. Res., 388(2–3): 249–289.

27) Singer, T.M., I.B. Lambert, A. Williams, G.R. Douglas and C.L. Yauk (2006), 'Detection of Induced Male Germline Mutation: Correlations and Comparisons between Traditional Germline Mutation Assays, Transgenic Rodent Assays and Expanded Simple Tandem Repeat Instability Assays', Mutation. Res., 598: 164–193.

28) Toyoda-Hokaiwado, N., T. Inoue, K. Masumura, H. Hayashi, Y. Kawamura, Y. Kurata, M. Takamune, M. Yamada, H. Sanada, T. Umemura, A. Nishikawa and T. Nohmi (2010), 'Integration of *in vivo* Genotoxicity and Short-term Carcinogenicity Assays using F344 gpt delta Transgenic Rats: *in vivo* Mutagenicity of 2,4-diaminotoluene and 2,6-diaminotoluene Structural Isomers', Toxicol. Sci., 114(1): 71–78.

29) Thybaud, V., S. Dean, T. Nohmi, J. de Boer, G.R. Douglas, B.W. Glickman, N.J. Gorelick, J.A. Heddle, R.H. Heflich, I. Lambert, H.-J. Martus, J.C. Mirsalis, T. Suzuki and N. Yajima (2003), '*In vivo* Transgenic Mutation Assays', *Mutation Res*., 540: 141–151.

30) Vijg, J. and G.R. Douglas (1996), 'Bacteriophage λ and Plasmid *lacZ* Transgenic Mice for studying Mutations *in vivo*' in: G. Pfeifer (ed.), *Technologies for Detection of DNA Damage and Mutations, Part II,* Plenum Press, New York, NY, USA, s. 391–410.

▼**M5**

31) Yauk, C.L., J.D. Gingerich, L. Soper, A. MacMahon, W.G. Foster and G.R. Douglas (2005), 'A *lacZ* Transgenic Mouse Assay for the Detection of Mutations in Follicular Granulosa Cells', *Mutation Res*., 578(1–2): 117–123.

32) Hayashi, M., K. Dearfield, P. Kasper, D. Lovell, H.-J. Martus, V. Thybaud (2011), 'Compilation and Use of Genetic Toxicity Historical Control Data', Mutation Res., doi:10.1016/j.mrgentox.2010.09.007.

33) OECD (2011), *Retrospective Performance Assessment of OECD Test Guideline on Transgenic Rodent Somatic and Germ Cell Gene Mutation Assays*, Series on Testing and Assessment, N° 145, ENV/JM/MONO(2011)20, OECD, Paris.

34) Clermont, Y. (1972), 'Kinetics of spermatogenesis in mammals seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal'. Physiol. Rev. 52: 198–236.

35) Robaire, B., Hinton, B.T., and Oregbin-Crist, M.-C. (2006), 'The Epididymis', in Neil, J.D., Pfaff, D.W., Chalis, J.R.G., de Kretser, D.M., Richards, J.S., and P. M, Wassarman (eds.), Physiology of Reproduction, Elsevier, the Netherlands, s. 1071–1148.

36) Russell, L.B. (2004), 'Effects of male germ-cell stage on the frequency, nature, and spectrum of induced specific-locus mutations in the mouse', Genetica, 122: 25–36.

▼M5

Dodatek

DEFINICE

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

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

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

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

Elektroporace: aplikace elektrických impulzů pro zvýšení propustnosti buněčných membrán.

Endogenní gen: vlastní gen genomu.

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

Chemická látka: látka nebo směs.

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

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

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

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

Kapsida: bílkovinné pouzdro, které obklopuje virovou částici.

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

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

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

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

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

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

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

Pozitivní selekce: metoda, díky níž přežívají pouze mutace.

▼M5

Reporterový gen: gen, jehož mutace se snadno zjišťuje.

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

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

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

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

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

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

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

▼M7

B.59 SENZIBILIZACE KŮŽE *IN CHEMICO*: ZKOUŠKA PŘÍMÉ REAKTIVITY PEPTIDŮ (DPRA)

ÚVOD

Tato zkušební metoda je rovnocenná Pokynu OECD pro zkoušení (TG) č. 442C (2015). Jako látka senzibilizující kůži se označuje látka, která po styku s kůží vyvolává alergickou odpověď, jak ji definuje globálně harmonizovaný systém klasifikace a označování chemických látek Organizace spojených národů (GHS OSN) (1) a nařízení Evropské unie (ES) č. 1272/2008 o klasifikaci, označování a balení látek a směsí (CLP) [1]. Tato zkušební metoda popisuje postup *in chemico* (zkoušku přímé reaktivity peptidů – DPRA), který se má podpůrně použít k rozlišování mezi látkami senzibilizujícími kůži a látkami nesenzibilizujícími kůži v souladu s GHS OSN a CLP.

Existuje všeobecná shoda, pokud jde o klíčové biologické procesy, jež zapříčiňují senzibilizaci kůže. Dosavadní znalosti o chemických a biologických mechanismech souvisejících se senzibilizací kůže byly shrnuty ve formě Dráhy nežádoucího účinku (AOP) (2) počínaje molekulární iniciační událostí přes průběžné události až po nepříznivý účinek, a sice alergickou kontaktní dermatitidu u lidí nebo kontaktní přecitlivělost u hlodavců. V rámci AOP pro senzibilizaci kůže je molekulární iniciační událostí kovalentní vazba elektrofilních látek na nukleofilní centra v kožních proteinech.

Hodnocení senzibilizace kůže bylo obvykle prováděno na pokusných zvířatech. Klasické metody založené na morčatech, Magnussonova-Klingmannova maximalizační zkouška na morčatech (GPMT) a Bühlerova zkouška (zkušební metoda B.6 (3)), studují indukční i provokační fázi senzibilizace kůže. Uznána byla i zkouška na myších, a sice zkouška s vyšetřením lokálních lymfatických uzlin (LLNA, zkušební metoda B.42 (4)) a její dvě neradioaktivní modifikace, LLNA: DA (zkušební metoda B.50 (5)) a LLNA: BrdU-ELISA (zkušební metoda B.51 (6)), které všechny posuzují výlučně odpověď na indukci; neboť ve srovnání se zkouškami na morčatech jsou vhodnější z hlediska dobrého zacházení se zvířaty a objektivního měření indukční fáze senzibilizace kůže.

V poslední době jsou za vědecky platné metody pro hodnocení nebezpečnosti chemických látek pro senzibilizaci kůže považovány mechanisticky založené zkušební metody *in chemico* a *in vitro*. Protože však každá z těchto nyní dostupných zkušebních metod bez použití zvířat mechanisticky pokrývá AOP jen v omezeném rozsahu, bude pro úplné nahrazení nyní používaných zkoušek na zvířatech zapotřebí kombinace metod bez použití zvířat (*in silico*, *in chemico*, *in vitro*) v rámci integrovaného přístupu ke zkouškám a posuzování (IATA) (2) (7).

Zkouška DPRA je navržena ke zkoumání molekulární iniciační události AOP pro senzibilizaci kůže, konkrétně reaktivity proteinů, pomocí kvantifikace reaktivity zkoušených chemických látek vůči modelovým syntetickým peptidům obsahujícím lysin nebo cystein (8). Na základě procentuálních hodnot úbytku cysteinových a lysinových peptidů se pak látka zařadí do jedné ze čtyř tříd reaktivity, což pomáhá rozlišovat mezi látkami senzibilizujícími kůži a látkami nesenzibilizujícími kůži (9).

[1] Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1272/2008 ze dne 16. prosince 2008 o klasifikaci, označování a balení látek a směsí, o změně a zrušení směrnic 67/548/EHS a 1999/45/ES a o změně nařízení (ES) č. 1907/2006, Úř. věst. L 353, 31.12.2008, s. 1.

▼M7

Zkušební metoda DPRA byla validována ve validační studii provedené pod vedením Referenční laboratoře Evropské unie pro alternativy ke zkouškám na zvířatech (EURL ECVAM), následně byla podrobena nezávislé odborné revizi, kterou provedl vědecký poradní výbor (ESAC) EURL ECVAM, a uznána za vědecky platnou (10) pro použití v rámci integrovaných přístupů IATA na podporu rozlišení mezi látkami senzibilizujícími a nesenzibilizujícími kůži pro účely klasifikace a označování nebezpečnosti. Příklady využití údajů DPRA v kombinaci s jinými informacemi jsou uvedeny v odborné literatuře (11) (12) (13) (14).

Definice jsou uvedeny v dodatku 1.

VÝCHOZÍ ÚVAHY, POUŽITELNOST A OMEZENÍ

Korelace mezi reaktivitou proteinů a potenciálem senzibilizace kůže byla spolehlivě zjištěna (15) (16) (17). Ačkoli se jedná o molekulární iniciační události AOP pro senzibilizace kůže, vazba na proteiny představuje pouze jeden klíčový jev, takže informace o reaktivitě proteinů získané zkušebními i nezkušebními metodami nemusí samy o sobě stačit k vyvození závěru o neexistenci potenciálu chemických látek způsobovat senzibilizaci kůže. Údaje získané pomocí této zkušební metody by proto měly být zvažovány v kontextu integrovaných přístupů, jako je např. IATA, v kombinaci s jinými doplňujícími informacemi např. pocházejícími ze zkoušek *in vitro* zkoumajících jiné klíčové události v rámci metody AOP pro stanovení senzibilizace kůže, jakož i z nezkušebních metod včetně údajů odvozených z analogických chemických látek.

Tuto zkušební metodu lze v kombinaci s jinými doplňujícími informacemi v rámci přístupu IATA použít na podporu rozlišení mezi látkami senzibilizujícími kůži (tj. kategorie 1 GHS OSN /CLP) a látkami nesenzibilizujícími kůži. Tuto zkušební metodu nelze používat samu o sobě ani k zařazení látek senzibilizujících kůži do podkategorií 1A a 1B, jak je definuje systém GHS OSN / CLP, ani k predikci účinnosti těchto látek při rozhodování v rámci posuzování bezpečnosti. V závislosti na regulačním rámci však kladný výsledek získaný zkušební metodou DPRA může být použit sám o sobě ke klasifikaci chemické látky v kategorii 1 GHS OSN / CLP.

U zkušební metody DPRA se prokázalo, že ji lze přenést do laboratoří, které mají zkušenosti s analýzou pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC). Míra reprodukovatelnosti předpovědí, které lze od této zkušební metody očekávat, činí řádově 85 % v rámci laboratoří a 80 % mezi laboratořemi (10). Výsledky validační studie (18) a zveřejněných studií (19) celkově ukazují, že přesnost zkušební metody DPRA při odlišení senzibilizujících látek (tj. kategorie 1 GHS OSN / CLP) od nesenzibilizujících látek činí 80 % (N=157) při citlivosti 80 % (88/109) a specifičnosti 77 % (37/48) ve srovnání s výsledky zkušební metody LLNA. V případě DPRA je pravděpodobnější, že povede k příliš nízké předpovědi u chemických látek vykazujících nízkou až střední potenci způsobovat senzibilizaci kůže (tj. podkategorie 1B GHS OSN / CLP), než u chemických látek vykazujících vysokou potenci způsobovat senzibilizaci kůže (tj. podkategorie 1A GHS OSN / CLP (18) (19). Zde uvedené hodnoty přesnosti DPRA jako samostatné zkušební metody jsou však pouze orientační, protože tato zkušební metoda by měla být zvažována v kombinaci s jinými zdroji informací v rámci přístupu IATA a v souladu s ustanoveními odstavce 9 výše. Při hodnocení metod posuzování senzibilizace kůže bez použití zvířat by se dále mělo vést v patrnosti, že ani zkouška LLNA, ani jiné zkoušky na zvířatech nemusí plně odrážet situaci existující u druhu, který je předmětem zájmu, tj. u lidí. Na základě celkových dostupných údajů bylo prokázáno, že zkušební metodu DPRA lze použít v případě zkoušených chemických látek, jež obsahují různé organické funkční skupiny, mají různé reakční mechanismy, různou potenci způsobovat senzibilizaci kůže (jak bylo stanoveno ve studiích *in vivo*) a různé fyzikálně-chemické vlastnosti (8) (9) (10) (19). Celkově vzato z těchto informací vyplývá, že zkušební metoda DPRA je užitečná a může přispět ke zjištění nebezpečí senzibilizace kůže.

▼M7

Termín „zkoušená chemická látka“ se v této zkušební metodě používá k označení toho, co se zkouší, a nesouvisí s použitelností zkušební metody DPRA ke zkoušení látek a/nebo směsí. Tuto zkušební metodu nelze použít k testování sloučenin kovů, protože je o nich známo, že s proteiny reagují prostřednictvím jiných mechanismů, než je kovalentní vazba. Zkoušená chemická látka by měla být rozpustná ve vhodném rozpouštědle při konečné koncentraci 100 mM (viz odstavec 18). Chemické látky, které nejsou při této koncentraci rozpustné, je nicméně přesto možné testovat při koncentracích nižších, ve kterých jsou rozpustné. V takovém případě by přesto mohl být pozitivní výsledek použit na podporu identifikace zkoušené chemické látky jako látky senzibilizující kůži, avšak z negativního výsledku by se neměl vyvozovat závěr, že není dostatečné reaktivní. V současnosti jsou k dispozici jen omezené informace o použitelnosti zkušební metody DPRA ke zkoušení směsí se známým složením (18) (19). DPRA je nicméně považována za technicky použitelnou k testování vícesložkových látek a směsí se známým složením (viz odstavec 10). Před použitím této zkušební metody ke zkoušení směsi za účelem získání údajů pro zamýšlené použití v právních předpisech by mělo být zváženo, zda tato metoda může pro tento účel poskytnout přiměřené výsledky, a pokud ano, proč je tomu tak. Takové posouzení není nutné, pokud existuje právní požadavek na zkoušení dané směsi. Vzhledem k definovanému molárnímu poměru zkoušené chemické látky k peptidu není možné stávající predikční model použít ke zkoušení komplexních směsí s neznámým složením nebo látek s neznámým nebo proměnlivým složením, komplexních reakčních produktů nebo biologického materiálu (tj. látek UVCB). Pro tento účel bude nutné vyvinout nový predikční model založený na gravimetrické metodě. V případech, kdy mohou být předloženy důkazy prokazující nepoužitelnost této zkušební metody ke zkoušení jiných specifických kategorií chemických látek, neměla by se tato zkušební metoda na tyto specifické kategorie chemických látek používat.

Tato zkušební metoda je metodou *in chemico*, která nezahrnuje metabolický systém. Pomocí této zkušební metody není možné detekovat chemické látky, které pro prokázání svého potenciálu senzibilizace kůže potřebují enzymatickou bioaktivaci (tj. prohapteny). V literatuře se uvádí, že v některých případech byly za pomocí této zkušební metody správně detekovány chemické látky, které se stávají senzibilizujícími látkami po abiotické přeměně (tj. prehapteny) (18). Vzhledem k výše uvedenému by se měly negativní výsledky získané touto zkušební metodou interpretovat v kontextu stanovených omezení a ve spojení s jinými zdroji informací v rámci přístupu IATA. Při zkoušení chemických látek, které se na peptidy kovalentně neváží, ale podporují jejich oxidaci (dimerizaci cysteinů), by mohlo potenciálně dojít k příliš vysokému odhadu úbytku peptidů, což může vést k falešným pozitivním předpovědím a/nebo k zařazení do vyšší třídy reaktivity (viz odstavce 29 a 30).

Jak bylo popsáno výše, zkušební metoda DPRA pomáhá rozlišovat mezi látkami senzibilizujícími kůži a látkami nesenzibilujícími kůži. Může však také potenciálně přispět k hodnocení senzibilizační potence (11), je-li používána v rámci integrovaných přístupů, například IATA. Pro určení toho, jak mohou výsledky DPRA potenciálně přispět k posuzování potence, však bude nutný další výzkum, přednostně založený na údajích o účincích na člověka.

PODSTATA ZKOUŠKY

DPRA je metoda *in chemico*, která kvantifikuje zbytkovou koncentraci peptidů obsahujících cystein nebo lysin po 24hodinové inkubaci se zkoušenou chemickou látkou při teplotě 25 ± 2,5 °C. K usnadnění detekce obsahují syntetické peptidy fenylalanin. Relativní koncentrace peptidů se měří pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) s gradientovou elucí a UV detekcí při vlnové délce 220 nm. Poté se vypočítají procentuální hodnoty úbytku cysteinových a lysinových peptidů a použijí se v predikčním modelu (viz odstavec 29), což umožní zařadit zkoušenou chemickou látku do jedné ze čtyř tříd reaktivity, které se podpůrně používají k rozlišení mezi senzibilizujícími a nesenzibilizujícími látkami.

▼M7

Před rutinním používáním popsané metody, která se řídí touto zkušební metodou, by měly laboratoře prokázat odbornou způsobilost použitím deseti látek pro prokazování způsobilosti, které jsou uvedeny v dodatku 2.

POSTUP

Tato zkušební metoda je založena na protokolu DPRA DB-ALM č. 154 (20), což je protokol použitý při validační studii provedené za koordinace EURL ECVAM. Při provádění a používání této metody v laboratoři se doporučuje použít tento protokol. Dále je uveden popis hlavních složek a postupů zkušební metody DPRA. Použije-li se jiné nastavení vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC), měla by být prokázána jeho rovnocennost validovanému nastavení, které je popsáno v protokolu DB-ALM (např. testováním vhodných látek uvedených v dodatku 2).

Příprava peptidů obsahujících cystein nebo lysin

Zásobní roztoky cysteinu (Ac-RFAACAA-COOH) a lysinu (Ac-RFAAKAA-COOH) obsahující syntetické peptidy o čistotě vyšší než 85 % a přednostně v rozmezí 90–95 % by se měly připravovat čerstvé bezprostředně před jejich inkubací se zkoušenou chemickou látkou. Konečná koncentrace cysteinových peptidů ve fosfátovém pufru s pH 7,5 by měla být 0,667 mM a konečná koncentrace lysinových peptidů v pufru octanu amonného s pH 10,2 by měla být 0,667 mM. Série provedení HPLC by se měla nastavit tak, aby trvání analýzy HPLC bylo kratší než 30 hodin. Při nastavení HPLC použitém ve validační studii a popsaném v této zkušební metodě je možné v rámci jednoho provedení HPLC zpracovat až 26 analytických vzorků (jež zahrnují vzorky se zkoušenou chemickou látkou, pozitivní kontrolu a přiměřený počet kontrol s rozpouštědlem na základě počtu jednotlivých rozpouštědel použitých ve zkoušce, přičemž každý z nich se testuje třikrát). U všech replik analyzovaných v rámci jednoho provedení by měly být použity totožné zásobní roztoky cysteinových a lysinových peptidů. U jednotlivých šarží peptidů se před použitím doporučuje ověřit správnou rozpustnost.

Příprava zkoušené chemické látky

Před provedením zkoušky by měla být posouzena rozpustnost zkoušené chemické látky ve vhodném rozpouštědle za dodržení postupu rozpouštění popsaného v protokolu DPRA DB-ALM (20). Ve vhodném rozpouštědle se zkoušená chemická látka rozpustí beze zbytku. Jelikož při zkoušce DPRA se zkoušená chemická látka inkubuje ve velkém přebytku s cysteinovými nebo lysinovými peptidy, stačí k ověření toho, že se zkoušená chemická látka (a všechny její složky v případě zkoušení vícesložkové látky nebo směsi) rozpustila, vizuální kontrola tvorby čirého roztoku. Vhodnými rozpouštědly jsou acetonitril, voda, směs voda/acetonitril v poměru 1:1, izopropanol, aceton nebo směs aceton/acetonitril v poměru 1:1. Lze použít i jiná rozpouštědla, pokud nemají vliv na stabilitu peptidů, sledovanou pomocí referenční kontroly C (tj. vzorky sestávající pouze z peptidů rozpuštěných ve vhodném rozpouštědle; viz dodatek 3). Poslední možností, není-li zkoušená chemická látka rozpustná v žádném z těchto rozpouštědel, je pokusit se ji rozpustit ve 300 µl DMSO a výsledný roztok zředit přidáním 2 700 µl acetonitrilu, a pokud zkoušená chemická látka není v této směsi rozpustná, pokusit se rozpustit stejné množství zkoušené chemické látky v 1 500 µl DMSO a výsledný roztok zředit přidáním 1 500 µl acetonitrilu. Zkoušená chemická látka by měla být předem odměřena do skleněných zkumavek a bezprostředně před zkoušením rozpuštěna ve vhodném rozpouštědle k získání 100 mM roztoku. U směsí a vícesložkových látek se známým složením by se měla stanovit jediná čistota součtem podílů jejich složek (s výjimkou vody) a měla by se stanovit celková molekulová hmotnost na základě jednotlivých

▼M7

molekulových hmotností každé složky směsi (s výjimkou vody) a jejich jednotlivých podílů. Výsledná čistota a molekulová hmotnost by poté měly být použity k výpočtu hmotnosti zkoušené chemické látky nezbytné pro přípravu 100 mM roztoku. U polymerů, u kterých není možné stanovit dominantní molekulovou hmotnost, lze pro přípravu 100 mM roztoku posoudit molekulovou hmotnost monomeru (nebo zdánlivou molekulovou hmotnost různých monomerů tvořících polymer). Při zkoušení směsí, vícesložkových látek nebo polymerů se známým složením by však mělo být zváženo také zkoušení chemické látky v neředěném stavu. V případě kapalin by měla být zkoušena čistá chemická látka jako taková bez předchozího ředění prostřednictvím inkubace s cysteinovými peptidy v molárním poměru 1:10 a s lysinovými peptidy v molárním poměru 1:50. V případě pevných látek by měla být zkoušená chemická látka rozpuštěna v maximální rozpustné koncentraci ve stejném rozpouštědle, které bylo použito na přípravu roztoku se zdánlivou molekulovou hmotností 100 mM. Poté by měla zbýt zkoušena jako taková bez dalšího ředění tak, že se inkubuje s cysteinovými peptidy v molárním poměru 1:10 a s lysinovými peptidy v molárním poměru 1:50. Souhlasné výsledky (reaktivita nebo nereaktivita) mezi roztokem se zdánlivou molekulovou hmotností 100 mM a roztokem čisté chemické látky by měly umožnit vyvodit na základě tohoto výsledku spolehlivý závěr.

Příprava pozitivní kontroly, referenčních kontrol a kontrol koelucí

Jako pozitivní kontrola by měl být použit cinnamaldehyd (č. CAS 104-55-2, potravinářské čistoty ≥95 %) v roztoku o koncentraci 100 mM v acetonitrilu. Lze použít i jiné vhodné pozitivní kontroly přednostně poskytující hodnoty úbytku středního rozsahu, pokud jsou k dispozici dosavadní údaje umožňující odvodit srovnatelná kritéria přijatelnosti daného provedení zkoušky. Do série provedení HPLC by navíc měly být zařazeny referenční kontroly (tj. vzorky obsahující pouze peptidy rozpuštěné ve vhodném rozpouštědle), které se používají k ověření vhodnosti systému HPLC před analýzou (referenční kontroly A), k ověření stability referenčních kontrol v časovém průběhu (referenční kontroly B) a k ověření toho, že rozpouštědlo použité k rozpuštění zkoušené chemické látky nemá vliv na procentuální úbytek peptidů (referenční kontroly C) (viz dodatek 3). Pro každou chemickou látku se použije vhodná referenční kontrola k výpočtu procentuálního úbytku peptidů vyvolaného touto chemickou látkou (viz odstavec 26). Do série provedení by rovněž měla být pro každou zkoušenou chemickou látku, která se analyzuje, zařazena kontrola koeluce sestávající pouze ze zkoušené chemické látky, s cílem detekovat případnou koeluci zkoušené chemické látky s lysinovými nebo cysteinovými peptidy.

Inkubace zkoušené chemické látky s roztoky cysteinových a lysinových peptidů

Roztoky cysteinových a lysinových peptidů by se měly inkubovat ve skleněných zkumavkách s automatickým dávkovačem se zkoušenou chemickou látkou v poměru 1:10 pro cysteinové a 1:50 pro lysinové peptidy. Je-li ihned po přidání roztoku zkoušené chemické látky do roztoku peptidů zpozorována sraženina v důsledku nízké rozpustnosti zkoušené chemické látky ve vodě, nelze si v tomto případě být jistý, jaké množství zkoušené chemické látky zůstalo v roztoku a bude moci reagovat s peptidy. Proto by v takovém případě pozitivní výsledek mohl být i přesto použit, ale negativní výsledek je nejistý a měl by být interpretován s velkou opatrností (viz též ustanovení odstavce 11 o zkoušení chemických látek, které nejsou rozpustné až do koncentrace 100 mM). Před provedením analýzy HPLS by reakční roztok měl být ponechán v temnu při teplotě 25 ± 2,5 °C po dobu 24 ± 2 hodin. Každá zkoušená chemická látka by se měla analyzovat třikrát s každým z obou druhů peptidů. Před analýzou HPLC se musí vzorky vizuálně zkontrolovat. Je-li zjištěna sraženina nebo fázová separace, lze vzorky odstředit při nízké rychlosti (100–400xg), aby se sraženina z preventivních důvodů vytlačila ke dnu zkumavky, neboť velké množství sraženiny může ucpat trubice nebo kolony HPLC. Je-li sraženina nebo fázová separace zjištěna po inkubační době, může v případě negativního výsledku dojít k podhodnocenému odhadu a závěr o nedostatečné reaktivitě nelze učinit s dostatečnou jistotou.

▼M7

Příprava kalibrační křivky standardů pro HPLC

Kalibrační křivka standardů by měla být stanovena pro cysteinové i pro lysinové peptidy. Standardy peptidů by měly být připraveny ve 20 % nebo 25 % pufračním roztoku acetonitrilu za použití fosfátového pufru (pH 7,5) pro cysteinové peptidy a pufru octanu sodného (pH 10,2) pro lysinové peptidy. S použitím standardu sériového ředění pro zásobní roztok s peptidy (0,667 mM) by se mělo připravit 6 kalibračních roztoků pokrývajících rozsah od 0,534 do 0,0167 mM. Do kalibrační křivky standardů by měla být rovněž zanesena slepá zkouška s ředicím pufrem. Vhodné kalibrační křivky by měly mít $r^2 > 0,99$.

Příprava a analýza HPLC

Před provedením analýzy by se měla ověřit vhodnost systému HPLC. Úbytek peptidů se sleduje pomocí HPLC s připojeným UV detektorem (fotodiodový detektor nebo absorpční detektor s fixní vlnovou délkou se signálem 220 nm). Do systému HPLC se nainstaluje vhodná kolona. Nastavení HPLC popsané ve validační studii používá přednostně kolonu Zorbax SB-C-18 o rozměrech 2,1 mm × 100 mm × 3,5 micronu. S touto kolonou HPLC na reverzní fázi by se celý systém měl nechat před provedením analýzy nejméně po dobu 2 hodin ustálit při teplotě 30 °C s 50 % fází A (0,1 % obj. roztok kyseliny trifluoroctové ve vodě) a 50 % fází B (0,085 % obj. roztok kyseliny trifluoroctové v acetonitrilu). Analýza HPLC by se měla provádět za průtoku 0,35 ml/min a s lineárním gradientem od 10 % do 25 % acetonitrilu za 10 minut, s následným prudkým zvýšením na 90 % acetonitrilu za účelem odstranění jiných materiálů. Injekcí by měly být nastříknuty stejné objemy každého standardu, vzorku a kontroly. Kolona by se mezi injekcemi měla znovu nechat ustálit za původních podmínek po dobu 7 minut. Použije-li se jiná kolona HPLC na reverzní fázi, bude možná nutné upravit výše popsané nastavení parametrů, aby se zajistila přiměřená eluce a integrace cysteinových a lysinových peptidů, včetně vstřikovaného objemu, který se může lišit (obvykle v rozmezí od 3 do 10 µl) podle použitého systému. Důležité je, že při použití jiného nastavení HPLC by měla být prokázána jeho rovnocennost s validovaným nastavením, které je popsáno výše (např. testováním vhodných látek uvedených v dodatku 2). Absorbance se měří při 220 nm. Je-li použit fotodiodový detektor, měla by se rovněž zaznamenávat absorbance při 258 nm. Je třeba poznamenat, že některé dodávky acetonitrilu by mohly mít negativní dopad na stabilitu peptidů, a toto se musí posoudit při použití nové šarže acetonitrilu. Jako ukazatel koeluce lze použít poměr plochy píků při 220 nm k ploše píků při 258 nm. Poměr v rozmezí 90 % < střední hodnota ([1]) poměru plochy u kontrolních vzorků < 100 % u každého vzorku by znamenal přesvědčivou známku toho, že ke koeluci nedošlo.

Mohou se vyskytnout zkoušené chemické látky, které by mohly podporovat oxidaci cysteinových peptidů. Pík dimerizovaného cysteinového peptidu je možné sledovat vizuálně. Pokud se zdá, že došlo k dimerizaci, mělo by to být zaznamenáno, neboť může dojít k příliš vysokému odhadu procentuálního úbytku peptidů, což vede k falešným pozitivním předpovědím a/nebo k zařazení do vyšší třídy reaktivity (viz odstavce 29 a 30)

Analýzu cysteinových a lysinových peptidů pomocí metody HPLC lze provádět souběžně (jsou-li k dispozici dva systémy HPLC), nebo v různých dnech. Provádí-li se analýza v různých dnech, pak by se všechny roztoky zkušebních chemických látek měly čerstvě připravit pro obě analýzy v každý příslušný den. Analýza by měla být načasována tak, aby se zajistilo, že vstříknutí prvního vzorku začne po uplynutí 22 až 26 hodin od okamžiku, kdy byla zkoušená chemická látka smíchána s roztokem peptidu. Série provedení HPLC by se

([1]) Střední hodnotou se v celém tomto dokumentu rozumí aritmetický průměr.

▼M7

měla nastavit tak, aby trvání analýzy HPLC bylo kratší než 30 hodin. Při nastavení HPLC, které bylo použito ve validační studii a je popsáno v této zkušební metodě, lze v jedné sérii provedení HPLC zpracovat až 26 analytických vzorků (viz též odstavec 17). Příklad série provedení analýzy HPLC je uveden v dodatku 3.

ÚDAJE A PŘEDKLÁDÁNÍ ZPRÁV

Vyhodnocení údajů

Koncentrace cysteinových nebo lysinových peptidů se stanoví v každém vzorku fotometricky při 220 nm změřením plochy píku (plocha pod křivkou) vhodných píků a výpočtem koncentrace peptidů pomocí lineární kalibrační křivky odvozené od standardů.

Procentuální úbytek peptidů se stanoví v každém vzorku změřením plochy píku, která se vydělí střední hodnotou plochy píku příslušných referenčních kontrol C (viz dodatek 3) podle níže uvedeného vzorce.

$$\textit{Procentuální úbytek peptidů} = \left[1 - \left(\frac{\textit{Plocha píku peptidů vkaždé replice}}{\textit{Střed.hodnota plochy píku vref .kontrolách C}}\right)\right] \times 100$$

Kritéria přijatelnosti

Aby se provedení mohlo považovat za platné, měla by být splněna tato kritéria:

a) kalibrační křivka standardů by měla mít $r^2 > 0{,}99$;

b) střední hodnota procentuálního úbytku peptidů ze tří replik pozitivní kontroly v cinnamaldehydu by měla být mezi 60,8 % a 100 % u cysteinového peptidu a mezi 40,2 % and 69,0 % u lysinového peptidu a maximální směrodatná odchylka (SD) replik pozitivní kontroly by měla být < 14,9 % pro procentuální úbytek cysteinových peptidů a < 11,6 % pro procentuální úbytek lysinových peptidů; a

c) střední hodnota koncentrace peptidů z referenčních kontrol A by měla být 0,50 ± 0,05 mM a varianční koeficient (CV) píkových ploch peptidů u devíti referenčních kontrol B a C v acetonitrilu by měl být < 15,0 %.

Není-li jedno nebo více těchto kritérií splněno, mělo by se provedení opakovat.

Aby se výsledky zkoušení zkoušené chemické látky mohly považovat za platné, měla by být splněna tato kritéria:

a) maximální směrodatná odchylka u replik se zkoušenou chemickou látkou by měla být < 14,9 % u procentuálního úbytku cysteinu a < 11,6 % u procentuálního úbytku lysinu;

b) střední hodnota koncentrace peptidů ze tří referenčních kontrol C ve vhodném rozpouštědle by měla být 0,50 ± 0,05 mM. Nejsou-li tato kritéria splněna, měly by se údaje zamítnout a provedení s touto konkrétní zkoušenou chemickou látkou by se mělo opakovat.

Predikční model

Pro každou zkoušenou chemickou látku se vypočítá střední hodnota procentuálního úbytku cysteinu a procentuálního úbytku lysinu. Záporný úbytek se při výpočtu střední hodnoty považuje za „0“. S použitím predikčního modelu cystein 1:10 / lysin 1:50, jak je uvedeno v tabulce 1, by rozlišení mezi látkami senzibilizujícímu kůži a látkami nesenzibilizujícími kůži v rámci přístupu IATA mělo umožnit použití prahové hodnoty průměrného úbytku peptidů ve výši 6,38 %. Uplatnění tohoto predikčního modelu pro zařazení zkoušené chemické látky do příslušné třídy reaktivity (tj. nízká, střední a vysoká reaktivita) se snad může osvědčit jako užitečný zdroj informací pro posouzení potence v rámci přístupu IATA.

▼M7

Tabulka 1

Predikční model cystein 1:10 / lysin 1:50 ([1])

Střední hodnota procentuálního úbytku cysteinu a lysinu	Třída reaktivity	Předpověď DPRA ([2])
0 % ≤ střední hodnota procentuálního úbytku ≤ 6,38 %	Žádná nebo minimální reaktivita	Negativní
6,38 % < střední hodnota procentuálního úbytku ≤ 22,62 %	Nízká reaktivita	Pozitivní
22,62 % < střední hodnota procentuálního úbytku ≤ 42,47 %	Střední reaktivita	
42,47 % < střední hodnota procentuálního úbytku ≤ 100 %	Vysoká reaktivita	

([1]) Tyto údaje vyjadřují statisticky odvozené prahové hodnoty a nesouvisí s přesností měření.
([2]) Předpověď DPRA by měla být zvažována v rámci přístupu IATA a v souladu s ustanoveními odstavců 9 a12.

Mohly by se vyskytnout případy, kdy zkoušená chemická látka (látka nebo jedna nebo několik složek vícesložkové látky nebo směsi) při 220 nm značně absorbuje a má stejný retenční čas jako peptid (koeluce). Koeluci lze vyřešit mírnou úpravou nastavení HPLC, aby se více oddělil eluční čas zkoušené chemické látky a eluční čas peptidu. Při použití jiného nastavení HPLC ve snaze vyřešit koeluci by měla být prokázána jeho rovnocennost s validovaným nastavením (např. testováním vhodných látek uvedených v dodatku 2). Dojde-li ke koeluci, pík peptidu nelze integrovat a výpočet procentuálního úbytku peptidu není možný. Jestliže dojde ke koeluci takových zkoušených chemických látek s cysteinovými i lysinovými peptidy, měla by být analýza označena za „neprůkaznou“. V případech, kdy dojde ke koeluci pouze s lysinovým peptidem, lze použít predikční model cystein 1:10 uvedený v tabulce

Tabulka 2

Predikční model cystein 1:10 ([1])

Procentuální úbytek cysteinu (Cys)	Třída reaktivity	Předpověď DPRA ([2])
0 % ≤ procentuální úbytek Cys ≤ 13,89 %	Žádná nebo minimální reaktivita	Negativní
13,89 % < procentuální úbytek Cys ≤ 23,09 %	Nízká reaktivita	Pozitivní
23,09 % < procentuální úbytek Cys ≤ 98,24 %	Střední reaktivita	
98,24 % < procentuální úbytek Cys ≤ 100 %	Vysoká reaktivita	

([1]) Tyto údaje vyjadřují statisticky odvozené prahové hodnoty a nesouvisí s přesností měření.
([2]) Předpověď DPRA by měla být zvažována v rámci přístupu IATA a v souladu s ustanoveními odstavců 9 a 12.

Mohly by se vyskytnout jiné případy, kdy se retenční čas zkoušené chemické látky a retenční čas některého z peptidů zcela nepřekrývá. V takových případech lze hodnoty procentuálního úbytku peptidu odhadnout a použít je v predikčním modelu cystein 1:10 / lysin 1:50, avšak zařazení zkoušené chemické látky do třídy reaktivity nelze provést s přesností.

▼M7

Jediná analýza HPLC pro hodnocení cysteinových i lysinových peptidů by měla být pro zkoušenou chemickou látku dostačující, pokud je výsledek jednoznačný. Avšak v případě výsledků přibližujících se prahové hodnotě použité pro rozlišení mezi pozitivními a negativními výsledky (tj. hraničních výsledků) může být nezbytné další zkoušení. V situacích, kdy se střední hodnota procentuálního úbytku nachází v rozmezí 3 % až 10 % v predikčním modelu cystein 1:10 / lysin 1:50 nebo kdy se procentuální úbytek cysteinu nachází v rozmezí 9 % až 17 % v predikčním modelu cystein 1:10, by mělo být zváženo druhé provedení a v případě nesouhlasných výsledků prvního a druhého provedení by mělo být zváženo třetí provedení.

Závěrečná zpráva

Závěrečná zpráva by měla obsahovat následující informace:

Zkoušená chemická látka

— Jednosložková látka

  — chemická identifikace, např. název (názvy) IUPAC nebo CAS, číslo (čísla) CAS, kód SMILES nebo InChI, strukturní vzorec a/nebo jiné identifikátory,

  — fyzický vzhled, rozpustnost ve vodě, molekulová hmotnost a další důležité fyzikálně-chemické vlastnosti, v rozsahu, v jakém jsou tyto informace dostupné,

  — čistota, případně chemická identita nečistot, je-li to prakticky proveditelné, atd.,

  — případné ošetření před zkoušením (např. zahřívání, mletí),

  — zkušební koncentrace,

  — podmínky skladování a stabilita, v rozsahu, v jakém jsou tyto informace dostupné.

— Vícesložková látka, UVCB a směs

  — charakterizovaná v co možná největší míře např. chemickou identitou (viz výše), čistotou, kvantitativním výskytem a důležitými fyzikálně-chemickými vlastnostmi (viz výše) složek, v rozsahu, v jakém jsou tyto informace dostupné,

  — fyzický vzhled, rozpustnost ve vodě a další důležité fyzikálně-chemické vlastnosti, v rozsahu, v jakém jsou tyto informace dostupné,

  — molekulová hmotnost nebo zdánlivá molekulová hmotnost v případě směsí/polymerů se známým složením nebo jiné informace důležité pro provedení studie,

  — případné ošetření před zkoušením (např. zahřívání, mletí),

  — zkušební koncentrace,

  — podmínky skladování a stabilita, v rozsahu, v jakém jsou tyto informace dostupné.

Kontroly

— Pozitivní kontrola

  — chemická identifikace, např. název (názvy) IUPAC nebo CAS, číslo (čísla) CAS, kód SMILES nebo InChI, strukturní vzorec a/nebo jiné identifikátory,

  — fyzický vzhled, rozpustnost ve vodě, molekulová hmotnost a další důležité fyzikálně-chemické vlastnosti, v rozsahu, v jakém jsou tyto informace dostupné,

  — čistota, případně chemická identita nečistot, je-li to prakticky proveditelné, atd.,

▼M7

— případné ošetření před zkoušením (např. zahřívání, mletí),

— zkušební koncentrace,

— podmínky skladování a stabilita, v rozsahu, v jakém jsou tyto informace dostupné,

— odkaz na případné dosavadní výsledky pozitivních kontrol prokazující vhodnost kritérií přijatelnosti provedení.

— Rozpouštědlo/vehikulum

— použité rozpouštědlo/vehikulum a případně poměr jeho složek,

— chemická identifikace, např. název (názvy) IUPAC nebo CAS, číslo (čísla) CAS a/nebo jiné identifikátory,

— čistota, případně chemická identita nečistot, je-li to prakticky proveditelné, atd.,

— fyzický vzhled, molekulová hmotnost a další důležité fyzikálně-chemické vlastnosti v případě použití jiných rozpouštědel/vehikul než rozpouštědel/vehikul uvedených v této zkušební metodě, a to v rozsahu, v jakém jsou tyto informace dostupné,

— podmínky skladování a stabilita, v rozsahu, v jakém jsou tyto informace dostupné.

— zdůvodnění volby rozpouštědla pro každou zkoušenou chemickou látku,

— u acetonitrilu výsledky zkoušky dopadu na stabilitu peptidů.

Příprava peptidů, pozitivní kontroly a zkoušené chemické látky

— charakterizace roztoku peptidů (dodavatel, šarže, přesná hmotnost peptidu, objem přidaný do zásobního roztoku),

— charakterizace roztoku pozitivní kontroly (přesná hmotnost pozitivní kontrolní látky, objem přidaný do zkušebního roztoku),

— charakterizace roztoků zkoušené chemické látky (přesná hmotnost zkoušené chemické látky, objem přidaný do zkušebního roztoku).

HPLC – nastavení přístrojů a analýza

— druh analyzátoru HPLC, kolon HPLC a předkolon, detektoru, automatického dávkovače,

— důležité parametry pro analýzu HPLC, jako např. teplota v kolonách, objem nástřiku, průtok a gradient.

Vhodnost systému

— plocha píku peptidů při 220 nm v každém standardu a v každé replice referenční kontroly A,

— lineární kalibrační křivka v grafickém vyjádření a udaná hodnota r^2,

— koncentrace peptidů v každé replice referenční kontroly A,

— střední hodnota koncentrace peptidu (v mM) ve třech referenčních kontrolách A, směrodatná odchylka a variační koeficient,

— koncentrace peptidu v referenčních kontrolách A a C.

▼M7

Série analýzy

— U referenčních kontrol:

  — plocha píku peptidů při 220 nm v každé replice B a C,

  — střední hodnota plochy píku peptidů při 220 nm v devíti referenčních kontrolách B a C v acetonitrilu, směrodatná odchylka a variační koeficient (pro zajištění stability referenčních kontrol po celou dobu analýzy),

  — pro každé použité rozpouštědlo střední hodnota plochy píku peptidů při 220 nm ve třech vhodných referenčních kontrolách C (pro výpočet procentuálního úbytku peptidů),

  — u každého použitého rozpouštědla koncentrace peptidů (v mM) ve třech vhodných referenčních kontrolách C,

  — u každého použitého rozpouštědla střední hodnota koncentrace peptidů (v mM) ve třech vhodných referenčních kontrolách C, směrodatná odchylka a variační koeficient.

— Ohledně pozitivní kontroly:

  — plocha píku peptidů při 220 nm v každé replice,

  — procentuální úbytek peptidů v každé replice,

  — střední hodnota procentuálního úbytku peptidů ve třech replikách, směrodatná odchylka a variační koeficient.

— U každé zkoušené chemické látky:

  — vzhled sraženiny v reakční směsi na konci inkubační doby, byla-li zjištěna; zda byla sraženina rozpuštěna nebo odstředěna,

  — přítomnost koeluce,

  — případně popis jakýchkoli jiných důležitých zjištění z pozorování,

  — plocha píku peptidů při 220 nm v každé replice,

  — procentuální úbytek peptidů v každé replice,

  — střední hodnota procentuálního úbytku peptidů ve třech replikách, směrodatná odchylka a variační koeficient,

  — střední hodnota procentuálního úbytku cysteinu a procentuálního úbytku lysinu,

  — použitý predikční model a předpověď DPRA.

Zkoušení způsobilosti

— Případný postup použitý k prokázání způsobilosti laboratoře k provádění této zkušební metody (např. zkoušením látek pro prokázání způsobilosti) nebo k prokázání reprodukovatelného provedení této zkušební metody v průběhu doby.

Diskuse o výsledcích

— diskuse o výsledcích získaných pomocí zkušební metody DPRA,

— diskuse o výsledcích zkušební metody v rámci IATA, jsou-li k dispozici jiné příslušné informace.

Závěr

▼M7

LITERATURA

1) United Nations (UN) (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Fifth revised edition, UN New York and Geneva, 2013. Dostupné na: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html

2) OECD (2012). The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Scientific Evidence. Series on Testing and Assessment No. 168, OECD, Paris.

3) Kapitola B.6 této přílohy: Senzibilizace kůže.

4) Kapitola B.42 této přílohy: Zkouška s vyšetřením lokálních lymfatických uzlin.

5) Kapitola B.50 této přílohy: Senzibilizace kůže: zkouška s vyšetřením lokálních lymfatických uzlin: DA.

6) Kapitola B.51 této přílohy: Senzibilizace kůže: zkouška s vyšetřením lokálních lymfatických uzlin: BrdU-ELISA.

7) Adler *et al.* (2011). Alternative (non-animal) methods for cosmetics testing: current status and future prospects-2010. Archives of Toxicology 85:367-485.

8) Gerberick *et al.* (2004). Development of a peptide reactivity assay for screening contact allergens. Toxicological Sciences 81:332-343.

9) Gerberick *et al.* (2007). Quantification of chemical peptide reactivity for screening contact allergens: A classification tree model approach. Toxicological Sciences 97:417-427.

10) EC EURL-ECVAM (2013). Direct Peptide Reactivity assay (DPRA) for skin sensitisation testing. Dostupné na: https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/eurl-ecvam-recommendations/eurl-ecvam-recommendation-on-the-direct-peptide-reactivity-assay-dpra

11) Jaworska *et al.* (2013). Bayesian integrated testing strategy to assess skin sensitization potency: from theory to practice. Journal of Applied Toxicology, published online, 14 May 2013, DOI: 10.1002/jat.2869.

12) Bauch *et al*. (2012). Putting the parts together: combining *in vitro* methods to test for skin sensitizing potential. Regulatory Toxicology and Pharmacology 63: 489-504.

13) Nukada *et al.* (2013). Data integration of non-animal tests for the development of a test battery to predict the skin sensitizing potential and potency of chemicals. Toxicology *in vitro* 27:609 618.

14) Ball *et al* (2011). Evaluating the sensitization potential of surfactants: integrating data from the local lymph node assay, guinea pig maximization test, and *in vitro* methods in a weight-of-evidence approach. Regulatory Toxicology and Pharmacology 60:389-400.

15) Landsteiner and Jacobs (1936). Studies on the sensitization of animals with simple chemical compounds. Journal of Experimental Medicine 64:625-639.

16) Dupuis and Benezra (1982). Allergic contact dermatitis to simple chemicals: a molecular approach. New York & Basel: Marcel Dekker Inc.

17) Lepoittevin *et al.* (1998). Allergic contact dermatitis: the molecular basis. Springer, Berlin.

18) EC EURL-ECVAM (2012). Direct Peptide Reactivity assay (DPRA) for skin sensitisation testing 74pp. Dostupné na: http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/eurl-ecvam/eurl-ecvam-recommendations/eurl-ecvam-recommendation-on-the-direct-peptide-reactivity-assay-dpra

▼**M7**

19) Natsch *et al.* (2013). A dataset on 145 chemicals tested in alternative assays for skin sensitization undergoing prevalidation. Journal of Applied Toxicology, published online, 9 April 2013, DOI:10.1002/jat.2868.

20) DB-ALM (INVITTOX) Protocol 154: Direct Peptide Reactivity assay (DPRA) for skin sensitisation testing 17pp. Dostupné na: http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/

21) OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. OECD Series on Testing and Assessment, No. 34. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris, France.

22) FDA (Food and Drug Administration (2001). Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation 22pp. Dostupné na: www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidance/ucm070107.pdf – 138

23) ECETOC (2003). Contact sensitization: Classification according to potency. European Centre for Ecotoxicology & Toxicology of Chemicals (Technical Report No. 87).

▼M7

Dodatek 1

DEFINICE

Přesnost: Přesnost shody mezi výsledky zkušební metody a přijatými referenčními hodnotami. Je to měření výsledku zkušební metody a jednoho aspektu „důležitosti“. Tento výraz se často používá namísto výrazu „soulad“ a rozumí se jím podíl správných výsledků zkušební metody (21).

AOP (Dráha nežádoucího účinku): Sled událostí od chemické struktury cílové chemické látky nebo skupiny podobných chemických látek přes molekulární iniciační událost po účinek *in vivo*, který je předmětem zájmu (2).

Kalibrační křivka: Vztah mezi hodnotou experimentální odpovědi a analytickou koncentrací (rovněž nazývaná *standardní křivka*) známé látky.

Chemická látka: Látka nebo směs.

Variační koeficient: Míra variability, která se vypočítává pro skupinu údajů z replik tak, že se směrodatná odchylka vydělí průměrem. Lze ho vynásobit 100 za účelem vyjádření v procentech.

Nebezpečnost: Základní charakteristika látky nebo situace, která má potenciál vyvolat nepříznivé účinky, jsou-li organismus, systém nebo (sub)populace vystaveny této látce.

IATA (integrovaný přístup ke zkoušení a posuzování): Strukturovaný přístup používaný pro zjišťování nebezpečnosti (potenciál), charakterizaci rizik (potence) a/nebo posouzení bezpečnosti (potenciál/potence a expozice) chemické látky nebo skupiny chemických látek, jenž strategicky integruje a váží všechny důležité údaje s cílem poskytnout informace pro přijetí regulačního rozhodnutí, které se týká potenciální nebezpečnosti a/nebo rizika a/nebo potřeby dalšího cíleného, a tudíž minimálního zkoušení.

Molekulární iniciační událost: Narušení biologického systému na molekulární úrovni vyvolané chemickou látkou, jež bylo identifikováno jako počáteční událost v mechanismu nepříznivých účinků.

Směs: Směs nebo roztok tvořený dvěma nebo více látkami, které v něm nereagují (1).

Jednosložková látka: Látka definovaná svým kvantitativním složením, v níž je přítomna jedna hlavní složka v míře alespoň 80 % hmot.

Vícesložková látka: Látka definovaná svým kvantitativním složením, v níž je přítomna více než jedna hlavní složka v koncentraci ≥ 10 % hmot. a < 80 % hmot. Vícesložková látka je výsledkem výrobního procesu. Rozdíl mezi směsí a vícesložkovou látkou spočívá v tom, že směs se získá smísením dvou nebo více látek bez chemické reakce. Vícesložková látka je výsledkem chemické reakce.

Pozitivní kontrola: Replika obsahující všechny složky zkušebního systému s přidáním látky, o níž je známo, že způsobuje pozitivní reakci. Aby se zajistilo, že proměnlivost v reakci na pozitivní kontrolu bude možné časem vyhodnotit, rozsah pozitivní reakce by neměl být nadměrný.

Referenční kontrola: Neexponovaný vzorek obsahující všechny složky zkušebního systému, včetně rozpouštědla nebo vehikula, který se zpracovává s exponovanými zkoušenými chemickými látkami a jinými kontrolními vzorky, aby se zjistila základní reakce vzorků zkoušených se zkoušenou chemickou látkou

▼M7

rozpuštěnou ve stejném rozpouštědle nebo vehikulu. Když se použije souběžně s negativní kontrolou, ukazuje také, zda rozpouštědlo nebo vehikul vzájemně reaguje se zkušebním systémem.

Relevantnost: Popis vztahu zkoušky k účinku, který je předmětem zájmu, a také toho, zda je zkouška smysluplná a použitelná pro konkrétní účel. Vyjadřuje, do jaké míry zkouška správně měří nebo predikuje biologický účinek, který je předmětem zájmu. Relevantnost zahrnuje také posouzení přesnosti (shody) zkušební metody (21).

Spolehlivost: Měření rozsahu, v jakém může být zkušební metoda časem reprodukovatelná v laboratořích a mezi laboratořemi, když se provádí s použitím stejného protokolu. Hodnotí se to výpočtem laboratorní a mezilaboratorní reprodukovatelnosti a laboratorní opakovatelnosti (21).

Reprodukovatelnost: Shoda mezi výsledky získanými při zkoušení téže chemické látky za použití stejného zkušebního protokolu (viz spolehlivost) (21).

Citlivost: Podíl všech pozitivních/aktivních chemických látek, které jsou na základě zkušební metody správně zatříděny. Je měřítkem přesnosti zkušební metody, která poskytuje kategorické výsledky, a je důležitým prvkem při hodnocení relevantnosti zkušební metody (21).

Specifičnost: Podíl všech negativních/neaktivních chemických látek, které jsou na základě zkušební metody správně zatříděny. Je měřítkem přesnosti zkušební metody, která poskytuje kategorické výsledky, a je důležitým prvkem při hodnocení relevantnosti zkušební metody (21).

Látka: Chemické prvky nebo jejich sloučeniny v přírodním stavu nebo získané výrobním procesem včetně všech přídatných látek nutných k uchování stability výrobku a všech nečistot vznikajících v použitém procesu, ale s vyloučením všech rozpouštědel, která je možno oddělit bez ovlivnění stability látky nebo změny jejího složení (1).

Vhodnost systému: Určení výkonnosti (např. citlivosti) přístrojů pomocí analýzy referenčního standardu před zavedením analytické sady (22).

Zkoušená chemická látka: Termín „zkoušená chemická látka“ se používá k označení toho, co se podrobuje zkoušení.

Globálně harmonizovaný systém klasifikace a označování chemických látek Organizace spojených národů (GHS OSN): Systém navrhující klasifikaci látek a směsí podle standardizovaných typů a úrovní fyzikálních, zdravotních a environmentálních nebezpečí a řešící příslušné komunikační prvky, jako jsou piktogramy, signální slova, výroky o nebezpečí, výroky o bezpečnostních opatřeních a bezpečnostní datové listy, které obsahují informace o jejich nežádoucích účincích s ohledem na ochranu lidí (včetně zaměstnavatelů, dělníků, přepravců, spotřebitelů a osob reagujících na havárie) a životního prostředí (1).

UVCB: Látky s neznámým nebo proměnlivým složením, komplexní reakční produkty nebo biologický materiál.

Validovaná zkušební metoda: Zkušební metoda, u níž se má za to, že je dostatečně relevantní a spolehlivá pro určitý účel, a která je založena na vědecky spolehlivých zásadách. Zkušební metoda není nikdy validovaná v absolutním smyslu, ale pouze pro určitý konkrétní účel (21).

▼M7

Dodatek 2

LÁTKY PRO PROKÁZÁNÍ ZPŮSOBILOSTI

Senzibilizace kůže *in chemico*: zkouška přímé reaktivity peptidů

Dříve než začnou laboratoře běžně používat tuto zkušební metodu, měly by prokázat odbornou způsobilost správným získáním předpokládané předpovědi DPRA u 10 vhodných látek doporučených v tabulce 1 a získáním hodnot úbytku cysteinu a lysinu, které spadají do příslušného referenčního rozpětí, u 8 z 10 vhodných látek pro každý peptid. Tyto vhodné látky byly vybrány tak, aby představovaly rozpětí účinků z hlediska nebezpečí senzibilizace kůže. Dalšími kritérii výběru bylo, aby byly komerčně dostupné, aby k nim byly k dispozici vysoce kvalitní referenční údaje získané *in vivo* a vysoce kvalitní údaje získané zkouškou DPRA *in vitro* a aby byly použity ve validační studii provedené za koordinace EURL ECVAM k prokázání úspěšného provedení této zkušební metody v laboratořích, které se na studii podílely.

Tabulka 1

Doporučené látky k prokázání odborné způsobilosti k provádění zkoušky přímé reaktivity peptidů

Látky pro zkoušení způsobilosti	Registrační číslo CAS	Skupenství	Předpověď *in vivo* [1]	Předpověď DPRA [2]	Rozpětí [3] procentuálního úbytku cysteinových peptidů	Rozpětí [3] procentuálního úbytku lysinových peptidů
2,4-dinitrochlorbenzen	97-00-7	Pevné	Senzibilizující (extrémně)	Pozitivní	90–100	15–45
Oxazolon	15646-46-5	Pevné	Senzibilizující (extrémně)	Pozitivní	60–80	10–55
Formaldehyd	50-00-0	Kapalné	Senzibilizující (silně)	Pozitivní	30–60	0–24
Benzylidenaceton	122-57-6	Pevné	Senzibilizující (středně silně)	Pozitivní	80–100	0–7
Farnesal	19317-11-4	Kapalné	Senzibilizující (slabě)	Pozitivní	15–55	0–25
Butanedion	431-03-8	Kapalné	Senzibilizující (slabě)	Pozitivní	60–100	10–45
Butan-1-ol	71-36-3	Kapalné	Nesenzibilizující	Negativní	0–7	0–5,5
6-methylkumarin	92-48-8	Pevné	Nesenzibilizující	Negativní	0–7	0–5,5
Kyselina mléčná	50-21-5	Kapalné	Nesenzibilizující	Negativní	0–7	0–5,5
4-methoxyacetofenon	100-06-1	Pevné	Nesenzibilizující	Negativní	0–7	0–5,5

([1]) Předpovědi nebezpečnosti (a potence) *in vivo* vycházejí z údajů ze zkoušek LLNA (19). Potence *in vivo* je odvozena s použitím kritérií navržených střediskem ECETOC (23).
([2]) Předpověď DPRA by měla být zvažována v rámci přístupu IATA a v souladu s ustanoveními odstavců 9 a 11.
([3]) Rozpětí stanovená na základě alespoň 10 hodnot úbytku získaných 6 nezávislými laboratořemi.

▼M7

Dodatek 3

PŘÍKLADY ANALYTICKÉ SÉRIE

Kalibrační standardy a referenční kontroly	STD1 STD2 STD3 STD4 STD5 STD6 Ředicí pufr Referenční kontrola A, replika 1 Referenční kontrola A, replika 2 Referenční kontrola A, replika 3
Kontroly koeluce	Kontrola koeluce 1 pro zkoušenou chemickou látku 1 Kontrola koeluce 2 pro zkoušenou chemickou látku 2
Referenční kontroly	Referenční kontrola B, replika 1 Referenční kontrola B, replika 2 Referenční kontrola B, replika 3
První sada replik	Referenční kontrola C, replika 1 Cinnamaldehyd, replika 1 Vzorek 1, replika 1 Vzorek 2, replika 1
Druhá sada replik	Referenční kontrola C, replika 2 Cinnamaldehyd, replika 2 Vzorek 1, replika 2 Vzorek 2, replika 2
Třetí sada replik	Referenční kontrola C, replika 3 Cinnamaldehyd, replika 3 Vzorek 1, replika 3 Vzorek 2, replika 3
Referenční kontroly	Referenční kontrola B, replika 4 Referenční kontrola B, replika 5 Referenční kontrola B, replika 6

Do analytické série by měly být zařazeny tři sady referenčních kontrol (tj. vzorků sestávajících pouze z peptidu rozpuštěného ve vhodném rozpouštědle):
Referenční kontrola A: používá se k ověření vhodnosti systému HPLC.
Referenční kontrola B: zařadí se na začátku a na konci analytické série k ověření stability referenčních kontrol po dobu analýzy.
Referenční kontrola C: zařadí se do analytické série k ověření, že rozpouštědlo použité k rozpuštění zkoušené chemické látky neovlivňuje procentuální úbytek peptidů.

▼M7

B.60 SENZIBILIZACE KŮŽE *IN VITRO*: ZKUŠEBNÍ METODA S VYŠETŘENÍM LUCIFERÁZY ARE-NRF2

ÚVOD

Tato zkušební metoda je rovnocenná Pokynu OECD pro zkoušení (TG) č. 442D (2015). Jako látka senzibilizující kůži se označuje látka, která po styku s kůží vyvolává alergickou odpověď, jak ji definuje globálně harmonizovaný systém klasifikace a označování chemických látek Organizace spojených národů (GHS OSN) (1) a nařízení Evropské unie (ES) č. 1272/2008 o klasifikaci, označování a balení látek a směsí (CLP) ([1]). Tato zkušební metoda popisuje postup *in vitro* (zkoušku luciferázy ARE-Nrf2), který má být podpůrně použit k rozlišování mezi látkami senzibilizujícími kůži a látkami nesenzibilizujícími kůži v souladu s GHS OSN a s nařízením CLP.

Existuje všeobecná shoda, pokud jde o klíčové biologické procesy, jež zapříčiňují senzibilizaci kůže. Dosavadní znalosti o chemických a biologických mechanismech spojených se senzibilizací kůže byly shrnuty ve formě Dráhy nežádoucích účinků (AOP) (2), která se odvíjí od molekulární iniciační události přes průběžné události až k výslednému nepříznivému účinku na zdraví, tj. alergickou kontaktní dermatitidu u lidí nebo kontaktní přecitlivělost u hlodavců (2) (3). Molekulární iniciační událostí je kovalentní navázání elektrofilních látek na nukleofilní centra v kožních proteinech. Druhá klíčová událost v této metodě AOP se odehrává v keratinocytech a zahrnuje zánětlivé odpovědi, jakož i expresi genů spojenou se specifickými dráhami buněčné signalizace, např. dráhami závislými na antioxidačním/elektrofilním responsním elementu (ARE). Třetí klíčovou událostí je aktivace dendritických buněk, typicky hodnocená podle exprese specifických buněčných povrchových markerů, chemokinů a cytokinů. Čtvrtou klíčovou událostí je proliferace T buněk, která se nepřímo hodnotí ve zkoušce s vyšetřením lokálních lymfatických uzlin na myších (4).

Hodnocení senzibilizace kůže bylo obvykle prováděno na pokusných zvířatech. Klasické metody založené na morčatech, Magnussonova-Klingmannova maximalizační zkouška na morčatech (GPMT) a Bühlerova zkouška (zkušební metoda B.6 (5)), studují indukční i provokační fázi senzibilizace kůže. Uznána byla i zkouška na myších, a sice zkouška vyšetřením lokálních místních uzlin (LLNA, zkušební metoda B.42 (4)) a její dvě neradioaktivní modifikace, LLNA: DA (zkušební metoda B.50 (6)) a LLNA: BrdU-ELISA (zkušební metoda B.51 (7)), které všechny posuzují výlučně odpověď na indukci; neboť oproti zkouškám na morčatech poskytují výhody z hlediska dobrého zacházení se zvířaty, i pokud jde o objektivní měření indukční fáze senzibilizace kůže.

V poslední době jsou za vědecky platné metody pro hodnocení nebezpečnosti chemických látek pro senzibilizaci kůže považovány mechanisticky založené zkušební metody *in chemico* a *in vitro*. Protože však každá z těchto nyní dostupných zkušebních metod bez použití zvířat mechanisticky pokrývá AOP jen v omezeném rozsahu, bude pro úplné nahrazení nyní používaných zkoušek na zvířatech zapotřebí kombinace metod bez použití zvířat (*in silico*, *in chemico*, *in vitro*) v rámci integrovaného přístupu ke zkouškám a posuzování (IATA) (2) (3).

Tato zkušební metoda (zkouška luciferázy ARE-Nrf2) se se navrhuje ke zkoumání druhé klíčové události, jak je vysvětleno v odstavci 2. V literatuře se uvádí, že látky senzibilizující kůži indukují geny, které jsou regulovány antioxidačním responsním elementem (ARE) (8) (9). Slabé elektrofilní látky, jako jsou látky

([1]) Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1272/2008 ze dne 16. prosince 2008 o klasifikaci, označování a balení látek a směsí, o změně a zrušení směrnic 67/548/EHS a 1999/45/ES a o změně nařízení (ES) č. 1907/2006, Úř. věst. L 353, 31.12.2008, s. 1.

▼M7

senzibilizující kůži, mohou působit na senzorový protein Keap1 (Kelch-like ECH-associated protein 1) například kovalentní modifikací jeho zbytkového cysteinu, což vede k jeho disociaci od trankripčního faktoru Nrf2 (nuclear factor-erythroid 2-related factor 2). Disociovaný Nrf2 může pak aktivovat geny závislé na ARE, např. ty, které kódují detoxifi kační enzymy fáze II (8) (10) (11).

V současnosti je k dispozici jediná zkouška, která vyhovuje zde popsané zkušební metodě *in vitro* s vyšetřením luciferázy ARE-Nrf2, a to zkouška KeratinoSens™, u které již byly dokončeny validační studie (9) (12) (13) s následnou nezávislou odbornou revizí, kterou provedla Referenční laboratoř Evropské unie pro alternativy ke zkouškám na zvířatech (EURL ECVAM) (14). Zkouška KeratinoSens™ byla uznána za vědecky platnou při použití v rámci přístupu IATA na podporu rozlišování mezi látkami senzibilizujícími kůži a látkami nesenzibilizujícími kůži za účelem klasifikace nebezpečnosti a označování (14). Laboratoře, které chtějí tuto zkušební metodu provádět, mohou získat rekombinantní buněčnou linii použitou ve zkoušce KeratinoSens™ po uzavření licenční dohody se subjektem, který tuto zkušební metodu vyvinul (15).

Definice jsou uvedeny v dodatku 1.

VÝCHOZÍ ÚVAHY, POUŽITELNOST A OMEZENÍ

Jelikož se aktivace dráhy Keap1-Nrf2-ARE vztahuje pouze ke druhé klíčové události AOP pro senzibilizaci kůže, není pravděpodobné, že informace získané touto zkušební metodou na základě aktivace této dráhy, jsou-li použity samy o sobě, by byly dostatečné pro vyvození závěru o potenciálu chemických látek senzibilizovat kůži. Údaje získané pomocí této zkušební metody by proto měly posuzovány v kontextu integrovaných přístupů, např. IATA, v kombinaci s jinými doplňujícími informacemi získanými např. ze zkoušek *in vitro*, které zkoumají jiné klíčové události AOP pro senzibilizaci kůže, a také nezkušebními metodami včetně údajů odvozených z analogických chemických látek. Příklady využití údajů zkušební metody s vyšetřením luciferázy ARE-Nrf2 v kombinaci s jinými informacemi jsou uvedeny v literatuře (13) (16) (17) (18) (19).

Tuto zkušební metodu je možné v rámci IATA podpůrně použít k rozlišování mezi látkami senzibilizujícími kůži (tj. kategorie 1 GHS OSN / CLP) a látkami nesenzibilizujícími kůži. Tuto zkušební metodu nelze používat samu o sobě, a to ani k zařazení látek senzibilizujících kůži do podkategorií 1A a 1B, jak je definuje systém GHS OSN / CLP, ani k predikci účinnosti těchto látek při rozhodování v rámci posuzování bezpečnosti. V závislosti na regulačním rámci však pozitivní výsledek může být sám o sobě použit ke klasifikaci chemické látky v kategorii 1 GHS OSN / CLP.

Na základě souboru údajů z validační studie a z interního laboratorního testování použitého pro nezávislou odbornou revizi této zkušební metody bylo prokázáno, že zkoušku KeratinoSens™ lze přenést do laboratoří, které mají zkušenosti s kultivací buněk. Míra reprodukovatelnosti předpovědí, které lze od této zkušební metody očekávat, činí řádově 85 % v rámci laboratoří a 80 % mezi laboratořemi (14). Přesnost (77 % – 155/201), citlivost (78 % – 71/91) a specifičnost (76 % – 84/110) zkoušky KeratinoSens™ pro rozlišení mezi látkami senzibilizujícími kůži (tj. kategorie 1 UN GHS/CLP) a látkami nesenzibilizujícími kůži ve srovnání s výsledky zkoušky LLNA byly vypočteny na základě všech údajů, které byly předloženy EURL ECVAM za účelem vyhodnocení a odborné revize této zkušební metody. Tyto údaje jsou obdobné jako nedávno zveřejněné údaje založené na výsledcích interního testování asi 145 látek (přesnost 77 %, citlivost 79 %, specifičnost 72 %) (13). V případě zkoušky KeratinoSens™ je pravděpodobnější, že povede k příliš nízké předpovědi u chemických

▼M7

látek vykazujících nízkou až střední potenci způsobovat senzibilizaci kůže (tj. podkategorie 1B GHS OSN / CLP), než u chemických látek vykazujících vysokou potenci způsobovat senzibilizaci kůže (tj. podkategorie 1A GHS OSN / CLP) (13) (14). Celkově vzato tyto informace naznačují, že zkouška KeratinoSens™ může být užitečná a může přispět k zjištění nebezpečí senzibilizace kůže. Zde uvedené hodnoty přesnosti zkoušky KeratinoSens™ jako samostatné zkušební metody jsou však pouze orientační, neboť tato zkušební metoda by měla být posuzována v kombinaci s jinými zdroji informací v rámci IATA a v souladu s ustanoveními odstavce 9 výše. Při hodnocení metod posuzování senzibilizace kůže bez použití zvířat by se dále mělo vést v patrnosti, že ani LLNA a ani jiné zkoušky na zvířatech nemusí plně odrážet situaci existující u druhu, který je předmětem zájmu, tj. u lidí.

Termín „zkoušená chemická látka“ se v této zkušební metodě používá k označení toho, co se zkouší, a netýká se použitelnosti zkušební metody luciferázy ARE-Nrf2 ke zkoušení látek a/nebo směsí. Na základě nyní dostupných údajů bylo prokázáno, že zkoušku KeratinoSens™ lze použít ke zkoušení chemických látek, které obsahují různé organické funkční skupiny, mají různé reakční mechanismy, různou potenci způsobovat senzibilizaci kůže (jak byla stanovena ve studiích *in vivo*) a různé fyzikálně-chemické vlastnosti (9) (12) (13) (14). Zkoušeny byly hlavně jednosložkové látky, ačkoli určité omezené množství údajů existuje i o zkoušení směsí (20). Zkušební metoda je nicméně technicky použitelná i na zkoušení vícesložkových látek a směsí. Před použitím této zkušební metody ke zkoušení směsi za účelem získání údajů pro zamýšlené použití v právních předpisech by však mělo být zváženo, zda tato metoda může pro tento účel poskytnout přiměřené výsledky, a pokud ano, proč je tomu tak. Takové úvahy nejsou nutné, pokud existuje právní požadavek na zkoušení dané směsi. Při zkoušení vícesložkových látek nebo směsí by se mimoto měly uvážit možné rušivé vlivy cytotoxických složek na pozorované odpovědi. Zkušební metodu lze použít ke zkoušení rozpustných chemických látek nebo látek, jež tvoří stabilní disperzi (tj. koloid nebo suspenzi, ve které se zkoušená chemická látka neusazuje ani se neodděluje od rozpouštědla do různých fází) buď ve vodě, nebo v DMSO (včetně všech složek zkoušených chemických látek v případě zkoušení vícesložkové látky nebo směsi). Zkoušené chemické látky, které nesplňují tyto podmínky při nejvyšší požadované konečné koncentraci 2 000 μM (viz odstavec 22), lze přesto zkoušet při nižších koncentracích. V takovém případě by výsledky splňující kritéria pro pozitivitu popsaná v odstavci 39 i přesto mohly být použity na podporu identifikace zkoušené chemické látky jako látky senzibilizující kůži, ale negativní výsledek získaný při koncentracích < 1 000 μM by měl být považován za nepřesvědčivý (viz predikční model v odstavci 39). Obecně byly úspěšně zkoušeny látky s hodnotou LogP do 5, zatímco na extrémně hydrofobní látky s hodnotou LogP vyšší než 7 se podle současných poznatků použitelnost této zkušení metody nevztahuje (14). O látkách, u nichž hodnota LogP leží mezi 5 a 7, jsou k dispozici jen omezené informace.

Negativní výsledky by se měly interpretovat obezřetně, protože látky s výlučnou reaktivitou vůči reziduím lysinů může tato zkušební metoda detekovat jako negativní. Z důvodu omezené metabolické schopnosti použité buněčné linie (21) a vzhledem k experimentálním podmínkám mohou prohapteny (tj. chemické látky vyžadující enzymatickou aktivaci, například prostřednictvím enzymů P450) a prehapteny (tj. chemické látky aktivované autooxidací) zejména při nízké míře oxidace rovněž vykazovat negativní výsledky. Na druhé straně zkoušené chemické látky, které nepůsobí jako senzibilizující látka, ale jsou nicméně chemickými stresory, mohou vést k falešně pozitivním výsledkům (14). Ne vždy je též možné spolehlivě posuzovat vysoce cytotoxické zkoušené chemické látky. Rovněž tak zkoušené chemické látky, jež ovlivňují enzym luciferázu, mohou zkreslit aktivitu luciferázy ve zkouškách založených na zkoušení buněk, neboť způsobují buď očividnou inhibici, nebo zvýšenou luminiscenci (22). Uvádí se

▼M7

například, že koncentrace fytoestrogenu vyšší než 1 μM ovlivnila luminiscenční signály v jiných zkouškách reporterových genů založených na luciferáze v důsledku nadměrné aktivace reporterového genu luciferázy (23). V důsledku toho je nutné pečlivě zkoumat exprese luciferázy získané při vysoké koncentraci fytoestrogenů nebo podobných chemických látek, u nichž existuje podezření, že vyvolávají nadměrnou aktivaci reporterového genu luciferázy podobně jako fytoestrogeny (23). V případech, kdy mohou být předloženy důkazy prokazující nepoužitelnost této zkušební metody na jiné specifické kategorie chemických látek, neměla by se tato zkušební metoda ke zkoušení těchto specifických kategorií používat.

Kromě podpory rozlišování mezi látkami senzibilizujícími kůži a látkami nesenzibilizujícími kůži zkouška KeratinoSens™ rovněž poskytuje informace o vztahu koncentrace a účinku, které při použití v rámci integrovaných přístupů jako IATA mohou potenciálně přispět k hodnocení senzibilizační potence (19). Ke stanovení toho, jak mohou výsledky zkoušky KeratinoSens™ přispět k hodnocení potence (24) a k zařazování senzibilizujících látek do podkategorií GHS OSN / CLP, však bude zapotřebí další výzkum, přednostně založeny na spolehlivých údajích o účincích na člověka.

PODSTATA ZKOUŠKY

Zkušební metoda s vyšetřením luciferázy ARE-Nrf2 používá permanentní adherentní buněčné linie odvozené z lidských keratinocytů HaCaT stabilně transfektované volitelným plasmidem. Buněčná linie obsahuje gen luciferázy pod transkripční kontrolou konstitutivního promotoru sloučeného s elementem ARE z genu, o kterém je známo, že je up-regulován kontaktními senzibilizátory (25) (26). Signál luciferázy odráží aktivaci látek senzibilizujících endogenní Mrf2 závislé geny, a závislost signálu luciferázy na Nrf2 v rekombinantní buněčné linii byla prokázána (27). To umožňuje kvantitativní měření (pomocí lumuniscenční detekce) indukce genu luciferázy za použití dobře známých substrátů pro luciferázu produkujících světlo, jako ukazatele aktivity transkripčního faktoru Nrf2 v buňkách po expozici elektrofilním látkám.

Zkoušené chemické látky se při zkoušce KeratinoSens™ považují za pozitivní, pokud vyvolávají statisticky významnou indukci aktivity luciferázy nad stanovenou prahovou hodnotou (tj. > 1,5násobný nebo 50 % růst) při menší než stanovené koncentraci, která významně neovlivňuje životaschopnost buněk (tj. nižší než 1 000 μM a při koncentraci, při které je životaschopnost buněk vyšší než 70 % (9) (12)). Za tímto účelem se stanoví maximální násobek indukce aktivity luciferázy oproti (negativní) kontrole s rozpouštědlem (I_{max}). Jelikož jsou buňky vystaveny řadě koncentrací zkoušených chemických látek, měly by se dále z křivky dávka-účinek interpolovat koncentrace potřebné pro vyvolání statisticky významné aktivity luciferázy nad prahovou hodnotou (tj. hodnota $EC_{1,5}$) (výpočty viz odstavec 32). Měla by být rovněž prováděna paralelní měření cytotoxicity, aby bylo možné posoudit, zda úrovně indukce aktivity luciferázy nastávají při sub-cytotoxických koncentracích.

Před rutinním použitím zkoušky se stanovením luciferázy ARE-Nrf2 by měly laboratoře prokázat odbornou způsobilost použitím deseti k tomu určených látek, které jsou uvedeny v dodatku 2.

Jsou k dispozici technické parametry metody (Performance Standards) (28), které usnadní validaci nových nebo pozměněných zkušebních metod luciferázy ARE-Nrf2 *in vitro* obdobných zkoušce KeratinoSens™ a umožní včas provést změnu této zkušební metody, aby do ní mohly být zahrnuty. Vzájemné uznávání údajů bude podle postupu dohodnutého v rámci OECD zaručeno pouze u zkušebních metod validovaných podle těchto výkonnostních standardů, pokud tyto zkušební metody byly podrobeny revizi a pokud je OECD zahrnula do odpovídajícího pokynu ke zkoušení.

▼M7

POSTUP

Jedinou zkouškou, kterou popsaná zkušební metoda v současnosti zahrnuje, je vědecky platná zkouška KeratinoSens™ (9) (12) (13) (14). Jsou k dispozici standardní pracovní postupy pro zkoušku KeratinoSens™ a měly by být používány pro provádění a využívání této zkušební metody v laboratoři (15). Laboratoře, jež chtějí tuto zkušební metodu provádět, mohou získat rekombinantní buněčnou linii použitou ve zkoušce KeratinoSens™ po uzavření licenční dohody se subjektem, který tuto zkušební metodu vyvinul. V následujících odstavcích je uveden popis hlavních složek a postupů zkušební metody se stanovením luciferázy ARE-Nrf2.

Příprava kultur keratinocytů

Měla by být použita transgenní buněčná linie, která má stabilní inzerci reporterového genu luciferázy řízeného elementem ARE (např. buněčná linie KeratinoSens™). Buňky se po obdržení pomnoží (např. 2 až 4 pasáže) a skladují se zmrazené jako homogenní kmen. Buňky z tohoto původního kmene se mohou pomnožit až do maximálního počtu pasáží (tj. 25 v případě KeratinoSens™) a použijí se pro rutinní zkoušení s použitím vhodného udržovacího média (v případě KeratinoSens™ se jedná o DMEM (Dulbeccova modifikace Eagleova média, obsahující sérum a geneticin).

Buňky by pro zkoušení měly být z 80 % až 90 % konfluentní a je třeba dbát na to, aby nikdy nevyrostly do úplné konfluence. Jeden den před zkoušením se buňky odeberou a rozdělí na destičky o 96 jamkách (10 000 buněk na každou jamku v případě KeratinoSens™). Je třeba se vyvarovat sedimentace buněk během nasazování, aby se zajistila distribuce homogenního počtu buněk do jamek. Pokud by se tak nestalo, může z tohoto kroku vzejít vysoká variabilita mezi jednotlivými jamkami. V každém opakování se použijí tři repliky pro měření aktivity luciferázy a jedna souběžná replika se použije pro zkoušku životaschopnosti buněk.

Příprava zkoušené chemické látky a kontrolních látek

Zkoušená chemická látka a kontrolní látky se připraví v den zkoušení. Při zkoušce KeratinoSens™ se zkoušené chemické látky rozpustí v dimethylsulfoxidu (DMSO) na žádoucí konečnou koncentraci (např. 200 mM). Roztoky v DMSO lze považovat za samosterilizující, takže sterilní filtrace není nutná. Chemická látka, která není rozpustná v DMSO, se rozpustí v sterilní vodě nebo v kultivačním médiu a roztoky se sterilizují např. filtrací. V případě zkoušené chemické látky, která nemá definovanou molekulovou hmotnost (MW) se připraví zásobní roztok v standardní koncentraci (40 mg/ml nebo 4 % (m/V)) používané ve zkoušce KeratinoSens™. V případě použití jiných rozpouštědel než DMSO, vody nebo kultivačního média by mělo být uvedeno dostatečné vědecké zdůvodnění.

Na základě zásobních roztoků zkoušené chemické látky v DMSO se provádí sériové ředění pomocí DMSO k získání 12 základních koncentrací chemické látky, která má být zkoušena (od 0,098 do 200 mM ve zkoušce KeratinoSens™). U chemických látek nerozpustných v DMSO se k získání základních koncentrací provádí ředění sterilní vodou nebo sterilním kultivačním médiem. Nezávisle na použitém rozpouštědle se poté základní koncentrace dále naředí v poměru 1:25 v kultivačním médiu obsahujícím sérum, a nakonec se použije k expozici buněk po dalším zředění ředicím faktorem 4, takže konečné koncentrace zkoušené chemické látky při zkoušce KeratinoSens™ jsou v rozsahu od 0,98 do 2 000 μM. V odůvodněných případech lze použít jiné koncentrace (např. v případě cytotoxicity nebo špatné rozpustnosti).

Pro negativní kontrolu (s rozpouštědlem) se ve zkoušce KeratinoSens™ používá DMSO (č. CAS 67-68-5, v ≥ 99 % čistotě), pro tuto kontrolu se připraví šest jamek na každé destičce. Provede se stejné zředění, jak je popsáno u základních koncentrací v odstavci 22, takže konečná koncentrace negativní kontroly

▼M7

(s rozpouštědlem) je 1 %, což neovlivní životaschopnost buněk a odpovídá to stejné koncentraci DMSO, která je použita u zkoušené chemické látky a v pozitivní kontrole. U zkoušené chemické látky nerozpustné v DMSO, u které se ředění prováděla ve vodě, musí být úroveň DMSO ve všech jamkách konečného zkušebního roztoku upravena na 1 %, tj. na stejnou úroveň, která byla použita u ostatních zkoušených chemických látek a u kontrolních látek.

Pozitivní kontrolou, která se používá v případě zkoušky KeratinoSens™ je cinnamaldehyd (č. CAS 14371-10-9, o čistotě ≥ 98 %), pro který se připraví řada základních koncentrací v rozsahu od 0,4 do 6,4 mM v DMSO (ze zásobního roztoku 6,4 mM) a rozpustí se tak, jak je uvedeno u základních koncentrací v odstavci 22, takže konečná koncentrace pozitivní kontroly je v rozsahu 4 až 64 μM. Lze použít jiné vhodné pozitivní kontroly, nejlépe poskytující hodnoty $EC_{1,5}$ ve střední části rozsahu, pokud jsou k dispozici historické údaje k odvození srovnatelných kritérií přijatelnosti provedení.

Aplikace zkoušené chemické látky a kontrolních látek

U každé zkoušené chemické látky a pozitivní kontrolní látky je pro předpověď účinku (pozitivní nebo negativní) postačující jeden experiment, který sestává nejméně ze dvou nezávislých opakování, každé s třemi replikami (tj. n = 6). V případě neshodných výsledků mezi dvěma nezávislými opakováními by se mělo provést třetí opakování se třemi replikami (tj. n=9). Každé nezávislé opakování se provádí v různý den s čerstvým zásobním roztokem zkoušených chemických látek a s nezávisle sklizenými buňkami. Buňky však mohou pocházet ze stejné pasáže.

Po nasazení buněk, jak je popsáno v odstavci 20, se buňky kultivují 24 hodin na mikrotitračních destičkách s 96 jamkami. Médium se poté odstraní a nahradí čerstvým kultivačním médiem (v případě zkoušky KeratinoSens™ je to 150 μl kultivačního média obsahujícího sérum, ale bez geneticinu, do něhož se přidá 50 μl 25násobně rozředěné zkoušené chemické látky a kontrolních látek. Nejméně jedna jamka na každé destičce by se měla ponechat prázdná (bez buněk a bez expozice), aby bylo možné posoudit hodnoty pozadí.

Exponované destičky se poté ve zkoušce KeratinoSens™ inkubují asi 48 hodin při teplotě 37 ± 1 °C za přítomnosti 5 % CO_2. Mělo by se dbát na to, aby nedošlo k vypařování těkavých zkoušených chemických látek a ke vzájemné kontaminaci zkoušenou chemickou látkou mezi jamkami, např. tak, že se destičky před inkubací se zkoušenými chemickými látkami přikryjí fólií.

Měření aktivity luciferázy

K zajištění odpovídajících údajů o luminiscenci jsou kriticky důležité tři faktory:

— volba citlivého luminometru,

— použití destiček o dostatečné výšce, aby se nedošlo k vzájemné světelné kontaminaci, a

— použití substrátu pro luciferázu s dostatečným světelným výstupem, což zajistí dostatečnou citlivost a nízkou variabilitu.

Před vlastním zkoušením by měl být proveden kontrolní experiment, jak je popsáno v dodatku 3, aby se zajistilo, že tyto tři body budou splněny.

Po 48hodinové době expozice zkoušené chemické látce a kontrolním látkám ve zkoušce KeratinoSens™ se buňky opláchnou fosfátovým pufrem a do každé jamky se přidá na 20 minut za pokojové teploty příslušný lýzový pufr pro získání údajů o luminiscenci.

▼M7

Destičky s buněčným lyzátem se poté vloží do luminometru pro získání údajů, což je ve zkoušce KeratinoSens™ naprogramováno tak, že se i) přidá substrát pro luciferázu do každé jamky (tj. 50 µl), ii) počká 1 sekundu a iii) integruje aktivita luciferázy po 2 sekundy. V případě, že se použije jiné nastavení, např. v závislosti na použitém modelu luminometru, mělo by to být odůvodněno. Je možné rovněž použít luminiscenční substrát za předpokladu, že byl úspěšně splněn pokus na kontrolu kvality uvedený v dodatku 3.

Posouzení cytotoxicity

Při zkoušce životaschopnosti buněk KeratinoSens™ se médium po 48hodinové expoziční době nahradí čerstvým médiem obsahujícím MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium-bromid, thiazolylová modř č. CAS 298-93-1) a buňky se inkubují 4 hodiny při teplotě 37 °C za přítomnosti 5 % CO_2. Médium s MTT se poté odstraní a buňky se přes noc lýzují (např. přidáním 10 % roztoku SDS do každé jamky). Po protřepání se změří absorpce při 600 nm pomocí fotometru.

ÚDAJE A PŘEDKLÁDÁNÍ ZPRÁV

Vyhodnocení údajů

Ve zkoušce KeratinoSens™ se vypočítávají tyto parametry:

— maximální průměrný násobek hodnoty indukce aktivity luciferázy (I_{max}) pozorovaný při jakékoli koncentraci zkoušené chemické látky a pozitivní kontroly,

— hodnota $EC_{1,5}$, jež představuje koncentraci, při níž byla získána indukce aktivity luciferázy vyšší než 1,5násobek prahové hodnoty (tj. než 50 % zvýšení aktivity luciferázy), a

— hodnoty koncentrací IC_{50} a IC_{30}, při nichž došlo k 50 % a 30 % snížení životnosti buněk,

— násobek indukce aktivity luciferázy se vypočítá pomocí rovnice 1 a celkový maximální násobek indukce (I_{max}) se vypočítá jako průměr jednotlivých opakování.

Rovnice 1:

$$Násobek\ indukce = \frac{(L_{sample} - L_{blank})}{(L_{solvent} - L_{blank})}$$

kde

L_{sample} je naměřená hodnota luminiscence v jamce se zkoušenou chemickou látkou,

L_{blank} je naměřená hodnota luminiscence v jamce slepého pokusu, jež neobsahuje žádné buňky a nebyla nijak ošetřena,

$L_{solvent}$ je průměrná naměřená hodnota luminiscence v jamkách obsahujících buňky a (negativní) kontrolu s rozpouštědlem.

$EC_{1,5}$ se vypočítá lineární interpolací podle rovnice2 a celková hodnota $EC_{1,5}$ se vypočítá jako geometrický průměr z jednotlivých opakování.

Rovnice 2:

$$EC1{,}5 = (C_b - C_a) \times \left(\frac{1{,}5 - I_\alpha}{I_b - I_\alpha}\right) + C_\alpha$$

▼M7

kde

C_a je nejnižší koncentrace v μM s větší než 1,5násobnou indukcí,

C_b je nejvyšší koncentrace v μM s menší než 1,5násobnou indukcí,

I_a je násobek indukce naměřený při nejnižší koncentraci s větší než 1,5násobnou indukcí (střední hodnota tří jamek s replicitními vzorky),

I_b je násobek indukce při nejvyšší koncentraci s menší než 1,5násobnou indukcí (střední hodnota tří jamek s replicitními vzorky).

Životaschopnost se vypočítá podle rovnice 3:

Rovnice 3:

$$Životaschopnost = \frac{(V_{sample} - V_{blank})}{V_{solvent} - V_{blank}} \times 100$$

kde

V_{sample} je naměřená hodnota absorbance MTT v jamce se zkoušenou chemickou látkou,

V_{blank} je naměřená hodnota absorbance MTT v jamce slepého pokusu, jež neobsahuje žádné buňky a nebyla nijak ošetřena,

$V_{solvent}$ je průměrná naměřená hodnota absorbance MTT v jamkách obsahujících buňky a (negativní) kontrolu s rozpouštědlem,

IC_{50} a IC_{30} se vypočítají lineární interpolací podle rovnice 4 a celkové hodnoty IC_{50} a IC_{30} se vypočítají jako geometrický průměr z jednotlivých opakování.

Rovnice 4:

$$IC_x = (C_b - C_a) \times \left(\frac{(100 - x) - V_a}{V_b - V_a}\right) + C_a$$

kde

X je % snížení při koncentraci, jež má být vypočtena (50 pro IC_{50} a 30 pro IC_{30}),

C_a je nejnižší koncentrace v μM s větším než x % snížením životaschopnosti,

C_b je nejvyšší koncentrace v μM s menším než x % snížením životaschopnosti,

V_a je % životaschopnosti při nejnižší koncentraci s větším než x % snížením životaschopnosti,

V_b je % životaschopnosti při nejvyšší koncentraci s menším než x % snížením životaschopnosti.

U každé koncentrace vykazující větší než 1,5násobnou indukci aktivity luciferázy se vypočte statistická významnost (např. pomocí dvouvýběrového Studentova t-testu), přičemž se hodnoty luminiscence u tří replicitních vzorků porovnají s hodnotami luminiscence zjištěné v jamkách (negativní) kontroly s rozpouštědlem, což umožní stanovit, zda je indukce aktivity luciferázy statisticky významná ($p < 0,05$). Nejnižší koncentrace s větší než 1,5násobnou indukcí aktivity luciferázy je hodnotou určující hodnotu $EC_{1,5}$. V každém případě se zkontroluje, zda je tato hodnota nižší než hodnota IC_{30}, což nasvědčuje tomu, že při koncentraci určující hodnotu $EC_{1,5}$ je menší než 30 % snížení životaschopnosti buněk.

▼M7

Doporučuje se tyto údaje zkontrolovat vizuálně s použitím grafů. Není-li zjištěna jasná křivka dávka-účinek nebo pokud je získaná křivka dávka-účinek dvoufázová (tj. protíná prahovou hodnotu 1,5 dvakrát), měl by být experiment opakován, aby se ověřilo, zda je to specifické pro danou chemickou látku nebo zda je to důsledkem experimentálního artefaktu. V případě, že dvoufázová odezva je reprodukovatelná v nezávislém experimentu, měla by být zaznamenána nižší hodnota $EC_{1,5}$ (koncentrace, kdy je prahová hodnota 1,5 protnuta poprvé).

V ojedinělých případech, kdy je zjištěna statisticky nevýznamná indukce nad 1,5násobnou hodnotou, po níž následuje vyšší koncentrace se statisticky významnou indukcí, se výsledky získané z tohoto opakování považují za platné a pozitivní pouze v případě, že při koncentraci, jež není cytotoxická, byla získána statisticky významná indukce vyšší než prahová hodnota 1,5).

A konečně, u chemických látek, jež vyvolávají 1,5násobnou nebo vyšší indukci při nejnižší koncentraci 0,98 μM, se na základě vizuální kontroly křivky dávka-účinek stanoví hodnota $EC_{1,5} < 0,98$.

Kritéria přijatelnosti

Při použití zkoušky KeratinoSens™ by měla být splněna tato kritéria přijatelnosti: Zaprvé, indukce aktivity luciferázy získaná s pozitivní kontrolou, cinnamaldehydem, by měla být statisticky významná nad prahovou hodnotou 1,5 (tj. s použitím T-testu) alespoň při jedné ze zkoušených koncentrací (od 4 do 64 μM).

Zadruhé, hodnota $EC_{1,5}$ by měla ležet mezi dvěma směrodatnými odchylkami od historické střední hodnoty zkušebního zařízení (např. mezi 7 μM a 30 μM na základě souboru údajů použitého pro validaci), která by měla být pravidelně aktualizována. Dále, průměrná indukce ve třech replikách s cinnamaldehydem při koncentraci 64 μM by měla být mezi 2 a 8. Není-li toto posledně uvedené kritérium splněno, měla by se pečlivě zkontrolovat křivka dávka-účinek cinnamaldehydu a zkoušky lze přijmout pouze v případě, že existuje jednoznačný vztah dávka-účinek s rostoucí indukcí aktivity luciferázy při rostoucích koncentracích v pozitivní kontrole.

Průměrný variační koeficient u naměřených údajů luminiscence v negativní kontrole (s rozpouštědlem) s DMSO by pak měl být pod hodnotou 20 % při každém opakování, které se skládá z 6 jamek testovaných třikrát. Je-li variabilita vyšší, výsledky se nepoužijí.

Interpretace výsledků a predikční model

Předpověď získaná zkouškou KeratinoSens™ se považuje za pozitivní, jsou-li splněny všechny 4 následující podmínky ve 2 ze 2 opakování nebo v týchž 2 ze 3 opakování, jinak se předpověď získaná zkouškou KeratinoSens™ považuje za negativní (schéma č. 1):

1. hodnota I_{max} je větší než (>) 1,5násobek a statisticky významně se liší v porovnání s hodnotou (negativní) kontroly s rozpouštědlem (jak se stanoví pomocí dvouvýběrového, nepárového Studentova t-testu);

2. životaschopnost buněk je větší než (>) 70 % při nejnižší koncentraci, jež vede k indukci aktivity luciferázy vyšší než 1,5násobek (tj. při koncentraci určující hodnotu $EC_{1,5}$);

3. hodnota $EC_{1,5}$ je menší než (<) 1 000 μM (nebo < 200 μg/ml v případě zkoušené chemické látky bez definované molekulové hmotnosti;

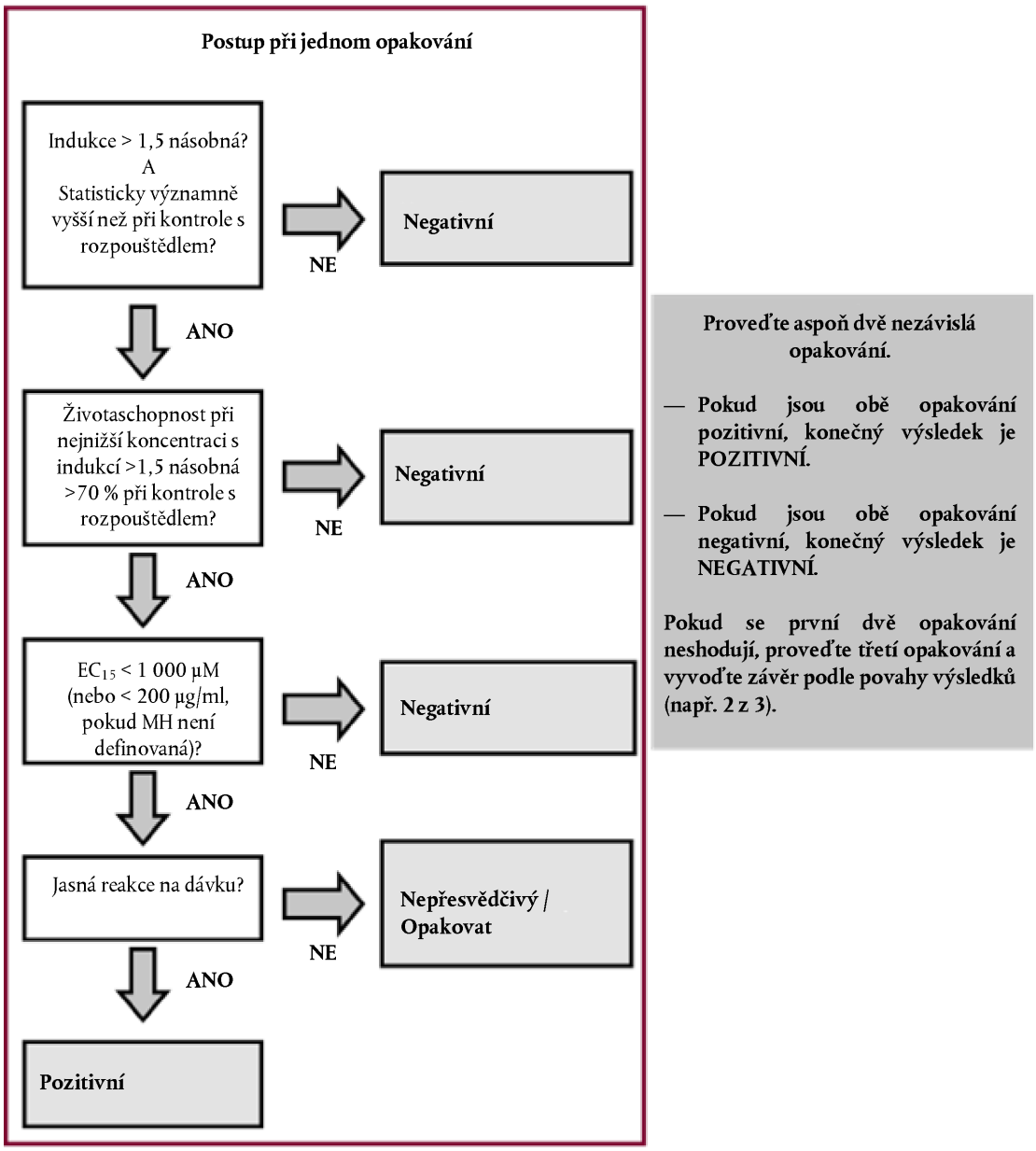
4. existuje zjevný celkový vztah dávka-účinek při indukci luciferázy (nebo dvoufázová odezva, jak uvedeno v odstavci 33).

▼M7

Pokud v daném opakování jsou všechny tři první podmínky splněny, avšak nelze zjistit jasný vztah dávka-účinek při indukci luciferázy, pak by výsledek tohoto opakování měl být považován za nepřesvědčivý a může být nutné další zkoušení (schéma č. 1). Rovněž tak negativní výsledek získaný s koncentracemi < 1 000 µM (nebo < 200 µg/ml v případě zkoušených chemických látek bez definované molekulové hmotnosti) by také měl být považován za nepřesvědčivý (viz odstavec 11).

Schéma č. 1

Predikční model používaný při zkoušce KeratinoSens™. Předpověď KeratinoSens™ by měla být hodnocena v rámci přístupu IATA a v souladu s ustanoveními odstavců 9 a 11.



V ojedinělých případech zkoušené chemické látky, jež indukují aktivitu luciferázy na úrovni velmi blízké cytotoxickým úrovním, mohou být při některých opakováních pozitivní na necytotoxických úrovních (tj. při koncentraci určující hodnotu $EC_{1,5}$ menší než (<) koncentrace IC_{30}), a při jiných opakováních mohou být pozitivní pouze na cytotoxických úrovních (tj. při koncentraci určující

▼M7

hodnotu $EC_{1,5}$ větší než (>) koncentrace IC_{30}). Takové zkoušené chemické látky musí být přezkoušeny s užší analýzou vztahu dávka-účinek a za použití nižšího ředicího faktoru (např. zředění 1:1,33 nebo √2 (= 1,41) mezi jamkami), aby bylo možné stanovit, zda došlo k indukci na cytotoxických úrovních, či nikoli (9).

Závěrečná zpráva

Závěrečná zpráva by měla obsahovat tyto informace:

Zkoušená chemická látka

— Jednosložková látka:

  — chemická identifikace, např. název (názvy) IUPAC nebo CAS, číslo (čísla) CAS, kód SMILES nebo InChI, strukturní vzorec a/nebo jiné identifikátory,

  — fyzický vzhled, rozpustnost ve vodě, rozpustnost v DMSO, molekulová hmotnost a další důležité fyzikálně-chemické vlastnosti, v rozsahu, v jakém jsou tyto informace dostupné,

  — čistota, případně chemická identita nečistot, je-li to prakticky proveditelné atd.,

  — případné ošetření před zkoušením (např. zahřívání, mletí),

  — zkušební koncentrace,

  — podmínky skladování a stabilita, v rozsahu, v jakém jsou tyto informace dostupné.

— Vícesložková látka, UVCB a směs:

  — charakterizovaná v co možná největší míře např. chemickou identitou (viz výše), čistotou, kvantitativním výskytem a důležitými fyzikálně-chemickými vlastnostmi (viz výše) složek, v rozsahu, v jakém jsou tyto informace dostupné,

  — fyzický vzhled, rozpustnost ve vodě, rozpustnost v DMSO, a další důležité fyzikálně-chemické vlastnosti, v rozsahu, v jakém jsou tyto informace dostupné,

  — molekulová hmotnost nebo zdánlivá molekulová hmotnost v případě směsí/polymerů se známým složením nebo jiné informace důležité pro provedení studie,

  — případné ošetření před zkoušením (např. zahřívání, mletí),

  — zkušební koncentrace,

  — podmínky skladování a stabilita, v rozsahu, v jakém jsou tyto informace dostupné.

Kontroly

— Pozitivní kontrola:

  — chemická identifikace, např. název (názvy) IUPAC nebo CAS, číslo (čísla) CAS, kód SMILES nebo InChI, strukturní vzorec a/nebo jiné identifikátory,

  — případně fyzický vzhled, rozpustnost ve vodě, rozpustnost v DMSO, molekulová hmotnost a další důležité fyzikálně-chemické vlastnosti, v rozsahu, v jakém jsou tyto informace dostupné,

  — čistota, případně chemická identita nečistot, je-li to prakticky proveditelné atd.,

  — případné ošetření před zkoušením (např. zahřívání, mletí),

  — zkušební koncentrace,

  — podmínky skladování a stabilita, v rozsahu, v jakém jsou tyto informace dostupné,

▼M7

— odkaz na případné dosavadní výsledky pozitivních kontrol prokazující vhodnost kritérií přijatelnosti provedení.

— Negativní kontrola (kontrola vehikula):

— chemická identifikace, např. název (názvy) IUPAC nebo CAS, číslo (čísla) CAS a/nebo jiné identifikátory,

— čistota, případně chemická identita nečistot, je-li to prakticky proveditelné atd.,

— fyzický vzhled, molekulová hmotnost a další důležité fyzikálně-chemické vlastnosti v případě použití jiných negativních kontrol / vehikul, než které jsou uvedeny v této zkušební metodě, a to v rozsahu, v jakém jsou tyto informace dostupné,

— podmínky skladování a stabilita, v rozsahu, v jakém jsou tyto informace dostupné,

— zdůvodnění volby rozpouštědla pro každou zkoušenou chemickou látku.

Podmínky zkušební metody

— jméno a adresa zadavatele, zkušebního zařízení a vedoucího studie,

— popis použité zkušební metody,

— použité buněčné linie, podmínky skladování a zdroj (např. zařízení, z něhož byly získány),

— počet pasáží a míra konfluence buněk použitých ke zkoušení,

— metoda počítání buněk použitá při jejich nasazování před zkoušením a opatření přijatá k zajištění homogenní distribuce počtu buněk (viz odstavec 20),

— použitý luminometr (např. model), včetně nastavení přístroje, použitý substrát pro luciferázu a prokázání přiměřeného měření luminiscence na základě kontrolního testu, který je popsán v dodatku 3,

— postup použitý pro prokázání způsobilosti laboratoře k provádění této zkušební metody (např. zkoušením vhodných látek) nebo pro prokázání reprodukovatelného provedení této zkušební metody v průběhu doby.

Postup zkoušky

— počet opakování a použitých replik,

— koncentrace zkoušených chemických látek, použitý postup aplikace a doba expozice (pokud se liší od doporučených),

— popis použitých hodnotících kritérií a kritérií rozhodování,

— popis použitých kritérií přijatelnosti studie,

— popis jakýchkoli změn zkušebního postupu.

Výsledky

— Tabulka s uvedením hodnot I_{max}, $EC_{1,5}$ a životaschopnosti (tj. IC_{50}, IC_{30}) získaných se zkoušenými chemickými látkami a v pozitivních kontrolách při každém opakování, a rovněž středních hodnot (I_{max}: průměr; hodnoty $EC_{1,5}$ a životaschopnosti: geometrický průměr) a směrodatných odchylek vypočtených z údajů získaných při všech opakováních, s uvedením hodnocení zkoušené chemické látky podle predikčního modelu,

▼M7

— získaný variační koeficient s údaji o luminiscenci naměřenými v negativní kontrole při každém pokusu,

— graf zobrazující křivky dávka- účinek pro indukci aktivity luciferázy a životaschopnost,

— případně popis jakýchkoli jiných důležitých zjištění z pozorování.

Diskuse o výsledcích

— diskuse o výsledcích získaných za pomoci zkoušky KeratinoSens™,

— diskuse o výsledcích zkušební metody v rámci IATA, jsou-li k dispozici jiné příslušné informace.

Závěr

LITERATURA

1) United Nations (UN) (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Fifth revised edition, UN New York and Geneva, 2013. Dostupné na: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html.

2) OECD (2012). The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Scientific Evidence. OECD Environment, Health and Safety publications, Series on Testing and Assessment No. 168. OECD, Paris.

3) Adler S., Basketter D., Creton S., Pelkonen O., van Benthem J., Zuang V., Andersen K.E., Angers-Loustau A., Aptula A., Bal-Price A., Benfenati E., Bernauer U., Bessems J., Bois F.Y., Boobis A., Brandon E., Bremer S., Broschard T., Casati S., Coecke S., Corvi R., Cronin M., Daston G., Dekant W., Felter S., Grignard E., Gundert-Remy U., Heinonen T., Kimber I., Kleinjans J., Komulainen H., Kreiling R., Kreysa J., Leite S.B., Loizou G., Maxwell G., Mazzatorta P., Munn S., Pfuhler S., Phrakonkham P., Piersma A., Poth A., Prieto P., Repetto G., Rogiers V., Schoeters G., Schwarz M., Serafimova R., Tähti H., Testai E., van Delft J., van Loveren H., Vinken M., Worth A., Zaldivar J.M. (2011). Alternative (non-animal) methods for cosmetics testing: current status and future prospects-2010. Archives of Toxicology 85, 367–485.

4) Kapitola B.42 této přílohy: Senzibilizace kůže: zkouška s vyšetřením lokálních lymfatických uzlin.

5) Kapitola B.6 této přílohy: Senzibilizace kůže.

6) Kapitola B.50 této přílohy: Senzibilizace kůže: zkouška s vyšetřením lokálních lymfatických uzlin: DA.

7) Kapitola B.51 této přílohy: Senzibilizace kůže: zkouška s vyšetřením lokálních lymfatických uzlin: BrdU-ELISA.

8) Natsch A. (2010). The Nrf2-Keap1-ARE Toxicity Pathway as a Cellular Sensor for Skin Sensitizers-Functional Relevance and Hypothesis on Innate Reactions to Skin Sensitizers. Toxicological Sciences 113, 284–292.

9) Emter R., Ellis G., Natsch A. (2010). Performance of a novel keratinocyte-based reporter cell line to screen skin sensitizers *in vitro*. Toxicology and Applied Pharmacology 245, 281–290.

10) Dinkova-Kostova A.T., Holtzclaw W.D., Kensler T.W. (2005). The role of Keap1 in cellular protective responses. Chem. Res. Toxicol. 18, 1779–1791.

▼**M7**

11) Kansanen E., Kuosmanen S.M., Leinonen H., Levonen A.L. (2013). The Keap1-Nrf2 pathway: Mechanisms of activation and dysregulation in cancer. Redox Biol. 1(1), 45–49.

12) Natsch A., Bauch C., Foertsch L., Gerberick F., Normann K., Hilberer A., Inglis H., Landsiedel R., Onken S., Reuter H., Schepky A., Emter R. (2011). The intra- and inter-laboratory reproducibility and predictivity of the KeratinoSens assay to predict skin sensitizers *in vitro*: results of a ring-study in five laboratories. Toxicol. *In Vitro* 25, 733–744.

13) Natsch A., Ryan C.A., Foertsch L., Emter R., Jaworska J., Gerberick G.F., Kern P. (2013). A dataset on 145 chemicals tested in alternative assays for skin sensitization undergoing prevalidation. Journal of Applied Toxicology, 33, 1337–1352.

14) EC EURL-ECVAM (2014). Recommendation on the KeratinoSens™ assay for skin sensitisation testing (Doporučení pro zkoušku KeratinoSens™ ke zkoušení senzibilizace kůže), 42 pp. Dostupné na: http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/eurl-ecvam/eurl-ecvam-recommendations/recommendation-keratinosens-skin-sensitisation.

15) DB-ALM (INVITTOX) (2013) Protocol 155: KeratinoSens™, 17 pp. Dostupné na: http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/beta/index.cfm/methodsAndProtocols/index

16) Natsch A., Emter R., Ellis G. (2009). Filling the concept with data: integrating data from different *in vitro* and *in silico* assays on skin sensitizers to explore the battery approach for animal-free skin sensitization testing. Toxicol. Sci. 107, 106–121.

17) Ball N., Cagen S., Carrillo J.C., Certa H., Eigler D., Emter R., Faulhammer F., Garcia C., Graham C., Haux C., Kolle S.N., Kreiling R., Natsch A., Mehling A. (2011). Evaluating the sensitization potential of surfactants: integrating data from the local lymph node assay, guinea pig maximization test, and *in vitro* methods in a weight-of-evidence approach. Regul. Toxicol. Pharmacol. 60, 389–400.

18) Bauch C., Kolle S.N., Ramirez T., Eltze T., Fabian E., Mehling A., Teubner W., van Ravenzwaay B., Landsiedel R. (2012). Putting the parts together: combining *in vitro* methods to test for skin sensitizing potentials. Regul. Toxicol. Pharmacol. 63, 489–504.

19) Jaworska J., Dancik Y., Kern P., Gerberick F., Natsch A. (2013). Bayesian integrated testing strategy to assess skin sensitization potency: from theory to practice. J Appl Toxicol. 33, 1353–1364.

20) Andres E., Sa-Rocha V.M., Barrichello C., Haupt T., Ellis G., Natsch A. (2013). The sensitivity of the KeratinoSens™ assay to evaluate plant extracts: A pilot study. Toxicology *In Vitro* 27, 1220–1225.

21) Fabian E., Vogel D., Blatz V., Ramirez T., Kolle S., Eltze T., van Ravenzwaay B., Oesch F., Landsiedel R. (2013). Xenobiotic metabolizin enzyme activities in cells used for testing skin sensitization *in vitro*. Arch. Toxicol. 87, 1683–1969.

22) Thorne N., Inglese J., Auld D.S. (2010). Illuminating Insights into Firefly Luciferase and Other Bioluminescent Reporters Used in Chemical Biology. Chemistry and Biology 17, 646–657.

23) OECD (2012). BG1Luc Estrogen Receptor Transactivation Test Method for Identifying Estrogen Receptor Agonists and Antagonists. OECD Guidelines for Chemical Testing No. 457. OECD, Paris.

24) ECETOC (2003). Contact sensitization: Classification according to potency. European Centre for Ecotoxicology & Toxicology of Chemicals (Technical Report No. 87).

25) Gildea L.A., Ryan C.A., Foertsch L.M., Kennedy J.M., Dearman R.J., Kimber I., Gerberick G.F. (2006). Identification of gene expression changes induced by chemical allergens in dendritic cells: opportunities for skin sensitization testing. J. Invest. Dermatol., 126, 1813–1822.

▼**M7**

26) Ryan C.A., Gildea L.A., Hulette B.C., Dearman R.J., Kimber I., Gerberick G.F. (2004). Gene expressing changes in peripheral blood-derived dendritic cells following exposure to a contact allergen. Toxicol. Lett. 150, 301–316.

27) Emter R., van der Veen J.W., Adamson G., Ezendam J., van Loveren H., Natsch A. (2013). Gene expression changes induced by skin sensitizers in the KeratinoSens™ cell line: Discriminating Nrf2-dependent and Nrf2-independent events. Toxicol. *in vitro* 27, 2225–2232.

28) OECD (2015). Performance Standards for assessment of proposed similar or modified *in vitro* skin sensitisation ARE-Nrf2 luciferase test methods. OECD Environment, Health and Safety publications, Series on Testing and Assessment N0 213, OECD, Paris.

29) OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. OECD Environment, Health and Safety publications, Series on Testing and Assessment No.34. OECD, Paris, France.

30) NAFTA (North American Free Trade Agreement) (2012). Technical Working Group on Pesticides – (Quantitative) Structure Activity Relationship ((Q)SAR) Guidance Document. 186 pp. http://www.epa.gov/oppfead1/international/naftatwg/guidance/qsar-guidance.pdf

▼M7

Dodatek 1

DEFINICE

Přesnost: Přesnost shody mezi výsledky zkušební metody a přijatými referenčními hodnotami. Je to měření výsledku zkušební metody a jednoho aspektu „důležitosti“. Tento výraz se často používá namísto výrazu „soulad“ a rozumí se jím podíl správných výsledků zkušební metody (29).

AOP (mechanismy nežádoucích účinků): Sled událostí od chemické struktury cílové chemické látky nebo skupiny podobných chemických látek přes molekulární iniciační událost po účinek *in vivo*, který je předmětem zájmu (2).

ARE: Antioxidační responzivní element (též nazývaný EpRE, elektrofilní responzivní element), je responzivní element, který se nachází v oblasti protisměrných promotorů mnohých cytoprotektivních genů a genů kódujících enzymy II. fáze. Je-li aktivován prostřednictvím transkripčního faktoru Nfr2, zprostředkovává transkripční indukci těchto genů.

Chemická látka: Chemická substance nebo směs.

Variační koeficient: Míra variability, která se vypočítává pro skupinu údajů z replik tak, že se směrodatná odchylka vydělí průměrem. Lze ho vynásobit 100 za účelem vyjádření v procentech.

$EC_{1,5}$: Interpolovaná koncentrace pro získání 1,5násobné indukce luciferázy.

IC_{30}: Koncentrace vyvolávající snížení životaschopnosti buněk o 30 %.

IC_{50}: Koncentrace vyvolávající snížení životaschopnosti buněk o 50 %.

Nebezpečnost: Základní charakteristika látky nebo situace, která má potenciál vyvolat nepříznivé účinky, jsou-li organismus, systém nebo (sub)populace vystaveny této látce.

IATA (integrovaný přístup ke zkoušení a posuzování): Strukturovaný přístup používaný pro zjišťování nebezpečnosti (potenciál), charakterizaci rizik (potence) a/nebo posouzení bezpečnosti (potenciál/potence a expozice) chemické látky nebo skupiny chemických látek, jenž strategicky integruje a váží všechny důležité údaje s cílem poskytnout informace pro přijetí regulačního rozhodnutí, které se týká potenciální nebezpečnosti a/nebo rizika a/nebo potřeby dalšího cíleného, a tudíž minimálního zkoušení.

I_{max}: Faktor maximální indukce aktivity luciferázy ve srovnání s (negativní) kontrolou s rozpouštědlem naměřený při jakékoli koncentraci zkoušené chemické látky.

Keap1: (Kelch-like ECH-associated protein 1) je senzorový protein, který dokáže regulovat aktivitu transkripčního faktoru Nrf2. Za neindukovaných podmínek senzorový protein Keap1 směruje transkripční faktor Nrf2 na ubikvitinylaci a proteolytickou degradaci v proteazomu. Kovalentní modifikace reaktivních reziduí cysteinu v Keap 1 prostřednictvím malých molekul může vést k disociaci Nrf2 z Keap1 (8) (10) (11).

▼M7

Směs: Směs nebo roztok tvořený dvěma nebo více látkami, které v něm nereagují (1).

Jednosložková látka: Látka definovaná svým kvantitativním složením, v níž je přítomna jedna hlavní složka v míře alespoň 80 % hmot.

Vícesložková látka: Látka definovaná svým kvantitativním složením, v níž je přítomna více než jedna hlavní složka v koncentraci ≥ 10 % hmot. a < 80 % hmot. Vícesložková látka je výsledkem výrobního procesu. Rozdíl mezi směsí a vícesložkovou látkou spočívá v tom, že směs se získá smísením dvou nebo více látek bez chemické reakce. Vícesložková látka je výsledkem chemické reakce.

Nrf2: Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2, je transkripční faktor zapojený do mechanismu antioxidační odpovědi. Není-li Nrf2 ubikvitinylován, hromadí se se v cytoplasmě a přesouvá se do jádra, kde se spojuje s ARE v oblasti protisměrných promotorů mnohých cytoprotektivních genů a vyvolává jejich transkripci (8) (10) (11).

Pozitivní kontrola: Replika obsahující všechny složky zkušebního systému a látku, o níž je známo, že způsobuje pozitivní reakci. Aby se zajistilo, že proměnlivost v reakci na pozitivní kontrolu bude možné časem vyhodnotit, rozsah pozitivní reakce by neměl být nadměrný.

Relevantnost: Popis vztahu zkoušky k účinku, který je předmětem zájmu, a také toho, zda je zkouška smysluplná a použitelná pro konkrétní účel. Vyjadřuje, do jaké míry zkouška správně měří nebo predikuje biologický účinek, který je předmětem zájmu. Relevantnost zahrnuje také posouzení přesnosti (shody) zkušební metody (29).

Spolehlivost: Měření rozsahu, v jakém může být zkušební metoda časem reprodukovatelná v laboratořích a mezi laboratořemi, když se provádí s použitím stejného protokolu. Hodnotí se to výpočtem laboratorní a mezilaboratorní reprodukovatelnosti a laboratorní opakovatelnosti. Hodnotí se na základě výpočtu laboratorní a mezilaboratorní reprodukovatelnosti a laboratorní opakovatelnosti (29).

Reprodukovatelnost: Shoda mezi výsledky získanými při zkoušení téže chemické látky za použití stejného zkušebního protokolu (viz spolehlivost) (29).

Citlivost: Podíl všech pozitivních/aktivních chemických látek, které jsou na základě zkušební metody správně zatříděny. Je měřítkem přesnosti zkušební metody, která poskytuje kategorické výsledky, a je důležitým prvkem při hodnocení relevantnosti zkušební metody (29).

Kontrola s rozpouštědlem/vehikulem: Replika obsahující všechny složky zkušebního systému s výjimkou zkoušené chemické látky, ale včetně rozpouštědla, které se používá. Používá se ke stanovení účinku na pozadí u vzorků exponovaných zkoušené chemické látce, která je rozpuštěna ve stejném rozpouštědle.

Specifičnost: Podíl všech negativních/neaktivních chemických látek, které jsou na základě zkušební metody správně zatříděny. Je měřítkem přesnosti zkušební metody, která poskytuje kategorické výsledky, a je důležitým prvkem při hodnocení relevantnosti zkušební metody (29).

Látka: Chemické prvky nebo jejich sloučeniny v přírodním stavu nebo získané výrobním procesem včetně všech přídatných látek nutných k uchování stability výrobku a všech nečistot vznikajících v použitém procesu, ale s vyloučením všech rozpouštědel, která je možno oddělit bez ovlivnění stability látky nebo změny jejího složení (1).

Zkoušená chemická látka: Termín „zkoušená chemická látka“ se používá k označení toho, co se podrobuje zkoušení.

▼M7

Globálně harmonizovaný systém klasifikace a označování chemických látek Organizace spojených národů (GHS OSN): Systém navrhující klasifikaci látek a směsí podle standardizovaných typů a úrovní fyzikálních, zdravotních a environmentálních nebezpečí a řešící příslušné komunikační prvky, jako jsou piktogramy, signální slova, výroky o nebezpečí, výroky o bezpečnostních opatřeních a bezpečnostní datové listy, které obsahují informace o jejich nežádoucích účincích s ohledem na ochranu lidí (včetně zaměstnavatelů, dělníků, přepravců, spotřebitelů a osob reagujících na havárie) a životního prostředí (1).

UVCB: Látky s neznámým nebo proměnlivým složením, komplexní reakční produkty nebo biologický materiál.

Validovaná zkušební metoda: Zkušební metoda, u níž se má za to, že je dostatečně relevantní a spolehlivá pro určitý účel, a která je založena na vědecky spolehlivých zásadách. Zkušební metoda není nikdy validovaná v absolutním smyslu, ale pouze pro určitý konkrétní účel (29).

▼M7

Dodatek 2

LÁTKY PRO PROKÁZÁNÍ ZPŮSOBILOSTI

Senzibilizace kůže *in vitro*: zkušební metoda se stanovením luciferázy ARE-Nrf2

Dříve než začnou laboratoře běžně používat tuto zkušební metodu, měly by prokázat odbornou způsobilost správným získáním předpokládané předpovědi KeratinoSens™ u 10 vhodných látek doporučených v tabulce 1 a získáním hodnot $EC_{1,5}$ a IC_{50}, které spadají do příslušného referenčního rozpětí, u nejméně 8 z 10 vhodných látek. Tyto látky pro prokázání způsobilosti byly vybrány tak, aby představovaly rozpětí účinků na nebezpečí senzibilizace kůže. Jinými kritérii výběru bylo, aby byly komerčně dostupné, aby k nim byly k dispozici vysoce kvalitní referenční údaje získané *in vivo* a vysoce kvalitní údaje získané *in vitro* zkouškou KeratinoSens™.

Tabulka 1

Doporučené látky pro prokázání odborné způsobilosti k provádění zkoušky KeratinoSens™.

Vhodné látky	Registrační číslo CAS	Fyzikální forma	Předpověď *in vivo* (1)	KeratinoSens™ Předpověď (2)	Referenční rozpětí $EC_{1,5}$ (v μM) (3)	Referenční rozpětí IC_{50} (v μM) (3)
Propan-2-ol	67-63-0	Kapalná	Látka nesenzibilizující kůži	Negativní	> 1 000	> 1 000
Kyselina salicylová	69-72-7	Pevná	Látka nesenzibilizující kůži	Negativní	> 1 000	> 1 000
Kyselina mléčná	50-21-5	Kapalná	Látka nesenzibilizující kůži	Negativní	> 1 000	> 1 000
glycerol	56-81-5	Kapalná	Látka nesenzibilizující kůži	Negativní	> 1 000	> 1 000
Cinnamyl-alkohol	104-54-1	Pevná	Látka senzibilizující kůži (slabě)	Pozitivní	25–175	> 1 000
Ethylenglykol-dimethakrylát	97-90-5	Kapalná	Látka senzibilizující kůži (slabě)	Pozitivní	5–125	> 500
Benzothiazol-2-thiol	149-30-4	Pevná	Látka senzibilizující kůži (středně silně)	Pozitivní	25–250	> 500
2-brom-2-(bromethyl)pentadinitril	35691-65-7	Pevná	Látka senzibilizující kůži (silně)	Pozitivní	< 20	20–100
4-(methylamino)fenol, hemisulfát	55-55-0	Pevná	Látka senzibilizující kůži (silně)	Pozitivní	< 12,5	20–200
1-chlor-2,4-dinitrobenzen	97-00-7	Pevná	Látka senzibilizující kůži (extrémně)	Pozitivní	< 12,5	5–20

(1) Předpovědi nebezpečnosti (a potence) *in vivo* vycházejí z údajů ze zkoušek LLNA (13). Potence *in vivo* je odvozena použitím kritérií střediskem ECETOC (24).

(2) Předpověď KeratinoSens™ by měla být hodnocena v rámci přístupu IATA a v souladu s ustanoveními odstavců 9 a 11 této zkušební metody.

(3) Na základě dosavadních zaznamenaných hodnot (12).

▼M7

Dodatek 3

KONTROLA KVALITY MĚŘENÍ LUMINISCENCE

Základní experiment k zajištění optimálních měření luminiscence při zkoušce KeratinoSens™

Pro zajištění spolehlivých výsledků při měření luminometrem jsou kriticky důležité tyto tři parametry:

— aby byl dostatečně citlivý a vykazoval stabilní hodnoty pozadí v kontrolních jamkách,

— aby nebyl na destičce žádný gradient v důsledku dlouhých dob odečtů a

— aby v přilehlých jamkách nebyla žádná světelná kontaminace pocházející z jamek se silnou aktivitou.

Před zkoušením se doporučuje zajistit odpovídající měření luminiscence pomocí testování kontrolní destičky s níže uvedeným uspořádáním (trojitá analýza).:

Uspořádání destičky při prvním přípravném pokusu

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
B	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
C	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
D	**EGDMA 0,98**	**EGDMA 1,95**	**EGDMA 3,9**	**EGDMA 7,8**	**EGDMA 15,6**	**EGDMA 31,25**	**EGDMA 62,5**	**EGDMA 125**	**EGDMA 250**	**EGDMA 500**	**EGDMA 1000**	**EGDMA 2000**
E	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
F	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
G	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
H	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	**CA 4**	**CA 8**	**CA 16**	**CA 32**	**CA 64**	**Prázdný**

EGDMA = ethylenglykol-dimethakrylát (č. CAS: 97-90-5), chemická látka vyvolávající silnou indukci

CA = cinnamaldehyd (č. CAS: 104-55-2), pozitivní referenční látka

Analýza kontroly kvality by měla prokázat:

— jasný vztah dávka-účinek na řádku D, s hodnotou I_{max} > 20násobek hodnoty pozadí (ve většině případů se dosahuje hodnot I_{max} mezi 100 a 300),

— žádný vztah dávka-účinek na řádku C a E (žádná hodnota indukce nad 1,5 (ideálně žádná hodnota nad 1,3) v důsledku možné světelné kontaminace, zejména v jamkách sousedících se silně aktivními jamkami na řádku EGDMA;

— žádný statisticky významný rozdíl mezi řádky A, B. C, E, F a G (tj. žádný gradient na destičce) a

— variabilita v kterémkoli z řádků, B, C, E, F a G a v jamkách DMSO na řádku H by měla být nižší než 20 % (tj. stabilní pozadí).

▼M7

B.61 ZKUŠEBNÍ METODA PRŮNIKU FLUORESCEINU KE ZJIŠŤOVÁNÍ LÁTEK S LEPTAVÝMI A SILNĚ DRÁŽDIVÝMI ÚČINKY NA OČI

ÚVOD

Tato zkušební metoda odpovídá Pokynu OECD pro zkoušení (TG) č. 460 (2012). Zkušební metoda průniku fluoresceinu (Fluorescein Leakage – FL) je zkušební metoda *in vitro*, kterou lze používat za určitých podmínek a se specifickými omezeními ke klasifikaci chemických látek (látek a směsí) jako látek s leptavými účinky na oči a silně dráždivých látek, jak je definuje Globálně harmonizovaný systém klasifikace a označování chemických látek (GHS) Organizace spojených národů (OSN), nařízení (ES) č. 1272/2008 o klasifikaci, označování a balení látek a směsí (CLP) ([1]) (kategorie 1) a Agentura pro ochranu životního prostředí (EPA) USA (kategorie I) (1) (2). Pro účely této zkušební metody jsou látky se silně dráždivými účinky na oči definovány jako chemické látky, které způsobují poškození oční tkáně po podání zkoušené chemické látky, které není vratné do 21 dní, nebo způsobují vážné fyzické zhoršení vidění, a látky s leptavými účinky na oči jsou chemické látky, které způsobují nevratné poškození oční tkáně. Tyto látky jsou klasifikovány v kategorii 1 GHS OSN, v kategorii 1 CLP EU nebo v kategorii I EPA USA.

Zkušební metoda FL není považována za dostatečnou pro úplné nahrazení oční zkoušky *in vivo* na králících, avšak zkoušku FL se doporučuje používat v rámci strategie odstupňovaného zkoušení pro účely klasifikace a označování v právních předpisech. Zkušební metodu FL se tak doporučuje použít jako úvodní krok v rámci přístupu „shora dolů“ ke zjišťování látek s leptavými / silně dráždivými účinky na oči, a zvláště pak ke zkoušení určitých druhů chemických látek (tj. látek a směsí rozpustných ve vodě) (3) (4).

V současnosti se všeobecně uznává, že jediná zkouška dráždivých účinků na oči *in vitro* nemůže v dohledné budoucnosti nahradit oční zkoušku *in vivo* (zkušební metoda B.5, OECD (5)), pokud jde o předpověď v celé škále dráždivosti různých tříd chemických látek. Oční zkoušku *in vivo* však možná bude možné nahradit strategickou kombinací několika alternativních zkušebních metod v rámci strategie (odstupňovaného) zkoušení. Postup „shora dolů“ je určen pro případy, kdy se na základě existujících informací předpokládá, že chemická látka má vysokou schopnost vyvolat dráždivé účinky.

Na základě predikčního modelu, který je podrobně popsán v odstavci 35, může zkušební metoda FL identifikovat chemické látky v omezené oblasti použitelnosti jako látky s leptavými / silně dráždivými účinky na oči (kategorie 1 GHS OSN; kategorie 1 CLP EU; kategorie I EPA USA) bez jakéhokoli dalšího zkoušení. Totéž se předpokládá u směsí, ačkoli směsi nebyly při validaci použity. Při použití strategie postupného zkoušení uvedené ve zkušební metodě B.5 (5) lze zkušební metodu FL použít ke stanovení dráždivých/leptavých účinků chemických látek na oči. Chemickou látku, o níž se na základě použití metody FL nepředpokládá, že je látkou s leptavými / silně dráždivými účinky na oči, by však bylo třeba zkoušet jednou nebo několika dalšími zkušebními metodami (*in vitro* a/nebo *in vivo*), které jsou schopny přesně identifikovat i) chemické látky, které ve zkoušce FL *in vitro* ke zjištění látek s leptavými / silně dráždivými účinky na oč (kategorie 1 GHS OSN; kategorie 1 CLP EU; kategorie I EPA USA) vykazují falešné negativní výsledky; ii) chemické látky, které nejsou klasifikovány jako látky s leptavými/dráždivými účinky na oči (bez kategorie GHS

([1]) Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1272/2008 ze dne 16. prosince 2008 o klasifikaci, označování a balení látek a směsí, o změně a zrušení směrnic 67/548/EHS a 1999/45/ES a o změně nařízení (ES) č. 1907/2006, Úř. věst. L 353, 31.12.2008, s. 1.

▼M7

EOSN; bez kategorie CLP EU; kategorie IV EPA USA); a/nebo iii) chemické látky se středně silnými / slabými dráždivými účinky na oči (kategorie 2A a 2B GHS OSN; kategorie 2 CLP EU; kategorie II a III EPA USA).

Účelem této zkušební metody je popsat postupy používané k hodnocení potenciálních leptavých nebo silně dráždivých účinků zkoušené chemické látky na oči vyjádřených jako její schopnost poškozovat nepropustné konfluentní monovrstvy buněk epitelu. Integrita transepiteliální propustnosti je důležitou funkcí epitelu, např. epitelu ve spojivkách a v rohovce. Transepiteliální propustnost je řízena různými těsnými spoji. Bylo prokázáno, že zvýšení propustnosti epitelu rohovky *in vivo* koreluje s mírou zánětu a poškození povrchu, jež jsou zaznamenávány s postupujícím podrážděním oka.

Při zkušební metodě FL se toxické účinky po krátké expozici zkoušené chemické látce měří pomocí zvýšení propustnosti fluorosceinu sodného přes epiteliální monovrstvu Madin-Darbyho psích ledvinových (MDCK, Madin-Darby Canine Kidney) buněk kultivovaných na propustných vložkách. Výše úniku fluoresceinu, k němuž dojde, je přímo úměrná poškození těsných spojů, desmosomálních spojů a buněčných membrán, jež způsobila chemická látka, a lze ji použít k odhadu potenciálu oční toxicity zkoušené chemické látky. Schéma buněk MDCK kultivovaných na membráně vložky pro zkušební metodu FL je uvedeno v dodatku 1.

Definice jsou uvedeny v dodatku 2.

VÝCHOZÍ ÚVAHY A OMEZENÍ

Tato zkušební metoda je založena INVITTOX protokolu č. 71 (6), který byl hodnocen v mezinárodní validační studii Evropským střediskem pro validaci alternativních metod (ECVAM) ve spolupráci s Koordinačním výborem mezi různými organizacemi pro ověřování platnosti alternativních metod (ICCVAM) USA a s Japonským střediskem pro validaci alternativních metod (JaCVAM).

Zkušební metoda FL se nedoporučuje ke zjišťování chemických látek, které by měly být klasifikovány jako látky se slabými / středně silnými dráždivými účinky, nebo chemických látek (látek a směsi), které by neměly být klasifikovány jako látky s dráždivými účinky na oči (tj. kategorie 2A/2B nebo bez kategorie GHS OSN; kategorie 2 nebo bez kategorie CLP EU; kategorie II/III/IV EPA USA), jak prokázala validační studie (3) (7).

Zkušební metodu lze používat pouze ke zkoušení chemických látek (látek a směsí) rozpustných ve vodě. Zkušební metoda FL obvykle přesně předpovídá potenciál chemických látek mít silně dráždivé účinky na oči, pokud jsou tyto chemické látky rozpustné ve vodě a/nebo pokud není toxický účinek ovlivněn zředěním (7). Pro určení chemické látky jako rozpustné ve vodě by za zkušebních podmínek měla být rozpustná ve sterilním Hanksově vyváženém solném roztoku (HBSS) při koncentraci $\geq$ 250 mg/ml (jedna dávka nad mezní hodnotou 100 mg/ml) s obsahem vápníku (v koncentraci 1,0–1,8 mM), bez fenolové červeně. Je-li však zkoušená chemická látka rozpustná při koncentraci nižší než 100 mg/ml, ale při této koncentraci již vyvolává 20 % indukci FL (což znamená, že FL_{20} < 100 mg/ml), lze ji přesto klasifikovat v kategorii 1 GHS nebo kategorii I EPA.

Omezení zjištěná u této zkušební metody vylučují z oblasti její použitelnosti silné kyseliny a zásady, buněčná fixativa a vysoce těkavé chemické látky. Tyto chemické látky mají mechanismy, které zkušební metoda FL neměří, např. vysokou koagulaci, saponifikaci nebo specifické reaktivní chemismy. Jiná zjištěná omezení této metody vyplývají z výsledků její prediktivní schopnosti, pokud jde o zbarvené a viskózní chemické látky. Poukazuje se na to, že oba tyto druhy chemických látek je obtížné z monovrstvy odstranit po krátké době expozice a že kvalitu předpovědí této zkušební metody by mohlo zlepšit, pokud by bylo

▼M7

použito více oplachovacích kroků. Pevné chemické látky rozpuštěné v kapalině mohou vést k tvorbě sraženin a může být obtížné stanovit konečnou koncentraci. Jsou-li látky v rámci těchto chemických a fyzikálních tříd vyřazeny z databáze, přesnost zkušební metody FL v klasifikačních systémech EU, EPA a GHS je podstatně vyšší (7).

Vzhledem k účelu této zkušební metody (tj. zjišťovat pouze látky s leptavými / silně dráždivými účinky na oči) není míra falešné negativity (viz odstavec 13) kriticky důležitá, protože takové chemické látky by byly následně zkoušeny jinými náležitě validovanými zkouškami *in vitro* nebo zkouškou na králících, v závislosti na požadavcích právních předpisů, s využitím strategie postupného zkoušení v rámci přístupu založeného na posuzování váhy důkazů (5) (viz též odstavce 3 a 4).

Další zjištěná omezení zkušební metody FL vyplývají z míry falešné negativity a falešné pozitivity. Při použití zkušební metody FL jako počátečního kroku v rámci přístupu „shora dolů“ ke zjištění ve vodě rozpustných látek a směsí s leptavými / silně dráždivými účinky na oči (kategorie 1 GHS OSN; kategorie 1 CLP EU; kategorie I EPA USA), se míra falešné pozitivity zkušební metody FL pohybovala od 7 % (7/103; GHS OSN a CLP EU) do 9 % (9/99; EPA USA) a míra falešné negativity se pohybovala od 54 % (15/28; EPA USA) do 56 % (27/48; GHS OSN a CLP EU) ve srovnání s výsledky získanými *in vivo*. Skupiny chemických látek, které ve zkušební metodě FL vykazují falešně pozitivní nebo falešně negativní výsledky, zde nejsou definovány.

Určitá technická omezení jsou specifická pro kulturu buněk MDCK. Těsné spoje, které blokují průchod barviva fluoresceinu sodného monovsrstvou, jsou s rostoucím počtem buněčných pasáží stále více narušovány. Neúplná tvorba těsných spojů vede ke zvýšenému úniku fluoresceinu u neexponovaných kontrol. Proto je důležité stanovit maximální přípustný průnik v neexponovaných kontrolách (viz odstavec 38: 0 % průnik). Stejně jako u všech zkoušek *in vitro* se buňky mohou v průběhu času transformovat, a je tedy nezbytné, aby byla pro tyto zkoušky stanovena rozpětí pro počet pasáží.

Stávající oblast použitelnosti zkušební metody by bylo možné v některých případech rozšířit, avšak až po analýze rozšířeného souboru údajů o zkoumaných zkoušených chemických látkách, přednostně získaného prostřednictvím jejich zkoušení (3). Tato zkušební metoda se bude podle potřeby aktualizovat, tak jak budou zohledňovány nové informace a údaje.

Každá laboratoř, která poprvé provádí tuto analýzu, by měla použít referenční chemické látky uvedené v dodatku 3. Laboratoře mohou použít tyto chemické látky k prokázání své odborné způsobilosti k provádění zkušební metody FL před předložením výsledků získaných zkušební metodou FL pro regulační účely klasifikace nebezpečnosti.

PODSTATA ZKOUŠKY

Zkušební metoda FL je zkouška *in vitro* založená na cytotoxicitě a funkci buněk, která se provádí na konfluentní monovrstvě tubulárních epiteliálních buněk MDCK CB997, které se kultivují na polopropustných vložkách a modelují neproliferující stav epitelu rohovky *in vivo*. Buněčná linie MDCK je dobře zavedená a tvoří těsné spoje a desmosomální spoje podobné těm, které se nacházejí na apikální straně epitelu spojivek a rohovky. Těsné a desmosomální spoje *in vivo* zabraňují pronikání rozpuštěných látek a cizích materiálů do epitelu rohovky. Ztráta transepiteliální nepropustnosti v důsledku poškození těsných spojů a desmosomálních spojů je jedním z časných jevů při podrážděních oka vyvolaných chemickou látkou.

▼M7

Zkoušená chemická látka se nanese na konfluentní vrstvu buněk kultivovaných na apikální straně vložky. K vyjádření obvyklé rychlosti clearance při expozici člověka se běžně používá krátká expozice v délce 1 minuty. Výhodou krátké expoziční doby je, že látky a směsi založené na vodě je možné zkoušet v čistém stavu, pokud se dají po ukončení expozice snadno odstranit. To umožňuje přímější srovnání výsledků s účinky chemických látek na lidi. Zkoušená chemická látka se poté odstraní a na apikální stranu monovrstvy se na dobu 30 minut nanese netoxické, vysoce fluorescenční barvivo fluorescein sodný. Poškození těsných spojů způsobené zkoušenou chemickou látkou se určuje množstvím fluoresceinu, které během stanoveného časového úseku unikne přes vrstvu buněk.

Množství barviva fluoresceinu sodného, jež pronikne monovrstvou a membránou vložky do stanoveného objemu roztoku v jamce (do které barvivo fluorescein sodný uniká), se určí spektrofluorimetrickým měřením koncentrace fluoresceinu v jamce. Velikost úniku fluoresceinu (FL) se vypočítá podle údajů o intenzitě fluorescence naměřených ve dvou kontrolách: ve slepé kontrole a v kontrole s maximálním únikem. Únik vyjádřený v procentech, a tedy míra poškození těsných spojů, se vyjádří v poměru k těmto kontrolám, a to u každé ze stanovených koncentrací zkoušené chemické látky. Poté se vypočítá hodnota FL_{20} (tj. koncentrace, která způsobuje 20 % únik fluoresceinu v poměru k hodnotě zaznamenané v neexponované konfluentní monovrstvě a ve vložkách bez buněk). Hodnota FL_{20} (v mg/ml) se použije v predikčním modelu ke zjišťování látek s leptavými účinky na oči a silně dráždivých látek (viz odstavec 35).

Důležitou součástí profilu toxicity zkoušené chemické látky je zotavení, které se rovněž posuzuje zkouškou dráždivých účinků na oči *in vivo*. Z předběžných analýz vyplývá, že údaje o zotavení (až do 72 hodin po expozici chemické látce) by potenciálně mohly zvýšit prediktivní schopnost INVITTOX protokolu č. 71, avšak je zapotřebí další hodnocení opírající se o doplňující údaje, přednostně získané dalším zkoušením (6). Tato zkušební metoda se bude podle potřeby aktualizovat, tak jak budou zohledňovány nové informace a údaje.

POSTUP

Příprava monovrstvy buněk

Monovrstva buněk MDCK CB997 se připraví použitím sub-konfluentních buněk, které se kultivují v baňkách s buněčnou kulturou v roztoku DMEM/Nutrient Mix F12 (1x koncentrát s L-glutaminem, 15 mM HEPES, vápníkem (v koncentraci 1,0–1,8 mM) a10 % tepelně dezaktivovaným FCS/FBS). Důležité je, aby všechna média/roztoky používané v průběhu zkoušky FL obsahovaly vápník v koncentraci mezi 1,8 mM (200 mg/l) a 1,0 mM (111 mg/l), což zajistí tvorbu a pevnost těsných spojů. Mělo by se kontrolovat rozpětí počtu buněčných pasáží, aby se zajistila rovnoměrná a reprodukovatelná tvorba těsných spojů. Počet buněčných pasáží by nejlépe měl být v rozpětí 3 až 30 od rozmrazení, protože buňky v tomto rozpětí pasáží mají podobnou funkčnost, což napomáhá reprodukovatelnosti zkoušky.

Před provedením zkušební metody FL se buňky vyjmou z baňky trypsinizací, odstředí se a přiměřené množství buněk se nasadí do vložek umístěných v destičkách s 24 jamkami (viz dodatek 1). K násadě buněk by se měly použít vložky o průměru 12 mm s membránou vyrobenou ze smíšených esterů celulosy, o tloušťce 80 až 150 μm a velikosti pórů 0,45 μm. Ve validační studii byly použity vložky Millicell-HA o průměru 12 mm. Vlastnosti vložky a druh membrány jsou důležité, neboť mohou ovlivnit růst buněk a vazbu na chemickou látku. Některé druhy chemických látek se mohou vázat na membránu vložky Millicell-HA, což by mohlo ovlivnit interpretaci výsledků. Jsou-li použity jiné membrány, měla by být prokázána jejich rovnocennost pomocí vhodných chemických látek (viz dodatek 3).

▼M7

Vazba chemické látky na membránu vložky je obvyklejší u chemických látek vytvářející kationty, jako je např. benzalkoniumchlorid, které jsou přitahovány k membráně s nábojem (7). Vazba chemické látky na membránu vložky může prodloužit dobu expozice chemickou látkou, což vede k nadhodnocení toxického potenciálu chemické látky, avšak může to rovněž fyzicky snížit únik fluoresceinu přes vložku v důsledku vazby barviva na chemickou látku tvořící kationty vázanou na membránu vložky, což vede k podhodnocení toxického potenciálu dané chemické látky. Tento aspekt lze snadno sledovat tak, že se samotná membrána vystaví nejvyšší koncentraci chemické látky, která se zkouší, a poté se přidá barvivo fluorescein sodný v normální koncentraci na standardní dobu (kontrola bez buněk). Vznikne-li vazba barviva fluoresceinu sodného, membrána vložky se po opláchnutí zkušebního materiálu zbarví žlutě. Pro interpretaci účinku chemické látky na buňky je tudíž důležité znát vazební vlastnosti zkoušené chemické látky.

Nasazením buněk do vložek by měla vzniknout konfluentní monovrstva v době expozice chemické látce. Do každé vložky by mělo být vloženo $1{,}6 \times 10^5$ buněk (400 µl buněčné suspenze o hustotě 4×10^5 buněk/ml). Za těchto podmínek se po 96 hodinách obvykle vytvoří konfluentní jednovrstvá kultura. Před aplikací látek by se vložky měly vizuálně zkontrolovat a zaznamenat viditelná poškození, aby se zajistilo, která poškození zaznamenaná při vizuální kontrole, která je popsána v odstavci 30, byla způsobena manipulací.

Buněčné kultury MDCK by měly být udržovány v inkubátorech ve zvlhčeném ovzduší, při 5 % ± 1 % CO_2 a teplotě 37 ± 1 °C. Buňky by neměly být kontaminovány bakteriemi, viry, mykoplasmaty ani houbovými mikroorganismy.

Aplikace zkoušených a kontrolních chemických látek

Pro každé provedení pokusu by měl být připraven čerstvý zásobní roztok zkoušené chemické látky a použit do 30 minut od přípravy. Zkoušená chemická látka by se měla připravit v roztoku HBSS s obsahem vápníku (v koncentraci 1,0 až 1,8 mM), bez fenolové červeně, aby se zabránilo vazbě na proteiny v séru. Před zkoušením by se měla posoudit rozpustnost chemické látky v roztoku HBSS při koncentraci 250 mg/ml. Jestliže chemická látka při této koncentraci vytváří stabilní suspenzi nebo emulzi (tj. zachovává jednotnost a neusazuje se ani se nedělí na více než jednu fázi) po dobu 30 minut, může být HBSS přesto použito jako rozpouštědlo. Pokud se však zjistí, že chemická látka je za této koncentrace v HBSS nerozpustná, mělo by se zvážit použití jiných zkušebních metod než FL. Použití lehkého minerálního oleje jako rozpouštědla v případech, kdy se zjistí, že chemická látka není v HBSS rozpustná, by mělo být zvažováno s obezřetností, neboť není k dispozici dostatek údajů umožňujících učinit závěr o funkčnosti zkoušky FL za takových podmínek.

Všechny chemické látky, které mají být zkoušeny, se připraví v roztoku HBSS s obsahem vápníku (v koncentraci 1,0 až 1,8 mM), bez fenolové červeně, pocházejícím ze zásobního roztoku, v pěti pevně stanovených koncentracích zředěných na bázi hmotnosti na jednotku objemu: 1, 25, 100, 250 mg/ml a čistý nebo nasycený roztok. Při zkoušení pevné chemické látky by měla být zařazena velmi vysoká koncentrace 750 mg/ml. Chemickou látku v této koncentraci možná bude nutné na buňky aplikovat pomocí objemové pipety. Pokud se zjistí toxicita při koncentraci mezi 25 a 100 mg/ml, měly by se následující koncentrace zkoušet dvakrát: 1, 25, 50, 75, 100 mg/ml. Hodnota FL_{20} by se měla odvodit z těchto koncentrací, za předpokladu, že byla splněna kritéria přijatelnosti zkoušky.

Zkoušené chemické látky se aplikují na konfluentní buněčné monovrstvy po odstranění média pro kultivaci buněk a po dvojím opláchnutí sterilním, teplým (37 °C) roztokem HBSS s obsahem vápníku (v koncentraci 1,0 až 1,8 mM), bez fenolové červeně. Předtím byly vizuálně zkontrolovány filtry, zda nevykazují dříve vzniklá poškození, která by mohla být chybně přičtena potenciální nesslučitelnosti se zkoušenými chemickými látkami. Měly by být použity nejméně tři

▼M7

repliky pro každou koncentraci zkoušené chemické látky a pro kontroly v každém provedení zkoušky. Po expozici o délce 1 minuty za pokojové teploty by měla být zkoušená chemická látka pečlivě odstraněna odsátím, monovrstva by se měla dvakrát opláchnout sterilním teplým (37 °C) roztokem HBSS s obsahem vápníku (v koncentraci 1,0 až 1,8 mM), bez fenolové červeně, a ihned by se měl změřit průnik fluoresceinu.

Souběžné negativní a pozitivní kontroly je nutné používat pro každé provedení zkoušky, aby se prokázalo, že integrita monovrstev (v negativní kontrole) a citlivost buněk (v pozitivní kontrole) je v rámci definovaného dosavadního rozpětí přijatelnosti. Doporučenou chemickou látkou pro pozitivní kontrolu je Brij 35 (č. CAS 9002-92-0) v koncentraci 100 mg/ml. Tato koncentrace by měla vykázat přibližně 30 % průnik fluoresceinu (přijatelné rozpětí je 20 až 40 % průnik fluoresceinu, tj. poškození vrstvy buněk). Doporučenou chemickou látkou pro negativní kontrolu je roztok HBSS s obsahem vápníku (v koncentraci 1,0 až 1,8 mM), bez fenolové červeně (neexponovaná, slepá zkouška) V každém provedení zkoušky by měla být zařazena také kontrola s maximálním průnikem umožňující výpočet hodnot FL_{20}. Maximální průnik se stanoví pomocí kontrolní vložky bez buněk.

Stanovení propustnosti fluoresceinu

Ihned po odstranění zkoušené a kontrolní chemické látky se do vložek (např. typu Milicell-HA) přidá 400µl roztoku fluoresceinu sodného o koncentraci 0,1 mg/ml (0,01 % (m/V) v HBSS s obsahem vápníku (v koncentraci 1,0 až 1,8 mM], bez fenolové červeně). Kultury se udržují 30 minut při pokojové teplotě. Na konci inkubace s fluoresceinem se z každé jamky opatrně vyjmou vložky. Provede se vizuální kontrola každého filtru a zaznamená se každé poškození, ke kterému mohlo dojít při manipulaci.

V roztoku, který zbyl v jamkách po odstranění vložek, se vyčíslí množství fluoresceinu, který pronikl přes monovrstvu a podložku. Měření se provádějí spektrofluorimetrem při excitační vlnové délce 485 mm a emisní vlnové délce 530 mm. Citlivost spektrofluorimetru by měla být nastavena tak, aby byl co nejvyšší numerický rozdíl mezi maximálním FL (vložka bez buněk) a minimálním FL (vložka s konfluentní monovrstvou ošetřená negativní kontrolní látkou). Kvůli rozdílnosti použitého spektrofluorimetru se doporučuje použít takovou citlivost, která poskytne intenzitu fluorescence > 4 000 v kontrole s maximálním průnikem fluoresceinu. Maximální hodnota FL by neměla být větší než 9 999. Maximální intenzita průniku fluorosceinu by se měla nacházet v lineárním rozpětí použitého spektrofluorimetru.

Interpretace výsledků a predikční model

Velikost průniku fluoresceinu je úměrná poškození těsných spojů vyvolanému chemickou látkou. Procentuální hodnota průniku fluoresceinu pro každou zkoušenou koncentraci chemické látky se vypočítá z hodnot FL získaných pro zkoušenou chemickou látku ve srovnání s hodnotami FL získanými z negativní kontroly (údaje naměřené z konfluentní monovrstvy ošetřené negativní kontrolní látkou) a z kontroly s maximálním únikem (údaje naměřené z množství fluoresceinu, který pronikl přes vložku bez buněk).

Střední hodnota intenzity fluorescence při maximálním průniku = x

Střední hodnota intenzity fluorescence při 0 % průniku (v negativní kontrole) = y

Střední hodnota 100 % průniku se získá odečtením střední hodnoty 0 % průniku od střední hodnoty maximálního průniku,

tj. x – y = z

Procentuální hodnota průniku pro každou pevně stanovenou dávku se získá odečtením 0 % průniku od střední hodnoty intenzity fluorescence získané měřeními tří replik (m) a vydělením této hodnoty 100 % průnikem tj. % FL = [(m-y) / z] × 100 %, kde:

▼M7

m = střední hodnota intenzity fluorescence z měření tří replik pro danou koncentraci

% FL = procento fluoresceinu, který proniká skrz vrstvu buněk

Pro výpočet koncentrace chemické látky vyvolávající 20 % FL se použije tato rovnice:

$$FL_D = [(A-B) / (C-B)] \times (M_C - M_B) + M_B$$

kde:

D = % inhibice

A = % poškození (20 % únik fluoresceinu)

B = % průnik fluoresceinu < A

C = % průnik fluoresceinu > A

M_C = koncentrace C (v mg/ml)

M_B = koncentrace B (v mg/ml)

Níže je uvedena mezní hodnota FL_{20} pro předpověď chemických látek jako látek s leptavými / silně dráždivými účinky na oči:

FL_{20} (v mg/ml)	Klasifikace a označování podle GHS OSN	Klasifikace a označování podle CLP EU	Klasifikace a označování podle EPA USA
≤ 100	Kategorie 1	Kategorie 1	Kategorie I

Klasifikace a označování

Zkušební metoda FL se doporučuje pouze ke zjišťování ve vodě rozpustných látek s leptavými a silně dráždivými účinky na oči (kategorie 1 GHS OSN, kategorie 1 CLP EU, kategorie I EPA USA) (viz odstavce 1 a 10).

Aby bylo možné identifikovat chemické látky (látky a směsi) rozpustné ve vodě (3) (6) (7) jako „látky vyvolávající závažné poškození očí“ (kategorie 1 GHS OSN / CLP EU) nebo jako „látky s leptavými nebo silně dráždivými účinky na oči“ (kategorie 1 EPA USA), měla by chemická látka indukovat hodnotu $FL_{20} \leq$ 100 mg/ml.

Přijatelnost výsledků

Střední hodnota při maximálním průniku fluorosceinu (x) by měla být vyšší než 4 000 (viz odstavec 31), střední hodnota při 0 % průniku (y) by měla být rovna nebo menší než 300 a střední hodnota při 100 % průniku (z) by se měla nacházet mezi 3 700 a 6 000.

Zkouška se považuje za přijatelnou, pokud pozitivní kontrola vyvolala 20 % až 40 % poškození vrstvy buněk (vyjádřeno v % průniku fluoresceinu).

ÚDAJE A PŘEDKLÁDÁNÍ ZPRÁV

Údaje

U každého provedení se uvedou ve formě tabulky údaje o jednotlivých replicitních jamkách (např. hodnoty intenzity fluorescence a vypočtené procentuální údaje o průniku fluoresceinu pro každou zkoušenou chemickou látku včetně její klasifikace). Dále by měly být uvedeny střední hodnoty ± směrodatné odchylky u jednotlivých měření replik při každém provedení zkoušky.

▼M7

Závěrečná zpráva

Závěrečná zpráva by měla obsahovat tyto informace:

Zkoušené chemické látky a chemické látky pro kontrolu

— chemický název (chemické názvy), např. strukturální název používaný podle Chemical Abstracts Service (CAS), s dalšími názvy, jsou-li známy,

— číslo CAS chemické látky, je-li známo,

— čistota a složení látky nebo směsi (v hmotnostních procentech), jsou-li tyto informace dostupné,

— fyzikálně-chemické vlastnosti důležité pro provádění studie (např. skupenství, těkavost, pH, stabilita, rozpustnost ve vodě, třída chemických látek),

— případné ošetření zkoušených/kontrolních chemických látek před zkouškou (např. zahřívání, mletí),

— podmínky skladování.

Zdůvodnění použité zkušební metody a protokolu

— Mělo by obsahovat úvahy týkající se oblasti použitelnosti a omezení zkušební metody.

Zkušební podmínky

— popis použitého buněčného systému, včetně osvědčení o pravosti a o stavu mykoplazmatu v buněčné linii,

— podrobnosti o použitém zkušebním postupu,

— použitá (použité) koncentrace zkoušené chemické látky,

— délka expozice zkoušené chemické látce,

— délka inkubace s fluoresceinem,

— popis jakýchkoli úprav zkušebního postupu,

— popis použitých hodnotících kritérií,

— odkaz na dosavadní údaje modelu (např. o negativních a pozitivních kontrolách, o případných referenčních chemických látkách),

— informace o prokázané odborné způsobilosti laboratoře.

Výsledky

— V tabulce se uvedou údaje o každé zkoušené chemické látce a o kontrolách pro každé provedení zkoušky a pro každé měření replik (včetně jednotlivých výsledků, středních hodnot a směrodatných odchylek),

— odvozená (odvozené) klasifikace s odkazem na predikční model a/nebo na použitá kritéria rozhodování,

— popis ostatních pozorovaných účinků.

▼**M7**

Diskuse o výsledcích

— Měla by zahrnovat úvahy týkající se nepřesvědčivého výsledku zkoušky (odstavec 35: FL_{20} > 100 mg/ml) a dalšího zkoušení.

Závěry

LITERATURA

1) UN (2009), United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Third revised edition, New York & Geneva: United Nations Publications. ISBN: 978-92-1-117006-1. Dostupné na: [http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev03/03files_e.html]

2) U.S. EPA (1996), Label Review Manual: 2nd Edition, EPA737-B-96-001, Washington DC: U.S., Environmental Protection Agency.

3) EC-ECVAM (2009), Statement on the scientific validity of cytotoxicity/cell-function based *in vitro* assays for eye irritation testing

4) Scott, L. *et al.* (2010), A proposed eye irritation testing strategy to reduce and replace *in vivo* studies using Bottom-Up and Top-Down approaches, *Toxicol. In Vitro* 24, 1–9

5) Kapitola B.5 této přílohy: *Akutní dráždivé/leptavé účinky na oči*.

6) EC-ECVAM (1999), INVITOX Protocol 71: Fluorescein Leakage Test (Protokol č. 71 INVITOX: Zkouška úniku fluoresceinu), Ispra, Italy: Evropské středisko pro validaci alternativních metod (ECVAM). Dostupné na: [http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu

7) EC-ECVAM (2008), Fluorescein Leakage Assay Background Review Document as an Alternative Method for Eye Irritation Testing.

8) OECD (2005), *Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment*, OECD Series on Testing and Assessment No. 34. OECD, Paris.

▼M7

Dodatek 1

SCHÉMA BUNĚK MDCK KULTIVOVANÝCH NA MEMBRÁNĚ VLOŽKY PRO ZKUŠEBNÍ METODU FL

Konfluentní vrstva buněk MDCK se kultivuje na polopropustné membráně vložky. Vložky jsou umístěny do jamek destiček s 24 jamkami.

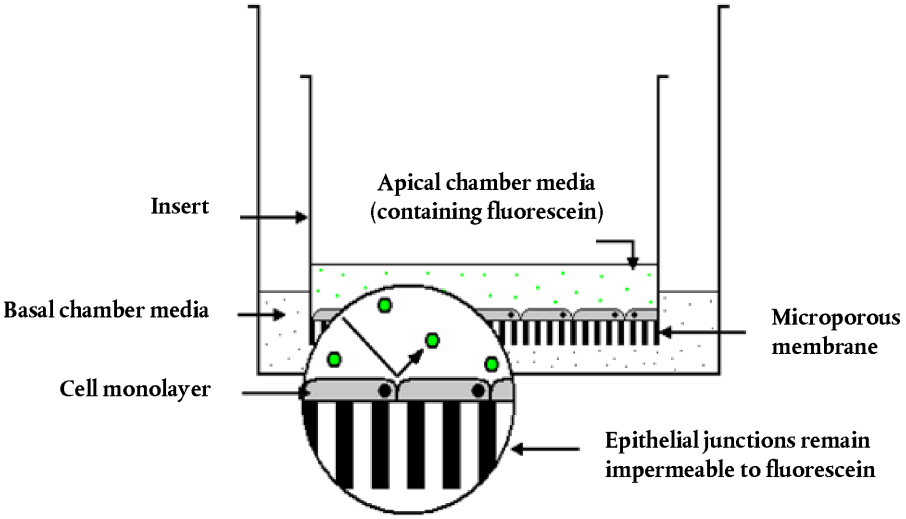


Schéma převzato z: Wilkinson, P.J. (2006), Development of an *in vitro* model to investigate repeat ocular exposure, Ph.D. Thesis, University of Nottingham, UK.

▼M7

Dodatek 2

DEFINICE

Přesnost: Přesnost shody mezi výsledky zkušební metody a přijatými referenčními hodnotami. Je to měření výsledku zkušební metody a jednoho aspektu „důležitosti“. Termín se často používá namísto „souladu“, kterým se rozumí podíl správných výsledků zkušební metody.

Chemická látka: Látka nebo směs.

Kategorie I EPA: Chemické látky, jež vyvolávají poleptání (nevratné poškození oční tkáně) nebo zasažení rohovky či dráždění přetrvávající déle než 21 dní (2).

CLP EU (nařízení (ES) č. 1272/2008 o klasifikaci, označování a balení látek a směsí): Toto nařízení provádí v Evropské unii (EU) systém GHS OSN pro klasifikaci chemických látek (látek a směsí).

Míra falešné negativity: Podíl všech pozitivních chemických látek falešně zjištěných zkušební metodou jako negativní. Je to jeden z ukazatelů výsledku zkušební metody.

Míra falešné pozitivity: Podíl všech negativních látek falešně zjištěných zkušební metodou jako pozitivní. Je to jeden z ukazatelů výsledku zkušební metody.

FL_{20}: Hodnota, kterou lze odhadnout stanovením koncentrace, při které zkoušená chemická látka způsobuje 20 % únik fluoresceinu skrz vrstvu buněk.

Průnik fluoresceinu: Množství fluoresceinu, které pronikne vrstvou buněk, určené spektrofluorimetrickým měřením.

GHS (Globálně harmonizovaný systém klasifikace a označování chemických látek zavedený Organizací spojených národů (OSN)): Systém navrhující klasifikaci látek a směsí podle standardizovaných typů a úrovní fyzikálních, zdravotních a environmentálních nebezpečí a řešící příslušné komunikační prvky, jako jsou piktogramy, signální slova, výroky o nebezpečí, výroky o bezpečnostních opatřeních a bezpečnostní datové listy, které obsahují informace o jejich nežádoucích účincích s ohledem na ochranu lidí (včetně zaměstnavatelů, dělníků, přepravců, spotřebitelů a osob reagujících na havárie) a životního prostředí.

Kategorie 1 GHS: Tvorba poškození tkání v oku nebo závažné fyzikální slábnutí vidění po aplikaci zkoušené látky na přední plochu oka, které není plně vratné do 21 dní od aplikace.

Nebezpečnost: Základní charakteristika látky nebo situace, která má potenciál vyvolat nepříznivé účinky, jsou-li organismus, systém nebo (sub)populace vystaveny této látce.

Směs: V kontextu GHS OSN se používá k označení směsi nebo roztoku složeného ze dvou nebo více látek, které v něm nereagují.

Negativní kontrola: Neovlivněná replika, která obsahuje všechny složky zkušebního systému. Tento vzorek se zpracovává se vzorky zkoušené chemické látky a jinými kontrolními vzorky, aby se zjistilo, zda rozpouštědlo vzájemně reaguje se zkušebním systémem.

▼M7

Neklasifikovány: Chemické látky, které nejsou klasifikovány jako látky s dráždivými účinky na oči kategorie 1, 2A nebo 2B GHS OSN, kategorie 1 nebo 2 CLP EU, kategorie I, II nebo III EPA USA.

Látka s leptavými účinky na oči: a) chemická látka, která způsobuje nevratné poškození tkání očí; b) chemické látky, které jsou klasifikovány jako látky s dráždivými účinky na oči kategorie 1 GHS OSN, kategorie 1 CLP EU nebo kategorie I EPA USA.

Látka s dráždivými účinky na oči: a) chemická látka, která způsobuje vratnou změnu v oku po aplikaci na přední plochu oka; b) chemické látky, které jsou klasifikovány jako látky s dráždivými účinky na oči kategorie 2A nebo 2B GHS OSN, kategorie 2 CLP EU, nebo kategorie II nebo III EPA USA.

Látka se silně dráždivými účinky na oči: a) chemická látka, která způsobuje poškození tkání v oku po aplikaci na přední plochu oka, které není vratné do 21 dnů od aplikace, nebo způsobuje vážné fyzické zhoršení vidění; b) chemické látky, které jsou klasifikovány jako látky s dráždivými účinky na oči kategorie 1 GHS OSN, kategorie 1 CLP EU nebo kategorie I EPA USA.

Pozitivní kontrola: Replika obsahující všechny složky zkušebního systému a zkoušená s chemickou látkou, o níž je známo, že způsobuje pozitivní reakci. Aby se zajistilo, že proměnlivost v reakci na pozitivní kontrolu bude možné časem vyhodnotit, rozsah pozitivní reakce by neměl být extrémní.

Vhodné chemické látky: Podsoubor ze seznamu referenčních chemických látek, které může nezkušená laboratoř použít k prokázání způsobilosti k provádění validované referenční zkušební metody.

Relevantnost: Popis vztahu zkoušky k účinku, který je předmětem zájmu, a také toho, zda je zkouška smysluplná a použitelná pro konkrétní účel. Vyjadřuje, do jaké míry zkouška správně měří nebo predikuje biologický účinek, který je předmětem zájmu. Relevantnost zahrnuje také posouzení přesnosti (shody) zkušební metody (8).

Spolehlivost: Měření rozsahu, v jakém může být zkušební metoda časem reprodukovatelná v laboratořích a mezi laboratořemi, když se provádí s použitím stejného protokolu. Hodnotí se to výpočtem laboratorní a mezilaboratorní reprodukovatelnosti a laboratorní opakovatelnosti. Hodnotí se výpočtem laboratorní a mezilaboratorní reprodukovatelnosti a laboratorní opakovatelnosti.

Náhradní zkouška: Zkouška, která je koncipována tak, aby nahradila běžně používanou a uznávanou zkoušku, která slouží k určení nebezpečnosti a/nebo posouzení rizika a u níž je zjištěno, že poskytuje stejnou nebo lepší úroveň ochrany zdraví lidí nebo zvířat či případně ochrany životního prostředí ve srovnání s uznávanou zkouškou ve všech možných zkušebních situacích a pro všechny zkoušené chemické látky.

Citlivost: Podíl všech pozitivních/aktivních chemických látek, které jsou na základě zkoušky správně zatříděny. Je to měřítko přesnosti zkušební metody, která dává kategorické výsledky, a je důležitým prvkem při hodnocení relevance zkušební metody (8).

Vážné poškození očí: Je to tvorba poškození tkání v oku nebo závažné fyzikální slábnutí vidění po aplikaci zkoušené chemické látky na přední plochu oka, které není plně vratné do 21 dní od aplikace.

Kontrola s rozpouštědlem/vehikulem: Neošetřený vzorek obsahující všechny složky zkušebního systému, včetně rozpouštědla nebo vehikula, který se zpracovává s exponovanými zkoušenými chemickými látkami a jinými kontrolními vzorky, aby se zjistila základní reakce vzorků zkoušených se zkoušenou

▼M7

chemickou látkou rozpuštěnou ve stejném rozpouštědle nebo vehikulu. Pokud se vzorek zkouší souběžnou negativní kontrolou, ukazuje také, zda rozpouštědlo nebo vehikul vzájemně reaguje se zkušebním systémem.

Specifičnost: Podíl všech negativních/neaktivních chemických látek, které jsou na základě zkušební metody správně zatříděny. Je to měřítko přesnosti zkušební metody, která dává kategorické výsledky, a je důležitým prvkem při hodnocení relevance zkušební metody.

Látka: V kontextu GHS OSN jsou to chemické prvky a jejich sloučeniny v přírodním stavu nebo získané výrobním procesem, včetně všech přídatných látek nezbytných k uchování stability výrobků a veškerých nečistot vznikajících v daném procesu, avšak s výjimkou všech rozpouštědel, která lze oddělit bez ovlivnění stability látky nebo změny jejího složení.

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

Strategie postupného zkoušení: Strategie postupného zkoušení, kde se všechny existující informace o zkoušené chemické látce přezkoumávají ve stanoveném pořadí s použitím postupu váhy důkazů na každém stupni, aby se zjistilo, zda je k dispozici dost informací pro rozhodnutí o klasifikaci nebezpečnosti, než se postoupí do dalšího stupně. Pokud potenciál dráždivých účinků zkoušené chemické látky lze určit na základě existujících informací, další zkoušení není nutné. Jestliže potenciál dráždivých účinků zkoušené látky nelze určit na základě existujících informací, použije se stupňovitý postupný postup zkoušení na zvířatech po krocích, dokud se nestanoví jednoznačná klasifikace.

Validovaná zkušební metoda: Zkušební metoda, u níž byly provedeny validační studie k určení její relevantnosti (včetně přesnosti) a spolehlivosti pro konkrétní účel. Je nutné poznamenat, že validovaná zkušební metoda nemusí poskytnout postačující výsledek z hlediska přesnosti a spolehlivosti, aby byla shledána přijatelnou pro navržený účel (8).

Závažnost důkazů: Postup zvažování silných a slabých stránek různých informací v dosahování a podpoře závěru týkajícího se potenciálu nebezpečnosti látky.

▼M7

Dodatek 3

CHEMICKÉ LÁTKY PRO PROKÁZÁNÍ ZPŮSOBILOSTI PRO ZKUŠEBNÍ METODU FL

Dříve než začnou laboratoře rutinně používat tuto zkušební metodu, měly by prokázat svou odbornou způsobilost správným určením klasifikace leptavých účinků na oči u 8 chemických látek doporučených v tabulce 1. Tyto chemické látky byly vybrány tak, aby představovaly rozpětí reakcí na lokální podráždění/poleptání očí, a to na základě výsledků oční zkoušky *in vivo* na králících (TG OECD 405, zkušební metoda B.5 (5)) (tj. kategorie 1, 2A, 2B, nebo bez klasifikace podle GHS OSN). Vzhledem k validované užitečnosti zkoušky FL (tj. zjišťovat pouze látky vyvolávající leptavé / silně dráždivé účinky na oči) však existují pouze dva výsledky zkoušky pro účely klasifikace (látka mající leptavé / silně dráždivé účinky na oči nebo látka nemající leptavé / silně dráždivé účinky na oči) k prokázání způsobilosti. Jinými kritérii výběru bylo, aby chemické látky byly komerčně dostupné, aby k nim byly k dispozici vysoce kvalitní referenční údaje *in vivo* a aby existovaly vysoce kvalitní údaje získané zkušební metodou FL. Z tohoto důvodu byly vybrány osvědčené chemické látky ze „Základního dokumentu o revizi zkoušky úniku fluoresceinu jako alternativní metody ke zkoušení dráždivých účinků na oči“ (8), který byl použit pro zpětnou validaci zkušební metody FL.

Tabulka 1

Doporučené chemické látky pro prokázání odborné způsobilosti ke zkoušce FL

Chemická látka	Číslo CAS	Třída chemických látek (1)	Fyzikální forma	Klasifikace *in vivo* (2)	Klasifikace *in vitro* (3)
Benzalkoniumchlorid (5 %)	8001-54-5	Oniová sloučenina	Kapalná	Kategorie 1	Látka mající leptavé / silně dráždivé účinky
Promethazin-hydrochlorid	58-33-3	Amin/amidin, heterocyklická, organická sloučenina síry	Pevná	Kategorie 1	Látka mající leptavé / silně dráždivé účinky
Hydroxid sodný (10 %)	1310-73-2	Alkálie	Kapalná	Kategorie 1	Látka mající leptavé / silně dráždivé účinky
Natrium-dodecyl-sulfát (15 %)	151-21-3	Karboxylová kyselina (sůl)	Kapalná	Kategorie 1	Látka mající leptavé / silně dráždivé účinky
4-formylbenzoová kyselina	619-66-9	Karboxylová kyselina, aldehyd	Pevná	Kategorie 2(A)	Látka nemající leptavé / silně dráždivé účinky
Dusičnan amonný	6484-52-2	Anorganická sůl	Pevná	Kategorie 2(A)	Látka nemající leptavé / silně dráždivé účinky
Ethyl-2-metyla-ceto–acetát	609-14-3	Keton, ester	Kapalná	Kategorie 2(B)	Látka nemající leptavé / silně dráždivé účinky
glycerol	56-81-5	Alkohol	Kapalná	Bez kategorie	Látka nemající leptavé / silně dráždivé účinky

Zkratky: Číslo CAS = registrační číslo Chemical Abstracts Service

(1) Chemické třídy byly přiděleny každé zkoušené chemické látce s použitím standardního klasifikačního schématu na základě klasifikačního systému Národní knihovny názvů léků a léčivých látek (MeSH) (dostupný na: http://www.nlm.nih.gov/mesh).

(2) Založena na výsledcích oční zkoušky *in vivo* na králících (Pokyn OECD pro zkoušení č. 405, zkušební metoda B.5) a s použitím klasifikace podle GHS OSN a CLP EU.

(3) Na základě výsledků získaných zkušební metodou FL (INVITTOX protokolu č. 71(6)).

▼M7

B.62 ALKALICKÝ KOMETOVÝ TEST *IN VIVO* NA SAVCÍCH

ÚVOD

Tato zkušební metoda je rovnocenná Pokynu OECD pro zkoušení (TG) č. 489 (2016). Alkalický kometový test *in vivo* (jednobuněčná gelová elektroforéza) (dále označovaný pouze jako kometový test) se používá k detekci přerušení vláken DNA v buňkách nebo jádrech izolovaných z mnoha tkání zvířete, obvykle hlodavce, které byly vystaveny potenciálně genotoxickému materiálu (materiálům). Tento kometový text byl podroben revizi a různé skupiny odborníků zveřejnily svá doporučení (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9) (10). Tato zkušební metoda je součástí série zkušebních metod genetické toxikologie. Byl vypracován dokument OECD, který obsahuje stručné informace o zkoušení v oblasti genetické toxikologie a přehled posledních změn, které byly v těchto pokynech ke zkoušení provedeny (11).

Účelem kometového testu je zjišťovat chemické látky, které způsobují poškození DNA. V zásaditém prostředí (> pH 13) může kometový test odhalit jednoduché a dvojné zlomy vláken, které jsou například důsledkem přímých interakcí s DNA, existence oblastí DNA, které jsou nestabilní vůči zásadám, nebo jsou důsledkem přechodných zlomů vláken DNA vyvolaných vyštěpovací reparací DNA. Tyto zlomy je možné opravit, což znamená, že následky nejsou trvalé, nebo, mohou být pro buňku smrtící, anebo mohou vést k mutaci, která představuje trvalou životaschopnou změnu. Mohou rovněž vést k poškození chromozomů, které je mimo jiné spojeno s mnoha nemocemi u lidí, včetně rakoviny.

Formální validační experiment kometového testu *in vivo* na hlodavcích byl proveden v letech 2006 až 2012 za koordinace Japonského střediska pro validaci alternativních metod (JaCVAM) a ve spolupráci s Evropským střediskem pro validaci alternativních metod (ECVAM), Meziagenturním koordinačním výborem pro validaci alternativních metod (ICCVAM) a Meziagenturním střediskem pro hodnocení alternativních toxikologických metod (NICEATM) národního toxikologického programu (NTP) (12). Tato zkušební metoda obsahuje rovněž doporučené použití a omezení kometového testu a je založena na závěrečném protokolu (12), který byl použit ve validačním experimentu, a na dalších příslušných zveřejněných i nezveřejněných (chráněných laboratorních) údajích.

Definice nejdůležitějších termínů jsou uvedeny v dodatku 1. Je třeba konstatovat, že při tomto testu lze použít řadu různých platforem (mikroskopické preparáty, gelové skvrny, 96jamkové destičky atd.). Z praktických důvodů se v celé zbývající části tohoto dokumentu používá výraz „preparát“, avšak zahrnuje i všechny ostatní platformy.

VÝCHOZÍ ÚVAHY A OMEZENÍ

Kometový test je metodou měření zlomů vláken DNA v eukaryotických buňkách. Samostatné buňky/jádra ponořené do agarózy se nechají na podložním sklíčku s detergentem a při vysoké koncentraci soli lyzovat. Tímto krokem lýzy se vyluhují buněčné a jaderné membrány a umožní se uvolnění svinutých smyček DNA, které se zpravidla označují jako nukleoidy a fragmenty DNA. Elektroforéza při vysokém pH vede ke vzniku struktur podobajícím se kometám, které při použití vhodných fluorescenčních barviv lze pozorovat prostřednictvím fluorescenční mikroskopie; fragmenty DNA podle své velikosti putují od „hlavy“ k „ohonu“ a intenzita „ohonu komety“ v poměru k celkové intenzitě (hlava plus ohon) vyjadřuje množství přerušení DNA (13) (14) (15).

Alkalický kometový test *in vivo* je zvláště vhodný k posouzení genotoxické nebezpečnosti proto, že odezvy při tomto testu jsou závislé na absorpci, distribuci, metabolismu a exkreci (ADME) *in vivo* a rovněž na procesech reparace DNA. Tyto jevy mohou u různých druhů zvířat, různých tkání a při různých druzích poškození DNA probíhat různě.

▼M7

Aby byly splněny požadavky šetrného zacházení se zvířaty, zejména snížení používání zvířat (zásady 3R nahrazení (replacement), snižování (reduction), zmírňování (refinement)), může být tento test také začleněn do jiných toxikologických studií, např. do studií toxicity po opakovaných dávkách (10) (16) (17), nebo lze jeho cílový ukazatel kombinovat s jinými cílovými ukazateli genotoxicity, např. zkoušky savčích erytrocytárních mikrojader *in vivo* (18) (19) (20). Kometový test se nejčastěji provádí na hlodavcích, ačkoli byl prováděn i na jiných druzích savců a na jiných zvířatech než na savcích. Použití jiných druhů než hlodavců by v každém jednotlivém případě mělo být vědecky a eticky zdůvodněno a důrazně se doporučuje provádět kometový test na jiných druzích než na hlodavcích pouze v rámci jiných studií toxicity, a nikoli jako samostatný test.

Výběr způsobu expozice a tkáně (tkání), jež mají být zkoušeny, by měl vycházet ze všech dostupných/existujících poznatků o zkoušené chemické látce, např. zamýšleného/předpokládaného způsobu expozice lidí, metabolismu a distribuce, možných účinků v místě kontaktu, strukturálních rizik, jiných údajů o genotoxicitě a toxicitě a z účelu studie. Proto, je-li to vhodné, je možné genotoxický potenciál zkoušených chemických látek zkoušet na cílové tkáni (tkáních), na nichž se zkouší karcinogenní a/nebo jiné toxické účinky. Tento test je rovněž považován za užitečný pro další výzkum genotoxicity zjištěné způsobem *in vitro*. Je vhodné provést kometový test *in vivo* na tkáni, která je předmětem zájmu, jestliže lze důvodně předpokládat, že tato tkáň bude dostatečně exponována.

Zkouška byla nejobsáhleji validována na somatických tkáních samice potkana v kolaborativních studiích, jako byl experiment střediska JaCVAM (12) a zkouška popsaná v publikaci Rothfuss *et al*., 2010 (10). V mezinárodním validačním experimentu střediska JaCVAM byla použita játra a žaludek. Játra proto, že jsou nejaktivnějším orgánem v metabolismu chemických látek a často též cílovým orgánem karcinogenity. Žaludek proto, že je obvykle prvním místem kontaktu s chemickými látkami po expozici orální cestou, ačkoli by za tkáně kontaktu měly být považovány i jiné oblasti trávicí soustavy jako dvanáctník a lačník, které z hlediska lidského organismu mohou být považovány za relevantnější než žláznatý žaludek hlodavců. Je třeba dbát na to, aby tyto tkáně nebyly vystaveny nadměrně vysokým koncentracím zkoušené chemické látky (21). Tuto metodu lze v zásadě použít ke zkoušení jakékoli tkáně, ze které lze odebrat jednobuněčné/jednojaderné suspenze. Chráněné údaje některých laboratoří prokazují její úspěšné použití na mnoha různých tkáních a existuje množství publikací, z nichž vyplývá použitelnost této metody pro zkoušení jiných orgánů nebo tkání než jater a žaludku, např. lačníku (22), ledvin (23) (24), kůže (25) (26) nebo močového měchýře (27) (28), plic a buněk bronchoalveolární laváže (což je důležité při inhalačních studiích chemických látek) (29) (30), a prováděly se i zkoušky s více orgány současně (31) (32).

Předmětem zájmu mohou být genotoxické účinky na zárodečné buňky, avšak je třeba poznamenat, že standardní alkalický kometový test, jak je popsán v této zkušební metodě, není považován za vhodný pro měření zlomů vláken DNA ve zralých zárodečných buňkách. Při průzkumu literatury o použití kometového testu k výzkumu genotoxicity zárodečných buněk byly totiž zaznamenány vysoké a proměnlivé úrovně poškození buněk pozadí (33), a proto se má za to, že předtím, než bude možné do této zkušební metody začlenit kometový test na zralých zárodečných buňkách (např. spermatu), musí se provést změny v protokolu a hlubší standardizační a validační studie. Doporučený režim expozice popsaný v této zkušební metodě navíc není optimální a pro analýzu zlomů vláken DNA ve zralých spermiích, pro jeho použitelnost by byla nezbytná delší expozice nebo delší interval odběru vzorků. V literatuře jsou popsány genotoxické účinky měřené kometovým testem v testikulárních buňkách v různých fázích jejich diferenciace (34) (35). Je však třeba poznamenat, že gonády obsahují směs somatických a zárodečných buněk. Z tohoto důvodu pozitivní výsledky v celých gonádách (varlatech) nemusí nutně odrážet poškození zárodečných buněk; nicméně nasvědčují tomu, že zkoušená chemická látka (látky) a/nebo její metabolity dospěly až do gonád.

▼M7

Za standardních zkušebních podmínek kometového testu nelze spolehlivě zjistit překřížení vláken DNA. Za určitých upravených zkušebních podmínek by bylo možné zjistit překřížení DNA-DNA a DNA-protein a jiné bazické změny, jako např. zoxidované báze (23) (36) (37) (38) (39). K tomu, aby se daly nezbytné změny protokolu náležitě charakterizovat, byl by zapotřebí další výzkum. Zjišťování činitelů způsobujících překřížení vláken tak není prvořadým úkolem testu, jak je zde popsán. Test není vhodný, a to ani s úpravami, ke zjišťování aneugenů.

Za současného stavu poznání jsou s kometovým testem *in vivo* spojena i některá další omezení (viz dodatek 3). Lze předpokládat, že tato zkušební metoda bude v budoucnu přezkoumána a v případě potřeby revidována vzhledem k získaným zkušenostem.

Před použitím této zkušební metody ke zkoušení směsi s cílem získat údaje pro zamýšlené regulační účely by mělo být zváženo, zda tato metoda může pro tento účel poskytnout přiměřené výsledky, a pokud ano, proč je tomu tak. Takové úvahy nejsou nutné, pokud existuje právní požadavek na zkoušení dané směsi.

PODSTATA METODY

Zvířata se vhodným způsobem exponují zkoušené chemické látce. Podrobný popis dávkování a odběru vzorků je uveden v odstavcích 36 až 40. Ve zvoleném čase (časech) odběru vzorků se tkáně, které jsou předmětem zájmu, vyříznou a připraví se z nich jednobuněčná/jednojaderná suspenze (bude-li to považováno za užitečné, např. u jater, lze povést perfuzi *in situ*) a uloží se do měkkého agaru tak, aby se na sklíčkách znehybnily. Buňky/jádra se ošetří lýzovým pufrem, aby se odstranila buněčná a/nebo jaderná membrána, a exponuje se silné zásadě, např. s hodnotou pH ≥13, aby se umožnilo rozvinutí šroubovice DNA a odloučení uvolněných smyček a fragmentů DNA. Jaderná DNA v agaru se poté podrobí elektroforéze. Normální, nefragmentované molekuly DNA zůstanou v pozici, ve které byla jaderná DNA v agaru, zatímco veškerá fragmentovaná DNA a uvolněné smyčky DNA migrovaly směrem k anodě. Po elektroforéze se DNA zviditelní pomocí vhodného fluorescenčního barviva. Preparáty by se měly analyzovat za pomoci mikroskopu a plně automatizovaného nebo poloautomatizovaného analytického systému. Rozsah, v němž DNA migruje během elektroforézy, a vzdálenost, na niž migruje, odráží množství a velikost fragmentů DNA. Kometový test má několik cílových ukazatelů. Pro posouzení poškození DNA bylo doporučeno stanovit obsah DNA v ohonu (procentuální zastoupení DNA v ohonu (% tail DNA) nebo procentuální intenzita ohonu (% tail intensity)) (12) (40) (41) (42). Po analýze dostatečného počtu jader se údaje analyzují vhodnými metodami a vyhodnotí se výsledek testu.

Je třeba poznamenat, že byly zkoumány změny různých kroků metodiky, včetně přípravy vzorků, podmínek elektroforézy, parametrů vizuální analýzy (např. intenzita barviva, intenzita světla žárovky mikroskopu a použití filtrů u mikroskopu a dynamika kamery) a podmínek okolního prostředí (např. osvětlení pozadí), které mohou migraci DNA ovlivnit (43) (44) (45) (46).

OVĚŘENÍ ODBORNÉ ZPŮSOBILOSTI LABORATOŘE

Každá laboratoř by měla dosáhnout způsobilosti k provádění pokusů tím, že prokáže schopnost získat dostatečně kvalitní suspenze s jedinou buňkou nebo jádrem pro každou cílovou tkáň (tkáně) každého druhu, který se použije. Kvalita preparátů bude hodnocena především podle procent DNA v ohonu u zvířat ošetřených vehikulem, která patří do reprodukovatelného nízkého rozpětí. Dosavadní údaje naznačují, že střední hodnota procentuálního zastoupení DNA v ohonu ve skupině (na základě střední hodnoty mediánů – podrobněji o těchto termínech viz odstavec 57) u jater potkanů by přednostně neměla být vyšší než 6 %, což by se shodovalo s hodnotami získanými ve validačním experimentu JaCVAM (12) a jinými zveřejněnými i chráněnými údaji. V současnosti neexistuje dostatek údajů, aby bylo možné předložit doporučení týkající se optimálních

▼M7

nebo přijatelných rozpětí pro jiné tkáně. To nebrání použití jiných tkání, je-li to odůvodněno. V závěrečné zprávě by měl být uveden náležitý přehled účinnosti kometového testu v těchto tkáních v poměru k údajům z publikované literatury nebo chráněným údajům. Za prvé je žádoucí, aby nízké rozpětí procentuálního zastoupení DNA v ohonu v kontrolách poskytovalo dostatečně dynamické rozpětí pro zjištění pozitivního účinku. Za druhé by každá laboratoř měla být schopna reprodukovat očekávané odezvy na přímé mutageny a promutageny s různými mechanismy působení, jak se doporučuje v tabulce 1 (odstavec 29).

Pozitivní látky lze vybrat z validačního experimentu JaCVAM (12) nebo případně s odůvodněním i z jiných zveřejněných údajů (viz odstavec 9), které prokazují jasné pozitivní odezvy ve tkáních, které jsou předmětem zájmu. Měla by být rovněž prokázána schopnost detekovat slabé účinky známých mutagenů, např. EMS, při nízkých dávkách, například určením vztahu dávka-účinek s odpovídajícím počtem dávek a intervaly jejich podávání. Nejprve by se úsilí mělo zaměřit na dosažení způsobilosti ke zkoušení nejčastěji používaných tkání, tj. jater hlodavců, kde lze provést srovnání s existujícími údaji a očekávanými výsledky. Zároveň by měly být shromažďovány údaje vztahující se k jiným tkáním, např. žaludku/dvanáctníku/lačníku, krvi atd. Laboratoř musí prokázat způsobilost ke zkoušení každé jednotlivé tkáně každého druhu, který plánuje zkoušet, a bude muset prokázat, že v této tkáni lze získat přijatelnou pozitivní odezvu na známý mutagen (např. EMS).

Měly by být shromažďovány údaje o kontrolách s vehikulem / negativních kontrolách, aby bylo možné prokázat reprodukovatelnost údajů o negativních odezvách a prokázat, že byly řádně kontrolovány technické aspekty testu, nebo aby bylo možné navrhnout stanovení nových historických rozpětí kontrol (viz odstavec 22).

Je třeba poznamenat, že mnohé tkáně je možné odebírat při pitvě a zpracovat pro kometovou analýzu, avšak laboratoř musí být způsobilá odebírat vzorky více tkání od jediného zvířete, čímž se zajistí, že jakékoli potenciální léze DNA nebudou opomenuty a že analýza komet nebude zpochybněna. Zásadně důležitý může být časový interval od utracení do odstranění tkání pro zpracování (viz odstavec 44).

Při dosahování způsobilosti k této zkoušce musí být brán ohled na dobré zacházení se zvířaty, proto při zvyšování způsobilosti v různých aspektech testu lze použít tkáně ze zvířat použitých v jiných zkouškách. Nemusí být rovněž nezbytné v různých fázích zavádění nové zkušební metody v laboratoři provádět celou zkoušku a při rozvíjení potřebných dovedností lze použít méně zvířat nebo nižší zkušební koncentrace.

Historické kontrolní údaje

Během šetření způsobilosti by laboratoř měla vytvořit databázi historických údajů, aby mohla stanovit rozsah a distribuci pozitivních a negativních kontrol pro příslušné tkáně a druhy zvířat. Doporučení, jak shromáždit a používat historické údaje (tj. kritéria pro zařazení údajů do databáze a jejich vyřazení a kritéria přijatelnosti pro daný experiment), lze najít v literatuře (47). Různé tkáně a různé druhy, jakož i různá vehikula a způsoby podávání mohou vést k různým hodnotám procentuálního zastoupení DNA v ohonu u negativních kontrol. Je proto důležité stanovit rozsahy negativních kontrol pro každou tkáň a pro každý druh. V laboratořích by měly být uplatňovány metody řízení jakosti, např. regulační diagramy (např. diagramy typu C nebo χ s pruhem (48)), z nichž je patrné, jak proměnlivé jsou jejich údaje a že metodika je v dané

▼M7

laboratoři „pod kontrolou“. Aby bylo možné detekovat slabé účinky, bude také možná zapotřebí optimalizovat výběr vhodných látek pro pozitivní kontrolu, rozsahy dávkování a zkušební podmínky (např. podmínky elektroforézy) (viz odstavec 17).

Jakékoli změny zkušebního protokolu by měly být zvažovány z hlediska jejich souladu se stávající databází kontrolních údajů laboratoře. Jakýkoli větší rozdíl ve zkušebním protokolu by měl vést k zavedení nové historické kontrolní databáze.

POPIS METODY

Příprava

Výběr zvířecích druhů

Obvykle se používají běžné laboratorní kmeny zdravých, mladých a pohlavně zralých zvířat (ve věku 6 až 10 týdnů na počátku expozice, i když přijatelné je i použití poněkud starších zvířat). Při výběru druhu hlodavců by se mělo vycházet z i) druhů používaných v jiných studiích toxicity (aby bylo možné porovnat údaje a provádět integrované studie), ii) druhů, u kterých se ve zkoušce karcinogenity (při zkoumání mechanismu karcinogeneze) rozvinuly nádory nebo iii) druhů, jejichž metabolismus nejvíce odpovídá lidskému, jsou-li takové známy. Při této zkoušce jsou rutinně používáni hlodavci. Lze však použít i jiné druhy, je-li to eticky a vědecky odůvodněno.

Podmínky chovu a krmení zvířat

Teplota v místnosti s pokusnými zvířaty by u hlodavců v ideálním případě měla být 22 °C (± 3 °C). Relativní vlhkost vzduchu by v ideálním případě měla mít hodnotu 50 až 60 %, minimálně však 30 %, a neměla by pokud možno přesáhnout 70 % kromě doby úklidu místnosti. Osvětlení by mělo být umělé a mělo by se střídat 12 hodin světla a 12 hodin tmy. Ke krmení lze použít konvenční laboratorní krmivo s neomezeným přísunem pitné vody. Výběr druhu potravy může být ovlivněn její dostatečnou mísitelností se zkoušenou chemickou látkou, je-li látka podávána tímto způsobem. Hlodavci by měli být umístěni v klecích v malých skupinkách (obvykle maximálně pět zvířat) stejného pohlaví, pokud se neočekává agresivní chování. Zvířata mohou být umístěna v klecích individuálně, pouze je-li to vědecky odůvodněné. Měly by být pokud možno použity pevné podlahy, protože pletivové podlahy mohou způsobit vážná poranění (49). Musí být zajištěno přiměřené obohacení životního prostředí.

Příprava zvířat

Zvířata se náhodným výběrem rozdělí do kontrolních a experimentálních skupin. Zvířata se jednoznačně identifikují a před začátkem expozice se nechají v laboratorních podmínkách alespoň pět dní aklimatizovat. Musí být použita co nejméně invazivní metoda jednoznačné identifikace zvířat. Vhodnými metodami jsou například kroužkování, označení štítkem, pomocí mikročipu nebo biometrické identifikace. Zkracování posledních článků končetin a vystříhávání tkání z uší není při těchto zkouškách vědecky odůvodněné. Klece by měly být uspořádány tak, aby byl případný vliv jejich polohy minimalizován. V okamžiku zahájení studie by měla být odchylka v hmotnosti zvířat minimální a neměla by překročit ± 20 %.

Příprava dávek

Pevné zkoušené chemické látky by se před podáním dávky zvířatům měly rozpustit nebo suspendovat ve vhodných vehikulech nebo přimíchat do potravy nebo pitné vody. Kapalné zkoušené chemické látky mohou být podávány přímo nebo se před podáním zředí. Pro účely expozice inhalací lze zkoušené chemické látky v závislosti na jejich fyzikálně-chemických vlastnostech podávat v podobě plynu, páry nebo pevného/kapalného aerosolu (50) (51).

Používat by se měla čerstvě připravená zkoušená chemická látka, pokud údaje o stabilitě neprokazují možnost skladování a nestanoví vhodné podmínky pro skladování.

▼M7

Zkušební podmínky

Vehikulum

Vehikulum by nemělo mít při použitých objemech dávek toxické účinky a mělo by být vyloučeno podezření, že reaguje se zkoušenou chemickou látkou. Jsou-li použita jiná než známá vehikula, mělo by být jejich zařazení podloženo referenčními údaji o jejich kompatibilitě, pokud jde o pokusná zvířata, způsob podávání a cílový ukazatel. Doporučuje se nejprve zvážit použití vodného rozpouštědla/vehikula. Je třeba poznamenat, že některá (zejména viskózní) vehikula mohou vyvolat zánět a zvýšit úroveň zlomů vláken DNA v pozadí v místě kontaktu, zejména při vícenásobném podávání.

Kontroly

Pozitivní kontroly

V současnosti by měla být běžně do každé zkoušky zařazena skupina nejméně 3 analyzovatelných zvířat jednoho pohlaví nebo každého pohlaví, jsou-li použita obě (viz odstavec 32), exponovaných pozitivní kontrolní látce. V budoucnosti bude možná možné prokázat odpovídající způsobilost a potřebu pozitivních kontrol snížit. Odebírají-li se vzorky vícekrát (např. při protokolu s jediným podáním dávky), je nezbytné zařadit pozitivní kontroly pouze při jednom odběru, avšak mělo by být zajištěno vyvážené uspořádání (viz odstavec 48). V souběžných pozitivních kontrolách není nezbytné podávat látky stejným způsobem jako zkoušenou chemickou látku, ovšem při měření účinků v místě kontaktu je důležité použít stejný způsob podávání. O pozitivních kontrolních látkách by mělo být známo, že indukují zlomy vláken DNA ve všech tkáních, které jsou předmětem zájmu u zkoušené chemické látky, a vhodnou látkou pro pozitivní kontrolu je pravděpodobně EMS, neboť vyvolala zlomy vláken DNA ve všech tkáních, které byly dosud zkoumány. Dávky pozitivních kontrolních látek by měly být vybrány tak, aby vyvolaly střední účinky, které nejlépe dokládají dobré provedení a citlivost zkoušky, a mohly by být založeny na křivkách dávka-účinek vytvořených laboratoří během prokazování způsobilosti. U zvířat souběžné pozitivní kontroly by procentuální zastoupení DNA v ohonu mělo odpovídat rozpětí, které bylo předem laboratoří stanoveno pro každou jednotlivou tkáň a každý odběr vzorků u daného druhu (viz odstavec 16). Příklady pozitivních kontrolních látek a některé z jejich cílových tkání (u hlodavců) jsou uvedeny v tabulce 1. Je možné vybrat jiné látky než látky uvedené v tabulce 1, je-li to vědecky odůvodněno.

Tabulka 1

Příklady pozitivních kontrolních látek a některé z jejich cílových tkání

Látky a jejich číslo CAS
ethylmethansulfonát (CAS RN 62-50-0) pro veškeré tkáně
1-ethyl 1-nitrosomočovina (CAS RN 759-73-9) pro játra a žaludek, dvanáctník nebo lačník
methylmethansulfonát (CAS RN 66-27-3) pro játra, žaludek, dvanáctník nebo lačník, plíce a buňky bronchoalveolární laváže (BAL), ledviny, močový měchýř, plíce, varlata a kostní dřeň / krev
N-methyl-N′-nitro-N-nitrosoguanidin (CAS RN: 70-25-7) pro žaludek, dvanáctník nebo lačník
1,2-dimethylhydrazin-dihydrochlorid (CAS RN 306-37-6) pro játra a střeva
1-methyl-1-nitrosomočovina (CAS RN 684-93-5) pro játra, kostní dřeň, krev, ledviny, žaludek, dvanáctník a mozek

▼M7

Negativní kontroly

Do každé zkoušky by pro každý odběr a pro každou tkáň měla být zařazena skupina zvířat pro negativní kontrolu ošetřených pouze vehikulem, s kterou se jinak zachází stejně jako s exponovanými skupinami. U zvířat negativní kontroly by procentuální zastoupení DNA v ohonu mělo být uvnitř rozpětí pro pozadí, které laboratoř předem stanoví pro každou jednotlivou tkáň a každý odběr vzorků u daného druhu (viz odstavec 16). Neexistují-li dosavadní nebo publikované údaje o kontrolách prokazující, že zvolené vehikulum, počet podávaných dávek nebo způsob jejich podávání vyvolává zhoubné nebo genotoxické účinky, měly by se před provedením úplné studie provést počáteční studie ke stanovení přijatelnosti kontroly s vehikulem.

POSTUP

Počet a pohlaví zvířat

Existuje málo údajů týkajících se zvířat samičího pohlaví, na jejichž základě by bylo možné provést srovnání mezi oběma pohlavími v souvislosti s kometovým testem, avšak obecně jsou jiné genotoxické odezvy *in vivo* u zvířat samčího a samičího pohlaví podobné, a proto většinu studií lze provést se zvířaty kterékoli pohlaví. Použití zvířat obou pohlaví podpoří údaje prokazující významné rozdíly mezi samci a samicemi (např. rozdíly v systémové toxicitě, metabolismu, biologické dostupnosti atd. zjištěné např. ve studii ke stanovení rozsahu dávek pro studie toxicity po opakovaných dávkách). V tom případě může být vhodné provést studii s oběma pohlavími, např. jako součást studie toxicity po opakovaných dávkách. V případě použití obou pohlaví by mohlo být vhodné použít faktoriální pokus. Podrobnosti ohledně toho, jak pomocí tohoto pokusu analyzovat údaje, jsou uvedeny v dodatku 2.

Velikost skupin při zahájení studie (a během stanovení způsobilosti) by měla být stanovena tak, aby poskytla minimálně pět analyzovatelných zvířat jednoho pohlaví nebo každého pohlaví, jsou-li použita obě, z každé skupiny (méně ve skupině souběžné pozitivní kontroly – viz odstavec 29). Je-li expozice člověka chemickým látkám specifická pro určité pohlaví, jako je tomu například u některých farmaceutických látek, měla by být zkouška provedena se zvířaty odpovídajícího pohlaví. Určitým vodítkem pro maximální typické požadavky na počet zvířat může být, že studie provedená podle parametrů uvedených v odstavci 33 se třemi exponovanými skupinami a souběžnými negativními a pozitivními kontrolami (každá skupina složená z pěti zvířat jednoho pohlaví) by vyžadovala 25 až 35 zvířat.

PLÁN EXPOZICE

Zvířata by měla být každodenně exponována po dobu 2 nebo více dnů (tj. dvě nebo více expozic v přibližně 24hodinových intervalech), a vzorky by měly být odebírány každých 2 až 6 hodin (nebo v čase T_{max}) od první expozice. Vzorky ze studií s prodlouženým režimem podávání (např. každodenní podávání po dobu 28 dnů) jsou přijatelné. Byla prokázána úspěšná kombinace kometového testu a testu erytrocytárních mikrojader (10) (19). Je však třeba pečlivě zvážit logistiku spojenou s odběrem vzorků tkání pro kometovou analýzu spolu s požadavky na odběr tkáňových vzorků pro jiné druhy toxikologických hodnocení. Ve většině případů není vhodný odběr vzorků 24 hodin po poslední dávce, který je typický pro studium obecné toxicity. Použití jiných harmonogramů expozice a odběru vzorků by mělo být odůvodněno (viz dodatek 3). Mohla by být například použita jediná expozice s více odběry vzorků, avšak je třeba poznamenat, že studie s jediným podáním dávky bude vyžadovat více zvířat, jelikož je zapotřebí více odběrů, avšak někdy může být upřednostněna, např. jestliže zkoušená chemická látka po opakovaném podání vyvolává nadměrnou úroveň toxicity.

▼M7

Ať je zkouška provedena jakýmkoli způsobem, je přijatelná, pokud zkoušená chemická látka vyvolá pozitivní odezvu nebo, v případě negativní studie, pokud jsou podány přímé či nepřímé důkazy o expozici cílové tkáně (tkání) nebo o toxicitě pro cílovou tkáň (tkáně) nebo o tom, že bylo dosaženo limitní dávky (viz odstavec 36).

Zkoušené chemické látky mohou být podávány také ve dvou dávkách, tj. dvě expozice v týž den v intervalu nanejvýš 2 až 3 hodin, aby se usnadnilo podávání velkých objemů. Za těchto podmínek by doby odběru vzorků měly být stanoveny na základě doby posledního podání dávky (viz odstavec 40).

Dávkování

Provádí-li se studie ke stanovení rozsahu dávek, poněvadž nejsou k dispozici vhodné údaje z jiných relevantních studií, které by mohly pomoci při stanovení dávek, měla by podle současného přístupu k provádění studií ke stanovení rozsahu dávek být provedena ve stejné laboratoři, se stejným druhem, kmenem, pohlavím a za stejného režimu expozice, které se použijí v hlavní studii. Cílem této studie by mělo být zjistit maximální tolerovanou dávku (MTD), která je definována jako dávka vyvolávající slabé toxické účinky po dobu trvání zkoušky (například zjevné klinické příznaky jako nenormální chování nebo reakce, menší pokles tělesné hmotnosti nebo cytotoxicita cílové tkáně), nikoli však smrt nebo důkazy o bolesti, utrpení nebo strádání vyžadující utracení. U netoxické chemické látky při době podávání 14 dnů nebo delší činí maximální (limitní) dávka 1 000 mg/kg tělesné hmotnosti na den. Při kratší než 14denní aplikaci je maximální (limitní) dávka 2 000 mg/kg tělesné hmotnosti na den. Pro některé druhy zkoušených chemických látek (např. farmaceutické látky používané v humánní medicíně), na něž se vztahují specifické požadavky, se tyto limity mohou lišit.

Výjimku z kritérií pro stanovení dávek mohou představovat chemické látky, jež vykazují saturaci toxikokinetických vlastností nebo indukují detoxifikační procesy, jež mohou vést ke snížení expozice po dlouhodobém podávání; tyto látky by měly být hodnoceny v každém jednotlivém případě.

V akutní a subakutní verzi kometového textu by kromě maximální dávky (MTD, maximální únosné dávky, maximální expozice nebo limitní dávky) měl být pro každý odběr vzorků vybrána klesající řada alespoň dvou dalších vhodně odstupňovaných úrovní (pokud možno v intervalu menším než 10), aby se prokázala odezva v závislosti na dávce. Použité úrovně dávek by však pokud možno měly pokrývat rozsah od maximální dávky až po dávku vyvolávající malou toxicitu nebo nevyvolávající žádnou toxicitu. Je-li toxicita pro cílovou tkáň (kostní dřeň) pozorována na všech testovaných úrovních dávek, doporučuje se další studie s netoxickými dávkami (viz odstavce 54–55). Studie, jejichž cílem je úplnější výzkum tvaru křivky dávka-účinek, mohou vyžadovat zařazení doplňkové exponované skupiny (skupin).

Podávání dávek

Při plánování zkoušky by měl být zvážen předpokládaný způsob expozice člověka. Proto lze oprávněně zvolit způsoby expozice např. stravou, v pitné vodě, lokálně, subkutánně, nitrožilně, orálně (pomocí žaludeční sondy), inhalací, intratracheálně nebo implantací. Způsob podávání by měl být v každém případě zvolen tak, aby zajistil odpovídající expozici cílové tkáně (tkání). Intraperitoneální injekce se obecně nedoporučuje, protože se nejedná o typický odpovídající způsob expozice člověka, a měla by být použita pouze s konkrétním zdůvodněním (např. u některých pozitivních kontrolních látek, pro výzkumné účely nebo u některých léčiv, která se podávají intraperitoneální cestou). Maximální objem

▼M7

kapaliny, který lze najednou podán žaludeční sondou nebo injekčně, závisí na velikosti pokusného zvířete. Tento objem by neměl překročit 1 ml na 100 g tělesné hmotnosti, s výjimkou vodných roztoků, kde lze použít 2 ml na 100g tělesné hmotnosti. Použití větších objemů, než jsou tyto (pokud je povolují právní předpisy o šetrném zacházení se zvířaty), je třeba odůvodnit. Různých úrovní dávky by mělo být pokud možno dosaženo úpravou koncentrace aplikační formy, aby se zajistil konstantní objem v poměru k tělesné hmotnosti na všech úrovních dávek.

Doba odběru vzorků

Doba odběru vzorků je kritická proměnná, neboť je určována dobou, která je nezbytná k dosažení maximální koncentrace zkoušených chemických látek v cílové tkáni a k vyvolání zlomů vláken DNA, avšak dříve, než byly tyto zlomy odstraněny, napraveny nebo než vedly k zániku buňky. Trvání některých lézí, jež vedou k zlomům vláken DNA detekovaným při kometovém testu, může být, alespoň u některých chemických látek zkoušených *in vitro,* velmi krátké (52) (53). Existuje-li podezření na výskyt takových přechodných lézí DNA, měla by být přijata opatření ke zmírnění jejich ztráty tím, že se vzorky tkání odeberou včas, možná dříve než ve standardních dobách, které jsou uvedeny níže. Optimální doba (doby) odběru vzorků mohou záviset na chemické látce nebo na způsobu jejího podávání, což vede například k rychlé expozici tkání při nitrožilním podávání nebo při expozici inhalací. Proto by doby odběru vzorků měly být pokud možno stanoveny na základě kinetických údajů (např. čas (T_{max}), ve kterém je dosažena maximální koncentrace v plazmě nebo ve tkáni (C_{max}), nebo v rovnovážném stavu v případě podávání ve více dávkách). Pokud kinetické údaje neexistují, vhodným kompromisem pro měření genotoxicity je odebírat vzorky 2 až 6 hodin po poslední expozici v případě dvou nebo více expozic nebo po 2 až 6 hodinách a po 16 až 24 hodinách po jediném podání dávky; mělo by se však dbát na to, aby se pitva všech zvířat provedla ve stejném intervalu po poslední (nebo jediné) dávce. Při výběru vhodných dob odběru vzorků mohou být též použity informace o vzniku toxických účinků v cílových orgánech (jsou-li takové informace k dispozici).

Pozorování

Všeobecné klinické pozorování zdravotního stavu pokusných zvířat by se mělo provádět a zaznamenávat nejméně jednou denně, nejlépe ve stejnou dobu (stejné doby) každého dne a s uvážením doby očekávaného maxima účinku po podání dávky (54). Nejméně dvakrát denně by měla být provedena prohlídka všech zvířat za účelem zjištění morbidity a mortality. Při déletrvajících studiích by všechna zvířata měla být nejméně jednou týdně zvážena, a rovněž při ukončení zkoušky. Spotřeba potravy by se měla měřit při každé výměně krmiva a alespoň jednou týdně. Pokud je zkoušená chemická látka podávána v pitné vodě, měla by se spotřeba vody měřit při každé výměně vody a alespoň jednou týdně. Zvířata, která vykazují neletální indikátory nadměrné toxicity, by měla být utracena před uplynutím doby zkoušky a pro kometovou analýzu se zpravidla nepoužívají.

Odběr tkání

Jelikož vyvolání zlomů vláken DNA (komet) je možné zkoumat prakticky v jakékoli tkáni, mělo by být jasně uvedeno zdůvodnění tkáně (tkání), které se budou odebírat, a mělo by vycházet z důvodu provedení této studie a z veškerých existujících údajů o absorpci, distribuci, metabolismu a exkreci (ADME), o genotoxicitě, karcinogenitě nebo jiné toxicitě zkoušených chemických látek, které jsou předmětem výzkumu. Důležitými faktory, které je nutno zvážit, jsou mimo jiné způsob podávání dávek (založený na pravděpodobném způsobu (způsobech) expozice u lidí), predikovaná distribuce a absorpce tkání, vliv metabolismu a možný mechanismus působení zkoušených chemických látek. Nejčastěji zkoumanou tkání jsou játra, o kterých také existuje nejvíce údajů. Pokud některé

▼M7

podkladové informace chybějí a pokud předmětem zájmu nejsou některé konkrétní tkáně, byl by odběr vzorků z jater oprávněný, neboť především v nich se odehrává xenobiotický metabolismus a jsou často vystaveny působení jak mateřské látky (látek), tak metabolitu (metabolitů). V některých případech může být nejvhodnější zkoumání místa přímého kontaktu (např. žláznatého žaludku nebo dvanáctníku/lačníku u chemických látek podávaných orálně nebo do plic v případě inhalovaných chemických látek). Další nebo alternativní tkáně by měly být vybírány na základě konkrétních důvodů, proč se zkouška provádí, ale může být užitečné zkoumat více tkání stejných zvířat za předpokladu, že laboratoř prokázala způsobilost ke zkoušení těchto tkání a k manipulaci s více tkáněmi současně.

Příprava vzorků

U procesů popsaných v následujících odstavcích (44–49) je důležité, že všechny roztoky nebo stabilní suspenze by měly být používány před skončením jejich použitelnosti nebo, pokud je to možné, měly být čerstvě připraveny. V následujících odstavcích jsou rovněž doby nezbytné k i) odstranění každé tkáně po provedení pitvy, ii) zpracování každé tkáně do buněčných/jaderných suspenzí a iii) zpracování suspenze a přípravě preparátů považovány za kritické proměnné (viz definice, dodatek 1) a při zavádění metody a při prokazování způsobilosti by měly být stanoveny přijatelné časové intervaly pro každý z těchto kroků.

Ve vhodnou dobu (doby) po poslední expozici zkoušené chemické látce se zvířata utratí v souladu s platnými právními předpisy o šetrném zacházení se zvířaty a se zásadami 3R- nahrazování, snižování a zmírňování. Vybraná tkáň (tkáně) se vyjme, oddělí a část se odebere pro kometový test, podle standardních postupů by se kousek této tkáně měl odříznout a uložit do formaldehydového roztoku nebo do vhodné fixační látky pro případnou histopatologickou analýzu (viz odstavec 55). Tkáň určená pro kometový test se vloží do rozmělňovacího pufru, dostatečně se propláchne studeným rozmělňovacím pufrem, aby se odstranila zbytková krev a až do zpracování se uchovává se v ledovém rozmělňovacím pufru. Může se rovněž provést perfuze (např. jater, ledvin) *in situ*.

Existuje celá řada metod izolace buněk/jader, které jsou popsány v literatuře. Tyto metody zahrnují rozřezání tkání, např. jater nebo ledvin, na malé kousky, seškrabání povrchu sliznice v případě gastrointestinálního traktu, homogenizaci a enzymatickou digesci. V průběhu validačního experimentu JaCVAM byly zkoumány pouze izolované buňky, a proto se při zavádění metody, aby se při prokazování způsobilosti bylo možné odvolat na údaje z experimentu JaCVAM, upřednostňují izolované buňky. Bylo však prokázáno, že ať byly použity izolované buňky nebo jádra, nebyl ve výsledcích zkoušky podstatný rozdíl (8). Srovnatelné výsledky daly také různé metody izolace buněk/jader (např. homogenizace, krájení, enzymatická digesce a filtrace na sítu) (55). Mohou tedy být použity buď izolované buňky, nebo izolovaná jádra. Laboratoř by měla důkladně vyhodnotit metody izolace jediné buňky / jediného jádra specifické pro každou tkáň a ověřit je. Jak bylo uvedeno v odstavci 40, některé léze, jež vedou k zlomům vláken DNA detekovaným při kometovém testu, mohou mít jen velmi krátké trvání (52) (53). Proto, ať je na přípravu jednobuněčných/jednojaderných suspenzí použita kterákoli metoda, je důležité, aby tkáně byly zpracovány co nejdříve po utracení zvířat a uchovávány v podmínkách, které snižují ústup lézí (např. uchováváním tkáně při nízké teplotě). Buněčné suspenze by měly být uchovávány na ledu, dokud nejsou připraveny k použití, aby tak mohla být prokázána minimální variabilita mezi vzorky a přiměřeným účinkem u pozitivních a negativních kontrol.

▼M7

PŘÍPRAVA PREPARÁTŮ

Příprava preparátů by se měla provést co nejdříve (v ideálním případě do jedné hodiny) po přípravě izolovaných buněk/jader, ale teplota a časový interval mezi smrtí zvířete a přípravou preparátů by měly být přísně řízeny a ověřovány v podmínkách laboratoře. Objem buněčné suspenze přidaný do agarózy s nízkým bodem tání (obvykle 0,5 až 1,0 %) na přípravu preparátů by neměl snížit procentuální podíl agarózy s nízkým bodem tání na méně než 0,45 %. Optimální hustota buněk bude stanovena systémem analýzy obrazu, který se používá pro hodnocení komet.

Lýza

Podmínky lýzy jsou rovněž kritickou proměnnou a mohou ovlivňovat zlomy vláken u některých specifických modifikací DNA (určité alkylace DNA a bazické adukty). Proto se doporučuje, aby podmínky lýzy byly pro všechny preparáty v experimentu co nejvíce konstantní. Jakmile jsou preparáty připraveny, měly by se ponořit alespoň na hodinu (nebo přes noc) do chlazeného lyzovacího roztoku o teplotě asi 2 až 8 °C za tlumeného osvětlení, např. pomocí žlutého světla (nebo chráněné před světlem), což zabrání vystavení bílému světlu, jež může obsahovat UV složky. Po této inkubační době by preparáty před krokem alkalického rozvinutí měly být opláchnuty, aby se odstranil zbytkový detergent a soli. To lze provést pomocí přečištěné vody, neutralizačního pufru nebo fosfátového pufru. Použít lze také elektroforézní pufr. To by zachovalo zásadité prostředí v elektroforézní komoře.

Rozvinutí a elektroforéza

Preparáty by měly být náhodným výběrem umístěny na platformu zařízení pro ponorkovou elektroforézu obsahující dostatečné množství elektroforézního roztoku, aby povrch preparátů byl zcela pokryt (hloubka pokrytí by měla být konzistentní při jednotlivých provedeních). U jiného druhu zařízení pro elektroforézu při kometovém testu, tj. zařízení s aktivním chlazením, cirkulací a vysokokapacitním zdrojem energie, bude vyšší vrstva roztoku na povrchu mít za následek silnější elektrický proud při udržování konstantního napětí. Preparáty by měly být vkládány do elektroforézní nádoby ve vyváženém uspořádání, aby se zmírnily účinky jakýchkoli trendů nebo okrajové účinky uvnitř nádoby a minimalizovala se variabilita mezi jednotlivými sadami, tj. při každém provedení elektroforézy by měl být stejný počet preparátů z každého zvířete zařazeného do studie a měly by být zařazeny vzorky z různých exponovaných skupin, negativních a pozitivních kontrol. Preparáty by měly být ponechány alespoň 20 minut v klidu, aby se mohla rozvinout DNA, a poté podrobeny elektroforéze za řízených podmínek, které umožní dosáhnout co nejvyšší citlivosti a dynamického rozpětí zkoušky (tj. povedou k přijatelným úrovním procent DNA v ohonu u negativních a pozitivních kontrol, jež maximalizují citlivost). Míra migrace DNA je přímo úměrná délce trvání elektroforézy a také potenciálu (ve V/cm). Na základě experimentu JaCVAM by to mohlo být 0,7 V/cm za dobu nejméně 20 minut. Délka trvání elektroforézy je považována za kritickou proměnnou a době elektroforézy by měla být stanovena tak, aby se optimalizovalo dynamické rozpětí. Delší doba elektroforézy (např. 30 nebo 40 minut pro dosažení co největší citlivosti) u známých mutagenů obvykle vedou k silnějším pozitivním odezvám. Delší doby elektroforézy však mohou také vést k nadměrné migraci u kontrolních vzorků. Při každém experimentu by mělo být udržováno konstantní napětí a proměnlivost ostatních parametrů by měla být v úzkém vymezeném rozpětí, např. v experimentu JaCVAM hodnota 0,7 V/cm poskytla počáteční proud 300 mA. Hloubka pufru by měla být upravena tak, aby bylo dosaženo

▼M7

požadovaných podmínek a ty byly zachovány po celou dobu pokusu. Hodnota proudu na začátku a na konci doby elektroforézy by měla být zaznamenána. Optimální podmínky by měly být určeny při počátečním prokázání způsobilosti v příslušné laboratoři pro každou testovanou tkáň. Teplota elektroforézního roztoku během rozvinutí a elektroforézy by měla být udržována na nízké hodnotě, obvykle 2 až 10 °C (10). Teplota elektroforézního roztoku na počátku rozvinutí, na začátku elektroforézy a na konci elektroforézy by se měla zaznamenat.

Po ukončení elektroforézy by preparáty měly být ponořeny/propláchnuty v neutralizačním pufru nejméně po dobu 5 minut. Gely lze obarvit a hodnotit v „čerstvém“ stavu (např. během 1 až 2 dnů) nebo je lze dehydratovat pro pozdější hodnocení (např. během 1 až 2 týdnů po obarvení) (56). Tyto podmínky by však měly být při prokázání způsobilosti ověřeny a měly by být získány historické údaje, které se uchovávají zvlášť pro každou z těchto podmínek. Ve druhém z uvedených případů by preparáty měly být dehydrovány ponořením do absolutního ethanolu alespoň na 5 minut, nechají se usušit na vzduchu a poté se uskladní buď při pokojové teplotě, nebo v nádobě v chladničce, až do hodnocení.

Metody měření

Komety by se měly hodnotit kvantitativně pomocí automatizovaného nebo poloautomatizovaného systému analýzy obrazu. Preparáty se obarví vhodným fluorescenčním barvivem, např. SYBR Gold, Green 1, propidiumiodidem nebo ethidiumbromidem a změří se při vhodném zvětšení (např. 200x) mikroskopem vybaveným epifluorescencí a vhodnými detektory nebo digitálním fotoaparátem (např. CCD).

Buňky lze rozdělit do tří kategorií, jak je popsáno v atlasu vyobrazení komet (57), a sice hodnotitelné, nehodnotitelné a tzv. „hedgehogs“ („ježci“, bližší objasnění viz odstavec 56). Aby nedošlo k falešným výsledkům, k získání procentuálního zastoupení DNA v ohonu by měly být hodnoceny pouze hodnotitelné buňky (s jasně vyjádřenou hlavou a ohonem, bez rušivých vlivů sousedních buněk). Četnost výskytu nehodnotitelných buněk není nutné uvádět. Četnost výskytu „hedgehogs“ by měla být stanovena na základě vizuálního hodnocení (neboť nepřítomnost jasně vyjádřené hlavy bude znamenat, že je nelze snadno odhalit analýzou obrazu) alespoň 150 buněk v každém vzorku (bližší objasnění viz odstavec 56) a zdokumentována zvlášť.

Všechny preparáty k analýze, včetně preparátů pozitivních a negativních kontrol, by měly být označeny samostatným kódem a hodnoceny „naslepo“ tak, aby hodnotiteli nebyly známy zkušební podmínky. Z každého vzorku (na každou tkáň z každého zvířete) by mělo být analyzováno alespoň 150 buněk (s vyloučením „hedgehogs“ – viz odstavec 56), Hodnocení 150 buněk z každého zvířete při nejméně 5 zvířatech na každou dávku (v souběžné pozitivní kontrole méně – viz odstavec 29) poskytuje podle analýzy Smitha *et al.*, 2008 (5) odpovídající statistickou váhu. Jsou-li použity preparáty, mohlo by to znamenat hodnocení 2 nebo 3 preparátů z každého vzorku, pokud jsou použity skupiny s pěti zvířaty. Mělo by být pozorováno několik oblastí preparátu o hustotě zajišťující, že nedojde k překrývání ohonů. Oblasti na okraji preparátů by se hodnotit neměly.

Zlomy vláken DNA by se v kometovém testu měly měřit podle nezávislých cílových ukazatelů, jako je např. procentuální zastoupení DNA v ohonu, délka ohonu a moment ohonu („tail moment“, definovaný jako součin délky ohonu a procentuálního zastoupení DNA v ohonu). Lze provést všechna tři měření, pokud je použit vhodný softwarový systém pro analýzu obrazu. Pro hodnocení a interpretaci výsledků se však doporučuje použít procentuální zastoupení DNA v ohonu (též známé jako procento intenzity ohonu) (12) (40) (41) (42), které se stanoví jako intenzita fragmentů DNA v ohonu vyjádřená v procentech z celkové intenzity buňky (13).

▼M7

Poškození tkání a cytotoxicita

Pozitivní nálezy v kometovém testu nemusejí být pouze důsledkem genotoxicity, ale k nárůstům migrace DNA může vést také toxicita cílové tkáně (12) (41). A naopak u známých genotoxinů je často zjištěna nízká nebo střední cytotoxocita (12), z čehož plyne, že pouze kometovým testem není možné rozlišit migraci DNA vyvolanou genotoxicitou od migrace DNA způsobené cytotoxicitou. Pokud jsou zjištěny nárůsty migrace DNA, doporučuje se nicméně provést vyšetření jednoho nebo více ukazatelů cytotoxicity, což může napomoci při interpretaci těchto nálezů. Nárůsty migrace DNA za přítomnosti jasných příznaků cytotoxicity by měly být interpretovány s obezřetností.

Byla navržena celá řada měřítek cytotoxicity, přičemž za důležité měřítko toxicity tkání jsou považovány histopatologické změny. S nárůsty migrace DNA byla spojována taková zjištění jako zánět, infiltrace buněk, apoptotické nebo nekrotické změny, avšak jak prokázal validační experiment JaCVAM (12), není k dispozici žádný konečný seznam histopatologických změn, které jsou vždy spojeny se zvýšenou migrací DNA. Užitečné informace o poškození tkání mohou poskytnout i změny v klinických biochemických ukazatelích (např. AST, ALT) a posoudit lze i další ukazatele, jako je aktivace kaspázy, barvivo TUNEL, barvivo Annexin V atd. O použití posledně jmenovaných ukazatelů ve studiích *in vivo* však existují jen omezené publikované údaje a některé mohou být méně spolehlivé než jiné.

„Hedgehogs“ (nebo též „clouds“ či „ghost cells“) jsou buňky, které pod mikroskopem tvoří obraz sestávající z malé nebo chybějící hlavy a z velkých roztroušených ohonů a jsou považovány za těžce poškozené buňky, ačkoli etiologie „hedgehogs“ je nejistá (viz dodatek 3). V důsledku jejich vzhledu jsou měření procentuálního zastoupení DNA v ohonu pomocí obrazové analýzy nespolehlivá, a proto se by buňky „hedgehogs“ měly hodnotit zvlášť. Výskyt „hedgehogs“ by měl být zaznamenán a uveden ve zprávě a jakýkoli významný nárůst, o němž se má za to, že je vyvolán zkoušenou chemickou látkou, by měl být pečlivě zkoumán a interpretován. Při takovém posuzování může pomoci znalost potenciálního mechanismu působení zkoušené chemické látky.

ÚDAJE A PŘEDKLÁDÁNÍ ZPRÁV

Zpracování výsledků

Experimentální jednotkou je zvíře, a proto by měly být předloženy jak údaje o jednotlivých zvířatech, tak souhrnné výsledky ve formě tabulky. Vzhledem k hierarchické povaze údajů se doporučuje určit mediánovou hodnota procentuálního zastoupení DNA v ohonu pro každý preparát a vypočítat střední hodnotu těchto mediánových hodnot pro každé zvíře (12). Ze středních hodnot pro jednotlivá zvířata se pak určí skupinová střední hodnota. Všechny tyto hodnoty by měly být v závěrečné zprávě uvedeny. Možné jsou i jiné přístupy (viz odstavec 53), pokud jsou vědecky a statisticky odůvodněny. Statistickou analýzu lze provést různými způsoby (58) (59) (60) (61). Při výběru statistické metody, která má být použita, by měla být zvážena nutnost transformace (např. log nebo druhá odmocnina) údajů a/nebo přičtení malého čísla (např. 0,001) ke všem (i k nenulovým) hodnotám, aby se zmírnily účinky nulových buněčných hodnot, jak bylo popsáno ve výše uvedených odkazech. Podrobnosti k analýze interakcí expozice/pohlaví, jsou-li použita obě pohlaví, a k následné analýze údajů v případě, že jsou zjištěny nebo nejsou zjištěny rozdíly, jsou uvedeny v dodatku 2. Uvedeny by měly být i údaje o toxicitě a klinické příznaky.

Kritéria přijatelnosti

Přijetí zkoušky je založeno na následujících kritériích:

a. provedená negativní kontrola se považuje za přijatelnou pro přidání do databáze historických negativních kontrol laboratoře, jak je popsáno v odstavci 16;

▼M7

b. provedené pozitivní kontroly (viz odstavec 29) by měly vyvolat odezvy, které jsou slučitelné s odezvami uvedenými v databázi historických pozitivních kontrol a měly by vyvolat statisticky významný nárůst v porovnání se souběžně provedenou negativní kontrolou;

c. byl analyzován přiměřený počet buněk a dávek (odstavce 52 a 36 až 38);

d. kritéria pro výběr nejvyšší dávky jsou v souladu s kritérii popsanými v odstavci 36.

Hodnocení a interpretace výsledků

Za předpokladu, že všechna kritéria přijatelnosti byla splněna, lze zkoušenou chemickou látku považovat za jasně pozitivní, pokud:

a. alespoň jedna ze zkoušených dávek vykazuje statisticky významný nárůst v porovnání se souběžně provedenou negativní kontrolou;

b. hodnocení pomocí vhodného trend-testu ukáže závislost tohoto nárůstu na dávce;

c. jakékoli výsledky se nacházejí vně rozložení dosavadních údajů negativních kontrol pro daný druh zvířat, vehikulum, způsob podání, tkáň a počet podání dávek.

Jsou-li splněna všechna tato kritéria, má se za to, že zkoušená chemická látka je schopna vyvolávat zlomy vláken DNA v tkáních zkoušených v tomto zkušebním systému. Je-li splněno pouze jedno nebo dvě z těchto kritérií, viz odstavec 62.

Za předpokladu, že všechna kritéria přijatelnosti byla splněna, lze zkoušenou chemickou látku považovat za jasně negativní, pokud:

a. žádná ze zkušebních koncentrací nevykazuje statisticky významný nárůst v porovnání se souběžně provedenou negativní kontrolou;

b. hodnocení pomocí vhodného trend-testu ukáže, že neexistuje nárůst v závislosti na koncentraci;

c. všechny výsledky se nacházejí uvnitř rozložení historických údajů negativních kontrol pro daný druh zvířat, vehikulum, způsob podání, tkáň a počet podání dávek;

d. byly podány přímé či nepřímé důkazy o expozici cílové tkáně (tkání) nebo o toxicitě pro cílovou tkáň (tkáně).

Zkoušená chemická látka je pak považována za látku nevyvolávající poškození vláken DNA v tkáních zkoumaných v tomto zkušebním systému.

Ověření jasně pozitivního či jasně negativního účinku není nutné.

V případě, že účinek není jasně negativní ani jasně pozitivní (tj. ne všechna kritéria uvedená v odstavcích 59 nebo 60 jsou splněna) a aby se napomohlo stanovení biologického významu výsledku, měly by být údaje vyhodnoceny na základě odborného posudku a/nebo by měl být provedeno další šetření, pokud je to vědecky odůvodněné. Užitečné by mohlo být hodnocení dalších buněk (je-li vhodné) nebo provedení opakovaného experimentu, případně za optimalizovaných zkušebních podmínek (např. intervaly koncentrací, jiné způsoby podávání dávek, jiné doby odběru vzorků nebo jiné tkáně).

Ve vzácných případech ani po dalším šetření nebude možné na základě daného souboru údajů dospět k závěru o pozitivitě či negativitě výsledku, a bude proto učiněn závěr, že výsledek je neurčitý.

▼M7

Ke zhodnocení biologického významu pozitivního nebo neurčitého výsledku jsou nutné informace o cytotoxicitě na cílovou tkáň (viz odstavce 54–55). V případě, že jsou pozitivní nebo neurčitá zjištění pozorována pouze za přítomnosti zjevných důkazů cytotoxicity, měla by být studie vyhodnocena jako neurčitá z hlediska genotoxicity, pokud neexistuje dostatek informací podporujících jednoznačný závěr. V případě negativního výsledku studie, kdy existují známky toxicity při všech zkoušených dávkách, lze doporučit další studii při netoxických dávkách.

Závěrečná zpráva

Závěrečná zpráva by měla obsahovat tyto informace:

Zkoušená chemická látka:

— zdroj, číslo šarže, je-li k dispozici,

— stabilita zkoušené chemické látky, datum použitelnosti nebo datum opětovné analýzy, je-li známo,

Jednosložková látka:

— fyzický vzhled, rozpustnost ve vodě a další důležité fyzikálně-chemické vlastnosti,

— chemická identifikace, jako např. název IUPAC nebo CAS, číslo CAS, kód SMILES nebo InChI, strukturní vzorec, čistota, případně chemická identita nečistot, je-li to prakticky proveditelné, atd.

Vícesložková látka, UVCB a směsi:

— charakterizovaná v co možná největší míře chemickou identitou (viz výše), kvantitativním výskytem a důležitými fyzikálně-chemickými vlastnostmi složek.

Rozpouštědlo/vehikulum:

— zdůvodnění volby rozpouštědla/vehikula,

— rozpustnost a stabilita zkoušené chemické látky v rozpouštědle/vehikulu, je-li známa,

— příprava aplikačních forem,

— analytická stanovení aplikační formy (např. stabilita, homogenita, nominální koncentrace).

Pokusná zvířata:

— použitý druh/kmen a vědecké a etické odůvodnění výběru,

— počet, stáří a pohlaví zvířat,

— původ, podmínky chovu, strava, obohacení atd.,

— individuální hmotnost zvířat na počátku a na konci zkoušky, včetně rozpětí tělesné hmotnosti, střední hodnoty a směrodatné odchylky pro každou skupinu.

Zkušební podmínky:

— údaje o pozitivní a negativní (vehikulum/rozpouštědlo) kontrole,

▼M7

— údaje ze studie pro zjištění rozsahu dávek (pokud byla provedena),

— zdůvodnění zvolených úrovní dávek,

— podrobnosti o přípravě zkoušené chemické látky,

— podrobné údaje o podávání zkoušené chemické látky,

— zdůvodnění způsobu podávání,

— místo injekce (při subkutánních nebo nitrožilních studiích),

— metody přípravy vzorků, případně histopatologické analýzy, zejména u chemických látek vyvolávajících pozitivní kometovou odezvu,

— zdůvodnění výběru tkáně,

— metody ověřování, zda se zkoušená chemická látka dostala k cílové tkáni, nebo ověřování obecné cirkulace, pokud byly získány negativní výsledky,

— skutečná dávka (v mg na kg tělesné hmotnosti za den) vypočtená z koncentrace zkoušené chemické látky v potravě / pitné vodě (v ppm) a případně ze spotřeby,

— podrobné údaje o kvalitě krmiva a vody,

— podrobný popis harmonogramů aplikace a odběru vzorků a odůvodnění výběru konkrétního schématu (např. toxikokinetické údaje, jsou-li k dispozici),

— metoda tišení bolesti, analgeze,

— způsob utracení,

— postupy izolace a uchovávání tkání,

— metody přípravy jednobuněčné/jednojaderné suspenze,

— zdroj a čísla šarží všech reakčních činidel (pokud možno),

— metody hodnocení cytotoxicity,

— podmínky elektroforézy,

— použité postupy barvení a

— metody hodnocení a měření komet.

Výsledky:

— všeobecná klinická pozorování každého zvířete, pokud byla prováděna, před zkouškou a v jejím průběhu,

— důkazy cytotoxicity, pokud byla zkoumána,

▼M7

— u studií trvajících déle než jeden týden: tělesné hmotnosti jednotlivých zvířat během studie, včetně rozpětí tělesné hmotnosti, střední hodnoty a směrodatné odchylky pro každou skupinu; spotřeba potravy,

— vztah dávka-účinek, pokud je zřejmý,

— u každé tkáně/zvířete, procentuální zastoupení DNA v ohonu (nebo jiná měřítka, pokud byla zvolena) a střední hodnoty pro každý preparát, střední hodnoty pro každé zvíře a střední hodnoty za skupinu,

— údaje o provedených negativních kontrolách a historické údaje negativních kontrol s rozpětími, středními/mediánovými hodnotami a směrodatnými odchylkami pro každou hodnocenou tkáň,

— údaje o provedených pozitivních kontrolách a historické údaje pozitivních skupin,

— u jiných tkání než jater křivka dávka-účinek na základě pozitivní kontroly. Křivka může být vynesena z údajů shromážděných během prokazování způsobilosti (viz odstavce 16–17) a mělo by k ní být připojeno zdůvodnění vhodnosti rozsahu a rozptylu odezev dané tkáně na kontrolní látku, s odkazy na existující literaturu,

— použité statistické analýzy a metody; a kritéria pro hodnocení odezvy jako pozitivní, negativní nebo neurčité,

— četnost výskytu buněk „hedgehogs“ v každé skupině a u každého zvířete.

Diskuse o výsledcích

Závěr

Odkazy

LITERATURA

1) Kirkland, D., G. Speit (2008), Evaluation of the ability of a battery of three *in vitro* genotoxicity tests to discriminate rodent carcinogens and non-carcinogens III. Appropriate follow-up testing *in vivo*, *Mutation Research*, Vol. 654/2, s. 114–32.

2) Brendler-Schwaab, S. *et al*. (2005), The *in vivo* Comet assay: use and status in genotoxicity testing, *Mutagenesis*, Vol. 20/4, s. 245–54.

3) Burlinson, B. *et al*. (2007), Fourth International Workgroup on Genotoxicity Testing: result of the *in vivo* Comet assay workgroup, *Mutation Research*, Vol. 627/1, s. 31–5.

4) Burlinson, B. (2012), The *in vitro* and *in vivo* Comet assays, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 817, s. 143–63.

5) Smith, C.C. *et al*. (2008), Recommendations for design of the rat Comet assay, *Mutagenesis*, Vol. 23/3, s. 233–40.

6) Hartmann, A. *et al*. (2003), Recommendations for conducting the *in vivo* alkaline Comet assay, *Mutagenesis*, Vol. 18/1, s. 45–51.

7) McKelvey-Martin, V.J. *et al*. (1993), The single cell gel electrophoresis assay (Comet assay): a European review, *Mutation Research*, Vol. 288/1, s. 47–63.

8) Tice, R.R. *et al*. (2000), Single cell gel/Comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 35/3, s. 206–21.

▼M7

9) Singh, N.P. *et al*. (1988), A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells, *Experimental Cell Research*, Vol. 175/1, s. 184–91.

10) Rothfuss, A. *et al*. (2010), Collaborative study on fifteen compounds in the rat-liver Comet assay integrated into 2- and 4-week repeat-dose studies, *Mutation Research*, Vol., 702/1, s. 40–69.

11) OECD (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, No. 234, OECD, Paris.

12) OECD (2014), Reports of the JaCVAM initiative international pre-validation and validation studies of the in vivo rodent alkaline comet assay for the detection of genotoxic carcinogens, Series on Testing and Assessment, Nos. 195 and 196, OECD Publishing, Paris.

13) Olive, P.L., J.P. Banath, R.E. Durand (1990), Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells using the „Comet“ assay, *Radiation Research*, Vol. 122/1, s. 86–94.

14) Tice, R.R., G.H. Strauss (1995), The single cell gel electrophoresis/Comet assay: a potential tool for detecting radiation-induced DNA damage in humans, *Stem Cells*, Vol. 13/1, s. 207–14.

15) Collins, A.R (2004), The Comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations, *Molecular Biotechnology*, Vol. 26/3, s. 249–61.

16) Rothfuss, A. *et al*. (2011), Improvement of *in vivo* genotoxicity assessment: combination of acute tests and integration into standard toxicity testing, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 723/2, s. 108–20.

17) Kushwaha, S. *et al*. (2010), Evaluation of multi-organ DNA damage by Comet assay from 28 days repeated dose oral toxicity test in mice: A practical approach for test integration in regulatory toxicity testing, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, Vol. 58/1, s. 145–54.

18) Vasquez, M.Z. (2010), Combining the *in vivo* Comet and micronucleus assays: a practical approach to genotoxicity testing and data interpretation, *Mutagenesis*, Vol. 25/2, s. 187–99.

19) Bowen, D.E. (2011), Evaluation of a multi-endpoint assay in rats, combining the bone-marrow micronucleus test, the Comet assay and the flow-cytometric peripheral blood micronucleus test, *Mutation Research*, Vol. 722/1, s. 7–19.

20) Recio, L. *et al*. (2010), Dose-response assessment of four genotoxic chemicals in a combined mouse and rat micronucleus (MN) and Comet assay protocol, *The Journal of Toxicological Science*, Vol. 35/2, s. 149–62.

21) O'Donovan, M., B. Burlinson (2013), Maximum dose levels for the rodent comet assay to examine damage at the site of contact or to the gastrointestinal tract, *Mutagenesis*, Vol. 28/6, s. 621–3.

22) Hartmann, A. (2004), Use of the alkaline *in vivo* Comet assay for mechanistic genotoxicity investigations, *Mutagenesis*, Vol. 19/1, s. 51–9.

23) Nesslany, F. (2007), *In vivo* Comet assay on isolated kidney cells to distinguish genotoxic carcinogens from epigenetic carcinogens or cytotoxic compounds, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 630/1, s. 28–41.

24) Brendler-Schwaab, S.Y., B.A. Herbold (1997), A new method for the enrichment of single renal proximal tubular cells and their first use in the Comet assay, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 393/1-2, s. 175–8.

▼**M7**

25) Toyoizumi, T. *et al*. (2011), Use of the *in vivo* skin Comet assay to evaluate the DNA-damaging potential of chemicals applied to the skin, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 726/2, s. 175–80.

26) Struwe, M. *et al*. (2008), Detection of photogenotoxicity in skin and eye in rat with the photo Comet assay, *Photochemical and Photobiological Sciences*, Vol. 7/2, s. 240–9.

27) Wada, K. *et al*. (2012), A comparison of cell-collecting methods for the Comet assay in urinary bladders of rats, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 742/1-2, s. 26–30.

28) Wang, A. *et al*. (2007), Measurement of DNA damage in rat urinary bladder transitional cells: improved selective harvest of transitional cells and detailed Comet assay protocols, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 634/ 1-2, s. 51–9.

29) Burlinson, B. *et al*. (2007), *In Vivo* Comet Assay Workgroup, part of the Fourth International Workgroup on Genotoxicity Testing. Fourth International Workgroup on Genotoxicity testing: results of the *in vivo* Comet assay workgroup, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 627/1, s. 31–5.

30) Jackson, P. *et al*. (2012), Pulmonary exposure to carbon black by inhalation or instillation in pregnant mice: effects on liver DNA strand breaks in dams and offspring, *Nanotoxicology*, Vol. 6/5, s. 486–500.

31) Sasaki, Y.F. *et al*. (2000), The comet assay with multiple mouse organs: comparison of Comet assay results and carcinogenicity with 208 chemicals selected from the IARC monographs and U.S. NTP Carcinogenicity Database, *Critical Reviews in Toxicology*, Vol. 30/6, s. 629–799.

32) Sekihashi, K. *et al*. (2002), Comparative investigations of multiple organs of mice and rats in the Comet assay, *Mutation Research*, Vol. 517/1-2, s. 53–74.

33) Speit, G, M. Vasquez, A. Hartmann (2009), The comet assay as an indicator test for germ cell genotoxicity, *Mutation Research*, Vol. 681/1, s. 3–12.

34) Zheng, H., P.L. Olive (1997), Influence of oxygen on radiation-induced DNA damage in testicular cells of C3H mice, *International Journal of Radiation Biology*, Vol. 71/3, s. 275–282.

35) Cordelli, E. *et al*. (2003), Evaluation of DNA damage in different stages of mouse spermatogenesis after testicular X irradiation, *Journal of Radiation Research*, Vol. 160/4, s. 443–451.

36) Merk, O., G. Speit (1999), Detection of crosslinks with the Comet assay in relationship to genotoxicity and cytotoxicity, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 33/2, s. 167–72.

37) Pfuhler, S., H.U. Wolf (1996), Detection of DNA-crosslinking agents with the alkaline Comet assay, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 27/3, s. 196–201.

38) Wu, J.H., N.J. Jones (2012), Assessment of DNA interstrand crosslinks using the modified alkaline Comet assay, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 817, s. 165–81.

39) Spanswick, V.J., J.M. Hartley, J.A. Hartley (2010), Measurement of DNA interstrand crosslinking in individual cells using the Single Cell Gel Electrophoresis (Comet) assay, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 613, s. 267–282.

▼**M7**

40) Kumaravel, T.S., A.N. Jha (2006), Reliable Comet assay measurements for detecting DNA damage induced by ionizing radiation and chemicals, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 605(1-2), s. 7–16.

41) Burlinson, B. *et al*. (2007), Fourth International Workgroup on Genotoxicity Testing: result of the *in vivo* Comet assay workgroup, *Mutation Research*, Vol.627/1, s. 31–5.

42) Kumaravel, T.S. *et al*. (2009), Comet Assay measurements: a perspective, *Cell Biology and Toxicology*, Vol. 25/1, s. 53–64.

43) Ersson, C., L. Möller (2011), The effects on DNA migration of altering parameters in the Comet assay protocol such as agarose density, electrophoresis conditions and durations of the enzyme or the alkaline treatments, *Mutagenesis*, Vol. 26/6, s. 689–95.

44) Møller, P. *et al*. (2010), Assessment and reduction of Comet assay variation in relation to DNA damage: studies from the European Comet Assay Validation Group, *Mutagenesis*, Vol. 25/2, s. 109–11.

45) Forchhammer, L. *et al*. (2010), Variation in the measurement of DNA damage by Comet assay measured by the ECVAG inter-laboratory validation trial, *Mutagenesis*, Vol. 25/2, s. 113–23.

46) Azqueta, A. *et al*. (2011), Towards a more reliable comet assay: Optimising agarose concentration, unwinding time and electrophoresis conditions, *Mutation Research*, Vol. 724/1-2, s. 41–45.

47) Hayashi, M. *et al*. (2011), Compilation and use of genetic toxicity historical control data, *Mutation Research*, Vol. 723/2, s. 87–90.

48) Ryan, T. P. (2000), *Statistical Methods for Quality Improvement,* John Wiley and Sons, New York 2nd ed.

49) Appendix A of the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes (Dodatek A Evropské úmluvy o ochraně obratlovců používaných pro pokusné a jiné vědecké účely) (ETS No. 123)

50) Kapitola B.8 této přílohy: *Subakutní inhalační toxicita: 28denní studie*.

51) Kapitola B.29 této přílohy: *Subchronická inhalační toxicita: 90denní studie*.

52) Blakey, D.H., G.R. Douglas (1984), Transient DNA lesions induced by benzo[a]pyrene in Chinese hamster ovary cells, *Mutation Research*, Vol. 140/2-3, s. 141–45.

53) Blakey, D.H., G.R. Douglas (1990), The role of excision repair in the removal of transient benzo[a]pyrene-induced DNA lesions in Chinese hamster ovary cells, *Mutation Research*, Vol. 236/1, s. 35–41.

54) OECD (2002), „Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation“, OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, No. 19, OECD Publishing, Paris.

55) Nakajima, M. (2012), Tissue sample preparation for *in vivo* rodent alkaline Comet assay, *Genes and Environment*, Vol. 34/1, s. 50–4.

56) Hartmann, A. *et al*. (2003), Recommendations for conducting the *in vivo* alkaline Comet assay, *Mutagenesis*, Vol.18/1, s.45–51.

57) Atlas of Comet Assay Images, Scientist Press Co., Ltd., Tokyo, Japan.

58) Lovell, D.P., G. Thomas, R. Dubow (1999), Issues related to the experimental design and subsequent statistical analysis of *in vivo* and *in vitro* Comet studies, *Teratogenesis Carcinogenesis Mutagenesis*, Vol. 19/2, s. 109–19.

▼**M7**

59) Wiklund, S.J., E. Agurell (2003), Aspects of design and statistical analysis in the Comet assay, *Mutagenesis*, Vol. 18/2, s. 167–75.

60) Bright, J. *et al*. (2011), Recommendations on the statistical analysis of the Comet assay, *Pharmaceutical Statistics*, Vol. 10/6, s. 485–93.

61) Lovell, D.P., T. Omori (2008), Statistical issues in the use of the Comet assay, *Mutagenesis*, Vol. 23/3, s. 171–82.

▼M7

Dodatek 1

DEFINICE

Alkalická jednobuněčná gelová elektroforéza: citlivá metoda detekce primárního poškození DNA na úrovni jednotlivé buňky/jádra.

Chemická látka: chemická substance nebo směs.

Kometa: tvar, který nabývají nukleoidy poté, co jsou vystaveny jednomu elektroforéznímu poli, vzhledem k podobnosti kometám: hlavou je jádro a ohon tvoří DNA migrující z jádra ven v elektrickém poli.

Kritická proměnná / kritický parametr: je to proměnná protokolu, jejíž malá změna může mít velký dopad na závěry zkoušky. Kritické proměnné mohou být u různých tkání různé. Kritické proměnné by neměly být měněny, zejména v průběhu zkoušky, aniž by se zvážilo, jak může změna změnit odezvu ve zkoušce vyjádřenou například velikostí a variabilitou v pozitivních a negativních kontrolách. V závěrečné zprávě by měly být uvedeny změny kritických proměnných provedené během zkoušky nebo ve srovnání se standardním protokolem dané laboratoře a každá změna by měla být odůvodněna.

Intenzita ohonu nebo procentuální zastoupení DNA v ohonu: odpovídá intenzitě ohonu komety v poměru k celkové intenzitě (hlavy plus ohonu). Zohledňuje množství zlomů DNA vyjádřené v procentech.

Zkoušená chemická látka: Jakákoli chemická substance nebo směs zkoušená touto zkušební metodou.

UVCB: látky s neznámým nebo proměnlivým složením, komplexní reakční produkty nebo biologický materiál.

▼M7

Dodatek 2

FAKTORIÁLNÍ POKUS KE ZJIŠTĚNÍ ROZDÍLŮ MEZI POHLAVÍMI V KOMETOVÉM TESTU *IN VIVO*

Faktoriální pokus a jeho analýza

Při tomto pokusu se na každé úrovni koncentrace testuje minimálně 5 samců a 5 samic a výsledkem je uspořádání s použitím minimálně 40 zvířat (20 samců a 20 samic plus příslušné pozitivní kontroly).

Tento pokus, který je jedním z nejjednodušších faktoriálních pokusů, je rovnocenný dvoucestné analýze rozptylu, přičemž hlavními efekty jsou úroveň koncentrace a pohlaví. Údaje je možné analyzovat pomocí mnoha standardních statistických počítačových programů, např. SPSS, SAS, STATA, Genstat a také pomocí programu R.

Analýza dělí variabilitu v souboru údajů na variabilitu mezi pohlavími, variabilitu mezi úrovněmi koncentrace a variabilitu interakce mezi pohlavími a koncentracemi. Každý z těchto znaků se testuje ve srovnání s odhadem variability mezi paralelními zvířaty v rámci skupin zvířat stejného pohlaví, kterým je podávána stejná koncentrace látky. Veškeré podrobnosti příslušné metodiky jsou dostupné v mnoha běžných učebnicích statistiky (viz odkazy) a v příručkách ke statistickým programům.

Analýza se provádí zkoumáním znaku interakce pohlaví x koncentrace v tabulce ANOVA ([1]). Neexistuje-li význačný znak interakce, kombinované hodnoty za obě pohlaví nebo za všechny úrovně koncentrace poskytují validní statistické testy variability mezi úrovněmi založené na zkoumání kumulovaného znaku vnitroskupinové variability pomocí analýzy ANOVA.

Analýza pokračuje rozdělením odhadu variability mezi koncentracemi na kontrasty, což vede k testování lineárních a kvadratických kontrastů odezev na všech úrovních koncentrace. Pokud existuje významná interakce pohlaví x koncentrace, lze tento znak také rozdělit na kontrasty interakce lineární x pohlaví a kvadratický x pohlaví. Pomocí těchto členů se testuje, zda jsou odpovědi na koncentraci u obou pohlaví paralelní, nebo zda je odpověď u každého pohlaví odlišná.

Odhad kumulované vnitroskupinové variability může být použit k párovému testování rozdílu mezi středními hodnotami. Tato srovnání by mohla být provedena mezi středními hodnotami u obou pohlaví a mezi středními hodnotami u různých úrovní koncentrace, např. za účelem porovnání s úrovněmi negativní skupiny. V případech, kdy existuje významná interakce, lze provádět srovnání mezi středními hodnotami při různých koncentracích v rámci jednotlivých pohlaví nebo mezi středními hodnotami každého pohlaví při stejné koncentraci.

Odkazy

Existuje množství učebnic statistiky, které se zabývají teorií, uspořádáním, metodikou, analýzou a interpretací faktoriálních pokusů od nejjednodušších dvoufaktorových analýz až po složitější formy používané v metodice experimentálního uspořádání. Následující seznam není úplný. V některých pracích jsou uvedeny vypracované příklady srovnatelných uspořádání, v některých případech i s kódem pro provádění analýz pomocí různých počítačových programů.

([1]) Statistikové, kteří používají metodu modelování, např. s použitím obecných lineárních modelů (GLM), mohou k této analýze přistupovat různým, byť srovnatelným způsobem, ale nebudou nutně odvozovat tradiční tabulku ANOVA, která se datuje zpět k algoritmickým metodám výpočtu statistických údajů vyvinutým před érou počítačů.

▼**M7**

1) Box, G.E.P, Hunter, W.G. and Hunter, J.S. (1978). Statistics for Experimenters. An Introduction to Design, Data Analysis, and Model Building. New York: John Wiley & Sons.

2) Box G.E.P. & Draper, N.R. (1987) Empirical model-building and response surfaces. John Wiley & Sons Inc.

3) Doncaster, C.P. & Davey, A.J.H. (2007) Analysis of Variance and Covariance: How to choose and Construct Models for the Life Sciences. Cambridge University Press.

4) Mead, R. (1990) The Design of Experiments. Statistical principles for practical application. Cambridge University Press.

5) Montgomery D.C. (1997) Design and Analysis of Experiments. John Wiley & Sons Inc.

6) Winer, B.J. (1971) Statistical Principles in Experimental Design. McGraw Hill.

7) Wu, C.F.J & Hamada, M.S. (2009) Experiments: Planning, Analysis and Optimization. John Wiley & Sons Inc.

▼M7

Dodatek 3

OMEZENÍ ZKOUŠKY V SOUČASNOSTI

Za současného stavu poznání jsou s kometovým testem *in vivo* spojena i některá omezení. Očekává se, že tato omezení budou redukována nebo úžeji definována, jakmile bude k dispozici více zkušeností s použitím zkoušky, které umožní řešit příslušné bezpečnostní otázky v právních předpisech.

1. Některé druhy poškození DNA mohou být krátkodobé, tj. mohou být napraveny mnohem rychleji, než je možné zaznamenat po uplynutí 24 hodin nebo ještě později po poslední dávce. Nebyl zjištěn žádný seznam druhů krátkodobého poškození ani chemických látek, které by pravděpodobně mohly tento druh poškození vyvolávat, a není ani známo, v jakém časovém intervalu lze tento druh poškození detekovat. Optimální doba (doby) pro odběr vzorků může (mohou) také záviset na chemické látce a na způsobu podávání dávky a doba odběru vzorků by měla být stanovena na základě kinetických údajů (například čas T_{max}, ve kterém je dosažena nejvyšší koncentrace plazmy nebo tkáně), pokud jsou takové údaje k dispozici. Většina validačních studií, které tuto zkušební metodu podpořily, stanovila provedení pitvy na dobu 2 nebo 3 hodiny po podání poslední dávky. Většina studií v publikované literatuře popisuje podání poslední dávky mezi 2 a 6 hodinami před usmrcením. Na základě těchto zkušeností se proto v této zkušební metodě doporučuje, aby – neexistují-li údaje, které by mohly nasvědčovat jiné době – byla poslední dávka podávána ve stanoveném čase 2 až 6 hodin před pitvou.

2. Nebyly zjištěny žádné experimentální údaje, které by zkoumaly citlivost tohoto testu při detekování krátkodobých poškození DNA po podávání potravy nebo pitné vody ve srovnání s podáváním žaludeční sondou. Byla zjištěna poškození DNA po podávání potravy a pitné vody, ale takových zpráv je poměrně málo v porovnání s mnohem většími zkušenostmi s podáváním žaludeční sondou a injekcí. Může tak být snížená citlivost zkoušky v případě chemických látek, které vyvolávají krátkodobá poškození a jsou podávány v potravě nebo s pitnou vodou.

3. Nebyly provedeny mezilaboratorní zkoušky s jinými tkáněmi než s játry a se žaludkem, a proto nebylo vydáno doporučení, např. ve formě předpokládaných rozpětí v rámci pozitivních a negativních kontrol, jak dosáhnout citlivé a reprodukovatelné odezvy v jiných tkáních než v játrech. Ani u jater však nebylo dosaženo shody, pokud jde o stanovení nižšího limitu pro hodnotu negativní kontroly.

4. Existuje několik publikací, jež prokazují zkreslující účinek cytotoxicity *in vitro*, avšak bylo publikováno velmi málo údajů získaných *in vivo*, a proto nemohlo být doporučeno žádné jediné měřítko cytotoxity. S nárůsty migrace DNA byly spojovány histopatologické změny jako zánět, infiltrace buněk, apoptotické nebo nekrotické změny, avšak jak prokázal validační experiment JaCVAM (OECD, 2014), tyto změny nevedly vždy k pozitivním nálezům v kometovém testu, a tudíž není k dispozici žádný konečný seznam histopatologických změn, které by byly vždy spojeny se zvýšenou migrací DNA. Jako ukazatel cytotoxicity byly dříve navrženy buňky zvané „hedgehogs“ (nebo „clouds“, „ghost cells“), avšak etiologie „hedgehogs“ není známa. Existují údaje, jež nasvědčují tomu, že mohou vznikat v důsledku cytotoxicity související s chemickou látkou, mechanicky/enzymaticky vyvolaného poškození vzniklého při přípravě vzorku (Guerard *et al*., 2014) a/nebo extrémnějšího účinku genotoxicity zkoušené chemické látky. Jiné údaje, zdá se, ukazují na to, že jsou důsledkem rozsáhlého, ale snad napravitelného poškození DNA (Lorenzo *et al*., 2013).

▼M7

5. Tkáně nebo buněčná jádra byly úspěšně zmrazeny pro pozdější analýzu. To obvykle vede k měřitelnému účinku na odezvu vůči vehikulu a pozitivní kontrolní látce (Recio *et al.,* 2010; Recio *et al.*, 2012; Jackson *et al.*, 2013). Je-li tento postup použit, laboratoř by měla prokázat schopnost používat mrazicí metody a potvrdit přijatelná nízká rozpětí procentuálního zastoupení DNA v ohonu v cílových tkáních zvířat ošetřených vehikulem i to, že přesto mohou být detekovány pozitivní odezvy. V literatuře bylo popsáno zmrazení tkání pomocí různých metod. V současnosti však neexistuje shoda ohledně toho, jak nejlépe tkáně zmrazovat a rozmrazovat a jak posoudit, zda potenciálně změněná odezva může ovlivnit citlivost zkoušky.

6. Práce z poslední doby prokazují, že seznam kritických proměnných se podle všeho bude dále zužovat a parametry kritických proměnných zpřesňovat (Guerard *et al*., 2014).

Odkazy

1) Guerard, M., C. Marchand, U. Plappert-Helbig (2014), Influence of Experimental Conditions on Data Variability in the Liver Comet Assay, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 55/2, s. 114–21.

2) Jackson, P. *et al*. (2013), Validation of use of frozen tissues in high-throughput comet assay with fully-automatic scoring, *Mutagenesis*, Vol. 28/6, s. 699–707.

3) Lorenzo Y. *et al*. (2013), The comet assay, DNA damage, DNA repair and cytotoxicity: hedgehogs are not always dead, *Mutagenesis*, Vol. 28/4, s. 427–32.

4) OECD (2014), Reports of the JaCVAM initiative international pre-validation and validation studies of the in vivo rodent alkaline comet assay for the detection of genotoxic carcinogens, Series on Testing and Assessment, Nos. 195 and 196, OECD Publishing, Paris.

5) Recio L, Hobbs C, Caspary W, Witt KL, (2010), Dose-response assessment of four genotoxic chemicals in a combined mouse and rat micronucleus (MN) and Comet assay protocol, *J. Toxicol. Sci.* 35:149–62.

6) Recio, L. *et al*. (2012), Comparison of Comet assay dose-response for ethyl methanesulfonate using freshly prepared versus cryopreserved tissues, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 53/2, pp. 101–13.

▼**M8**

B.63 **SCREENINGOVÁ ZKOUŠKA NA REPRODUKČNÍ/VÝVOJOVOU TOXICITU**

ÚVOD

1. Tato zkušební metoda je rovnocenná Pokynu OECD pro zkoušení (TG) č. 421 (2016). Pokyny OECD pro zkoušení chemických látek se pravidelně přezkoumávají s ohledem na vědecký pokrok. Pokyn č. 421 k původní screeningové zkoušce byl přijat v roce 1995 na základě protokolu pro „Předběžnou screeningovou zkoušku na reprodukční toxicitu“ projednaného na dvou zasedáních odborníků, a to v Londýně v roce 1990 (1) a v Tokiu v roce 1992 (2).

2. Tato zkušební metoda byla aktualizována o příslušné sledované vlastnosti pro endokrinní disruptory v návaznosti na činnost s vysokou prioritou, kterou organizace OECD zahájila v roce 1998 a která byla zaměřena na revizi stávajících pokynů ke zkoušení a vypracování nových pokynů pro zjišťování a zkoušení látek, které mohou narušovat činnost endokrinních žláz (3). Například do Pokynu OECD pro zkoušení č. 407 (Studie orální toxicity u hlodavců – 28denní opakovaná aplikace, kapitola B.7 této přílohy) byly v roce 2008 doplněny parametry vhodné k detekci endokrinního působení zkoušených chemických látek. Cílem aktualizace pokynu č. 421 bylo zahrnout do pokynu ke screeningové zkoušce některé relevantní sledované vlastnosti týkající se endokrinních disruptorů, pokud doby expozice zahrnují některá citlivá období v průběhu vývoje (prenatální nebo časně postnatální období).

3. Na základě studie proveditelnosti řešící vědecké a technické otázky spojené se zahrnutím relevantních sledovaných vlastností, jakož i možných úprav plánu zkoušky potřebných pro jejich zahrnutí (4) byly do pokynu č. 421 přidány vybrané další relevantní sledované vlastnosti související s endokrinními disruptory, které jsou rovněž součástí pokynu pro zkoušení č. 443 (Rozšířená jednogenerační studie toxicity pro reprodukci, kapitola B.56 této přílohy).

4. Tato zkušební metoda je určena pro získání omezeného množství informací týkajících se účinků zkoušené chemické látky na reprodukční výkonnost samců a samic, jako jsou funkce pohlavních žláz, chování při páření, početí, vývoj zárodku a vrh. Není alternativou pro stávající zkušební metody B.31, B.34, B.35 nebo B.56 a ani je nahrazuje.

VÝCHOZÍ ÚVAHY

5. Tuto screeningovou zkušební metodu lze použít na získání prvních informací o možných účincích na reprodukci anebo vývoj, a to v rané fázi posuzování toxikologických vlastností chemických látek, nebo informací o chemických látkách, které jsou předmětem zájmu. Rovněž může být použita jako součást sady úvodních screeningových zkoušek u stávajících chemických látek, o nichž nejsou k dispozici žádné nebo jen omezené toxikologické informace, jako studie ke stanovení dávkování pro rozsáhlejší reprodukční/vývojové studie, nebo když je to jinak považováno za relevantní. Při realizaci studie by měly být respektovány hlavní zásady a aspekty stanovené v pokynu OECD č. 19 o uznávání, posuzování a používání klinických příznaků jako humánních sledovaných vlastností pro pokusná zvířata používaná při hodnocení bezpečnosti (5).

▼M8

6. Tato zkušební metoda neposkytuje úplné informace o všech aspektech reprodukce a vývoje. Konkrétně nabízí jen omezené prostředky zjištění postnatálních projevů prenatální expozice nebo účinků, které mohou být vyvolány v průběhu postnatální expozice. Vzhledem (mimo jiné) k relativně malému počtu zvířat ve skupinách dávkování, selektivitě sledovaných vlastností a krátké době trvání studie neposkytuje tato metoda důkaz pro definitivní tvrzení, že nedochází k žádným účinkům. Navíc, pokud neexistují údaje z jiných zkoušek reprodukční/vývojové toxicity, jsou pozitivní výsledky užitečné pro první posouzení rizika a přispívají k rozhodnutím ohledně nezbytnosti a načasování dalších zkoušek.

7. Výsledky získané pro parametry související s endokrinním působením by se měly interpretovat v kontextu „koncepčního rámce OECD pro zkoušky a hodnocení chemických látek způsobujících endokrinní poruchy“ (6). V tomto koncepčním rámci je vylepšený Pokdyn OECD pro zkoušení č. 421 zařazena na úroveň 4 jako zkouška *in vivo* poskytující údaje o nežádoucích účincích na relevantní endokrinní sledované vlastnosti. Endokrinní signál sám o sobě však nemusí být považován za dostatečný důkaz, že zkoušená chemická látka je endokrinním disruptorem.

8. Tato zkušební metoda předpokládá orální aplikaci zkoušené chemické látky. Pokud jsou použity jiné cesty expozice, bude zřejmě nutné provést úpravy.

9. Před použitím této zkušební metody ke zkoušení směsi s cílem získat údaje pro zamýšlený regulační účel by mělo být zváženo, zda tato metoda může pro tento účel poskytnout odpovídající výsledky, a pokud ano, proč tomu tak je. Takové úvahy nejsou nutné, pokud existuje právní požadavek na zkoušení dané směsi.

10. Použité definice jsou uvedeny v dodatku 1.

PRINCIP ZKOUŠKY

11. Zkoušená chemická látka se podává v odstupňovaných dávkách několika skupinám samců a samic. Samcům se podává dávka minimálně čtyři týdny včetně dne před plánovaným usmrcením (zahrnuje to minimálně dva týdny před pářením, v průběhu období páření a přibližně dva týdny po páření). Vzhledem k omezené době podávání před pářením u samců nemusí být fertilita zvláště citlivým ukazatelem toxicity pro varlata. Proto je velmi důležité provést podrobné histologické vyšetření varlat. Kombinace dvoutýdenní doby podávání před pářením a následné pozorování páření/fertility s celkovou dobou podávání alespoň čtyři týdny, po níž následuje podrobná histopatologie samčích gonád, se považuje za dostatečnou ke zjištění většiny účinků na fertilitu a spermatogenezi u samců.

12. Samicím je třeba podávat zkoušenou chemickou látku po celou dobu studie. Zahrnuje to dva týdny před pářením (s cílem pokrýt alespoň dva celé estrální cykly), variabilní dobu do početí, dobu březosti a alespoň třináct dnů po porodu, a to včetně dne před plánovaným usmrcením.

13. Délka studie následující po aklimatizaci a zhodnocení estrálního cyklu před zahájením podávání závisí na výkonnosti samice a činí přibližně 63 dnů [alespoň 14 dnů před pářením, (maximálně) 14 dnů páření, 22 dnů gestace, 13 dnů laktace].

▼M8

14. V průběhu období podávání se zvířata každý den pečlivě pozorují, aby se zjistily příznaky toxicity. Zvířata, která v průběhu doby zkoušky uhynula nebo byla utracena, se pitvají a na konci zkoušky se přeživší zvířata utratí a rovněž pitvají.

POPIS METODY

Výběr zvířecích druhů

15. Tato zkušební metoda je určena k použití s potkany. Jestliže se parametry uvedené v této zkušební metodě zkoumají u jiných druhů hlodavců, mělo by se podat podrobné zdůvodnění. V mezinárodním validačním programu detekce endokrinních disruptorů pomocí Pokynu OECD pro zkoušení č. 407 (odpovídající kapitole B.7 této přílohy) byl jediným použitým druhem potkan. Není vhodné používat kmeny s nižší plodností nebo s typicky vysokým výskytem vývojových vad. Používají se zdravá, dosud nepřipuštěná zvířata ještě nepoužitá pro jiné experimenty. Pokusná zvířata by měla být plně charakterizována co do druhu, kmene, pohlaví, hmotnosti a věku. Na začátku studie by měly být odchylky hmotnosti zvířat minimální a neměly by překročit 20 % střední hodnoty pro každé pohlaví. Provádí-li se studie jako předběžná studie pro dlouhodobou nebo celogenerační studii, je vhodné použít v obou studiích nejlépe zvířata stejného kmene a stejného původu.

Umístění a krmení zvířat

16. Všechny postupy by měly splňovat místní standardy péče o laboratorní zvířata. Teplota v experimentálních zvířecích místnostech by měla být 22° C (± 3 °C). Ačkoli by relativní vlhkost vzduchu měla být minimálně 30 % a pokud možno nepřesáhnout 70 %, kromě doby úklidu místnosti, cílem by měla být hodnota 50–60 %. Osvětlení by mělo být umělé a mělo by se střídat 12 hodin světla a 12 hodin tmy. Ke krmení lze použít konvenční laboratorní krmivo s neomezeným přísunem pitné vody. Výběr potravy může být ovlivněn potřebou zajistit dostatečné promísení s testovanou látkou, je-li látka podávána touto cestou.

17. Zvířata by měla být chována v malých skupinách stejného pohlaví; je-li to z vědeckého hlediska důvodné, mohou být zvířata chována individuálně. Při chovu zvířat v klecích by v jedné kleci nemělo být umístěno více než pět zvířat. Páření by mělo probíhat v klecích, které jsou k tomuto účelu vhodné. Březí samice je třeba chovat v klecích jednotlivě a poskytnout jim materiál pro vytvoření hnízda. Samice v době laktace se chovají v klecích jednotlivě společně s potomky.

18. Krmivo by se mělo pravidelně analyzovat, aby se zjistila přítomnost kontaminantů. Vzorek stravy by se měl uchovávat až do dokončení zprávy.

Příprava zvířat

19. Zdravá mladá dospělá zvířata se náhodným výběrem rozdělí na kontrolní skupinu a skupinu, která se exponuje. Klece by měly být uspořádány tak, aby byl vliv umístění klecí minimalizován. Zvířata se jednoznačně identifikují a před započetím studie se nechají v laboratorních podmínkách alespoň pět dní aklimatizovat.

Příprava dávek

20. Není-li jiný způsob aplikace považován za vhodnější, doporučuje se orální podávání zkoušené chemické látky. Pokud je zvolena orální cesta, zkoušená chemická látka se obvykle podává žaludeční sondou; alternativně však lze zkoušené chemické látky podávat v potravě nebo v pitné vodě.

▼M8

21. Je-li to nutné, je zkoušená chemická látka rozpuštěna nebo suspendována ve vhodném vehikulu. Je-li to možné, doporučuje se zvážit jako první variantu použití vodného roztoku/suspenze, poté použití roztoku/emulze v oleji (např. v kukuřičném oleji) a nakonec eventuální použití roztoku jiného vehikula. U jiného typu vehikula, než je voda, je třeba znát jeho toxické charakteristiky. Měla by být určena stabilita a homogenita zkoušené chemické látky v daném vehikulu.

POSTUP

Počet a pohlaví zvířat

22. Doporučuje se, aby každá skupina měla zpočátku alespoň 10 samců a 12–13 samic. U samic se hodnotí před expozicí estrální cykly a zvířata, která nevykazují typické 4–5denní cykly, nebudou do studie zařazena; proto se doporučují náhradní samice, aby v každé skupině zůstalo 10 samic. S výjimkou případu výrazně toxických účinků se očekává, že v každé skupině bude alespoň 8 březích samic, což je obvykle minimální přijatelný počet březích samic na skupinu. Cílem je získat dostatečný počet březích samic a potomstva, a tím zajistit smysluplné hodnocení schopnosti zkoušené chemické látky ovlivnit plodnost, březost, chování samice a kojených mláďat a růst a vývoj potomstva generace F_1 od doby početí do 13. dne po porodu.

Dávkování

23. Obecně by měly být použity nejméně tři zkušební skupiny a kontrolní skupina. Úrovně dávek mohou vycházet z údajů ze zkoušek akutní toxicity nebo z výsledků studií po opakované dávce. S výjimkou podávání zkoušené chemické látky se se zvířaty v kontrolní skupině zachází stejně jako se zvířaty ve zkušební skupině. Používá-li se pro usnadnění aplikace zkoušené chemické látky vehikulum, podává se kontrolní skupině vehikulum v nejvyšším použitém objemu.

24. Při výběru úrovní dávek by se měly vzít v úvahu veškeré existující údaje o toxických a (toxiko)kinetických vlastnostech. Rovněž je třeba vzít v úvahu, že mohou existovat rozdíly v citlivosti mezi březími a nebřezími zvířaty. Nejvyšší úroveň dávky by se měla zvolit tak, aby vyvolala toxické účinky, ne však uhynutí nebo velké utrpení. Poté by se měla zvolit sestupná řada úrovní dávek, aby se prokázala odezva související s dávkou a nepřítomnost nepříznivých účinků (NOAEL) při nejnižší úrovni dávky. Pro nastavení sestupných úrovní dávek jsou obvykle optimální intervaly lišící se faktorem 2 až 4 a často je vhodnější přidání čtvrté zkušební skupiny než používání velkých intervalů mezi jednotlivými dávkami (např. lišících se faktorem vyšším než 10).

25. V přítomnosti pozorované obecné toxicity (např. snížená tělesná hmotnost, účinky na játra, srdce, plíce nebo ledviny atd.) nebo jiných změn, které nemusí být odezvou na toxicitu (např. snížený příjem krmiva, zvětšení jater), je třeba pozorované účinky na endokrinní citlivé sledované vlastnosti interpretovat obezřetně.

Limitní zkouška

26. Pokud orální studie s jednou úrovní dávky v množství alespoň 1 000 mg/kg tělesné hmotnosti a den nebo rovnocenné procento látky v potravě nebo pitné vodě při aplikaci dávky v potravě nebo pitné vodě pomocí postupů popsaných pro tuto studii nevyvolá žádnou zjistitelnou toxicitu, a pokud se neočekává ani toxicita na základě existujících údajů o strukturně příbuzných látkách, pak není nutné uvažovat o kompletní studii využívající několika úrovní dávek. Limitní zkouška se použije, pokud expozice u člověka nevyžaduje použít vyšší úroveň orální dávky. U dalších způsobů podávání látky, jako je inhalační nebo kožní aplikace, může být maximální dosažitelná úroveň koncentrace často dána fyzikálně-chemickými vlastnostmi zkoušených chemických látek.

▼M8

Podávání dávek

27. Zvířatům se denně podává zkoušená chemická látka po dobu sedmi dnů v rámci jednoho týdne. Pokud se zkoušená chemická látka podává nitrožaludečně, podává se zvířatům v jediné dávce za použití žaludeční sondy nebo vhodné intubační kanyly. Maximální objem tekutiny, kterou lze podat najednou, závisí na velikosti pokusného zvířete. Tento objem by neměl překročit 1 ml na 100 g tělesné hmotnosti, s výjimkou vodných roztoků, kde lze použít 2 ml na 100 g tělesné hmotnosti. S výjimkou dráždivých a žíravých zkoušených chemických látek, které obvykle při vyšších koncentracích vykazují zesílené účinky, by měla být variabilita zkušebního objemu minimalizována nastavením koncentrace zajišťující konstantní objem při všech úrovních dávky.

28. U zkoušených chemických látek podávaných v potravě nebo v pitné vodě je důležité zajistit, aby množství použité zkoušené chemické látky neovlivňovalo normální výživu nebo vodní rovnováhu. Podává-li se zkoušená chemická látka v krmivu, může se použít buď konstantní koncentrace (v ppm), nebo konstantní dávkování vzhledem k tělesné hmotnosti zvířete; použitá možnost by měla být specifikována. Zkoušená chemická látka podávaná žaludeční sondou se podává každý den přibližně ve stejnou dobu a alespoň jednou týdně se přizpůsobí tak, aby se udržela konstantní úroveň dávky vzhledem k tělesné hmotnosti zvířete.

Harmonogram zkoušky

29. Podávání oběma pohlavím by mělo být zahájeno alespoň 2 týdny před pářením po minimálně pětidenní aklimatizaci a po screeningu samic, zda mají normální estrální cykly (v dvoutýdenním období před expozicí). Studii je třeba naplánovat tak, aby hodnocení estrálních cyklů začalo brzy poté, co zvířata dosáhnou plné pohlavní zralosti. U různých kmenů potkana v různých laboratořích se to může mírně lišit, např. potkan Sprague Dawley stáří 10 týdnů, potkan Wistar stáří přibližně 12 týdnů. Samice s potomstvem by měly být utraceny 13. den po porodu nebo krátce poté. Den porodu (tj. ten, kdy je dokončen vrh) je definován jako 0. den po porodu. Samice, které nevykazují žádné známky kopulace, se utratí 24–26 dnů po posledním dni období páření. S dávkováním se u obou pohlaví pokračuje i během období páření. U samců se dále pokračuje s podáváním zkoušené chemické látky i po období páření alespoň do doby, kdy je dokončeno minimální období podávání 28 dnů. Poté se utratí, nebo se případně uchovají a dále je jim podávána zkoušená chemická látka pro případné provedení druhého páření, je-li to považováno za vhodné.

30. V denním podávání samicím rodičovské generace by se poté mělo pokračovat po celou březost a alespoň do 13. dne po porodu včetně nebo do dne před utracením. U studií, kde je zkoušená chemická látka podávána inhalací nebo dermální cestou, je třeba s dávkováním pokračovat alespoň do 19. dne gestace včetně, přičemž dávkování se obnoví co možná nejdříve, nejpozději však v PND 4.

31. Diagram časového sledu zkoušky je uveden v dodatku 2.

Páření

32. Obvykle se v této studii používá párování 1:1 (jeden samec a jedna samice). V případě náhodného úmrtí samců mohou nastat výjimky. Samice se umístí se stejným samcem až do doby, kdy budou pozorovány důkazy o spáření, nebo do uplynutí dvou týdnů. Každé ráno se samice vyšetří na přítomnost spermatu nebo vaginální zátky. Den 0 březosti je definován jako den, kdy je potvrzen důkaz o spáření (je nalezena vaginální zátka nebo sperma). V případě, že je páření neúspěšné, se zváží spáření se samci s osvědčenou plodností ze stejné skupiny.

▼M8

Velikost vrhu

33. Čtvrtý den po vrhu se velikost všech vrhů upraví náhodným vyřazením nadbytečných jedinců tak, aby bylo pokud možno dosaženo počtu čtyř až pěti samců a čtyř až pěti samic z jednoho vrhu podle obvyklé početnosti vrhu u použitého kmene potkana. Od dvou nadbytečných mláďat se odeberou krevní vzorky, smíchají se a použijí pro stanovení sérových hladin T4. Selektivní eliminace jedinců, např. na základě tělesné hmotnosti nebo anogenitální vzdálenosti (AGD), není vhodná. Pokud počet mladých samců nebo samic neumožňuje ponechat čtyři až pět od každého pohlaví a vrhu, je možná částečná úprava (např. ponechat šest samců a čtyři samice). Jestliže velikost vrhu poklesne pod cílový počet pro utracení (8 nebo 10 mláďat/vrh), nevyřazují se žádná mláďata. Jestliže zbývá pouze jedno mládě nad cílový počet pro utracení, vyřadí se pouze jedno mládě, které se použije pro odběr krve pro případné vyšetření sérové hladiny T4.

34. Jestliže se velikost trhu neupravuje, 4. den po porodu se utratí dvě mláďata na vrh a odeberou se krevní vzorky pro stanovení sérové koncentrace hormonů štítné žlázy. Těmito dvěma mláďaty na vrh by měly být pokud možno samice, aby se uchovali samci pro hodnocení retenčních mléčných cyst, s výjimkou případu, že by po odstranění těchto mláďat nezbyly žádné samice pro vyšetření při ukončení zkoušky. Jestliže velikost vrhu poklesne pod 8 nebo 10 mláďat/vrh (podle normální velikosti vrhu u použitého kmene potkana), nevyřazují se žádná mláďata. Jestliže zbývá pouze jedno mládě nad normální velikost vrhu, vyřadí se pouze jedno mládě, které se použije pro odběr krve pro případné vyšetření sérové hladiny T4.

Pozorování živých zvířat

Poznatky z klinického pozorování

35. Po celou dobu zkoušky by se mělo provádět všeobecné klinické pozorování nejméně jednou denně a častěji, pokud jsou zpozorovány příznaky toxicity. Pozorování se provádí denně, pokud možno ve stejnou dobu a s přihlédnutím k době očekávaného maxima účinku po podání látky. Zaznamenávají se významné změny chování, příznaky ztíženého nebo prodlouženého vrhu a všechny příznaky toxicity, včetně mortality. Tyto záznamy by měly zahrnovat čas nástupu, stupeň a délku trvání známek toxicity.

Tělesná hmotnost a spotřeba potravy a vody

36. Samci a samice se váží první den podávání, poté týdně a při ukončení zkoušky. V průběhu březosti se samice zváží 0., 7., 14. a 20. den a do 24 hodin po vrhu (0. den nebo 1. den po porodu) a alespoň 4. den a 13. den po porodu. Tato pozorování se zaznamenají individuálně u každého dospělého zvířete.

37. Před obdobím páření a během březosti a laktace se alespoň jednou týdně měří příjem potravy. Měření příjmu potravy v průběhu páření je volitelné. Pokud se zkoušená chemická látka podává v pitné vodě, měří se v průběhu těchto období také spotřeba vody.

Estrální cykly

38. Estrální cykly je třeba sledovat před zahájením expozice, aby bylo možné vybrat pro studii samice s pravidelným cyklem (viz odstavec 22). Od začátku období expozice až do průkazu o páření je třeba také každý den sledovat vaginální stěry. V případě obav z účinků akutního stresu, které by při zahájení podávání zkoušené chemické látky mohly změnit estrální cykly,

▼M8

mohou laboratoře exponovat pokusná zvířata po dobu dvou týdnů, poté denně odebírat vaginální stěry za účelem sledování estrálního cyklu po dobu minimálně dvou týdnů před obdobím páření a dále je sledovat až do období páření, dokud prokazatelně nedojde k páření. Při získávání vaginálních/cervikálních buněk je třeba dávat pozor, aby se neporušila sliznice, což by mohlo vyvolat stav falešné březosti (7) (8).

Parametry potomstva

39. Doba gestace se zaznamená a počítá se ode dne 0 březosti. Každý vrh se co nejdříve po porodu vyšetří a stanoví se počty a pohlaví mláďat, počet mrtvě a živě narozených mláďat, počet zakrslých mláďat (mláďat, která jsou výrazně menší než odpovídající kontrolní mláďata) a přítomnost nápadných abnormalit.

40. Do 24 hodin po porodu (0. den nebo 1. den po porodu) a alespoň 4. den a 13. den po porodu se živá mláďata spočítají, stanoví se jejich pohlaví a zváží se. Kromě pozorování popsaných v odstavci 35 je třeba zaznamenat jakékoli abnormální chování potomstva.

41. U každého mláděte je třeba ve stejný den po porodu v době od PND 0 do PND 4 změřit anogenitální vzdálenost (AGD). V den měření AGD by měla být zjištěna tělesná hmotnost mláděte a AGD by měla být normalizována na nějakou míru velikosti mláďat, nejlépe třetí odmocninu tělesné hmotnosti (9). Podle doporučení pokynu OECD č. 151 se v PND 12 nebo 13 spočítá počet bradavek/prsních dvorců u mladých samců (10).

Biochemické vyšetření

42. Krevní vzorky z určeného místa se odebírají podle tohoto rozvrhu:

— od alespoň dvou mláďat na vrh 4. den po porodu, pokud to umožňuje počet mláďat (viz odstavce 33-34)

— od všech samic a alespoň dvou mláďat na vrh při ukončení zkoušky 13. den a

— od všech dospělých samců při ukončení zkoušky.

Všechny krevní vzorky se uchovávají za vhodných podmínek. Krevní vzorky odebrané mláďatům 13. den a dospělým samcům se vyšetří na sérové hladiny hormonů štítné žlázy (T4). Ve vhodných případech se provede další vyšetření T4 v krevních vzorcích odebraných samicím a mláďatům 4. den. Je-li to vhodné, mohou být volitelně stanoveny také hladiny jiných hormonů: Krev mláďat z vrhu lze pro potřeby analýzy hormonů štítné žlázy smíchat. Hormony štítné žlázy (T4 a TSH) se měří nejlépe jako „celkové“.

43. Následující faktory mohou ovlivnit variabilitu a absolutní koncentrace stanovovaných hormonů:

— doba utracení vzhledem k diurnálním odchylkám v koncentracích hormonů,

— způsob utracení – mělo by se zabránit zbytečnému stresu zvířat, který může ovlivnit koncentrace hormonů,

— testovací soupravy pro stanovení hormonů, jejichž standardní křivky se mohou lišit.

▼M8

44. Vzorky plazmy určené speciálně k stanovení hormonů by se měly odebírat zhruba ve stejnou denní dobu. Číselné hodnoty získané při analýze koncentrací hormonů se u různých komerčních testovacích souprav liší.

Patologie

Celková pitva

45. Dospělá zvířata se v okamžiku usmrcení nebo úhynu během studie makroskopicky vyšetří na abnormality nebo patologické změny. Speciální pozornost je třeba věnovat orgánům rozmnožovací soustavy. Zaznamená se počet implantací. Ráno v den pitvy se vyšetří vaginální stěry s cílem určit stadium estrálního cyklu a umožnit korelaci s histopatologickým vyšetřením vaječníků.

46. Varlata, nadvarlata a prostata a semenné váčky s Cowperovými žlázami jako celek se u všech dospělých samců podle potřeby zbaví všech přirostlých tkání a co nejdříve po pitvě se ve vlhkém stavu zváží, aby nedošlo k vyschnutí. Kromě toho mohou být volitelně zváženy další orgány, jako jsou svaly m. levator ani a m. bulbocavernosus, Cowperovy žlázy a žalud penisu u samců a párové vaječníky (vlhká hmotnost) a děloha (včetně děložního hrdla) u samic; je-li toto vážení prováděno, mělo by k němu dojít co nejdříve po pitvě.

47. Mrtvá mláďata a mláďata utracená 13. den po porodu nebo krátce poté je třeba alespoň pečlivě externě vyšetřit na závažné abnormality. Zvláštní pozornost je třeba věnovat vnějším rozmnožovacím orgánům, které se vyšetří na přítomnost známek změněného vývoje. 13. den se uchová štítná žláza od 1 mladého samce a 1 mladé samice z každého vrhu.

48. Vaječníky a varlata, přídatné pohlavní orgány (děloha a děložní hrdlo, nadvarlata, prostata, semenné váčky s Cowperovými žlázami), štítná žláza a všechny orgány od všech dospělých zvířat vykazující makroskopické léze se uchovají. Pro rutinní vyšetření varlat a nadvarlat se nedoporučuje fixace ve formalínu. Přípustnou metodou pro tyto tkáně je použití Bouinova fixačního roztoku nebo modifikovaného Davidsonova fixačního roztoku (11). Tunica albuginea se může jemně a mělce propíchnout jehlou na obou koncích orgánu, aby se umožnilo rychlé proniknutí fixativa.

Histopatologie

49. Podrobné histologické vyšetření je třeba provést u vaječníků, varlat a nadvarlat (se zvláštním důrazem na stádia spermatogeneze a histopatologii struktury intersticiálních buněk varlat) zvířat ve skupině s nejvyšší dávkou a v kontrolní skupině. V případě potřeby mohou být vyšetřeny i další uchované orgány včetně štítné žlázy od mláďat a dospělých zvířat. Hmotnost štítné žlázy lze stanovit po fixaci. Odříznutí by se mělo rovněž provádět velmi opatrně a teprve po fixaci, aby se zamezilo poškození tkáně. Poškození tkáně by mohlo narušit histopatologickou analýzu. Vyšetření by měla být provedena také u zvířat ostatních dávkových skupin, pokud jsou u skupiny s nejvyšší dávkou pozorovány změny. Pokyny k histopatologickému vyšetření (11) podrobně popisují pitvu, fixaci, tvorbu řezů a histopatologické vyšetření endokrinních tkání.

▼M8

ÚDAJE A PŘEDKLÁDÁNÍ ZPRÁV

Údaje

50. Měly by být uvedeny údaje pro každé jednotlivé zvíře. Dále se všechny údaje shrnou do tabulek tak, aby byl u každé experimentální skupiny uveden počet zvířat na začátku zkoušky, počet zvířat uhynulých během zkoušky nebo utracených z humánních důvodů, doba úhynu nebo humánního utracení, počet plodných samic, počet březích samic, počet zvířat vykazujících příznaky toxicity, popis pozorovaných příznaků toxicity včetně doby nástupu, trvání a závažnosti veškerých toxických účinků, druhy histopatologických změn a všechny významné údaje o vrhu. Souhrnná zpráva ve formě tabulky, která se ukázala jako velmi užitečná pro hodnocení reprodukčního/vývojového účinku, je uvedena v dodatku 3.

51. Vzhledem k omezené velikosti studie mají statistické analýzy ve formě testů „významnosti“ pro mnoho sledovaných vlastností, zejména pro reprodukční sledované vlastnosti, omezenou hodnotu. Pokud se používají statistické analýzy, pak by měla být zvolená metoda vhodná pro distribuci zkoumané proměnné a měla by být zvolena před zahájením studie. Statistická analýza AGD a retenčních mléčných cyst by měla vycházet z údajů o jednotlivých mláďatech se zohledněním účinků na vrh. Ve vhodných případech je jednotkou analýzy vrh. Statistická analýza tělesné hmotnosti mláďat by měla vycházet z údajů o jednotlivých mláďatech se zohledněním velikosti vrhu. Vzhledem k malé velikosti skupin může být jako pomůcka pro interpretaci studie také užitečné použití historických kontrolních údajů (např. o velikosti vrhu), pokud jsou tyto údaje k dispozici.

Vyhodnocení výsledků

52. Výsledky této studie reprodukční toxicity se vyhodnotí z hlediska pozorovaných účinků, pitvy a mikroskopických nálezů. V hodnocení musí být uveden vztah mezi dávkou zkoušené chemické látky a přítomností nebo nepřítomností, výskytem a závažností abnormalit včetně makroskopických lézí, stanovených cílových orgánů, neplodnosti, klinických abnormalit, vlivu na reprodukční výkonnost a schopnost vrhu, změny tělesné hmotnosti, vlivu na úmrtnost a další toxické účinky.

53. Vzhledem ke krátké době expozice samců je třeba histopatologii varlat a nadvarlat zvažovat při posuzování reprodukčních účinků u samců společně s údaji o fertilitě. Jako pomůcka pro interpretaci studie může být také užitečné použití historických kontrolních údajů o reprodukci/vývoji (např. o velikosti vrhu, AGD, retenčních mléčných cystách, sérových hladinách T4), pokud jsou tyto údaje k dispozici.

54. Za účelem kontroly jakosti se navrhuje, aby se shromáždily historické kontrolní údaje a vypočítaly se koeficienty rozptylu pro číselné údaje, zejména pro parametry spojené s detekcí endokrinních disruptorů. Tyto údaje pak lze použít pro účely srovnání při hodnocení stávajících studií.

ZÁVĚREČNÁ ZPRÁVA

55. Závěrečná zpráva by měla obsahovat tyto informace:

Zkoušená chemická látka:

— zdroj, číslo šarže a je-li k dispozici, datum použitelnosti,

— stabilita zkoušené chemické látky, je-li známa.

▼**M8**

Jednosložková látka:

— fyzický vzhled, rozpustnost ve vodě a další relevantní fyzikálně-chemické vlastnosti,

— chemická identifikace, např. název podle IUPAC nebo CAS, číslo CAS, kód SMILES nebo InChI, strukturní vzorec, čistota, případně chemická identita nečistot, je-li to prakticky možné, atd.

Vícesložkové látky, UVCB a směsi:

— charakterizované pokud možno chemickou identitou (viz výše), kvantitativním výskytem a relevantními fyzikálně-chemickými vlastnostmi složek.

Vehikulum (je-li použito):

— zdůvodnění výběru vehikula, pokud není použita voda.

Pokusná zvířata:

— použitý druh/kmen,

— počet, věk a pohlaví zvířat,

— původ, podmínky chovu, strava atd.,

— hmotnost jednotlivých zvířat na začátku zkoušky.

— zdůvodnění použití druhu, pokud je jiný než potkan.

Zkušební podmínky:

— zdůvodnění zvolených úrovní dávek,

— podrobnosti o složení zkoušené chemické látky/úpravě potravy, o použitých koncentracích, stálosti a homogenitě přípravku,

— podrobné údaje o podávání zkoušené chemické látky,

— popřípadě přepočet koncentrace zkoušené chemické látky v krmivu/pitné vodě (ppm) na skutečnou denní dávku (mg/kg tělesné hmotnosti/den),

— podrobnosti o jakosti krmení a vody,

— podrobný popis postupů randomizace při výběru mláďat pro třídění, jsou-li tříděna.

Výsledky:

— tělesná hmotnost/změny tělesné hmotnosti,

— spotřeba potravy a popřípadě spotřeba vody, je-li údaj k dispozici,

— údaje o toxických reakcích podle pohlaví a dávky, včetně ukazatelů plodnosti, gestace a všech dalších známek toxicity,

— délka gestace,

— toxické nebo jiné účinky na reprodukci, potomstvo, postnatální růst atd.,

— povaha, závažnost a trvání klinických projevů (ať vratných, či nevratných),

— počet dospělých samic s normálním nebo abnormálním estrálním cyklem a trváním cyklu,

— počet živě narozených mláďat a postimplantačních ztrát,

— údaje o tělesné hmotnosti mláďat,

— AGD všech mláďat (a tělesná hmotnost v den měření AGD),

▼M8

— retenční mléčné cysty u mláďat samců,

— hladiny hormonů štítné žlázy u 13denních mláďat a dospělých samců (a u samic a 4denních mláďat, jsou-li tyto hodnoty měřeny),

— počet mláďat s makroskopicky viditelnými abnormalitami, orientační hodnocení vnějších genitálií, počet zakrslých mláďat,

— den úhynu během studie nebo údaj, že zvířata přežila až do dne utracení,

— počet implantovaných plodů, velikost vrhu a hmotnost vrhu v době pořízení záznamu,

— tělesná hmotnost při utracení a údaje o hmotnosti orgánů u rodičovských zvířat,

— pitevní nálezy,

— podrobný popis histopatologických nálezů,

— údaje o absorpci (jsou-li k dispozici),

— statistické vyhodnocení výsledků, je-li to možné.

Rozbor výsledků.

Závěry.

Interpretace výsledků

56. Studie poskytne hodnocení reprodukční/vývojové toxicity spojené s podáváním opakovaných dávek (viz odstavce 5 a 6). Mohla by naznačit nutnost provést další výzkum a poskytnout vodítko pro návrh dalších studií. Jako pomůcka při interpretaci výsledků v oblasti reprodukce a vývoje by měl posloužit pokyn OECD č. 43 (12). Pokyn OECD č. 106 týkající se histologického hodnocení endokrinních a reprodukčních zkoušek u hlodavců (11) poskytuje informace o přípravě a hodnocení (endokrinních) orgánů a vaginálních stěrů, což může být pro tento pokyn užitečné.

LITERATURA

(1) OECD (1990). Room Document No 1 for the 14th Joint Meeting of the Chemicals Group and Management Committee. K dispozici na vyžádání u Organizace pro hospodářskou spolupráci a rozvoj, Paříž.

(2) OECD (1992). Chairman's Report of the ad hoc Expert Meeting on Reproductive Toxicity Screening Methods, Tokyo, 27th-29th October, 1992. K dispozici na vyžádání u Organizace pro hospodářskou spolupráci a rozvoj, Paříž.

(3) OECD (1998). Report of the First Meeting of the OECD Endocrine Disrupter Testing and Assessment (EDTA) Task Force, 10th-11th March 1998. K dispozici na vyžádání u Organizace pro hospodářskou spolupráci a rozvoj, Paříž.

(4) OECD (2015). Feasibility Study for Minor Enhancements of TG 421/422 with ED Relevant Endpoints. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (No 217) Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(5) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment, and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluations. Series on Testing and Assessment, (No 19), Organisation for Economic Cooperation and Development,.Paris.

▼**M8**

(6) OECD (2011). Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment(No 150), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(7) Goldman, J.M., Murr A.S., Buckalew A.R., Ferrell J.M. and Cooper R.L. (2007). The Rodent Estrous Cycle: Characterization of Vaginal Cytology and its Utility in Toxicological Studies, Birth Defects Research, Part B, 80 (2), 84-97.

(8) Sadleir R.M.F.S (1979). Cycles and Seasons, in Auston C.R. and Short R.V. (eds.), Reproduction in Mammals: I. Germ Cells and Fertilization, Cambridge, New York.

(9) Gallavan R.H. Jr, Holson J.F., Stump D.G., Knapp J.F. and Reynolds V.L. (1999). Interpreting the Toxicologic Significance of Alterations in Anogenital Distance: Potential for Confounding Effects of Progeny Body Weights, Reproductive Toxicology, 13: 383-390.

(10) OECD (2013). Guidance Document in Support of the Test Guideline on the Extended One Generation Reproductive Toxicity Study. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 151), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(11) OECD (2009). Guidance Document for Histologic Evaluation of Endocrine and Reproductive Tests in Rodents. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No106), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(12) OECD (2008). Guidance Document on Mammalian Reproductive Toxicity Testing and Assessment. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 43), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

▼**M8**

Dodatek 1

DEFINICE (VIZ TAKÉ POKYNY OECD Č. 150 (6))

Androgenicita je schopnost chemické látky působit v organismu savců jako přirozený androgenní hormon (např. testosteron).

Antiandrogenicita je schopnost chemické látky potlačit v organismu savců působení přirozeného androgenního hormonu (např. testosteronu).

Antiestrogenicita je schopnost chemické látky potlačit v organismu savců působení přirozeného estrogenního hormonu (např. estradiolu 17ß).

Antityreoidální působení je schopnost chemické látky potlačit v organismu savců působení přirozeného hormonu štítné žlázy (např. $T_{3)}$.

Chemická látka je látka nebo směs.

Vývojová toxicita: projev reprodukční toxicity představující prenatální, perinatální, postnatální, strukturální nebo funkční poruchy u potomstva.

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

Dávkou se rozumí množství podané zkoušené chemické látky. Dávka se vyjadřuje jako hmotnost zkoušené chemické látky na jednotku tělesné hmotnosti zvířete za den (např. mg/kg tělesné hmotnosti/den) nebo jako konstantní koncentrace v krmivu.

Zřejmá toxicita je obecný termín popisující jasné příznaky toxicity po podání zkoušené chemické látky. Ty by měly být dostačující pro posouzení nebezpečnosti a měly by být takové, že při zvýšení podávané dávky lze očekávat rozvoj závažných toxických příznaků a pravděpodobnou mortalitu.

Porucha plodnosti představuje poruchy samčích nebo samičích reprodukčních funkcí nebo schopnosti.

Mateřská toxicita: nežádoucí účinky na březí samice vyskytující se buď specificky (přímý účinek), nebo nespecificky (nepřímý účinek).

NOAEL je zkratka pro angl. „no-observed-adverse-effect level“. Je to nejvyšší úroveň dávky, při které nejsou pozorovány žádné nepříznivé účinky spojené se zkouškou.

Estrogenicita je schopnost chemické látky působit v organismu savců jako přirozený estrogenní hormon (např. estradiol 17ß).

Reprodukční toxicita představuje škodlivé účinky na potomstvo a/nebo poruchy samčích nebo samičích reprodukčních funkcí nebo schopnosti.

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

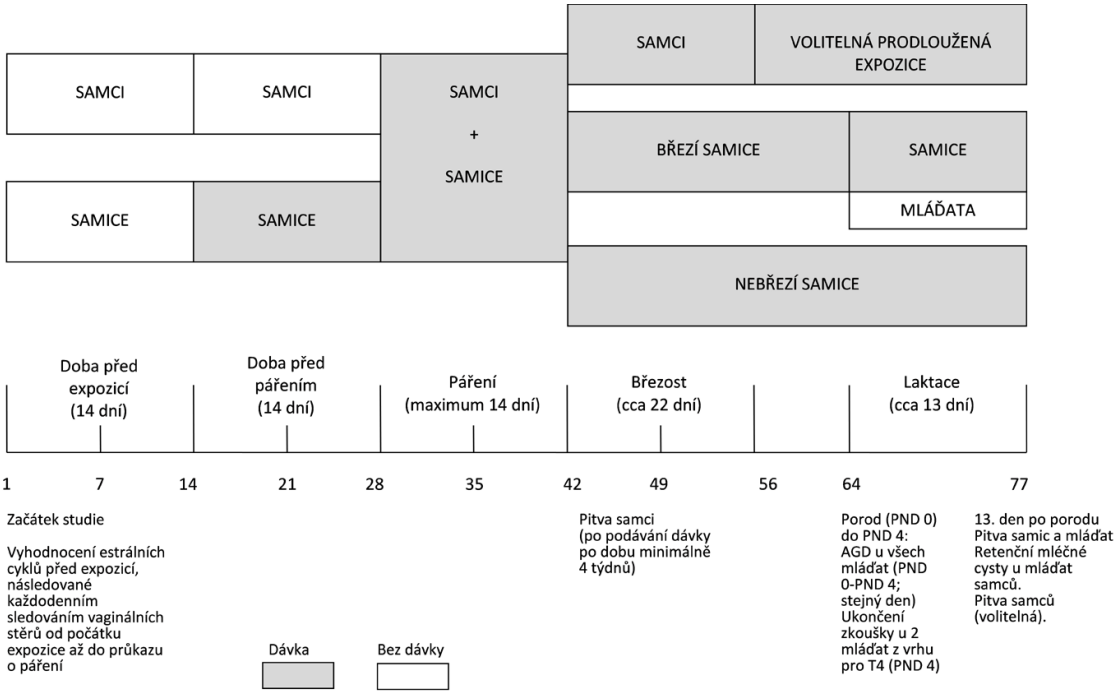
Tyreoidální působení je schopnost chemické látky působit jako přirozený hormon štítné žlázy (např. $T_{3)}$ v savčím organismu.

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

▼**M8**

Dodatek 2

DIAGRAM ČASOVÉHO PLÁNU EXPERIMENTU SE ZNÁZORNĚNÍM MAXIMÁLNÍ DÉLKY STUDIE, NA ZÁKLADĚ CELÉHO ČTRNÁCTIDENNÍHO OBDOBÍ PÁŘENÍ



▼**M8**

Dodatek 3

SOUHRNNÁ ZPRÁVA O ÚČINCÍCH NA REPRODUKCI/VÝVOJ VE FORMĚ TABULKY

POZOROVÁNÍ	HODNOTY				
Dávka (jednotky)	0 (kontrola)	...	...	...	...
Páry na začátku (N)					
Estrální cyklus (alespoň střední délka a frekvence nepravidelných cyklů)					
Samice vykazující známky kopulace (N)					
Zabřezlé samice (N)					
Dny zabřeznutí 1–5 (N)					
Dny zabřeznutí 6–... ([1]) (N)					
Březost ≤ 21 dnů (N)					
Březost = 22 dnů (N)					
Březost ≥ 23 dnů (N)					
Samice s živými novorozenými mláďaty (N)					
Samice s živými novorozenými mláďaty 4. den po porodu (N)					
Implantace/samice (průměr)					
Živá mláďata/samice při narození (průměr)					
Živá mláďata/samice 4. den (průměr)					
Poměr pohlaví (samec/samice) při narození (průměr)					
Poměr pohlaví (samec/samice) 4. den (průměr)					
Hmotnost vrhu při narození (průměr)					
Hmotnost vrhu 4. den (průměr)					
Hmotnost mláďat při narození (průměr)					
Hmotnost mláďat v době měření AGD (průměr samců, průměr samic)					

▼**M8**

POZOROVÁNÍ	HODNOTY				
Dávka (jednotky)	0 (kontrola)	...	...	...	...
AGD mláďat ve stejný postnatální den, při narození – 4. den (průměr samců, průměr samic, uvést PND)					
Hmotnost mláďat 4. den (průměr)					
Retenční mléčné cysty u mladých samců 13. den (průměr)					
Hmotnost mláďat 13. den (průměr)					
ABNORMÁLNÍ MLÁĎATA					
Samice s 0					
Samice s 1					
Samice s ≥ 2					
ZTRÁTA POTOMSTVA					
Prenatální/postimplantační (implantace minus živě narozená mláďata)					
Samice s 0					
Samice s 1					
Samice s 2					
Samice s ≥ 3					
Postnatální (živě narozená mláďata minus živá mláďata 13. den po porodu)					
Samice s 0					
Samice s 1					
Samice s 2					
Samice s ≥ 3					

([1]) poslední den období páření

▼M8

B.64 KOMBINOVANÁ STUDIE TOXICITY PO OPAKOVANÝCH DÁVKÁCH SE SCREENINGOVOU ZKOUŠKOU NA REPRODUKČNÍ/VÝVOJOVOU TOXICITU

ÚVOD

1. Tato zkušební metoda je rovnocenná Pokynu OECD pro zkoušení č. 422 (2016). Pokyny OECD pro zkoušení chemických látek se pravidelně přezkoumávají s ohledem na vědecký pokrok. Pokyn č. 422 k původní screeningové zkoušce byl přijat v roce 1996 na základě protokolu pro „Kombinovanou screeningovou zkoušku na reprodukční/vývojovou toxicitu po opakovaných dávkách“ projednaného na dvou zasedáních odborníků, a to v Londýně v roce 1990 (1) a v Tokiu v roce 1992 (2).

2. Tato zkušební metoda kombinuje screeningovou část na reprodukční/vývojovou toxicitu, která vychází ze zkušeností získaných v členských zemích při používání původní metody u stávajících chemických látek vyráběných ve velkém objemu a při průzkumném testování látek pozitivní kontroly (3) (4), a část zkoušení toxicity po opakovaných dávkách v souladu s Pokynem OECD pro zkoušení č. 407 (Studie orální toxicity u hlodavců s opakovaným podáváním dávky v 28denním cyklu, odpovídající kapitole B.7 této přílohy).

3. Tato zkušební metoda byla aktualizována o příslušné sledované vlastnosti endokrinnch disruptorů v návaznosti na činnost s vysokou prioritou, kterou organizace OECD zahájila v roce 1998 a která byla zaměřena na revizi stávajících pokynů pro zkoušení a vypracování nových pokynů pro zjišťování a zkoušení látek, které mohou narušovat činnost endokrinních žláz (5). V této souvislosti byly do pokynu č. 407 (odpovídajícího kapitole B.7 této přílohy) v roce 2008 doplněny parametry vhodné k detekci endokrinního působení zkoušených chemických látek. Cílem aktualizace pokynu č. 422 bylo zahrnout do pokynu ke screeningové zkoušce některé relevantní sledované vlastnosti endokrinních disruptorů, pokud doby expozice zahrnují některá citlivá období v průběhu vývoje (prenatální nebo časně postnatální období).

4. Na základě studie proveditelnosti řešící vědecké a technické otázky spojené se zahrnutím relevantních sledovaných vlastností, jakož i možných úprav plánu zkoušky potřebných pro jejich zahrnutí (6) byly do pokynu č. 422 přidány vybrané další relevantní sledované vlastnosti související s endokrinními disruptory, které jsou rovněž součástí pokynu pro zkoušení č. 443 (Rozšířená jednogenerační studie toxicity pro reprodukci, odpovídající kapitole B.56 této přílohy).

5. Tato zkušební metoda je určena pro získání omezeného množství informací týkajících se účinků zkoušené chemické látky na reprodukční výkonnost samců a samic, jako je funkce pohlavních žláz, chování při páření, početí, vývoj zárodku a vrh. Není alternativou pro stávající zkušební metody B.31, B.34, B.35 nebo B.56 a ani je nahrazuje.

VÝCHOZÍ ÚVAHY

6. Při posuzování a hodnocení toxických vlastností chemické látky lze po získání prvních informací o toxicitě z akutních zkoušek stanovit orální toxicitu pomocí opakované aplikace dávek. Tato studie poskytuje informace o možném nebezpečí pro zdraví, které by se mohlo projevit na základě opakované expozice během relativně omezeného časového období. Tato metoda se skládá ze základní studie toxicity po opakovaných dávkách, kterou lze použít u chemických látek, u nichž není důvod pro 90denní studii (např. když objem výroby nepřekračuje určité limity), nebo jako předběžnou studii k dlouhodobé studii. Při realizaci studie by měly být respektovány hlavní zásady a aspekty stanovené v pokynu OECD č. 19 o uznávání, posuzování a používání klinických příznaků jako humánních sledovaných vlastností pro pokusná zvířata používaná při hodnoceních bezpečnosti (7).

▼M8

7. Dále zahrnuje screeningovou zkoušku na reprodukční/vývojovou toxicitu, a proto může být použita také na získání prvních informací o možných účincích na reprodukční výkonnost samců a samic, jako je funkce pohlavních žláz, chování při páření, početí, vývoj zárodku a vrh, a to v rané fázi posuzování toxikologických vlastností zkoušených chemických látek, nebo informací o chemických látkách, které jsou předmětem zájmu. Tato zkušební metoda neposkytuje úplné informace o všech aspektech reprodukce a vývoje. Konkrétně nabízí jen omezené prostředky zjištění postnatálních projevů prenatální expozice nebo účinků, které mohou být vyvolány v průběhu postnatální expozice. Vzhledem (mimo jiné) k selektivitě sledovaných vlastností a krátké době trvání studie neposkytuje tato metoda důkaz pro definitivní tvrzení, že nedochází k žádným reprodukčním/vývojovým účinkům. Navíc, pokud neexistují údaje z jiných zkoušek reprodukční/vývojové toxicity, jsou pozitivní výsledky užitečné pro první posouzení rizika a přispívají k rozhodnutím ohledně nezbytnosti a načasování dalších zkoušek.

8. Výsledky získané pro parametry související s endokrinním působením by se měly interpretovat v kontextu „koncepčního rámce OECD pro zkoušky a hodnocení chemických látek způsobujících endokrinní poruchy“ (8). V tomto koncepčním rámci je vylepšený Pokyn OECD pro zkoušení č. 422 zařazen na úroveň 4 jako zkouška *in vivo* poskytující údaje o nežádoucích účincích na relevantní endokrinní sledované vlastnosti. Endokrinní signál sám o sobě však nemusí být považován za dostatečný důkaz, že zkoušená chemická látka je endokrinním disruptorem.

9. Tato zkušební metoda klade rovněž větší důraz na neurologické účinky jako na specifické sledované vlastnosti; důraz je kladen na potřebu pečlivého klinického pozorování zvířat, aby bylo získáno co nejvíce informací. Metoda by měla odhalit chemické látky s neurotoxickým potenciálem, u nichž může být nezbytné další hlubší zkoumání tohoto aspektu. Dále může tato metoda poskytnout základní indikaci imunologických účinků.

10. Pokud neexistují údaje z jiných studií systémové toxicity, reprodukční/vývojové toxicity, neurotoxicity anebo imunotoxicity, jsou pozitivní výsledky užitečné pro první posouzení rizika a přispívají k rozhodnutím ohledně nezbytnosti a načasování dalších zkoušek. Zkouška však může být zvláště užitečná jako součást souboru údajů pro hodnocení OECD (SIDS) pro posouzení stávajících chemických látek, o nichž nejsou k dispozici žádné nebo jen omezené toxikologické informace, a může sloužit jako alternativa k provedení dvou samostatných zkoušek toxicity po opakovaných dávkách (Pokyn OECD pro zkoušení č. 407, odpovídající kapitole B.7 této přílohy), respektive reprodukční/vývojové toxicity (Pokyn OECD pro zkoušení č. 421, odpovídající kapitole B.63 této přílohy). Rovněž může být použita jako studie ke stanovení dávkování pro rozsáhlejší reprodukční/vývojové studie, nebo když je to jinak považováno za relevantní.

11. Obecně se předpokládá, že existují rozdíly v citlivosti mezi březími a nebřezími zvířaty. Proto může být složitější stanovit úroveň dávek v této kombinované zkoušce, která bude adekvátní pro posouzení jak obecné systémové toxicity, tak i specifické reprodukční/vývojové toxicity, než když se jednotlivé zkoušky provádějí zvlášť. Navíc může být obtížnější interpretovat výsledky zkoušek s ohledem na obecnou systémovou toxicitu, než když se provádí samostatná studie s opakovanými dávkami, zejména když se sérové

▼M8

a histopatologické parametry nehodnotí ve studii současně. Vzhledem k uvedeným technickým problémům jsou pro provádění této kombinované screeningové zkoušky nutné značné zkušenosti v oblasti zkoušení toxicity. Na druhé straně může kombinovaná zkouška nabídnout kromě menšího počtu použitých zvířat lepší prostředky pro rozlišení přímých účinků na reprodukci/vývoj od účinků, které jsou sekundární k jiným (systémovým) účinkům.

12. V této zkoušce je období podávání zkoušené chemické látky delší než v klasické 28denní studii s opakovanou dávkou. V porovnání se stavem, kdy se provádí klasická 28denní studie s opakovanou dávkou kromě screeningové zkoušky reprodukční/vývojové toxicity, se však používá méně zvířat každého pohlaví na skupinu.

13. Tato zkušební metoda předpokládá orální aplikaci zkoušené chemické látky. Pokud jsou použity jiné cesty expozice, bude zřejmě nutné provést úpravy.

14. Před použitím této zkušební metody ke zkoušení směsi s cílem získat údaje pro zamýšlený regulační účel by mělo být zváženo, zda tato metoda může pro tento účel poskytnout odpovídající výsledky, a pokud ano, proč tomu tak je. Takové úvahy nejsou nutné, pokud existuje právní požadavek na zkoušení dané směsi.

15. Použité definice jsou uvedeny v dodatku 1.

PRINCIP ZKOUŠKY

16. Zkoušená chemická látka se podává v odstupňovaných dávkách několika skupinám samců a samic. Samcům se podává dávka minimálně čtyři týdny včetně dne před plánovaným usmrcením (zahrnuje to minimálně dva týdny před pářením, v průběhu období páření a přibližně dva týdny po páření). Vzhledem k omezené době podávání před pářením u samců nemusí být fertilita zvláště citlivým ukazatelem toxicity pro varlata. Proto je velmi důležité provést podrobné histologické vyšetření varlat. Kombinace dvoutýdenní doby podávání před pářením a následné pozorování páření/fertility s celkovou dobou podávání alespoň čtyři týdny, po níž následuje podrobná histopatologie samčích gonád, se považuje za dostatečnou ke zjištění většiny účinků na fertilitu a spermatogenezi u samců.

17. Samicím je třeba podávat zkoušenou chemickou látku po celou dobu studie. Zahrnuje to dva týdny před pářením (s cílem pokrýt alespoň dva celé estrální cykly), variabilní dobu do početí, dobu březosti a alespoň třináct dnů po porodu, a to včetně dne před plánovaným usmrcením.

18. Délka studie následující po aklimatizaci a zhodnocení estrálního cyklu před zahájením podávání závisí na výkonnosti samice a činí přibližně 63 dnů [alespoň 14 dnů před pářením, (maximálně) 14 dnů páření, 22 dnů gestace, 13 dnů laktace].

19. V průběhu období podávání se zvířata každý den pečlivě pozorují, aby se zjistily příznaky toxicity. Zvířata, která v průběhu zkoušky uhynula nebo byla utracena, se pitvají a na konci zkoušky se přeživší zvířata utratí a rovněž pitvají.

▼M8

POPIS METODY

Výběr zvířecích druhů

20. Tato zkušební metoda je určena k použití s potkany. Jestliže se parametry uvedené v tomto pokynu pro zkoušení č. 422 zkoumají u jiných druhů hlodavců, mělo by se podat podrobné zdůvodnění. V mezinárodním validačním programu detekce endokrinních disruptorů pomocí pokynu pro zkoušení č. 407 byl jediným použitým druhem potkan. Není vhodné používat kmeny s nízkou plodností nebo s typicky vysokým výskytem vývojových vad. Používají se zdravá, dosud nepřipuštěná zvířata ještě nepoužitá pro jiné experimenty. Pokusná zvířata by měla být plně charakterizována co do druhu, kmene, pohlaví, hmotnosti a věku. Na začátku studie by měly být odchylky hmotnosti zvířat minimální a neměly by překročit ± 20 % střední hodnoty pro každé pohlaví. Provádí-li se studie jako předběžná studie pro dlouhodobou nebo celogenerační studii, je vhodné použít v obou studiích nejlépe zvířata stejného kmene a stejného původu.

Umístění a krmení zvířat

21. Všechny postupy by měly splňovat místní standardy péče o laboratorní zvířata. Teplota v místnosti pro pokusná zvířata by měla být 22 ^{o}C (± 3 ^{o}). Relativní vlhkost vzduchu by měla být alespoň 30 % a neměla by pokud možno přesáhnout 70 % kromě doby úklidu místnosti. Osvětlení by mělo být umělé a mělo by se střídat 12 hodin světla a 12 hodin tmy. Ke krmení lze použít konvenční laboratorní krmivo s neomezeným přísunem pitné vody. Výběr potravy může být ovlivněn potřebou zajistit dostatečné promísení s testovanou látkou, je-li látka podávána touto cestou.

22. Zvířata by měla být chována v malých skupinách stejného pohlaví; je-li to z vědeckého hlediska důvodné, mohou být zvířata chována individuálně. Při chovu zvířat v klecích by v jedné kleci nemělo být umístěno více než pět zvířat. Páření by mělo probíhat v klecích, které jsou k tomuto účelu vhodné. Březí samice je třeba chovat v klecích jednotlivě a poskytnout jim materiál pro vytvoření hnízda. Samice v době laktace se chovají v klecích jednotlivě společně s potomky.

23. Krmivo by se mělo pravidelně analyzovat, aby se zjistila přítomnost kontaminantů. Vzorek stravy by se měl uchovávat až do dokončení zprávy.

Příprava zvířat

24. Zdravá mladá dospělá zvířata se náhodně vyberou a rozdělí do experimentálních skupin a klecí. Klece by měly být uspořádány tak, aby byl vliv umístění klecí minimalizován. Zvířata se jednoznačně identifikují a před započetím studie se nechají v laboratorních podmínkách alespoň pět dní aklimatizovat.

Příprava dávek

25. Není-li jiný způsob aplikace považován za vhodnější, doporučuje se orální podávání zkoušené chemické látky. Pokud je zvolena orální cesta, zkoušená chemická látka se obvykle podává žaludeční sondou; alternativně však lze zkoušené chemické látky podávat také v potravě nebo v pitné vodě.

26. Je-li to nutné, je zkoušená chemická látka rozpuštěna nebo suspendována ve vhodném vehikulu. Kdykoli je to možné, doporučuje se zvážit nejprve použití vodného roztoku/suspenze, poté použití olejového roztoku/emulze (např. kukuřičného oleje) a nakonec roztoku v jiných vehikulech. U jiného typu vehikula, než je voda, je třeba znát jeho toxické charakteristiky. Měla by být určena stabilita a homogenita zkoušené chemické látky v daném vehikulu.

▼M8

POSTUP

Počet a pohlaví zvířat

27. Doporučuje se, aby každá skupina měla zpočátku alespoň 10 samců a 12–13 samic. U samic se hodnotí před expozicí estrální cykly a zvířata, která nevykazují typické 4–5denní cykly, nebudou do studie zařazena; proto se doporučují náhradní samice, aby v každé skupině zůstalo 10 samic. S výjimkou případu výrazně toxických účinků se očekává, že v každé skupině bude alespoň 8 březích samic, což je obvykle minimální přijatelný počet březích samic na skupinu. Cílem je získat dostatečný počet březích samic a potomstva, a tím zajistit smysluplné hodnocení schopnosti zkoušené chemické látky ovlivnit plodnost, březost, chování samice a kojených mláďat a růst a vývoj potomstva generace F_1 od doby početí do dne 13 po porodu. Pokud se budou zvířata usmrcovat v průběhu studie, je nutno zvýšit celkový počet zvířat o počet zvířat, která budou usmrcena před ukončením studie. Mělo by se zvážit přidání další satelitní skupiny pěti zvířat od každého pohlaví do kontrolní skupiny a do skupiny s nejvyšší dávkou, aby se po dobu nejméně 14 dní po ukončení aplikace mohla sledovat vratnost, přetrvávání nebo opožděný nástup systémových toxických účinků. Zvířata ze satelitních skupin se nepáří, a proto se nepoužívají pro posouzení reprodukční/vývojové toxicity.

Dávkování

28. Obecně by měly být použity nejméně tři zkušební skupiny a kontrolní skupina. Nejsou-li dostupné žádné vhodné obecné údaje o toxicitě, může se provést předběžná studie (na zvířatech stejného kmene a původu) pro stanovení rozmezí dávek, které mají být použity. S výjimkou podávání zkoušené chemické látky se se zvířaty v kontrolní skupině zachází stejně jako se zvířaty ve zkušební skupině. Používá-li se pro usnadnění aplikace zkoušené chemické látky vehikulum, podává se kontrolní skupině vehikulum v nejvyšším použitém objemu.

29. Při výběru úrovní dávek by se měly vzít v úvahu veškeré existující údaje o toxických a (toxiko)kinetických vlastnostech. Rovněž je třeba vzít v úvahu, že mohou existovat rozdíly v citlivosti mezi březími a nebřezími zvířaty. Nejvyšší úroveň dávky by se měla zvolit tak, aby vyvolala toxické účinky, nikoli však uhynutí ani velké utrpení. Dále by měla být zvolena sestupná řada dávek s cílem prokázat, že existuje odezva související s dávkou a že nejnižší dávka nevyvolává žádné nežádoucí účinky. Obvykle jsou optimální dvoj- až čtyřnásobné intervaly mezi dávkami a často je vhodnější přidání čtvrté zkušební skupiny než používání příliš velkých intervalů mezi jednotlivými dávkami (např. lišících se faktorem větším než 10).

30. V přítomnosti pozorované obecné toxicity (např. snížená tělesná hmotnost, účinky na játra, srdce, plíce nebo ledviny atd.) nebo jiných změn, které nemusí být odezvou na toxicitu (např. snížený příjem krmiva, zvětšení jater), je třeba pozorované účinky na endokrinní citlivé sledované vlastnosti interpretovat obezřetně.

Limitní zkouška

31. Pokud orální studie provedená podle postupů popsaných pro tuto studii při jedné dávce nejméně 1 000 mg na kg tělesné hmotnosti na den nebo v případě podávání v potravě nebo v pitné vodě v rovnocenné koncentraci (na základě stanovení tělesné hmotnosti) nevyvolá pozorovatelné toxické účinky a pokud se na základě údajů o látkách s podobnou strukturou nepředpokládá toxicita, není úplná studie za použití několika úrovní dávek nutná.

▼M8

Limitní zkouška se použije s výjimkou případu, kdy údaje o expozici člověka naznačují, že je nezbytné použití vyšší úrovně dávek. U dalších způsobů podávání látky, jako je inhalační nebo kožní aplikace, může být maximální dosažitelná expozice často dána fyzikálně-chemickými vlastnostmi zkoušených chemických látek.

Podávání dávek

32. Zvířatům se denně podává zkoušená chemická látka po dobu sedmi dnů v rámci jednoho týdne. Pokud se zkoušená chemická látka podává nitrožaludečně, podává se zvířatům v jediné dávce za použití žaludeční sondy nebo vhodné intubační kanyly. Maximální objem tekutiny, kterou lze podat najednou, závisí na velikosti pokusného zvířete. Tento objem by neměl překročit 1 ml na 100 g tělesné hmotnosti, s výjimkou vodných roztoků, kde lze použít 2 ml na 100 g tělesné hmotnosti. S výjimkou dráždivých a žíravých zkoušených chemických látek, které obvykle při vyšších koncentracích vykazují zesílené účinky, by měla být variabilita zkušebního objemu minimalizována nastavením koncentrace zajišťující konstantní objem při všech úrovních dávky.

33. U zkoušených chemických látek podávaných v potravě nebo v pitné vodě je důležité zajistit, aby množství použité zkoušené chemické látky neovlivňovalo normální výživu nebo vodní rovnováhu. Podává-li se zkoušená chemická látka v krmivu, může se použít buď konstantní koncentrace (v ppm), nebo konstantní dávkování vzhledem k tělesné hmotnosti zvířete; použitá možnost by měla být specifikována. Zkoušená chemická látka podávaná žaludeční sondou se podává každý den přibližně ve stejnou dobu a alespoň jednou týdně se přizpůsobí tak, aby se udržela konstantní úroveň dávky vzhledem k tělesné hmotnosti zvířete. Pokud je kombinovaná studie prováděna jako předběžná studie k dlouhodobé nebo úplné studii reprodukční toxicity, měla by být v obou studiích použita stejná potrava.

Harmonogram zkoušky

34. Podávání oběma pohlavím by mělo být zahájeno 2 týdny před pářením po minimálně pětidenní aklimatizaci a po screeningu samic, zda mají normální estrální cykly (v dvoutýdenním období před expozicí). Studii je třeba naplánovat tak, aby hodnocení estrálních cyklů začalo brzy poté, co zvířata dosáhnou plné pohlavní zralosti. U různých kmenů potkana v různých laboratořích se to může mírně lišit, např. potkan Sprague Dawley stáří 10 týdnů, potkan Wistar stáří přibližně 12 týdnů. Samice s potomstvem by měly být utraceny 13. den po porodu nebo krátce poté. Aby bylo možné odebrat krev samicím nalačno (pokud je dávána přednost této možnosti), není nutné, aby byly samice a jejich potomstvo utraceny ve stejný den. Den porodu (tj. ten, kdy je dokončen vrh) je definován jako 0. den po porodu. Samice, které nevykazují žádné známky kopulace, se utratí 24–26 dnů po posledním dni období páření. S dávkováním se u obou pohlaví pokračuje i během období páření. U samců se dále pokračuje s podáváním zkoušené chemické látky i po období páření alespoň do doby, kdy je dokončeno minimální období podávání 28 dnů. Poté se utratí, nebo se případně uchovají a dále je jim podávána zkoušená chemická látka pro případné provedení druhého páření, je-li to považováno za vhodné.

35. V denním podávání samicím rodičovské generace by se poté mělo pokračovat po celou březost a alespoň do 13. dne po porodu včetně nebo do dne před utracením. U studií, kde je zkoušená chemická látka podávána inhalací nebo dermální cestou, je třeba s dávkováním pokračovat alespoň do 19. dne gestace včetně, přičemž dávkování se obnoví co možná nejdříve, nejpozději však 4. postnatální den (PND).

▼M8

36. Pokud je zařazena satelitní skupina, pak zvířata v této skupině, která mají být podle plánu dále sledována, se nepáří. Měla by být po dalších nejméně 14 dnů po prvním naplánovaném utracení samic bez aplikace, aby se zachytil opožděný nástup či přetrvávání toxických účinků nebo zotavení se z nich.

37. Diagram časového sledu zkoušky je uveden v dodatku 2.

Estrální cykly

38. Estrální cykly je třeba sledovat před zahájením expozice, aby bylo možné vybrat pro studii samice s pravidelným cyklem (viz odstavec 27). Od začátku období expozice až do průkazu o páření je třeba také každý den sledovat vaginální stěry. V případě obav z účinků akutního stresu, které by při zahájení podávání zkoušené chemické látky mohly změnit estrální cykly, mohou laboratoře exponovat pokusná zvířata po dobu dvou týdnů, poté denně odebírat vaginální stěry za účelem sledování estrálního cyklu po dobu minimálně dvou týdnů před obdobím páření a dále je sledovat až do období páření, dokud prokazatelně nedojde k páření. Při získávání vaginálních/cervikálních buněk je třeba neporušit sliznice, což by mohlo vyvolat stav falešné březosti (8) (9).

Páření

39. Obvykle se v této studii používá párování 1:1 (jeden samec a jedna samice). V případě náhodného úmrtí samců mohou nastat výjimky. Samice se umístí se stejným samcem až do doby, kdy budou pozorovány důkazy o spáření, nebo do uplynutí dvou týdnů. Každé ráno se samice vyšetří na přítomnost spermatu nebo vaginální zátky. Den 0 březosti je definován jako den, kdy je potvrzen důkaz o spáření (je nalezena vaginální zátka nebo sperma). V případě, že páření bylo neúspěšné, se zváží spáření se samci s osvědčenou plodností ze stejné skupiny.

Velikost vrhu

40. Čtvrtý den po vrhu se velikost všech vrhů upraví náhodným vyřazením nadbytečných jedinců tak, aby bylo pokud možno dosaženo počtu čtyř až pěti samců a čtyř až pěti samic z jednoho vrhu podle obvyklé početnosti vrhu u použitého kmene potkana. Od dvou nadbytečných mláďat se odeberou krevní vzorky, smíchají se a použijí pro stanovení sérových hladin T4. Selektivní eliminace jedinců, např. na základě tělesné hmotnosti nebo anogenitální vzdálenosti (AGD), není vhodná. Pokud počet mladých samců nebo samic neumožňuje ponechat čtyři až pět od každého pohlaví a vrhu, je možná částečná úprava (např. ponechat šest samců a čtyři samice). Jestliže velikost vrhu poklesne pod cílový počet pro utracení (8 nebo 10 mláďat/vrh), nevyřazují se žádná mláďata. Jestliže zbývá pouze jedno mládě nad cílový počet pro utracení, vyřadí se pouze jedno mládě, které se použije pro odběr krve pro případné vyšetření sérové hladiny T4.

41. Jestliže se velikost trhu neupravuje, 4. den po porodu se utratí dvě mláďata na vrh a odeberou se krevní vzorky pro stanovení sérové koncentrace hormonů štítné žlázy. Těmito dvěma mláďaty na vrh by měly být pokud možno samice, aby se uchovali samci pro hodnocení retenčních mléčných cyst, s výjimkou případu, že by po odstranění těchto mláďat nezbyly žádné samice pro vyšetření při ukončení zkoušky. Jestliže velikost vrhu poklesne pod 8 nebo 10 mláďat/vrh (podle normální velikosti vrhu u použitého kmene potkana), nevyřazují se žádná mláďata. Jestliže zbývá pouze jedno mládě nad normální velikost vrhu, vyřadí se pouze jedno mládě, které se použije pro odběr krve pro případné vyšetření sérové hladiny T4.

▼M8

Pozorování

42. Všeobecné klinické pozorování by se mělo provádět nejméně jednou denně, nejlépe ve stejnou dobu (stejné doby) a s uvážením doby očekávaného maxima účinku po podání látky. Zaznamenává se zdravotní stav zvířat. Nejméně dvakrát denně se provede prohlídka všech zvířat za účelem zjištění morbidity a mortality.

43. Před expozicí látce a dále nejméně jednou týdně by se mělo provést důkladné klinické vyšetření všech rodičovských zvířat (za účelem intraindividuálního porovnání). Toto pozorování by se mělo provádět mimo chovnou klec ve standardním pozorovacím prostoru a nejlépe každý den ve stejnou dobu. Pozorování je třeba pečlivě zaznamenat, nejlépe za použití systému bodování explicitně definovaného ve zkušební laboratoři. Mělo by se usilovat o to, aby rozdíly ve zkušebních podmínkách byly co nejmenší a aby vyšetření prováděly nejlépe osoby, které nevědí, jakým testem zvířata procházejí. Vyšetření by mělo mimo jiné zahrnovat změny kůže, srsti, očí a sliznic, výskyt sekretů a exkretů a vegetativních funkcí (např. slzení, zježení srsti, velikost zornic, nezvyklé dýchání). Zaznamenávat by se měly také změny chůze, držení těla a reakce na manipulaci, dále přítomnost klonických a tonických pohybů, stereotypů v chování (např. nadměrného čištění nebo opakovaného kroužení), ztížený nebo prodlužovaný vrh nebo bizarní chování (např. sebepoškozování, chůze pozpátku) (10).

44. Jednou v průběhu studie by se měly u pěti samců a pěti samic náhodně vybraných z každé skupiny vyšetřit reakce na smyslové podněty různého druhu (např. sluchové, zrakové, proprioceptivní), (8), (9), (11), síla úchopu (12) a motorická aktivita (13). Další informace o postupech, které lze použít, jsou uvedeny v příslušné literatuře. Místo postupů popsaných v této literatuře však lze použít alternativní postupy. U samců by měla tato funkční pozorování proběhnout ke konci období, kdy je jim podávána zkoušená chemická látka, krátce před naplánovaným utracením, ale před odběrem krve pro hematologické vyšetření nebo stanovení klinických biochemických ukazatelů (viz odstavce 53–56, včetně poznámky pod čarou č. 1). Samice by měly být v průběhu těchto funkčních zkoušek ve fyziologicky podobném stavu a měly by být testovány nejlépe jednou v průběhu posledního týdne laktace (např. LD 6–13), krátce před plánovaným utracením. V maximálně možné míře minimalizujte dobu oddělení samic od mláďat.

45. Pozorování funkčních poruch provedené jednou ke konci studie lze případně vynechat, pokud je studie prováděna jako předběžná pro následnou subchronickou (90denní) nebo dlouhodobou studii. V takovém případě by se mělo pozorování funkčních poruch zahrnout do této dlouhodobé studie. Dostupnost údajů o pozorovaných funkčních poruchách z této studie opakovaného podávání dávky může na druhé straně usnadnit výběr úrovní dávek pro následnou subchronickou nebo dlouhodobou studii.

46. Pozorování funkčních poruch lze výjimečně vynechat u skupin, které vykazují příznaky toxicity v takové míře, že by při posuzování funkčního stavu vadily.

47. Doba gestace se zaznamená a počítá se ode dne 0 březosti. Každý vrh se co nejdříve po porodu vyšetří a stanoví se počty a pohlaví mláďat, počet mrtvě a živě narozených mláďat, počet zakrslých mláďat (mláďat, která jsou výrazně menší než odpovídající kontrolní mláďata) a přítomnost nápadných abnormalit.

▼M8

48. Do 24 hodin po porodu (0. den nebo 1. den po porodu) a alespoň 4. den a 13. den po porodu se živá mláďata spočítají, stanoví se jejich pohlaví a zváží se. Kromě pozorování zvířat rodičovské generace (viz odstavce 43 a 44) je třeba zaznamenat jakékoli abnormální chování potomstva.

49. U každého mláděte je třeba ve stejný den po porodu v době od PND 0 do PND 4 změřit anogenitální vzdálenost (AGD). V den měření AGD by měla být zjištěna tělesná hmotnost mláděte a AGD by měla být normalizována na nějakou míru velikosti mláďat, nejlépe třetí odmocninu tělesné hmotnosti (14). Podle doporučení pokynu OECD č. 151 se v PND 12 nebo 13 spočítá počet bradavek/prsních dvorců u mladých samců (15).

Tělesná hmotnost a spotřeba potravy a vody

50. Samci a samice se váží první den podávání, poté týdně a při ukončení zkoušky. V průběhu březosti se samice zváží 0., 7., 14. a 20. den a do 24 hodin po vrhu (0. den nebo 1. den po porodu) a alespoň 4. den a 13. den po porodu. Tato pozorování se zaznamenají individuálně u každého dospělého zvířete.

51. Před obdobím páření a během březosti a laktace se alespoň jednou týdně měří příjem potravy. Měření příjmu potravy v průběhu páření je volitelné. Pokud se zkoušená chemická látka podává ve vodě, měří se v průběhu těchto období také spotřeba tohoto média.

Hematologická vyšetření

52. Jednou v průběhu studie by se měla u pěti samců a pěti samic náhodně vybraných z každé skupiny tato hematologická provést vyšetření: stanovení hematokritu, koncentrace hemoglobinu, počtu erytrocytů, retikulocytů, celkového počtu a diferenciálního rozpočtu leukocytů a trombocytů a stanovení protrombinového času. Jestliže zkoušená chemická látka nebo její domnělé metabolity mají oxidační vlastnosti nebo existuje podezření, že je mají, měly by se stanovit také koncentrace methemoglobinu a Heinzových tělísek.

53. Krevní vzorky by se měly odebírat z určeného místa. Samice by měly být při odběru ve fyziologicky podobném stavu. Za účelem vyloučení praktických problémů spojených s variabilitou při nástupu gestace se může samicím odebírat krev na konci období před pářením jako alternativa k odběru těsně před utracením zvířat nebo jako součást tohoto postupu. U samců se krev odebírá nejlépe těsně před utracením zvířat nebo jako součást tohoto postupu. Alternativně lze samcům odebírat krev také na konci období před pářením, pokud byla tato doba vybrána pro samice.

54. Krevní vzorky je třeba skladovat za vhodných podmínek.

Biochemické vyšetření

55. Klinické biochemické analýzy za účelem vyšetření hlavních toxických účinků na tkáně, a zejména na játra a ledviny, by se měly provést na krevních vzorcích od pěti vybraných samců a pěti vybraných samic z každé skupiny. Před odebráním krevních vzorků se doporučuje ponechat

▼M8

zvířata přes noc nalačno ([1]). Vyšetření plazmy a séra by mělo obsahovat stanovení sodíku, draslíku, glukózy, celkového cholesterolu, močoviny, kreatininu, celkových bílkovin a albuminu, nejméně dvou enzymů indikujících účinky na jaterní buňky (jako je alaninaminotransferáza, aspartátaminotransferáza, a sorbitoldehydrogenáza) a žlučových kyselin. Stanovení dalších enzymů (jaterního nebo jiného původu) a bilirubinu může za určitých okolností poskytnout užitečné informace.

56. Krevní vzorky z určeného místa se odebírají podle tohoto rozvrhu:

— od alespoň dvou mláďat na vrh 4. den po porodu, pokud to umožňuje počet mláďat (viz odstavce 40–41),

— od všech samic a alespoň dvou mláďat na vrh při ukončení zkoušky 13. den a

— od všech dospělých samců při ukončení zkoušky.

Všechny krevní vzorky se uchovávají za vhodných podmínek. Krevní vzorky odebrané mláďatům 13. den a dospělým samcům se vyšetří na sérové hladiny hormonů štítné žlázy (T4). Ve vhodných případech se provede další vyšetření T4 v krevních vzorcích odebraných samicím a mláďatům 4. den. Je-li to vhodné, mohou být volitelně stanoveny také hladiny jiných hormonů. Krev mláďat z vrhu lze pro potřeby analýzy hormonů štítné žlázy smíchat. Hormony štítné žlázy (T4 a TSH) se měří nejlépe jako „celek“.

57. Volitelně mohou být provedena tato vyšetření moči u pěti náhodně vybraných samců z každé skupiny v průběhu posledního týdne studie za použití časově definovaného sběru moči; vyšetření se týkají vzhledu, objemu, osmolality nebo specifické hmotnosti, pH, bílkovin, glukózy a krve/krvinek.

58. Dále by se mělo uvážit vyšetření indikátorů celkového poškození tkání v séru. Další vyšetření by mělo být provedeno, pokud mohou známé vlastnosti zkoušené chemické látky ovlivnit odpovídající metabolické profily, včetně vápníku, fosforu, triglyceridů na lačno a glukózy na lačno, specifických hormonů, methemoglobinu a cholinesterázy. To je třeba stanovit individuálně.

59. Následující faktory mohou ovlivnit variabilitu a absolutní koncentrace stanovovaných hormonů:

— doba utracení vzhledem k diurnálním odchylkám v koncentracích hormonů,

([1]) Pro řadu vyšetření séra a plazmy, zejména na glukózu, by bylo vhodné ponechat zvířata nalačno přes noc. Hlavním důvodem je, že u nehladovějících zvířat je vyšší variabilita výsledků, která by mohla maskovat jemné změny a ztížit interpretaci. Na druhé straně může mít hladovění přes noc vliv na celkový metabolismus (březích) zvířat, narušovat laktaci a chování při kojení a může narušit každodenní expozici zkoušené chemické látce, zejména ve studiích s podáváním látky v krmivu. Pokud se krev odebírá nalačno, měla by se klinická biochemická vyšetření provést až po pozorování funkčních poruch ve 4. týdnu studie u samců. Samice by se měly ponechat jeden další den po odejmutí mláďat například v den PND 13). Od 13.–14. dne laktace by samicím měly být nalačno odebrány závěrečné vzorky krve pro provedení závěrečných klinických biochemických vyšetření.

▼M8

— způsob utracení – mělo by se zabránit zbytečnému stresu zvířat, který může ovlivnit koncentrace hormonů,

— testovací soupravy pro stanovení hormonů, jejichž standardní křivky se mohou lišit.

60. Vzorky plazmy určené speciálně k stanovení hormonů by se měly odebírat zhruba ve stejnou denní dobu. Číselné hodnoty získané při analýze koncentrací hormonů se u různých komerčních testovacích souprav liší.

61. Pokud nejsou údaje o výchozích hodnotách z dřívějších pozorování dostatečné, mělo by se zvážit stanovení hematologických a klinických biochemických parametrů před začátkem podávání dávky nebo přednostně u skupiny zvířat nezahrnutých do experimentálních skupin. U samic musí být údaje od zvířat v laktaci.

PATOLOGIE

Celková pitva

62. U všech dospělých zvířat zařazených do studie by měla být provedena celková, podrobná pitva, zahrnující pečlivé vyšetření vnějšího povrchu těla, všech otvorů a lebeční, hrudní a břišní dutiny a jejich obsahu. Speciální pozornost je třeba věnovat orgánům rozmnožovací soustavy. Zaznamená se počet implantací. V den pitvy se vyšetří vaginální stěry s cílem určit stadium estrálního cyklu a umožnit korelaci s histopatologickým vyšetřením samičích reprodukčních orgánů.

63. Varlata, nadvarlata a prostata a semenné váčky s Cowperovými žlázami jako celek se u všech dospělých samců podle potřeby zbaví všech přirostlých tkání a co nejdříve po pitvě se ve vlhkém stavu zváží, aby nedošlo k vyschnutí. Kromě toho mohou být volitelně zváženy další orgány, jako jsou svaly m. levator ani a m. bulbocavernosus, Cowperovy žlázy a žalud penisu u samců a párové vaječníky (vlhká hmotnost) a děloha (včetně děložního hrdla) u samic; je-li toto vážení prováděno, mělo by k němu dojít co nejdříve po pitvě. Vaječníky, varlata, nadvarlata, přídatné pohlavní orgány a všechny orgány od všech dospělých zvířat vykazující makroskopické léze se uchovají.

64. Pro účely následného histopatologického vyšetření se uchovají v nejvhodnějším fixačním médiu štítné žlázy od všech dospělých samců a samic a od jednoho 13denního samce a jedné 13denní samice z každého vrhu. Hmotnost štítné žlázy lze stanovit po fixaci. Odříznutí by se mělo rovněž provádět velmi opatrně a teprve po fixaci, aby se zamezilo poškození tkáně. Poškození tkáně by mohlo narušit histopatologickou analýzu. Krevní vzorky by se měly odebírat z určeného místa těsně před utracením zvířat nebo v jeho průběhu a měly by se skladovat za vhodných podmínek (viz odstavec 56).

▼M8

65. Dále se játra, ledviny, nadledvinky, brzlík, slezina, mozek a srdce od alespoň pěti dospělých samců a samic náhodně vybraných z každé skupiny (kromě zvířat nalezených v agónii a/nebo zvířat utracených před ukončením studie) podle potřeby zbaví všech ulpělých tkání a co nejdříve po sekci se ve vlhkém stavu zváží, aby nedošlo k vyschnutí. Následující tkáně by se měly konzervovat v nejvhodnějším fixačním médiu s ohledem na typ tkáně a plánovaná následná histopatologická vyšetření: všechny makroskopicky viditelné léze, mozek (reprezentativní oblasti zahrnující hemisféry, mozeček a most), mícha, oko, žaludek, tenké a tlusté střevo (včetně Peyerových plátů), játra, ledviny, nadledvinky, slezina, srdce, brzlík, průdušnice a plíce (konzervované naplněním fixačním roztokem a následným ponořením), gonády (varlata a vaječníky), přídatné pohlavní orgány (děloha a hrdlo děložní, nadvarlata, prostata, semenné váčky s Cowperovými žlázami), vagina, močový měchýř, lymfatické uzliny (kromě nejproximálnější svodné uzliny by se měla odebrat ještě jedna uzlina dle laboratorních zkušeností (16)), periferní nerv (n. ischiadicus nebo n. tibialis) přednostně v blízkosti svalu, kosterní sval a kost, s kostní dření (řez nebo čerstvý nátěr z aspirované kostní dřeně). Doporučuje se fixovat varlata ponořením do Bouinova nebo modifikovaného Davidsonova fixačního média (16) (17) (18); pro tyto tkáně se nedoporučuje fixace ve formalínu. Tunica albuginea se může jemně a mělce propíchnout jehlou na obou koncích orgánu, aby se umožnilo rychlé proniknutí fixativa. Na základě klinických nebo jiných nálezů může být nezbytné zkoumat i další tkáně. Také by se měly uchovat všechny orgány považované na základě známých vlastností zkoušené chemické látky za možné cílové orgány.

66. Následující tkáně mohou poskytnout cenné svědectví o endokrinních účincích: gonády (vaječníky a varlata), přídatné pohlavní orgány (děloha včetně děložního hrdla, nadvarlata, semenné váčky s Cowperovými žlázami, dorzolaterální a ventrální prostata), vagina, hypofýza, samčí prsní žláza a nadledvinka. Změny na samčích prsních žlázách nebyly dostatečně zdokumentovány, avšak tento parametr může být velmi citlivý na látky s estrogenním působením. Pozorování orgánů/tkání, které nejsou uvedeny v odstavci 65, jsou volitelná.

67. Mrtvá mláďata a mláďata utracená 13. den po porodu nebo krátce poté je třeba alespoň pečlivě externě vyšetřit na závažné abnormality. Zvláštní pozornost je třeba věnovat vnějším rozmnožovacím orgánům, které se vyšetří na přítomnost známek změněného vývoje.

Histopatologie

68. U vybraných zvířat z kontrolní skupiny a skupiny s vysokou dávkou by mělo být provedeno celkové histologické vyšetření uchovaných orgánů a tkání (se zvláštním důrazem na stádia spermatogeneze samčích gonád a histopatologii struktury intersticiálních buněk varlat). V případě potřeby může být vyšetřena štítná žláza od mláďat a zbývajících dospělých zvířat. Toto vyšetření by mělo být rozšířeno na zvířata z ostatních dávkových skupin, pokud jsou u skupiny s vysokou dávkou pozorovány změny orgánů vyvolané zkoušenou dávkou. Pokyny k histopatologickému vyšetření (10) podrobně popisují pitvu, fixaci, tvorbu řezů a histopatologické vyšetření endokrinních tkání.

69. Měly by být zkoumány všechny makroskopické léze. Za účelem objasnění hodnot dávky bez pozorovaného nepříznivého účinku (NOAEL) je třeba vyšetřit cílové orgány v jiných dávkových skupinách, zejména ve skupinách, které údajně vykazují hodnotu dávky bez pozorovaného nepříznivého účinku.

▼M8

70. V případě použití satelitní skupiny by mělo být provedeno histopatologické vyšetření tkání a orgánů, na kterých byly pozorovány účinky u exponovaných skupin.

ÚDAJE A PŘEDKLÁDÁNÍ ZPRÁV

Údaje

71. Měly by být uvedeny údaje pro každé jednotlivé zvíře. Dále se všechny údaje shrnou do tabulek tak, aby byl u každé experimentální skupiny uveden počet zvířat na začátku zkoušky, počet zvířat uhynulých během zkoušky nebo utracených z humánních důvodů, doba úhynu nebo utracení, počet plodných samic, počet březích samic, počet zvířat vykazujících příznaky toxicity, popis pozorovaných příznaků toxicity včetně doby nástupu, trvání a závažnosti veškerých toxických účinků, druhy histopatologických změn a všechny významné údaje o vrhu. Souhrnná zpráva ve formě tabulky, která se ukázala jako velmi užitečná pro hodnocení reprodukčního/vývojového účinku, je uvedena v dodatku 3.

72. Je-li to možné, je třeba vyhodnotit číselné výsledky vhodnou a obecně uznávanou statistickou metodou. Srovnáním účinků v celém rozpětí dávkování by se mělo zamezit použití mnohonásobných t-testů. Statistické metody je třeba zvolit během plánování studie. Statistická analýza AGD a retenčních mléčných cyst by měla vycházet z údajů o jednotlivých mláďatech se zohledněním účinků na vrh. Ve vhodných případech je jednotkou analýzy vrh. Statistická analýza tělesné hmotnosti mláďat by měla vycházet z údajů o jednotlivých mláďatech se zohledněním velikosti vrhu. Vzhledem k omezené velikosti studie mají statistické analýzy ve formě testů „významnosti“ pro mnoho sledovaných vlastností, zejména pro reprodukční sledované vlastnosti, omezenou hodnotu. Některé nejčastěji používané metody, zejména parametrické testy na měření středního trendu, jsou nevhodné. Pokud se používají statistické analýzy, pak by měla být zvolená metoda vhodná pro distribuci zkoumané proměnné a měla by být zvolena před zahájením studie.

Vyhodnocení výsledků

73. Výsledky této studie reprodukční toxicity se vyhodnotí z hlediska pozorovaných účinků, pitvy a mikroskopických nálezů. V hodnocení musí být uveden vztah mezi dávkou zkoušené chemické látky a přítomností nebo nepřítomností, výskytem a závažností abnormalit včetně makroskopických lézí, stanovených cílových orgánů, neplodnosti, klinických abnormalit, vlivu na reprodukční výkonnost a schopnost vrhu, změny tělesné hmotnosti, vlivu na úmrtnost a další toxické účinky.

74. Vzhledem ke krátké době expozice samců je třeba histopatologii varlat a nadvarlat zvažovat při posuzování reprodukčních účinků u samců společně s údaji o fertilitě. Jako pomůcka pro interpretaci studie může být také užitečné použití historických kontrolních údajů o reprodukci/vývoji (např. o velikosti vrhu, AGD, retenčních mléčných cystách, sérových hladinách T4), pokud jsou tyto údaje k dispozici.

75. Za účelem kontroly jakosti se navrhuje, aby se shromáždily historické kontrolní údaje a vypočítaly se koeficienty rozptylu pro číselné údaje, zejména pro parametry spojené s detekcí endokrinních disruptorů. Tyto údaje pak lze použít pro účely srovnání při hodnocení stávajících studií.

▼M8

ZÁVĚREČNÁ ZPRÁVA

76. Závěrečná zpráva by měla obsahovat tyto informace:

Zkoušená chemická látka:

— zdroj, číslo šarže a, je-li k dispozici, datum použitelnosti,

— stabilita zkoušené chemické látky, je-li známa.

Jednosložková látka:

— fyzický vzhled, rozpustnost ve vodě a další relevantní fyzikálně-chemické vlastnosti,

— chemická identifikace, např. název podle IUPAC nebo CAS, číslo CAS, kód SMILES nebo InChI, strukturní vzorec, čistota, případně chemická identita nečistot, je-li to prakticky možné, atd.

Vícesložkové látky, UVCB a směsi:

— charakterizované pokud možno chemickou identitou (viz výše), kvantitativním výskytem a relevantními fyzikálně-chemickými vlastnostmi složek.

Vehikulum (je-li použito):

— zdůvodnění výběru vehikula, pokud není použita voda.

Pokusná zvířata:

— použitý druh/kmen,

— počet, věk a pohlaví zvířat,

— původ, podmínky chovu, strava atd.,

— hmotnost jednotlivých zvířat na začátku zkoušky,

— zdůvodnění použití druhu, pokud je jiný než potkan.

Zkušební podmínky:

— zdůvodnění zvolených úrovní dávek,

— podrobnosti o složení zkoušené chemické látky/úpravě potravy, o použité koncentraci, stálosti a homogenitě přípravku,

— podrobné údaje o podávání zkoušené chemické látky,

— popřípadě přepočet koncentrace zkoušené chemické látky v krmivu/pitné vodě (ppm) na skutečnou denní dávku (mg/kg tělesné hmotnosti/den),

— podrobnosti o jakosti krmení a vody,

— podrobný popis postupů randomizace při výběru mláďat pro třídění, jsou-li tříděna.

Výsledky:

— tělesná hmotnost/změny tělesné hmotnosti,

— spotřeba krmiva, popřípadě spotřeba vody,

▼**M8**

— údaje o toxických reakcích podle pohlaví a dávky, včetně ukazatelů plodnosti, gestace a všech dalších známek toxicity,

— délka gestace,

— toxické nebo jiné účinky na reprodukci, potomstvo, postnatální růst atd.,

— povaha, závažnost a trvání klinických projevů (ať vratných, či nevratných),

— posouzení reaktivity na smyslové podněty, úchopové síly a motorické aktivity,

— hematologická vyšetření s příslušnými základními hodnotami (normami),

— klinická biochemická vyšetření s příslušnými výchozími hodnotami (normami),

— počet dospělých samic s normálním nebo abnormálním estrálním cyklem a trváním cyklu,

— počet živě narozených mláďat a postimplantačních ztrát,

— počet mláďat s nápadnými strukturálními abnormalitami, orientační hodnocení vnějších genitálií, počet zakrslých mláďat,

— den úhynu během studie nebo údaj, že zvířata přežila až do dne utracení,

— počet implantovaných plodů, velikost vrhu a hmotnost vrhu v době pořízení záznamu,

— údaje o tělesné hmotnosti mláďat,

— AGD všech mláďat (a tělesná hmotnost v den měření AGD),

— retenční mléčné cysty u mláďat samců,

— hladiny hormonů štítné žlázy u 13denních mláďat a dospělých samců (a u samic a 4denních mláďat, jsou-li tyto hodnoty měřeny),

— tělesná hmotnost při utracení a údaje o hmotnosti orgánů u rodičovských zvířat,

— pitevní nálezy,

— podrobný popis histopatologických nálezů,

— údaje o absorpci (jsou-li k dispozici),

— statistické vyhodnocení výsledků, je-li to možné.

Rozbor výsledků.

Závěry.

▼M8

Interpretace výsledků

77. Studie poskytne hodnocení reprodukční/vývojové toxicity spojené s podáváním opakovaných dávek. Vzhledem k tomu, že důraz je kladen na sledované vlastnosti všeobecné toxicity i na sledované vlastnosti reprodukční/vývojové toxicity, umožní výsledky této studie rozlišení mezi reprodukčními/vývojovými účinky vyskytujícími se za nepřítomnosti všeobecné toxicity a účinky projevujícími se pouze při úrovních, které jsou toxické i pro rodičovská zvířata (viz odstavce 7–11). Mohla by naznačit nutnost provést další výzkum a poskytnout vodítko pro návrh dalších studií. Jako pomůcka při interpretaci výsledků v oblasti reprodukce a vývoje by měl posloužit pokyn OECD č. 43 (19). Pokyn OECD č. 106 týkající se histologického hodnocení endokrinních a reprodukčních zkoušek u hlodavců (16) poskytuje informace o přípravě a hodnocení (endokrinních) orgánů a vaginálních stěrů, což může být pro tuto zkušební metodu užitečné.

LITERATURA

(1) OECD (1990). Room Document No 1 for the 14th Joint Meeting of the Chemicals Group and Management Committee. K dispozici na vyžádání u Organizace pro hospodářskou spolupráci a rozvoj, Paříž.

(2) OECD (1992). Chairman's Report of the ad hoc Expert Meeting on Reproductive Toxicity Screening Methods, Tokyo, 27th-29th October, 1992. K dispozici na vyžádání u Organizace pro hospodářskou spolupráci a rozvoj, Paříž.

(3) Mitsumori K., Kodama Y., Uchida O., Takada K., Saito M. Naito K., Tanaka S., Kurokawa Y., Usami, M., Kawashima K., Yasuhara K., Toyoda K., Onodera H., Furukawa F., Takahashi M. and Hayashi Y. (1994). Confirmation Study, Using Nitro-Benzene, of the Combined Repeat Dose and Reproductive/ Developmental Toxicity Test Protocol Proposed by the Organization for Economic Cooperation and Development (OECD). J. *Toxicol*, Sci., 19, 141-149.

(4) Tanaka S., Kawashima K., Naito K., Usami M., Nakadate M., Imaida K., Takahashi M., Hayashi Y., Kurokawa Y. and Tobe M. (1992). Combined Repeat Dose and Reproductive/Developmental Toxicity Screening Test (OECD): Familiarization Using Cyclophosphamide. Fundam. Environ. *Toxicol*., 18, 89-95.

(5) OECD (1998). Report of the First Meeting of the OECD Endocrine Disrupter Testing and Assessment (EDTA) Task Force, 10th-11th March 1998, Available upon request at Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris

(6) OECD (2015). Feasibility Study for Minor Enhancements of TG 421/422 with ED Relevant Endpoints. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 217), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(7) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment, and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluations, Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (No 19), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

▼**M8**

(8) Goldman J.M., Murr A.S., Buckalew A.R., Ferrell J.M.and Cooper R.L. (2007). The Rodent Estrous Cycle: Characterization of Vaginal Cytology and its Utility in Toxicological Studies, *Birth Defects Research*, Part B, 80 (2), 84-97.

(9) Sadleir R.M.F.S. (1979). Cycles and Seasons, in Auston C.R. and Short R.V. (Eds.), Reproduction in Mammals: I. Germ Cells and Fertilization, Cambridge, New York.

(10) IPCS (1986). Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals. Environmental Health Criteria Document (No 60).

(11) Moser V.C., McDaniel K.M. and Phillips P.M. (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of Amitraz. *Toxicol*. Appl. *Pharmacol*., 108, 267-283.

(12) Meyer O.A., Tilson H.A., Byrd W.C. and Riley M.T. (1979). A Method for the Routine Assessment of Fore- and Hindlimb Grip Strength of Rats and Mice. Neurobehav. *Toxicol*., 1, 233-236.

(13) Crofton K.M., Howard J.L., Moser V.C., Gill M.W., Reiter L.W., Tilson H.A., MacPhail R.C. (1991). Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. Neurotoxicol. Teratol. 13, 599-609.

(14) Gallavan R.H. Jr, J.F. Holson, D.G. Stump, J.F. Knapp and V.L. Reynolds. (1999). „Interpreting the Toxicologic Significance of Alterations in Anogenital Distance: Potential for Confounding Effects of Progeny Body Weights“, Reproductive Toxicology, 13: 383-390.

(15) OECD (2013). Guidance Document in Support of the Test Guideline on the Extended One Generation Reproductive Toxicity Study. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 151). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(16) OECD (2009). Guidance Document for Histologic Evaluation of Endocrine and Reproductive Tests in Rodents. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 106) Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(17) Hess RA and Moore BJ. (1993). Histological Methods for the Evaluation of the Testis. V: Methods in Reproductive Toxicology, Chapin RE and Heindel JJ (Eds.). Academic Press: San Diego, CA, pp. 52-85.

(18) Latendresse JR, Warbrittion AR, Jonassen H, Creasy DM. (2002). Fixation of Testes and Eyes Using a Modified Davidson's Fluid: Comparison with Bouin's Fluid and Conventional Davidson's fluid. *Toxicol. Pathol*. 30, 524-533.

(19) OECD (2008). Guidance Document on Mammalian Reproductive Toxicity Testing and Assessment. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 43), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(20) OECD (2011), Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption (No 150), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

▼**M8**

Dodatek 1

DEFINICE (VIZ TAKÉ (20) POKYN OECD Č. 150)

Androgenicita je schopnost chemické látky působit v organismu savců jako přirozený androgenní hormon (např. testosteron).

Antiandrogenicita je schopnost chemické látky potlačit v organismu savců působení přirozeného androgenního hormonu (např. testosteronu).

Antiestrogenicita je schopnost chemické látky potlačit v organismu savců působení přirozeného estrogenního hormonu (např. estradiolu 17ß).

Antityreoidální působení je schopnost chemické látky potlačit v organismu savců působení přirozeného hormonu štítné žlázy (např. T_3).

Chemická látka je látka nebo směs.

Vývojová toxicita projev reprodukční toxicity představující prenatální, perinatální, postnatální, strukturální nebo funkční poruchy u potomstva.

Dávkou se rozumí množství podané zkoušené chemické látky. Dávka se vyjadřuje jako hmotnost zkoušené chemické látky na jednotku tělesné hmotnosti zvířete za den (např. mg/kg tělesné hmotnosti/den) nebo jako konstantní koncentrace v krmivu.

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

Zřejmá toxicita je obecný termín popisující jasné příznaky toxicity po podání zkoušené chemické látky. Ty by měly být dostačující pro posouzení nebezpečnosti a měly by být takové, že při zvýšení podávané dávky lze očekávat rozvoj závažných toxických příznaků a pravděpodobnou mortalitu.

Porucha plodnosti představuje poruchy samčích nebo samičích reprodukčních funkcí nebo schopnosti.

Mateřská toxicita nežádoucí účinky na březí samice vyskytující se buď specificky (přímý účinek), nebo nespecificky (nepřímý účinek), které souvisí s graviditou.

NOAEL je zkratka pro angl. „no-observed-adverse-effect level“. Je to nejvyšší úroveň dávky, při které nejsou pozorovány žádné nepříznivé účinky spojené se zkouškou.

Estrogenicita je schopnost chemické látky působit v organismu savců jako přirozený estrogenní hormon (např. estradiol 17ß).

Reprodukční toxicita představuje škodlivé účinky na potomstvo a/nebo poruchy samčích nebo samičích reprodukčních funkcí nebo schopnosti.

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

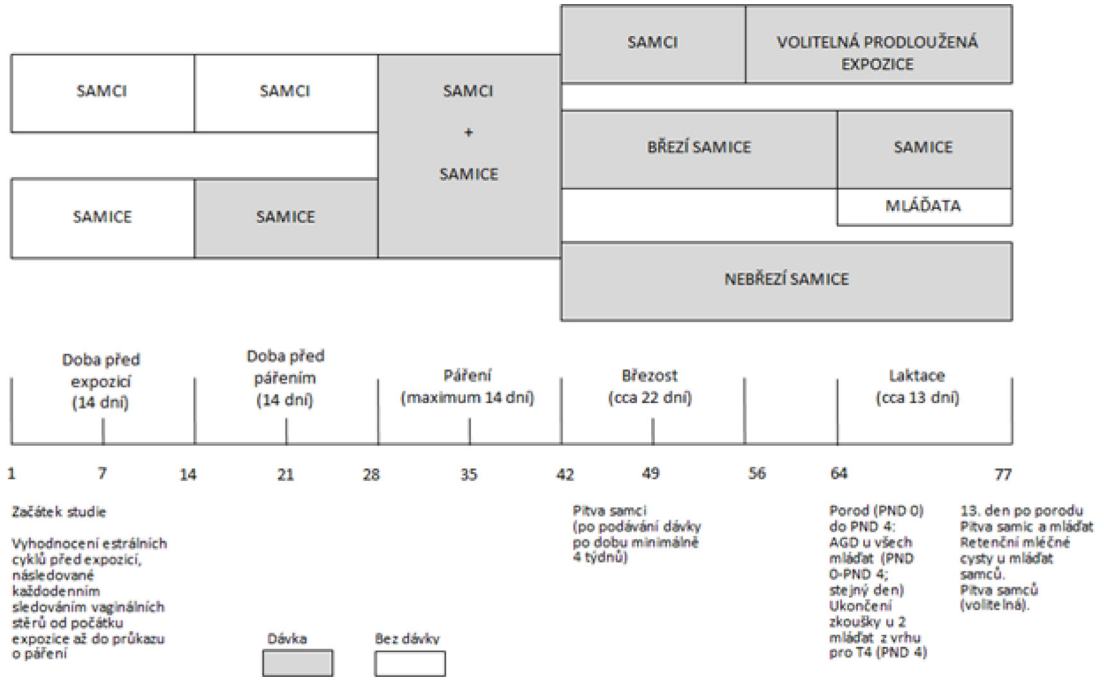
Tyreoidální působení je schopnost chemické látky působit jako přirozený hormon štítné žlázy (např. T_3) v organismu savců.

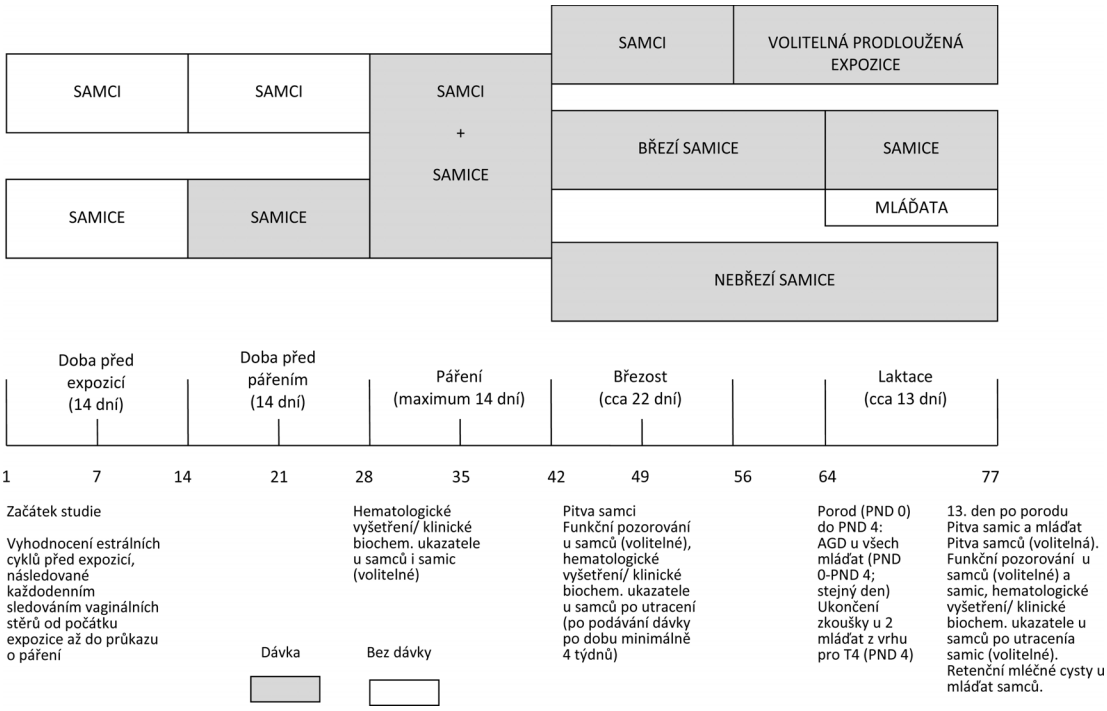
Validace je vědecký proces, jehož cílem je charakterizovat provozní požadavky a provozní omezení zkušební metody a prokázat její spolehlivost a relevantnost pro určitý konkrétní účel.

▼**M8**

Dodatek 2

DIAGRAM ČASOVÉHO PLÁNU EXPERIMENTU SE ZNÁZORNĚNÍM MAXIMÁLNÍ DÉLKY STUDIE NA ZÁKLADĚ CELÉHO ČTRNÁCTIDENNÍHO OBDOBÍ PÁŘENÍ





▼**M8**

Dodatek 3

SOUHRNNÁ ZPRÁVA O ÚČINCÍCH NA REPRODUKCI/VÝVOJ VE FORMĚ TABULKY

POZOROVÁNÍ	HODNOTY				
Dávka (jednotky).....	0 (kontrola)	...	...	...	...
Páry na začátku (N)					
Estrální cyklus (alespoň střední délka a frekvence nepravidelných cyklů)					
Samice vykazující známky kopulace (N)					
Zabřezlé samice (N)					
Dny zabřeznutí 1–5 (N)					
Dny zabřeznutí 6–... ([1]) (N)					
Březost≤21 dnů (N)					
Březost = 22 dnů (N)					
Březost ≥ 23 dnů (N)					
Samice s živými novorozenými mláďaty (N)					
Samice s živými novorozenými mláďaty 4. den po porodu (N)					
Implantace/samice (průměr)					
Živá mláďata/samice při narození (průměr)					
Živá mláďata/samice 4. den (průměr)					
Poměr pohlaví (samec/samice) při narození (průměr)					
Poměr pohlaví (samec/samice) 4. den (průměr)					
Hmotnost vrhu při narození (průměr)					
Hmotnost vrhu 4. den (průměr)					
Hmotnost mláďat při narození (průměr)					
Hmotnost mláďat v době měření AGD (průměr samců, průměr samic)					
AGD mláďat ve stejný postnatální den, při narození – 4. den (průměr samců, průměr samic, uvést PND)					
Hmotnost mláďat 4. den (průměr)					
Hmotnost mláďat 13. den (průměr)					

▼M8

POZOROVÁNÍ	HODNOTY				
Retenční mléčné cysty u mladých samců 13. den (průměr)					
ABNORMÁLNÍ MLÁĎATA					
Samice s 0					
Samice s 1					
Samice s ≥ 2					
ZTRÁTA POTOMSTVA					
Prenatální (implantace minus živě narozená mláďata)					
Samice s 0					
Samice s 1					
Samice s 2					
Samice s ≥ 3					
Postnatální (živě narozená mláďata minus živá mláďata 13. den po porodu)					
Samice s 0					
Samice s 1					
Samice s 2					
Samice s ≥ 3					

([1]) poslední den období páření

▼M8

B.65 ZKUŠEBNÍ METODA S VYUŽITÍM MEMBRÁNOVÉ BARIÉRY *IN VITRO* PRO LEPTAVÉ ÚČINKY NA KŮŽI

ÚVOD

1. Tato zkušební metoda je rovnocenná Pokynu OECD pro zkoušení č. 435 (2015). Leptavými účinky na kůži se označuje vyvolání nevratného poškození kůže, které se projevuje jako viditelná, do koria zasahující nekróza pokožky, po aplikaci zkoušené chemické látky, jak ji definuje globálně harmonizovaný systém klasifikace a označování chemických látek Organizace spojených národů (GHS OSN) (1) a nařízení Evropské unie (EU) č. 1272/2008 o klasifikaci, označování a balení látek a směsí (dále jen „nařízení CLP“) ([1]). Tato zkušební metoda, rovnocenná aktualizovanému Pokynu OECD pro zkoušení č. 435, představuje zkušební metodu s využitím membránové bariéry *in vitro*, kterou lze použít na určení žíravých chemických látek. Zkušební metoda využívá umělou membránu navrženou tak, aby reagovala na žíravé chemické látky podobně jako zvířecí kůže *in situ*.

2. Leptavé účinky na kůži se tradičně posuzují aplikací zkoušené chemické látky na kůži živých zvířat, kdy se vyhodnotí rozsah poškození tkáně po stanoveném časovém období (2). Kromě této zkušební metody byla přijata řada jiných zkušebních metod *in vitro* jako alternativy (3) (4) ke standardnímu postupu zkoušení na kůži králíka *in vivo* (kapitola B.4 této přílohy, rovnocenná Pokynu OECD pro zkoušení č. 104), který se používá na určení žíravých chemických látek (2). Strategie odstupňovaného zkoušení a hodnocení podle systému GHS OSN pro hodnocení a klasifikaci leptavých účinků na kůži a dokument OECD k integrovanému přístupu ke zkouškám a posuzování (IATA) látek dráždivých/leptavých pro kůži doporučuje použití validovaných a uznávaných zkušebních metod *in vitro* podle modulů 3 a 4 (1) (5). Integrované přístupy ke zkouškám a posuzování popisují několik modulů, které seskupují informační zdroje a analytické nástroje, a i) poskytují návod na integraci a používání stávajících údajů ze zkoušek i jiných údajů pro posouzení potenciálu dráždivých a leptavých účinků chemických látek na kůži a ii) navrhují přístup, když je nutné další zkoušení, včetně případů, kdy jsou zjištěny negativní výsledky (5). V tomto modulárním přístupu mohou být pozitivní výsledky zkušebních metod *in vitro* použity pro klasifikaci chemické látky jako žíravé bez nutnosti zkoušek na zvířatech, čímž se snižuje a kultivuje použití zvířat a vyloučí se bolest a stres, k nimž může dojít, když jsou pro tento účel používána zvířata.

3. Byly dokončeny validační studie pro model s membránovou bariérou *in vitro*, které jsou komerčně dostupné jako Corrositex® (6)(7)(8), vykazující celkovou přesnost predikce leptavých účinků na kůži 79 % (128/163), citlivost 85 % (76/89) a specifičnost 70 % (52/74) u databáze 163 látek a směsí (7). Na základě uznávané validity byla tato validovaná referenční metoda (VRM) doporučena pro použití jako součást strategie odstupňovaného zkoušení pro hodnocení potenciálního rizika leptavých účinků chemických látek na kůži (5) (7). Před použitím použít modelu s membránovou bariérou *in vitro* pro leptavé účinky na kůži pro regulační účely, je zapotřebí stanovit jeho spolehlivost, relevantnost (přesnost) a omezení týkající se jeho navrhovaného použití, aby se zajistila jeho podobnost s VRM (9) v souladu

([1]) Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1272/2008 ze dne 16. prosince 2008 o klasifikaci, označování a balení látek a směsí, o změně a zrušení směrnic 67/548/EHS a 1999/45/ES a o změně nařízení (ES) č. 1907/2006, Úř. věst. L 353, 31.12.2008, s. 1.

▼M8

se stanovenými požadavky standardů funkčnosti (10). Vzájemné uznávání údajů bude v rámci OECD zaručeno až poté, co bude každá navrhovaná nebo aktualizovaná metoda podle standardů funkčnosti podrobena revizi a zahrnuta do rovnocenného pokynu OECD pro zkoušení. V současnosti se Pokyn OECD pro zkoušení č. 435 a tato zkušební metoda týká pouze jedné metody *in vitro*, a to komerčně dostupného modelu Corrositex®.

4. Jiné zkušební metody pro zkoušení leptavých účinků na kůži vycházejí z použití rekonstruované lidské kůže (Pokyn OECD pro zkoušení č. 431) (3) a izolované kůže potkana (Pokyn OECD pro zkoušení č. 430) (4). Tento pokyn také stanoví podrobnější klasifikaci žíravých chemických látek do tří podkategorií žíravých látek podle systému GHS OSN a tří přepravních obalových skupin podle systému OSN pro nebezpečí žíravé látky. Tento pokyn byl původně přijat v roce 2006 a v roce 2015 byl aktualizován o odkazy na pokyny IATA a aktualizaci seznamu vhodných látek.

DEFINICE

5. Použité definice jsou uvedeny v dodatku.

VÝCHOZÍ ÚVAHY A OMEZENÍ

6. Zkouška popsaná v této zkušební metodě umožňuje určení žíravých zkoušených látek a dále umožňuje podrobnou klasifikaci žíravých zkoušených chemických látek podle systému GHS OSN/CLP (tabulka 1). Kromě toho může být taková zkušební metoda použita pro rozhodnutí o žíravosti a nežíravosti konkrétních tříd chemických látek, např. organických a anorganických kyselin, derivátů kyselin ([1]) a zásad pro některé účely zkoušení v oblasti přepravy (7)(11)(12). Tato zkušební metoda popisuje obecný postup podobný validované referenční zkušební metodě (7). I když tato zkušební metoda neposkytuje odpovídající informace o dráždivosti pro kůži, je třeba poznamenat, že zkušební metoda B.46 (rovnocenná Pokynu OECD pro zkoušení č. 439) řeší konkrétně zdravotní účinky dráždivosti pro kůži *in vitro* (13). Pro úplné vyhodnocení lokálních účinků na kůži po jednotlivých kožních expozicích je třeba postupovat podle pokynů OECD k integrovanému přístupu ke zkouškám a posuzování (5).

Tabulka 1

Kategorie a podkategorie leptavých účinků na kůži podle systému GHS OSN ([1])

Kategorie žíravých látek (kategorie 1) (pro orgány nepoužívající podkategorie)	Podkategorie potenciálně žíravých látek ([1]) (pro orgány používající podkategorie, včetně nařízení CLP)	Žíravá u ≥ 1 ze 3 zvířat	
		Expozice	Pozorované příznaky
Žíravá	Podkategorie žíravosti 1A	≤ 3 minuty	≤ 1 hodina
	Podkategorie žíravosti 1B	> 3 minuty / ≤ 1 hodina	≤ 14 dnů
	Podkategorie žíravosti 1C	> 1 hodina / ≤ 4 hodiny	≤ 14 dnů

([1]) Pro EU používá nařízení CLP tři podkategorie látek s leptavými účinky na kůži 1A, 1B a 1C.

7. Omezení této validované referenční metody (7) spočívá v tom, že mnoho nežíravých chemických látek a některé žíravé chemické látky nemusí být vhodné pro zkoušení na základě výsledků úvodního testu kompatibility (viz odstavec 13). Vodné chemické látky s pH v rozsahu 4,5 až 8,5 často

([1]) „Derivát kyseliny“ je nespecifické označení třídy a obecně je definován jako chemická látka vzniklá z kyseliny buď přímo, anebo v důsledku úpravy či částečné substituce. Tato třída zahrnuje anhydridy, halogenové kyseliny, soli a jiné druhy chemických látek.

▼M8

nejsou pro zkoušení vhodné; 85 % chemických látek zkoušených v tomto rozmezí pH však nemělo ve zkouškách na zvířatech leptavé účinky (7). Metoda s membránovou bariérou *in vitro* může být použita na zkoušení pevných látek (rozpustných nebo nerozpustných ve vodě), kapalin (vodných a nevodných) a emulzí. Zkoušené chemické látky nevyvolávající zjistitelnou změnu při testu kompatibility (tj. barevná změna v chemickém detekčním systému (CDS) validované referenční zkušební metody) však nemohou být testovány metodou s membránovou bariérou a je třeba je testovat pomocí jiných zkušebních metod.

PRINCIP ZKOUŠKY

8. Zkušební systém sestává ze dvou komponentů: syntetické makromolekulární biobariéry a chemického detekčního systému (CDS); tato zkušební metoda detekuje přes CDS poškození membránové bariéry způsobené žíravými zkoušenými chemickými látkami po aplikaci zkoušené chemické látky na povrch syntetické makromolekulární membránové bariéry (7), pravděpodobně stejným mechanismem (mechanismy) žíravosti, který působí na živou kůži.

9. Penetraci membránové bariéry (neboli proniknutí) lze měřit podle počtu zákroků nebo pomocí chemického detekčního systému, včetně změny barvy pH indikačního barviva či některé jiné vlastnosti indikačního roztoku pod bariérou.

10. Membránová bariéra by měla být stanovena jako validní, tj. relevantní a spolehlivá, pro zamýšlené použití. Zahrnuje to zajištění, aby byly různé přípravky shodné, pokud jde o bariérové vlastnosti, např. aby dokázaly zachovat bariéru proti nežíravým chemickým látkám a aby umožňovaly klasifikaci leptavých vlastností chemických látek do různých podkategorií žíravosti podle systému GHS OSN (1). Klasifikace vychází z doby, která je potřebná k tomu, aby chemická látka pronikla přes membránovou bariéru do indikačního roztoku.

PROKÁZÁNÍ ZPŮSOBILOSTI

11. Dříve než začnou laboratoře rutinně používat metodu s membránovou bariérou *in vitro*, která dodržuje tuto zkušební metodu, měly by prokázat svou odbornou způsobilost správným určením klasifikace dvanácti vhodných látek doporučených v tabulce 2. V situacích, kdy některá z uvedených látek není k dispozici, lze v odůvodněných případech použít jinou látku, u níž jsou k dispozici odpovídající referenční údaje o použití *in vivo* a *in vitro* (např. ze seznamu referenčních chemických látek (10)), pokud budou použita stejná kritéria výběru jako kritéria popsaná v tabulce 1.

Tabulka 2

Vhodné látky ([1])

Látka ([2])	Číslo CAS	Třída chemických látek	Podkategorie GHS OSN *in vivo* ([3])	Podkategorie GHS OSN *in vitro* ([3])
Dihydrát fluoridu boritého	13 319-75-0 Org.	Anorganické kyseliny	1A	1A
Kyselina dusičná	7 697-37-2	Anorganické kyseliny	1A	1A
Chlorid fosforečný	10 026-13-8	Anorganické kyseliny	1A	1A
Valerylchlorid	638-29-9	Chloridy kyselin	1B	1B
Hydroxid sodný	1 310-73-2	Anorganické zásady	1B	1B

▼M8

Látka ([2])	Číslo CAS	Třída chemických látek	Podkategorie GHS OSN *in vivo* ([3])	Podkategorie GHS OSN *in vitro* ([3])
1-(2-aminoethyl) piperazin	140-31-8	Alifatické aminy	1B	1B
Benzensulfonylchlorid	98-09-9	Chloridy kyselin	1C	1C
N,N-dimethylbenzylamin	103-83-3	Aniliny	1C	1C
Tetraethylenepentamin	112-57-2	Alifatické aminy	1C	1C
Eugenol	97-53-0	Fenoly	NC	NC
Nonylakrylát	2 664-55-3	Akryláty/metha-kryláty	NC	NC
Hydrouhličitan sodný	144-55-8	Anorganické soli	NC	NC

([1]) Dvanáct látek uvedených výše obsahuje tři látky z každé ze tří podkategorií GHS OSN pro žíravé látky a tři nežíravé látky, které jsou běžně dostupné u komerčních dodavatelů, přičemž podkategorie GHS OSN vychází z výsledků kvalitního testování *in vivo*. Tyto látky jsou převzaty ze seznamu 40 referenčních látek, které jsou uvedeny v minimálním seznamu chemických látek určených pro prokázání přesnosti a spolehlivosti zkušebních metod, jež jsou strukturálně a funkčně podobné validované referenční zkušební metodě, a byly vybrány ze 163 referenčních chemických látek, které byly původně použity pro validaci referenční zkušební metody (Corrositex®) (7) (10) (14). Cílem tohoto výběru bylo zahrnout pokud možno chemické látky, které: byly charakteristické pro celý rozsah poleptání (např. nežíravé látky, žíravé látky přepravních obalových skupin I, II a III podle systému OSN), jež validovaná referenční metoda dokáže změřit nebo predikovat, byly charakteristické pro chemické třídy použité v průběhu validačního procesu, mají chemickou strukturu, která byla dobře definována, vyvolávaly ve validované referenční zkušební metodě reprodukovatelné výsledky, vyvolávaly v referenční zkoušce *in vivo* definitivní výsledky, byly komerčně dostupné a nebyly spojeny s příliš vysokými náklady na likvidaci odpadu (14).

([2]) Látky zkoušené v čistém stavu nebo s čistotou ≥ 90 %.

([3]) Odpovídající obalové skupiny jsou UN I, II a III pro podkategorie GHS OSN 1A, 1B, respektive 1C.

POSTUP

12. V dalších odstavcích jsou popsány složky a postupy zkušební metody využívající umělou membránovou bariéru na posouzení leptavosti (7) (15) a vycházející ze stávající validované referenční metody, tj. komerčně dostupného testu Corrositex®. Membránová bariéra a kompatibilní/indikační a kategorizační roztoky mohou být zhotoveny, připraveny nebo pořízeny komerčně, jako je tomu v případě validované referenční metody Corrositex®. Protokol vzorové zkušební metody pro validovanou referenční zkušební metodu je k dispozici (7). Zkoušení je třeba provádět při teplotě okolí (17–25 °C) a jednotlivé složky by měly splňovat tyto podmínky.

Zkouška kompatibility zkoušené chemické látky

13. Před provedením zkoušky s membránovou bariérou se provádí zkouška kompatibility za účelem stanovení, zda chemický detekční systém dokáže zkoušenou chemickou látku detekovat. Jestliže chemický detekční systém nedetekuje zkoušenou chemickou látku, není zkušební metoda využívající membránovou bariéru vhodná pro posouzení potenciálních leptavých účinků této konkrétní zkoušené chemické látky a je třeba použít jinou zkušební metodu. Chemický detekční systém a podmínky expozice použité pro zkoušku kompatibility by měly odrážet expozici při následné zkoušce s membránovou bariérou.

Zkouška časové kategorie zkoušené chemické látky

14. Pokud je to pro zkušební metodu vhodné, měla by být zkoušená chemická látka, která prošla zkouškou kompatibility, podrobena zkoušce časové kategorie, tj. screeningové zkoušce na rozlišení slabých a silných kyselin nebo zásad. Například ve validované referenční zkušební metodě se časová kategorizační zkouška používá na zjištění, který ze dvou časových rámců má být

▼M8

použit, a to podle toho, zda je detekována významná kyselá nebo zásaditá rezerva. Na stanovení žíravosti a podkategorie leptavých účinků na kůži podle systému GHS OSN by se měly použít dva různé limitní časové rámce, a to podle kyselé nebo zásadité rezervy zkoušené chemické látky.

SLOŽKY ZKUŠEBNÍ METODY S MEMBRÁNOVOU BARIÉROU

Membránová bariéra

15. Membránová bariéra sestává ze dvou komponentů: bílkovinného makromolekulárního vodného gelu a propustné nosné membrány. Bílkovinný gel by měl být nepropustný pro kapaliny a pevné látky, ale při naleptání by měl začít propouštět. Kompletně zhotovená membránová bariéra by měla být uchovávána za předem určených podmínek, které prokazatelně vylučují znehodnocení gelu, např. vysušení, mikrobiální růst, posun, prasknutí, které by mohlo degradovat jeho funkčnost. Je třeba stanovit přijatelnou dobu uchovávání a po jejím uplynutí přípravky s membránovou bariérou nepoužívat.

16. Propustná nosná membrána představuje mechanickou oporu pro bílkovinný gel v průběhu procesu vzniku gelu a expozice zkoušené chemické látce. Nosná membrána by měla zabránit průhybu nebo posunu gelu a měla by být dobře prostupná pro všechny zkoušené chemické látky.

17. Bílkovinový gel složený z bílkovin, např. keratinu, kolagenu nebo směsí bílkovin, který vytváří gelovou matrici, slouží jako cíl pro zkoušenou chemickou látku. Bílkovinový materiál se umístí na povrch nosné membrány a umožní se prostup do gelu, než se membránová bariéra umístí na indikační roztok. Bílkovinový gel by měl mít všude stejnou tloušťku a hustotu a neměly by v něm být žádné vzduchové bublinky ani vady, které by mohly ovlivnit jeho funkční neporušenost.

Chemický detekční systém (CDS)

18. Indikační roztok, což je stejný roztok, jaký se používá pro zkoušku kompatibility, by měl reagovat na přítomnost zkoušené chemické látky. Používá se pH indikační barvivo nebo kombinace barviv, *např.* kresolová červeň a methyloranž, které ukážou změnu barvy v reakci na přítomnost zkoušené chemické látky. Systém měření může být vizuální nebo elektronický.

19. Je třeba posoudit relevantnost a spolehlivost detekčních systémů, které jsou vyvinuty pro detekci průchodu zkoušené chemické látky přes bariérovou membránu, aby bylo možné prokázat rozsah chemických látek, které lze detekovat, a kvantitativní limity detekce.

POSTUP ZKOUŠKY

Sestavení komponentů zkušební metody

20. Membránová bariéra se vloží do lavičky (nebo zkumavky) obsahující indikační roztok tak, aby byla nosná membrána úplně v kontaktu s indikačním roztokem a aby na ní nebyly žádné vzduchové bublinky. Je třeba dbát na to, aby bariéra nebyla porušena.

▼M8

Aplikace zkoušené chemické látky

21. Na horní povrch membránové bariéry se pečlivě nanese a rovnoměrně rozprostře vhodné množství zkoušené chemické látky, např. 500 µl kapaliny nebo 500 mg jemně rozdrcené pevné látky (7). Pro každou zkoušenou chemickou látku a odpovídající kontroly se připraví vhodný počet replikátů, např. čtyři (7) (viz odstavce 23 až 25). Čas nanesení zkoušené chemické látky na membránovou bariéru se zaznamená. Aby bylo zajištěno přesné zaznamenání krátkých dob leptání, časy aplikace zkoušené chemické látky do lahviček s replikáty se rozloží.

Měření průniku přes membránovou bariéru

22. Každá lahvička se řádně sleduje a zaznamená se čas první změny indikačního roztoku, tj. průnik přes bariéru, a určí se doba, která uplynula mezi aplikací a průnikem přes membránovou bariéru.

Kontroly

23. U zkoušek, které zahrnují použití vehikula nebo rozpouštědla se zkoušenou chemickou látkou, by vehikulum nebo rozpouštědlo mělo být kompatibilní se systémem membránové bariéry, tj. nemělo by narušit neporušenost systému membránové bariéry a měnit leptavé účinky zkoušené chemické látky. V případě potřeby je třeba kontrolu s rozpouštědlem (nebo vehikulem) zkoušet souběžně se zkoušenou chemickou látkou, aby se prokázala kompatibilita rozpouštědla se systémem membránové bariéry.

24. Pozitivní (leptavé účinky) kontrolu se střední žíravostí, např. 110 ± 15 mg hydroxidu sodného (podkategorie žíravých látek 1B podle systému GHS OSN) (7), je třeba provádět souběžně se zkoušenou chemickou látkou, aby bylo možné posoudit, zda zkušební systém funguje přijatelným způsobem. Pro hodnocení relativního leptavého potenciálu žíravé zkoušené chemické látky může být užitečná druhá pozitivní kontrola s látkou ze stejné chemické třídy jako zkoušená chemická látka. Pozitivní kontrolu (kontroly) je třeba volit tak, aby byly její leptavé účinky střední (např. podkategorie 1B podle GHS OSN), aby bylo možné detekovat změny doby průniku, které by mohly být nepřijatelně delší nebo kratší než stanovená referenční hodnota, což by naznačovalo, že zkušební systém nefunguje správně. Pro tento účel jsou extrémně žíravé (podkategorie 1A podle GHS OSN) nebo nežíravé chemické látky jen málo vhodné. Žíravá chemická látka podkategorie 1B podle GHS OSN by umožňovala detekci příliš rychlé nebo příliš pomalé doby průniku. Pro pozitivní kontrolu by mohla být použita slabě žíravá látka (podkategorie 1C podle GHS OSN) pro měření schopnosti zkušební metody konzistentně rozlišovat mezi slabě žíravými a nežíravými chemickými látkami. Bez ohledu na použitý přístup by měl být přijatelný rozsah odezvy pozitivní kontroly stanoven podle dosavadního rozsahu dob průniku u použité pozitivní kontroly (kontrol), například střední hodnota ± 2–3 směrodatné odchylky. V každé studii by měla být přesná doba průniku stanovena pro pozitivní kontrolu tak, aby mohly být detekovány odchylky mimo přijatelný rozsah.

25. Jako další opatření pro kontrolu kvality za účelem prokázání funkčnosti membránové bariéry by měla být souběžně se zkoušenou chemickou látkou provedena také negativní (látka bez leptavých účinků) kontrola, např. 10 % kyselina citronová, 6 % kyselina propionová (7).

▼M8

Kritéria přijatelnosti studie

26. Na predikci leptavých účinků zkoušené chemické látky se podle stanovených časových parametrů pro jednotlivé podkategorie leptavých účinků GHS OSN použije doba (v minutách), která uplynula mezi aplikací zkoušené chemické látky na membránovou bariéru a průnikem přes bariéru. Aby mohla být studie považována za přijatelnou, měla by souběžná pozitivní kontrola ukázat očekávanou dobu průniku (např. pokud je jako pozitivní kontrola použit hydroxid sodný, je doba průniku 8–16 minut), souběžná negativní kontrola by neměla vykazovat leptavé účinky, a pokud je zařazena souběžná kontrola s rozpouštědlem, neměla by tato kontrola vykazovat leptavé účinky ani by neměla měnit potenciál žíravosti zkoušené chemické látky. Před rutinním používáním metody, která se řídí touto zkušební metodou, by laboratoře měly prokázat odbornou způsobilost při použití dvanácti látek doporučených v tabulce 2. U nových metod typu „mee-too“ vyvinutých podle této zkušební metody, které jsou strukturálně a funkčně podobné validované referenční metodě (14), by měly být použity předem definované standardy funkčnosti na prokázání spolehlivosti a přesnosti nové metody, než bude tato metoda použita pro zkoušení pro regulační účely (10).

Interpretace výsledků a klasifikace žíravosti zkoušených chemických látek

27. Pro klasifikaci zkoušené chemické látky do podkategorií žíravosti podle systému GHS OSN (1), případně podle přepravních obalových skupin OSN (16) se používá doba (v minutách), která uplynula mezi aplikací zkoušené chemické látky na membránovou bariéru a průnikem přes bariéru. Pro každou navrhovanou zkušební metodu jsou stanoveny hraniční časové hodnoty pro každou ze tří podkategorií žíravosti. Konečné rozhodnutí o hraničních časových hodnotách by mělo vzít v úvahu nutnost minimalizovat podhodnocenou klasifikaci rizika leptavých účinků (tj. falešně negativní výsledky). V současném pokynu pro zkoušení by měly být použity hraniční časové hodnoty testu Corrositex® uvedené v tabulce 3, neboť tento test představuje jedinou zkušební metodu, která v současnosti odpovídá pokynu pro zkoušení (7).

Tabulka 3

Predikční model Corrositex®

Střední doba průniku (min)		Predikce podle GHS OSN ([3])
Zkoušené chemické látky kategorie 1 ([1]) (stanovené podle kategorizační zkoušky metody)	Zkoušené chemické látky kategorie 2 ([2]) (stanovené podle kategorizační zkoušky metody)	
0–3 min	0–3 min	Žíravá doplňková podkategorie 1A
> 3 až 60 min	> 3 až 30 min	Žíravá doplňková podkategorie 1B
> 60 až 240 min	> 30 až 60 min	Žíravá doplňková podkategorie 1C
> 240 min	> 60 min	Nežíravá

([1]) Zkoušené chemické látky s vysokou kyselou/zásaditou rezervou (6)
([2]) Zkoušené chemické látky s nízkou kyselou/zásaditou rezervou (6)
([3]) Podkategorie 1A, 1B a 1C podle systému GHS OSN odpovídají obalovým skupinám OSN I, II, respektive III.

▼M8

ÚDAJE A PŘEDKLÁDÁNÍ ZPRÁV

Údaje

28. Doba (v minutách), která uplynula mezi aplikací a průnikem přes bariéru u zkoušené chemické látky a pozitivní kontroly (kontrol), se vykazuje ve formě tabulky jako údaje o jednotlivých replikátech a střední hodnoty ± směrodatné odchylky pro každou zkoušku.

ZÁVĚREČNÁ ZPRÁVA

29. Závěrečná zpráva by měla obsahovat tyto informace:

Zkoušené chemické látky a kontrolní látky

— jednosložková látka: chemická identifikace, např. název podle IUPAC nebo CAS, číslo CAS, kód SMILES nebo InChI, strukturní vzorec, čistota, případně chemická identita nečistot, je-li to prakticky možné, atd.

— vícesložková látka, UVCB a směs: charakterizované pokud možno chemickou identitou (viz výše), kvantitativním výskytem a relevantními fyzikálně-chemickými vlastnostmi složek,

— fyzický vzhled, rozpustnost ve vodě a další relevantní fyzikálně-chemické vlastnosti,

— zdroj, číslo šarže, jsou-li k dispozici,

— případně ošetření zkoušené chemické látky / kontrolní látky před zkoušením (např. zahřátí, mletí),

— stabilita zkoušené chemické látky, datum použitelnosti nebo datum opětovné analýzy, je-li známo,

— podmínky skladování.

Vehikulum:

— identifikace, koncentrace (podle potřeby), použitý objem,

— zdůvodnění výběru vehikula.

Model s membránovou bariérou in vitro a použitý protokol, včetně prokázané přesnosti a spolehlivosti

Zkušební podmínky:

— popis použitého zařízení a postupů přípravy,

— zdroj a složení použité membránové bariéry *in vitro*,

— složení a vlastnosti indikačního roztoku,

— metoda detekce,

— množství zkoušené chemické látky a kontrolní látky,

— počet opakování,

— popis a odůvodnění časové kategorizační zkoušky,

▼**M8**

— způsob aplikace,

— doby pozorování,

— popis použitých hodnotících kritérií a klasifikačních kritérií,

— prokázání způsobilosti při provádění zkušební metody před rutinním použitím při zkoušení chemických látek pro prokázání způsobilosti.

Výsledky:

— jednotlivá nezpracovaná data z jednotlivých zkoušek a kontrolních vzorků pro každý replikát ve formě tabulky,

— popis ostatních pozorovaných účinků,

— odvozená klasifikace s odkazem na použitý predikční model / kritéria rozhodování.

Diskuse o výsledcích

Závěry

LITERATURA

(1) United Nations (UN) (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Fifth Revised Edition, UN New York and Geneva, 2013. Dostupné na internetových stránkách: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html.

(2) Kapitola B.4 této přílohy, Akutní dráždivé/leptavé účinky na kůži.

(3) Kapitola B.40a této přílohy, Leptavé účinky na kůži *in vitro*: zkušební metoda za použití rekonstruované lidské epidermis (RHE).

(4) Kapitola B.40 této přílohy, Leptavé účinky na kůži *in vitro*: Transkutánní elektrický odpor (TER).

(5) OECD (2015). Guidance Document on Integrated Approaches to Testing and Assessment of Skin Irritation/Corrosion. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (No 203). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(6) Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdaile, D.J., Holzhutter, H.-G. and Liebsch, M. (1998). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Skin Corrosivity. 2. Results and Evaluation by the Management Team. Toxicology *In Vitro* 12, 483-524.

(7) ICCVAM (1999). Corrositex®. An *In Vitro* Test Method for Assessing Dermal Corrosivity Potential of Chemicals. The Results of an Independent Peer Review Evaluation Coordinated by ICCVAM, NTP and NICEATM. NIEHS, NIH Publication (No 99-4495.)

(8) Gordon V.C., Harvell J.D. and Maibach H.I. (1994). Dermal Corrosion, the Corrositex® System: A DOT Accepted Method to Predict Corrosivity Potential of Test Materials. *In vitro* Skin Toxicology-Irritation, Phototoxicity, Sensitization. Alternative Methods in Toxicology 10, 37-45.

▼**M8**

(9) OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environmental, Health and Safety Publications. Series on testing and Assessment (No 34).

(10) OECD (2014). Performance Standards for the Assessment of Proposed Similar or Modified *In Vitro* Membrane Barrier Test Method for Skin Corrosion in Relation to TG 435. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Dostupné na webových stránkách: http://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/PerfStand-TG430-June14.pdf.

(11) ECVAM (2001). Statement on the Application of the CORROSITEX® Assay for Skin Corrosivity Testing. 15th Meeting of ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC), Ispra, Italy. ATLA 29, 96-97.

(12) U.S. DOT (2002). Exemption DOT-E-10904 (Fifth Revision). (September 20, 2002). Washington, D.C., U.S. DOT.

(13) Kapitola B.46 této přílohy, Dráždivost pro kůži *in vitro*: Zkušební metoda za použití rekonstruované lidské epidermis. ICCVAM (2004). ICCVAM Recommended Performance Standards for *In Vitro* Test Methods for Skin Corrosion. NIEHS, NIH Publication No 04-4510. Dostupné na internetových stránkách: http://www.ntp.niehs.nih.gov/iccvam/docs/dermal_docs/ps/ps044510.pdf.

(14) U.S. EPA (1996). Method 1120, Dermal Corrosion. Dostupné na internetových stránkách: http://www.epa.gov/osw/hazard/testmethods/sw846/pdfs/1120.pdf.

(15) United Nations (UN) (2013). UN Recommendations on the Transport of Dangerous Goods, Model Regulations, 18th Revised Edition (Part, Chapter 2.8), UN, 2013. Dostupné na internetových stránkách: http://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/unrec/rev18/English/Rev18_Volume1_Part2.pdf.

▼M8

Dodatek

DEFINICE

Přesnost: přesnost shody mezi výsledky zkušební metody a přijatými referenčními hodnotami. Je to míra funkčnosti zkušební metody a jeden z aspektů její relevantnosti. Tento pojem se často používá místo pojmu „soulad“ a rozumí se jím podíl správných výsledků zkušební metody (9).

Chemická látka: látka nebo směs.

Chemický detekční systém (CDS): vizuální nebo elektronický měřicí systém s indikačním roztokem, který reaguje na přítomnost zkoušené chemické látky, *např.* změnou indikačního barviva pH nebo kombinace barviv, jež ukáže barevnou změnu v reakci na přítomnost zkoušené chemické látky, nebo jinými druhy chemické či elektrochemické reakce.

Soulad: je měřítkem funkčnosti u zkušebních metod poskytujících kategorické výsledky a je jedním z aspektů relevantnosti. Tento pojem se někdy používá místo pojmu „přesnost“ a je definován jako podíl všech zkoušených chemických látek, které jsou správně klasifikovány jako pozitivní nebo negativní. Soulad závisí do velké míry na prevalenci pozitivních výsledků u druhů studovaných zkoušených chemických látek (9).

GHS (Globálně harmonizovaný systém klasifikace a označování chemických látek): systém navrhující klasifikaci chemických látek (látek a směsí) podle standardizovaných typů a úrovní fyzikální, zdravotní a environmentální nebezpečnosti a zabývající se příslušnými komunikačními prvky, jako jsou piktogramy, signální slova, výroky o nebezpečí, výroky o bezpečnostních opatřeních a bezpečnostní datové listy, které obsahují informace o jejich nežádoucích účincích s ohledem na ochranu lidí (včetně zaměstnavatelů, pracovníků, přepravců, spotřebitelů a osob reagujících na nouzové situace) a životního prostředí (1).

IATA: integrovaný přístup ke zkoušení a posuzování.

Směs: směs nebo roztok složený ze dvou nebo více látek.

Jednosložková látka: látka definovaná svým kvantitativním složením, v níž je přítomna jedna hlavní složka v míře alespoň 80 % hmot.

Vícesložková látka: látka definovaná svým kvantitativním složením, v níž je přítomna více než jedna hlavní složka v koncentraci ≥ 10 % hmot. a < 80 % hmot. Vícesložková látka je výsledkem výrobního procesu. Rozdíl mezi směsí a vícesložkovou látkou spočívá v tom, že směs se získá smísením dvou nebo více látek bez chemické reakce. Vícesložková látka je výsledkem chemické reakce.

NC („non-corrosive“):: nežíravá.

Standardy funkčnosti: standardy založené na validované referenční metodě, které slouží jako základ pro hodnocení srovnatelnosti navrhované zkušební metody, která je mechanicky a funkčně podobná. Zahrnují i) zásadní složky zkušební metody; ii) minimální seznam referenčních chemických látek vybraných z chemických látek používaných k prokázání přijatelné funkčnosti validované referenční metody; a iii) srovnatelné hladiny spolehlivosti a přesnosti založené na hodnotách získaných u validované referenční metody, jež by navrhovaná zkušební metoda měla prokázat při vyhodnocení za použití minimálního seznamu referenčních chemických látek (9).

▼**M8**

Relevantnost: popis vztahu zkoušky k účinku, který je předmětem zájmu, a také toho, zda je zkouška smysluplná a použitelná pro konkrétní účel. Vyjadřuje, do jaké míry zkušební metoda správně měří nebo predikuje biologický účinek, který je předmětem zájmu. Relevantnost zahrnuje také posouzení přesnosti (shody) zkušební metody (9).

Spolehlivost: měření rozsahu, v jakém může být zkušební metoda v průběhu času reprodukovatelná v laboratořích a mezi laboratořemi, když se provádí s použitím stejného protokolu. Hodnotí se na základě výpočtu vnitrolaboratorní a mezilaboratorní reprodukovatelnosti (9).

Citlivost: podíl všech pozitivních/aktivních chemických látek, které jsou na základě zkušební metody správně klasifikovány. Je měřítkem přesnosti zkušební metody, která poskytuje kategorické výsledky, a je důležitým prvkem při hodnocení relevantnosti zkušební metody (9).

Leptavé účinky na kůži *in vivo*: vyvolání nevratného poškození kůže; zejména viditelné, do koria zasahující nekrózy pokožky do čtyř hodin po aplikaci zkoušené chemické látky. Reakce po poleptání se projevují vředy, krvácením, krvavými strupy a v závěru čtrnáctidenního pozorování ztrátou barvy v důsledku vyblednutí kůže, úplnými ložisky alopecie a jizvami. K vyhodnocení sporných lézí by se měla uvážit histopatologie.

Specifičnost: podíl všech negativních/neaktivních chemických látek, které jsou na základě zkušební metody správně klasifikovány. Je měřítkem přesnosti zkušební metody, která poskytuje kategorické výsledky, a je důležitým prvkem při hodnocení relevantnosti zkušební metody (9).

Látka: chemický prvek a jeho sloučeniny v přírodním stavu nebo získané výrobním postupem, včetně jakýchkoliv aditiv potřebných pro zachování jeho stability a všech nečistot pocházejících z použitého postupu, ale s vyloučením všech rozpouštědel, která je možno oddělit bez ovlivnění stability dané látky nebo změny jejího složení.

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

UVCB: látky s neznámým nebo proměnlivým složením, komplexní reakční produkty nebo biologický materiál.

▼M8

B.66 ZKOUŠKY *IN VITRO* FORMOU STABILNĚ TRANSFEKOVANÉ TRANSAKTIVACE SLOUŽÍCÍ K DETEKCI AGONISTŮ A ANTAGONISTŮ ESTROGENOVÝCH RECEPTORŮ

VŠEOBECNÝ ÚVOD

Pokyn OECD vycházející z funkční způsobilosti

1. Tato zkušební metoda odpovídá pokynu OECD pro zkoušení (TG) 455 (2016). Pokyn č. 455 je pokyn vycházející z funkční způsobilosti (PBTG), který popisuje metodiku zkoušek *in vitro* formou stabilně transfekované transaktivace sloužící k detekci agonistů a antagonistů estrogenových receptorů (analýzy ER TA). Skládá se z několika mechanisticky a funkčně podobných zkušebních metod zjišťování agonistů a antagonistů estrogenových receptorů (tj. ERα a/nebo ERβ) a měl by usnadnit vypracování nových podobných nebo modifikovaných zkušebních metod podle zásad pro validaci stanovených v dokumentu OECD o validaci a mezinárodním uznání nových nebo aktualizovaných zkušebních metod pro posuzování nebezpečnosti (1). Plně validovanými referenčními zkušebními metodami (dodatek 2 a dodatek 3), které představují základ pro tento pokyn vycházející z funkční způsobilosti, jsou:

   — analýza STTA (2) s využitím buněčné linie (h) ERα-HeLa-9903, a

   — analýza VM7Luc ER TA (3) s využitím buněčné linie [1] VM7Luc4E2, která převážně exprimuje hERα s určitým příspěvkem od hERββ(4)(5).

   Pro vývoj a validaci podobných analýz stejného rizika jsou k dispozici standardy funkčnosti (PS) (6)(7), které by se měly používat. Umožňují včasnou změnu pokynu PBTG 455, aby mohly být do aktualizovaného pokynu přidány nové podobné analýzy; podobné analýzy však budou přidány až po přezkumu a dohodě s OECD, že splňují standardy funkčnosti. Analýzy zařazené do pokynu 455 mohou být použity libovolně pro řešení požadavků členských zemí OECD na výsledky zkoušek na transaktivaci estrogenových receptorů při využití vzájemného uznávání údajů podle postupu dohodnutého v rámci OECD.

Obecné informace a principy analýz zahrnutých do této zkušební metody

2. V roce 1998 zahájila OECD činnost vysoké priority, jejíž podstatou je revize stávajících a vytvoření nových pokynů pro screening a zkoušení potenciálních endokrinních disruptorů. V roce 2012 byl revidován koncepční rámec

[1] Do června 2016 byla tato buněčná linie označována za buněčnou linii BG1Luc. Buňky BG-1 původně popsal Geisinger et al. (1998) (35) a později je charakterizovali výzkumníci v Národním ústavu věd o zdraví a životním prostředí (NIEHS) (36). Relativně nedávno bylo objeveno, že existují dvě různé varianty buněk BG-1, které používají výzkumníci, a to BG-1 Fr a BG-1 NIEHS. Hloubková analýza zahrnující testování DNA těchto dvou variantních buněčných linií BG-1, kterou provedl Li a spolupracovníci (2014) (37), ukázala, že buněčná linie BG-1 Fr je jedinečná a že buněčná linie BG-1 NIEHS, tj. původní buněčná linie použitá při vývoji analýzy, není buněčná linie lidského karcinomu vaječníku BG1, ale že jde o variantu buněčné linie lidského karcinomu prsu MCF7. Buněčná linie použitá při analýze, původně nazývaná BG1Luc4E2 (38), se bude nyní označovat jako VM7Luc4E2 („V“ = variantní; „M7“ = buňky MCF7). Podobně se bude analýza nyní označovat jako VM7Luc ER TA. I když se mění původ buněčné linie, z níž analýza vychází, nejsou tím dotčeny publikované validační studie ani využitelnost a použití této analýzy pro screening estrogenních/antiestrogenních chemických látek.

▼**M8**

OECD pro zkoušky a hodnocení potenciálních endokrinních disruptorů. Původní i revidovaný koncepční rámec je uveden v přílohách dokumentu OECD o standardizovaných pokynech pro zkoušení a posuzování endokrinních disruptorů (*Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption*) (8). Koncepční rámec je tvořen pěti úrovněmi, které odpovídají různým úrovním biologické komplexnosti. Analýzy ER transaktivace (TA) popsané v této zkušební metodě představují úroveň 2, která zahrnuje „*analýzy in vivo poskytující údaje o vybraných endokrinních mechanismech/drahách*“. Tato zkušební metoda je pro analýzy transaktivace (TA) *in vitro* určené na zjištění agonistů a antagonistů estrogenových receptorů (ER).

3. Interakce estrogenů s estrogenovými receptory může ovlivnit transkripci estrogenem kontrolovaných genů, což může vést k indukci nebo inhibici buněčných procesů, včetně procesů nezbytných pro buněčnou proliferaci, normální vývoj plodu a reprodukční funkci (9)(10)(11). Narušení normálních estrogenních systémů může spustit nežádoucí účinky v oblasti normálního vývoje (ontogeneze), reprodukčního zdraví a správné funkce reprodukčního systému.

4. Analýzy TA *in vitro* vycházejí z přímé nebo nepřímé interakce látek se specifickým receptorem, který reguluje transkripci reportérového genového produktu. Tyto analýzy se široce používají na hodnocení genové exprese regulované specifickými jadernými receptory, jako jsou estrogenové receptory (12)(13)(14)(15)(16). Byly navrženy pro detekci estrogenní transaktivace regulované estrogenovým receptorem (17)(18)(19). Existují minimálně dva hlavní podtypy jaderných estrogenových receptorů, α a β, které jsou kódovány odlišnými geny. Příslušné bílkoviny mají různé biologické funkce i různou distribuci v tkáních a vazebnou afinitu ligandů (20)(21)(22)(23)(24)(25)(26). Jaderné ERα zprostředkovávají klasickou estrogenní odpověď (27)(28)(29)(30), a proto je většina modelů, které jsou v současnosti vyvíjeny na měření aktivace nebo inhibice estrogenových receptorů, specifická pro ERα. Analýzy se používají k určení chemických látek, které aktivují (nebo inhibují) estrogenové receptory po vazbě na ligandy, kdy se poté komplex receptor–ligand naváže na specifické responzivní elementy DNA a transaktivuje reportérový gen, přičemž výsledkem je zvýšená buněčná exprese proteinového markeru. V těchto analýzách mohou být použity různé odpovědi reportérových genů. V systémech na bázi luciferázy transformuje enzym luciferáza substrát luciferin na bioluminiscenční produkt, který může být kvantitativně změřen luminometrem. Mezi další příklady běžných reportérových genů patří fluorescenční protein a gen *LacZ*, který kóduje β-galaktosidázu, enzym, který dokáže transformovat bezbarvý substrát X-gal (5- bromo-4-chloro-indolyl-galaktopyranosid) na modrý produkt, který lze kvantifikovat pomocí spektrofotometru. Tyto reportérové geny lze rychle a levně vyhodnotit pomocí komerčně dostupných testů.

5. Validační studie analýz STTA a VM7Luc TA prokázaly svoji relevanci a spolehlivost pro zamýšlený účel (3)(4)(5)(30). Standardy funkčnosti pro analýzy ER TA na bázi luminiscence využívající buněčné linie prsu jsou uvedeny v hodnotící zprávě výboru ICCVAM týkající se zkušební metody LUMI-CELL® ER (VM7Luc ER TA): *An* In Vitro *Assay for Identifying Human Estrogen Receptor Agonist and Antagonist Activity of Chemicals* (3). Tyto standardy funkčnosti byly upraveny, aby je bylo možné použít na analýzu STTA i analýzu VM7Luc TA (2).

6. Definice a zkratky používané v této zkušební metodě jsou popsány v dodatku 1.

▼M8

Platnost a omezení analýz TA

7. Tyto analýzy jsou navrženy pro účely screeningu a stanovení priorit, ale mohou také poskytovat mechanistické informace, které lze použít při analýze průkaznosti výsledků. Týkají se transaktivace indukované chemickou vazbou na estrogenové receptory v systému *in vitro*. Výsledky proto nelze přímo extrapolovat na komplexní signalizaci a regulaci intaktního endokrinního systému *in vivo*.

8. Transaktivace zprostředkovaná estrogenovými receptory se považuje za jeden z klíčových mechanismů narušení endokrinního systému (ED), i když existují i jiné mechanismy, jejichž prostřednictvím může k tomuto narušení dojít, včetně i) interakcí s jinými receptory a enzymatickými systémy v endokrinním systému, ii) syntézy hormonů, iii) metabolické aktivace anebo inaktivace hormonů, iv) distribuce hormonů do cílových tkání a v) clearance hormonů z těla. Žádná z analýz podle této zkušební metody se nezabývá těmito způsoby účinku.

9. Tato zkušební metoda se zabývá schopností chemických látek aktivovat (tj. účinkovat jako agonisté) a také potlačovat (tj. účinkovat jako antagonisté) transkripci závislou na estrogenových receptorech. Některé chemické látky mohou v závislosti na druhu buněk vykazovat agonistické i antagonistické účinky a jsou známy jako selektivní modulátory estrogenových receptorů (SERM). Chemické látky, které jsou v těchto analýzách negativní, by před vyvozením závěru, že daná chemická látka se na receptor neváže, mohly být posouzeny v testu vazby na estrogenové receptory. Dále je pravděpodobné, že tyto analýzy budou informovat pouze o účinku původní molekuly, přičemž nelze zapomínat na omezenou metabolizační kapacitu buněčných systémů *in vitro*. Vzhledem k tomu, že při validaci byly použity pouze jednotlivé látky, nebyla řešena použitelnost na zkoušené směsi. Zkušební metoda je nicméně teoreticky použitelná i na zkoušení vícesložkových látek, UVCB a směsí. Před použitím této zkušební metody ke zkoušení vícesložkové látky, UVCB nebo směsi s cílem získat údaje pro zamýšlené regulační účely by mělo být zváženo, zda tato metoda může pro tento účel poskytnout přiměřené výsledky, a pokud ano, proč je tomu tak. Takové úvahy nejsou nutné, pokud existuje právní požadavek na zkoušení dané směsi.

10. V tabulce 1 jsou pro informaci uvedeny výsledky testu na agonistické účinky 34 látek, které byly zkoušeny oběma plně validovanými referenčními zkušebními metodami popsanými v této zkušební metodě. Z těchto látek je na základě publikovaných zpráv, včetně analýz na vazbu na ER a TA *in vitro*, anebo uterotrofní analýzy 26 klasifikováno s určitostí jako agonisté ER a 8 negativně (2)(3)(18)(31) (32)(33)(34). V tabulce 2 uvedeny výsledky testu na antagonistické účinky 15 látek, které byly zkoušeny oběma plně validovanými referenčními zkušebními metodami popsanými v této zkušební metodě. Z těchto látek jsou na základě publikovaných zpráv, včetně analýz na vazbu na ER a TA *in vitro*, 4 klasifikovány s určitostí/pravděpodobností jako antagonisté ER a 10 negativně (2)(3)(18)(31). Pokud jde o údaje uvedené v tabulce 1 a v tabulce 2, byla mezi oběma referenčními zkušebními metodami u klasifikace všech látek s výjimkou jedné (Mifepristone) 100 % shoda u analýz antagonistů, přičemž každá látka byla správně klasifikována jako agonista/antagonista ER nebo negativně. Doplňkové informace o této skupině chemických látek i o dalších chemických látkách zkoušených v analýzách STTA a VM7Luc ER TA v průběhu validačních studií jsou uvedeny ve standardech funkčnosti pro zkoušku ERTA (6)(7), dodatek 2 (tabulky 1, 2 a 3).

▼M8

Tabulka 1

Přehled výsledků z analýz STTA a VM7Luc ER TA u látek zkoušených pomocí obou analýz na agonistické účinky a klasifikovaných jako agonisté ER (POS) nebo negativní (NEG)

	Látka	Číslo CAS	STTA Assay (1)			VM7Luc ER TA Assay (2)		Zdroj údajů pro klasifikaci (4)		
			ER TA aktivita	Hodnota PC_{10} (M)	Hodnota PC_{50} (b) (M)	ER TA aktivita	Hodnota EC_{50} (b), (3) (M)	Jiné ER TA (c)	ER vazba	Uterotrofní
1	17ß-estradiol (a)	50-28-2	POS	$< 1{,}00 \times 10^{-11}$	$< 1{,}00 \times 10^{-11}$	POS	$5{,}63 \times 10^{-12}$	POS (227/227)	POS	POS
2	17α-estradiol (a)	57-91-0	POS	$7{,}24 \times 10^{-11}$	$6{,}44 \times 10^{-10}$	POS	$1{,}40 \times 10^{-9}$	POS(11/11)	POS	POS
3	17-alfa-ethinylestradiol (a)	57-63-6	POS	$< 1{,}00 \times 10^{-11}$	$< 1{,}00 \times 10^{-11}$	POS	$7{,}31 \times 10^{-12}$	POS(22/22)	POS	POS
4	17β-trenbolon	10161-33-8	POS	$1{,}78 \times 10^{-8}$	$2{,}73 \times 10^{-7}$	POS	$4{,}20 \times 10^{-8}$	POS (2/2)	NT	NT
5	19-nortestosteron (a)	434-22-0	POS	$9{,}64 \times 10^{-9}$	$2{,}71 \times 10^{-7}$	POS	$1{,}80 \times 10^{-6}$	POS(4/4)	POS	POS
6	4-kumylfenol (a)	599-64-4	POS	$1{,}49 \times 10^{-7}$	$1{,}60 \times 10^{-6}$	POS	$3{,}20 \times 10^{-7}$	POS(5/5)	POS	NT
7	4-*terc*-oktylfenol (a)	140-66-9	POS	$1{,}85 \times 10^{-9}$	$7{,}37 \times 10^{-8}$	POS	$3{,}19 \times 10^{-8}$	POS(21/24)	POS	POS
8	Apigenin (a)	520-36-5	POS	$1{,}31 \times 10^{-7}$	$5{,}71 \times 10^{-7}$	POS	$1{,}60 \times 10^{-6}$	POS(26/26)	POS	NT
9	Atrazin (a)	1912-24-9	NEG	—	—	NEG	—	NEG (30/30)	NEG	NT
10	Bisfenol A (a)	80-05-7	POS	$2{,}02 \times 10^{-8}$	$2{,}94 \times 10^{-7}$	POS	$5{,}33 \times 10^{-7}$	POS (65/65)	POS	POS
11	Bisfenol B (a)	77-40-7	POS	$2{,}36 \times 10^{-8}$	$2{,}11 \times 10^{-7}$	POS	$1{,}95 \times 10^{-7}$	POS(6/6)	POS	POS
12	Butylbenzylfthalát (a)	85-68-7	POS	$1{,}14 \times 10^{-6}$	$4{,}11 \times 10^{-6}$	POS	$1{,}98 \times 10^{-6}$	POS(12/14)	POS	NEG

▼M8

	Látka	Číslo CAS	STTA Assay [1]			VM7Luc ER TA Assay [2]		Zdroj údajů pro klasifikaci [4]		
			ER TA aktivita	Hodnota PC_{10} (M)	Hodnota PC_{50} [b] (M)	ER TA aktivita	Hodnota EC_{50} [b], [3] (M)	Jiné ER TA [c]	ER vazba	Uterotrofní
13	Kortikosteron [a]	50-22-6	NEG	—	—	NEG	—	NEG(6/6)	NEG	NT
14	Kumestrol [a]	479-13-0	POS	$1{,}23 \times 10^{-9}$	$2{,}00 \times 10^{-8}$	POS	$1{,}32 \times 10^{-7}$	POS(30/30)	POS	NT
15	Daidzein [a]	486-66-8	POS	$1{,}76 \times 10^{-8}$	$1{,}51 \times 10^{-7}$	POS	$7{,}95 \times 10^{-7}$	POS(39/39)	POS	POS
16	Diethylstilbestrol [a]	56-53-1	POS	$< 1{,}00 \times 10^{-11}$	$2{,}04 \times 10^{-11}$	POS	$3{,}34 \times 10^{-11}$	POS(42/42)	POS	NT
17	Di-n-butylftalát	84-74-2	POS	$4{,}09 \times 10^{-6}$		POS	$4{,}09 \times 10^{-6}$	POS(6/11)	POS	NEG
18	Ethylparaben	120-47-8	POS	$5{,}00 \times 10^{-6}$	(žádná hodnota PC_{50})	POS	$2{,}48 \times 10^{-5}$	POS		NT
19	Estron [a]	53-16-7	POS	$3{,}02 \times 10^{-11}$	$5{,}88 \times 10^{-10}$	POS	$2{,}34 \times 10^{-10}$	POS(26/28)	POS	POS
20	Genistein [a]	446-72-0	POS	$2{,}24 \times 10^{-9}$	$2{,}45 \times 10^{-8}$	POS	$2{,}71 \times 10^{-7}$	POS(100/102)	POS	POS
21	Haloperidol	52-86-8	NEG	—	—	NEG	—	NEG (2/2)	NEG	NT
22	Kaempferol [a]	520-18-3	POS	$1{,}36 \times 10^{-7}$	$1{,}21 \times 10^{-6}$	POS	$3{,}99 \times 10^{-6}$	POS(23/23)	POS	NT
23	Kepon [a]	143-50-0	POS	$7{,}11 \times 10^{-7}$	$7{,}68 \times 10^{-6}$	POS	$4{,}91 \times 10^{-7}$	POS(14/18)	POS	NT
24	Ketokonazol	65277-42-1	NEG	—	—	NEG	—	NEG (2/2)	NEG	NT
25	Linuron [a]	330-55-2	NEG	—	—	NEG	—	NEG (8/8)	NEG	NT
26	*meso*-Hexestrol [a]	84-16-2	POS	$< 1{,}00 \times 10^{-11}$	$2{,}75 \times 10^{-11}$	POS	$1{,}65 \times 10^{-11}$	POS(4/4)	POS	NT
27	Methyltestosteron [a]	58-18-4	POS	$1{,}73 \times 10^{-7}$	$4{,}11 \times 10^{-6}$	POS	$2{,}68 \times 10^{-6}$	POS(5/6)	POS	NT

▼M8

	Látka	Číslo CAS	STTA Assay (1)			VM7Luc ER TA Assay (2)		Zdroj údajů pro klasifikaci (4)		
			ER TA aktivita	Hodnota PC_{10} (M)	Hodnota PC_{50} (b) (M)	ER TA aktivita	Hodnota EC_{50} (b), (3) (M)	Jiné ER TA (c)	ER vazba	Uterotrofní
28	Morin	480-16-0	POS	$5{,}43 \times 10^{-7}$	$4{,}16 \times 10^{-6}$	POS	$2{,}37 \times 10^{-6}$	POS (2/2)	POS	NT
29	Norethynodrel (a)	68-23-5	POS	$1{,}11 \times 10^{-11}$	$1{,}50 \times 10^{-9}$	POS	$9{,}39 \times 10^{-10}$	POS (5/5)	POS	NT
30	*p,p*'-Methoxychlor (a)	72-43-5	POS	$1{,}23 \times 10^{-6}$	(žádná hodnota PC_{50}) (a)	POS	$1{,}92 \times 10^{-6}$	POS (24/27)	POS	POS
31	Fenobarbital (a)	57-30-7	NEG	—	—	NEG	—	NEG (2/2)	NEG	NT
32	Reserpin	50-55-5	NEG	—	—	NEG	—	NEG (4/4)	NEG	NT
33	Spironolakton (a)	52-01-7	NEG	—	—	NEG	—	NEG (4/4)	NEG	NT
34	Testosteron	58-22-0	POS	$2{,}82 \times 10^{-8}$	$9{,}78 \times 10^{-6}$	POS	$1{,}75 \times 10^{-5}$	POS (5/10)	POS	NT

Zkratky: CASRN = Chemical Abstracts Service Registry Number (registrační číslo CAS); M = molární; EC_{50} = poloviční maximální účinná koncentrace zkoušené látky; NEG = negativní; POS = pozitivní; NT = nezkoušeno; PC_{10} (a PC_{50}) = koncentrace zkoušené látky, při níž je odpověď 10 % (nebo 50 % u PC_{50}) odpovědi indukované pozitivní kontrolou (E2, 1nM) na každé destičce.

(a) Běžné látky zkoušené v analýzách STTA a VM7Luc ER TA, které byly označeny jako agonisté ER nebo negativní a použity na hodnocení přesnosti ve validační studii VM7Luc ER TA (hodnotící zpráva ICCVAM VM7Luc ER TA, tabulka 4-1 (3)).

(b) Maximální koncentrace zkoušená bez omezení způsobených cytotoxicitou nebo nerozpustností byla 1×10^{-5} M (analýza STTA) a 1×10^{-3} M (analýza VM7Luc ER TA).

(c) Číslo v závorce představuje výsledky zkoušky klasifikované jako pozitivní (POS) nebo negativní (NEG) z celého počtu citovaných studií.

(1) Hodnoty uvedené v návrhu zprávy o předběžné validaci a mezilaboratorní validaci pro analýzu stabilně transfekované transaktivace (TA) na detekci estrogenní aktivity – Analýza reportérového genu zprostředkovaného lidským estrogenovým receptorem alfa pomocí buněčné linie hER-HeLa-9903 (2).

(2) Hodnotící zpráva výboru ICCVAM o zkušební metodě LUMI-CELL® ER (VM7Luc ER TA): Metoda *in vitro* na identifikaci agonistů a antagonistů ER (3).

(3) Střední hodnoty EC_{50} byly vypočteny pomocí hodnot uvedených laboratořemi, které prováděly validační studii VM7Luc ER TA (XDS, ECVAM a Hiyoshi) (3).

(4) Klasifikace agonisty ER nebo negativní vycházela z informací uvedených v dokumentech výboru ICCVAM (BRD) pro zkušební metody na vazbu ER a TA (31) a z informací získaných z publikací zveřejněných a kontrolovaných po dokončení dokumentů BRD výboru ICCVAM (2) (3) (18) (31) (33) (34).

Poznámky: Ne každá analýza v rámci této zkušební metody měla stejná měření. V některých situacích nelze vypočítat hodnotu EC_{50}, protože není generována celá křivka dávka-účinek. Zatímco u analýzy STTA je hlavním měřítkem hodnota PC_{10}, mohou existovat i další příklady, kde PC_x poskytne užitečné informace.

▼M8

Tabulka 2

Porovnání výsledků z analýz STTA a VM7Luc ER TA u látek zkoušených pomocí obou analýz na antagonistické účinky a klasifikovaných jako antagonisté ER (POS) nebo negativní (NEG)

	Látka ([a])	CASRN	Analýza ER STTA ([1])		Analýza VM7Luc ER TA ([2])		Kandidát na účinky ER STTA ([4])	ICCVAM ([5]) Dohoda o klasifikaci	MeSH ([6]) Třída chemických látek	Třída produktu ([7])
			ER TA Činnost	Hodnota IC_{50} ([b]) (M)	ER TA Činnost	Hodnota IC_{50} ([b]), ([3]) (M)				
1	4-Hydroxytamoxifen	68047-06-3	POS	$3{,}97 \times 10^{-9}$	POS	$2{,}08 \times 10^{-7}$	středně POS	POS	Uhlovodík (cyklický)	Léčivý přípravek
2	Dibenzo[a,h]anthracen	53-70-3	POS	žádná hodnota IC_{50}	POS	žádná hodnota IC_{50}	POS	PP	Polycyklická sloučenina	Laboratorní chemická látka, přírodní produkt
3	Mifepriston	84371-65-3	POS	$5{,}61 \times 10^{-6}$	NEG	—	mírně POS	NEG	Steroid	Léčivý přípravek
4	Raloxifen-hydrochlorid	82640-04-8	POS	$7{,}86 \times 10^{-10}$	POS	$1{,}19 \times 10^{-9}$	středně POS	POS	Uhlovodík (cyklický)	Léčivý přípravek
5	Tamoxifen	10540-29-1	POS	$4{,}91 \times 10^{-7}$	POS	$8{,}17 \times 10^{-7}$	POS	POS	Uhlovodík (cyklický)	Léčivý přípravek
6	17β-estradiol	50-28-2	NEG	—	NEG	—	PN	PN	Steroid	Léčivý přípravek, veterinární látka

▼M8

	Látka ([a])	CASRN	Analýza ER STTA ([1])		Analýza VM7Luc ER TA ([2])		Kandidát na účinky ER STTA ([4])	ICCVAM ([5]) Dohoda o klasifikaci	MeSH ([6]) Třída chemických látek	Třída produktu ([7])
			ER TA Činnost	Hodnota IC_{50} ([b]) (M)	ER TA Činnost	Hodnota IC_{50} ([b]), ([3]) (M)				
7	Apigenin	520-36-5	NEG	—	NEG	—	NEG	NEG	Heterocyklická sloučenina	Barvivo, přírodní produkt, farmaceutický meziprodukt
8	Atrazin	1912-24-9	NEG	—	NEG	—	NEG	PN	Heterocyklická sloučenina	Herbicid
9	Di-n-butylftalát	84-74-2	NEG	—	NEG	—	NEG	NEG	Ester, kyselina ftalová	Kosmetická složka, průmyslová chemická látka, plastifikátor
10	Fenarimol	60168-88-9	NEG	—	NEG	—	nezkoušeno	PN	Heterocyklická sloučenina, pyrimidin	Fungicid
11	Flavon	525-82-6	NEG	—	NEG	—	PN	PN	Flavonoid, heterocyklická sloučenina	Přírodní produkt, léčivý přípravek
12	Flutamid	13311-84-7	NEG	—	NEG	—	NEG	PN	Amid	Léčivý přípravek, veterinární látka
13	Genistein	446-72-0	NEG	—	NEG	—	PN	NEG	Flavonoid, heterocyklická sloučenina	Přírodní produkt, léčivý přípravek

▼M8

	Látka ([a])	CASRN	Analýza ER STTA ([1])		Analýza VM7Luc ER TA ([2])		Kandidát na účinky ER STTA ([4])	ICCVAM ([5]) Dohoda o klasifikaci	MeSH ([6]) Třída chemických látek	Třída produktu ([7])
			ER TA Činnost	Hodnota IC_{50} ([b]) (M)	ER TA Činnost	Hodnota IC_{50} ([b]), ([3]) (M)				
14	p-n-nonylfenol	104-40-5	NEG	—	NEG	—	nezkoušeno	NEG	Fenol	Chemický mezi-produkt
15	Resveratrol	501-36-0	NEG	—	NEG	—	PN	NEG	Uhlovodík (cyklický)	Přírodní produkt

Zkratky: CASRN = Chemical Abstracts Service Registry Number (registrační číslo CAS); M = molární; IC_{50} = poloviční maximální inhibiční koncentrace zkoušené chemické látky; NEG = negativní; PN = pravděpodobně negativní; POS = pozitivní; PP = pravděpodobně pozitivní.

([a]) Běžné látky zkoušené v analýzách STTA a VM7Luc ER TA, které byly označeny jako antagonisté ER nebo negativní a použity na hodnocení přesnosti ve validační studii VM7Luc ER TA (2) (3).

([b]) Maximální koncentrace zkoušená bez omezení způsobených cytotoxicitou nebo nerozpustností byla 1×10^{-3} M (analýza STTA) a 1×10^{-5} M (analýza VM7Luc ER TA).

([1]) Zpráva o validaci analýzy stabilně transfekované transaktivace na detekci aktivity zprostředkované estrogenovými receptory, část B (2).

([2]) Hodnotící zpráva výboru ICCVAM týkající se zkušební metody LUMI-CELL®ER (VM7Luc ER TA): Metoda in vitro na identifikaci agonistů a antagonistů ER (3).

([3]) Střední hodnoty EC_{50} byly vypočteny pomocí hodnot uvedených laboratořemi, které prováděly validační studii VM7Luc ER TA (XDS, ECVAM a Hiyoshi) (3).

([4]) ER STTA aktivita se předpokládá na základě hlášených účinků známých z dosavadních údajů CERI o testování vazby na ER receptor, uterotrofní analýzy a informací shromážděných z otevřených zdrojů literatury (2).

([5]) Klasifikace antagonisty ER nebo negativní vycházela z informací uvedených v dokumentech výboru ICCVAM (BRD) pro analýzy vazby ER a TA (31) a z informací získaných z publikací zveřejněných a kontrolovaných po dokončení dokumentů BRD výboru ICCVAM (2) (3) (18) (31).

([6]) Látky byly zařazeny do jedné nebo několika chemických tříd s použitím klasifikačního systému Národní knihovny názvů léků a léčivých látek (MeSH), mezinárodně uznávané standardizované klasifikace (k dispozici na http://www.nlm.nih.gov/mesh).

([7]) Látky byly zařazeny do jedné nebo několika produktových tříd podle databanky nebezpečných látek americké Národní lékařské knihovny (k dispozici na http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB).

▼M8

SLOŽKY ANALÝZY ER TA

Zásadní složky zkoušky

11. Tato zkušební metoda se vztahuje na analýzy využívající stabilně transfekovaný nebo endogenní receptor ERα a stabilně transfekovanou reportérovou genovou konstrukci pod kontrolou jednoho nebo několika estrogenových responzivních elementů; mohou však být přítomny i jiné receptory, jako je ERβ. Jsou to zásadní složky analýzy.

Kontroly

12. Je třeba popsat východisko pro navrhované souběžné referenční standardy pro každou analýzu agonistů a antagonistů. Souběžné kontroly (negativní, rozpouštědlo a pozitivní) slouží podle potřeby jako indikace, že analýza je za zkušebních podmínek funkční a poskytuje základ pro porovnání jednotlivých experimentů; obvykle jsou součástí kritérií přijatelnosti pro daný experiment (1).

Standardní postupy kontroly kvality

13. Standardní postupy kontroly kvality by měly být prováděny tak, jak je popsáno pro každou analýzu, aby bylo zajištěno, že buněčná linie zůstane stabilní i po opakovaných pasážích, nebudou v ní mykoplazmata (tj. nebude obsahovat bakteriální kontaminaci) a uchová si schopnost podávat očekávané odpovědi zprostředkované estrogenovými receptory v průběhu času. U buněčných linií je třeba dále zkontrolovat správnou identitu a další kontaminanty (např. houby, kvasinky a viry).

Prokázání odborné způsobilosti laboratoře

14. Před zkoušením neznámých chemických látek pomocí některé z analýz v rámci této zkušební metody by měla každá laboratoř prokázat odbornou způsobilost v používání analýzy. Aby laboratoř prokázala svou odbornou způsobilost, měla by analyzovat 14 vhodných látek uvedených v tabulce 3 na agonistické účinky a 10 vhodných látek z tabulky 4 na antagonistické účinky. Toto vyzkoušení odborné způsobilosti rovněž potvrdí reakční schopnost zkušebního systému. Seznam vhodných látek představuje podmnožinu referenčních látek uvedených ve standardech funkčnosti pro analýzy ER TA (6). Tyto látky jsou komerčně dostupné, představují třídy chemických látek běžně souvisejících s ER agonistickými nebo antagonistickými účinky, vykazují vhodný rozsah síly očekávané od ER agonistů/antagonistů (tj. silné až slabé) a zahrnují negativní kontroly. Zkoušení vhodných látek by mělo být alespoň dvakrát zopakováno, a to v různé dny. Odborná způsobilost je prokázána správnou klasifikací (pozitivní/negativní) každé vhodné látky. Zkoušení odborné způsobilosti by měl zopakovat každý technik, který se analýzy učí. Podle typu buňky se mohou některé z těchto vhodných látek chovat jako selektivní modulátory estrogenových receptorů a vykazovat agonistické i antagonistické účinky. Vhodné látky jsou však v tabulce 3 a 4 klasifikovány podle známé převažující aktivity, která by měla být použita při hodnocení odborné způsobilosti.

15. Pro prokázání funkčnosti a pro účely kontroly kvality by si měla každá laboratoř sestavovat historické databáze agonistů a antagonistů s údaji o referenčním standardu (např. 17β-estradiol a tamoxifen), chemických látkách pro pozitivní a negativní kontrolu a kontrolu rozpouštědla (např. DMSO). Na začátku by měla být databáze vytvořena z alespoň 10 nezávislých zkoušek na agonistické účinky (např. 17β-estradiol) a 10 nezávislých zkoušek na antagonistické účinky (např. tamoxifen). Dále se přidají výsledky z budoucích analýz těchto referenčních standardů a kontrol rozpouštědla, aby se databáze rozšířila a byla tak zajištěna konzistence a funkčnost bioanalýz prováděných v laboratoři v průběhu času.

▼M8

Tabulka 3

Seznam (14) vhodných látek pro analýzu agonistických účinků (1)

č. (8)	Látka	CASRN	Předpokládaná odpověď (2)	Analýza STTA			Analýza VM7Luc ER TA		Třída chemických látek MeSH (6)	Třída produktu (7)
				Hodnota PC_{10} (M) (3)	Hodnota PC_{50} (M) (3)	Rozpětí zkušebních konc. (M)	Hodnota VM7Luc EC_{50} (M) (4)	Nejvyšší konc. pro zjištění rozmezí (M) (5)		
14	Diethylstilbestrol	56-53-1	POS	$< 1{,}00 \times 10^{-11}$	$2{,}04 \times 10^{-11}$	$10^{-14} \times 10^{-8}$	$3{,}34 \times 10^{-11}$	$3{,}73 \times 10^{-4}$	Uhlovodík (cyklický)	Léčivý přípravek, veterinární látka
12	17α-estradiol	57-91-0	POS	$4{,}27 \times 10^{-11}$	$6{,}44 \times 10^{-10}$	$10^{-11} \times 10^{-5}$	$1{,}40 \times 10^{-9}$	$3{,}67 \times 10^{-3}$	Steroid	Léčivý přípravek, veterinární látka
15	*meso*-Hexestrol	84-16-2	POS	$< 1{,}00 \times 10^{-11}$	$2{,}75 \times 10^{-11}$	$10^{-11} \times 10^{-5}$	$1{,}65 \times 10^{-11}$	$3{,}70 \times 10^{-3}$	Uhlovodík (cyklický), fenol	Léčivý přípravek, veterinární látka
11	4-*terc*-oktylfenol	140-66-9	POS	$1{,}85 \times 10^{-9}$	$7{,}37 \times 10^{-8}$	$10^{-11} \times 10^{-5}$	$3{,}19 \times 10^{-8}$	$4{,}85 \times 10^{-3}$	Fenol	Chemický meziprodukt
9	Genistein	446-72-0	POS	$2{,}24 \times 10^{-9}$	$2{,}45 \times 10^{-8}$	$10^{-11} \times 10^{-5}$	$2{,}71 \times 10^{-7}$	$3{,}70 \times 10^{-4}$	Flavonoid, heterocyklická sloučenina	Přírodní produkt, léčivý přípravek
6	Bisfenol A	80-05-7	POS	$2{,}02 \times 10^{-8}$	$2{,}94 \times 10^{-7}$	$10^{-11} \times 10^{-5}$	$5{,}33 \times 10^{-7}$	$4{,}38 \times 10^{-3}$	Fenol	Chemický meziprodukt

▼M8

č. ([8])	Látka	CASRN	Předpokládaná odpověď ([2])	Analýza STTA			Analýza VM7Luc ER TA		Třída chemických látek MeSH ([6])	Třída produktu ([7])
				Hodnota PC_{10} (M) ([3])	Hodnota PC_{50} (M) ([3])	Rozpětí zkušebních konc. (M)	Hodnota VM7Luc EC_{50} (M) ([4])	Nejvyšší konc. pro zjištění rozmezí (M) ([5])		
2	Kaempferol	520-18-3	POS	$1{,}36 \times 10^{-7}$	$1{,}21 \times 10^{-6}$	$10^{-11} \times 10^{-5}$	$3{,}99 \times 10^{-6}$	$3{,}49 \times 10^{-3}$	Flavonoid, heterocyklická sloučenina	Přírodní produkt
3	Butylbenzylfthalát	85-68-7	POS	$1{,}14 \times 10^{-6}$	$4{,}11 \times 10^{-6}$	$10^{-11} \times 10^{-5}$	$1{,}98 \times 10^{-6}$	$3{,}20 \times 10^{-4}$	Kyselina karboxylová, ester, kyselina ftalová	Plastifikátor, průmyslová chemická látka
4	*p,p*'- Methoxychlor	72-43-5	POS	$1{,}23 \times 10^{-6}$	—	$10^{-11} \times 10^{-5}$	$1{,}92 \times 10^{-6}$	$2{,}89 \times 10^{-3}$	Uhlovodík (halogenovaný)	Léčivý přípravek, veterinární látka
1	Ethylparaben	120-47-8	POS	$5{,}00 \times 10^{-6}$	—	$10^{-11} \times 10^{-5}$	$2{,}48 \times 10^{-5}$	$6{,}02 \times 10^{-3}$	Kyselina karboxylová, fenol	Léčivý přípravek, konzervant
17	Atrazin	1912-24-9	NEG	—	—	10^{-10} - 10^{-4}	—	$4{,}64 \times 10^{-4}$	Heterocyklická sloučenina	Herbicid
20	Spironolakton	52-01-7	NEG	—	—	10^{-11} - 10^{-5}	—	$2{,}40 \times 10^{-3}$	Lakton, steroid	Léčivé přípravky
21	Ketokonazol	65277-42-1	NEG	—	—	10^{-11} - 10^{-5}	—	$9{,}41 \times 10^{-5}$	Heterocyklická sloučenina	Léčivé přípravky

▼M8

č. ([8])	Látka	CASRN	Předpokládaná odpověď ([2])	Analýza STTA			Analýza VM7Luc ER TA		Třída chemických látek MeSH ([6])	Třída produktu ([7])
				Hodnota PC_{10} (M) ([3])	Hodnota PC_{50} (M) ([3])	Rozpětí zkušebních konc. (M)	Hodnota VM7Luc EC_{50} (M) ([4])	Nejvyšší konc. pro zjištění rozmezí (M) ([5])		
22	Reserpin	50-55-5	NEG	—	—	10^{-11} - 10^{-5}	—	$1{,}64 \times 10^{-3}$	Heterocyklická sloučenina, indol	Léčivý přípravek, veterinární látka

Zkratky: CASRN = Chemical Abstracts Service Registry Number (registrační číslo CAS); EC_{50} = poloviční maximální účinná koncentrace zkoušené látky; NEG = negativní; POS = pozitivní; PC_{10} (a PC_{50}) = koncentrace zkoušené látky, při níž je odpověď 10 % (nebo 50 % u PC_{50}) odpovědi indukované pozitivní kontrolou (E2, 1nM) na každé destičce.

([1]) Klasifikace jako pozitivní nebo negativní u ER agonistických účinků vycházela z dokumentů výboru ICCVAM (BRD) pro analýzy vazby ER a TA (31) a z empirických údajů a dalších informací získaných z citovaných studií zveřejněných a kontrolovaných po dokončení dokumentů BRD výboru ICCVAM (2) (3) (18) (31) (32) (33) (34).

([2]) Hodnoty uvedené v návrhu zprávy o předběžné validaci a mezilaboratorní validaci pro analýzu stabilně transfekované transaktivace (TA) na detekci estrogenní aktivity - Analýza reportérového genu zprostředkovaného lidským estrogenovým receptorem alfa pomocí buněčné linie hER-HeLa-9903 (30).

([3]) Střední hodnoty EC_{50} byly vypočteny pomocí hodnot uvedených laboratořemi, které prováděly validační studii VM7Luc ER TA (XDS, ECVAM a Hiyoshi) (3).

([4]) Uvedené koncentrace byly nejvyšší zkoušené koncentrace (ke zjištění rozsahu) v průběhu validace analýzy VM7Luc ER TA. Když se koncentrace v různých laboratořích lišily, je uvedena nejvyšší koncentrace. Viz tabulka 4-10 hodnotící zprávy výboru ICCVAM o zkušební metodě; Zkušební metoda LUMI-Cell®ER (VM7Luc ER TA): Analýza *in vitro* na zjištění agonistických a antagonistických účinků chemických látek na lidské estrogenové receptory (3).

([5]) Látky byly zařazeny do jedné nebo několika chemických tříd s použitím klasifikačního systému Národní knihovny názvů léků a léčivých látek (MeSH), mezinárodně uznávané standardizované klasifikace (k dispozici na http://www.nlm.nih.gov/mesh).

([6]) Látky byly zařazeny do jedné nebo několika produktových tříd podle databáze nebezpečných látek americké Národní lékařské knihovny (k dispozici na: http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB).

([7]) Z tabulky 1 (Seznam referenčních chemických látek (22) pro hodnocení přesnosti ER agonistů) standardů funkčnosti (6).

([8]) Jestliže vhodná látka již není komerčně dostupná, může být použita látka se stejnou klasifikací a srovnatelnou sílou, způsobem účinku a ze stejné chemické třídy.

▼M8

Tabulka 4

Seznam (10) vhodných látek pro analýzu antagonistů

	Látka ([a])	CASRN	Analýza ER STTA ([1])			Analýza VM7Luc ER TA ([2])			Kandidát na účinky ER STTA ([1])	ICCVAM ([5]) Dohoda o klasifikaci	MeSH ([6]) Třída chemických látek	Třída produktu ([7])
			ER TA aktivita	IC_{50} (M)	Rozpětí zkušebních konc. (M)	ER TA aktivita	IC_{50} ([3]) (M)	Nejvyšší konc. pro zjištění rozmezí (M) ([4])				
1	4-Hydroxytamoxifen	68047-06-3	POS	$3{,}97 \times 10^{-9}$	10^{-12}–10^{-7}	POS	$2{,}08 \times 10^{-7}$	$2{,}58 \times 10^{-4}$	středně POS	POS	Uhlovodík (cyklický)	Léčivé přípravky
2	Raloxifen-hydrochlorid	82640-04-8	POS	$7{,}86 \times 10^{-10}$	10^{-12}–10^{-7}	POS	$1{,}19 \times 10^{-9}$	$1{,}96 \times 10^{-4}$	středně POS	POS	Uhlovodík (cyklický)	Léčivé přípravky
3	Tamoxifen	10540-29-1	POS	$4{,}91 \times 10^{-7}$	10^{-10}–10^{-5}	POS	$8{,}17 \times 10^{-7}$	$2{,}69 \times 10^{-4}$	POS	POS	Uhlovodík (cyklický)	Léčivé přípravky
4	17β-estradiol	50-28-2	NEG	—	10^{-9}–10^{-4}	NEG	—	$3{,}67 \times 10^{-3}$	negativní (*)	PN	Steroid	Léčivý přípravek, veterinární látka
5	Apigenin	520-36-5	NEG	—	10^{-9}–10^{-4}	NEG	—	$3{,}70 \times 10^{-4}$	NEG	NEG	Heterocyklická sloučenina	Barvivo, přírodní produkt, farmaceutický meziprodukt
6	Di-n-butylftalát	84-74-2	NEG	—	10^{-8}–10^{-3}	NEG	—	$3{,}59 \times 10^{-3}$	NEG	NEG	Ester, kyselina ftalová	Kosmetická složka, průmyslová chemická látka, plastifikátor

▼M8

	Látka ([a])	CASRN	Analýza ER STTA ([1])			Analýza VM7Luc ER TA ([2])			Kandidát na účinky ER STTA ([1])	ICCVAM ([5]) Dohoda o klasifikaci	MeSH ([6]) Třída chemických látek	Třída produktu ([7])
			ER TA aktivita	IC_{50} (M)	Rozpětí zkušebních konc. (M)	ER TA aktivita	IC_{50} ([3]) (M)	Nejvyšší konc. pro zjištění rozmezí (M) ([4])				
7	Flavon	525-82-6	NEG	—	10^{-8}–10^{-3}	NEG	—	$4{,}50 \times 10^{-4}$	negativní (*)	PN	Flavonoid, heterocyklická sloučenina	Přírodní produkt, léčivý přípravek
8	Genistein	446-72-0	NEG	—	10^{-9}–10^{-4}	NEG	—	$3{,}70 \times 10^{-4}$	negativní (*)	NEG	Flavonoid, heterocyklická sloučenina	Přírodní produkt, léčivý přípravek
9	p-n-nonylfenol	104-40-5	NEG	—	10^{-9}–10^{-4}	NEG	—	$4{,}54 \times 10^{-4}$	nezkoušeno	NEG	Fenol	Chemický meziprodukt
10	Resveratrol	501-36-0	NEG	—	10^{-8}–10^{-3}	NEG	—	$4{,}38 \times 10^{-4}$	negativní (*)	NEG	Uhlovodík (cyklický)	Přírodní produkt

Zkratky: CASRN = Chemical Abstracts Service Registry Number (registrační číslo CAS); M = molární; IC_{50} = poloviční maximální inhibiční koncentrace zkoušené chemické látky; NEG = negativní; PN = pravděpodobně negativní; POS = pozitivní.

(*) klasifikováno negativně podle kontroly literatury (2).

([a]) Běžné látky zkoušené v analýzách STTA a VM7Luc ER TA, které byly označeny jako antagonisté ER nebo negativní a použity na hodnocení přesnosti ve validační studii VM7Luc ER TA (2) (3).

([1]) Zpráva o validaci analýzy stabilně transfekované transaktivace na detekci aktivity zprostředkované estrogenovými receptory, část B (2)

([2]) Hodnotící zpráva výboru ICCVAM týkající se zkušební metody LUMI-CELL ER (VM7Luc ER TA): Metoda in vitro na identifikaci agonistů a antagonistů ER (3).

([3]) Střední hodnoty EC_{50} byly vypočteny pomocí hodnot uvedených laboratořemi, které prováděly validační studii VM7Luc ER TA (XDS, ECVAM a Hiyoshi) (3).

([4]) Uvedené koncentrace byly nejvyšší zkoušené koncentrace (ke zjištění rozsahu) v průběhu validace analýzy VM7Luc ER TA. Když se koncentrace v různých laboratořích lišily, je uvedena nejvyšší koncentrace. Viz tabulka 4-11 hodnotící zprávy výboru ICCVAM o zkušební metodě; Zkušební metoda LUMI-Cell®ER (VM7Luc ER TA): Analýza *in vitro* na zjištění agonistických a antagonistických účinků chemických látek na lidské estrogenové receptory (3).

([5]) Klasifikace antagonisty ER nebo negativní vycházela z informací uvedených v dokumentech výboru ICCVAM (BRD) pro zkušební metody vazby ER a TA (31) a z informací získaných z publikací zveřejněných a kontrolovaných po dokončení dokumentů BRD výboru ICCVAM (2) (3) (18) (31).

([6]) Látky byly zařazeny do jedné nebo několika chemických tříd s použitím klasifikačního systému Národní knihovny názvů léků a léčivých látek (MeSH), což je mezinárodně uznávaná standardizovaná klasifikace (k dispozici na http://www.nlm.nih.gov/mesh).

([7]) Látky byly zařazeny do jedné nebo několika produktových tříd podle databanky nebezpečných látek americké Národní knihovny léčiv (k dispozici na http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB).

▼M8

Kritéria přijatelnosti provedení zkoušky

16. Přijetí nebo odmítnutí provedené zkoušky vychází z hodnocení výsledků získaných pro referenční standardy a kontroly použité pro každý experiment. Hodnoty pro PC_{50} (EC_{50}) nebo IC_{50} pro referenční standardy by měly splňovat kritéria přijatelnosti stanovená pro zvolenou analýzu (pro STTA viz dodatek 2, pro VM7Luc ER TA viz dodatek 3) a všechny pozitivní/negativní kontroly by měly být pro každý přijatý experiment správně klasifikovány. Schopnost konzistentního provedení analýzy by měla být prokázána vytvořením a údržbou historické databáze referenčních standardů a kontrol (viz odstavec 15). Jako měřítko vnitrolaboratorní reprodukovatelnosti mohou být použity směrodatné odchylky (SD) nebo variační koeficienty (CV) pro střední hodnoty parametrů stanovené křivky referenčních standardů z vícečetných experimentů. Kromě toho by měly být splněny tyto zásady, pokud jde o kritéria přijatelnosti:

— Údaje by měly být dostačující pro kvantitativní posouzení aktivace (u analýzy agonistů) nebo suprese (u analýzy antagonistů) ER (tj. účinnost a síla).

— Střední aktivita reportérových genů pro referenční koncentraci referenčního estrogenu by měla dosahovat alespoň minima stanoveného v analýzách týkajících se aktivity kontroly s vehikulem (rozpouštědlem), aby byla zajištěna adekvátní citlivost. Pro analýzy STTA a VM7Luc ER TA je to čtyřnásobek střední kontroly s vehikulem na každé destičce.

— Zkoušené koncentrace by měly zůstat v rozmezí rozpustnosti zkoušených chemických látek a neměly by vykazovat cytotoxicitu.

Analýza údajů

17. Pro klasifikaci pozitivní a negativní odpovědi by měl být použit definovaný postup interpretace údajů pro každou analýzu.

18. Splnění kritérií přijatelnosti (odstavec 16) ukazuje, že analýza funguje správně, ale nezaručuje to, že konkrétní provedení zkoušky podá přesné údaje. Opakování výsledků první zkoušky je nejlepším důkazem, že údaje byly přesné. Jestliže jsou při dvou provedeních zkoušky získány reprodukovatelné výsledky (např. výsledky z obou provedení ukazují, že zkoušená chemická látka je pozitivní), není nutné provádět zkoušku potřetí.

19. Jestliže dvě provedení zkoušky nepodají reprodukovatelné výsledky (např. zkoušená chemikálie je při jednom provedení pozitivní a při druhém provedení negativní) nebo jestliže je potřebný větší stupeň jistoty, pokud jde o výsledek této analýzy, je třeba provést alespoň tři nezávislé zkoušky. V takovém případě vychází klasifikace ze dvou shodných výsledků ze tří.

Obecná kritéria interpretace údajů

20. V současné době neexistuje žádná univerzálně akceptovaná metoda pro interpretaci údajů ER TA. Kvalitativní (např. pozitivní/negativní) anebo kvantitativní (např. EC_{50}, PC_{50}, IC_{50}) posouzení aktivity zprostředkované estrogenovými receptory by však mělo vycházet z empirických údajů a fundovaného vědeckého úsudku. Pokud je to možné, měly by být pozitivní výsledky charakterizovány jak intenzitou účinku v porovnání s kontrolou vehikulem (rozpouštědlem) nebo referenčním estrogenem, tak i koncentrací, při níž k účinku dochází (např. EC_{50}, PC_{50}, RPC_{Max}, IC_{50} atd.).

▼M8

ZÁVĚREČNÁ ZPRÁVA

21. Závěrečná zpráva by měla obsahovat tyto informace:

Analýza:

— použitá analýza,

— kontrola / referenční standard / zkoušená chemická látka,

— zdroj, číslo šarže a datum použitelnosti, je-li k dispozici,

— stabilita zkoušené chemické látky samotné, je-li známa,

— rozpustnost a stabilita zkoušené chemické látky v rozpouštědle, jsou-li známy,

— měření pH, případně osmolality a sraženiny v kultivačním médiu, do něhož byla přidána zkoušená chemická látka.

Jednosložková látka:

— fyzický vzhled, rozpustnost ve vodě a další relevantní fyzikálně-chemické vlastnosti,

— chemická identifikace, např. název podle IUPAC nebo CAS, číslo CAS, kód SMILES nebo InChI, strukturní vzorec, čistota, případně chemická identita nečistot, je-li to prakticky možné, atd.

Vícesložková látka, látka s neznámým nebo proměnlivým složením, komplexní reakční produkt nebo biologický materiál a směsi:

— charakterizované pokud možno chemickou identitou (viz výše), kvantitativním výskytem a relevantními fyzikálně-chemickými vlastnostmi složek.

Rozpouštědlo/vehikulum:

— charakterizace (povaha, dodavatel a šarže),

— zdůvodnění volby rozpouštědla/vehikula,

— rozpustnost a stabilita zkoušené chemické látky v rozpouštědle/vehikulu, jsou-li známy.

Buňky:

— typ a zdroj buněk:

  • Je ER endogenně exprimován? Pokud není, které receptory byly transfekovány?

  • použitá (použité) reportérová (reportérové) konstrukce (včetně zdrojových druhů),

  • metoda transfekce,

  • selekční metoda pro udržení stabilní transfekce (ve vhodných případech),

  • je metoda transfekce relevantní pro stabilní linie?

— počet pasáží (z rozmrazených buněk),

▼**M8**

— číslo pasáže buněk při rozmrazení,

— metody udržování buněčných kultur.

Zkušební podmínky:

— omezení rozpustnosti,

— popis použitých metod posuzování životaschopnosti,

— složení média, koncentrace CO_2,

— koncentrace zkoušené chemické látky,

— objem vehikula a přidané zkoušené chemické látky,

— inkubační teplota a vlhkost,

— trvání expozice,

— hustota buněk na začátku expozice a během expozice,

— pozitivní a negativní referenční standardy,

— reportérové reagencie (název přípravku, dodavatel a šarže),

— kritéria klasifikace jednotlivých provedení zkoušky na pozitivní, negativní nebo neurčitou.

Kontrola přijatelnosti:

— násobné indukce pro každou destičku, a zda splňují minimum požadované pro analýzu na základě dosavadních kontrol,

— skutečné hodnoty pro kritéria přijatelnosti, např. $\log_{10}EC_{50}$, $\log_{10}PC_{50}$, $\log IC_{50}$ a hodnoty Hillova koeficientu pro souběžné pozitivní kontroly / referenční standardy.

Výsledky:

— nezpracovaná a normalizovaná data,

— maximální úroveň násobku indukce,

— údaje o cytotoxicitě,

— pokud existuje, nejnižší účinná koncentrace (LEC),

— hodnoty RPC_{Max}, PC_{Max}, PC_{50}, IC_{50} a/nebo EC_{50} podle potřeby,

— závislost účinku na koncentraci, pokud je to možné,

▼M8

— případné statistické analýzy společně s měřítkem chyby a spolehlivosti (např. SEM, SD, CV nebo 95 % CI) a popis, jak byly tyto hodnoty získány.

Diskuse o výsledcích

Závěr

LITERATURA

(1) OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 34.), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(2) OECD (2015). Report of the Inter-Laboratory Validation for Stably Transfected Transactivation Assay to detect Estrogenic and Anti-estrogenic Activity. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 225), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(3) ICCVAM (2011). ICCVAM Test Method Evaluation Report on the LUMI-CELL® ER (BG1Luc ER TA) Test Method, an *In Vit*ro Method for Identifying ER Agonists and Antagonists, National Institute of Environmental Health Sciences: Research Triangle Park, NC.

(4) Pujol P. *et al.* (1998). Differential Expression of Estrogen Receptor-Alpha and -Beta Messenger RNAs as a Potential Marker of Ovarian Carcinogenesis, Cancer. Res., 58(23): s. 5367-73.

(5) Rogers J.M. and Denison M.S. (2000). Recombinant Cell Bioassays for Endocrine Disruptors: Development of a Stably Transfected Human Ovarian Cell Line for the Detection of Estrogenic and Anti-Estrogenic Chemicals, *In Vitro* and Molecular Toxicology: Journal of Basic and Applied Research, 13(1): s. 67-82.

(6) OECD (2012). Performance Standards For Stably Transfected Transactivation *In Vitro* Assay to Detect Estrogen Receptor Agonists (for TG 455). Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 173.), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(7) OECD (2015). Performance Standards For Stably Transfected Transactivation *In Vitro* Assay to Detect Estrogen Receptor Antagonists. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 174.), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(8) OECD (2012). Guidance Document on Standardized Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 150.), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(9) Cavailles V. (2002). Estrogens and Receptors: an Evolving Concept. Climacteric, 5 Suppl 2: s. 20- 6.

(10) Welboren W.J. *et al.* (2009). Genomic Actions of Estrogen Receptor Alpha: What are the Targets and how are they Regulated? Endocr. Relat. Cancer, 16(4): s. 1073-89.

(11) Younes M. and Honma N. (2011). Estrogen Receptor Beta, Arch. Pathol. Lab. Med., 135(1): s. 63- 6.

▼**M8**

(12) Jefferson W.N., *et al.* (2002). Assessing Estrogenic Activity of Phytochemicals Using Transcriptional Activation and Immature Mouse Uterotrophic Responses, Journal of Chromatography B, 777(1-2): s. 179-189.

(13) Sonneveld E. *et al.* (2006). Comparison of I*n Vitro* and *In Vivo* Screening Models for Androgenic and Estrogenic Activities, *Toxicol*. Sci., 89(1): s. 173-187.

(14) Takeyoshi M. *et al.* (2002). The Efficacy of Endocrine Disruptor Screening Tests in Detecting Anti- Estrogenic Effects Downstream of Receptor-Ligand Interactions, Toxicology Letters, 126(2): s. 91- 98.

(15) Combes R.D. (2000). Endocrine Disruptors: a Critical Review of *In Vitro* and *In Vivo* Testing Strategies for Assessing their Toxic Hazard to Humans, ATLA Alternatives to Laboratory Animals,28(1): s. 81-118.

(16) Escande A. *et al.* (2006). Evaluation of Ligand Selectivity Using Reporter Cell Lines Stably Expressing Estrogen Receptor Alpha or Beta, Biochem. Pharmacol,71(10): s. 1459-69.

(17) Gray L.E. Jr. (1998). Tiered Screening and Testing Strategy for Xenoestrogens and Antiandrogens, *Toxicol*. Lett, 102-103, 677-680.

(18) EDSTAC (1998). Endocrine Disruptor Screening and Testing Advisory Committee (EDSTAC) Final Report.

(19) ICCVAM (2003). ICCVAM Evaluation of *In Vitro* Test Methods for Detecting Potential Endocrine Disruptors: Estrogen Receptor and Androgen Receptor Binding and Transcriptional Activation Assays.

(20) Gustafsson J.Ö. (1999). Estrogen Receptor ß - A New Dimension in Estrogen Mechanism of Action, Journal of Endocrinology, 163(3): s. 379-383.

(21) Ogawa S. *et al.* (1998). The Complete Primary Structure of Human Estrogen Receptor ß (hERß) and its Heterodimerization with ERα *In Vivo* and *In Vitro,* Biochemical and Biophysical Research Communications, 243(1): s. 122-126.

(22) Enmark E. *et al.* (1997). Human Estrogen Receptor ß-Gene Structure, Chromosomal Localization, and Expression Pattern, Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism,82(12): s. 4258-4265.

(23) Ball L.J. *et al.* (2009). Cell Type- and Estrogen Receptor-Subtype Specific Regulation of Selective Estrogen Receptor Modulator Regulatory Elements, Molecular and Cellular Endocrinology, 299(2): s. 204-211.

(24) Barkhem T. *et al.* (1998). Differential Response of Estrogen Receptor Alpha and Estrogen Receptor Beta to Partial Estrogen Agonists/Antagonists, Mol. Pharmacol, 54(1): s. 105-12.

(25) Deroo B.J. and Buensuceso A.V. (2010). Minireview: Estrogen Receptor-ß: Mechanistic Insights from Recent Studies, Molecular Endocrinology, 24(9): s. 1703-1714.

(26) Harris D.M. *et al.* (2005). Phytoestrogens Induce Differential Estrogen Receptor Alpha- or Beta- Mediated Responses in Transfected Breast Cancer Cells, Experimental Biology and Medicine, 230(8): s. 558-568.

(27) Anderson J.N. Clark J.H. and Peck E.J.Jr. (1972). The Relationship Between Nuclear Receptor- Estrogen Binding and Uterotrophic Responses, Biochemical and Biophysical Research Communications, 48(6): s. 1460-1468.

▼**M8**

(28) Toft D. (1972). The Interaction of Uterine Estrogen Receptors with DNA, Journal of Steroid Biochemistry, 3(3): s. 515-522.

(29) Gorski J. *et al.* (1968), Hormone Receptors: Studies on the Interaction of Estrogen with the Uterus, Recent Progress in Hormone Research, 24: s. 45-80.

(30) Jensen E.V. *et al.* (1967), Estrogen-Receptor Interactions in Target Tissues, Archives d'Anatomie Microscopique et de Morphologie Experimentale, 56(3): s. 547-569.

(31) ICCVAM (2002). Background Review Document: Estrogen Receptor Transcriptional Activation (TA) Assay. Appendix D, Substances Tested in the ER TA Assay, NIH Publication Report (No 03-4505.).

(32) Kanno J. *et al.* (2001). The OECD Program to Validate the Rat Uterotrophic Bioassay to Screen Compounds for *In Vivo* Estrogenic Responses: Phase 1, Environ. Health Persp., 109:785-94.

(33) Kanno J. *et al.* (2003). The OECD Program to Validate the Rat Uterotrophic Bioassay: Phase Two Dose -Response Studies, Environ. Health Persp., 111:1530-1549.

(34) Kanno J. *et al.* (2003), The OECD Program to Validate the Rat Uterotrophic Bioassay: Phase Two – Coded Single-Dose Studies, Environ. Health Persp., 111:1550-1558.

(35) Geisinger *et al.* (1989) Characterization of a human ovarian carcinoma cell line with estrogen and progesterone receptors, Cancer 63, 280-288.

(36) Baldwin *et al.* (1998) BG-1 ovarian cell line: an alternative model for examining estrogen-dependent growth *in vitro*, *In Vitro* Cell. Dev. Biol. – Animal, 34, 649-654.

(37) Li, Y. *et al.* (2014) Research resource: STR DNA profile and gene expression comparisons of human BG-1 cells and a BG-1/MCF-7 clonal variant, Mol. Endo. 28, 2072-2081.

(38) Rogers, J.M. and Denison, M.S. (2000) Recombinant cell bioassays for endocrine disruptors: development of a stably transfected human ovarian cell line for the detection of estrogenic and anti-estrogenic chemicals, *In Vitro* & Molec. Toxicol. Chem. 13, 67-82.

▼M8

Dodatek 1

DEFINICE A ZKRATKY

Kritéria přijatelnosti: Minimální pravidla pro výkonnost experimentálních kontrol a referenčních standardů. Aby se experiment mohl považovat za platný, měla by být splněna všechna kritéria přijatelnosti.

Přesnost (soulad): Přesnost shody mezi výsledky analýzy a přijatými referenčními hodnotami. Je to měřítko funkčnosti analýzy a jeden z aspektů relevance. Tento pojem se často používá místo pojmu „soulad“ a rozumí se jím podíl správných výsledků analýzy (1).

Agonista: Látka, která vyvolá odpověď, např. transkripci, když se naváže na specifický receptor.

Antagonista: Druh receptorového ligandu nebo chemická látka, která sama nevyvolává biologickou odpověď po navázání na receptor, ale blokuje nebo tlumí odpovědi zprostředkované agonisty.

Antiestrogenní aktivita: je schopnost chemické látky potlačit působení 17β-estradiolu zprostředkované přes estrogenové receptory.

Buněčná morfologie: Tvar a vzhled buněk rostoucích v monovrstvě v jedné jamce destičky pro tkáňové kultury. Buňky, které odumírají, často vykazují abnormální buněčnou morfologii.

CF: Koncepční rámec OECD pro zkoušky a hodnocení endokrinních distruptorů.

Ošetření aktivním uhlím/dextranem: Ošetření séra použitého v buněčné kultuře. Ošetření aktivním uhlím/dextranem (často označované jako „stripping“) odstraňuje endogenní hormony a bílkoviny, na které se hormony vážou.

Chemická látka: Látka nebo směs.

Cytotoxicita: Škodlivé účinky pro buněčnou strukturu nebo funkci, které mohou nakonec způsobit buněčnou smrt a vyvolat snížení počtu buněk přítomných v jamce na konci doby expozice nebo snížení kapacity pro měření buněčné funkce při porovnání se souběžnou kontrolou vehikulem.

CV: Variační koeficient.

DCC-FBS: Fetální bovinní sérum ošetřené aktivním uhlím, které je potaženo dextranem.

DMEM: Dulbeccova modifikace Eaglova média.

DMSO: Dimethylsulfoxid.

E2: 17β-estradiol.

EC50: Poloviční maximální účinná koncentrace zkoušené chemické látky.

ED: Narušení endokrinní činnosti.

hERα: Lidský estrogenní receptor alfa.

▼**M8**

hERß: Lidský estrogenní receptor beta.

EFM: Médium bez estrogenů Dulbeccova modifikace Eaglova média (DMEM) doplněná 4,5 % FBS ošetřeného aktivním uhlím/dextranem, 1,9 % L-glutaminu a 0,9 % Pen-Strepu.

ER: Estrogenový receptor.

ERE: Estrogen responzivní element.

Estrogenní aktivita: Schopnost chemické látky napodobit schopnost 17β-estradiolu vázat se na estrogenové receptury a aktivovat je. Touto zkušební metodou lze detekovat estrogenní aktivitu zprostředkovanou hERα.

ERTA: Transaktivace estrogenových receptorů.

FBS: Fetální bovinní sérum.

HeLa: Imortalizovaná buněčná linie z lidského děložního hrdla.

HeLa9903: Subklon buněk HeLa, do nichž byly stabilně transfekovány hERααa reportérový gen luciferázy.

IC_{50}: Poloviční maximální účinná koncentrace inhibiční zkoušené chemické látky.

ICCVAM: Meziagenturní koordinační výbor pro validaci alternativních metod.

Mezilaboratorní reprodukovatelnost: Míra, v jaké mohou různé kvalifikované laboratoře za použití stejného protokolu a při testování stejných látek získat kvalitativně a kvantitativně podobné výsledky. Mezilaboratorní reprodukovatelnost se určuje během předvalidačních a validačních postupů a ukazuje, do jaké míry lze analýzu úspěšně přenášet mezi různými laboratořemi (1).

Vnitrolaboratorní reprodukovatelnost: Určení míry, v jaké může kvalifikovaný personál ve stejné laboratoři jindy úspěšně dosáhnout stejných výsledků za použití určitého protokolu. Označuje se také jako „reprodukovatelnost v rámci laboratoře“ (1).

LEC: Nejnižší účinná koncentrace je nejnižší koncentrace zkoušené chemické látky, která vyvolává odpověď (tj. nejnižší koncentrace zkoušené chemické látky, při níž je násobná indukce statisticky odlišná od souběžné kontroly vehikulem).

Zkouška typu „me-too“: Hovorový výraz pro analýzu, která je strukturálně a funkčně podobná validované a uznávané referenční zkušební metodě. Používá se namísto podobné zkušební metody.

MT: Metallothionein.

MMTV: Virus myšího nádoru prsní žlázy.

OHT: 4-Hydroxytamoxifen.

PBTG: Pokyn vycházející z funkční způsobilosti.

▼M8

PC: (pozitivní kontrola): Silně aktivní látka, nejlépe 17ß-estradiol, která je zařazena do všech zkoušek, a pomáhá tak zajistit správné fungování analýzy.

PC_{10}: Koncentrace zkoušené chemické látky, při níž činí naměřená aktivita v analýze agonistů 10 % maximální aktivity indukované pozitivní kontrolou (E2 při 1nM pro analýzu STTA) na každé destičce.

PC_{50}: Koncentrace zkoušené chemické látky, při níž činí naměřená aktivita v analýze agonistů 50 % maximální aktivity indukované pozitivní kontrolou (E2 při referenční koncentraci stanovené ve zkušební metodě) na každé destičce.

PC_{Max}: Koncentrace zkoušené chemické látky vyvolávající RPC_{Max}.

Standardy funkčnosti: Standardy založené na validované analýze, které slouží jako základ pro hodnocení srovnatelnosti navrhované analýzy, která je mechanicky a funkčně podobná. Zahrnují 1) zásadní složky analýzy; 2) minimální seznam srovnávacích látek vybraných z chemických látek používaných k prokázání přijatelné funkčnosti validované referenční metody; a 3) srovnatelné hladiny přesnosti a spolehlivosti založené na hodnotách získaných u validované zkušební metody, jež by navrhovaná analýza měla prokázat při vyhodnocení za použití minimálního seznamu srovnávacích látek (1).

Vhodné látky: Podsoubor ze seznamu referenčních látek zařazených do standardů funkčnosti, které mohou laboratoře použít k prokázání způsobilosti k provádění standardizované zkušební metody. Kritéria výběru u těchto látek obvykle zahrnují to, že reprezentují celou škálu odpovědí, jsou komerčně dostupné a jsou k nim dostupné kvalitní referenční údaje.

Způsobilost: Prokázaná schopnost řádně provést analýzu před zkoušením neznámých látek.

Referenční estrogen (pozitivní kontrola, PC): 17β-estradiol (E2, CAS 50-28-2).

Referenční standard: Referenční látka použitá na prokázání vhodnosti analýzy. Pro analýzy STTA a VM7Luc ER TA je referenčním standardem 17β-estradiol.

Referenční zkušební metody: Analýzy, z nichž vychází pokyn PBTG č. 455.

Relevantnost: Popis vztahu analýzy k účinku, který je předmětem zájmu, a také toho, zda je analýza smysluplná a použitelná pro konkrétní účel. Vyjadřuje, do jaké míry analýza správně měří nebo predikuje biologický účinek, který je předmětem zájmu. Relevantnost zahrnuje také posouzení přesnosti (shody) analýzy (1).

Spolehlivost: Míra rozsahu, v jakém může být analýza časem reprodukovatelná v laboratořích a mezi laboratořemi, když se provádí s použitím stejného protokolu. Hodnotí se to výpočtem laboratorní a mezilaboratorní reprodukovatelnosti.

RLU: Relativní luminiscenční jednotky.

RNA: Kyselina ribonukleová.

RPC_{Max}: Maximální úroveň odpovědi indukované zkoušenou chemickou látkou, vyjádřená jako % odpovědi indukované 1 nM E2 na stejné destičce.

▼M8

RPMI: Médium RPMI 1 640 doplněné 0,9 % Pen-Strepu a 8,0 % fetálního bovinního séra (FBS).

Provedení zkoušky: Individuální experiment, kterým se hodnotí chemické působení na biologický výsledek analýzy. Každé provedení představuje úplný experiment provedený v replikovaných jamkách s buňkami kultivovanými ze stejného zdroje buněk ve stejném čase.

Nezávislé provedení zkoušky: Samostatný nezávislý experiment, při němž se hodnotí chemické působení na biologický výsledek analýzy s použitím buněk z jiného zdroje, čerstvě naředěných chemických látek, provedený v jiné dny nebo ve stejný den jiným pracovníkem.

SD: Směrodatná odchylka.

Citlivost: Podíl všech pozitivních/aktivních látek, které jsou na základě analýzy správně klasifikovány. Je to měřítko přesnosti analýzy, která dává kategorické výsledky, a je důležitým prvkem při hodnocení relevance analýzy (1).

Specifičnost: Podíl všech negativních/neaktivních látek, které jsou na základě zkoušky správně klasifikovány. Je to měřítko přesnosti analýzy, která dává kategorické výsledky, a je důležitým prvkem při hodnocení relevance analýzy (1).

Stabilní transfekce: Když je do kultivovaných buněk transfekována DNA takovým způsobem, aby byla stabilně intregrována do genomu buněk, čímž dojde ke stabilní expresi transfekovaných genů. Klony stabilně transfekovaných buněk se selektují stabilními markery (např. resistence na G418).

Analýza STTA: Analýza stabilně transfekované transaktivace, analýza transkripční aktivace ERα s využitím buněčné linie HeLa 9 903.

Studie: Experimentální práce v plném rozsahu provedená za účelem hodnocení jedné specifické látky s využitím specifické analýzy. Studie zahrnuje všechny kroky včetně testů ředění zkoušené látky ve zkušebním médiu, předběžné zkoušky ke stanovení rozsahu, všechny nezbytné komplexní zkoušky, analýzy údajů, zajištění kvality, posouzení cytotoxicity atd. Provedení studie umožňuje klasifikovat aktivitu zkoušené chemické látky z hlediska toxicity (tj. účinná, neúčinná nebo neprůkazná), což se hodnotí použitou analýzou a odhadem síly ve vztahu k pozitivní referenční chemické látce.

Látka: Podle nařízení REACH ([1]) je látka definována jako chemický prvek a jeho sloučeniny v přírodním stavu nebo získané výrobním procesem, včetně všech přídatných látek nezbytných k uchování jeho stability a všech nečistot vznikajících v použitém procesu, avšak s vyloučením všech rozpouštědel, která lze oddělit bez ovlivnění stability látky nebo změny jejího složení. Velmi podobná definice se používá v rámci GHS OSN (1).

TA (transaktivace):: Iniciace syntézy mRNA v reakci na specifický chemický signál, jako je navázání estrogenu na estrogenový receptor.

([1]) Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1907/2006 ze dne 18. prosince 2006 o registraci, hodnocení, povolování a omezování chemických látek, o zřízení Evropské agentury pro chemické látky, o změně směrnice 1999/45/ES a o zrušení nařízení Rady (EHS) č. 793/93, nařízení Komise (ES) č. 1488/94, směrnice Rady 76/769/EHS a směrnic Komise 91/155/EHS, 93/67/EHS, 93/105/ES a 2000/21/ES (Úř. věst. L 304, 22.11.2007, s. 1).

▼M8

Analýza: V souvislosti s touto zkušební metodou je analýza jednou z metodik, která je uznávána jako validní z hlediska plnění stanovených kritérií výkonnosti. Složky analýzy zahrnují například specifickou buněčnou linii se souvisejícími růstovými podmínkami, specifické médium, v němž je zkouška prováděna, podmínky uspořádání destiček, sestavu a ředění zkoušených chemických látek společně s dalšími požadovanými opatřeními v oblasti kontroly kvality a související kroky při hodnocení údajů.

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

Transkripce: Syntéza mRNA.

UVCB: Chemické látky s neznámým nebo proměnlivým složením, komplexní reakční produkty nebo biologický materiál.

Validovaná zkušební metoda: Analýza, u níž byly provedeny validační studie k určení její relevantnosti (včetně přesnosti) a spolehlivosti pro konkrétní účel. Je důležité si uvědomit, že validovaná zkušební metoda nemusí mít dostatečnou funkčnost, pokud jde o přesnost a spolehlivost, aby mohla být shledána přijatelnou pro navrhovaný účel (1).

Validace: Proces, při němž je stanovena spolehlivost a relevance konkrétního přístupu, metody, analýzy, procesu nebo hodnocení pro definovaný účel (1).

VC (kontrola s vehikulem): Rozpouštědlo, které se používá na rozpuštění zkoušené chemické látky a kontrolních chemických látek a zkouší se výhradně jako vehikulum bez rozpuštěné chemické látky.

VM7: Imortalizovaná buňka adenokarcinomu, která endogenně exprimuje estrogenový receptor.

VM7Luc4E2: Buněčná linie VM7Luc4E2 byla odvozena z imortalizovaných buněk získaných z lidského adenokarcinomu VM7, které endogenně exprimují obě formy estrogenového receptoru (ERα a ERβ) a jsou stabilně transfekovány plasmidem pGudLuc7.ERE. Tento plasmid obsahuje čtyři kopie syntetického oligonukleotidu obsahujícího estrogen responzivní element před promotorem viru myšího nádoru prsní žlázy a genu luciferázy světlušek.

Slabá pozitivní kontrola: Slabě aktivní látka vybraná ze seznamu referenčních chemických látek, která je zařazena do všech zkoušek, a pomáhá tak zajistit správné fungování analýzy.

▼**M8**

Dodatek 2

ANALÝZA STABILNĚ TRANSFEKOVANÉ TRANSAKTIVACE ESTROGENOVÉHO RECEPTORU A PRO DETEKCI ESTROGENOVÝCH AGONISTICKÝCH A ANTAGONISTICKÝCH ÚČINKŮ CHEMICKÝCH LÁTEK S POUŽITÍM BUNĚČNÉ LINIE HERA-HELA-9903

VÝCHOZÍ ÚVAHY A OMEZENÍ (VIZ TAKÉ VŠEOBECNÝ ÚVOD)

1. Při této transaktivační analýze (TA) se používá buněčná linie hERα-HeLa-9 903 na detekci estrogenní agonistické aktivity zprostředkované lidským estrogenovým receptorem alfa (hERα). Validační studie analýzy stabilně transfekované transaktivace (STTA) provedená japonským Ústavem pro hodnocení a výzkum chemických látek (CERI) s použitím buněčné linie hERα-HeLa-9 903 na detekci estrogenových agonistických a antagonistických účinků zprostředkovaných lidským estrogenovým receptorem alfa (hERα) prokázala relevanci a spolehlivost analýzy pro zamýšlený účel (1).

2. Tato analýza je specificky určena na detekci TA zprostředkované hERα měřením chemiluminiscence jako sledované vlastnosti. Při koncentracích fytoestrogenů vyšších než 1 μM však byly hlášeny luminiscenční signály nezprostředkované receptorem v důsledku nadměrné aktivace reportérového genu luciferázy (2) (3). Přestože křivka závislosti odpovědi na dávce naznačuje, že ke skutečné aktivaci systému ER dochází při nižších koncentracích, je nutné v systémech analýzy stabilně transfekované ER TA pečlivě zkoumat exprese luciferázy získané při vysoké koncentraci fytoestrogenů nebo podobných sloučenin, u nichž existuje podezření, že vyvolávají nadměrnou aktivaci reportérového genu luciferázy podobně jako fytoestrogeny (dodatek 1).

3. Před použitím této analýzy pro regulační účely je třeba přečíst si části „VŠEOBECNÝ ÚVOD“ a „SLOŽKY ANALÝZY ER TA“. Definice a zkratky používané v této zkušební metodě jsou popsány v dodatku 2.1.

PRINCIP ANALÝZY (VIZ TAKÉ VŠEOBECNÝ ÚVOD)

4. Analýza se používá na signalizaci vazby ligandu na estrogenový receptor. Po vazbě na ligandy se komplex receptor-ligand přesune do jádra, kde se naváže na specifické responzivní elementy DNA a transaktivuje reportérový gen luciferázy světlušek, přičemž výsledkem je zvýšená buněčná exprese enzymu luciferáza. Luciferin je substrát, který enzym luciferáza transformuje na bioluminiscenční produkt, jenž může být kvantitativně změřen luminometrem. Aktivitu luciferázy lze rychle a levně vyhodnotit pomocí řady komerčně dostupných testů.

5. Zkušební systém používá buněčnou linii hERα-HeLa-9 903, která je odvozena z lidského tumoru děložního hrdla, se dvěma stabilně vloženými konstrukcemi: (i) konstrukcí pro expresi hERαα (kódující lidský receptor v celé délce) a (ii) reportérovou konstrukcí luciferázy světlušek nesoucí pět tandemových repeticí vitelogeninového estrogen-responzivního elementu (ERE) řízeného myším methalothioneinovým (MT) promotorem TATA elementu. Prokázalo se, že myší genová konstrukce MT TATA podává nejlepší výkon, a proto se běžně používá. Proto může tato buněčná linie hERα-HeLa-9 903 měřit schopnost testované chemické látky indukovat hERα-zprostředkovanou transaktivaci exprese luciferázového genu.

▼M8

6. V případě analýzy ER agonistů vychází interpretace údajů z toho, zda je maximální úroveň odpovědi indukované zkoušenou chemickou látkou rovná nebo vyšší než odpověď agonisty rovnající se 10 % odpovědi indukované maximálně indukující (1 nM) koncentrací pozitivní kontroly (PC) 17β-estradiol (E2) (tj. PC10). V případě analýzy ER antagonistů vychází interpretace údajů z toho, zda odpověď vykazuje alespoň 30 % snížení aktivity oproti odpovědi indukované obohacenou kontrolou (25 pM E2) bez cytotoxicity. Analýza a interpretace údajů je podrobně probrána v odstavcích 34–48.

POSTUP

Buněčné linie

7. Pro analýzu by se měla používat stabilně transfekovaná buněčná linie hERα-HeLa-9 903. Buněčnou linii lze získat z buněčné banky Japonské sbírky výzkumných biozdrojů (*Japanese Collection of Research Bioresources* (JCRB) ([1]) po podpisu smlouvy o prodeji materiálu.

8. Při zkoušení by měly být používány pouze buňky charakterizované jako buňky bez mykoplazmat. Metodou volby pro citlivou detekci mykoplazmové infekce je RT-PCR (polymerázová řetězová reakce v reálném čase) (4)(5)(6).

Stabilita buněčné linie

9. Pro monitorování stability buněčné linie by se jako referenční standardy pro analýzu agonistů měly používat E2, 17α-estradiol, 17α-methyltestosteron a kortikosteron a alespoň jednou je třeba při každém provedení analýzy změřit kompletní křivku závislosti odpovědi na koncentraci v rozsahu zkoušených koncentrací uvedených v tabulce 1, přičemž výsledky by měly být v souladu s výsledky uvedenými v tabulce 1.

10. V případě analýzy antagonistů je třeba změřit současně s každým provedením zkoušky úplné křivky koncentrace pro dva referenční standardy, tamoxifen a flutamid. U obou chemických látek je třeba sledovat správnou kvalitativní klasifikaci na pozitivní nebo negativní.

Buněčná kultura a podmínky na destičce

11. Buňky se udržují v Eaglově minimálním esenciálním médiu (EMEM) bez fenolové červeně, doplněném 60 mg/l antibiotika kanamycinu a 10 % fetálního bovinního séra ošetřeného aktivním uhlím, které je potaženo dextranem (DCC-FBS) v inkubátoru s CO_2 (5 % CO_2) při 37±1°C. Po dosažení 75–90 % konfluence mohou být buňky pasážovány s 10 ml 0,4 x 10^5 – 1 x 10^5 buněk/ml pro 100 mm nádobu s buněčnou kulturou. Buňky by měly být suspendovány s 10 % FBS-EMEM (což je stejné médium jako EMEM s DCC-FBS) a poté umístěny do jamek mikrotitrační destičky v hustotě 1 x 104 jamek/(100 µl x jamka). Dále by měly být buňky předběžně inkubovány v inkubátoru s 5 % CO_2 při teplotě 37°±1°C po dobu 3 hodin před expozicí chemické látce. Plastové pomůcky by neměly vykazovat estrogenní aktivitu.

12. Aby se zachovala integrita odpovědi, měly by buňky růst více než jednu pasáž ze zmrazené zásoby v upraveném médiu a neměly by být kultivovány déle než 40 pasáží. Pro buněčnou linii hERα-HeLa-9 903 to bude méně než tři měsíce. Výkonnost buněk však může být snížena, pokud jsou kultivovány v nevhodných podmínkách.

([1]) JCRB Cell Bank: National Institute of Biomedical Innovation, 7-6-8 Asagi Saito, Ibaraki-shi, Osaka 567-0085, Japonsko Fax: +81-72-641-9812.

▼M8

13. Médium DCC-FBS lze připravit podle popisu v dodatku 2.2 nebo pořídit z komerčních zdrojů.

Kritéria přijatelnosti

Pozitivní a negativní referenční standardy pro analýzu agonistů ER

14. Před provedením studie a v jejím průběhu je třeba ověřit reaktivitu zkušebního systému pomocí vhodných koncentrací silného estrogenu: E2, slabého estrogenu (17α-estradiol), velmi slabého agonisty (17α-methyltestosteron) a negativní látky (kortikosteron). Hodnoty rozsahu přijatelnosti odvozené od validované studie (1) jsou uvedeny v tabulce 1. Tyto 4 souběžné referenční standardy by měly být zařazeny do každého experimentu a výsledky by měly spadat do uvedených přijatelných mezí. Pokud tomu tak není, je třeba stanovit příčinu nesplnění kritérií přijatelnosti (např. manipulace s buňkami a kvalita a koncentrace séra a antibiotik) a analýzu zopakovat. Po dosažení kritérií přijatelnosti je pro zajištění minimální variability hodnot EC_{50}, PC_{50} a PC_{10} zásadně důležité konzistentní používání materiálů pro kultivaci buněk. Čtyři souběžné referenční standardy, které by měly být zařazeny do každého experimentu (provedeného za stejných podmínek včetně materiálů, úrovně pasážování a techniků), mohou zajistit citlivost analýzy, protože hodnoty PC_{10} tří pozitivních referenčních standardů by měly spadat do přijatelného rozsahu, stejně jako hodnoty PC_{50} a EC_{50}, pokud je lze vypočítat (viz tabulka 1).

Tabulka 1

Rozsah přijatelných hodnot čtyř referenčních standardů pro analýzu agonistů ER

Název	$logPC_{50}$	$logPC_{10}$	$logEC_{50}$	Hillův koeficient	Zkušební rozsah
17β-estradiol (E2) CAS č.: 50-28-2	–11,4 ~ –10,1	< –11	–11,3 ~ –10,1	0,7 ~ 1,5	10^{-14} ~ 10^{-8}M
17α-estradiol CAS č.: 57-91-0	–9,6 ~ –8,1	–10,7 ~ –9,3	–9,6 ~ –8,4	0,9 ~ 2,0	10^{-12} ~ 10^{-6}M
Kortikosteron CAS č.: 50-22-6	–	–	–	–	10^{-10} ~ 10^{-4}M
17α-methyltestosteron CAS č.: 58-18-4	–6,0 ~ –5,1	–8,0 ~ –6,2	–	–	10^{-11} ~ 10^{-5}M

Pozitivní a negativní referenční standardy pro analýzu antagonistů ER

15. Před provedením studie a v jejím průběhu je třeba ověřit reaktivitu zkušebního systému pomocí vhodných koncentrací pozitivní látky (tamoxifen) a negativní látky (flutamid). Hodnoty rozsahu přijatelnosti odvozené od validované studie (1) jsou uvedeny v tabulce 2. Tyto dva souběžné referenční standardy by měly být zařazeny do každého experimentu a výsledky by měly být správně posouzeny, jak je uvedeno v kritériích. Pokud tomu tak není, je třeba stanovit příčinu nesplnění kritérií (např. manipulace s buňkami a kvalita a koncentrace séra a antibiotik) a analýzu zopakovat. Dále by měly být vypočítány hodnoty IC_{50} pro pozitivní látku (tamoxifen) a výsledky by měly spadat do uvedených přijatelných mezí. Po dosažení kritérií přijatelnosti je pro zajištění minimální variability hodnot EC_{50} zásadně důležité konzistentní používání materiálů pro kultivaci buněk. Dva souběžné referenční standardy, které by měly být zařazeny do každého experimentu (provedeného za stejných podmínek včetně materiálů, úrovně pasážování a techniků), mohou zajistit citlivost analýzy (viz tabulka 2).

▼M8

Tabulka 2

Kritéria a rozsah přijatelných hodnot dvou referenčních standardů pro analýzu antagonistů ER

Název	Kritéria	$logIC_{50}$	Zkušební rozsah
Tamoxifen CAS č.: 10 540-29-1	Pozitivní: IC50 nemohla být vypočtena	–-5,942 ~ –7,596	10^{-10} ~ 10^{-5}M
Flutamid CAS č.: 13 311-84-7	Negativní: IC30 nemohla být vypočtena	-	10^{-10} ~ 10^{-5}M

Pozitivní a negativní kontroly

16. Pozitivní kontrola (PC) pro analýzu agonistů ER (1 nM E2) a pro analýzu antagonistů ER (10μM TAM) by měla být testována na každé destičce alespoň třikrát. Rozpouštědlo, které se používá na rozpuštění zkoušené chemické látky, by mělo být testováno jako kontrola vehikula (VC) na každé destičce alespoň třikrát. Kromě této kontroly vehikula by měla být kontrola vehikula provedena na stejné destičce alespoň třikrát se stejnou pozitivní kontrolou, pokud se u pozitivní kontroly používá jiné vehikulum než u zkoušené chemické látky.

Kvalitativní kritéria pro analýzu agonistů ER

17. Střední aktivita luciferázy u pozitivní kontroly (1 nM E2) by měla být alespoň čtyřnásobná oproti střední aktivitě kontroly vehikula na každé destičce. Toto kritérium je stanoveno na základě spolehlivosti hodnot cílových ukazatelů z validační studie (historicky mezi čtyřnásobkem a třicetinásobkem).

18. Pokud jde o kontrolu kvality analýzy, měla by být násobná indukce odpovídající hodnotě PC_{10} souběžné pozitivní kontroly (1 nM E2) větší než 1+2SD hodnoty násobné indukce (=1) souběžné kontroly vehikula. Za účelem stanovení priorit může být hodnota PC_{10} užitečná pro zjednodušení analýzy dat potřebné na porovnání se statistickou analýzou. Ačkoli statistická analýza poskytuje informace o významnosti, tato analýza není kvantitativním parametrem, pokud jde o potenciál vycházející z koncentrace, a proto je méně užitečná pro účely stanovení priorit.

Kvalitativní kritéria pro analýzu antagonistů ER

19. Střední aktivita luciferázy u obohacené kontroly (25 pM E2) by měla být alespoň čtyřnásobná oproti střední aktivitě kontroly vehikula na každé destičce. Toto kritérium je stanoveno na základě spolehlivosti hodnot cílových ukazatelů z validační studie.

20. Pokud jde o kontrolu kvality analýzy, měla by být relativní transkripční aktivace (RTA) 1 nM E2 větší než 100 %, RTA 1μM 4-hydroxytamoxifenu (OHT) by měla být menší než 40,6 % a RTA 100 μM Digitoninu (Dig) by měla být menší než 0 %.

Prokázání odborné způsobilosti laboratoře (viz odstavec 14 a tabulky 3 a 4 v části «SLOŽKY ANALÝZY ER TA» této zkušební metody).

Vehikulum

21. Jako souběžná kontrola vehikula by měl být použit dimethylsulfoxid (DMSO) nebo vhodné rozpouštědlo ve stejné koncentraci použité pro různé pozitivní a negativní kontroly a zkoušené chemické látky. Zkoušené chemické látky by měly být rozpuštěny v rozpouštědle, které danou zkoušenou chemickou látku rozpouští a je mísitelné s kultivačním médiem. Vhodnými vehikuly jsou voda, etanol (čistota 95 % až 100 %) a DMSO. Jestliže se používá DMSO, neměla by úroveň překročit 0,1 % (obj.). Pro každé vehikulum je třeba prokázat, že maximální použitý objem není cytotoxický a nenarušuje provedení analýzy.

▼M8

Příprava zkoušených chemických látek

22. Obecně je třeba zkoušené chemické látky rozpustit v DMSO nebo jiném vhodném rozpouštědle, postupně naředit stejným rozpouštědlem ve společném poměru 1:10, a připravit tak roztoky pro ředění médiem.

Rozpustnost a cytotoxicita: Důvody pro zjištění rozsahu

23. Měla by být provedena předběžná zkouška, aby bylo možné stanovit vhodný rozsah koncentrace chemické látky, jež má být testována, a zkontrolovat, zda zkoušená chemická látka nevykazuje nějaké problémy v oblasti rozpustnosti a cytotoxicity. Nejdříve se chemické látky zkoušejí do maximální koncentrace 1 µl/ml, 1 mg/ml, nebo 1 mM podle toho, která z uvedených hodnot je nejnižší. Podle rozsahu cytotoxicity nebo nerozpustnosti pozorované při předběžné zkoušce by se chemická látka měla při prvním definitivním provedení zkoušky testovat v log-sériovém ředění, počínaje maximální přijatelnou koncentrací (např. 1 mM, 100µM, 10µM atd.) a měla by se zaznamenat přítomnost zákalu nebo sraženiny či cytotoxicity. Při druhém a v případě potřeby i třetím provedení zkoušky by se měla podle potřeby upravit koncentrace, aby lépe charakterizovala křivku závislosti odpovědi na koncentraci a aby byly vyloučeny koncentrace, které byly zjištěny jako nerozpustné nebo vyvolávající nadměrnou cytotoxicitu.

24. U agonistů a antagonistů ER může přítomnost zvyšujících se úrovní cytotoxicity významně změnit nebo eliminovat typickou sigmoidní odpověď, což je třeba vzít v úvahu při interpretaci dat. Měly by se používat metody zkoušení cytotoxicity, které mohou poskytnout informace o 80 % životaschopnosti buněk, s využitím vhodné analýzy na základě zkušeností laboratoře.

25. Pokud výsledky zkoušky cytotoxicity ukazují, že koncentrace zkoušené chemické látky snížila počet buněk o 20 % nebo více, je třeba tuto koncentraci považovat za cytotoxickou a koncentrace na cytotoxické úrovni nebo vyšší je třeba z hodnocení vyloučit.

Expozice chemické látce a organizace testovacích destiček

26. Postup ředění chemických látek (kroky 1 a 2) a expozici buněk (krok 3) lze provést takto:

Krok 1: Každou zkoušenou chemickou látku je třeba postupně naředit v DMSO nebo vhodném rozpouštědle a přidat do jamek mikrotitrační destičky, aby byla dosažena finální sériová koncentrace stanovená při předběžné zkoušce ke stanovení rozsahu (obvykle v sérii například 1 mM, 100 µM, 10 µM, 1µM, 100 nM, 10 nM, 1 nM, 100 pM a 10 pM (10^{-3}–10^{-11} M)) pro trojí testování.

Krok 2: Ředění chemické látky: Nejprve rozpusťte 1,5 µl zkoušené chemické látky v rozpouštědle na objem 500 µl média.

Krok 3: Expozice buněk chemické látce: Přidejte 50 µl roztoku s médiem (připraveného v kroku 2) do testovací jamky obsahující 10^4 buněk/100 µl/jamku.

Doporučený konečný objem média potřebného pro každou jamku je 150 µl. Zkušební vzorky a referenční standardy lze zařadit tak, jak je uvedeno v tabulce 3 a v tabulce 4.

▼M8

Tabulka 3

Příklad uspořádání koncentrací referenčních standardů na testovací destičce při analýze agonistů ER

Řádek	17α-methyltestosteron			Kortikosteron			17α-estradiol			E2		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	konc. 1 (10 μM)	→	→	100 μM	→	→	1 μM	→	→	10 nM	→	→
B	konc. 2 (1 μM)	→	→	10 μM	→	→	100 nM	→	→	1 nM	→	→
C	konc. 3 (100 nM)	→	→	1 μM	→	→	10 nM	→	→	100 pM	→	→
D	konc. 4 (10 nM)	→	→	100 nM	→	→	1 nM	→	→	10 pM	→	→
E	konc. 5 (1 nM)	→	→	10 nM	→	→	100 pM	→	→	1 pM	→	→
F	konc. 6 (100 pM)	→	→	1 nM	→	→	10 pM	→	→	0,1 pM	→	→
G	konc. 7 (10 pM)	→	→	100 pM	→	→	1 pM	→	→	0,01 pM	→	→
H	VC	→	→	→	→	→	PC	→	→	→	→	→

VC: Kontrola vehikulem (0,1 % DMSO); PC: Pozitivní kontrola (1 nM E2)

27. Při každém provedení zkoušky by měly být testovány referenční standardy (E2, 17α-estradiol, 17-methyltestosteron a kortikosteronmm(tabulka 3)((Na každé testovací destičce by měly být zařazeny jamky PC exponované 1 nM E2, který dokáže vyvolat maximální indukci E2, a jamky VC exponované pouze DMSO (nebo vhodným rozpouštědlem) (tabulka 4). Pokud jsou použity ve stejném experimentu buňky z různých zdrojů (například různý počet pasáží, různá šarže atd.), je třeba referenční standardy testovat pro každý zdroj buněk.

Tabulka 4

Příklad uspořádání koncentrací zkoušených a kontrolních chemických látek na testovací destičce při analýze agonistů ER

Řádek	Zkoušená chemická látka 1			Zkoušená chemická látka 2			Zkoušená chemická látka 3			Zkoušená chemická látka 4		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	konc. 1 (10 μM)	→	→	1 mM	→	→	1 μM	→	→	10 nM	→	→
B	konc. 2 (1 μM)	→	→	100 μM	→	→	100 nM	→	→	1 nM	→	→
C	konc. 3 (100 nM)	→	→	10 μM	→	→	10 nM	→	→	100 pM	→	→

▼M8

Řádek	Zkoušená chemická látka 1			Zkoušená chemická látka 2			Zkoušená chemická látka 3			Zkoušená chemická látka 4		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
D	konc. 4 (10 nM)	→	→	1 μM	→	→	1 nM	→	→	10 pM	→	→
E	konc. 5 (1 nM)	→	→	100 nM	→	→	100 pM	→	→	1 pM	→	→
F	konc. 6 (100 nM)	→	→	10 nM	→	→	10 pM	→	→	0,1 pM	→	→
G	konc. 7 (10 pM)	→	→	1 nM	→	→	1 pM	→	→	0,01 pM	→	→
H	VC	→	→	→	→	→	PC	→	→	→	→	→

VC: Kontrola vehikulem (0,1 % DMSO); Pozitivní kontrola: Pozitivní kontrola (1 nM E2)

Tabulka 5

Příklad uspořádání koncentrací referenčních standardů na testovací destičce při analýze antagonistů ER

Řádek	Tamoxifen			Flutamid			Zkoušená chemická látka 1			Zkoušená chemická látka 2		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	konc. 1 (10 μM)	→	→	10 μM	→	→	10 μM	→	→	10 μM	→	→
B	konc. 2 (1 μM)	→	→	1 μM	→	→	1 μM	→	→	1 μM	→	→
C	konc. 3 (100 nM)	→	→	100 nM	→	→	100 nM	→	→	100 nM	→	→
D	konc. 4 (10 nM)	→	→	10 nM	→	→	10 nM	→	→	10 nM	→	→
E	konc. 5 (1 nM)	→	→	1 nM	→	→	1 nM	→	→	1 nM	→	→
F	konc. 6 (100 pM)	→	→	100 pM	→	→	100 pM	→	→	100 pM	→	→
G	0,1% DMSO	→	→	→	→	→	1 μM OHT	→	→	100 μM Dig	→	→
H	VC	→	→	→	→	→	PC	→	→	→	→	→

VC: Kontrola vehikulem (0,1% DMSO), PC: Pozitivní kontrola:(1 nM E2), OHT :4-Hydroxytamoxifen, Dig: Digitonin.

= obohaceno 25pM E2

28. Aby mohla být posouzena antagonistická aktivita chemických látek, je třeba jamky umístěné v řadách A až G obohatit 25pM E2. Při každém provedení zkoušky by měly být testovány referenční standardy (tamoxifen a flutamid). Na každé testovací destičce by měly být zařazeny jamky s PC exponované 1 nM E2, který může být použit jako kontrola kvality buněčné linie hERα-HeLa-9 903, jamky s VC exponované DMSO (nebo vhodným rozpouštědlem), jamky s 0,1 % DMSO exponované přídavkem DMSO do obohaceného E2 odpovídající „obohacené kontrole“, jamky exponované finální koncentrací 1 μM OHT a jamky exponované 100 μM Dig (tabulka 5). Další testovací destička by měla mít stejné uspořádání bez buněk s referenčními standardy (tabulka 6). Pokud jsou použity ve stejném experimentu buňky z různých zdrojů (například různý počet pasáží, různá šarže atd.), je třeba referenční standardy testovat pro každý zdroj buněk.

▼M8

Tabulka 6

Příklad uspořádání koncentrací zkoušených a kontrolních chemických látek na testovací destičce při analýze antagonistů ER

Řádek	Zkoušená chemická látka 1			Zkoušená chemická látka 2			Zkoušená chemická látka 3			Zkoušená chemická látka 4		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	konc. 1 (10 µM)	→	→	10 µM	→	→	10 µM	→	→	10 µM	→	→
B	konc. 2 (1 µM)	→	→	1 µM	→	→	1 µM	→	→	1 µM	→	→
C	konc. 3 (100 nM)	→	→	100 nM	→	→	100 nM	→	→	100 nM	→	→
D	konc. 4 (10 nM)	→	→	10 nM	→	→	10 nM	→	→	10 nM	→	→
E	konc. 5 (1 nM)	→	→	1 nM	→	→	1 nM	→	→	1 nM	→	→
F	konc. 6 (100 pM)	→	→	100 pM	→	→	100 pM	→	→	100 pM	→	→
G	0,1% DMSO	→	→	→	→	→	1 µM OHT	→	→	100 µM Dig	→	→
H	VC	→	→	→	→	→	PC	→	→	→	→	→

VC: Kontrola vehikulem (0,1% DMSO), PC: Pozitivní kontrola (1 nM E2), OHT: 4-Hydroxytamoxifen, Dig: Digitonin.

: obohaceno 25pM E2

29. Podle potřeby je třeba potvrdit nepřítomnost okrajových účinků, a pokud je podezření na takové účinky, je třeba uspořádání destičky změnit, aby k nim nedocházelo. Může být například použito uspořádání destičky s vyloučením okrajových jamek.

30. Po přidání chemických látek by testovací destičky měly být inkubovány v inkubátoru s 5 % CO_2 při teplotě 37°±1°C po dobu 20–24 hodin, aby se indukovaly reportérové genové produkty.

31. Zvláštní pozornost je třeba věnovat sloučeninám, které jsou vysoce těkavé. V těchto případech mohou vedlejší kontrolní jamky generovat falešně pozitivní výsledky, což je třeba vzít v úvahu s ohledem na očekávané a dosavadní kontrolní hodnoty. V ojedinělých případech, kdy může být těkavost problémem, může pomoci použití „zapečetěných destiček“ účinně izolovat jednotlivé jamky v průběhu zkoušení, a proto je v těchto případech doporučováno.

32. Opakované definitivní testy pro stejnou chemickou látku by měly být prováděny v různé dny, aby byla zajištěna nezávislost.

Luciferázová analýza

33. Pro analýzu může být použito komerční luciferázové činidlo [např. systém Steady-Glo® Luciferase Assay (Promega, E2510 nebo ekvivalentní)] nebo standardní luciferázový systém (např. Promega, E1500 nebo ekvivalentní), pokud jsou splněna kritéria přijatelnosti. Činidla pro analýzu je třeba zvolit podle citlivosti luminometru, který bude použit. Když se používá standardní luciferázový systém, mělo by být před přidáním substrátu použito lyzační činidlo na buněčnou kulturu (např. Promega, E1531 nebo ekvivalentní). Luciferázové činidlo je třeba aplikovat podle pokynů výrobce.

ANALÝZA ÚDAJŮ

Analýza agonistů ER

34. Aby byla získána relativní transkripční aktivita u PC (1 nM E2), mohou být v případě analýzy agonistů ER luminiscenční signály ze stejné destičky analyzovány podle těchto kroků (přijatelné jsou i jiné ekvivalentní matematické procesy):

Krok 1. Vypočítejte střední hodnotu pro VC.

▼M8

Krok 2. Odečtěte střední hodnotu VC od hodnoty každé jamky, abyste normalizovali data.

Krok 3. Vypočítejte střední hodnotu pro normalizovanou PC.

Krok 4. Vydělte normalizovanou hodnotu každé jamky na destičce střední hodnotou normalizované PC (PC = 100 %).

Konečná hodnota každé jamky je relativní transkripční aktivita pro tuto jamku v porovnání s odpovědí PC.

Krok 5. Vypočtěte střední hodnotu relativní transkripční aktivity pro každou skupinu koncentrace zkoušené chemické látky. Odpověď má dva rozměry: zprůměrovaná transkripční aktivita (odpověď) a koncentrace, při níž dochází k odpovědi (viz následující část).

Poznámky k indukci EC_{50}, PC_{50} a PC_{10}

35. Pro výpočet EC_{50} je nutná celá křivka závislosti koncentrace na odpovědi, ale to nemusí být vždy dosažitelné nebo praktické vzhledem k mezím rozsahu zkušebních koncentrací (například v důsledku problémů s cytotoxicitou nebo rozpustností). Protože jsou však EC_{50} a maximální indukční úroveň (odpovídající horní hodnotě Hillovy rovnice) informativními parametry, měly by být tyto parametry pokud možno uvedeny. Pro výpočet EC_{50} a maximální indukční úrovně by měl být použit vhodný statistický software (např. statistický software Graphpad Prism). Jestliže lze na údaje o koncentraci a odpovědi aplikovat Hillovu logistickou rovnici, je třeba vypočítat EC_{50} takto (7):

Y= dolní + (horní–dolní) / (1+10 exp ((log EC_{50}–X) x Hillův koeficient))
Kde:

X je logaritmus koncentrace; a

Y je odpověď, přičemž Y začíná na dolní hranici a pokračuje nahoru sigmoidní křivkou. Dolní hranice je v Hillově logistické rovnici pevně stanovena na nule.

36. Pro každou zkoušenou chemickou látku by měly být zajištěny tyto podmínky:

RPC_{Max}, což je maximální úroveň odpovědi indukované zkoušenou chemickou látkou, vyjádřená jako procento odpovědi indukované 1 nM E2 na stejné destičce, stejně jako PC_{Max} (koncentrace související s RPC_{Max}); a

u pozitivních chemických látek koncentrace, které indukují PC_{10}, případně PC_{50}.

37. Hodnotu PCx lze vypočítat interpolací mezi 2 body do bodu o souřadnici X–Y, přičemž jeden je bezprostředně nad a jeden bezprostředně pod hodnotou PCx. Pokud mají datové body ležící bezprostředně nad a pod hodnotou PCx souřadnice (a,b), respektive (c,d), pak lze vypočítat hodnotu PCx podle této rovnice:

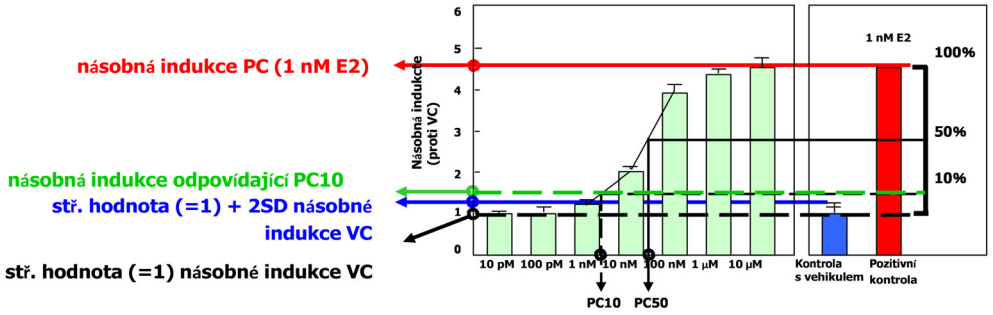
log[PCx] = log[c]+(x-d)/(d-b)

▼M8

38. Popisy hodnot PC jsou uvedeny níže na obrázku 1.

Obrázek 1

Příklad odvození hodnot PC. Na každé testovací destičce je zařazena PC (1 nM E2)



Analýza antagonistů ER

39. Aby byla získána relativní transkripční aktivita (RTA) u obohacené kontroly (25 pM E2), mohou být v případě analýzy antagonistů ER luminiscenční signály ze stejné destičky analyzovány podle těchto kroků (přijatelné jsou i jiné ekvivalentní matematické procesy):

Krok 1. Vypočítejte střední hodnotu pro VC.

Krok 2. Odečtěte střední hodnotu VC od hodnoty každé jamky, abyste normalizovali data. Krok 3. Vypočítejte střední hodnotu pro normalizovanou obohacenou kontrolu.

Krok 4. Vydělte normalizovanou hodnotu každé jamky na destičce střední hodnotou normalizované obohacené kontroly (obohacená kontrola = 100 %).

Konečná hodnota každé jamky je relativní transkripční aktivita pro tuto jamku v porovnání s odpovědí obohacené kontroly.

Krok 5. Vypočtěte střední hodnotu relativní transkripční aktivity pro každou expozici.

Poznámky k indukci IC_{30} a IC_{50}

40. U pozitivních chemických látek je třeba uvést koncentrace, které indukují IC_{30}, případně IC_{50}.

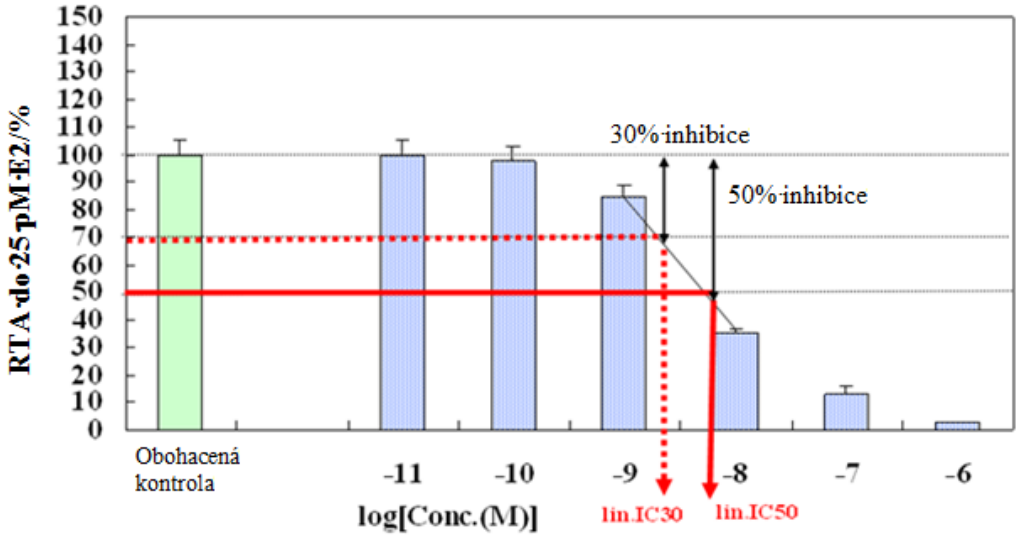
41. Hodnotu ICx lze vypočítat interpolací mezi 2 body do bodu o souřadnici X–Y, přičemž jeden je bezprostředně nad a jeden bezprostředně pod hodnotou ICx. Pokud mají datové body ležící bezprostředně nad a pod hodnotou ICx souřadnice (c,d), respektive (a,b), pak lze vypočítat hodnotu ICx podle této rovnice:

lin ICx = a-(b-(100-x)) (a-c) /(b-d)

▼M8

Obrázek 2

Příklad odvození hodnot IC. Na každé testovací destičce je zařazena obohacená kontrola (25 nM E2)



RTA: relativní transkripční aktivita

42. Výsledky by měly vycházet ze dvou (nebo tří) nezávislých provedení zkoušek. Jestliže jsou při dvou provedeních zkoušky získány srovnatelné, a tedy reprodukovatelné výsledky, není nutné provádět zkoušku potřetí. Aby byly výsledky přijatelné, měly by:

— splňovat kritéria přijatelnosti (viz kritéria přijatelnosti v odstavcích 14–20),

— být reprodukovatelné.

Kritéria interpretace údajů

Tabulka 7

Pozitivní a negativní kritéria rozhodování při analýze agonistů ER

Pozitivní	Jestliže je získána RPC_{Max}, která se rovná nebo je vyšší než 10 % odpovědi pozitivní kontroly alespoň dvou ze dvou nebo dvou ze tří provedení zkoušek.
Negativní	Jestliže RPC

Tabulka 8

Pozitivní a negativní kritéria rozhodování při analýze antagonistů ER

Pozitivní	Jestliže je vypočtena IC_{30} alespoň ve dvou ze dvou nebo dvou ze tří provedení zkoušek.
Negativní	Jestliže IC_{30} není vypočtena alespoň ve dvou ze dvou nebo dvou ze tří provedení zkoušek.

▼**M8**

43. Kritéria interpretace údajů jsou uvedena v tabulkách 7 a 8. Pozitivní výsledky budou charakterizovány jak intenzitou účinku, tak i koncentrací, při níž k účinku dochází. Oba tyto cíle splňuje vyjádření výsledků jako koncentrace, při níž je u analýzy agonistů dosaženo 50 % (PC50) nebo 10 % (PC10) hodnot PC a u analýzy antagonistů je 50 % (IC50) nebo 30 % (IC30) hodnoty obohacené kontroly inhibováno. Zkoušená chemická látka je však určena jako pozitivní, jestliže se maximální odpověď indukovaná touto zkoušenou chemickou látkou (RPC_{Max}) rovná nebo je vyšší než 10 % odpovědi PC alespoň ve dvou ze dvou nebo dvou ze tří provedení zkoušek, zatímco za negativní je zkoušená chemická látka považována, jestliže RPC_{Max} nedosáhne alespoň 10 % odpovědi pozitivní kontroly ve dvou ze dvou nebo dvou ze tří provedení zkoušek.

44. Výpočty PC_{10}, PC_{50} a PC_{Max} v analýze agonistů ER a IC_{30} a IC_{50} v analýze antagonistů ER mohou být provedeny pomocí tabulkového kalkulátoru, který je dostupný u příslušného pokynu na veřejných webových stránkách OECD ([1]).

45. Získání hodnot PC_{10} nebo PC_{50} a IC_{30} nebo IC_{50} alespoň dvakrát by mělo stačit. Pokud však výsledná výchozí hodnota pro data ve stejném rozsahu koncentrace vykazují variabilitu s nepřijatelně vysokým variačním koeficientem (CV; %), nelze tato data považovat za spolehlivá a je třeba najít zdroj vysoké variability. Variační koeficient prvních tří opakování (tj. údaje o intenzitě luminiscence) datových bodů, které jsou použity pro výpočet PC_{10}, by měl být menší než 20 %.

46. Splnění kritérií přijatelnosti ukazuje, že analytický systém funguje správně, ale nezaručuje to, že konkrétní provedení zkoušky podá přesné údaje. Opakování výsledků první zkoušky je nejlepším důkazem, že údaje byly přesné.

47. V případě analýzy agonistů ER, kdy jsou potřebné další informace kromě informací pro účely screeningu a stanovení priorit tohoto pokynu pro pozitivní zkoušené chemické látky, zvláště pro chemické látky PC_{10}–PC_{49}, jakož i chemické látky, u nichž existuje podezření, že nadměrně stimulují luciferázu, může být potvrzeno, že pozorovaná aktivita luciferázy je výhradně ERα-specifická odpověď pomocí antagonisty ERα (viz dodatek 2.1).

ZÁVĚREČNÁ ZPRÁVA

48. Viz odstavec 20 „SLOŽKY ANALÝZY ER TA“.

LITERATURA

(1) OECD (2015). Report of the Inter-Laboratory Validation for Stably Transfected Transactivation Assay to detect Estrogenic and Anti-estrogenic Activity. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 225), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(2) Escande A., *et al.* (2006). Evaluation of Ligand Selectivity Using Reporter Cell Lines Stably Expressing Estrogen Receptor Alpha or Beta, *Biochem. Pharmacol.,* 71, 1 459-1 469.

(3) Kuiper G.G., *et al.* (1998). Interaction of Estrogenic Chemicals and Phytoestrogens with Estrogen Receptor Beta, *Endocrinol.,* 139, 4 252-4 263.

([1]) http://www.oecd.org/env/testguidelines

▼**M8**

(4) Spaepen M., *et al.* (1992). Detection of Bacterial and Mycoplasma Contamination in Cell Cultures by Polymerase Chain Reaction, FEMS Microbiol. Lett., 78(1), 89-94.

(5) Kobayashi H., *et al.* (1995). Rapid Detection of Mycoplasma Contamination in Cell Cultures by Enzymatic Detection of Polymerase Chain Reaction (PCR) Products, J. Vet. Med. Sci., 57(4), 769- 71.

(6) Dussurget O. and Roulland-Dussoix D. (1994). Rapid, Sensitive PCR-Based Detection of Mycoplasmas in Simulated Samples of Animal Sera, *Appl.* Environ. *Microbiol*., 60(3), 953-9.

(7) De Lean A., Munson P.J. and Rodbard D. (1978). Simultaneous Analysis of Families of Sigmoidal Curves: Application to Bioassay, Radioligand Assay, and Physiological Dose-Response Curves, Am. J. *Physiol*., 235, E97-El02.

▼**M8**

Dodatek 2.1

FALEŠNĚ POZITIVNÍ: POSOUZENÍ LUMINISCENČNÍCH SIGNÁLŮ NEZPROSTŘEDKOVANÝCH RECEPTOREM

1. Falešně pozitivní výsledky mohou být při analýze agonistů ER generovány aktivací luciferázového genu nezprostředkovanou ER nebo přímou aktivací genového produktu či nesouvisející fluorescencí. Tyto účinky indikuje neúplná nebo neobvyklá křivka závislosti odpovědi na dávce. V případě podezření na tyto účinky je třeba vyšetřit účinek antagonisty ER (např. 4-hydroxytamoxifen (OHT) při netoxické koncentraci) na odpověď. K tomuto účelu nemusí být vhodný čistý antagonista ICI 1827 80, neboť dostatečná koncentrace ICI 1827 80 může snížit hodnotu VC, což ovlivní analýzu dat.

2. Aby byla zajištěna validita tohoto přístupu, je třeba na stejné destičce otestovat:

   — agonistickou aktivitu neznámé chemické látky s/bez 10 μM OHT

   — VC (tři opakování)

   — OHT (tři opakování)

   — 1 nM E2 (tři opakování) jako agonistická PC

   — 1 nM E2 + OHT (tři opakování)

KRITÉRIA INTERPRETACE ÚDAJŮ

Poznámka: Do všech jamek by měla být aplikována stejná koncentrace vehikula.

— Jestliže aplikace antagonisty ER NEOVLIVNÍ agonistickou aktivitu neznámé chemické látky, klasifikuje se jako „negativní“.

— Jestliže je agonistická aktivita neznámé chemické látky zcela inhibována, použijte kritéria rozhodování.

— Jestliže se agonistická aktivita při nejnižší koncentraci rovná nebo je vyšší než odpověď PC_{10}, je neznámá chemická látka inhibována při odpovědi rovnající se nebo vyšší než PC_{10}. Vypočte se rozdíl odpovědí mezi jamkami neošetřenými a ošetřenými antagonistou ER a jamkami, do nichž antagonista ER byl aplikován, a tento rozdíl je třeba považovat za skutečnou odpověď a použít jej pro výpočet vhodných parametrů, aby mohlo být rozhodnuto o klasifikaci.

ANALÝZA ÚDAJŮ

Zkontrolujte standard funkčnosti.

Zkontrolujte variační koeficient mezi jamkami ošetřenými za stejných podmínek.

1. Vypočítejte střední hodnotu VC.

2. Odečtěte střední hodnotu VC od hodnoty každé jamky **neošetřené** OHT.

3. Vypočítejte střední hodnotu OHT.

4. Odečtěte střední hodnotu VC od hodnoty každé jamky ošetřené OHT.

5. Vypočítejte střední hodnotu PC.

6. Vypočítejte relativní transkripční aktivitu všech ostatních jamek ve vztahu k PC.

▼**M8**

Dodatek 2.2

PŘÍPRAVA SÉRA OŠETŘENÉHO AKTIVNÍM UHLÍM POTAŽENÝM DEXTRANEM (DCC)

1. Ošetření séra aktivním uhlím potaženým dextranem (DCC) je obecná metoda na odstranění estrogenních sloučenin ze séra, které se přidává do kultivačního média, aby se vyloučila zkreslená odpověď související s reziduálními estrogeny v séru. Tímto postupem lze ošetřit 500 ml fetálního bovinního séra (FBS).

SLOŽKY

2. Potřebné budou tyto materiály a vybavení:

Materiály

Aktivní uhlí

Dextran

Hexahydrát chloridu hořečnatého ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$)

Sacharóza

1 M HEPES pufrační roztok (pH 7,4)

Ultračistá voda z filtračního systému

Vybavení

Sterilizovaná skleněná nádoba (velikost podle potřeby) běžná laboratorní odstředivka (s možností nastavení teploty na 4 °C)

POSTUP

3. Při použití 50ml odstředivkových zkumavek se upraví tento postup:

[Den 1] Připravte suspenzi aktivního uhlí potaženého dextranem s 1 litrem ultračisté vody obsahující 1,5 mM $MgCl_2$, 0,25 M sacharózy, 2,5 g aktivního uhlí, 0,25 g dextranu a 5 mM HEPES a nechte promíchávat přes noc při 4 °C.

[Den 2] Nadávkujte suspenzi do 50ml odstředivkových zkumavek a odstřeďujte při 10 000 ot./min. při 4 °C po dobu 10 minut. Odstraňte supernatant a uložte polovinu sedimentu aktivního uhlí při 4 °C pro použití 3. den. Druhou polovinu aktivního uhlí rozpusťte v FBS, které jste nechali pomalu roztát, aby nevznikla sraženina, a inaktivovali teplem při teplotě 56 °C po dobu 30 minut, poté přemístěte do sterilizované nádoby, například Erlenmeyerovy baňky. Tuto suspenzi nechte lehce promíchávat přes noc při teplotě 4 °C.

[Den 3] Nadávkujte suspenzi s FBS do odstředivkových zkumavek a odstřeďujte při 10 000 ot./min. při 4 °C po dobu 10 minut. Seberte FBS a uložte jej do nového sedimentu aktivního uhlí připraveného a uloženého 2. den. Rozpusťte sediment aktivního uhlí a tuto suspenzi nechte přes noc lehce promíchávat ve sterilizované nádobě při teplotě 4 °C.

[Den 4] Nadávkujte suspenzi k odstřeďování při 10 000 ot./min. při teplotě 4 °C po dobu 10 minut a sterilizujte supernatant filtrací přes sterilní filtr 0,2 μm. Tento FBS ošetřený DCC by měl být uchováván při teplotě -20 °C a může být používán po dobu jednoho roku.

▼**M8**

Dodatek 3

ANALÝZA TRANSAKTIVACE ESTROGENOVÝCH RECEPTORŮ VM7LUC KE ZJIŠTĚNÍ AGONISTŮ A ANTAGONISTŮ ESTROGENOVÝCH RECEPTORŮ

VÝCHOZÍ ÚVAHY A OMEZENÍ (VIZ TAKÉ VŠEOBECNÝ ÚVOD)

1. Při této analýze se používá buněčná linie VM7Luc4E2 ([1]). Byla validována Meziagenturním střediskem pro hodnocení alternativních toxikologických metod Národního toxikologického programu (*National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods* – NICEATM) a Meziagenturním koordinačním výborem pro validaci alternativních metod (*Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods* – ICCVAM) (1). Buněčné linie VM7Luc exprimují převážně endogenní ERα a menší množství endogenního ERβ (2) (3) (4).

2. Tuto analýzu lze použít u široké škály látek, pokud mohou být rozpuštěny v dimethylsulfoxidu (DMSO; CASRN 67-68-5*)*, nereagují s DMSO ani s kultivačním médiem a nejsou cytotoxické ve zkoušených koncentracích. Pokud není možné použít DMSO, může být použito jiné vehikulum, jako je etanol nebo voda (viz odstavec 12). Prokázaná funkční způsobilost analýzy (ant)agonistů VM7Luc ER TA naznačuje, že údaje získané při této analýze mohou poskytnout informace o mechanismech působení zprostředkovaných ER a mohou být vzaty v úvahu při určování priorit látek k dalšímu zkoušení.

3. Tato analýza je specificky určena na detekci TA zprostředkované hERα a hERß měřením chemiluminiscence jako sledované vlastnosti. Použití chemiluminiscence při bioanalýzách je rozšířené, protože luminiscence má vysoký poměr odstupu signálu od pozadí. Aktivitu luciferázy světlušek v buněčných testech však mohou zkreslovat látky, které inhibující enzym luciferázu, a vyvolávají tak zdánlivou inhibici nebo vyšší luminiscenci v důsledku stabilizace proteinů. Kromě toho v některých analýzách reportérového genu ER na bázi luciferázy byly při koncentracích fytoestrogenů vyšších než 1 μM hlášeny luminiscenční signály nezprostředkované receptorem v důsledku nadměrné aktivace reportérového genu luciferázy (9) (11). Přestože křivka závislosti odpovědi na dávce naznačuje, že ke skutečné aktivaci systému ER dochází při nižších koncentracích, je nutné v systémech analýzy stabilně transfekované ER TA pečlivě zkoumat exprese luciferázy získané při vysoké koncentraci fytoestrogenů nebo podobných sloučenin, u nichž existuje podezření, že vyvolávají nadměrnou aktivaci reportérového genu luciferázy podobně jako fytoestrogeny.

4. Před použitím této analýzy pro regulační účely je třeba přečíst si „VŠEOBECNÝ ÚVOD“ a „SLOŽKY ANALÝZY ER TA“. Definice a zkratky používané v této zkušební metodě jsou popsány v dodatku 1.

([1]) Do června 2016 byla tato buněčná linie označována za buněčnou linii BG1Luc. Buňky BG-1 původně popsal Geisinger et al. (1998) (12) a později je charakterizovali výzkumníci v Národním ústavu věd o zdravém životním prostředí (NIEHS) (13). Relativně nedávno bylo objeveno, že existují dvě různé varianty buněk BG-1, které používají výzkumníci, a to BG-1 Fr a BG-1 NIEHS. Hloubková analýza zahrnující testování DNA těchto dvou variantních buněčných linií BG-1, kterou provedl Li a spolupracovníci (2014) (14), ukázala, že buněčná linie BG-1 Fr je jedinečná a že buněčná linie BG-1 NIEHS, tj. původní buněčná linie použitá při vývoji analýzy, není buněčná linie lidského karcinomu vaječníku BG1, ale že jde o variantu buněčné linie lidského karcinomu prsu MCF7. Buněčná linie použitá při analýze, původně nazývaná BG1Luc4E2 (15), se bude nyní označovat jako VM7Luc4E2 („V“ = variantní; „M7“ = buňky MCF7). Podobně se bude analýza nyní označovat jako VM7Luc ER TA. I když se mění původ buněčné linie, z níž analýza vychází, nejsou tím dotčeny publikované validační studie ani využitelnost a použití této analýzy pro screening estrogenních/antiestrogenních chemických látek.

▼M8

PRINCIP ANALÝZY (VIZ TAKÉ VŠEOBECNÝ ÚVOD)

5. Analýza se používá na indikaci vazby ligandu na estrogenový receptor, po níž následuje přesun komplexu receptor-ligand do jádra. V jádru se komplex receptor-ligand naváže na specifické responzivní elementy DNA a transaktivuje reportérový gen (*luc*), což vyvolá tvorbu luciferázy a následnou emisi světla, které lze kvantifikovat pomocí luminometru. Aktivitu luciferázy lze rychle a levně vyhodnotit pomocí řady komerčně dostupných testů. Test VM7Luc ER TA využívá ER responzivní buněčnou linii lidského adenokarcinomu prsu, VM7, která je stabilně transfekována reportérovou konstrukcí světlušek *luc* pod kontrolou čtyř estrogenových responzivních elementů umístěných před promotorem viru myšího nádoru prsní žlázy (MMTV), k detekci látek s agonistickou nebo antagonistickou aktivitou ER *in vitro*. Tento promotor MMTV vykazuje jen malou křížovou reaktivitu s jinými steroidními a nesteroidními hormony (8). Kritéria pro interpretaci údajů jsou podrobně popsána v odstavci 41. Stručně řečeno, pozitivní odpověď se určuje podle křivky závislosti odpovědi na koncentraci obsahující alespoň tři body s nepřekrývajícími se chybovými úsečkami (střední hodnota ± SD) a podle změny amplitudy (normalizovaná relativní luminiscenční jednotka [RLU]) ve výši alespoň 20 % maximální hodnoty pro referenční standard (17β-estradiol [E2; CASRN 50-28-2] při analýze agonistů, raloxifen-hydrochlorid [Ral; CASRN 84 449-90-1]/E2 při analýze antagonistů).

POSTUP

Buněčná linie

6. Pro analýzu by se měla používat stabilně transfekovaná buněčná linie VM7Luc4E2. Tato buněčná linie je v současnosti k dispozici pouze na základě technické licenční smlouvy od Kalifornské univerzity, Davis, Kalifornie, USA ([1]) a společnosti Xenobiotic Detection Systems Inc., Durham, North Carolina, USA ([2]).

Stabilita buněčné linie

7. Aby se zachovala stabilita a integrita buněčné linie, měly by buňky růst více než jednu pasáž ze zmrazené zásoby v udržovacím médiu (viz odstavec 9). Buňky by neměly být kultivovány déle než 30 pasáží. Pro buněčnou linii VM7Luc4E2 bude 30 pasáží trvat zhruba tři měsíce.

Buněčná kultura a podmínky na destičce

8. Měly být dodržovány postupy uvedené v pokynu ke správné praxi při kultivaci buněk (5)(6), aby byla zajištěna kvalita všech materiálů a metod a zachována integrita, validita a reprodukovatelnost veškeré provedené práce.

9. Buňky VM7Luc4E2 se uchovávají v médiu RPMI 1 640 doplněném 0,9 % přípravkem Pen-Strep a 8,0 % fetálním bovinním sérem (FBS) v inkubátoru vyhrazeném pro tkáňové kultury při teplotě 37 °C ± 1 °C, vlhkosti vzduchu 90 % ± 5 % a 5,0 % ± 1 % CO_2/vzduch.

10. Po dosažení konfluence ~ 80 % se buňky VM7Luc4E2 subkultivují a po dobu 48 hodin upravují v prostředí bez estrogenů, než jsou umístěny na 96jamkovou mikrotitrační destičku, kde jsou exponovány zkoušenými chemickými látkami a analyzovány na indukci luciferázové aktivity závislé

([1]) Michael S. Denison, Ph.D. Professor, Dept. of Environmental Toxicology, 4241 Meyer Hall, One Shields Ave, University of California, Davis, CA 95616, E: msdenison@ucdavis.edu, (530) 754-8649.

([2]) Xenobiotic Detection Systems Inc. 1601 East Geer Street, Suite S, Durham NC, 27704 USA, email: info@dioxins.com, Telefon: 919-688-4804, Fax: 919-688-4404 Org.

▼M8

na estrogenu. Médium bez estrogenů (EFM) obsahuje Dulbeccovu modifikaci Eaglova média bez fenolové červeně (DMEM), doplněného 4,5 % FBS ošetřeného aktivním uhlím/dextranem, 1,9 % L-glutaminu a 0,9 % Pen-Strepu. Žádné plastové pomůcky by neměly vykazovat estrogenní aktivitu [viz podrobný protokol (7)].

Kritéria přijatelnosti

11. Přijetí nebo odmítnutí zkoušky vychází z hodnocení referenčního standardu a kontrolních výsledků z každého experimentu na 96jamkové destičce. Každý referenční standard se zkouší v několika koncentracích a na několika vzorcích každé referenční i kontrolní koncentrace. Výsledky se porovnají s kvalitativními kontrolami (QC) u těch parametrů, které byly odvozeny z dosavadních databází agonistů a antagonistů, které si každá laboratoř vypracovala při prokazování způsobilosti. Dosavadní databáze se průběžně aktualizují o hodnoty referenčních standardů a kontrol. Při změnách vybavení nebo podmínek v laboratoři může být nutná aktualizace dosavadních databází.

Zkouška agonistů

Zkouška ke stanovení rozsahu

- Indukce: Indukce na destičce se měří vydělením průměrné nejvyšší referenční standardní hodnoty relativní luminiscenční jednotky (RLU) E2 průměrnou kontrolní hodnotou RLU DMSO. Obvykle je dosažena pětinásobná indukce, ale pro účely přijetí by měla být indukce větší než nebo rovna čtyřnásobku.

- Výsledky kontroly DMSO: Kontrolní hodnoty RLU rozpouštědla by měly být v rozsahu 2,5násobku směrodatné odchylky dosavadní kontrolní střední hodnoty RLU rozpouštědla.

- Experiment, při němž není splněno ani jedno kritérium, je třeba vyřadit a zopakovat.

Souhrnný test

Zahrnuje kritéria přijatelnosti ze zkoušky ke stanovení rozsahu agonistů a tyto údaje:

- Referenční standardní výsledky: Tvar křivky závislosti odpovědi na koncentraci u referenčního standardu E2 by měl být sigmoidní a křivka by měla mít alespoň tři hodnoty v lineární části křivky závislosti odpovědi na koncentraci.

- Výsledky pozitivní kontroly: Kontrolní hodnoty RLU methoxychloru by měly být větší než střední hodnota DMSO plus trojnásobek směrodatné odchylky od střední hodnoty DMSO.

- Experiment, při němž není splněno některé z kritérií přijatelnosti, je třeba vyřadit a zopakovat.

Zkouška antagonistů

Zkouška ke stanovení rozsahu

- Redukce: Redukce na destičce se měří vydělením průměrné nejvyšší referenční standardní hodnoty RLU Ral/E2 průměrnou kontrolní hodnotou RLU DMSO. Obvykle je dosažena pětinásobná redukce, ale pro účely přijetí by měla být redukce větší než nebo rovna trojnásobku.

- Výsledky kontroly E2: Kontrolní hodnoty RLU E2 by měly být v rozsahu 2,5násobku směrodatné odchylky dosavadní kontrolní střední hodnoty RLU E2.

▼M8

- Výsledky kontroly DMSO: Kontrolní hodnoty RLU DMSO by měly být v rozsahu 2,5násobku směrodatné odchylky dosavadní kontrolní střední hodnoty RLU rozpouštědla.

- Experiment, při němž není splněno některé z kritérií přijatelnosti, se vyřadí a zopakuje.

Souhrnný test

Zahrnuje kritéria přijatelnosti ze zkoušky ke stanovení rozsahu antagonistů a tyto údaje:

- Referenční standardní výsledky: Tvar křivky závislosti odpovědi na koncentraci u referenčního standardu Ral/E2 by měl být sigmoidní a křivka by měla mít alespoň tři hodnoty v lineární části křivky závislosti odpovědi na koncentraci.

- Výsledky pozitivní kontroly: Kontrolní hodnoty RLU tamoxifenu/E2 by měly být menší než kontrolní střední hodnota E2 minus trojnásobek směrodatné odchylky od střední hodnoty E2.

- Experiment, při němž není splněno některé z kritérií přijatelnosti, se vyřadí a zopakuje.

Referenční standardy, pozitivní kontrola a kontrola vehikula

Kontrola vehikula (analýzy agonistů a antagonistů)

12. Rozpouštědlo, které se používá na rozpuštění zkoušených chemických látek, by mělo být testováno jako kontrola s vehikulem. Vehikulem použitým při validaci analýzy VM7Luc ER TA byl 1 % (obj.) dimethylsulfoxid (DMSO, CASRN 67-68-5) (viz odstavec 24). Jestliže je použito jiné vehikulum než DMSO, měly by být všechny referenční standardy, kontroly a zkoušené chemické látky testovány podle potřeby ve stejném vehikulu.

Referenční standardy (zjištění rozsahu agonistů)

13. Referenčním standardem je E2 (CASRN 50-28-2). Při zkouškách ke stanovení rozsahu sestává referenční standard z postupného ředění čtyř koncentrací E2 ($1{,}84 \times 10^{-10}$, $4{,}59 \times 10^{-11}$, $1{,}15 \times 10^{-11}$ a $2{,}87 \times 10^{-12}$ M), přičemž každá koncentrace se zkouší v duplikátních jamkách.

Referenční standardy (souhrnný test agonistů)

14. E2 pro souhrnný test sestává z postupného ředění 1: 2 a zahrnuje 11 koncentrací (v rozsahu od $3{,}67 \times 10^{-10}$ do $3{,}59 \times 10^{-13}$ M) E2 v duplikátních jamkách.

Referenční standardy (zjištění rozsahu antagonistů)

15. Referenčním standardem je kombinace Ral (CASRN 84 449-90-1) a E2 (CASRN 50-28-2). Ral/E2 pro zkoušky ke stanovení rozsahu sestává z postupného ředění tří koncentrací Ral ($3{,}06 \times 10^{-9}$, $7{,}67 \times 10^{-10}$ a $1{,}92 \times 10^{-10}$M) plus fixní koncentrace E2 ($9{,}18 \times 10^{-11}$ M) v duplikátních jamkách.

Referenční standard (souhrnný test antagonistů)

16. Ral/E2 pro souhrnný test sestává z postupného ředění Ral 1: 2 (v rozsahu od $2{,}45 \times 10^{-8}$ do $9{,}57 \times 10^{-11}$M) plus fixní koncentrace ($9{,}18 \times 10^{-11}$ M) E2 zahrnujícího devět koncentrací Ral/E2 v duplikátních jamkách.

Slabá pozitivní kontrola (agonista)

17. Slabá pozitivní kontrola je $9{,}06 \times 10^{-6}$ M *p,p'*-methoxychlor (methoxychlor; CASRN 72-43-5) v EFM.

▼M8

Slabá pozitivní kontrola (antagonista)

18. Slabá pozitivní kontrola sestává z tamoxifenu (CASRN 10 540-29-1) 3,36 x 10^{-6} M s 9,18 × 10^{-11} M E2 v EFM.

Kontrola E2 (pouze analýza antagonistů)

19. Kontrola E2 je 9,18 × 10^{-11} M E2 v EFM a používá se jako výchozí negativní kontrola.

Násobná indukce (agonista)

20. Indukce luciferázové aktivity referenčního standardu (E2) se měří vydělením průměrné nejvyšší referenční standardní hodnoty RLU E2 průměrnou kontrolní hodnotou RLU DMSO, přičemž výsledek by měl být větší než čtyřnásobek.

Násobná indukce (antagonista)

21. Střední luciferázová aktivita referenčního standardu (Ral/E2) se měří vydělením průměrné nejvyšší referenční standardní hodnoty RLU Ral/E2 průměrnou kontrolní hodnotou RLU DMSO a měla by být větší než trojnásobek.

Prokázání odborné způsobilosti laboratoře (viz odstavec 14 a tabulky 3 a 4 v části «SLOŽKY ANALÝZY ER TA» této zkušební metody)

Vehikulum

22. Zkoušené chemické látky by měly být rozpuštěny v rozpouštědle, které zkoušenou chemickou látku rozpouští a je mísitelné s kultivačním médiem. Vhodnými vehikuly jsou voda, etanol (čistota 95 % až 100 %) a DMSO. Jestliže se používá DMSO, neměla by úroveň překročit 1 % (obj.). Pro každé vehikulum je třeba prokázat, že maximální použitý objem není cytotoxický a nenarušuje provedení analýzy. Referenční standardy a kontroly se rozpustí ve 100 % rozpouštědle a poté naředí na vhodné koncentrace v EFM.

Příprava zkoušených chemických látek

23. Zkoušené chemické látky se rozpustí ve 100 % DMSO (nebo vhodném rozpouštědle) a poté naředí na vhodné koncentrace v EFM. Před rozpuštěním a naředěním by se měly všechny zkoušené chemické látky nechat ustálit na pokojovou teplotu. Pro každý experiment by se měly připravit čerstvé roztoky zkoušených chemických látek. V roztocích by neměla být znatelná žádná sraženina ani zákal. Zásoba referenčních standardů a kontrol může být připravována hromadně; pro každý experiment by však měly být připraveny čerstvé konečné referenční standardní a kontrolní roztoky a zkoušené chemické látky a měly by být použity do 24 hodin od přípravy.

Rozpustnost a cytotoxicita: Důvody pro zjištění rozmezí dávek

24. Zkoušky ke stanovení rozsahu zahrnují sedmibodové postupné ředění – 1:10 a provádějí se dvakrát. Nejdříve se chemické látky zkoušejí do maximální koncentrace 1 mg/ml (~1 mM) u zkoušek agonistů a 20 μg/ml (~10 μM) u zkoušek antagonistů. Experimenty ke stanovení rozsahu se používají k určení:

— počátečních koncentrací zkoušené chemické látky, jež mají být použity při souhrnném testování,

— ředění zkoušených chemických látek (1: 2 nebo 1: 5), jež mají být použity při souhrnném testování.

▼M8

25. Posouzení životaschopnosti buněk/cytotoxicity je zahrnuto v protokolech o zkouškách agonistů a antagonistů (7) a je součástí zkoušek ke stanovení rozsahu a souhrnného testování. Metodou posouzení cytotoxicity, která byla použita pro posouzení životaschopnosti buněk při validaci analýzy VM7Luc ER TA (1), byla škálovaná kvalitativní vizuální observační metoda; ke stanovení cytotoxicity však může být použita kvantitativní metoda (viz protokol (7). Údaje z koncentrací zkoušených chemických látek, které vyvolávají více než 20 % redukci životaschopnosti, nelze použít.

Expozice zkoušené chemické látce a organizace testovacích destiček

26. Buňky se spočítají a umístí na 96jamkové mikrotitrační destičky (2 x 10^5 buněk na jamku) v EFM a ponechají se inkubovat po dobu 24 hodin, aby se umožnilo přichycení buněk na destičku. EFM se odstraní a nahradí zkoušenými a referenčními chemickými látkami v EFM a ponechají se inkubovat po dobu 19–24 hodin. Zvláštní pozornost je třeba věnovat sloučeninám, které jsou vysoce těkavé, neboť vedlejší kontrolní jamky mohou generovat falešně pozitivní výsledky. V těchto případech může pomoci použití „zapečetěných destiček“ účinně izolovat jednotlivé jamky v průběhu zkoušení, a proto je doporučováno.

Zkoušky ke stanovení rozsahu

27. *Při zkouškách* ke stanovení rozsahu se používají všechny jamky 96jamkové mikrotitrační destičky na testování až šesti zkoušených chemických látek v sedmibodovém postupném ředění 1:10 duplicitně (viz obrázky 1 a 2).

— *Při zkouškách* ke stanovení rozsahu *agonistů* se používají čtyři koncentrace E2 duplicitně jako referenční standard a čtyři replikované jamky pro kontrolu DMSO.

— Při zkouškách ke stanovení rozsahu *antagonistů* se používají tři koncentrace Ral/E2 s 9,18 × 10^{-11} M E2 duplicitně jako referenční standard a tři replikované jamky pro kontrolu E2 a DMSO.

Obrázek 1

Uspořádání 96jamkové mikrotitrační destičky při zkoušce ke stanovení rozsahu agonistů

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TC1-1	TC1-1	TC2-1	TC2-1	TC3-1	TC3-1	TC4-1	TC4-1	TC5-1	TC5-1	TC6-1	TC6-1
B	TC1-2	TC1-2	TC2-2	TC2-2	TC3-2	TC3-2	TC4-2	TC4-2	TC5-2	TC5-2	TC6-2	TC6-2
C	TC1-3	TC1-3	TC2-3	TC2-3	TC3-3	TC3-3	TC4-3	TC4-3	TC5-3	TC5-3	TC6-3	TC6-3
D	TC1-4	TC1-4	TC2-4	TC2-4	TC3-4	TC3-4	TC4-4	TC4-4	TC5-4	TC5-4	TC6-4	TC6-4
E	TC1-5	TC1-5	TC2-5	TC2-5	TC3-5	TC3-5	TC4-5	TC4-5	TC5-5	TC5-5	TC6-5	TC6-5
F	TC1-6	TC1-6	TC2-6	TC2-6	TC3-6	TC3-6	TC4-6	TC4-6	TC5-6	TC5-6	TC6-6	TC6-6
G	TC1-7	TC1-7	TC2-7	TC2-7	TC3-7	TC3-7	TC4-7	TC4-7	TC5-7	TC5-7	TC6-7	TC6-7
H	E2-1	E2-2	E2-3	E2-4	VC	VC	VC	VC	E2-1	E2-2	E2-3	E2-4

Zkratky: E2-1 až E2-4 = koncentrace referenčního standardu E2 (od vysoké po nízkou); TC1-1 až TC1-7 = koncentrace (od vysoké po nízkou) zkoušené chemické látky 1 (TC1); TC2-1 až TC2-7 = koncentrace (od vysoké po nízkou) zkoušené chemické látky 2 (TC2); TC3-1 až TC3-7 = koncentrace (od vysoké po nízkou) zkoušené chemické látky 3 (TC3); TC4-1 až TC4-7 = koncentrace (od vysoké po nízkou) zkoušené chemické látky 4 (TC4); TC5-1 až TC5-7 = koncentrace (od vysoké po nízkou) zkoušené chemické látky 5 (TC5); TC6-1 až TC6-7 = koncentrace (od vysoké po nízkou) zkoušené chemické látky 6 (TC6); VC = kontrola vehikula (DMSO [1 % obj. EFM.]).

▼M8

Obrázek 2

Uspořádání 96jamkové mikrotitrační destičky při zkoušce ke stanovení rozsahu antagonistů

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TC1-1	TC1-1	TC2-1	TC2-1	TC3-1	TC3-1	TC4-1	TC4-1	TC5-1	TC5-1	TC6-1	TC6-1
B	TC1-2	TC1-2	TC2-2	TC2-2	TC3-2	TC3-2	TC4-2	TC4-2	TC5-2	TC5-2	TC6-2	TC6-2
C	TC1-3	TC1-3	TC2-3	TC2-3	TC3-3	TC3-3	TC4-3	TC4-3	TC5-3	TC5-3	TC6-3	TC6-3
D	TC1-4	TC1-4	TC2-4	TC2-4	TC3-4	TC3-4	TC4-4	TC4-4	TC5-4	TC5-4	TC6-4	TC6-4
E	TC1-5	TC1-5	TC2-5	TC2-5	TC3-5	TC3-5	TC4-5	TC4-5	TC5-5	TC5-5	TC6-5	TC6-5
F	TC1-6	TC1-6	TC2-6	TC2-6	TC3-6	TC3-6	TC4-6	TC4-6	TC5-6	TC5-6	TC6-6	TC6-6
G	TC1-7	TC1-7	TC2-7	TC2-7	TC3-7	TC3-7	TC4-7	TC4-7	TC5-7	TC5-7	TC6-7	TC6-7
H	Ral-1	Ral-2	Ral-3	VC	VC	VC	E2	E2	E2	Ral-1	Ral-2	Ral-3

Zkratky: E2 = E2 kontrola; Ral-1 až Ral-3 = koncentrace raloxifenu/referenčního standardu E2 (od vysoké po nízkou); TC1-1 až TC1-7 = koncentrace (od vysoké po nízkou) zkoušené chemické látky 1 (TC1); TC2-1 až TC2-7 = koncentrace (od vysoké po nízkou) zkoušené chemické látky 2 (TC2); TC3-1 až TC3-7 = koncentrace (od vysoké po nízkou) zkoušené chemické látky 3 (TC3); TC4-1 až TC4-7 = koncentrace (od vysoké po nízkou) zkoušené chemické látky 4 (TC4); TC5-1 až TC5-7 = koncentrace (od vysoké po nízkou) zkoušené chemické látky 5 (TC5); TC6-1 až TC6-7 = koncentrace (od vysoké po nízkou) zkoušené chemické látky 6 (TC6); VC = kontrola vehikula (DMSO [1 % obj. EFM.]).

Poznámka: Všechny zkoušené chemické látky jsou testovány v přítomnosti 9,18 × 10-11 M E2.

28. Doporučený konečný objem média potřebného pro každou jamku je 200 µl. Používejte pouze testovací destičky, v nichž buňky ve všech jamkách vykazují životaschopnost 80 % a více.

29. Stanovení počátečních koncentrací pro souhrnné testování ***agonistů*** je podrobně popsáno v protokolu pro agonisty (7). Stručně řečeno, použijí se tato kritéria:

— Jestliže na křivce koncentrace zkoušené chemické látky nejsou žádné body, které by byly větší než střední hodnota plus trojnásobek směrodatné odchylky kontroly DMSO, provede se souhrnné testování s použitím 11bodového postupného ředění 1: 2, počínaje maximální rozpustnou koncentrací.

— Jestliže na křivce koncentrace zkoušené chemické látky jsou body větší než střední hodnota plus trojnásobek směrodatné odchylky kontroly DMSO, měla by být počáteční koncentrace, která se použije pro 11bodové postupné ředění při souhrnném testování o jeden logaritmus vyšší než koncentrace vykazující nejvyšší upravenou hodnotu RLU ve zkoušce ke zjištění rozsahu. 11bodové ředění vychází z ředění 1: 2 nebo 1: 5 podle těchto kritérií:

Postupné 11bodové ředění 1: 2 by se mělo používat, pokud bude výsledné rozmezí koncentrace zahrnovat celý rozsah odpovědí vycházejících z křivky závislosti odpovědi na koncentraci vytvořené při zkoušce ke zjištění rozsahu. Jinak používejte ředění 1: 5.

▼**M8**

— Jestliže zkoušená chemická látka vykazuje při zkoušce ke zjištění rozsahu dvoufázovou křivku závislosti odpovědi na koncentraci, měly by být při souhrnném testování vyřešeny také obě fáze.

30. Stanovení počátečních koncentrací pro souhrnné testování ***antagonistů*** je podrobně popsáno v protokolu pro antagonisty (7). Stručně, použijí se tato kritéria:

— Jestliže na křivce koncentrace zkoušené chemické látky nejsou žádné body, které by byly menší než střední hodnota minus trojnásobek směrodatné odchylky kontroly E2, provede se souhrnné testování s použitím 11bodového postupného ředění 1: 2, počínaje maximální rozpustnou koncentrací.

— Jestliže na křivce koncentrace zkoušené chemické látky jsou body menší než střední hodnota minus trojnásobek směrodatné odchylky kontroly E2, měla by počáteční koncentrace, která se použije pro 11bodové postupné ředění při souhrnném testování, odpovídat jedné z těchto možností:

• Koncentrace vykazující při zkoušce ke zjištění rozsahu nejnižší upravenou hodnotou RLU

• Maximální rozpustná koncentrace (viz protokol pro antagonisty (7), obrázek 14-2)

• Nejnižší cytotoxická koncentrace (viz protokol pro antagonisty (7), obrázek 14-3, kde je uveden podobný příklad).

— 11bodové ředění vychází z postupného ředění 1: 2 nebo 1: 5 podle těchto kritérií:

Postupné 11bodové ředění 1: 2 by se mělo používat, pokud bude výsledné rozmezí koncentrace zahrnovat celý rozsah odpovědí vycházejících z křivky závislosti odpovědi na koncentraci vytvořené při zkoušce ke zjištění rozsahu. Jinak se použije ředění 1: 5.

Souhrnné testování

31. Souhrnné testování sestává z jedenáctibodového postupného ředění (postupné ředění buď 1: 2, nebo 1: 5 na základě počáteční koncentrace pro kritéria souhrnného testování), přičemž každá koncentrace se testuje ve třech jamkách 96jamkové mikrotitrační destičky (viz obrázky 3 a 4).

— Při souhrnném testování *agonistů* se používá 11 koncentrací E2 duplicitně jako referenční standard. Na každé destičce jsou zahrnuty čtyři replikované jamky pro kontrolu s DMSO a čtyři replikované jamky pro kontrolu s methoxychlorem (9,06 x 10^{-6} M).

— Při zkouškách ke stanovení rozsahu *antagonistů* se používá devět koncentrací Ral/E2 s 9,18 × 10^{-11} M E2 duplicitně jako referenční standard a čtyři replikované jamky pro kontrolu E2 9,18 x 10^{-11} M, čtyři replikované jamky pro kontrolu DMSO a čtyři replikované jamky pro tamoxifen 3,36 x 10^{-6} M.

▼M8

Obrázek 3

Uspořádání 96jamkové mikrotitrační destičky při souhrnném testování agonistů

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	VC
B	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	VC
C	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	VC
D	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	VC
E	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	Meth
F	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	Meth
G	E2-1	E2-2	E2-3	E2-4	E2-5	E2-6	E2-7	E2-8	E2-9	E2-10	E2-11	Meth
H	E2-1	E2-2	E2-3	E2-4	E2-5	E2-6	E2-7	E2-8	E2-9	E2-10	E2-11	Meth

Zkratky: TC1-1 až TC1-11 = koncentrace (od vysoké po nízkou) zkoušené chemické látky 1; TC2-1 až TC2-11 = koncentrace (od vysoké po nízkou) zkoušené chemické látky 2; E2-1 až E2-11 = koncentrace referenčního standardu E2 (od vysoké po nízkou); Meth = p,p' methoxychlor slabá pozitivní kontrola; VC = DMSO (1 % obj.) EFM kontrola vehikula

Obrázek 4

Uspořádání 96jamkové mikrotitrační destičky při souhrnném testování antagonistů

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	VC
B	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	VC
C	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	VC
D	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	VC
E	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	Tam
F	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	Tam
G	Ral-1	Ral-2	Ral-3	Ral-4	Ral-5	Ral-6	Ral-7	Ral-8	Ral-9	E2	E2	Tam
H	Ral-1	Ral-2	Ral-3	Ral-4	Ral-5	Ral-6	Ral-7	Ral-8	Ral-9	E2	E2	Tam

Zkratky: E2 = E2 kontrola; Ral-1 až Ral-9 = koncentrace raloxifenu/referenčního standardu E2 (od vysoké po nízkou); Tam = tamoxifen/E2 slabá pozitivní kontrola; TC1-1 až TC1-11 = koncentrace (od vysoké po nízkou) zkoušené chemické látky 1 (TC1); TC2-1 až TC2-11 = koncentrace (od vysoké po nízkou) zkoušené chemické látky 2 (TC2); VC = kontrola vehikula (DMSO [1 % obj. EFM.]).

Poznámka: Jak bylo uvedeno, všechny referenční a testovací jamky obsahují pevně stanovenou koncentraci E2 (9,18 x 10^{-11} M).

32. Opakované souhrnné testy pro stejnou chemickou látku by měly být prováděny v různé dny, aby byla zajištěna nezávislost. Měly by být provedeny nejméně dva souhrnné testy. Jestliže jsou výsledky testů vzájemně rozporné (například jeden test je pozitivní, druhý negativní) nebo jestliže jeden z testů není adekvátní, měl by být proveden dodatečný třetí test.

Měření luminiscence

33. Luminiscence se měří v rozsahu 300 až 650 nm, a to pomocí injekčního luminometru a softwaru, který řídí objem vstřikování a interval měření (7). Světelné emise z každé jamky se vyjadřují jako RLU na jamku.

▼M8

ANALÝZA ÚDAJŮ

Stanovení EC_{50} /IC_{50}

34. Hodnota EC_{50} (poloviční maximální účinná koncentrace zkoušené chemické látky [agonisté]) a hodnota IC_{50} (poloviční maximální inhibiční koncentrace zkoušené chemické látky [antagonisté]) se stanoví z údajů o závislosti odpovědi na koncentraci. U zkoušených chemických látek, které jsou pozitivní při jedné nebo několika koncentracích, se koncentrace zkoušené chemické látky, která vyvolává poloviční maximální odpověď (IC_{50} nebo EC_{50}) vypočítá pomocí analýzy Hillovy funkce nebo vhodným alternativním způsobem. Hillova funkce je čtyřparametrový logistický matematický model týkající se závislosti odpovědi na koncentraci zkoušené chemické látky (obvykle podle sigmoidní křivky) s využitím níže uvedené rovnice:

$$Y = Bottom + \frac{(Top - Bottom)}{1 + 10(lgEC_{50} - X)HillSlope}$$

kde:

Y = odpověď (tj. RLU);

X = logaritmus koncentrace;

Bottom = minimální odpověď;

Top = maximální odpověď;

log EC_{50} (nebo log IC_{50}) = logaritmus X jako odpověď uprostřed mezi maximální a minimální;

Hillův koeficient = sklon křivky.

Model počítá nejlépe odpovídající hodnoty pro parametry maximální odpovědi, minimální odpovědi, sklon křivky a IC_{50} a EC_{50}. Pro výpočet hodnot EC_{50} a IC_{50} by měl být použit vhodný statistický software (např. statistický software Graphpad Prism®).

Stanovení odlehlých hodnot

35. Správné statistické posouzení by mohlo být usnadněno zařazením (například) Q-testu (viz protokoly pro agonisty a antagonisty (7) pro stanovení „nepoužitelných“ jamek, které budou vyřazeny z analýzy dat.

36. U referenčních standardních replikátů E2 (velikost vzorku dva) se každá upravená hodnota RLU pro replikáty při dané koncentraci E2 považuje za odlehlou hodnotu, jestliže je více než 20 % nad nebo pod upravenou hodnotou RLU pro tuto koncentraci v dosavadní databázi.

Sběr a korekce dat z luminometru pro testování ke stanovení rozsahu

37. Nezpracovaná data z luminometru je třeba převést do vzorového tabulkového editoru určeného pro analýzu. Mělo by být stanoveno, zda jsou zde odlehlé datové body, které je třeba odstranit. (Viz kritéria přijatelnosti zkoušky, kde jsou uvedeny parametry určované v analýzách.) Provádějí se tyto výpočty:

Agonista

Krok 1 Vypočítejte střední hodnotu pro kontrolu s vehikulem DMSO (VC).

Krok 2 Odečtěte střední hodnotu VC DMSO od hodnoty každé jamky, abyste normalizovali data.

▼**M8**

Krok 3 Vypočítejte střední hodnotu násobné indukce pro referenční standard (E2).

Krok 4 Vypočítejte střední hodnotu EC_{50} pro zkoušené chemické látky.

Antagonista

Krok 1 Vypočítejte střední hodnotu pro VC DMSO.

Krok 2 Odečtěte střední hodnotu VC DMSO od hodnoty každé jamky, abyste normalizovali data.

Krok 3 Vypočítejte střední násobnou redukci pro referenční standard (Ral/E2).

Krok 4 Vypočítejte střední hodnotu pro referenční standard E2.

Krok 5 Vypočítejte střední hodnotu IC_{50} pro zkoušené chemické látky.

Sběr a korekce dat z luminometru pro souhrnné testování

38. Nezpracovaná data z luminometru je třeba převést do vzorového tabulkového editoru určeného pro analýzu. Mělo by být stanoveno, zda jsou zde odlehlé datové body, které je třeba odstranit. (Viz kritéria přijatelnosti zkoušky, kde jsou uvedeny parametry určované v analýzách.) Provádějí se tyto výpočty:

Agonista

Krok 1 Vypočítejte střední hodnotu pro VC DMSO.

Krok 2 Odečtěte střední hodnotu VC DMSO od hodnoty každé jamky, abyste normalizovali data.

Krok 3 Vypočítejte střední hodnotu násobné indukce pro referenční standard (E2).

Krok 4 Vypočítejte střední hodnotu EC_{50} pro E2 a zkoušené chemické látky.

Krok 5 Vypočítejte střední upravenou hodnotu RLU pro methoxychlor.

Antagonista

Krok 1 Vypočítejte střední hodnotu pro VC DMSO.

Krok 2 Odečtěte střední hodnotu VC DMSO od hodnoty každé jamky, abyste normalizovali data.

Krok 3 Vypočítejte střední násobnou indukci pro referenční standard (Ral/E2).

Krok 4 Vypočítejte střední hodnotu IC_{50} pro Ral/E2 a zkoušené chemické látky.

Krok 5 Vypočítejte střední upravenou hodnotu RLU pro tamoxifen.

Krok 6 Vypočítejte střední hodnotu pro referenční standard E2.

▼M8

Kritéria interpretace údajů

39. Analýza VM7Luc ER TA je součástí přístupu založeného na průkazných důkazech a má pomoci stanovit priority u látek pro zkoušení ED *in vivo*. Součásti tohoto postupu stanovení priorit bude klasifikace zkoušené chemické látky jako pozitivní nebo negativní pro ER agonistickou nebo antagonistickou aktivitu. Pozitivní a negativní rozhodovací kritéria použitá ve validační studii analýzy VM7Luc ER TA jsou popsána v tabulce 1.

Tabulka 1

Pozitivní a negativní kritéria rozhodování

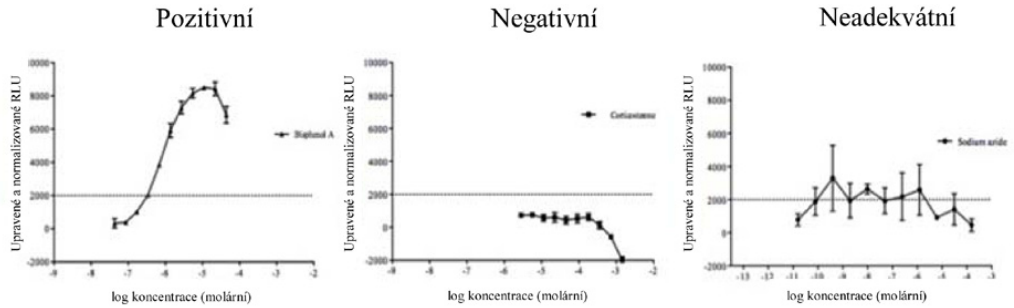
AGONISTICKÁ AKTIVITA	
Pozitivní	— Všechny zkoušené chemické látky klasifikované jako *pozitivní* u ER agonistické aktivity by měly mít křivku závislosti odpovědi na koncentraci sestávající z výchozí hodnoty, po níž následuje pozitivní sklon a křivku ukončuje plató nebo vrchol. V některých případech mohou být definovány pouze dvě z těchto charakteristik (výchozí hodnota – sklon nebo sklon – vrchol). — Přímka definující pozitivní sklon by měla obsahovat alespoň tři body s nepřekrývajícími se chybovými úsečkami (střední hodnota ± SD). Body vytvářející výchozí hodnotu se vyloučí, ale lineární část křivky může zahrnovat vrchol prvního bodu plató. — Pozitivní klasifikace vyžaduje amplitudu odpovědi, rozdíl mezi výchozí hodnotou a vrcholem, alespoň 20 % maximální hodnoty pro referenční standard, E2 (tj. 2 000 RLU nebo více, když je hodnota maximální odpovědi referenčních standardů [E2] upravena na 10 000 RLU). — Pro každou pozitivní zkoušenou chemickou látku by měla být vypočítána pokud možno hodnota EC_{50}.
Negativní	Průměrná upravená hodnota RLU pro danou koncentraci je na nebo pod střední hodnotou RLU kontroly DMSO plus trojnásobek směrodatné odchylky hodnoty RLU DMSO.
Neadekvátní	Data, která nelze interpretovat jako platná podle vykazované přítomnosti nebo nepřítomnosti aktivity vzhledem k velkým kvalitativním nebo kvantitativním omezením, se považují za neadekvátní a nelze je použít na stanovení, zda je zkoušená chemická látka pozitivní nebo negativní. Chemické látky je třeba otestovat znovu.
ANTAGONISTICKÁ AKTIVITA	
Pozitivní	— Data zkoušené chemické látky vytvářejí křivku závislosti odpovědi na koncentraci sestávající z výchozí hodnoty, po níž následuje negativní sklon. — Přímka definující negativní sklon by měla obsahovat alespoň tři body s nepřekrývajícími se chybovými úsečkami; body vytvářející výchozí hodnotu se vyloučí, ale lineární část křivky může zahrnovat první bod plató. — Mělo by zde být alespoň 20 % snížení aktivity oproti maximální hodnotě pro referenční standard, Ral/E2 (tj. 8 000 RLU nebo méně, když je hodnota maximální odpovědi referenčních standardů [Ral/E2] upravena na 10 000 RLU). — Nejvyšší necytotoxické koncentrace zkoušené chemické látky by měly být menší než nebo rovny 1×10^{-5} M. — Pro každou pozitivní zkoušenou chemickou látku by měla být vypočítána pokud možno hodnota IC_{50}.
Negativní	Všechny datové body nad hodnotou EC_{80} (80 % odpovědi E2, nebo 8 000 RLU) při koncentracích menších než $1{,}0 \times 10^{-5}$ M.
Neadekvátní	Data, která nelze interpretovat jako platná podle vykazované přítomnosti nebo nepřítomnosti aktivity vzhledem k velkým kvalitativním nebo kvantitativním omezením, se považují za neadekvátní a nelze je použít na stanovení, zda je zkoušená chemická látka pozitivní nebo negativní. Chemickou látku je třeba otestovat znovu.

▼M8

40. Pozitivní výsledky budou pokud možno charakterizovány jak intenzitou účinku, tak i koncentrací, při níž k účinku dochází. Příklady pozitivních, negativních a neadekvátních dat jsou uvedeny na obrázcích 5 a 6.

Obrázek 5

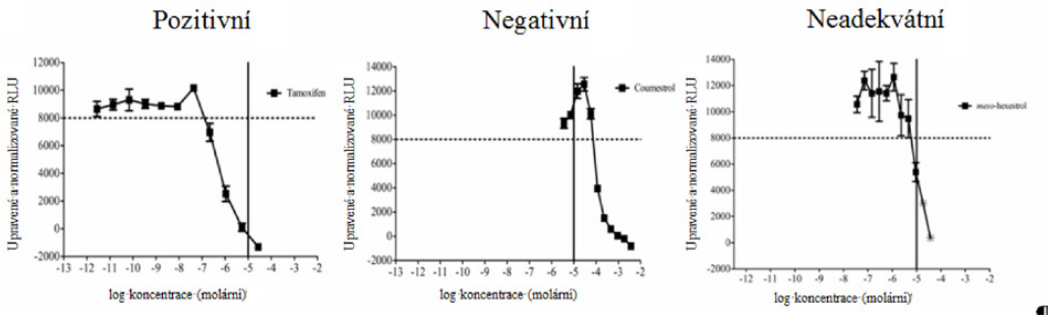
Příklady agonistů: Pozitivní, negativní a neadekvátní data



Tečkovaná čára označuje 20 % odpovědi E2, 2 000 upravených a normalizovaných RLU.

Obrázek 6

Příklady antagonistů: Pozitivní, negativní a neadekvátní data



Tečkovaná čára označuje 80 % odpovědi Ral/E2, 8 000 upravených a normalizovaných RLU.

Plná čára označuje 1,00 10-5 M. Aby byla odpověď považována za pozitivní, měla by být pod čarou 8 000 RLU, a to při koncentracích menších než 1,00 10-5M.

Koncentrace označené hvězdičkou na grafu meso-hexestrolu označují skóre životaschopnosti „2“ nebo větší.

Výsledky zkoušek u meso-hexestrolu se považuji za neadekvátní data, protože jediná odpověď, která je pod 8 000 RLU, se vyskytuje při 1,00 10-5M.

41. Výpočty EC50 a IC50 lze provést pomocí čtyřparametrové Hillovy funkce (viz protokol pro agonisty a protokol pro antagonisty, kde jsou uvedeny podrobnější informace (7)). Splnění kritérií přijatelnosti ukazuje, že systém funguje správně, ale nezaručuje to, že konkrétní provedení zkoušky podá přesné údaje. Opakování výsledků první zkoušky je nejlepším důkazem, že byly získány přesné údaje (viz odstavec 19„SLOŽKY ANALÝZY ER TA“.

▼**M8**

ZÁVĚREČNÁ ZPRÁVA

42. Viz odstavec 20 „SLOŽKY ANALÝZY ER TA“.

LITERATURA

(1) ICCVAM. (2011). ICCVAM Test Method Evaluation Report on the LUMI-CELL® ER (BG1Luc ER TA) Test Method: An *In Vitro* Method for Identifying ER Agonists and Antagonists, National Institute of Environmental Health Sciences: Research Triangle Park, NC.(1)

(2) Monje P., Boland R. (2001). Subcellular Distribution of Native Estrogen Receptor α and β Isoforms in Rabbit Uterus and Ovary, J. Cell Biochem., 82(3): 467-479.

(3) Pujol P., *et al.* (1998). Differential Expression of Estrogen Receptor-Alpha and -Beta Messenger RNAs as a Potential Marker of Ovarian Carcinogenesis, Cancer Res., 58(23): 5 367-5 373.

(4) Weihua Z., *et al.* (2000). Estrogen Receptor (ER) β, a Modulator of ERα in the Uterus, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 97(11): 936-5 941.

(5) Balls M., *et al.* (2006). The Importance of Good Cell Culture Practice (GCCP), ALTEX, 23(Suppl): 270-273.

(6) Coecke S., *et al.* (2005). Guidance on Good Cell Culture Practice: a Report of the Second ECVAM Task Force on Good Cell Culture Practice, Alternatives to Laboratory Animals, 33: 261-287.

(7) ICCVAM (2011). ICCVAM Test Method Evaluation Report, The LUMI-CELL® ER (BG1Luc ER TA) Test Method: An *In Vitro* Assay for Identifying Human Estrogen Receptor Agonist and Antagonist Activity of Chemicals, NIH Publication No 11-7 850.

(8) Rogers J.M., Denison M.S. (2000). Recombinant Cell Bioassays for Endocrine Disruptors: Development of a Stably Transfected Human Ovarian Cell Line for the Detection of Estrogenic and Anti-Estrogenic Chemicals*, In Vitro* Mol. *Toxicol*.,13(1):67-82.

(9) Escande A., *et al.* (2006). Evaluation of Ligand Selectivity Using Reporter Cell Lines Stably Expressing Estrogen Receptor Alpha or Beta, Biochem. *Pharmacol*., 71(10):1 459-69.

(10) Thorne N., Inglese J., Auld D.S. (2010). Illuminating Insights into Firefly Luciferase and Other Bioluminescent Reporters Used in Chemical Biology, Chemistry and Biology,17(6):646-57.

(11) Kuiper G.G, *et al.* (1998). Interaction of Estrogenic Chemicals and Phytoestrogens with Estrogen Receptor Beta, Endocrinology,139(10):4 252-63.

(12) Geisinger, *et al.* (1989). Characterization of a human ovarian carcinoma cell line with estrogen and progesterone receptors, Cancer 63, 280-288.

(13) Baldwin, *et al.* (1998). BG-1 ovarian cell line: an alternative model for examining estrogen-dependent growth *in vitro*, *In Vitro* Cell. Dev. Biol. – Animal, 34, 649-654.

(14) Li, Y., *et al.* (2014). Research resource: STR DNA profile and gene expression comparisons of human BG-1 cells and a BG-1/MCF-7 clonal variant, Mol. Endo. 28, 2072-2081.

(15) Rogers, J.M. and Denison, M.S. (2000). Recombinant cell bioassays for endocrine disruptors:development of a stably transfected human ovarian cell line for the detection of estrogenicand anti-estrogenic chemicals, *In Vitro* & Molec. Toxicol. Chem. 13, 67-82.

▼**M8**

Dodatek 4

ANALÝZA STABILNĚ TRANSFEKOVANÉ TRANSAKTIVACE ESTROGENOVÉHO RECEPTORU A PRO DETEKCI ESTROGENOV'YCH AGONISTICK'YCH A ANTAGONISTICK'YCH ÏΘINKΩ CHEMICK'YCH LATEK S POUITNM BUNMΘNI LINIE ERA CALUX

VÝCHOZÍ ÚVAHY A OMEZENÍ (VIZ TAKÉ VŠEOBECNÝ ÚVOD)

1. Při transaktivační analýze ERα CALUX se používá buněčná linie U2OS na detekci estrogenní agonistické a antagonistické aktivity zprostředkované lidským estrogenovým receptorem alfa (hERα). Relevanci a spolehlivost analýzy pro zamýšlený účel prokázala validační studie biotestu stabilně transfekovaného ERα CALUX od společnosti BioDetection Systems BV (Amsterdam, Nizozemsko) (1). Buněčná linie ERα CALUX exprimuje pouze stabilně transfekovaný lidský ERα (2)(3).

2. Tato analýza je specificky určena k detekci transaktivace zprostředkované hERα měřením bioluminiscence jako sledované vlastnosti. Použití bioluminiscence je v biotestech běžné vzhledem k vysokému poměru signálu k šumu (4).

3. Bylo hlášeno, že koncentrace fytoestrogenů vyšší než 1 μM nadměrně aktivují reportérový gen luciferázy, přičemž výsledkem je luminiscence nezprostředkovaná receptorem (5)(6)(7). Proto je třeba vyšší koncentrace fytoestrogenů nebo podobných sloučenin, které mohou nadměrně aktivovat expresi luciferázy, pečlivě prozkoumat v analýzách stabilně transfekované transaktivace ER (viz dodatek 2).

4. Před použitím této analýzy pro regulační účely je třeba přečíst si „VŠEOBECNÝ ÚVOD“ a „SLOŽKY ANALÝZY ER TA“. Definice a zkratky používané v této zkušební metodě jsou popsány v dodatku 1.

PRINCIP ANALÝZY (VIZ TAKÉ VŠEOBECNÝ ÚVOD)

5. Biotest se používá k posouzení vazby ligandu na estrogenový receptor a následného přesunu komplexu receptor-ligand do jádra. V jádru se komplex receptor-ligand naváže na specifické responzivní elementy DNA a transaktivuje reportérový gen luciferázy světlušek, přičemž výsledkem je zvýšená buněčná exprese enzymu luciferáza. Po přidání substrátu luciferázy luciferinu se luciferin transformuje na bioluminiscenční produkt. Vzniklé světlo lze snadno detekovat a kvantifikovat pomocí luminometru.

6. Zkušební systém využívá stabilně transfekované buňky ERα CALUX. Buňky ERα CALUX pocházejí z buněčné linie lidského osteoblastického osteosarkomu U2OS. Lidské buňky U2OS byly stabilně transfekovány 3xHRE-TATA-Luc a pSG5-neo-hERα pomocí koprecipitace s využitím fosforečnanu vápenatého. Buněčná linie U2OS byla vybrána jako nejlepší kandidát na estrogen- (a jiný steroidní hormon) responzivní reportérovou buněčnou linii na základě pozorování, že buněčná linie U2OS vykazovala jen malou nebo žádnou endogenní receptorovou aktivitu. Absence endogenních receptorů byla hodnocena pouze pomocí luciferázových reportérových plazmidů, kdy po přidání ligandů pro receptory nebyla vykázána žádná aktivita. Navíc tato buněčná linie podporovala silné, hormonem zprostředkované odpovědi, když byly přechodně vneseny příbuzné receptory (2)(3)(8).

7. Testování chemických látek na estrogenní nebo antiestrogenní aktivitu pomocí buněčné linie ERα CALUX zahrnuje předběžnou screeningovou zkoušku a souhrnné zkoušky. Při předběžné screeningové zkoušce se stanoví rozpustnost a cytotoxicita a přesně se určí rozmezí koncentrace zkoušených

▼M8

chemických látek pro souhrnné testování. V průběhu souhrnného testování se zkouší přesně určené rozmezí koncentrace zkoušených chemických látek v biotestech ERα CALUX, po nichž následuje klasifikace zkoušených chemických látek na agonistickou nebo antagonistickou aktivitu.

8. Kritéria pro interpretaci údajů jsou podrobně popsána v odstavci 59. Stručně řečeno, zkoušená chemická látka se považuje za pozitivní na agonistickou aktivitu v případě, že alespoň dvě po sobě jdoucí koncentrace zkoušené chemické látky vykazují odpověď, která se rovná nebo je vyšší než 10 % maximální odpovědi referenčního standardu 17β-estradiolu (PC_{10}). Zkoušená chemická látka se považuje za pozitivní na antagonistickou aktivitu v případě, že alespoň dvě po sobě jdoucí koncentrace zkoušené chemické látky vykazují odpověď, která se rovná nebo je menší než 80 % maximální odpovědi referenčního standardu tamoxifenu (PC_{80}).

POSTUP

Buněčné linie

9. Pro analýzu by se měla používat stabilně transfekovaná buněčná linie U2OS ERα CALUX. Buněčnou linii lze získat od společnosti BioDetection Systems BV, Amsterdam, Nizozemsko na základě technické licenční smlouvy.

10. Používat by se měly pouze buněčné kultury bez mykoplazmat. Použité šarže buněk by měly být certifikovány jako negativní na kontaminaci mykoplazmatem, nebo by měl být před použitím proveden test na mykoplazma. Pro citlivou detekci mykoplazmové infekce se používá RT-PCR (polymerázová řetězová reakce v reálném čase) (9).

Stabilita buněčné linie

11. Aby se udržela stabilita a integrita buněk CALUX, měly by být buňky uchovávány v tekutém dusíku (–80 °C). Po rozmrazení je třeba buňky pro přípravu nové kultury subkultivovat alespoň dvakrát, než se použijí pro hodnocení estrogenní agonistické a antagonistické aktivity chemických látek. Buňky by neměly být subkultivovány déle než 30 pasáží.

12. Pro monitorování stability buněčné linie v čase by měla být reaktivita zkušebního systému agonistické a antagonistické aktivity ověřena hodnocením EC_{50} nebo IC_{50} referenčního standardu. Dále by měla být monitorována relativní indukce pozitivního kontrolního vzorku (PC) a negativního kontrolního vzorku (NC). Výsledky by měly odpovídat kritériím přijatelnosti pro biotest ERα CALUX agonistické (tabulka 3C) nebo antagonistické (tabulka 4C) aktivity. Referenční standardy, pozitivní a negativní kontroly jsou uvedeny v tabulce 1 a v tabulce 2 pro agonistický, respektive antagonistický režim.

Buněčná kultura a podmínky na destičce

13. Buňky U2OS se kultivují v růstovém médiu (médium DMEM/F12 (1:1) s fenolovou červení jako indikátorem pH, doplněném fetálním bovinním sérem (7,5 %), neesenciálními aminokyselinami (1 %), 10 jednotkami/ml penicilinu, streptomycinu a geneticinu (G-418) jako selekčním markerem). Buňky se umístí do inkubátoru CO_2 (5 % CO_2) při teplotě 37 °C a 100 % vlhkosti vzduchu. Když buňky dosáhnou konfluence 85–95 %, buď se subkultivují, nebo připraví pro nasazení do 96jamkových mikrotitračních destiček. Ve druhém případě je třeba buňky resuspendovat ve zkušebním médiu 1 x 10^5 buněk/ml (DMEM/F12 (1:1) neobsahujícím estrogeny bez fenolové červeně, doplněném fetálním bovinním sérem ošetřeným aktivním uhlím, které je potaženo dextranem (5 % obj.), neesenciálními aminokyselinami (1 % obj.), 10 jednotkami/ml penicilinu a streptomycinu) a umístit do jamek 96jamkových mikrotitračních destiček (100 µl homogenizované buněčné suspenze). 24 hodin před expozicí by buňky měly být předběžně inkubovány v inkubátoru (5 % CO_2, 37 °C, 100 % vlhkost vzduchu). Plastové pomůcky by neměly obsahovat estrogen.

▼M8

Kritéria přijatelnosti

14. Agonistická a antagonistická aktivita zkoušených chemických látek se testuje ve zkušební sérii. Zkušební série sestává maximálně z 6 mikrotitračních destiček. Každá zkušební série obsahuje alespoň 1 celou sérii ředění referenčního standardu, pozitivní kontrolní vzorek, negativní kontrolní vzorek a kontroly s rozpouštědlem. Na obrázku 1 a 2 je znázorněno uspořádání destiček pro agonistickou a antagonistickou zkušební sérii.

15. Každé ředění referenčních standardů, zkoušených chemických látek, všechny kontroly s rozpouštědlem a pozitivní a negativní kontroly by měly být analyzovány třikrát. Každá ze tří analýz by měla splňovat požadavky uvedené v tabulce 3A v tabulce 4A.

16. Na první destičce v každé zkušební sérii se měří celá série ředění referenčního standardu (17β-estradiol na agonistickou aktivitu; tamoxifen na antagonistickou aktivitu). Aby bylo možné porovnat výsledky analýzy zbývajících 5 mikrotitračních destiček s první mikrotitrační destičkou obsahující celou křivku závislosti odpovědi referenčního standardu na koncentraci, měly by všechny destičky obsahovat 3 kontrolní vzorky: kontrolu s rozpouštědlem, nejvyšší koncentraci zkoušeného referenčního standardu a přibližnou koncentraci referenčního standardu EC_{50} (agonistická aktivita) nebo IC_{50} (antagonistická aktivita). Poměr průměrných kontrolních vzorků na první destičce a na zbývajících 5 destičkách by měl splňovat požadavky uvedené v tabulce 3C (agonistická aktivita) nebo v tabulce 4C (antagonistická aktivita).

17. Pro každou mikrotitrační destičku ve zkušební sérii se vypočítá faktor z (10). Faktor z se počítá s použitím odpovědí při nejvyšší a nejnižší koncentraci referenčního standardu. Mikrotitrační destička se považuje za platnou v případě, že splňuje požadavky uvedené v tabulce 3C (agonistická aktivita) nebo v tabulce 4C (antagonistická aktivita).

18. Referenční standard by měl vykazovat sigmoidní křivku závislosti odpovědi na dávce. Hodnoty EC_{50} nebo IC_{50} odvozené od odpovědi při sérii ředění referenčního standardu by měly splňovat požadavky uvedené v tabulce 3C (agonistická aktivita) nebo v tabulce 4C (antagonistická aktivita).

19. Každá zkušební série by měla obsahovat pozitivní kontrolní a negativní kontrolní vzorek. Vypočtená relativní indukce pozitivního i negativního kontrolního vzorku by měla splňovat požadavky uvedené v tabulce 3C (agonistická aktivita) nebo v tabulce 4C (antagonistická aktivita).

20. V průběhu všech měření se indukční faktor nejvyšší koncentrace referenčního standardu měří vydělením průměrné nejvyšší referenční standardní hodnoty relativní luminiscenční jednotky (RLU) 17β-estradiolu průměrnou odpovědí RLU referenční kontroly s rozpouštědlem. Tento indukční faktor by měl splňovat formální požadavky na násobnou indukci uvedené v tabulce 3C (agonistická aktivita) nebo v tabulce 4C (antagonistická aktivita).

21. Za platné se považují pouze mikrotitrační destičky, které splňují všechna výše uvedená kritéria přijatelnosti, a tyto mikrotitrační destičky mohou být použity pro hodnocení odpovědi zkoušených chemických látek.

22. Kritéria přijatelnosti jsou použitelná pro předběžné screeningové zkoušky i pro souhrnné zkoušky.

▼M8

Tabulka 1

Koncentrace referenčního standardu, pozitivní kontroly (PC) a negativní kontroly (NC) pro biotest agonistické aktivity CALUX

	Látka	Číslo CAS	Zkušební rozsah (M)
Referenční standard	17β-estradiol	50-28-2	$1*10^{-13}$–$1*10^{-10}$
Pozitivní kontrola (PC)	17α-methyltestosteron	58-18-4	$3*10^{-6}$
Negativní kontrola (NC)	kortikosteron	50-22-6	$1*10^{-8}$

Tabulka 2

Koncentrace referenčního standardu, pozitivní kontroly (PC) a negativní kontroly (NC) pro biotest antagonistické aktivity CALUX

	Látka	Číslo CAS	Zkušební rozsah (M)
Referenční standard	tamoxifen	10540-29-1	$3*10^{-9}$–$1*10^{-5}$
Pozitivní kontrola (PC)	4-hydroxytamoxifen	68047-06-3	$1*10^{-9}$
Negativní kontrola (NC)	resveratrol	501-36-0	$1*10^{-5}$

Tabulka 3

Kritéria přijatelnosti pro biotest agonistické aktivity ERα CALUX

A - individuální vzorky na destičce		**Kritérium**
1	Maximální % SD trojích jamek (pro NC, PC, každé ředění zkoušené chemické látky a referenčního standardu s výjimkou C0)	< 15 %
2	Maximální % SD trojích jamek (pro referenční standard a kontroly zkoušené chemické látky s rozpouštědlem (C0, SC))	< 30 %
3	Maximální průnik LDH jako míra cytoxicity.	< 120 %
B - v rámci jedné mikrotitrační destičky		
4	Poměr kontroly referenčního standardu s rozpouštědlem (C0; destička 1) a kontroly zkoušené chemické látky s rozpouštědlem; destičky 2 až x)	0,5 až 2,0
5	Poměr přibl. hodnoty EC_{50} a nejvyšších koncentrací referenčního standardu na destičce 1 a přibl. hodnoty EC_{50} a nejvyšších koncentrací referenčního standardu na destičkách 2 až x (C4, C8)	0,70 až 1,30
6	Faktor Z pro každou destičku	> 0,6
C - v rámci jedné série analýz (všechny destičky v rámci jedné série)		
7	Sigmoidní křivka referenčního standardu	ano (17ß-estradiol)
8	Rozsah EC50 referenčního standardu 17ß-estradiol	$4*10^{-12}$–$4*10^{-11}$ M
9	Minimální násobná indukce nejvyšší koncentrace 17ß-estradiolu vzhledem ke kontrole referenčního standardu s rozpouštědlem.	5
10	Relativní indukce (%) PC.	> 30 %
11	Relativní indukce (%) NC	< 10 %

▼M8

PC: pozitivní kontrola; NC: negativní kontrola; SC: kontrola s rozpouštědlem chemické látky; C0: kontrola referenčního standardu s rozpouštědlem; SD: směrodatná odchylka; LDH: laktát dehydrogenáza

Tabulka 4

Kritéria přijatelnosti pro biotest antagonistické aktivity ERα CALUX

A – individuální vzorky na destičce		**Kritérium**
1	Maximální % SD trojích jamek (pro NC, PC, každé ředění zkoušené chemické látky a referenčního standardu, kontrola s rozpouštědlem (C0))	< 15 %
2	Maximální % SD trojích jamek (pro kontrolu s vehikulem (VC) a nejvyšší koncentrace referenčního standardu (C8))	< 30 %
3	Maximální průnik LDH jako míra cytoxicity.	≥ 120%
B – v rámci jedné mikrotitrační destičky		
4	Poměr kontroly referenčního standardu s rozpouštědlem (C0; destička 1) a kontroly zkoušené chemické látky s rozpouštědlem; destičky 2 až x)	0,70 až 1,30
5	Poměr přibl. hodnoty IC_{50} koncentrací referenčního standardu na destičce 1 a přibl. hodnoty IC_{50} koncentrací referenčního standardu na destičkách 2 až x (C4)	0,70 až 1,30
6	Poměr nejvyšších koncentrací referenčního standardu na destičce 1 a nejvyšších koncentrací referenčního standardu na destičkách 2 až x (C8)	0,50 až 2,0
7	Faktor z pro každou destičku	> 0,6
C – v rámci jedné série analýz (všechny destičky v rámci jedné série)		
8	Sigmoidní křivka referenčního standardu	ano (tamoxifen)
9	Rozsah IC50 referenčního standardu (tamoxifen)	$1*10^{-8}$–$1*10^{-7}$ M
10	Minimální násobná indukce kontroly referenčního standardu s rozpouštědlem vzhledem k nejvyšší koncentraci tamoxifenu.	2,5
11	Relativní indukce (%) PC.	< 70 %
12	Relativní indukce (%) NC	> 85 %

PC: pozitivní kontrola; NC: negativní kontrola; VC: kontrola s vehikulem (kontrola s rozpouštědlem bez pevné koncentrace agonistického referenčního standardu); SC: kontrola s rozpouštědlem chemické látky; C0: kontrola referenčního standardu s rozpouštědlem; SD: směrodatná odchylka; LDH: laktát dehydrogenáza

Kontrola s rozpouštědlem/vehikulem, referenční standardy, pozitivní kontroly, negativní kontroly

23. Při předběžných screeningových zkouškách i souhrnných zkouškách by se měla používat stejná kontrola s rozpouštědlem/vehikulem, referenční standardy, pozitivní kontroly a negativní kontroly. Dále by měla být stejná koncentrace referenčních standardů, pozitivních kontrol a negativních kontrol.

▼M8

Kontrola s rozpouštědlem

24. Rozpouštědlo, které se používá na rozpuštění zkoušených chemických látek, by mělo být testováno jako kontrola s rozpouštědlem. Při validaci biotestu ERα CALUX byl jako vehikulum použit dimethylsulfoxid (DMSO, 1 % (obj.); CASRN 67-68-5). Jestliže je použito jiné rozpouštědlo než DMSO, měly by být všechny referenční standardy, kontroly a zkoušené chemické látky testovány ve stejném vehikulu. Nezapomeňte, že kontrola s rozpouštědlem u antagonistických studií obsahuje pevnou koncentraci agonistického referenčního standardu 17β-estradiol (přibližně koncentrace EC_{50}). Pro testování rozpouštědla použitého pro antagonistické studie je třeba připravit a otestovat kontrolu s vehikulem.

Kontrola s vehikulem (antagonistická aktivita)

25. Při testování antagonistické aktivity se zkušební médium doplňuje pevnou koncentrací agonistického referenčního standardu 17β-estradiol (přibližně koncentrace EC_{50}). Pro testování rozpouštědla použitého k rozpuštění zkoušených chemických látek při zkoušce na antagonistickou aktivitu je třeba připravit zkušební médium bez pevné koncentrace agonistického referenčního standardu 17β-estradiol. Tento kontrolní vzorek se označuje jako kontrola s vehikulem. Při validaci biotestu ERα CALUX byl jako vehikulum použit dimethylsulfoxid (DMSO, 1 % (obj.); CASRN 67-68-5). Jestliže je použito jiné rozpouštědlo než DMSO, měly by být všechny referenční standardy, kontroly a zkoušené chemické látky testovány ve stejném vehikulu.

Referenční standardy

26. Agonistickým referenčním standardem je 17β-estradiol (tabulka 1). Referenční standardy sestávají ze série ředění osmi koncentrací 17β-estradiolu ($1*10^{-13}$, $3*10^{-13}$, $1*10^{-12}$, $3*10^{-12}$, $6*10^{-12}$, $1*10^{-11}$, $3*10^{-11}$, $1*10^{-10}$ M).

27. Antagonistickým referenčním standardem je tamoxifen (tabulka 2). Referenční standardy sestávají ze série ředění osmi koncentrací tamoxifenu ($3*10^{-9}$, $1*10^{-8}$, $3*10^{-8}$, $1*10^{-7}$, $3*10^{-7}$, $1*10^{-6}$, $3*10^{-6}$, $1*10^{-5}$ M). Každá koncentrace antagonistického referenčního standardu se inkubuje společně s pevnou koncentrací agonistického referenčního standardu 17β-estradiol ($3*10^{-12}$ M).

Pozitivní kontrola

28. Pozitivní kontrolou pro agonistické studie je 17α-methyltestosteron (tabulka 1).

29. Pozitivní kontrolou pro antagonistické studie je 4-hydroxytamoxifen (tabulka 2). Antagonistická pozitivní kontrola se inkubuje společně s pevnou koncentrací agonistického referenčního standardu 17β-estradiol ($3*10^{-12}$ M).

Negativní kontrola

30. Negativní kontrolou pro agonistické studie je kortikosteron (tabulka 1).

31. Negativní kontrolou pro antagonistické studie je resveratrol (tabulka 2). Antagonistická negativní kontrola se inkubuje společně s pevnou koncentrací agonistického referenčního standardu 17β-estradiol ($3,0*10^{-12}$ M).

▼M8

Prokázání odborné způsobilosti laboratoře (viz odstavec 14 a tabulky 3 a 4 v části «SLOŽKY ANALÝZY ER TA» této zkušební metody)

Vehikulum

32. Rozpouštědlo použité na rozpuštění zkoušených chemických látek by mělo zkoušenou chemickou látku zcela rozpustit a mělo by být mísitelné s kultivačním médiem. Vhodnými rozpouštědly jsou DMSO, voda a etanol (čistota 95 % až 100 %). Jestliže se jako rozpouštědlo používá DMSO, neměla by maximální koncentrace DMSO při inkubaci překročit 1 % (obj.). Před použitím by rozpouštědlo mělo být otestováno, zda není cytotoxické a zda neinterferuje s provedením analýz.

Příprava referenčních standardů, pozitivních kontrol, negativních kontrol a zkoušených chemických látek

33. Referenční standardy, pozitivní kontroly, negativní kontroly a zkoušené chemické látky se rozpustí ve 100 % DMSO (nebo ve vhodném rozpouštědle). Poté se ve stejném rozpouštědle připraví příslušná (postupná) ředění. Před rozpuštěním by se měly všechny látky nechat ustálit na pokojovou teplotu. V čerstvě připravené zásobě roztoků referenčních standardů, pozitivních kontrol, negativních kontrol a zkoušených chemických látek by neměla být znatelná sraženina ani zákal. Zásoba referenčních standardů a kontrol může být připravována hromadně. Před každým experimentem by se měly připravit čerstvé roztoky zkoušených chemických látek. Konečná ředění referenčních standardů, pozitivních kontrol, negativních kontrol a zkoušených chemických látek by se měla připravit čerstvá pro každý experiment a použít do 24 hodin od přípravy.

Rozpustnost, cytotoxicita a zjištění rozsahu

34. Při předběžné screeningové zkoušce se stanoví rozpustnost zkoušených chemických látek ve zvoleném rozpouštědle. Připraví se zásoba v maximální koncentraci 0,1 M. Pokud tato koncentrace vykazuje problémy s rozpustností, je třeba připravit zásobní roztoky s nižší koncentrací, dokud nebudou zkoušené chemické látky zcela rozpustné. Při předběžné screeningové zkoušce se testují postupná ředění zkoušené chemické látky 1:10. Maximální koncentrace pro testování agonistů nebo antagonistů je 1 mM. Po předběžné screeningové zkoušce se odvodí vhodný upřesněný rozsah koncentrací pro zkoušené chemické látky, jež mají být testovány v souhrnných zkouškách. Ředění použitá pro souhrnné testování by měla být 1x, 3x, 10x, 30x, 100x, 300x, 1000x a 3000x.

35. V protokolu analýzy agonistů a antagonistů je zařazeno testování cytotoxicity (11). Testování cytotoxicity je začleněno do předběžné screeningové zkoušky i do souhrnných zkoušek. Při validaci biotestu ERα CALUX se pro posouzení cytotoxicity použila zkouška na průnik laktát dehydrogenázy v kombinaci s kvalitativní vizuální kontrolou buněk (viz dodatek 4.1) po expozici zkoušeným chemickým látkám. Mohou však být použity i jiné kvantitativní metody pro stanovení cytotoxicity (např. kolorimetrická analýza na bázi tetrazolia (MTT) nebo biotest cytotoxicity CALUX). Obecně, koncentrace zkoušených chemických látek, které vykazují více než 20 % redukci životaschopnosti, se považují za cytotoxické, a proto nemohou být použity pro hodnocení dat. Pokud jde o analýzu průniků LDH, považuje se koncentrace zkoušené chemické látky za cytotoxickou, když je procento průniku LDH větší než 120 %.

▼M8

Expozice zkoušené chemické látce a organizace testovacích destiček

36. Po přidání trypsinu do konfluentní lahve s kultivovanými buňkami se buňky resuspendují na 1 x 10^5 buněk/ml ve zkušebním médiu bez estrogenů. 100 µl resuspendovaných buněk se umístí do vnitřních jamek 96jamkové mikrotitrační destičky. Vnější jamky se naplní 200 µl fosfátového pufru (PBS) (viz obrázky 1 a 2). Buňky na destičkách se předběžně inkubují po dobu 24 hodin dne v inkubátoru s CO_2 (5 % CO_2, 37 °C, 100 % vlhkost vzduchu).

37. Po předběžné inkubaci se destičky prohlédnou, zda nejeví vizuální známky cytotoxicity (viz dodatek 4.1), kontaminace a konfluence. Pro testování se použijí pouze destičky, které nejeví žádné vizuální známky cytotoxicity a kontaminace a které mají minimálně 85 % konfluenci. Médium z vnitřních jamek se opatrně odstraní a nahradí 200 µl zkušebního média bez estrogenu obsahujícího příslušnou sérii ředění referenčních standardů, zkoušených chemických látek, pozitivních kontrol, negativních kontrol a kontrol s rozpouštědlem (tabulka 5: studie agonistů; tabulka 6: studie antagonistů). Všechny referenční standardy, zkoušené chemické látky, pozitivní kontroly, negativní kontroly a kontroly s rozpouštědlem se testují třikrát. Na obrázku 1 je uvedeno uspořádání destičky pro zkoušení agonistů. Na obrázku 2 je uvedeno uspořádání destičky pro zkoušení antagonistů. Uspořádání destičky pro předběžné screeningové testování a souhrnné testování je stejné. Při testování antagonistů obsahují všechny vnitřní jamky, s výjimkou jamek pro kontrolu vehikula (VC), také pevnou koncentraci agonistického referenčního standardu 17β-estradiolu ($3*10^{-12}$ M). Nezapomeňte, že na každou destičku TC je třeba přidat referenční standardy C8 a C4.

38. Po expozici buněk všem chemickým látkám se 96jamkové mikrotitrační destičky inkubují po dobu dalších 24 hodin v inkubátoru s CO_2 (5 % CO_2, 37 °C, 100 % vlhkost vzduchu).

Obrázek 1

Uspořádání 96jamkových mikrotitračních destiček pro předběžné screeningové testování a posouzení agonistického účinku

Destička 1

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	PC	
C		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	PC	
D		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	PC	
E		SC	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	NC	
F		SC	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	NC	
G		SC	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	NC	
H												

Další destičky

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (max)	
C		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (max)	
D		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (max)	
E		SC	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C4 (EC50)	
F		SC	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C4 (EC50)	
G		SC	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C4 (EC50)	
H												

C0 = referenční standardní rozpouštědlo

C(1–8) = série ředění (1–8, koncentrace od nízké po vysokou) referenčního standardu

▼M8

PC = pozitivní kontrola

NC = negativní kontrola

TCx-(1–8) = ředění (1–8, koncentrace od nízké po vysokou) zkoušené chemické látky pro předběžnou screeningovou zkoušku a posouzení agonistického účinku zkoušené chemické látky x

SC = kontrola zkoušené chemické látky s rozpouštědlem (optimálně stejné rozpouštědlo jako v C0, ale může být z jiné šarže)

Šedé buňky: = vnější buňky, naplněné 200 µl PBS

Obrázek 2

Uspořádání 96jamkových mikrotitračních destiček pro předběžné screeningové testování a posouzení antagonistického účinku

Destička 1

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	VC	
C		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	VC	
D		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	VC	
E		NC	TC1-	TC1-2	TC1-3	TC	TC1-5	TC1-	TC1-	TC1-	PC	
F		NC	TC1-	TC1-2	TC1-3	TC	TC1-5	TC1-	TC1-	TC1-	PC	
G		NC	TC1-	TC1-2	TC1-3	TC	TC1-5	TC1-	TC1-	TC1-	PC	
H												

Další destičky

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (max)	
C		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (max)	
D		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (max)	
E		C4 (IC50)	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C8 (max)	
F		C4 (IC50)	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C8 (max)	
G		C4 (IC50)	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C8 (max)	
H												

C0 = referenční standardní rozpouštědlo

C(1–8) = série ředění (1–8, koncentrace od nízké po vysokou) referenčního standardu

NC = negativní kontrola

PC = pozitivní kontrola

TCx–(1–8) = ředění (1–8, koncentrace od nízké po vysokou) zkoušené chemické látky pro předběžnou screeningovou zkoušku a posouzení agonistického účinku zkoušené chemické látky x

SC = kontrola zkoušené chemické látky s rozpouštědlem (optimálně stejné rozpouštědlo jako v C0, ale může být z jiné šarže)

VC = kontrola s vehikulem (kontrola s rozpouštědlem bez pevné koncentrace agonistického referenčního standardu 17β-estradiolu)

Šedé buňky: = vnější buňky, naplněné 200 µl PBS

Poznámka: Všechny vnitřní jamky, s výjimkou jamek pro kontrolu vehikula (VC), obsahují také pevnou koncentraci agonistického referenčního standardu 17β-estradiolu ($3{,}0*10^{-12}$ M).

Měření luminiscence

39. Měření luminiscence je podrobně popsáno v protokolu analýzy agonistů a antagonistů (10). Médium by se mělo z jamek odstranit a buňky by se po 24 hodinách inkubace měly štěpit, aby se otevřela buněčná membrána a umožnilo měření luciferázové aktivity.

▼M8

40. Pro měření luminiscence vyžaduje tento postup luminometr vybavený dvěma injektory. Reakce luciferázy začíná vstříknutím substrátu luciferin. Reakce se zastaví přidáním 0,2 M NaOH. Reakce je zastavena, aby nedocházelo k přenosu luminiscence z jedné jamky do druhé.

41. Světlo emitované z každé jamky se vyjadřuje v relativních luminiscenčních jednotkách (RLU) na jamku.

Předběžná screeningová zkouška

42. Výsledky předběžné screeningové analýzy se použijí k určení přesného rozmezí koncentrace zkoušených chemických látek pro souhrnné testování. Hodnocení výsledků předběžné screeningové analýzy a určení přesného rozmezí koncentrace zkoušených chemických látek pro souhrnné testování je podrobně popsáno v protokolech pro analýzu agonistů a antagonistů (10). Zde je uveden stručný souhrn postupů pro určení rozmezí koncentrace zkoušených chemických látek pro analýzu agonistů a antagonistů. Viz tabulky 5 a 6, kde je uveden návod na způsob postupného ředění.

Volba koncentrací pro posouzení agonistických účinků

43. Při předběžné screeningové zkoušce se zkoušené chemické látky testují pomocí série ředění, jak je uvedeno v tabulce 5 (agonistická aktivita) a v tabulce 6 (antagonistická aktivita). Všechny koncentrace je třeba testovat v trojích jamkách podle rozvržení destičky, jak je znázorněno na obrázku 1 (agonistická aktivita) nebo 2 (antagonistická aktivita).

44. Za platné se považují pouze výsledky analýzy, které splňují kritéria přijatelnosti (tabulka 3), a tyto výsledky mohou být použity pro hodnocení odpovědi zkoušených chemických látek. V případě, že jedna nebo více mikrotitračních destiček v sérii analýz nesplní kritéria přijatelnosti, je třeba příslušné mikrotitrační destičky analyzovat znovu. Pokud první destička obsahující celou sérii ředění referenčního standardu nesplní kritéria přijatelnosti, je třeba znovu analyzovat celou zkušební sérii (6 destiček).

45. Původní rozmezí koncentrací zkoušených chemických látek se upraví a předběžná screeningová zkouška se zopakuje v případě, že:

— je pozorována cytotoxicita. Předběžný screeningový postup se zopakuje s nižšími necytotoxickými koncentracemi zkoušené chemické látky,

— předběžný screening zkoušené chemické látky nevykazuje celou křivku závislosti odpovědi na dávce, protože testované koncentrace generují maximální indukci. Předběžná screeningová zkouška se zopakuje s nižšími koncentracemi zkoušené chemické látky.

46. Když je pozorována platná odpověď ve vztahu k dávce, zvolí se (nejnižší) koncentrace, při níž je pozorována maximální indukce a která nevykazuje cytotoxicitu. Nejvyšší koncentrace zkoušené chemické látky, která se testuje v souhrnných zkouškách, by měla být trojnásobkem této zvolené koncentrace.

47. Připraví se celá upřesněná série ředění zkoušené chemické látky, a to podle kroků ředění uvedených v tabulce 5, počínaje nejvyšší koncentrací, jak je stanoveno výše.

▼M8

48. Zkoušená chemická látka, která nevyvolává žádný agonistický účinek, se testuje v souhrnných zkouškách počínaje nejvyšší necytotoxickou koncentrací určenou v průběhu předběžného screeningu.

Volba koncentrací pro posouzení antagonistických účinků

49. Za platné se považují pouze výsledky analýzy, které splňují kritéria přijatelnosti (tabulka 4), a tyto výsledky mohou být použity pro hodnocení odpovědi zkoušených chemických látek. V případě, že jedna nebo více mikrotitračních destiček v sérii analýz nesplní kritéria přijatelnosti, je třeba příslušné mikrotitrační destičky analyzovat znovu. Pokud první destička obsahující celou sérii ředění referenčního standardu nesplní kritéria přijatelnosti, je třeba znovu analyzovat celou zkušební sérii (6 destiček).

50. Původní rozmezí koncentrací zkoušených chemických látek se upraví a předběžná screeningová zkouška se zopakuje v případě, že:

— je pozorována cytotoxicita. Předběžný screeningový postup se zopakuje s nižšími necytotoxickými koncentracemi zkoušené chemické látky,

— předběžný screening zkoušené chemické látky nevykazuje celou křivku závislosti odpovědi na dávce, protože testované koncentrace generují maximální inhibici. Předběžná screeningová zkouška se zopakuje s nižšími koncentracemi zkoušené chemické látky.

51. Když je zjištěna platná odpověď ve vztahu k dávce, zvolí se (nejnižší) koncentrace, při níž je pozorována maximální inhibice a která nevykazuje cytotoxicitu. Nejvyšší koncentrace zkoušené chemické látky, která se testuje v souhrnných zkouškách, by měla být trojnásobkem této zvolené koncentrace.

52. Připraví se celá upřesněná série ředění zkoušené chemické látky, a to podle kroků ředění uvedených v tabulce 6, počínaje nejvyšší koncentrací, jak je stanoveno výše.

53. Zkoušené chemické látky, které nevyvolávají žádný antagonistický účinek, se testují v souhrnných zkouškách počínaje nejvyšší necytotoxickou koncentrací otestovanou v průběhu předběžného screeningu.

Souhrnné zkoušky

54. Po výběru zpřesněných rozmezí koncentrací se zkoušené chemické látky testují souhrnně pomocí série ředění, jak je uvedeno v tabulce 5 (agonistická aktivita) a v tabulce 6 (antagonistická aktivita). Všechny koncentrace je třeba testovat v trojích jamkách podle rozvržení destičky, jak je znázorněno na obrázku 1 (agonistická aktivita) nebo 2 (antagonistická aktivita).

55. Za platné se považují pouze výsledky analýzy, které splňují kritéria přijatelnosti (tabulka 3 a 4), a tyto výsledky mohou být použity pro hodnocení odpovědi zkoušených chemických látek. V případě, že jedna nebo více mikrotitračních destiček v sérii analýz nesplní kritéria přijatelnosti, je třeba příslušné mikrotitrační destičky analyzovat znovu. Pokud první destička obsahující celou sérii ředění referenčního standardu nesplní kritéria přijatelnosti, je třeba znovu analyzovat celou zkušební sérii (6 destiček).

▼**M8**

Tabulka 5

Koncentrace a ředění referenčních standardů, kontrol a zkoušených chemických látek použité pro testování agonistů

Referenční 17β-estradiol		TCx – předběžná screeningová zkouška		TCx – souhrnná zkouška		Kontroly	
konc. (M)		ředění		ředění		konc. (M)	
C0	0	TCx-1	10000000 x	TCx-1	3000 x	PC	$3*10^{-6}$
C1	$1*10^{-13}$	TCx-2	1000000 x	TCx-2	1000 x	NC	$1*10^{-8}$
C2	$3*10^{-13}$	TCx-3	100000 x	TCx-3	300 x	C0	0
C3	$1*10^{-12}$	TCx-4	10000 x	TCx-4	100 x	SC	0
C4	$3*10^{-12}$	TCx-5	1000 x	TCx-5	30 x		
C5	$6*10^{-12}$	TCx-6	100 x	TCx-6	10 x		
C6	$1*10^{-11}$	TCx-7	10 x	TCx-7	3 x		
C7	$3*10^{-11}$	TCx-8	1 x	TCx-8	1 x		
C8	$1*10^{-10}$						

TCx – zkoušená chemická látka x
PC – pozitivní kontrola (17α-methyltestosteron)
NC – negativní kontrola (kortikosteron)
C0 – kontrola referenčního standardu s rozpouštědlem
SC – kontrola zkoušené chemické látky s rozpouštědlem

▼**M8**

Tabulka 6

Koncentrace a ředění referenčních standardů, kontrol a zkoušených chemických látek použité pro testování antagonistů

Referenční tamoxifen		TCx – předběžná screeningová zkouška		TCx – souhrnná zkouška		Kontroly	
konc. (M)		zředění		zředění		konc. (M)	
C0	0	TCx-1	10000000 x	TCx-1	3000 x	PC	$1*10^{-9}$
C1	$3*10^{-9}$	TCx-2	1000000 x	TCx-2	1000 x	NC	$1*10^{-5}$
C2	$1*10^{-8}$	TCx-3	100000 x	TCx-3	300 x	C0	0
C3	$3*10^{-8}$	TCx-4	10000 x	TCx-4	100 x	SC	0
C4	$1*10^{-7}$	TCx-5	1000 x	TCx-5	30 x		
C5	$3*10^{-7}$	TCx-6	100 x	TCx-6	10 x	**Doplněný agonista**	
C6	$1*10^{-6}$	TCx-7	10 x	TCx-7	3 x	**konc. (M)**	
C7	$3*10^{-6}$	TCx-8	1 x	TCx-8	1 x	17β-estradiol	$3*10^{-12}$
C8	$1*10^{-5}$						

TCx – zkoušená chemická látka x
PC – pozitivní kontrola (4-hydroxytamoxifen)
NC – negativní kontrola (resveratrol)
C0 – kontrola referenčního standardu s rozpouštědlem
SC – kontrola zkoušené chemické látky s rozpouštědlem
VC – kontrola s vehikulem (neobsahuje pevnou koncentraci agonistického referenčního standardu 17β-estradiol ($3,0*10^{-12}$ M)

▼M8

Sběr a analýza dat

56. Po předběžné screeningové zkoušce a souhrnných zkouškách se stanoví EC_{10}, EC_{50}, PC_{10}, PC_{50} a maximální indukce (TCx_{max}) zkoušené chemické látky pro testování agonistických účinků. Pro testování antagonistických účinků se stanoví IC_{20}, IC_{50}, PC_{80}, PC_{50} a minimální indukce (TCx_{min}). Na obrázku 3 (agonistická aktivita) a 4 (antagonistická aktivita) jsou tyto parametry znázorněny graficky. Potřebné parametry se vypočítají podle relativní indukce každé zkoušené chemické látky (ve vztahu k maximální indukci referenčního standardu (= 100 %)). Pro hodnocení dat se použije nelineární regrese (variabilní sklon, 4 parametry), a to podle následující rovnice:

$$Y = Bottom + \frac{(Top - Bottom)}{1 + 10(lgEC_{50} - X)Hill\ Slope}$$

kde:

X = logaritmus dávky nebo koncentrace

Y = odpověď (relativní indukce (%))

Top = maximální indukce (%)

Bottom = minimální indukce (%)

$logEC_{50}$ = logaritmus koncentrace, při níž je pozorováno 50 % maximální odpovědi

Hillův koeficient = míra sklonu nebo Hillova křivka

57. Nezpracovaná data z luminometru, vyjádřená jako relativní luminiscenční jednotky (RLU), je třeba převést do tabulkového editoru pro analýzu dat určeného pro předběžné screeningové a souhrnné zkoušky. Nezpracovaná data by měla splňovat kritéria přijatelnosti uvedená v tabulce 3A a 3B (agonistická aktivita) nebo 4A a 4B (antagonistická aktivita). V případě, že nezpracovaná data splňují kritéria přijatelnosti, provede se výpočet v následujících krocích pro stanovení potřebných parametrů:

Agonistická aktivita

— Odečtěte průměrné jednotky RLU kontroly referenčního standardu s rozpouštědlem od každé analýzy nezpracovaných dat referenčních standardů.

— Odečtěte průměrné jednotky RLU kontroly zkoušené chemické látky s rozpouštědlem od každé analýzy nezpracovaných dat zkoušených chemických látek.

— Vypočtěte relativní indukci každé koncentrace referenčního standardu. Stanovte indukci nejvyšší koncentrace referenčního standardu na 100 %.

— Vypočtěte relativní indukci každé koncentrace zkoušené chemické látky v porovnání s nejvyšší koncentrací referenčního standardu jako 100 %.

— Vyhodnoťte výsledky analýzy podle nelineární regrese (variabilní sklon, 4 parametry).

▼**M8**

— Určete hodnoty EC_{50} a EC_{10} referenčního standardu.

— Určete hodnoty EC_{50} a EC_{10} zkoušených chemických látek.

— Určete maximální relativní indukci zkoušené chemické látky (TC_{max}).

— Určete hodnoty PC_{10} a PC_{50} zkoušených chemických látek.

U zkoušených chemických látek nemusí být vždy dosažena celá křivka závislosti odpovědi na dávce, např. vzhledem k cytotoxicitě nebo problémům s rozpustností. Proto nelze určit hodnoty EC_{50}, EC_{10} a PC_{50}. V takovém případě lze určit pouze hodnoty PC_{10} and TC_{max}.

Antagonistická aktivita

— Odečtěte průměrné jednotky RLU nejvyšší koncentrace referenčního standardu od každé analýzy nezpracovaných dat referenčních standardů.

— Odečtěte průměrné jednotky RLU nejvyšší koncentrace referenčního standardu od každé analýzy nezpracovaných dat zkoušených chemických látek.

— Vypočtěte relativní indukci každé koncentrace referenčního standardu. Stanovte indukci nejnižší koncentrace referenčního standardu na 100 %.

— Vypočtěte relativní indukci každé koncentrace zkoušené chemické látky v porovnání s nejnižší koncentrací referenčního standardu jako 100 %.

— Vyhodnoťte výsledky analýzy podle nelineární regrese (variabilní sklon, 4 parametry).

— Určete hodnoty IC_{50} a IC_{20} referenčního standardu.

— Určete hodnoty IC_{50} a IC_{20} zkoušených chemických látek.

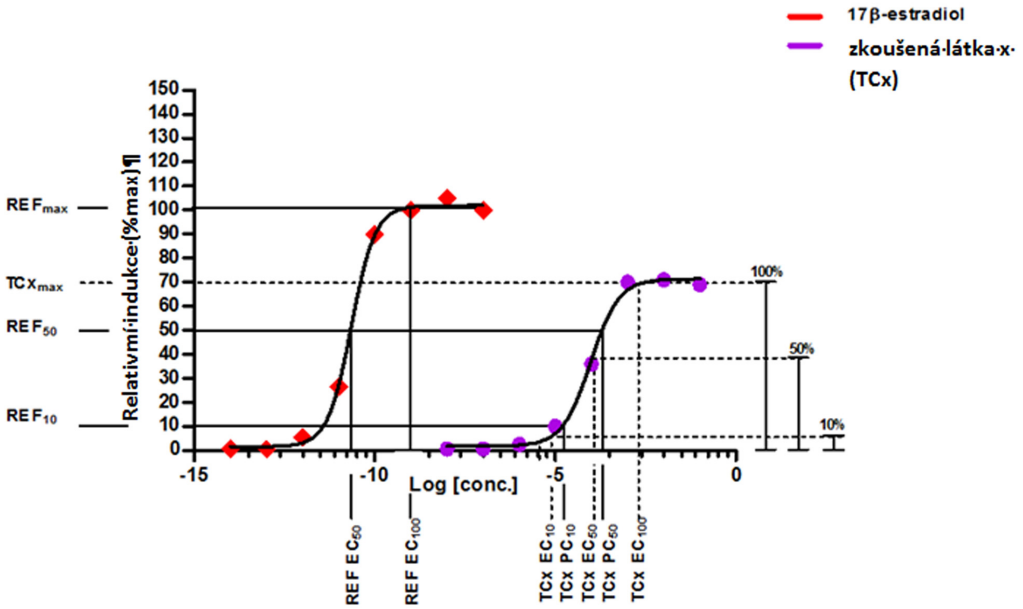
— Určete maximální relativní indukci zkoušené chemické látky (TC_{min}).

— Určete hodnoty PC_{80} a PC_{50} zkoušených chemických látek.

▼M8

Obrázek 3

Přehled parametrů stanovených v analýze agonistů



EC_{10} = koncentrace látky, při níž je pozorováno 10 % její maximální odpovědi

EC_{50} = koncentrace látky, při níž je pozorováno 50 % její maximální odpovědi

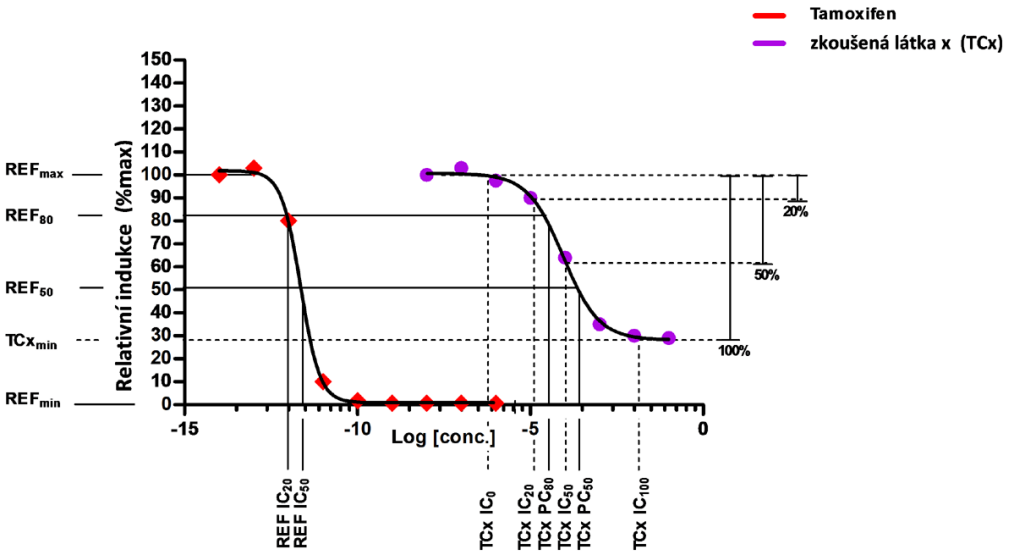
PC_{10} = koncentrace zkoušené chemické látky, při níž se její odpověď rovná EC_{10} referenčního standardu

PC_{50} = koncentrace zkoušené chemické látky, při níž se její odpověď rovná EC_{50} referenčního standardu

TCx_{max} = maximální relativní indukce zkoušené chemické látky.

Obrázek 4

Přehled parametrů stanovených v analýze antagonistů



IC20 = koncentrace látky, při níž je pozorováno 80 % její maximální odpovědi (20 % inhibice)

▼M8

IC50 = koncentrace látky, při níž je pozorováno 50 % její maximální odpovědi (50 % inhibice)

PC80 = koncentrace zkoušené chemické látky, při níž se její odpověď rovná IC_{20} referenčního standardu

PC50 = koncentrace zkoušené chemické látky, při níž se její odpověď rovná IC_{50} referenčního standardu

TCxmin = minimální relativní indukce zkoušené chemické látky.

U zkoušených chemických látek nemusí být vždy dosažena celá křivka závislosti odpovědi na dávce, např. vzhledem k cytotoxicitě nebo problémům s rozpustností. Proto nelze určit hodnoty IC_{50}, IC_{20} a PC_{50}. V takovém případě lze určit pouze hodnoty PC_{20} a TC_{min}.

58. Výsledky by měly vycházet ze dvou (nebo tří) nezávislých provedení zkoušek. Jestliže jsou při dvou provedeních zkoušky získány srovnatelné, a tedy reprodukovatelné výsledky, není nutné provádět zkoušku potřetí. Aby byly výsledky přijatelné, měly by:

— splňovat kritéria přijatelnosti (viz kritéria přijatelnosti, odstavce 14–22),

— být reprodukovatelné.

Kritéria interpretace údajů

59. Pro interpretaci údajů a rozhodnutí, zda je zkoušená chemická látka považována za pozitivní, nebo negativní, se používají tato kritéria:

Agonistická aktivita

U každé souhrnné zkoušky se zkoušená chemická látka považuje za **pozitivní** v případě:

1 TC_{max} se rovná nebo je vyšší než 10 % maximální odpovědi referenčního standardu (REF_{10}).

2 Alespoň 2 po sobě jdoucí koncentrace zkoušené chemické látky se rovnají nebo jsou vyšší než REF_{10}.

U každé souhrnné zkoušky se zkoušená chemická látka považuje za **negativní** v případě:

1 TC_{max} není vyšší než 10 % maximální odpovědi referenčního standardu (REF_{10}).

2 Méně než 2 koncentrace zkoušené chemické látky se rovnají nebo jsou vyšší než REF_{10}.

Antagonistická aktivita

U každé souhrnné zkoušky se zkoušená chemická látka považuje za **pozitivní** v případě:

1 TC_{min} se rovná nebo je nižší než 80 % maximální odpovědi referenčního standardu (REF_{80} = 20 % inhibice).

2 Alespoň 2 po sobě jdoucí koncentrace zkoušené chemické látky se rovnají nebo jsou nižší než REF_{80}.

▼**M8**

U každé souhrnné zkoušky se zkoušená chemická látka považuje za **negativní** v případě:

1 TC_{min} je vyšší než 80 % maximální odpovědi referenčního standardu (REF_{80} = 20 % inhibice).

2 Méně než 2 koncentrace zkoušené chemické látky se rovnají nebo jsou nižší než REF_{80}.

60. Aby bylo možné charakterizovat sílu pozitivní odpovědi zkoušené chemické látky, uvedou se velikost účinku (agonistická aktivita: TC_{max}; antagonistická aktivita: TC_{min}) a koncentrace, při níž k účinku dochází (agonistická aktivita: EC_{10}, EC_{50}, PC_{10}, PC_{50}; antagonistická aktivita: IC_{20}, IC_{50}, PC_{80}, PC_{50}).

ZÁVĚREČNÁ ZPRÁVA

61. Viz odstavec 20 „SLOŽKY ANALÝZY ER TA“.

LITERATURA

(1) OECD (2016). Draft Validation report of the (anti-) ERα CALUX bioassay - transactivation bioassay for the detection of compounds with (anti)estrogenic potential. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 240). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(2) Sonneveld E, Jansen HJ, Riteco JA, Brouwer A, van der Burg B. (2005). Development of androgen- and estrogen-responsive bioassays, members of a panel of human cell line-based highly selective steroid-responsive bioassays. *Toxicol Sci.* 83(1), 136-148.

(3) Quaedackers ME, van den Brink CE, Wissink S, Schreurs RHMM, Gustafsson JA, van der Saag PT, and van der Burg B. (2001). 4-Hydroxytamoxifen trans-represses nuclear factor-kB Activity in human osteoblastic U2OS cells through estrogen receptor (ER)α and not through ERβ. *Endocrinology* 142(3), 1156-1166.

(4) Thorne N, Inglese J and Auld DS. (2010). Illuminating Insights into Firefly Luciferase and Other Bioluminescent Reporters Used in Chemical Biology, Chemistry and Biology17(6):646-57.

(5) Escande A, Pillon A, Servant N, Cravedi JP, Larrea F, Muhn P, Nicolas JC, Cavaillès V and Balaguer P. (2006). Evaluation of ligand selectivity using reporter cell lines stably expressing estrogen receptor alpha or beta. *Biochem. Pharmacol.,* 71, 1459-1469.

(6) Kuiper GG, Lemmen JG, Carlsson B, Corton JC, Safe SH, van der Saag PT, van der Burg B and Gustafsson JA. (1998). Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinol.,* 139, 4252-4263.

(7) Sotoca AM, Bovee TFH, Brand W, Velikova N, Boeren S, Murk AJ, Vervoort J, Rietjens IMCM. (2010). Superinduction of estrogen receptor mediated gene expression in luciferase based reporter gene assays is mediated by a post-transcriptional mechanism. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.,* 122, 204–211.

(8) Sonneveld E, Riteco JAC, Jansen HJ, Pieterse B, Brouwer A, Schoonen WG, and van der Burg B. (2006). Comparison of *in vitro* and *in vivo* screening models for androgenic and estrogenic activities. *Toxicol. Sci.,* 89(1), 173–187.

▼**M8**

(9) Kobayashi H, Yamamoto K, Eguchi M, Kubo M, Nakagami S, Wakisaka S, Kaizuka M and Ishii H. (1995). Rapid detection of mycoplasma contamination in cell cultures by enzymatic detection of polymerase chain reaction (PCR) products. *J. Vet. Med. Sci.,* 57(4), 769-771.

(10) Zhang J-H, Chung TDY, and Oldenburg KR. (1999). A simple statistical parameter for use in evaluation and validation of high throuphut screening assays. J. Biomol. Scr., 4, 67-73

(11) Besselink H, Middelhof I, and Felzel, E. (2014). Transactivation assay for the detection of compounds with (anti)estrogenic potential using ERα CALUX cells. BioDetection Systems BV (BDS). Amsterdam, the Netherlands.

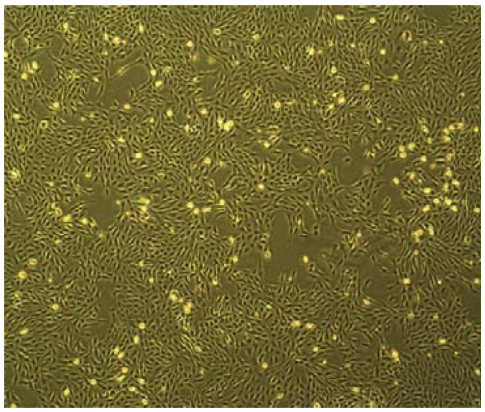
▼**M8**

Dodatek 4.1:

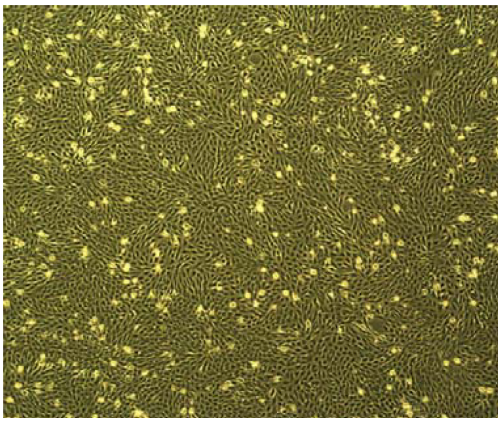
VIZUÁLNÍ KONTROLA ŽIVOTASCHOPNOSTI BUNĚK



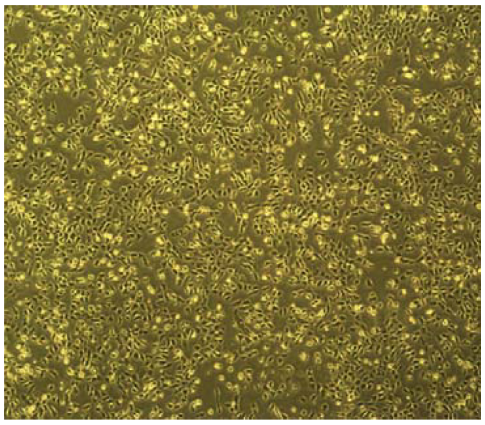
< 5 % konfluence. Buňky byly právě nasazeny. 100 % životaschopnost buněk. Klasifikace: „žádná cytotoxicita“



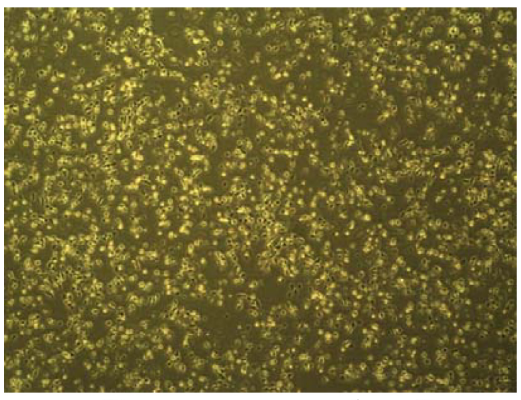
> 85 % konfluence. V tomto stádiu jsou buňky exponovány zkoušeným chemickým látkám. > 95 % životaschopnost buněk.
Klasifikace: „žádná cytotoxicita“



> 95 % konfluence. Buňky jsou hustě směstnány a začínají přerůstat. > 95 % životaschopnost buněk.
Klasifikace: „žádná cytotoxicita“



< 25 % životaschopnost buněk. Buňky se od sebe oddělují a kontakt mezi nimi se snižuje. Buňky jsou zakulacené. Klasifikace: „cytotoxicita“



< 5 % životaschopnost buněk. Buňky jsou od sebe zcela odděleny a kontakt mezi nimi je porušen. Buňky jsou zakulacené. Klasifikace: „cytotoxicita“

▼M8

B.67 ZKOUŠKA NA GENOVÉ MUTACE V BUŇKÁCH SAVCŮ *IN VITRO* S POUŽITÍM GENU THYMIDINKINÁZY

ÚVOD

1. Tato zkušební metoda je rovnocenná Pokynu OECD pro zkoušení (TG) č. 490 (2016). Zkušební metody se pravidelně přezkoumávají a revidují s ohledem na vědecký pokrok, potřeby regulace a dobré životní podmínky zvířat. Test myšího lymfomu (MLA) a test TK6 využívající lokus thymidinkinázy (TK) byly původně obsaženy ve zkušební metodě B.17. Následně expertní pracovní skupina pro MLA Mezinárodního semináře o zkoušení genotoxicity (IWGT) vyvinula mezinárodní harmonizovaná doporučení pro kritéria přijatelnosti tohoto testu a interpretaci dat MLA (1)(2)(3)(4)(5) a uvedená doporučení jsou začleněna do této nové zkušební metody B.67. Tato zkušební metoda je napsána pro test MLA, a protože využívá také lokus TK, pro test TK6. Zatímco test MLA se používá běžně pro regulační účely, test TK6 se používá mnohem méně často. Je třeba uvést, že i přes podobnost mezi cílovými parametry nejsou tyto dvě buněčné linie vzájemně zaměnitelné a regulační programy mohou platně vyjádřit preferenci jedné nebo druhé pro konkrétní regulační použití. Například validace testu MLA prokázala jeho vhodnost pro detekci nejen genových mutací, ale také schopnosti zkoušené chemické látky indukovat strukturální chromozomální poškození. Tato zkušební metoda je součástí série zkušebních metod genetické toxikologie. Byl vypracován dokument, který obsahuje stručné informace o zkoušení v oblasti genetické toxikologie a přehled posledních změn, které OECD provedla ve svých pokynech ke zkoušení genotoxicity (6).

2. Účelem zkoušek na genové mutace v buňkách savců *in vitro* je detekce genových mutací indukovaných chemickými látkami. Buněčné linie používané při těchto zkouškách měří přímé mutace reportérových genů, a to endogenního genu thymidinkinázy (*TK* pro lidské buňky a *Tk* pro buňky hlodavců, společně v této zkušební metodě nazývané jen *TK*). Tato zkušební metoda je určena k použití se dvěma buněčnými liniemi: buněčnou linií myšího lymfomu L5178Y $TK^{+/-}$-3.7.2C (obecně nazývanou L5178Y) a buněčnou linií lidského lymfoblastoidu TK6 (obecně nazývanou TK6). I když se tyto dvě buněčné linie liší vzhledem ke svému původu, růstu buněk, stavu p53 atd., mohou být testy genových mutací *TK* prováděny podobným způsobem u obou typů buněk, jak je popsáno v této zkušební metodě.

3. Autozomální a heterozygotní povaha genu thymidinkinázy umožňuje detekci životaschopných kolonií, jejichž buňky jsou deficitní na enzym thymidinkinázu po mutaci z $TK^{+/-}$ na $TK^{-/-}$. Tento deficit může vyplývat z genetických jevů ovlivňujících gen *TK* včetně genových mutací (bodové mutace, posunové mutace, malé delece atd.) i chromozomálních změn (velké delece, přestavby chromozomu a mitotické rekombinace). Posledně jmenované změny se projevují jako ztráta heterozygotnosti, což je běžná genetická změna genů tlumících nádory v lidské tumorigenezi. Teoreticky může být testem MLA detekována ztráta celého chromozomu nesoucího gen *TK* v důsledku poškození vřetene a/nebo mitotické nondisjunkce. Kombinace cytogenetické a molekulární analýzy jasně ukazuje, že některé mutace MLA TK jsou výsledkem nondisjunkce. Průkazné důkazy však ukazují, že testy genové mutace *TK* nemohou spolehlivě detekovat aneugeny při aplikaci standardních kritérií cytotoxicity (jak je popsáno v této zkušební metodě), a proto není vhodné používat tyto testy na detekci aneugenů (7)(8)(9).

▼**M8**

4. Při testech genových mutací *TK* se generují dvě odlišné fenotypové třídy mutantů *TK*; normálně rostoucí mutanti rostoucí stejnou rychlostí jako heterozygotní buňky TK a pomalu rostoucí mutanti rostoucí s prodlouženou dobou zdvojení. Normálně rostoucí i pomalu rostoucí mutanti se v testu MLA rozpoznávají jako mutanti tvořící velké kolonie a mutanti tvořící malé kolonie a v testu TK6 jako mutanti tvořící časné kolonie a mutanti tvořící pozdní kolonie. Podrobně byla zkoumána molekulární a cytogenetická povaha mutantů MLA tvořících jak velké kolonie, tak malé kolonie (8)(10)(11)(12)(13). Rovněž byla rozsáhle studována molekulární a cytogenetická povaha mutantů TK6 tvořících časné kolonie i pozdní kolonie (14)(15)(16)(17). Pomalu rostoucí mutanti u obou buněčných druhů vykazovali genetické poškození, které zahrnuje putativní gen(y) regulující růst v blízkosti lokusu *TK*, což má za následek prodlouženou dobu zdvojení a vznik pozdních nebo malých kolonií (18). Indukce pomalu rostoucích mutantů se spojuje s chemickými látkami, které indukují silné strukturální změny na úrovni chromozomů (26). Buňky, jejichž poškození nezahrnuje putativní gen(y) regulující růst v blízkosti lokusu TK, rostou podobnou rychlostí jako mateřské buňky a vzniknou z nich normálně rostoucí mutanti. Indukce primárně normálně rostoucích mutantů se spojuje s chemickými látkami, které primárně působí jako bodové mutageny. Proto je velmi důležité spočítat jak pomalu rostoucí, tak i normálně rostoucímu mutanty, aby se zjistily všechny mutace a získaly informace o druhu (druzích) poškození (mutageny oproti klastogenům) indukovaného zkoušenou chemickou látkou (10)(12)(18)(19).

5. Zkušební metoda je uspořádána tak, aby poskytla obecné informace, které platí pro test MLA i TK6, a specializovaný návod pro individuální testy.

6. Použité definice jsou uvedeny v dodatku 1.

VÝCHOZÍ ÚVAHY A OMEZENÍ

7. Zkoušky prováděné *in vitro* obecně vyžadují použití vnějšího zdroje metabolické aktivace. Systém exogenní metabolické aktivace zcela nenapodobuje podmínky *in vivo*.

8. Je třeba zabránit vzniku podmínek, které by mohly vést k uměle pozitivním výsledkům (tj. možná interakce se zkušebním systémem), které nejsou způsobeny interakcí mezi zkoušenou chemickou látkou a genetickým materiálem buňky; takové podmínky zahrnují změny pH nebo osmolality, interakce se složkami média (20) (21) nebo nadměrné úrovně cytotoxicity (22)(23)(24). Pro testy MLA a TK6 se cytotoxicita přesahující doporučené horní úrovně cytotoxicity stanovené v odstavci 28 považuje za nadměrnou. Dále je třeba poznamenat, že zkoušené chemické látky, které jsou analogy thymidinu nebo které se chovají jako analogy thymidinu, mohou zvyšovat frekvenci mutací selektivním růstem spontánních mutantů na pozadí při ošetření buněk a vyžadovat tak další zkušební metody pro adekvátní hodnocení (25).

9. Při zkoušení vyráběných nanomateriálů mohou být potřebné určité úpravy metody, které však v této zkušební metodě nejsou popsány.

10. Před použitím této zkušební metody ke zkoušení směsi za účelem získání údajů pro zamýšlené použití v právních předpisech by mělo být zváženo, zda tato metoda může pro tento účel poskytnout přiměřené výsledky, a pokud ano, proč je tomu tak. Takové posouzení není nutné, pokud existuje právní požadavek na zkoušení dané směsi.

▼M8

11. Mutantní buňky, které v důsledku mutace $TK^{+/-}$ na $TK^{-/-}$ vykazují deficit aktivity enzymu thymidinkináza, jsou rezistentní k cytostatickým účinkům analogu pyrimidinu trifluorthymidinu (TFT). Buňky produkující *TK* jsou citlivé na TFT, což způsobuje inhibici buněčného metabolismu a zastavuje další buněčné dělení. Mutantní buňky jsou tedy schopny proliferace za přítomnosti TFT a tvoří viditelné kolonie, zatímco buňky, které obsahují TK, tuto schopnost nemají.

PRINCIP ZKOUŠKY

12. Buňky v suspenzi jsou vhodnou dobu (viz odstavec 33) vystaveny zkoušené chemické látce jak s exogenním zdrojem metabolické aktivace (viz odstavec 19), tak bez něj a poté subkultivovány za účelem stanovení cytotoxicity a za účelem exprese fenotypu před selekcí mutantů. Cytotoxicita se stanoví podle relativního celkového růstu (RTG – viz odstavec 25) v testu MLA a podle relativního přežití (RS – viz odstavec 26) v testu TK6. Exponované kultury se udržují v růstovém médiu po vhodnou dobu charakteristickou pro každý zvolený typ buněk (viz odstavec 37), aby nastala přibližně optimální fenotypová exprese indukovaných mutací. Po fenotypové expresi se četnost mutantů stanoví tak, že se nasadí známý počet buněk do média obsahujícího selekční činidlo pro detekci mutantních kolonií a do média bez selekčního činidla, aby byla stanovena účinnost klonování (životaschopnost). Po vhodné inkubační době se spočítají kolonie. Četnost mutantů se vypočítá podle počtu mutantních kolonií korigovaného účinností klonování v době selekce mutantů.

POPIS METODY

Přípravky

Buňky

13. Pro test MLA: Protože test MLA byl vyvinut a charakterizován pomocí sublinie $TK^{+/-}$ -3.7.2C buněk L5178Y, musí být pro test MLA použita tato specifická sublinie. Buněčná linie L5178Y byla odvozena od lymfomu brzlíku indukovaného methylcholanthrenem z DBA-2 myši (26). Clive a spolupracovníci ošetřili buňky L5178Y (které Clive označil jako $TK^{+/+}$ -3) ethyl-metansulfonátem a izolovali klon $TK^{-/-}$ (označený jako $TK^{-/-}$ -3.7) pomocí bromodeoxyuridinu jako selekčního činidla. Z klonu $TK^{-/-}$ byly izolovány spontánní klon $TK^{+/-}$ (označený jako $TK^{+/-}$ -3.7.2.) a subklon (označený jako $TK^{+/-}$-3.7.2C) a charakterizovány pro použití v testu MLA (27). Karyotyp pro buněčnou linii byl zveřejněn (28)(29)(30)(31). Modální hodnota počtu chromozomů je 40. Je zde jeden metacentrický chromozom (t12;13), který by se měl počítat jako jeden chromozom. Myší lokus *TK* je umístěn na distálním konci chromozomu 11. Buněčná linie L5178Y $TK^{+/-}$ -3.7.2C má mutace v obou alelách p53 a vytváří mutantní protein p53 (32)(33). Za schopnost testu detekovat rozsáhlé poškození je pravděpodobně odpovědný stav p53 buněčné linie $TK^{+/-}$-3.7.2C (17).

14. Pro TK6: TK6 je buněčná linie lidského lymfoblastoidu. Mateřskou buněčnou linií je transformovaná buněčná linie viru Epstein-Barrové, WI-L2, která byla původně získána od pětiletého chlapce s hereditární sférocytózou. První izolovaný klon, HH4, byl zmutován ICR191 a byla vytvořena heterozygotní *TK* buněčná linie, TK6 (34). Buňky TK6 jsou téměř diploidní a reprezentativní karyotyp je 47, XY, 13+, t(14; 20), t(3; 21 (35). Na dlouhém rameni chromozomu 17 se nachází lidský lokus *TK*. TK6 je p53-kompetentní buněčná linie, protože má v obou alelách sekvenci p53 divokého typu a exprimuje pouze protein p53 divokého typu (36).

▼M8

15. Pro MLA i TK6 se doporučuje, aby zkoušející laboratoř při prvním vytváření nebo doplňování základní zásoby zkontrolovala nepřítomnost mykoplazmové kontaminace, určila karyotyp buněk nebo obarvila chromozomy s lokusem *TK* a zkontrolovala dobu zdvojení populace. Pro buňky použité ve zkušební laboratoři by měla být stanovena normální délka buněčného cyklu, která by měla být v souladu s buněčnými charakteristikami uvedenými v literatuře (16)(19)(37). Tuto základní zásobu je třeba skladovat při –150 °C nebo méně a používat na přípravu veškeré pracovní zásoby buněk.

16. Buď před vytvořením velkého množství zmrazené pracovní zásoby, nebo bezprostředně před použitím v experimentu může být nutné očistit kulturu od již existujících mutantních buněk [pokud již není frekvence mutací (MF) v kontrole s rozpouštědlem v přijatelném rozsahu – viz tabulka 2 pro MLA)]. Provádí se to pomocí methotrexátu (aminopterin), kterým se vyselektují TK-deficitní buňky, a přidáním thymidinu, hypoxanthinu a glycinu (L5178Y) nebo 2'-deoxycytidinu (TK6) do kultury pro zajištění optimálního růstu TK-kompetentních buněk (19)(38)(39) a (40) pro TK6). Obecné rady týkající se správného postupu udržování buněčných kultur i konkrétní rady pro buňky L5178Y a TK6 lze nalézt v (19)(31)(37)(39)(41). Laboratoře, které potřebují základní zásobu buněk, aby mohly iniciovat MLA nebo TK6, nebo si chtějí pořídit novou základní zásobu buněk, mají k dispozici buněčný archív s dobře charakterizovanými buňkami (37).

Média a podmínky kultivace

17. U obou zkoušek by pro udržování kultur mělo být použito vhodné kultivační médium a inkubační podmínky (např. kultivační nádoby, zvlhčená atmosféra s 5 % CO_2, inkubační teplota 37 °C). Buněčné kultury by měly být vždy uchovávány za podmínek, při nichž je zajištěn jejich logaritmický růst. Je zvláště důležité zvolit média a podmínky kultivace tak, aby byly zajištěny optimální růst buněk během období exprese a klonování jak mutovaných, tak nemutovaných buněk. Pro MLA i TK6 je také důležité, aby podmínky kultivace zajišťovaly optimální růst velkých kolonií/časných kolonií i malých kolonií/pozdních kolonií mutantů TK. Podrobnější informace o kultivaci, včetně nutnosti správně tepelně inaktivovat koňské sérum, jestliže se při selekci mutantů používá médium RPMI, lze nalézt v (19)(31)(38)(39)(40)(42).

Příprava kultur

18. Buňky se pomnoží z kmenových kultur a nasadí se do kultivačního média v takové hustotě, aby kultury v suspenzích pokračovaly v exponenciálním růstu po celou dobu expozice a exprese.

Metabolická aktivace

19. Při použití buněk L5178Y and TK6 by se měly použít exogenní metabolizující systémy, protože tyto buňky mají nedostatečnou endogenní metabolickou schopnost. Nejčastěji používaným systémem, který je standardně doporučován, pokud není zdůvodněno použití jiného systému, je kofaktorem dotovaná postmitochondriální frakce (S9) připravená z jater hlodavců (zpravidla potkanů) zpracovaná činidlem indukujícím enzymy, jako je Aroclor 1254 (43)(44)(45) nebo kombinace fenobarbitalu a β-naftoflavonu (46)(47)(48)(49)(50)(51). Posledně jmenovaná kombinace není v rozporu se Stockholmskou úmluvou o perzistentních organických znečišťujících látkách (52) a bylo prokázáno, že je stejně účinná jako Aroclor 1254 pro

▼M8

indukování oxidáz se smíšenou funkcí (45)(46)(47)(48)(49). Frakce S9 je obvykle používána v koncentracích od 1–2 % obj., avšak v konečném testovacím médiu je možné koncentraci zvýšit do 10 % obj. Volbu typu a koncentrace systému exogenní metabolické aktivace nebo metabolického induktoru, který se použije, může ovlivnit třída zkoušených chemických látek.

Příprava zkoušených chemických látek

20. Pevné zkoušené chemické látky by měly být před aplikací na buňky rozpuštěny ve vhodných rozpouštědlech a popřípadě zředěny (viz odstavec 21). Kapalné látky lze přidat přímo do zkušebních systémů a/nebo je lze před použitím k ošetření zkušebních systémů zředit. Plynné a těkavé zkoušené chemické látky by se měly zkoušet za použití vhodně upravených standardních protokolů, například prostřednictvím ošetření buněk v neprodyšně uzavřených kultivačních nádobách (53)(54)(55). Měly by se používat čerstvě připravené zkoušené látky, pokud údaje o stálosti neprokazují možnost skladování.

ZKUŠEBNÍ PODMÍNKY

Rozpouštědla

21. Rozpouštědlo by mělo být zvoleno tak, aby optimalizovalo rozpustnost zkoušené chemické látky, aniž by nepříznivě ovlivnilo provádění zkoušky, např. měnilo růst buněk, ovlivňovalo integritu zkoušené chemické látky, reagovalo s kultivačními nádobami, narušovalo systém metabolické aktivace. Doporučuje se pokud možno nejprve zvážit použití vodného rozpouštědla (nebo kultivačního média). Dobře zavedenými rozpouštědly jsou voda nebo dimethylsulfoxid. Podíl organických rozpouštědel by zpravidla neměl být větší než 1 % obj. a podíl vodných rozpouštědel (fyziologického roztoku nebo vody) v konečném expozičním médiu by neměl být větší než 10 % obj. Jsou-li použita jiná než osvědčená rozpouštědla (např. ethanol nebo aceton), mělo by být jejich použití podloženo údaji o jejich kompatibilitě se zkoušenými chemickými látkami, zkušebním systému a o tom, že nejsou v použité koncentraci genotoxická. Pokud takové podpůrné údaje neexistují, je důležité přidat neexponované kontroly (viz dodatek 1, Definice) prokazující, že zvolené rozpouštědlo nevyvolává žádné škodlivé nebo mutagenní účinky.

MĚŘENÍ CYTOTOXICITY A VOLBA EXPOZIČNÍCH KONCENTRACÍ

22. Při stanovení nejvyšší koncentrace zkoušené chemické látky by neměly být použity koncentrace, které jsou schopny vyvolat falešnou pozitivní odpověď, jako např. koncentrace, jež vyvolávají nadměrnou cytotoxicitu (viz odstavec 28), srážení (viz odstavec 29) kultivačního média nebo zřetelné změny pH nebo osmolality (viz odstavec 8). Pokud zkoušená chemická látka v době jejího přidání způsobuje zřetelnou změnu hodnoty pH média, bylo by možné pH upravit pufrováním konečného expozičního média tak, aby nedošlo k falešným pozitivním výsledkům a aby byly zachovány vhodné kultivační podmínky.

23. Volba koncentrace vychází z cytotoxicity a dalších faktorů (viz odstavce 27–30). Hodnocení cytotoxicity při předběžné zkoušce může být užitečné a může napomoci k lepšímu určení koncentrací, jež mají být použity při hlavní zkoušce, avšak předběžná zkouška není vyžadována. I v případě, že se provede předběžné hodnocení cytotoxicity, je při hlavním experimentu přesto požadováno měření cytotoxicity pro každou kulturu. Jestliže se provádí experiment ke zjištění rozsahu, měl by zahrnovat široké rozmezí koncentrací, přičemž může být ukončen buď v den 1 po expozici, nebo pokračovat expresí v den 2 a k selekci mutantů (pokud se budou použité koncentrace jevit jako vhodné).

▼**M8**

24. Cytotoxicita by měla být stanovena pro každou jednotlivou zkoušenou kulturu i kontrolní kulturu: metody pro MLA (2) a TK6 (15) jsou definovány podle mezinárodně dohodnuté praxe.

25. Pro obě verze testu MLA, s použitím agaru i mikrotitračních destiček: Cytotoxicita se hodnotí podle relativního celkového růstu (RTG), který původně definoval v roce 1975 Clive a Spector (2). Toto měření zahrnuje relativní růst v suspenzi (RSG: zkoušená kultura v porovnání s kontrolou s rozpouštědlem) v průběhu expozice buněk, dobu exprese a relativní účinnost klonování (RCE: zkoušená kultura v porovnání s kontrolou s rozpouštědlem) v době, kdy jsou selektováni mutanti (2). Je třeba poznamenat, že RSG zahrnuje každou ztrátu buněk, k níž dojde ve zkoušené kultuře v průběhu expozice (viz dodatek 2, kde jsou uvedeny vzorce).

26. Pro TK6: Cytotoxicita by se měla hodnotit podle relativního přežití (RS), tj. podle účinnosti klonování buněk umístěných na destičky okamžitě po expozici, upravené podle případné ztráty buněk v průběhu expozice, a to podle počtu buněk, v porovnání s negativní kontrolou (s přiřazeným přežitím 100 %) (viz dodatek 2, kde je uveden vzorec).

27. Měly by se vyhodnotit nejméně čtyři zkušební koncentrace (nepočítaje v to kontroly s rozpouštědlem a pozitivní kontroly), které splňují kritéria přijatelnosti (vhodná cytotoxicita, počet buněk atd.). I když se doporučuje použít duplicitní kultury, lze pro každou zkušební koncentraci použít repliky nebo jednu exponovanou kulturu. Výsledky získané z duplicitních kultur při dané koncentraci by měly být vykazovány samostatně, ale pro účely analýzy údajů je lze sloučit (55). U zkoušených látek, jež vykazují malou cytotoxicitu nebo nevykazují žádnou cytotoxicitu, budou obvykle vhodné přibližně dvojnásobné až trojnásobné intervaly koncentrací. V případě cytotoxicity by měly zvolené koncentrace pokrývat rozpětí od koncentrace vyvolávající cytotoxicitu, jak je popsáno v odstavci 28, po koncentrace, při nichž dochází ke střední a nízké cytotoxicitě nebo nedochází k žádné cytotoxicitě. Mnohé zkoušené chemické látky vykazují strmé křivky závislosti odezvy na koncentraci, a aby bylo možné postihnout celý rozsah cytotoxicity nebo podrobně studovat závislost odpovědi na koncentraci, může být nezbytné zvolit menší rozdíly mezi jednotlivými koncentracemi a více než čtyři koncentrace, zejména v situacích, kdy je požadován opakovaný experiment (viz odstavec 70). Použití více než 4 koncentrací může být zvláště důležité, když se používá jedna kultura.

28. Je-li maximální koncentrace odvozena od cytotoxicity, měla by být nejvyšší koncentrace zvolena tak, aby se dosáhlo relativního přežití mezi 20 a 10 % RTG u MLA a mezi 20 a 10 % RS u TK6 (odstavec 67).

29. V případě špatně rozpustných zkoušených chemických látek, které nejsou cytotoxické při koncentracích nižších, než je jejich rozpustnost, by nejvyšší analyzovaná koncentrace měla na konci expozice zkoušené chemické látce vyvolat zákal nebo sraženinu viditelnou pouhým okem nebo pomocí inverzního mikroskopu. Dokonce i v případech, kdy k výskytu cytotoxicity dochází při koncentracích vyšších, než je rozpustnost, se doporučuje testovat pouze při jedné koncentraci vyvolávající zákal nebo viditelné sraženiny, neboť sraženina může vést k falešným účinkům. Protože testy MLA i TK6 používají kultury v suspenzi, je třeba zvláště dbát na to, aby provádění zkoušky nemohla ovlivňovat sraženina. Užitečné může být také stanovení rozpustnosti v kultivačním médiu před pokusem.

▼M8

30. Není-li pozorována sraženina nebo omezení cytotoxicity, měla by největší zkušební koncentrace odpovídat 10 mM, 2 mg/ml nebo 2 μl/ml, podle toho, která z uvedených hodnot je nejnižší (57) (58). Pokud u zkoušené chemické látky není stanoveno její složení, např. u látek s neznámým nebo proměnlivým složením, komplexních reakčních produktů nebo biologického materiálu [tj. chemické látky s neznámým nebo proměnlivým složením, (UVCB)], přírodních extraktů atd., bude možná muset být při nedostatečné cytotoxicitě nejvyšší koncentrace vyšší (např. 5 mg/ml), aby se zvýšila koncentrace každé ze složek. Je však třeba poznamenat, že u humánních léčivých přípravků se tyto požadavky mohou lišit (59).

Kontroly

31. V okamžiku každého odběru by měly být použity souběžné negativní kontroly (viz odstavec 21) skládající se ze samotného rozpouštědla v kultivačním médiu, s nimiž se zachází stejným způsobem jako s exponovanými kulturami.

32. K prokázání schopnosti laboratoře stanovit mutageny za podmínek použitého zkušebního protokolu, (případně) účinnosti exogenního systému metabolické aktivace a k prokázání adekvátní detekce malých/pozdních a velkých/časných *TK* mutantů jsou nutné souběžné pozitivní kontroly. Příklady pozitivních kontrol jsou uvedeny v tabulce 1 níže. V odůvodněných případech mohou být k pozitivní kontrole použity jiné látky. Jelikož zkoušky genetické toxicity savčích buněk *in vitro* při krátkodobé expozici (3–4 hodiny) prováděné souběžně s metabolickou aktivací a bez metabolické aktivace s použitím stejné doby trvání expozice jsou již dostatečně standardizovány, je možné použití pozitivních kontrol omezit na testování mutagenu vyžadujícího metabolickou aktivaci. V tomto případě tato reakce jediné pozitivní kontroly prokáže činnost systému metabolické aktivace i citlivost zkušebního systému. Pokud se však používá dlouhodobá expozice (tj. 24 hodin bez S9), měla by mít svou vlastní pozitivní kontrolu, protože doba trvání expozice bude odlišná než při zkoušce za použití metabolické aktivace. Každá pozitivní kontrola by měla být použita při jedné nebo více koncentracích, u nichž se očekává, že poskytnou reprodukovatelný a detekovatelný nárůst oproti pozadí, čímž se prokáže citlivost testovacího systému, a reakce by neměla být narušena cytotoxicitou přesahující limitní hodnoty stanovené v této zkušební metodě (viz odstavec 28).

Tabulka 1

Referenční látky doporučené pro posouzení způsobilosti laboratoře a pro výběr pozitivních kontrol

Kategorie	Látka	CASRN
1. Mutageny působící bez metabolické aktivace		
	methyl-methansulfonát	66-27-3
	mitomycin C	50-07-7
	4-nitrochinolin-1-oxid	56-57-5
2. Mutageny vyžadující metabolickou aktivaci		
	benzo[a]pyren	50-32-8
	cyklofosfamid (cyklofosfamid monohydrát)	50-18-0 R60/6055/-19-2
	7,12-dimethylbenzoanthracen	57-97-6
	3-methylcholanthren	56-49-5

▼M8

POSTUP

Expozice zkoušené chemické látce

33. Proliferující buňky se vystaví zkoušené chemické látce jak za přítomnosti metabolického aktivačního systému, tak bez něho. Expozice by měla trvat vhodnou dobu (obvykle je postačující doba 3 až 4 hodin). Je však třeba poznamenat, že u humánních léčivých přípravků se tyto požadavky mohou lišit (59). Pro MLA, v případech, kdy krátkodobá expozice dává negativní výsledky a existují informace naznačující nutnost dlouhodobější expozice [např. analoga nukleosidů, špatně rozpustné chemické látky (5)(59)], je třeba zvážit provedení zkoušky s delší expozicí, tj. 24 hodin bez S9.

34. Minimální počet buněk použitých pro každou zkušební (kontrolní a exponovanou) kulturu v každém stádiu zkoušky by měl vycházet z četnosti spontánních mutací. Obecným pravidlem je exponovat a pasážovat v každé experimentální kultuře dostatečný počet buněk, aby bylo uchováno v každé fázi zkoušky alespoň 10, ideálně však 100 spontánních mutantů (expozice, fenotypová exprese a selekce mutantů) (56).

35. Pro MLA je doporučená přijatelná frekvence spontánních mutací mezi 35–140 × 10^{-6} (verze s agarem) a 50–170 × 10^{-6} (verze s mikrotitračními destičkami) (viz tabulka 2). Pro získání alespoň 10 a ideálně 100 spontánních mutantů, kteří v každé zkoušené kultuře přežijí expozici, je nezbytné exponovat alespoň 6 × 10^{6} buněk. Exponování takového počtu buněk a zachování dostatečného počtu buněk v průběhu exprese a klonování pro selekci mutantů poskytuje dostatečný počet spontánních mutací (10 nebo více) ve všech fázích experimentu, a to i u kultur exponovaných při koncentracích, jejichž výsledkem je 90 % cytotoxicita (měřeno podle 10 % RTG) (19)(38)(39).

36. U TK6 činí četnost spontánních mutací obvykle 2 až 10 × 10^{-6}. Pro získání alespoň 10 spontánních mutantů, kteří v každé kultuře přežijí expozici, je nezbytné exponovat alespoň 20 × 10^{6} buněk. Expozice tohoto počtu buněk zajistí dostatečný počet spontánních mutantů (10 nebo více) i v kulturách exponovaných při koncentracích, které vyvolávají při expozici 90 % cytotoxicitu (10 % relativní přežití). Kromě toho musí být v období exprese kultivován a umístěn na destičky pro výběr mutantů dostatečný počet buněk (60).

Doba exprese fenotypu a měření cytotoxicity a četnosti mutací

37. Na konci expoziční doby se buňky po stanovenou dobu kultivují, aby se umožnila téměř optimální fenotypová exprese nově indukovaných mutantů, specifická pro každou buněčnou linii. U testu MLA je doba fenotypové exprese 2 dny. U testu TK6 činí doba fenotypové exprese 3–4 dny. Jestliže se použije 24hodinová expozice, začíná doba exprese po ukončení expozice.

38. V průběhu doby fenotypové exprese se buňky počítají každý den. U testu MLA se denní počet buněk použije pro výpočet denního růstu v suspenzi (SG). Po dvoudenním období exprese se buňky suspendují v médiu se selekčním činidlem a bez něj za účelem stanovení počtu mutantů (destičky pro selekci), respektive účinnosti klonování (destičky pro životaschopnost). Pro test MLA existují dvě stejně přijatelné metody pro selektivní klonování mutantů; jedna s použitím měkkého agaru a druhá s použitím kapalného média v 96jamkových destičkách (19)(38)(39). Klonování v testu TK6 se provádí s použitím kapalného média v 96jamkových destičkách (16).

▼M8

39. Jediným doporučeným selekčním činidlem pro mutanty *TK* je triflurothymidin (TFT) (61).

40. U testu MLA se agarové destičky a mikrotitrační destičky počítají po 10–12 dnech inkubace. U testu TK6 se po 10–14 dnech stanoví skóre časných kolonií mutantů v mikrotitračních destičkách. Za účelem obnovení pomalu rostoucích (pozdních kolonií) mutantů TK6 je třeba po spočítání časných kolonií mutantů dodat buňkám růstové médium a TFT a poté destičky inkubovat dalších 7–10 dnů (62). Viz odstavce 42 a 44, kde je uvedena diskuze o vyčíslení mutantů *TK* s pomalým a normálním růstem.

41. Příslušné výpočty pro tyto dva testy včetně obou metod (agar a mikrodestičky) pro test MLA jsou uvedeny v dodatku 2. U testu MLA s použitím agarové metody se spočítají kolonie a počet mutantních kolonií se upraví podle účinnosti klonování, aby bylo možné vypočítat četnost mutací. U testu MLA ve verzi s mikrodestičkami a u testu TK6 se stanoví účinnost klonování u destiček pro selekci i destiček pro účinnost klonování podle Poissonova rozdělení (63). Z těchto dvou hodnot účinnosti klonování se vypočítá četnost mutací.

Charakterizace mutantních kolonií

42. Je-li u testu MLA zkoušená chemická látka pozitivní (viz odstavce 62–63), charakterizace podle velikosti nebo růstu kolonií by měla být provedena alespoň na jedné ze zkušebních kultur (obvykle na kultuře s nejvyšší pozitivní koncentrací) a na negativních a pozitivních kontrolách. Je-li zkoušená látka negativní (viz odstavec 64), měla být charakterizace mutantních kolonií provedena na negativních a pozitivních kontrolách. U metody testu MLA s využitím mikrodestiček se mutanti tvořící malé kolonie definují jako kolonie pokrývající méně než 25 % průměru jamky a mutanti tvořící velké kolonie jako kolonie pokrývající více než 25 % průměru jamky. U agarové metody se na vyčíslení kolonií mutantů a stanovení jejich velikosti používá automatické počítadlo kolonií. Způsoby stanovení velikosti kolonií jsou podrobně popsány v literatuře (19)(38)(40). Aby bylo prokázáno, že studie se provádějí správně, je třeba charakterizovat kolonie na negativní a pozitivní kontrole.

43. Zkoušenou chemickou látku nelze určit jako negativní, pokud nejsou v pozitivní kontrole adekvátně detekováni mutanti tvořící velké i malé kolonie. Charakterizace kolonií může sloužit k poskytnutí obecných informací o schopnosti zkoušené chemické látky způsobit bodové mutace anebo chromozomální jevy (odstavec 4).

44. TK6: Normálně rostoucí a pomalu rostoucí mutanti se diferencují podle rozdílu v době inkubace (viz odstavec 40). U testu TK6 se obvykle stanoví skóre časných i pozdních mutantů pro všechny kultury včetně negativních a pozitivních kontrol. Aby bylo prokázáno, že studie se provádějí správně, je třeba charakterizovat kolonie u negativní a pozitivní kontroly. Zkoušenou chemickou látku nelze určit jako negativní, pokud nejsou v pozitivní kontrole adekvátně detekováni časní i pozdní mutanti. Charakterizace kolonií může sloužit k poskytnutí obecných informací o schopnosti zkoušené chemické látky způsobit bodové mutace anebo chromozomální jevy (odstavec 4).

▼M8

Způsobilost laboratoře

45. Aby bylo možné před zahájením rutinního zkoušení prokázat, zda laboratoř má s danou zkouškou dostatečné zkušenosti, měla by provést sérii experimentů s referenčními pozitivními látkami, jež působí prostřednictvím různých mechanismů (alespoň s jednou látkou účinnou s metabolickou aktivací a jednou účinnou bez metabolické aktivace, které se vyberou ze seznamu látek uvedeného v tabulce 1), a s různými negativními kontrolami (včetně neexponovaných kultur a různých rozpouštědel/vehikul). Odpovědi těchto pozitivních a negativních kontrol by měly být v souladu s odbornou literaturou. Tento požadavek se nepoužije na laboratoře, které tuto zkušenost mají, tj. které mají k dispozici databázi historických údajů, jak je definována v odstavcích 47–50. V testu MLA by hodnoty dosažené u pozitivní i negativní kontroly měly odpovídat doporučením IWGT (viz tabulka 2).

46. Výběr z látek pro pozitivní kontroly (viz tabulka 1) by měl být zkoumán s krátkou i dlouhou expozicí (pokud se používají dlouhé expozice) bez metabolické aktivace a také s krátkou expozicí a s metabolickou aktivací, aby byla prokázána způsobilost pro detekci mutagenních chemických látek, stanovena účinnost systému metabolické aktivace a prokázána vhodnost podmínek pro růst buněk v průběhu expozice, fenotypovou expresi a selekci mutantů a postupů hodnocení. Rozsah koncentrací by u vybraných látek měl být zvolen tak, aby poskytl opakovatelná zvýšení účinku v závislosti na dávce nad úroveň pozadí, aby se tak prokázala citlivost a dynamické rozpětí testovacího systému.

Historické kontrolní údaje

47. Laboratoř by měla stanovit:

— historické rozmezí a distribuci pozitivních kontrol,

— historické rozmezí a distribuci negativních kontrol (neexponovaných, s rozpouštědlem).

48. Při prvním získávání údajů o historické distribuci negativních kontrol by měly být výsledky souběžných negativních kontrol v souladu s publikovanými negativními kontrolními údaji. S tím, jak je do distribuce kontrol přidáváno více údajů z experimentů, měly by aktuální negativní kontroly v ideálním případě spadat do 95 % rozmezí této distribuce (64)(65).

49. Nejprve by měla být vybudována historická databáze negativních kontrol dané laboratoře na základě nejméně 10 experimentů, avšak raději by měla zahrnovat nejméně 20 experimentů provedených za srovnatelných zkušebních podmínek. V laboratořích by měly být uplatňovány metody kontroly jakosti, jako např. regulační diagramy (např. C-diagramy nebo diagramy X s pruhem (65)), z nichž je patrné, jak proměnlivé jsou jejich údaje o pozitivních a negativních kontrolách a že metodika je v dané laboratoři „pod kontrolou“ (66). Další podrobnosti a doporučení jak vytvářet a používat historická data lze najít v literatuře (64).

50. Údaje o negativních kontrolách by měly zahrnovat četnost mutací z jedné kultury nebo raději z replikovaných kultur, jak je popsáno v odstavci 27. Výsledky souběžných negativních kontrol by v ideálním případě měly být uvnitř 95 % kontrolních limitů distribuce v historické databázi negativních kontrol laboratoře. Pokud jsou údaje z negativních kontrol mimo 95 % rozmezí, může být přijatelné je zahrnout do dosavadní distribuce kontrol, pokud tyto údaje nejsou mimořádně odlehlé, je to důkaz, že testovací systém je „pod kontrolou“ (viz odstavec 49), a důkaz, že nedošlo k technické nebo lidské chybě.

▼M8

51. Jakékoli změny zkušebního protokolu by měly být zvažovány z hlediska jejich souladu se stávajícími historickými kontrolními databázemi laboratoře. Jakýkoli větší rozdíl ve zkušebním protokolu by měl vést k zavedení nové historické kontrolní databáze.

ÚDAJE A PŘEDKLÁDÁNÍ ZPRÁV

Vyjádření výsledků

52. Prezentace údajů pro test MLA i TK6 by měla zahrnovat údaje za exponované i kontrolní kultury potřebné pro výpočet cytotoxicity (RTG, respektive RS) a četnosti mutací, jak je popsáno níže.

53. U testu MLA by měly být uvedeny údaje za jednotlivé kultury pro RSG, RTG, účinnost klonování v době selekce mutantů a počet mutantních kolonií (u agarové verze) nebo počet prázdných jamek (u mikrodestičkové verze). Četnost mutantů by měla být vyjádřena jako počet mutantních buněk na milion přeživších buněk. Je-li odpověď pozitivní, měly by se uvést četnosti mutací tvořících malé a velké kolonie (anebo procento z celkové četnosti mutací) u alespoň jedné koncentrace zkoušené chemické látky (obvykle látky s nejvyšší pozitivní koncentrací) a negativní a pozitivní kontroly. V případě negativní odpovědi by se měla uvést četnost mutací tvořících malé a velké kolonie pro negativní a pozitivní kontrolu.

54. U testu TK6 by měly být uvedeny údaje za jednotlivé kultury pro RS, účinnost klonování v době selekce mutantů a počet prázdných jamek u časných a pozdních mutací. Četnost mutací (MF) se vyjadřuje jako počet mutantních buněk na počet přeživších buněk a měla by zahrnovat celkovou MF i MF (anebo procento z celkové MF) časných a pozdních mutantů.

Kritéria přijatelnosti

55. Pro test MLA i test TK6 by měla být splněna tato kritéria před stanovením celkových výsledků za konkrétní zkoušenou chemickou látku:

— Test se provedl za dvou experimentálních uspořádání (krátká expozice s metabolickou aktivací a bez ní – viz odstavec 33), pokud jedno z nich nevedlo k pozitivním výsledkům.

— Měl by být analyzovatelný adekvátní počet buněk a koncentrací (viz odstavce 27, 34–36).

— Kritéria pro výběr nejvyšší koncentrace jsou v souladu s kritérii popsanými v odstavcích 28–30.

Kritéria přijatelnosti pro negativní a pozitivní kontroly

56. Na základě analýzy expertní pracovní skupiny IWGT pro MLA zahrnující velké množství údajů o MLA byl dosažen mezinárodní konsensus ohledně specifických kritérií přijatelnosti pro MLA (1)(2)(3)(4)(5). Proto tato zkušební metoda poskytuje konkrétní doporučení pro určení přijatelnosti negativních a pozitivních kontrol a pro hodnocení výsledků jednotlivých látek v testu MLA. Test TK6 má mnohem menší databázi a nebyl hodnocen pracovní skupinou.

▼M8

57. V testu MLA by se mělo u každého experimentu hodnotit, zda neexponovaná kontrola / kontrola s rozpouštědlem splňuje kritéria přijatelnosti pracovní skupiny IWGT pro MLA ((4) a níže uvedená tabulka) pro: 1) četnost mutací (nezapomeňte, že přijatelné MF podle IWGT jsou jiné pro verzi testu MLA s agarem a verzi s mikrodestičkami), 2) účinnost klonování (CE) v době selekce mutantů a 3) růst v suspenzi (SG) pro kontrolu s rozpouštědlem (viz dodatek 2, kde jsou uvedeny vzorce).

Tabulka 2

Kritéria přijatelnosti pro MLA

Parametr	Metoda s použitím měkkého agaru	Metoda s použitím mikrodestiček
Četnost mutantů	35–140 × 10^{-6}	50–170 × 10^{-6}
Účinnost klonování	65–120 %	65–120 %
Růst v suspenzi	8–32násobek (3–4 hodiny expozice) 32–180násobek (24 hodin expozice, je-li prováděna)	8–32násobek (3–4 hodiny expozice) 32–180násobek (24 hodin expozice, je-li prováděna)

58. V testu MLA by se u každé zkoušky mělo hodnotit také, zda pozitivní kontrola/y splňuje/í alespoň jedno z těchto dvou kritérií přijatelnosti stanovených pracovní skupinou IWGT:

— Pozitivní kontrola by měla prokázat absolutní nárůst celkové četnosti mutací, to znamená zvýšení nad spontánní četnost mutací na pozadí [indukovaná četnost mutací (IMF)] alespoň 300 × 10^{-6}. Alespoň 40 % IMF by se mělo projevit v četnosti mutací tvořících malé kolonie.

— Pozitivní kontrola má zvýšenou četnost mutací tvořících malé kolonie alespoň 150 × 10^{-6} nad MF pozorovanou u souběžné neexponované kontroly / kontroly s rozpouštědlem (IMF tvořících malé kolonie 150 × 10^{-6}).

59. U testu TK6 bude zkouška přijatelná, jestliže se souběžná negativní kontrola považuje za přijatelnou pro přidání do databáze historických negativních kontrol laboratoře, jak je popsáno v odstavcích 48–49. Kromě toho by souběžné pozitivní kontroly (viz odstavec 32) měly vyvolat odpovědi, které jsou slučitelné s odpověďmi uvedenými v historické databázi pozitivních kontrol, a měly by vyvolat statisticky významný nárůst v porovnání se souběžnou negativní kontrolou.

60. U obou testů by horní mez cytotoxicity pozorovaná v kultuře pozitivní kontroly měla být stejná jako v experimentálních kulturách. To znamená, že poměr RTG/RS by neměl být menší než 10 %. K prokázání, že kritéria přijatelnosti byla u pozitivní kontroly splněna, postačí použít jednu koncentraci (nebo jednu z koncentrací kultur pozitivní kontroly, jestliže je použita více než jedna koncentrace). Dále musí být četnost mutací pozitivní kontroly v rámci přijatelného rozmezí stanoveného pro laboratoř.

Hodnocení a interpretace výsledků

61. Pro test MLA vykonala významnou práci v oblasti biologické relevance a kritérií pro pozitivní odpověď expertní pracovní skupina IWGT pro myší lymfom (4). Proto tato zkušební metoda poskytuje konkrétní doporučení pro

▼M8

interpretaci výsledků zkoušené chemické látky v testu MLA (viz odstavce 62–64). Test TK6 má mnohem menší databázi a nebyl hodnocen pracovní skupinou. Proto jsou doporučení pro interpretaci dat v testu TK6 uvedena obecněji (viz odstavce 65–66). Další doporučení se vztahují na oba testy (viz odstavce 67–71).

MLA

62. Doporučuje se, aby způsob definování pozitivní a negativní odpovědi zajišťoval, že zvýšená četnost mutací bude biologicky relevantní. Místo statistické analýzy, která se obvykle používá u jiných testů, vychází z použití předem definované indukované frekvence mutací (tj. zvýšení frekvence mutací nad souběžnou kontrolu), určeného globálního hodnotícího faktoru (GEF), který vychází z analýzy distribuce dat o četnosti mutací u negativních kontrol od zúčastněných laboratoří (4). Pro agarovou verzi testu MLA je faktor GEF 90×10^{-6} a pro mikrodestičkovou verzi testu MLA je faktor GEF 126×10^{-6}.

63. Za předpokladu, že všechna kritéria přijatelnosti byla splněna, lze zkoušenou chemickou látku považovat za jasně pozitivní, pokud v některém ze zkoumaných experimentálních uspořádání (viz odstavec 33), přesahuje zvýšení četnosti mutací nad souběžné pozadí faktor GEF a toto zvýšení souvisí s koncentrací (např. s použitím trend testu). Pak se má za to, že zkoušená chemická látka je schopna vyvolávat mutaci v tomto testovacím systému.

64. Za předpokladu, že byla splněna všechna kritéria přijatelnosti, lze zkoušenou chemickou látku považovat za jasně negativní, pokud za všech zkoumaných experimentálních uspořádání (viz odstavec 33), nedochází k žádné odpovědi v závislosti na koncentraci nebo četnost mutací, jestliže se zvýšila, nepřevyšuje faktor GEF. Pak se má za to, že zkoušená chemická látka není schopna vyvolávat mutace v tomto testovacím systému.

TK6

65. Za předpokladu, že všechna kritéria přijatelnosti byla splněna, lze zkoušenou chemickou látku považovat za jasně pozitivní, pokud v některém ze zkoumaných experimentálních uspořádání (viz odstavec 33):

— alespoň jedna ze zkušebních koncentrací vykazuje statisticky významný nárůst v porovnání se souběžnou negativní kontrolou,

— hodnocení pomocí vhodného trend-testu ukáže závislost tohoto nárůstu na koncentraci (viz odstavec 33),

— všechny výsledky jsou mimo distribuci historických údajů o negativních kontrolách (např. mimo 95 % rozmezí dle Poissonova rozdělení; viz odstavec 48).

Jsou-li splněna všechna tato kritéria, má se za to, že zkoušená chemická látka je schopna vyvolávat mutace v tomto testovacím systému. Doporučení ohledně nejvhodnějších statistických metod lze najít v literatuře (66)(67).

66. Za předpokladu, že byla splněna všechna kritéria přijatelnosti, lze zkoušenou chemickou látku považovat za jasně negativní, pokud za všech zkoumaných experimentálních uspořádání (viz odstavec 33):

— žádná ze zkušebních koncentrací nevykazuje statisticky významný nárůst v porovnání se souběžně provedenou negativní kontrolou,

— hodnocení pomocí vhodné zkoušky trendu ukáže, že nedochází k nárůstu v závislosti na koncentraci,

▼M8

— všechny výsledky spadají do rámce distribuce dosavadních údajů o negativních kontrolách (např. 95 % rozmezí dle Poissonova rozdělení, viz odstavec 48).

Pak se má za to, že zkoušená chemická látka není schopna vyvolávat mutace v tomto testovacím systému.

Pro MLA i TK6:

67. Je-li maximální koncentrace odvozena od cytotoxicity, měla by být nejvyšší koncentrace zvolena tak, aby se dosáhlo mezi 20 a 10 % RTG/RS. Podle konsensu je třeba dbát na to, aby byly interpretovány pouze ty pozitivní výsledky, které jsou vykazovány mezi 20 a 10 % RTG/RS, přičemž výsledek se nepovažuje za pozitivní, jestliže ke zvýšení četnosti dotací došlo pouze při 10 % RTG/RS nebo nižším poměru (pokud byl hodnocen) (2)(59).

68. Existují některé okolnosti, za nichž mohou pomoci další informace určit, že zkoušená chemická látka není mutagenní, když žádná kultura nevykazuje hodnotu RTG mezi 10–20 % RTG/RS. Jde o tyto situace: 1) V sérii datových bodů v rozmezí od 100 % do 20 % RTG/RS není žádný důkaz o mutagenitě (např. žádná závislost odpovědi na dávce, žádné četnosti mutací nad četnost pozorovanou při souběžné negativní kontrole nebo v historických rozsazích pozadí atd.) a alespoň jeden datový bod je mezi 20 % a 25 % RTG/RS. 2) V sérii datových bodů od 100 % do 25 % RTG/RS není žádný důkaz o mutagenitě (např. žádná závislost odpovědi na dávce, žádné četnosti mutací nad četnost pozorovanou při souběžné negativní kontrole nebo v historických rozsazích pozadí atd.) a také jeden datový bod je mírně pod 10 % RTG/RS. V obou těchto situacích lze zkoušenou chemickou látku posoudit jako negativní.

69. Ověření jasně pozitivního či jasně negativního účinku není nutné.

70. V případech, kdy odpověď není ani jasně negativní, ani jasně pozitivní, jak je popsáno výše, nebo s cílem napomoci při stanovení biologického významu výsledku by měly být údaje vyhodnoceny na základě odborného posouzení a/nebo dalším šetřením. Užitečné by mohlo být provedení opakovaného experimentu, případně za použití upravených zkušebních podmínek [např. rozsahu koncentrací, aby se zvýšila pravděpodobnost dosažení datových bodů v rozmezí 10–20 % RTG/RS, použití jiných podmínek metabolické aktivace (např. koncentrace S9 nebo původ S9) a délky expozice].

71. Ve vzácných případech ani po dalším šetření nebude možné na základě daného souboru údajů dospět k závěru o pozitivitě či negativitě výsledku. Proto by měl být učiněn závěr, že odpověď na zkoumanou chemickou látku je neurčitá (interpretováno jako stejná pravděpodobnost pozitivní nebo negativní odpovědi).

ZÁVĚREČNÁ ZPRÁVA

72. Závěrečná zpráva by měla obsahovat tyto informace:

Zkoušená chemická látka:

— zdroj, číslo šarže a je-li k dispozici, datum použitelnosti,

— stabilita zkoušené chemické látky samotné, je-li známa,

— rozpustnost a stabilita zkoušené chemické látky v rozpouštědle, jsou-li známy,

▼M8

— měření pH, případně osmolality a sraženiny v kultivačním médiu, do něhož byla přidána zkoušená chemická látka.

Jednosložková látka:

— fyzický vzhled, rozpustnost ve vodě a další relevantní fyzikálně-chemické vlastnosti,

— chemická identifikace, např. název podle IUPAC nebo CAS, číslo CAS, kód SMILES nebo InChI, strukturní vzorec, čistota, případně chemická identita nečistot, je-li to prakticky možné, atd.

Vícesložková látka, látka s neznámým nebo proměnlivým složením, komplexní reakční produkt nebo biologický materiál a směsi:

— charakterizované pokud možno chemickou identitou (viz výše), kvantitativním výskytem a relevantními fyzikálně-chemickými vlastnostmi složek.

Rozpouštědlo:

— zdůvodnění volby rozpouštědla,

— percentuální podíl rozpouštědla v konečném kultivačním médiu.

Buňky:

Pro základní laboratorní kultury:

— druh a zdroj buněk a historie ve zkušební laboratoři,

— vlastnosti karyotypu a/nebo modální hodnota počtu chromozomů,

— metody udržování buněčných kultur,

— nepřítomnost mykoplasmat,

— doby zdvojnásobení buněk.

Zkušební podmínky:

— zdůvodnění volby koncentrací a počtu buněčných kultur, včetně např. údajů o cytotoxicitě a mezích rozpustnosti,

— složení média, koncentrace CO_2, vlhkost,

— koncentrace zkoušené chemické látky vyjádřená jako konečná koncentrace v kultivačním médiu (např. v μg nebo mg/ml nebo mM kultivačního média),

— koncentrace (a/nebo objem) rozpouštědla a zkoumané chemické látky přidaných do kultivačního média,

— inkubační teplota,

— inkubační doba,

— trvání expozice,

— hustota buněk během expozice;

▼**M8**

— typ a složení použitého metabolického aktivačního systému (zdroj S9, metoda přípravy směsi S9, koncentrace nebo objem směsi S9 a S9 v konečném kultivačním médiu, kontroly jakosti S9),

— látky použité v pozitivních a negativních kontrolách, konečné koncentrace pro jednotlivé podmínky expozice,

— délka doby exprese (případně včetně počtu nasazených buněk, subkultur a výměny média),

— identifikace selekčního činidla a jeho koncentrace,

— u testu MLA by měla být uvedena použitá verze (agar nebo mikrodestička),

— kritéria přijatelnosti zkoušek,

— metody použité k počítání životaschopných a mutantních buněk,

— metody použité pro měření cytotoxicity,

— jakékoli doplňkové informace týkající se cytotoxicity a použité metody,

— délka inkubace po umístění na destičky,

— definice kolonií podle velikosti a typu (případně včetně kritérií pro „malé“ a „velké“ kolonie),

— kritéria klasifikace studie na pozitivní, negativní nebo neurčitou,

— metody použité ke stanovení pH, osmolality, je-li test proveden, a v příslušných případech sraženiny.

Výsledky:

— počet exponovaných buněk a počet subkultivovaných buněk v každé kultuře,

— parametry toxicity (RTG pro MLA a RS pro TK6),

— známky srážení a čas jejich stanovení,

— počet buněk kultivovaných v selektivním a neselektivním médiu,

— počet kolonií v neselektivním médiu a počet rezistentních kolonií v selektivním médiu a související četnosti mutací,

— stanovení velikosti kolonií u negativních a pozitivních kontrol a v případě, že je zkoušená chemická látka pozitivní, alespoň jedna koncentrace a související četnosti mutací,

— závislost účinku na koncentraci, pokud je to možné,

— údaje o souběžných negativních kontrolách (rozpouštědlo) a pozitivních kontrolách (koncentrace a rozpouštědla),

— dosavadní údaje o negativní (rozpouštědlo) a pozitivní kontrole (koncentrace a rozpouštědla) s rozmezími, středními hodnotami a směrodatnými odchylkami, počet zkoušek, z nichž vychází historické kontroly,

▼M8

— statistické analýzy (pro jednotlivé kultury, případně spojené repliky) a případné p hodnoty; a pro test MLA hodnocení GEF.

Diskuse o výsledcích

Závěr

LITERATURA

(1) Moore, M.M., Honma, M. Clements, J. (Rapporteur), Awogi, T., Bolcsfoldi, G., Cole, J., Gollapudi, B., Harrington-Brock, K., Mitchell, A., Muster, W., Myhr, B., O'Donovan, M., Ouldelhkim, M-C., San, R., Shimada, H. and Stankowski, L.F. Jr. (2000). Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Locus (TK) Gene Mutation Assay: International Workshop on Genotoxicity Test Procedures (IWGTP) Workgroup Report, Environ. Mol. Mutagen., 35 (3): 185-190.

(2) Moore, M.M., Honma, M., Clements, J., Harrington-Brock, K., Awogi, T., Bolcsfoldi, G., Cifone, M., Collard, D., Fellows, M., Flanders, K., Gollapudi, B., Jenkinson, P., Kirby, P., Kirchner, S., Kraycer, J., McEnaney, S., Muster, W., Myhr, B., O'Donovan, M., Oliver, Ouldelhkim, M-C., Pant, K., Preston, R., Riach, C., San, R., Shimada, H. and Stankowski, L.F. Jr. (2002). Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Locus Gene Mutation Assay: Follow-Up International Workshop on Genotoxicity Test Procedures, New Orleans, Louisiana, (April 2000), Environ. Mol. Mutagen., 40 (4): 292-299.

(3) Moore, M.M., Honma, M., Clements, J., Bolcsfoldi, G., Cifone, M., Delongchamp, R., Fellows, M., Gollapudi, B., Jenkinson, P., Kirby, P., Kirchner, S., Muster, W., Myhr, B., O'Donovan, M., Ouldelhkim, M-C., Pant, K., Preston, R., Riach, C., San, R., Stankowski, L.F. Jr., Thakur, A., Wakuri, S. and Yoshimura, I. (2003). Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Locus Gene Mutation Assay: International Workshop (Plymouth, UK) on Genotoxicity Test Procedures Workgroup Report, Mutation Res., 540: 127-140.

(4) Moore, M.M., Honma, M., Clements, J., Bolcsfoldi, G., Burlinson, B., Cifone, M., Clarke, J., Delongchamp, R., Durward, R., Fellows, M., Gollapudi, B., Hou, S., Jenkinson, P., Lloyd, M., Majeska, J., Myhr, B., O'Donovan, M., Omori, T., Riach, C., San, R., Stankowski, L.F. Jr., Thakur, A.K., Van Goethem, F., Wakuri, S. and Yoshimura, I. (2006). Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Gene Mutation Assay: Follow-Up Meeting of the International Workshop on Genotoxicity Tests – Aberdeen, Scotland, 2003 – Assay Acceptance Criteria, Positive Controls, and Data Evaluation, Environ. Mol. Mutagen., 47 (1): 1-5.

(5) Moore, M.M., Honma, M., Clements, J., Bolcsfoldi, G., Burlinson, B., Cifone, M., Clarke, J., Clay, P., Doppalapudi, R., Fellows, M., Gollapudi, B., Hou, S., Jenkinson, P., Muster, W., Pant, K., Kidd, D.A., Lorge, E., Lloyd, M., Myhr, B., O'Donovan, M., Riach, C., Stankowski, L.F. Jr., Thakur A.K. and Van Goethem, F. (2007). Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Mutation Assay: Meeting of the International Workshop on Genotoxicity Testing, San Francisco, 2005, Recommendations for 24-h Treatment, Mutation. Res., 627 (1): 36-40.

(6) OECD (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, No. Series on Testing and Assessment, No 234, OECD, Paris.

(7) Fellows M.D., Luker, T., Cooper, A. and O'Donovan, M.R. (2012). Unusual Structure-Genotoxicity Relationship in Mouse Lymphoma Cells Observed with a Series of Kinase Inhibitors. Mutation, Res., 746 (1): 21-28.

(8) Honma, M., Momose, M., Sakamoto, H., Sofuni, T. and Hayashi, M. (2001). Spindol Poisons Induce Allelic Loss in Mouse Lymphoma Cells Through Mitotic Non-Disjunction. Mutation Res., 493 (1-2): 101-114.

▼**M8**

(9) Wang, J., Sawyer, J.R., Chen, L., Chen, T., Honma, M., Mei, N. and Moore, M.M. (2009). The Mouse Lymphoma Assay Detects Recombination, Deletion, and Aneuploidy, *Toxicol*. Sci.., 109 (1): 96-105.

(10) Applegate, M.L., Moore, M.M., Broder, C.B., Burrell, A., and Hozier, J.C. (1990). Molecular Dissection of Mutations at the Heterozygous Thymidine Kinase Locus in Mouse Lymphoma Cells. Proc. National. Academy. Sci. USA, 87 (1): 51-55.

(11) Hozier, J., Sawyer, J., Moore, M., Howard, B. and Clive, D. (1981). Cytogenetic Analysis of the L5178Y/$TK^{+/-}$ Leads to $TK^{-/-}$ Mouse Lymphoma Mutagenesis Assay System, Mutation Res., 84 (1): 169-181.

(12) Hozier, J., Sawyer, J., Clive, D. and Moore, M.M. (1985). Chromosome 11 Aberrations in Small Colony L5178Y $TK^{-/-}$ Mutants Early in their Clonal History, Mutation Res., 147 (5): 237-242.

(13) Moore, M.M., Clive, D., Hozier, J.C., Howard, B.E., Batson, A.G., Turner, N.T. and Sawyer, J. (1985). Analysis of Trifluorothymidine-Resistant (TFTr) Mutants of L5178Y/$TK^{+/-}$ Mouse Lymphoma Cells. Mutation Res., 151 (1): 161-174.

(14) Liber H.L., Call K.M. and Little J.B. (1987). Molecular and Biochemical Analyses of Spontaneous and X-Ray-Induced Mutants in Human Lymphoblastoid Cells. Mutation Res., 178 (1): 143-153.

(15) Li C.Y., Yandell D.W. and Little J.B. (1992). Molecular Mechanisms of Spontaneous and Induced Loss of Heterozygosity in Human Cells *In Vitro*. Somat. Cell Mol. Genet., 18 (1): 77-87.

(16) Honma M., Hayashi M. and Sofuni T. (1997). Cytotoxic and Mutagenic Responses to X-Rays and Chemical Mutagens in Normal and P53-Mutated Human Lymphoblastoid Cells. Mutation. Res., 374 (1): 89-98.

(17) Honma, M., Momose, M., Tanabe, H., Sakamoto, H., Yu, Y., Little, J.B., Sofuni, T. and Hayashi, M. (2000). Requirement of Wild-Type P53 Protein for Maintenance of Chromosomal Integrity. Mol. Carcinogen., 28 (4): 203-14.

(18) Amundson S.A. and Liber H.L. (1992). A Comparison of Induced Mutation at Homologous Alleles of the TK Locus in Human Cells. II. Molecular Analysis of Mutants. Mutation Res., 267 (1): 89-95.

(19) Schisler M.R., Moore M.M. and Gollapudi B.B. (2013). *In Vitro* Mouse Lymphoma (L5178Y $TK^{+/-}$ -3.7.2C) Forward Mutation Assay. In Protocols in Genotoxicity Assessment A. Dhawan and M. Bajpayee (Eds.), Springer Protocols, Humana Press: 27-50.

(20) Long L.H., Kirkland D., Whitwell J. and Halliwell B. (2007). Different Cytotoxic and Clastogenic Effects of Epigallocatechin Gallate in Various Cell-Culture Media Due to Variable Rates of its Oxidation in the Culture Medium, Mutation Res., 634 (1-2): 177-183.

(21) Nesslany, F., Simar-Meintieres, S., Watzinger, M., Talahari, I. and Marzin, D. (2008). Characterization of the Genotoxicity of Nitrilotriacetic Acid. Environ. Mol. Mutagen., 49 (6): 439-452.

(22) Brusick D. (1986). Genotoxic Effects in Cultured Mammalian Cells Produced by Low pH Treatment Conditions and Increased Ion Concentrations. Environ. Mutagen., 8 (6): 879-886.

(23) Morita, T., Nagaki, T., Fukuda, I. and Okumura, K., (1992). Clastogenicity of Low pH to Various Cultured Mammalian Cells. Mutation Res., 268 (2): 297-305.

▼**M8**

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

(25) Wang J., Heflich R.H. and Moore M.M. (2007). A Method to Distinguish Between the *De Novo* Induction of Thymidine Kinase Mutants and the Selection of Pre-Existing Thymidine Kinase Mutants in the Mouse Lymphoma Assay. Mutation Res., 626 (1-2): 185-190.

(26) Fischer, G.A. (1958). Studies on the Culture of Leukemic Cells *In Vitro*. Ann. N.Y. Academy Sci., 76: 673-680.

(27) Clive, D., Johnson, K.O., Spector, J.F.S., Batson, A.G. and Brown, M.M.M. (1979). Validation and Characterization of the L5178Y/TK+/– Mouse Lymphoma Mutagen Assay System. Mutation Res., 59(1): 61-108.

(28) Sawyer, J., Moore, M.M., Clive, D. and Hozier, J. (1985). Cytogenetic Characterization of the L5178Y $TK^{+/-}$ 3.7.2C Mouse Lymphoma Cell Line, Mutation Res., 147 (5): 243-253.

(29) Sawyer J.R., Moore M.M. and Hozier J.C. (1989). High-Resolution Cytogenetic Characterization of the L5178Y $TK^{+/-}$ Mouse Lymphoma Cell Line, Mutation Res., 214 (2): 181-193.

(30) Sawyer, J.R., Binz, R.L., Wang, J. and Moore, M.M. (2006). Multicolor Spectral Karyotyping of the L5178Y $TK^{+/-}$-3.7.2C Mouse Lymphoma Cell Line, Environ. Mol. Mutagen., 47 (2): 127-131.

(31) Fellows, M.D., McDermott, A., Clare, K.R., Doherty, A. and Aardema, M.J. (2014). The Spectral Karyotype of L5178Y $TK^{+/-}$ Mouse Lymphoma Cells Clone 3.7.2C and Factors Affecting Mutant Frequency at the Thymidine Kinase (TK) Locus in the Microtitre Mouse Lymphoma Assay, Environ. Mol. Mutagen., 55 (1): 35-42.

(32) Storer, R.D., Jraynak, A.R., McKelvey, T.W., Elia, M.C., Goodrow, T.L. and DeLuca, J.G. (1997). The Mouse Lymphoma L5178Y $TK^{+/-}$ Cell Line is Heterozygous for a Codon 170 Mutation in the P53 Tumor Suppressor Gene. Mutation. Res., 373 (2): 157-165.

(33) Clark L.S., Harrington-Brock, K., Wang, J., Sargent, L., Lowry, D., Reynolds, S.H. and Moore, M.M. (2004). Loss of P53 Heterozygosity is not Responsible for the Small Colony Thymidine Kinase Mutant Phenotype in L5178Y Mouse Lymphoma Cells. Mutagen., 19 (4): 263-268.

(34) Skopek T.R., Liber, H.L., Penman, B.W. and Thilly, W.G. (1978). Isolation of a Human Lymphoblastoid Line Heterozygous at the Thymidine Kinase Locus: Possibility for a Rapid Human Cell Mutation Assay. Biochem. Biophys. Res. Commun., 84 (2): 411-416.

(35) Honma M. (2005). Generation of Loss of Heterozygosity and its Dependency on P53 Status in Human Lymphoblastoid Cells. Environ. Mol. Mutagen., 45, 2-3. 162-176.

(36) Xia, F., Wang, X., Wang, Y.H., Tsang, N.M., Yandell, D.W., Kelsey, K.T. and Liber, H.L. (1995). Altered P53 Status Correlates with Differences in Sensitivity to Radiation-Induced Mutation and Apoptosis in Two Closely Related Human Lymphoblast Lines. Cancer. Res., 55 (1): 12-15.

▼**M8**

(37) Lorge, E., M. Moore, J. Clements, M. O Donovan, M. Honma, A. Kohara, J. van Benthem, S. Galloway, M.J. Armstrong, V. Thybaud, B. Gollapudi, M. Aardema, J. Kim, A. Sutter, D.J. Kirkland (2015). Standardized Cell Sources and Recommendations for Good Cell Culture Practices in Genotoxicity Testing. (Manuscript in preparation).

(38) Lloyd M. and Kidd D. (2012). The Mouse Lymphoma Assay. Springer Protocols: Methods in Molecular Biology 817, Genetic Toxicology Principles and Methods, ed. Parry and Parry, Humana Press. ISBN, 978-1-61779-420-9, 35-54.

(39) Mei N., Guo X. and Moore M.M. (2014). Methods for Using the Mouse Lymphoma Assay to Screen for Chemical Mutagenicity and Photo-Mutagenicity. In: Optimization in Drug Discover: *In Vitro* Methods: Yan Z and Caldwell(Eds) , 2nd Edition, GW; Humana Press, Totowa, NJ.

(40) Liber H.L. and Thilly W.G. (1982). Mutation Assay at the Thymidine Kinase Locus in Diploidhuman Lymphoblasts. Mutation Res., 94 (2): 467-485.

(41) Coecke, S., Balls, M., Bowe, G., Davis, J., Gstraunthaler, G., Hartung, T., Hay, R., Merten, OW., Price, A., Schechtman, L., Stacey, G. and Stokes, W. (2005). Guidance on Good Cell Culture Practice. A Report of the Second ECVAM Task Force on Good Cell Culture Practice. ATLA, 33 (3): 261-287.

(42) Moore M.M. and Howard B.E. (1982). Quantitation of Small Colony Trifluorothymidine-Resistant Mutants of L5178Y/TK+/- Mouse Lymphoma Cells in RPMI-1640 Medium, Mutation Res., 104 (4-5): 287-294.

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

(44) Maron D.M. and Ames B.N. (1983). Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test. Mutation Res., 113 (3-4): 173-215.

(45) Natarajan, A.T., Tates, A.D, Van Buul, P.P.W., Meijers, M. and De Vogel, N. (1976). Cytogenetic Effects of Mutagens/Carcinogens After Activation in a Microsomal System *In Vitro*, I. Induction of Chromosomal Aberrations and Sister Chromatid Exchanges by Diethylnitrosamine (DEN) and Dimethylnitrosamine (DMN) in CHO Cells in the Presence of Rat-Liver Microsomes. Mutation Res., 37 (1): 83-90.

(46) Matsuoka A., Hayashi M. and Ishidate M. Jr. (1979). Chromosomal Aberration Tests on 29 Chemicals Combined with S9 Mix *In Vitro*. Mutation Res., 66 (3): 277-290.

(47) Ong T.M., *et al.* (1980). Differential Effects of Cytochrome P450-Inducers on Promutagen Activation Capabilities and Enzymatic Activities of S-9 from Rat Liver, J. Environ. *Pathol*. *Toxicol*., 4 (1): 55-65

(48) Elliott, B.M., Combes, R.D., Elcombe, C.R., Gatehouse, D.G., Gibson, G.G., Mackay, J.M. and Wolf, R.C. (1992). Report of UK Environmental Mutagen Society Working Party. Alternatives to Aroclor 1254-Induced S9 in *In Vitro* Genotoxicity Assays. Mutagen., 7 (3): 175-177.

(49) Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. and Sugimura, T. (1976). A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems. In: *In Vitro* Metabolic Activation in Mutagenesis Testing. de Serres F.J., *et al.* (Eds, Elsevier, North-Holland, pp. 85-88.

▼**M8**

(50) Galloway S.M., *et al.* (1994). Report from Working Group on *In Vitro* Tests for Chromosomal Aberrations. Mutation Res., 312 (3): 241-261.

(51) Johnson T.E., Umbenhauer D.R. and Galloway S.M. (1996). Human Liver S-9 Metabolic Activation: Proficiency in Cytogenetic Assays and Comparison with Phenobarbital/Beta-Naphthoflavone or Aroclor 1254 Induced Rat S-9, Environ. Mol. Mutagen., 28 (1): 51-59.

(52) UNEP (2001). Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants, United Nations Environment Programme (UNEP).

(53) Krahn D.F., Barsky F.C. and McCooey K.T. (1982). CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids. In: Genotoxic Effects of Airborne Agents Tice R.R., Costa D.L.and Schaich K.M. (Eds.). New York, Plenum, pp. 91–103.

(54) Zamora, P.O., Benson, J.M., Li, A.P. and 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. Environ. Mutagen., 5 (6): 795-801.

(55) Asakura M., Sasaki T., Sugiyama T., Arito H., Fukushima, S. and Matsushima, T. (2008). An Improved System for Exposure of Cultured Mammalian Cells to Gaseous Compounds in the Chromosomal Aberration Assay. Mutation Res., 652 (2): 122-130.

(56) Arlett C.F., *et al.* (1989). Mammalian Cell Gene Mutation Assays Based upon Colony Formation. V: Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data, Kirkland, D.J. (Ed.), CambridgeUniversity Press, pp. 66-101.

(57) Morita T., Honma M. and Morikawa K. (2012). Effect of Reducing the Top Concentration Used in the *In Vitro* Chromosomal Aberration Test in CHL Cells on the Evaluation of Industrial Chemical Genotoxicity. Mutation Res., 741 (1-2): 32-56.

(58) Brookmire L., Chen J.J. and Levy D.D. (2013). Evaluation of the Highest Concentrations Used in the *In Vitro* Chromosome Aberrations Assay. Environ. Mol. Mutagen., 54 (1): s. 36-43.

(59) USFDA (2012). International Conference on Harmonisation (ICH) Guidance S2 (R1) on Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended For Human Use. Dostupné na webových stránkách: [https://www.federalregister.gov/a/2012-13774].

(60) Honma M. and Hayashi M. (2011). Comparison of *In Vitro* Micronucleus and Gene Mutation Assay Results for P53-Competent Versus P53-Deficient Human Lymphoblastoid Cells. Environ. Mol. Mutagen., 52 (5): 373-384.

(61) Moore-Brown, M.M., Clive, D., Howard, B.E., Batson, A.G. and Johnson, K.O. (1981). The Utilization of Trifluorothymidine (TFT) to Select for Thymidine Kinase-Deficient ($TK^{-/-}$) Mutants from L5178Y/$TK^{+/-}$ Mouse Lymphoma Cells, Mutation Res., 85 (5): 363-378.

(62) Liber H.L., Yandell D.W. and Little J.B. (1989). A Comparison of Mutation Induction at the TK and HRPT Loci in Human Lymphoblastoid Cells; Quantitative Differences are Due to an Additional Class of Mutations at the Autosomal TK locus. Mutation Res., 216 (1): 9-17.

(63) Furth E.E., Thilly, W.G., Penman, B.W., Liber, H.L. and Rand, W.M. (1981). Quantitative Assay for Mutation in Diploid Human Lymphoblasts Using Microtiter Plates. Chem. Biochem., 110 (1): 1-8.

(64) Hayashi, M, Dearfield, K., Kasper, P., Lovell, D., Martus, H. J. and Thybaud, V. (2011). Compilation and Use of Genetic Toxicity Historical Control Data, Mutation Res., 723 (2): 87-90.

▼**M8**

(65) Ryan T.P. (2000). Statistical Methods for Quality Improvement. John Wiley and Sons, New York 2nd Edition.

(66) OECD (2014). Statistical analysis supporting the revision of the genotoxicity Test Guidelines. Environmental, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 199.), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(67) Fleiss J.L., Levin B. and Paik M.C. (2003). Statistical Methods for Rates and Proportions, Third Edition, New York: John Wiley & Sons.

▼M8

Dodatek 1

DEFINICE

Aneugen: Jakákoli chemická látka nebo proces, který v interakci se složkami mitotického a meiotického cyklu buněčného dělení vede k aneuploidii v buňkách nebo organismech.

Aneuploidie: Jakákoli odchylka od normálního diploidního (nebo haploidního) počtu chromozomů o jeden nebo více chromozomů, avšak nikoli o celou sadu (nebo více sad) chromozomů (polyploidie).

Mutageny substituce párů bází: Chemické látky, které způsobují substituci jednoho nebo více párů bází v DNA.

Chemická látka: Látka nebo směs.

Účinnost klonování: Procento buněk kultivovaných v nízké hustotě, které jsou schopny se rozrůst do kolonií, jež mohou být spočítány.

Klastogen: Jakákoli chemická látka nebo proces, které způsobují strukturní chromozomové aberace v populacích buněk nebo organismů.

Cytotoxicita: U zkoušek prováděných podle této zkušební metody se cytotoxicita vyjadřuje jako snížení relativního celkového růstu (RTG) nebo relativního přežití (RS) v testu MLA, respektive TK6.

Přímá mutace: Genová mutace výchozího typu mutované formy, která způsobuje změnu nebo ztrátu enzymatické aktivity nebo funkce kódovaných bílkovin.

Posunové mutageny: Chemické látky, které způsobují adici nebo deleci jednoho nebo více párů bází v molekule DNA.

Genotoxický: Obecný termín zahrnující všechny typy poškození DNA nebo chromozomů včetně jejich rozlámání, přestavby aduktů, mutací, chromozomálních aberací a aneuploidie. Ne všechny druhy genotoxických účinků způsobují mutace nebo stálé poškození chromozomů.

Mitotická rekombinace: Rekombinace mezi homologními chromatidami v průběhu mitózy, v jejímž důsledku může dojít k indukci dvojných zlomů vláken DNA nebo ke ztrátě heterozygotnosti.

Mutagenní: Produkující dědičné změny sekvence (sekvencí) párů bází DNA v genech nebo struktury chromozomů (chromozomové aberace).

Četnost mutací (MF): Počet pozorovaných mutantních buněk dělený počtem životaschopných buněk.

Doba exprese fenotypu: Doba po expozici, během níž v genomu vznikne genetická změna a všechny dříve existující genové produkty vymizí do té míry, že se změní fenotypová vlastnost.

Relativní přežití: Relativní přežití se u TK6 používá jako míra cytotoxicity související s expozicí. Je to relativní účinnost klonování (CE) buněk umístěných na destičky okamžitě po jejich expozici, upravená podle případné ztráty buněk v průběhu expozice v porovnání s účinností klonování u negativní kontroly.

▼M8

Relativní růst v suspenzi (RSG): V testu MLA se relativní celkový dvoudenní růst zkoušené kultury v suspenzi porovná s celkovým dvoudenním růstem negativní kontroly/kontroly s rozpouštědlem v suspenzi (Clive a Spector, 1975). RSG by měl zahrnovat relativní růst zkoušené kultury v porovnání s negativní kontrolou/kontrolou s rozpouštědlem v průběhu expozice.

Relativní celkový růst (RTG): Relativní celkový růst se u MLA používá jako míra cytotoxicity související s expozicí. Je to míra relativního (ke kontrole s vehikulem) růstu zkoušených kultur v průběhu expozice, ve fázi dvoudenní exprese a ve fázi selekce mutantních klonů. RSG každé zkoušené kultury se vynásobí relativní účinností klonování zkoušené kultury v době selekce mutantů a vyjadřuje se ve vztahu k účinnosti klonování negativní kontroly/kontroly s rozpouštědlem (Clive a Spector, 1975).

Jaterní frakce S9: Supernatant homogenátu jater po odstředění při 9 000g, tj. surový jaterní extrakt

Směs S9: Směs jaterní frakce S9 a kofaktorů nezbytných pro metabolickou aktivaci enzymů.

Růst v suspenzi (SG): Násobné zvýšení počtu buněk v průběhu expozice a fáze exprese v testu MLA. SG se vypočítá vynásobením násobného zvýšení v den 1 násobným zvýšením v den 2 u krátkodobé (3 nebo 4 hodiny) expozice. Jestliže se použije 24hodinová expozice, je SG násobné zvýšení v průběhu 24hodinové expozice vynásobené násobným zvýšením v dny exprese 1 a 2.

Kontrola s rozpouštědlem: Obecný termín k označení kontrolních kultur, ke kterým se přidává pouze rozpouštědlo používané k rozpuštění zkoušené chemické látky.

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

Neexponované kontroly: Neexponované/neošetřené kontroly jsou kultury, které se neexponují (tj. ani chemické látce, ani rozpouštědlu), ale zpracovávají se stejným způsobem jako kultury, k nimž se přidává zkoušená chemická látka.

▼M8

Dodatek 2

VZORCE

CYTOTOXICITA

Pro obě verze testu MLA (s použitím agaru i mikrotitračních destiček)

Cytotoxicita je definována jako relativní celkový růst (RTG), který zahrnuje relativní růst v suspenzi (RSG) v průběhu dvoudenní exprese a relativní účinnost klonování (RCE) dosaženou v době selekce mutantů. RTG, RSG a RCE jsou vyjádřeny v procentech.

Výpočet RSG: Růst v suspenzi jedna (SG_1) je rychlost růstu mezi dnem 0 a dnem 1 (koncentrace buněk v den 1 / koncentrace buněk v den 0) a růst v suspenzi dva (SG_2) je rychlost růstu mezi dnem 1 a dnem 2 (koncentrace buněk v den 2 / koncentrace buněk v den 1). RSG je celkový růst SG (SG_1 x SG_2) pro exponovanou kulturu v porovnání s neexponovanou kulturou / kulturou s rozpouštědlem. To znamená: RSG = [$SG_{1(test)}$ x $SG_{2(test)}$] / [$SG_{1(control)}$ x $SG_{2(control)}$] SG_1 se vypočítá z počáteční koncentrace buněk použité na začátku expozice buněk. Zahrnuje to případnou diferenciální cytotoxicitu, k níž dochází ve zkoušené kultuře (kulturách) v průběhu expozice buněk.

RCE je relativní účinnost klonování zkoušené kultury v porovnání s relativní účinností klonování neexponované kontroly / kontroly s rozpouštědlem zjištěné v době selekce mutantů.

Relativní celkový růst (RTG): RTG = RSG x RCE

TK6

RELATIVNÍ PŘEŽITÍ (RS):

Cytotoxicita se hodnotí podle relativního přežití, tj. účinnosti klonování (CE) buněk umístěných na destičky okamžitě po expozici, upravené podle případné ztráty buněk v průběhu expozice v porovnání s účinností klonování u negativních kontrol (s přiřazeným přežitím 100 %). Korekci ztráty buněk v průběhu expozice lze vypočítat jako:

$$\text{Adjusted CE} = \text{CE} \times \frac{\textit{Number of cells at the end of treatment}}{\textit{Number of cells at the beginning of treatment}}$$

Relativní přežití u kultury exponované zkoušené chemické látce se vypočítá jako:

$$RS = \frac{\textit{Adjusted CE in the treated culture}}{\textit{Adjusted CE in the solvent control}} \times 100$$

ČETNOST MUTACÍ PRO MLA I TK6

Četnost mutací (MF) je účinnost klonování kolonií mutací v selektivním médiu (CE_M) upraveno podle účinnosti klonování v neselektivním médiu v době selekce mutací (CE_V). To znamená MF = CE_M / CE_V. Výpočet těchto dvou účinností klonování je popsán níže pro metodu klonování s použitím agaru a metodu s použitím mikrodestiček.

▼**M8**

Verze testu MLA s použitím agaru: Ve verzi testu MLA s použitím měkkého agaru se počet kolonií na destičce pro selekci mutantů (C_M) a počet kolonií na neselektované destičce nebo destičce pro účinnost klonování (životaschopný počet) (C_V) zjistí přímým spočítáním klonů. Když se umístí 600 buněk pro účinnost klonování (CE) na destičky pro selekci mutantů (CE_M) a neselektované destičky nebo destičky pro účinnost klonování (životaschopný počet) (CE_V) a 3 x 10^6 buněk se použije pro selekci mutantů,

$CE_M = C_M / (3 \times 10^6) = (C_M / 3) \times 10^{-6}$

$CE_V = C_V / 600$

Verze testu MLA a TK6 s použitím mikrodestiček: Ve verzi testu MLA s použitím mikrodestiček se hodnoty C_M a C_V určí jako součin celkového počtu mikrodestiček (TW) a pravděpodobného počtu kolonií na jamku (P) na mikrotitračních destičkách.

$C_M = P_M \times TW_M$

$C_V = P_V \times TW_V$

Od nulového výrazu Poissonova rozdělení (Furth et al., 1981) je P dáno vztahem

$P = - \ln (EW / TW)$

kde EW jsou prázdné jamky a TW je celkový počet jamek. Proto,

$CE_M = C_M / T_M = (P_M \times TW_M) / T_M$

$CE_V = C_V / T_V = (P_V \times TW_V) / T_V$

Ve verzi testu MLA s použitím mikrodestiček se četnosti mutací tvořících malé a velké kolonie vypočítají stejným způsobem s použitím příslušného počtu prázdných jamek pro malé a velké kolonie.

V testu TK6 vycházejí četnosti mutací tvořících malé a velké kolonie z časně a pozdně se objevujících mutantů.

▼M8

B.68 **ZKUŠEBNÍ METODA VYUŽÍVAJÍCÍ KRÁTKODOBOU EXPOZICI IN VITRO PRO IDENTIFIKACI i) CHEMICKÝCH LÁTEK VYVOLÁVAJÍCÍCH VÁŽNÉ POŠKOZENÍ OČÍ A ii) CHEMICKÝCH LÁTEK, KTERÉ NENÍ NUTNÉ KLASIFIKOVAT JAKO LÁTKY MAJÍCÍ DRÁŽDIVÉ ÚČINKY NA OČI NEBO VYVOLÁVAJÍCÍ VÁŽNÉ POŠKOZENÍ OČÍ**

ÚVOD

1. Tato zkušební metoda je rovnocenná Pokynu OECD pro zkoušení (TG) č. 491 (2017). Zkušební metoda využívající krátkodobou expozici (STE) je metoda *in vitro*, kterou lze použít za určitých okolností a se specifickými omezeními pro klasifikaci a označování nebezpečnosti chemických látek (látek a směsí), které vyvolávají vážné poškození očí, i chemických látek, které není nutné klasifikovat jako látky vyvolávající vážné poškození očí nebo mající dráždivé účinky na oči, jak je definuje Globálně harmonizovaný systém klasifikace a označování chemických látek (GHS) Organizace spojených národů (OSN) (1) a nařízení Evropské unie (EU) č. 1272/2008 o klasifikaci, označování a balení látek a směsí (nařízení CLP) ([1]).

2. Po řadu let byl potenciál nebezpečnosti chemických látek pro oči posuzován primárně pomocí oční zkoušky *in vivo* na králících (zkušební metoda B.5 (8), ekvivalentní zkušební metodice OECD č. 405). Obecně se uznává, že v dohledné budoucnosti nebude moci žádný alternativní test *in vitro* plně nahradit oční zkoušku na králících *in vivo*, pokud jde o předpověď celé škály závažného poškození očí / dráždivosti u různých tříd chemických látek. Oční zkouška na králících by však mohla být nahrazena strategickou kombinací alternativních zkušebních metod použitých v rámci strategie (odstupňovaného) zkoušení (2). Pro zkoušení chemických látek, u nichž lze na základě stávajících informací očekávat, že budou mít vysoký potenciál dráždivosti nebo že budou vyvolávat závažné poškození očí, je navržen přístup shora dolů. Naopak přístup zdola nahoru je navržen pro zkoušení chemických látek, u nichž lze na základě stávajících informací očekávat, že nebudou působit takové podráždění očí, aby to vyžadovalo klasifikaci. Ačkoli není zkušební metoda STE považována za úplnou náhradu očního testu *in vivo* na králících, je vhodná pro použití jako součást odstupňované strategie zkoušení pro klasifikaci a označování pro regulační účely, například v rámci přístupu shora dolů / zdola nahoru, aby bylo možné určit bez dalšího zkoušení i) chemické látky vyvolávající závažné poškození očí (kategorie 1 podle GHS OSN/CLP) a ii) chemické látky (s výjimkou vysoce těkavých látek a všech pevných chemických látek jiných než povrchově aktivních látek), které nevyžadují klasifikaci jako látky dráždivé pro oči nebo vyvolávající vážné poškození očí (kategorie 2 podle GHS OSN/CLP) (1)(2). U chemické látky, o níž se na základě použití zkušební metody STE nepředpokládá, že vyvolává vážné poškození očí (kategorie 1 podle GHS OSN/CLP) ani není klasifikována jako „bez kategorie podle GHS OSN/CLP“ (nevyvolává vážné poškození očí ani podráždění očí), by však pro stanovení konečné klasifikace bylo nutné další zkoušení. Použití zkušební metody STE v rámci postupu „zdola nahoru“ podle jiných klasifikačních systémů než GHS OSN/CLP by mělo být předem konzultováno s příslušnými regulačními orgány. Výběr nejvhodnější zkušební metody a její použití je třeba posuzovat v souvislosti s Pokynem OECD k integrovanému přístupu ke zkoušení a posuzování vážného poškození očí a podráždění očí (14).

3. Účelem této zkušební metody je popsat postupy používané k hodnocení potenciálních nebezpečných účinků zkoušené chemické látky na oči podle její schopností vyvolávat toxicitu při použití zkušební metody s krátkodobou expozicí. Cytotoxický účinek chemických látek na epitelové buňky rohovky je důležitým

([1]) Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1272/2008 ze dne 16. prosince 2008 o klasifikaci, označování a balení látek a směsí, o změně a zrušení směrnic 67/548/EHS a 1999/45/ES a o změně nařízení (ES) č. 1907/2006, Úř. věst. L 353, 31.12.2008.

▼M8

způsobem účinku (MOA) vedoucím k poškození epitelu rohovky a podráždění očí. Životaschopnost buněk se ve zkušební metodě STE posuzuje kvantitativním měřením po extrakci soli modrého formazanu z buněk produkovaného živými buňkami enzymatickou konverzí vitálního barviva MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium-bromid), které se také nazývá bromthiazolová modř (3). Zjištěná životaschopnost buněk se porovná s kontrolou s rozpouštědlem (relativní životaschopnost) a použije se na odhad potenciální nebezpečnosti zkoušené chemické látky pro oči. Zkoušená chemická látka je klasifikována jako kategorie 1 podle systému GHS OSN/CLP, když je životaschopnost buněk při koncentraci 5 % i 0,05 % menší nebo rovna (≤) 70 %. Naopak, u zkoušené chemické látky lze předpokládat klasifikaci bez kategorie podle systému GHS OSN/CLP, když je životaschopnost buněk při koncentraci 5 % i 0,05 % větší než (>) 70 %.

4. Termín „zkoušená chemická látka“ se v této zkušební metodě používá k označení toho, co se zkouší, a netýká se použitelnosti zkušební metody STE ke zkoušení látek a/nebo směsí. Definice jsou uvedeny v dodatku.

VÝCHOZÍ ÚVAHY A OMEZENÍ

5. Tato zkušební metoda je založena na protokolu, který vyvinula společnost Kao Corporation (4) a který byl validován ve dvou různých studiích: jednu studii provedl validační výbor Japonské společnosti pro alternativy experimentů na zvířatech (JSAAE) (5) a druhou japonské středisko pro validaci alternativních metod (JaCVAM) (6). Vzájemné hodnocení provedl NICEATM/ICCVAM na základě zpráv o validační studii a všeobecných dokumentů o kontrole této zkušební metody (7).

6. Když byla zkušební metoda STE použita pro zjišťování chemických látek (látek a směsí) vyvolávajících vážné poškození očí (kategorie 1 GHS OSN/CLP (1), vykázala data zjištěná u 125 chemických látek (včetně látek i směsí) celkovou přesnost 83 % (104/125), míru falešné pozitivity 1 % (1/86) a míru falešné negativity 51 % (20/39) ve srovnání se zkouškou *in vivo* na očích králíků (7). Zjištěná míra falešné negativity není v této souvislosti kriticky důležitá, protože všechny zkoušené chemické látky, které indukují životaschopnost buněk ≤ 70 % při 5 % koncentraci a > 70 % při 0,05 % koncentraci by byly následně zkoušeny dalšími náležitě validovanými zkouškami *in vitro* nebo jako poslední možnost oční zkouškou *in vivo* na králících, v závislosti na požadavcích právních předpisů a v souladu se strategií postupného zkoušení a podle analýzy průkaznosti výsledků, která je v současnosti doporučena (1)(8). Zkoušeny byly hlavně jednosložkové látky, ačkoli určité omezené množství údajů existuje i o zkoušení směsí. Zkušební metoda je nicméně technicky použitelná i na zkoušení vícesložkových látek a směsí. Před použitím této zkušební metody ke zkoušení směsi za účelem získání údajů pro zamýšlené použití v právních předpisech by však mělo být zváženo, zda tato metoda může pro tento účel poskytnout přiměřené výsledky, a pokud ano, proč je tomu tak. Takové posouzení není nutné, pokud existuje právní požadavek na zkoušení dané směsi. Když byla zkušební metoda STE použita na zjištění chemických látek klasifikovaných jako kategorie 1 GHS OSN, nevykazovala žádné jiné konkrétní nedostatky. Zkoušející by mohli zvážit použití této zkušební metody na všechny zkoušené chemické látky, přičemž životaschopnost buněk ≤ 70 % při koncentraci 5 % i 0,05 % by měla být považována za odpověď indukující vážné poškození očí, které je třeba klasifikovat v kategorii 1 GHS OSN/CLP bez dalšího zkoušení.

▼M8

7. Když byla zkušební metoda STE použita pro zjišťování chemických látek (látek a směsí) nevyžadujících klasifikaci jako látky vyvolávající podráždění očí a závažné poškození očí (tj. bez kategorie GHS OSN/CLP), vykázala data zjištěná u 130 chemických látek (včetně látek i směsí) celkovou přesnost 85 % (110/130), míru falešné negativity 12 % (9/73) a míru falešné pozitivity 19 % (11/57) ve srovnání se zkouškou *in vivo* na očích králíků (7). Pokud se z datového souboru vyloučí vysoce těkavé látky a pevné látky jiné než povrchově aktivní látky, celková přesnost se zlepší na 90 % (92/102), míra falešné negativity na 2 % (1/54) a míra falešné pozitivity na 19 % (9/48) (7). Potenciálním nedostatkem zkušební metody STE použité pro zjištění zkoušených chemických látek, které nevyžadují klasifikaci jako látky vyvolávající podráždění očí a závažné poškození očí (bez kategorie GHS OSN/CLP), tedy je vysoká míra falešné negativity u i) vysoce těkavých látek s tlakem výparů nad 6 kPa a ii) pevných chemických látek (látek a směsí) jiných než povrchově aktivních látek a směsí složených pouze z povrchově aktivních látek. Tyto chemické látky jsou ze sféry použitelnosti zkušební metody STE vyloučeny (7).

8. Kromě chemických látek uvedených v odstavcích 6 a 7 obsahuje datový soubor generovaný pomocí zkušební metody STE také interní údaje o 40 směsích, které při porovnání s Draizovou oční zkouškou *in vivo* vykázaly přesnost 88 % (35/40), míru falešné pozitivity 50 % (5/10) a míru falešné negativity 0 % (0/30) při predikci směsí, které nevyžadují klasifikaci podle klasifikačních systémů GHS OSN/CLP (9). Zkušební metoda STE tedy může být použita pro zjištění směsí klasifikovaných jako směsi bez kategorie GHS OSN/CLP při použití přístupu zdola nahoru s výjimkou pevných směsí jiných než směsí složených pouze z povrchově aktivních látek navíc k jejímu omezení u pevných látek. Dále směsi obsahující látky s tenzí par vyšší než 6 kPa by měly být hodnoceny opatrně, aby nedošlo k případnému podcenění, přičemž každý případ by měl být individuálně odůvodněn.

9. Zkušební metodu STE nelze použít pro identifikaci zkoušených chemických látek klasifikovaných jako látky kategorie 2 GHS OSN/CLP nebo kategorie 2A GHS OSN (podráždění očí) nebo kategorie 2B GHS OSN (mírné podráždění očí), a to vzhledem k značnému počtu chemických látek kategorie 1 GHS OSN/CLP podhodnoceně klasifikovaných v kategorii 2, 2A nebo 2B a látek bez kategorie GHS OSN/CLP nadhodnoceně klasifikovaných v kategorii 2, 2A nebo 2B (7). Pro tento účel může být nezbytné další zkoušení s použitím jiné vhodné metody.

10. Zkušební metoda STE je vhodná pro zkoušené chemické látky, které jsou rozpuštěny nebo rovnoměrně suspendovány po dobu alespoň 5 minut ve fyziologickém roztoku, 5 % dimethylsulfoxidu (DMSO) ve fyziologickém roztoku nebo v minerálním oleji. Zkušební metoda STE není vhodná pro zkoušené chemické látky, které jsou nerozpustné nebo které nelze rovnoměrně suspendovat po dobu alespoň 5 minut ve fyziologickém roztoku, 5 % DMSO ve fyziologickém roztoku nebo v minerálním oleji. Použití minerálního oleje ve zkušební metodě STE je možné vzhledem ke krátkodobé expozici. Zkušební metoda STE je tedy vhodná pro predikci potenciálu nebezpečnosti zkoušených chemických látek nerozpustných ve vodě pro oči (např. mastné alkoholy nebo ketony s dlouhým řetězcem), pokud jsou mísitelné alespoň s jedním ze tří výše uvedených navrhovaných rozpouštědel (4).

▼M8

11. Termín „zkoušená chemická látka“ se v této zkušební metodě používá k označení toho, co se zkouší ([1]), a netýká se použitelnosti zkušební metody STE ke zkoušení látek a/nebo směsí.

PRINCIP ZKOUŠKY

12. Zkušební metoda STE je zkouška *in vitro* založená na cytotoxicitě, která se provádí na konfluentní monovrstvě buněk rohovky králíka (Statens Seruminstitut Rabbit Cornea – SIRC), které se kultivují na 96jamkové polykarbonátové mikrotitrační destičce (4). Po pětiminutové expozici zkoušené chemické látce se pomocí zkoušky MTT kvantitativně změří cytotoxicita jako relativní životaschopnost buněk SIRC (4). Snížená životaschopnost buněk se použije na predikci potenciálních nežádoucích účinků vedoucích k poškození oka.

13. Bylo hlášeno, že 80 % roztoku nakapaného do oka králíka se vyloučí přes spojivkový vak do tří až čtyř minut, zatímco více než 80 % roztoku nakapaného do lidského oka se vyloučí do jedné až dvou minut (10). Zkušební metoda STE se pokouší aproximovat tyto doby expozice a využít cytotoxicitu jako sledovanou vlastnost pro posouzení rozsahu poškození buněk SIRC po pětiminutové expozici zkoušené chemické látce.

PROKÁZÁNÍ ZPŮSOBILOSTI

14. Dříve, než začnou laboratoře rutinně používat zkoušku STE popsanou v této zkušební metodě, měly by prokázat svou odbornou způsobilost správným určením klasifikace jedenácti vhodných látek doporučených v tabulce 1. Tyto látky byly vybrány tak, aby představovaly celý rozsah odpovědí u závažného poškození očí nebo podráždění očí na základě výsledků oční zkoušky *in vivo* na králících (TG 405) a klasifikačního systému GHS OSN (1). Dalšími kritérii výběru bylo, aby látky byly komerčně dostupné, aby k nim byly k dispozici kvalitní referenční údaje *in vivo* a aby existovaly kvalitní údaje *in vitro* ze zkoušky STE (3). V situacích, kdy některá z uvedených látek není k dispozici, lze v odůvodněných případech použít jinou látku, u níž jsou k dispozici odpovídající referenční údaje o použití *in vivo* a *in vitro*, pokud budou použita stejná kritéria jako kritéria zde popsaná.

Tabulka 1

Seznam vhodných látek

Látka	CASRN	Třída chemických látek ([1])	Skupenství	Kat. GHS OSN/ CLP *in vivo* ([2])	Rozpouštědlo ve zkoušce STE	Kat. GHS OSN/ CLP
benzalkoniumchlorid (10 %, vodný)	8 001-54-5	oniová sloučenina	kapalina	kategorie 1	fyziologický roztok	kategorie 1
triton X-100 (100 %)	9 002-93-1	ether	kapalina	kategorie 1	fyziologický roztok	kategorie 1

([1]) V červnu 2013 bylo na společné schůzi dohodnuto, že nyní by měl být v nových a aktualizovaných zkušebních metodách používán výraz „zkoušená chemická látka“ popisující to, co se zkouší, jednotněji.

▼**M8**

Látka	CASRN	Třída chemických látek ([1])	Skupenství	Kat. GHS OSN/ CLP *in vivo* ([2])	Rozpouštědlo ve zkoušce STE	Kat. GHS OSN/ CLP
kyselá červeň 92	18 472-87-2	heterocyklická sloučenina; sloučenina bromu; sloučenina chloru	pevná látka	kategorie 1	fyziologický roztok	kategorie 1
hydroxid sodný	1 310-73-2	zásada; anorganická chemická látka	pevná látka	kategorie 1 ([3])	fyziologický roztok	kategorie 1
butyrolakton	96-48-0	lakton; heterocyklická sloučenina	kapalina	kategorie 2A (kategorie 2 v CLP)	fyziologický roztok	nelze předpovědět
oktan-1-ol	111-87-5	alkohol	kapalina	kategorie 2A/ B ([4])(kategorie 2 v CLP)	minerální olej	nelze předpovědět
cyklopentanol	96-41-3	alkohol; uhlovodík, cyklický	kapalina	kategorie 2A/B ([5]) (kategorie 2 v CLP)	fyziologický roztok	nelze předpovědět
2-ethoxyethyl-acetát	111-15-9	alkohol; ether	kapalina	bez kategorie	fyziologický roztok	bez kategorie
dodekan	112-40-3	uhlovodík, acyklický	kapalina	bez kategorie	minerální olej	bez kategorie
methyl(isobutyl)keton	108-10-1	keton	kapalina	bez kategorie	minerální olej	bez kategorie

▼M8

Látka	CASRN	Třída chemických látek ([1])	Skupenství	Kat. GHS OSN/ CLP *in vivo* ([2])	Rozpouštědlo ve zkoušce STE	Kat. GHS OSN/ CLP
1,1-dimethylguanidin-sulfát	598-65-2	amidin; sloučenina síry	pevná látka	bez kategorie	fyziologický roztok	bez kategorie

([1]) Chemické třídy byly přiřazeny s použitím informací získaných z předchozích publikací NICEATM, a pokud tyto informace nebyly k dispozici, s použitím klasifikačního systému Národní knihovny názvů léků a léčivých látek (MeSH®) (přes ChemIDplus® [National Library of Medicine], k dispozici na http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/), přičemž určení struktury bylo provedeno podle NICEATM.

([2]) Na základě výsledků zkoušky na oku králíka *in vivo* (Pokyn OECD (TG) č. 405) a s použitím GHS OSN/CLP (1).

([3]) Klasifikace jako kategorie 1 vychází z potenciálních leptavých účinků na kůži 100 % hydroxidu sodného (uvedeného na seznamu pokynu OECD TG 435 jako vhodná chemická látka s potenciálními leptavými účinky pro kůži) a z kritéria pro kategorii 1 podle GHS OSN/CLP (1).

([4]) Klasifikace 2A nebo 2B závisí na interpretaci kritéria GHS OSN pro rozlišování mezi těmito dvěma kategoriemi, tj. pro stanovení klasifikace v kategorii 2A jsou nutné 2 ze 6 oproti 4 ze 6 zvířat s účinky v den 7. Datový soubor *in vivo* zahrnoval 2 studie po 3 zvířatech. V jedné studii vykazovala dvě ze tří zvířat účinky v den 7, což si vyžádalo klasifikaci jako kat. 2A (11), zatímco ve druhé studii se všechny sledované vlastnosti u všech tří zvířat vrátily do dne 7 na skóre nula, což odpovídá klasifikaci 2B (12).

([5]) Klasifikace 2A nebo 2B závisí na interpretaci kritéria GHS OSN pro rozlišování mezi těmito dvěma kategoriemi, tj. pro stanovení klasifikace v kategorii 2A jsou nutné 1 ze 3 oproti 2 ze 3 zvířat s účinky v den 7. Studie *in vivo* byla provedena na 3 zvířatech. Všechny sledované vlastnosti kromě zákalu rohovky a zčervenání spojivek u jednoho zvířete se ke dni 7 nebo dříve vrátily zpět na nulovou hodnotu. Toto jedno zvíře, které se ke dni 7 zcela neuzdravilo, mělo skóre zákalu rohovky 1 a skóre zčervenání spojivek 1 (v den 7) a plně se uzdravilo v den 14 (11).

Zkratky: CAS RN = registrační číslo CAS (Chemical Abstracts Service)

POSTUP

Příprava monovrstvy buněk

15. Zkušební metoda STE se používá s buněčnou linií z rohovky králíka SIRC. Doporučuje se, aby byly buňky SIRC pořízeny z kvalifikované buněčné banky, jako je například Americká sbírka typových kultur CCL60.

16. Buňky SIRC se kultivují při teplotě 37 °C ve zvlhčené atmosféře s 5 % CO_2 v kultivační lahvi obsahující kultivační médium, které sestává z Eaglova minimálního esenciálního média (MEM) doplněného 10 % fetálního bovinního séra (FBS), 2 mM L-glutaminu, 50–100 jednotkami/ml penicilinu a 50–100 μg/ml streptomycinu. Buňky, které v kultivační lahvi splynuly, je třeba rozdělit pomocí roztoku trypsinu a kyseliny ethylendiamintetraoctové, s použitím nebo bez použití stěrky. Před použitím k rutinním zkouškám se buňky nechají rozmnožit (např. 2 až 3 pasáže) v kultivační láhvi, přičemž by neměly být pasážovány více než 25krát od rozmrazení.

17. Buňky připravené k použití ke zkoušce STE se poté upraví na vhodnou hustotou a nasadí do 96jamkových destiček. Doporučená hustota nasazování buněk je $6{,}0 \times 10^3$ buněk na jamku, když jsou buňky používány čtyři dny po nasazení, nebo $3{,}0 \times 10^3$ buněk na jamku, když jsou buňky používány pět dnů po nasazení, v 200 μl kultivačního média. Buňky použité ke zkoušce STE, které jsou nasazeny do kultivačního média ve vhodné hustotě, dosáhnou konfluence v době zkoušení více než 80 %, tj. čtyři nebo pět dnů od nasazení.

Aplikace zkoušených chemických látek a kontrolních látek

18. Rozpouštědlem první volby pro ředění nebo rozpuštění chemických látek je fyziologický roztok. Jestliže zkoušená chemická látka vykazuje nízkou rozpustnost nebo ji nelze rozpustit či rovnoměrně suspendovat po dobu

▼M8

alespoň pěti minut ve fyziologickém roztoku, použije se jako rozpouštědlo druhé volby 5 % DMSO (CAS#67-68-5) ve fyziologickém roztoku. Pro zkoušené chemické látky, které nelze rozpustit či rovnoměrně suspendovat po dobu alespoň pěti minut ve fyziologickém roztoku ani v 5 % DMSO ve fyziologickém roztoku, se jako rozpouštědlo třetí volby použije minerální olej (CAS#8042-47-5).

19. Zkoušené chemické látky se rozpustí nebo rovnoměrně suspendují ve zvoleném rozpouštědle na koncentraci 5 % (hmotnostních) a poté se dále ředí postupným desetinásobným ředěním na koncentraci 0,5 % a 0,05 %. Každá zkoušená chemická látka se zkouší v koncentraci 5 % i 0,05 %. Buňky kultivované v 96jamkové mikrotitrační destičce se exponují roztoku (nebo suspenzi) zkoušené chemické látky v množství 200 µl/jamku v koncentraci 5 % nebo 0,05 %, a to po dobu pěti minut při pokojové teplotě. Zkoušené chemické látky (jednosložkové látky nebo vícesložkové látky či směsi) se považují za čisté látky a ředí se nebo suspendují podle této metody bez ohledu na čistotu.

20. Kultivační médium popsané v odstavci 16 se používá jako kontrola s médiem na každé destičce a při každém opakování. Kromě toho se na každé destičce a při každém opakování buňky exponují také vzorkům kontroly s rozpouštědlem. Bylo potvrzeno, že rozpouštědla uvedená v odstavci 18 nemají žádné nežádoucí účinky na životaschopnost buněk SIRC.

21. Ve zkušební metodě STE se na každé destičce a při každém opakování používá jako pozitivní kontrola 0,01 % laurylsíran sodný (SLS) ve fyziologickém roztoku. Aby bylo možné vypočítat životaschopnost buněk u pozitivní kontroly, musí každá destička při každém opakování zahrnovat také kontrolu s rozpouštědlem ve fyziologickém roztoku.

22. Aby bylo možné stanovit kompenzaci pro optickou hustotu, je třeba provést slepou zkoušku, přičemž tato slepá zkouška se provádí na jamkách obsahujících pouze fosfátový pufr, ale žádné kalcium a magnézium (PBS-) nebo buňky.

23. Každý vzorek (zkoušená chemická látka v koncentraci 5 % a 0,05 %, kontrola s médiem, kontrola s rozpouštědlem a pozitivní kontrola) je třeba zkoušet při každém opakování třikrát exponováním buněk 200 µl příslušné zkoušené nebo kontrolní látky po dobu pěti minut při pokojové teplotě.

24. Srovnávací látky jsou účelné pro hodnocení potenciálu podráždění očí neznámými chemickými látkami nebo specifickými třídami chemických látek nebo produktů nebo pro hodnocení relativního potenciálu podráždění látkou s dráždivými účinky na oči ve specifickém rozmezí dráždivých reakcí.

Měření životaschopnosti buněk

25. Po expozici se buňky dvakrát promyjí 200 µl PBS a přidá se 200 µl roztoku MTT (0,5 mg MTT/ml kultivačního média). Po dvouhodinové reakční době v inkubátoru (37 °C, 5 % CO_2) se roztok MTT dekantuje, formazan MTT se extrahuje přidáním 200 µl 0,04 N kyseliny chlorovodíkové v isopropanolu po dobu 60 minut v temnu při pokojové teplotě a pomocí čtečky destiček se změří absorbance roztoku formazanu MTT při 570 nm. K interferenci zkoušených chemických látek s analýzou MTT (barvivy nebo přímými redukčními činidly MTT) dochází pouze, když se ve zkušebním systému ponechá po oplachu po expozici významné množství zkoušené chemické látky, což platí pro 3D tkáně rekonstruované lidské rohovky nebo rekonstruované lidské epidermis, ale neplatí pro 2D buněčné kultury používané pro zkušební metodu STE.

▼M8

Interpretace výsledků a predikční model

26. Poté se použijí hodnoty optické hustoty (OD) dosažené pro každou zkoušenou chemickou látku k výpočtu relativní životaschopnosti buněk vzhledem ke kontrole s rozpouštědlem, která je stanovena na úroveň 100 %. Relativní životaschopnost buněk se vyjadřuje jako procento a zjistí se vydělením optické hustoty zkoušené chemické látky optickou hustotou kontroly s rozpouštědlem po odečtení optické hustoty slepého pokusu od obou hodnot.

$$Cell\ viability(\%) = \frac{(OD_{570}\ of\ test\ chemical) - (OD_{570} of\ blank)}{(OD_{570}\ solvent\ control) - (OD_{570} of\ blank)} \times 100$$

Podobně se relativní životaschopnost buněk každé kontroly s rozpouštědlem vyjadřuje jako procento a zjistí se vydělením optické hustoty každé kontroly s rozpouštědlem optickou hustotou kontroly s médiem po odečtení optické hustoty slepého pokusu od obou hodnot.

27. Měla by být provedena tři nezávislá opakování, přičemž každé zahrnuje tři replikované jamky (tj. n = 9). Aritmetický průměr tří jamek pro každou zkoušenou chemickou látku a kontrolu s rozpouštědlem při každém nezávislém opakování se použije pro výpočet aritmetického průměru relativní životaschopnosti buněk. Ze tří nezávislých opakování se vypočítá konečný aritmetický průměr životaschopnosti buněk.

28. Dále jsou uvedeny hraniční hodnoty životaschopnosti buněk pro identifikaci zkoušených chemických látek vyvolávajících vážné poškození očí (kategorie 1 GHS OSN/CLP) a zkoušených chemických látek, které není nutné klasifikovat jako látky mající dráždivé účinky na oči nebo vyvolávající vážné poškození očí (bez kategorie GHS OSN/CLP).

Tabulka 2

Prediktivní model zkušební metody STE

Životaschopnost buněk		Klasifikace GHS OSN/CLP	Použitelnost
při 5 %	při 0,05 %		
> 70 %	> 70 %	bez kategorie	látky a směsi, s výjimkou: i) vysoce těkavých látek s tlakem výparů nad 6 kPa (1) a ii) pevných chemických látek (látek a směsí) jiných než povrchově aktivních látek a směsí složených pouze z povrchově aktivních látek
≤ 70 %	> 70 %	nelze předpovědět	nepoužije se
≤ 70 %	≤ 70 %	kategorie 1	látky a směsi (2)

(1) Směsi obsahující látky s tlakem výparů vyšším než 6 kPa by měly být hodnoceny opatrně, aby nedošlo k případnému podcenění, přičemž každý případ by měl být individuálně odůvodněn.

(2) Na základě výsledků získaných zejména ze zkoušek jednosložkových látek, ačkoli omezené údaje existují i o zkoušení směsí. Zkušební metoda je nicméně technicky použitelná i na zkoušení vícesložkových látek a směsí. Před použitím této zkušební metody ke zkoušení směsi za účelem získání údajů pro zamýšlené použití v právních předpisech by mělo být zváženo, zda tato metoda může pro tento účel poskytnout přiměřené výsledky, a pokud ano, proč je tomu tak. Takové úvahy nejsou nutné, pokud existuje právní požadavek na zkoušení dané směsi.

▼M8

Kritéria přijatelnosti

29. Výsledky zkoušky se považují za přijatelné, když jsou splněna všechna následující kritéria:

a) Optická hustota kontroly s médiem (exponované kultivačnímu médiu) by měla být po odečtení optické hustoty slepého pokusu 0,3 nebo vyšší.

b) Životaschopnost kontroly s rozpouštědlem by měla být 80 % nebo vyšší ve vztahu ke kontrole s médiem. Pokud se při každém opakování používají kontroly s více rozpouštědly, každá z těchto kontrol by měla vykazovat životaschopnost buněk větší než 80 %, aby byly vhodné pro chemické látky zkoušené těmito rozpouštědly.

c) Životaschopnost buněk zjištěná při pozitivní kontrole (0,01 % SLS) by měla být mezi dvěma směrodatnými odchylkami od historické střední hodnoty. Horní a dolní mez přijatelnosti pro pozitivní kontrolu je třeba často aktualizovat, tj. každé tři měsíce nebo pokaždé, když se přijatelná zkouška vykonává v laboratořích, kde se zkoušky nedělají často (tj. méně než jednou měsíčně). Pokud laboratoř neprovedla dostatečný počet experimentů, aby mohla stanovit statisticky robustní distribuci pozitivních kontrol, je přijatelné, aby byla použita horní a dolní mez přijatelnosti stanovená subjektem, který metodu vyvinul, tj. mezi 21,1 % a 62,3 % podle historických dat laboratoře, přičemž v průběhu prvních rutinních zkoušek se stanoví interní distribuce.

d) Směrodatná odchylka konečné životaschopnosti buněk odvozená ze tří nezávislých opakování by měla být menší než 15 % pro koncentraci 5 % i 0,05 % zkoušené chemické látky.

Není-li jedno nebo několik těchto kritérií splněno, měly by se výsledky zlikvidovat a provést další tři nezávislá opakování.

ÚDAJE A PŘEDKLÁDÁNÍ ZPRÁV

Údaje

30. Vykazují se údaje za každou jednotlivou jamku (např. hodnoty životaschopnosti buněk) z každého opakování, jakož i celková střední hodnota, směrodatná odchylka a klasifikace.

ZÁVĚREČNÁ ZPRÁVA

31. Závěrečná zpráva by měla obsahovat tyto informace:

Zkoušené chemické látky a látky pro kontrolu

— Jednosložková látka: chemická identifikace, např. název (názvy) IUPAC nebo CAS, registrační číslo (čísla) CAS, kód SMILES nebo InChI, strukturní vzorec a/nebo jiné identifikátory,

— vícesložková látka, UVCB a směs: charakterizovaná v co možná největší míře např. chemickou identitou (viz výše), čistotou, kvantitativním výskytem a důležitými fyzikálně-chemickými vlastnostmi (viz výše) složek, v rozsahu, v jakém jsou tyto informace dostupné,

— skupenství, těkavost, pH, logP, molekulová hmotnost, chemická třída a další důležité fyzikálně-chemické vlastnosti podstatné pro provedení studie, a to v rozsahu, v jakém jsou tyto informace dostupné,

▼**M8**

— čistota, případně chemická identita nečistot, je-li to prakticky proveditelné atd.,

— případné ošetření před zkoušením (např. zahřívání, mletí),

— podmínky skladování a stabilita, v rozsahu, v jakém jsou tyto informace dostupné.

Podmínky a postupy zkušební metody

— Jméno a adresa zadavatele, zkušebního zařízení a vedoucího studie,

— popis použité zkušební metody,

— použitá buněčná linie, její zdroj, počet pasáží a konfluence buněk použitých ke zkoušení,

— podrobnosti o použitém zkušebním postupu,

— počet opakování a použitých replik,

— koncentrace zkoušených chemických látek (pokud se liší od doporučených),

— zdůvodnění volby rozpouštědla pro každou zkoušenou chemickou látku,

— délka expozice zkoušené chemické látce (pokud se liší od doporučené),

— popis všech úprav zkušebního postupu,

— popis použitých hodnotících kritérií a kritérií rozhodování,

— odkaz na dosavadní střední hodnoty pozitivních kontrol a směrodatnou odchylku (SD):

— prokázání způsobilosti laboratoře k provádění této zkušební metody (např. zkoušením vhodných látek) nebo prokázání reprodukovatelného provedení této zkušební metody v průběhu doby.

Výsledky

— Pro každou zkoušenou chemickou látku a kontrolní látku a pro každou zkoušenou koncentraci je třeba v tabulkové formě uvést jednotlivé hodnoty optické hustoty každé replikované jamky, aritmetický průměr hodnot optické hustoty pro každé nezávislé opakování, % životaschopnosti buněk pro každé nezávislé opakování a konečný aritmetický průměr % životaschopnosti buněk a směrodatnou odchylku ze tří opakování,

— výsledky z kontroly s médiem, kontroly s rozpouštědlem a pozitivní kontroly prokazující vhodná kritéria přijatelnosti studie,

— popis ostatních pozorovaných účinků,

— celková odvozená klasifikace s odkazem na použitý predikční model / kritéria rozhodování.

▼**M8**

Diskuse o výsledcích

Závěry

LITERATURA

(1) United Nations UN (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Fifth revised edition. New York & Geneva: United Nations Publications. ISBN: 978-92-1-117006-1. Dostupné na webových stránkách: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html.

(2) Scott L, *et al.* (2010). A proposed Eye Irritation Testing Strategy to Reduce and Replace *in vivo* Studies Using Bottom-Up and Top-Down Approaches. *Toxicol. Chem. In Vitro* 24, 1-9.

(3) Mosmann T. (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to 7 Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J. Immunol. Methods* 65, 55-63.

(4) Takahashi Y, *et al.* (2008). Development of the Short Time Exposure (STE) Test: an *In Vitro* Eye Irritation Test Using SIRC Cells. *Toxicol. Chem. In Vitro* 22,760-770.

(5) Sakaguchi H, *et al.* (2011). Validation Study of the Short Time Exposure (STE) Test to Assess the Eye Irritation Potential of Chemicals. *Toxicol. Chem. In Vitro* 25,796-809.

(6) Kojima H, *et al.* (2013). Second-Phase Validation of Short Time Exposure Tests for Assessment of Eye Irritation Potency of Chemicals. *Toxicol. Chem. In Vitro* 27, pp.1855-1869.

(7) ICCVAM (2013). Short Time Exposure (STE) Test Method Summary Review Document, NIH. Dostupné na webových stránkách: [http://www.ntp.niehs.nih.gov/iccvam/docs/ocutox_docs/STE-SRD-NICEATM-508.pdf].

(8) Kapitola B.5 této přílohy: Akutní dráždivé/leptavé účinky na oči.

(9) Saito K, *et al*. (2015). Predictive Performance of the Short Time Exposure Test for Identifying Eye Irritation Potential of Chemical Mixtures.

(10) Mikkelson TJ, Chrai SS and Robinson JR. (1973). Altered Bioavailability of Drugs in the Eye Due to Drug-Protein Interaction. *J. Pharm*. Sci.1648-1653.

(11) ECETOC (1998). Eye Irritation Reference Chemicals Data Bank. Technical Report (No 48. (2)), Brussels, Belgium.

(12) Gautheron P, *et al*. (1992). Bovine Corneal Opacity and Permeability Test: an *In Vitro* Assay of Ocular Irritancy. Fundam Appl *Toxicol.* 18, 442-449.

(13) OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 34). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(14) OECD (2017). Guidance Document on an Integrated Approaches on Testing and Assessment for Serious Eye Damage and Eye irritation. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 263). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

▼M8

Dodatek

DEFINICE

Přesnost: Přesnost shody mezi výsledky zkušební metody a přijatými referenčními hodnotami. Je to míra funkčnosti zkušební metody a jeden z aspektů její relevantnosti. Tento pojem se často používá místo pojmu soulad a rozumí se jím podíl správných výsledků zkušební metody (13).

Srovnávací látka: Látka použitá jako norma pro srovnání se zkoušenou látkou. Srovnávací látka by měla mít tyto vlastnosti: i) nesporný a spolehlivý zdroj (nesporné a spolehlivé zdroje); ii) strukturální a funkční podobnost s třídou zkoušených látek; iii) známé fyzikální/chemické vlastnosti; iv) podpůrné údaje o známých účincích; a v) známou sílu v rozsahu žádoucí reakce.

Přístup „zdola nahoru“: Přístup zkoušení po krocích používaný u zkoušené chemické látky, u níž se předpokládá, že ji není nutné klasifikovat jako látku mající dráždivé účinky na oči nebo vyvolávající vážné poškození očí, který začíná odlišením chemických látek, u nichž není nutná klasifikace (negativní výsledek), od ostatních chemických látek (pozitivní výsledek).

Chemická látka: Látka nebo směs.

Podráždění očí: Vyvolání změny na oku po aplikaci zkoušené chemické látky na přední plochu oka, která je plně vratná do 21 dní od aplikace. Tento pojem je zaměnitelný s výrazy „vratné účinky na oko“ a kategorie 2 GHS OSN/CLP.

Míra falešné negativity: Podíl všech pozitivních chemických látek falešně zjištěných zkušební metodou jako negativní. Je to jeden z ukazatelů výsledku zkušební metody.

Míra falešné pozitivity: Podíl všech negativních chemických látek falešně zjištěných zkušební metodou jako pozitivní. Je to jeden z ukazatelů výsledku zkušební metody.

Nebezpečnost: Základní charakteristika látky nebo situace, která má potenciál vyvolat nepříznivé účinky, jsou-li organismus, systém nebo (sub)populace vystaveny této látce.

Kontrola s médiem: Neošetřená replika, která obsahuje všechny složky zkušebního systému. Tento vzorek se zpracovává se vzorky zkoušené chemické látky a jinými kontrolními vzorky, aby se zjistilo, zda rozpouštědlo vzájemně reaguje se zkušebním systémem.

Směs: Směs nebo roztok složený ze dvou nebo více látek.

Jednosložková látka: Látka definovaná svým kvantitativním složením, v níž je přítomna jedna hlavní složka v míře alespoň 80 % hmot.

MTT: 3–(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyl-2H-tetrazolium-bromid; thiazolylová modř tetrazolium-bromid.

Vícesložková látka: Látka definovaná svým kvantitativním složením, v níž je přítomna více než jedna hlavní složka v koncentraci $\geq$ 10 % hmot. a $<$ 80 % hmot. Vícesložková látka je výsledkem výrobního procesu. Rozdíl mezi směsí a vícesložkovou látkou spočívá v tom, že směs se získá smísením dvou nebo více látek bez chemické reakce. Vícesložková látka je výsledkem chemické reakce.

▼M8

OD: Optická hustota.

Pozitivní kontrola: Replika obsahující všechny složky zkušebního systému a látku, o níž je známo, že způsobuje pozitivní reakci. Aby se zajistilo, že proměnlivost v reakci na pozitivní kontrolu v čase bude možné vyhodnotit, rozsah pozitivní reakce by neměl být nadměrný.

Relevantnost: Popis vztahu zkoušky k účinku, který je předmětem zájmu, a také toho, zda je zkouška smysluplná a použitelná pro konkrétní účel. Vyjadřuje, do jaké míry zkouška správně měří nebo predikuje biologický účinek, který je předmětem zájmu. Relevantnost zahrnuje také posouzení přesnosti (shody) zkušební metody (10).

Spolehlivost: Měření rozsahu, v jakém může být zkušební metoda časem reprodukovatelná v laboratořích a mezi laboratořemi, když se provádí s použitím stejného protokolu. Hodnotí se to výpočtem laboratorní a mezilaboratorní reprodukovatelnosti a laboratorní opakovatelnosti (13).

Citlivost: Podíl všech pozitivních/aktivních chemických látek, které jsou na základě zkoušky správně klasifikovány. Je měřítkem přesnosti zkušební metody, která poskytuje kategorické výsledky, a je důležitým prvkem při hodnocení relevantnosti zkušební metody (10).

Vážné poškození očí: Tvorba poškození tkání v oku nebo závažné fyzikální slábnutí vidění po aplikaci zkoušené látky na přední plochu oka, které není plně vratné do 21 dní od aplikace. Tento pojem je zaměnitelný s výrazy „nevratné účinky na oči“ a kategorie 1 GHS OSN/CLP.

Kontrola s rozpouštědlem/vehikulem: Neošetřený vzorek obsahující všechny složky zkušebního systému, včetně rozpouštědla nebo vehikula, který se zpracovává s exponovanými zkoušenými chemickými látkami a jinými kontrolními vzorky, aby se zjistila základní reakce vzorků zkoušených se zkoušenou chemickou látkou rozpuštěnou ve stejném rozpouštědle nebo vehikulu. Pokud se vzorek zkouší souběžnou kontrolou s médiem, ukazuje také, zda rozpouštědlo nebo vehikulum vzájemně reaguje se zkušebním systémem.

Specifičnost: Podíl všech negativních/neaktivních chemických látek, které jsou na základě zkušební metody správně klasifikovány. Je měřítkem přesnosti zkušební metody, která poskytuje kategorické výsledky, a je důležitým prvkem při hodnocení relevantnosti zkušební metody (13).

Látka: Chemický prvek a jeho sloučeniny v přírodním stavu nebo získané výrobním postupem, včetně jakýchkoliv aditiv potřebných pro zachování stability výrobku a všech nečistot pocházejících z použitého postupu, ale s vyloučením všech rozpouštědel, která je možno oddělit bez ovlivnění stability dané látky nebo změny jejího složení.

Smáčedlo: Nazývané též povrchově aktivní látka, je to chemická látka, jako např. detergent, která je schopna snížit povrchové napětí kapaliny a umožnit jí vytvářet pěnu nebo pronikat do pevných látek; je též známa jako surfaktant.

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

▼M8

Strategie stupňovitého zkoušení: Strategie postupného zkoušení, kde se všechny existující informace o zkoušené chemické látce přezkoumávají ve stanoveném pořadí s použitím postupu váhy důkazů na každém stupni, aby se zjistilo, zda je k dispozici dost informací pro rozhodnutí o klasifikaci nebezpečnosti, než se postoupí do dalšího stupně. Pokud potenciál dráždivých účinků zkoušené chemické látky lze určit na základě existujících informací, další zkoušení není nutné. Jestliže potenciál dráždivých účinků zkoušené látky nelze určit na základě existujících informací, použije se stupňovitý postupný postup zkoušení na zvířatech po krocích, dokud se nestanoví jednoznačná klasifikace.

Přístup „shora dolů“: Přístup zkoušení po krocích používaný u zkoušených chemických látek, u nichž se předpokládá, že způsobují vážné poškození očí, který začíná odlišením chemických látek vyvolávajících vážné poškození očí (pozitivní výsledek) od jiných chemických látek (negativní výsledek).

Globálně harmonizovaný systém klasifikace a označování chemických látek Organizace spojených národů (GHS OSN): Systém navrhující klasifikaci látek a směsí podle standardizovaných typů a úrovní fyzikálních, zdravotních a environmentálních nebezpečí a řešící příslušné komunikační prvky, jako jsou piktogramy, signální slova, výroky o nebezpečí, výroky o bezpečnostních opatřeních a bezpečnostní datové listy, které obsahují informace o jejich nežádoucích účincích s ohledem na ochranu lidí (včetně zaměstnavatelů, pracovníků, přepravců, spotřebitelů a osob reagujících na havárie) a životního prostředí (1).

Kategorie 1 GHS OSN/CLP: Viz „vážné poškození očí“.

Kategorie 2 GHS OSN/CLP: Viz „dráždivé účinky na oči“.

Bez kategorie GHS OSN/CLP: Chemické látky, které nesplňují požadavky na klasifikaci v kategorii 1 nebo 2 GHS OSN/CLP (nebo 2A nebo 2B GHS OSN).

UVCB: látky s neznámým nebo proměnlivým složením, komplexní reakční produkty nebo biologický materiál.

▼M8

B.69 **ZKUŠEBNÍ METODA S POUŽITÍM REKONSTRUOVANÉHO EPITELU PODOBNÉHO LIDSKÉ ROHOVCE (RhCE) PRO STANOVENÍ CHEMICKÝCH LÁTEK, KTERÉ NEVYŽADUJÍ KLASIFIKACI A OZNAČENÍ JAKO LÁTKY MAJÍCÍ DRÁŽDIVÉ ÚČINKY NA OČI NEBO VYVOLÁVAJÍCÍ VÁŽNÉ POŠKOZENÍ OČÍ**

ÚVOD

1. Tato zkušební metoda je rovnocenná Pokynu OECD pro zkoušení (TG) č. 492 (2017). *Vážné poškození očí* znamená vznik poškození tkáně oka nebo závažné zhoršení zraku po aplikaci zkoušené chemické látky na přední plochu oka, které není plně vratné do 21 dnů po aplikaci, jak je definováno v globálně harmonizovaném systému klasifikace a označování chemických látek (GHS) OSN) (1) a v nařízení Evropského unie (EU) č. 1272/2008 o klasifikaci, označování a balení látek a směsí (CLP) ([1]). Rovněž podle GHS OSN a CLP znamená *podráždění očí* vznik změn na oku po aplikaci zkoušené chemické látky na přední plochu oka, které jsou plně vratné do 21 dní od aplikace. Zkoušené chemické látky vyvolávající vážné poškození oka jsou klasifikovány jako látky kategorie 1 GHS OSN a CLP, zatímco zkoušené chemické látky vyvolávající podráždění oka jsou klasifikovány jako kategorie 2 GHS OSN a CLP. Zkoušené chemické látky, které nejsou klasifikovány jako látky mající dráždivé účinky na oči nebo vyvolávající vážné poškození očí, jsou definovány jako chemické látky, které nesplňují požadavky pro klasifikaci v kategorii 1 nebo 2 (2A nebo 2B) GHS OSN a CLP, tj. označují se jako chemické látky bez kategorie GHS OSN a CLP.

2. Posuzování vážného poškození oka / podráždění oka bylo obvykle prováděno na pokusných zvířatech (zkušební metoda B.5 (2)). Výběr nejvhodnější zkušební metody a její použití je třeba posuzovat v souvislosti s Pokynem OECD k integrovanému přístupu ke zkoušení a posuzování vážného poškození očí a podráždění očí (39).

3. Tato zkušební metoda popisuje postup *in vitro*, který umožňuje určení chemických látek (látek a směsí), které nevyžadují klasifikaci a označení jako látky vyvolávající podráždění oka nebo vážné poškození oka podle systému GHS OSN a nařízení CLP. Využívá rekonstruovaného epitelu podobného lidské rohovce (RhCE), který věrně napodobuje histologické, morfologické, biochemické a fyziologické vlastnosti epitelu lidské rohovky. Byly validovány čtyři další zkušební metody *in vitro*, které jsou považovány za vědecky platné a byly přijaty jako zkušební metody B.47 (3), B.48 (4), B.61 (5) a B.68 (6) pro zkoumání účinků na lidské zdraví, a to vážného poškození oka / podráždění oka.

4. Tato zkušební metoda zahrnuje dvě validované zkoušky využívající komerčně dostupné modely RhCE. Validační studie k posouzení podráždění oka / vážného poškození oka byly provedeny (7)(8)(9)(10)(11)(12)(13) s použitím zkoušek na podráždění oka (EIT) EpiOcular™ a SkinEthic™ Human Corneal Epithelium (HCE). Každá z těchto zkoušek, které se

([1]) Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1272/2008 ze dne 16. prosince 2008 o klasifikaci, označování a balení látek a směsí, o změně a zrušení směrnic 67/548/EHS a 1999/45/ES a o změně nařízení (ES) č. 1907/2006, Úř. věst. L 353, 31.12.2008, s. 1.

▼M8

v dalším textu nazývají validované referenční metody – VRM 1 respektive VRM2, využívá jako zkušební systém komerčně dostupné tkáňové konstrukce RhCE. Na základě těchto validačních studií a jejich nezávislého vzájemného hodnocení (9)(12) byl vyvozen závěr, že zkoušky na podráždění oka EpiOcular™ EIT a SkinEthic™ HCE dokážou správně určit chemické látky (látky i směsi), které nevyžadují klasifikaci a označení jako látky vyvolávající podráždění oka nebo vážné poškození oka podle GHS OSN, a tyto zkoušky byly doporučeny jako vědecky platné pro tento účel (13).

5. V současnosti se obecně uznává, že v dohledné budoucnosti nebude moci žádný alternativní test *in vitro* plně nahradit Draizeovu oční zkoušku *in vivo* (2)(14), pokud jde o předpověď celé škály závažného poškození očí/dráždivosti u různých tříd chemických látek. Draizeova oční zkouška (15) by však mohla být zcela nahrazena strategickými kombinacemi několika alternativních zkušebních metod v rámci strategií (odstupňovaného) zkoušení, jako je přístup zdola nahoru / shora dolů. Postup „zdola nahoru“ (15) má být použit, pokud se na základě existujících informací očekává, že chemická látka nevyvolává tak intenzivní podráždění oka, aby vyžadovala klasifikaci, zatímco postup „shora dolů“ (15) se má použít, jestliže se na základě existujících informací předpokládá, že chemická látka vyvolává závažné poškození oka. Zkoušky na podráždění oka EpiOcular™ EIT a SkinEthic™ HCE se doporučují použít k identifikaci chemických látek, které není nutné klasifikovat jako látky mající dráždivé účinky na oči nebo vyvolávající vážné poškození očí podle systému GHS OSN (bez kategorie), bez dalšího zkoušení, a to v rámci strategie zkoušení, jako je přístup zdola nahoru, jak navrhuje Scott *et al.*, například jako první krok v přístupu zdola nahoru nebo jako jeden z posledních kroků v přístupu shora dolů (15). Zkoušky na podráždění oka EpiOcular™ EIT a SkinEthic™ HCE však nejsou určeny pro rozlišení látek kategorie 1 GHS OS/CLP (vážné poškození oka) od látek kategorie 2 GHS OS/CLP (podráždění oka). Toto rozlišení bude třeba řešit dalším stupněm strategie zkoušení (15). Zkoušená chemická látka, která je pomocí zkoušek na podráždění oka EpiOcular™ EIT nebo SkinEthic™ HCE určena jako látka vyžadující klasifikaci z důvodu podráždění oka / vážného poškození oka, tedy bude vyžadovat další zkoušení (*in vitro* anebo *in vivo*), aby bylo možné stanovit konečný závěr (bez kategorie, kategorie 2 nebo kategorie 1 GHS OSN/CLP), a to pomocí např. zkušební metody B.47, B.48, B.61 nebo B.68.

6. Účelem této zkušební metody je popsat postup používaný k hodnocení potenciálních nebezpečných účinků zkoušené chemické látky na oči podle její schopnosti vyvolávat toxicitu v tkáňové konstrukci RhCE, měřenou analýzou MTT (16) (viz odstavec 21). Životaschopnost tkáně RhCE po expozici zkoušené chemické látce se určuje porovnáním s tkáněmi ošetřenými negativní kontrolní látkou (% životaschopnosti) a poté se používá k predikci potenciální nebezpečnosti zkoušené chemické látky pro oko.

7. K dispozici jsou standardy funkčnosti (17), které usnadní validaci nových nebo pozměněných zkoušek *in vitro* využívajících RhCE, obdobných zkouškám na podráždění oka EpiOcular™ EIT a SkinEthic™ HCE, v souladu se zásadami pokynu OECD č. 34 (18), a které umožní včas provést změnu pokynu OECD pro zkoušení č. 492, aby do něj mohly být zahrnuty. Vzájemné uznávání údajů bude podle postupu dohodnutého v rámci OECD zaručeno pouze u zkušebních metod validovaných podle těchto standardů funkčnosti, pokud tyto zkoušky byly podrobeny revizi a pokud je OECD zahrnula do odpovídajícího pokynu ke zkoušení.

DEFINICE

8. Definice jsou uvedeny v dodatku 1.

▼M8

VÝCHOZÍ ÚVAHY A OMEZENÍ

9. Tato zkušební metoda vychází z komerčních trojrozměrných tkáňových konstrukcí RhCE, které se vyrábějí s využitím primárních lidských epidermálních keratinocytů (tj. EpiOcular™ OCL-200), nebo imortalizovaných lidských buněk epitelu rohovky (tj. SkinEthic™ HCE/S). Tkáňové konstrukce EpiOcular™ OCL-200 a SkinEthic™ HCE/S RhCE jsou podobné trojrozměrné struktuře rohovkového epitelu *in vivo* a vyrábějí se s použitím buněk zájmových druhů (19)(20). Tyto zkoušky navíc přímo měří cytotoxicitu v důsledku průniku chemické látky přes rohovku a vznik poškození buněk a tkání; cytotoxická odpověď poté určuje celkový výsledek vážného poškození oka / podráždění oka *in vivo*. K poškození buněk může dojít několika způsoby účinku (viz odstavec 20), ale cytotoxicita hraje důležitou, pokud ne primární, mechanistickou roli při určování celkové odpovědi na působení chemické látky ve formě poškození oka / podráždění oka, které se projevuje *in vivo* zejména zákalem rohovky, iritidou, zarudnutím spojivek anebo chemózou spojivek bez ohledu na fyzikálně chemické procesy, které jsou příčinou poškození tkáně.

10. Ve validační studii k této zkušební metodě byla zkoušena široká škála chemických látek zahrnujících nejrůznější chemické druhy, chemické třídy, molekulové hmotnosti, logP, chemické struktury atd. Validační databáze zkoušky na podráždění oka EpiOcular™ obsahovala celkem 113 chemických látek zahrnujících 95 různých organických funkčních skupin podle analýzy OECD QSAR (8). Většina těchto chemických látek představovala jednosložkové látky, ale do studie bylo zařazeno také několik vícesložkových látek (včetně 3 homopolymerů, 5 kopolymerů a 10 kvazipolymerů). Z hlediska skupenství a kategorií GHS OSN/CLP bylo 113 zkoušených chemických látek rozděleno takto: 13 kapalin kategorie 1, 15 pevných látek kategorie 1, 6 kapalin kategorie 2A, 10 pevných látek kategorie 2A, 7 kapalin kategorie 2B, 7 pevných látek kategorie 2B, 27 kapalin bez kategorie a 28 pevných látek bez kategorie (8). Validační databáze zkoušky na podráždění oka SkinEthic™ HCE obsahovala celkem 200 chemických látek zahrnujících 165 různých organických funkčních skupin (8)(10)(11). Většina těchto chemických látek představovala jednosložkové látky, ale do studie bylo zařazeno také několik vícesložkových látek (včetně 10 polymerů). Z hlediska skupenství a kategorií GHS OSN/CLP bylo 200 zkoušených chemických látek rozděleno takto: 27 kapalin kategorie 1, 24 pevných látek kategorie 1, 19 kapalin kategorie 2A, 10 pevných látek kategorie 2A, 9 kapalin kategorie 2B, 7 pevných látek kategorie 2B, 50 kapalin bez kategorie a 53 pevných látek bez kategorie (10)(11).

11. Tato zkušební metoda je použitelná pro látky a směsi a pro pevné látky, kapaliny, polotuhé látky a vosky. Kapaliny mohou být vodné či nevodné; pevné látky mohou být ve vodě rozpustné či nerozpustné. Pevné látky by měly být pokud možno před aplikací rozemlety na jemný prášek; žádná další předběžná úprava vzorku není vyžadována. Plyny a aerosoly nebyly ve validační studii hodnoceny. Ačkoli není jejich zkoušení postupem za použití techniky RhCE teoreticky vyloučeno, současná zkušební metoda zkoušení plynů a aerosolů neumožňuje.

12. Zkoušené chemické látky absorbující světlo ve stejném pásmu jako formazan MTT (přirozeně nebo po expozici) a zkoušené chemické látky schopné přímé redukce vitálního barviva MTT (na formazan MTT) mohou interferovat s měřením životaschopnosti tkání, proto je třeba pro korekce použít upravené kontroly. Druh upravených kontrol, které mohou být potřebné, se bude lišit v závislosti na druhu interference vyvolané zkoušenou chemickou látkou a na postupu použitém pro kvantifikaci formazanu MTT (viz odstavce 36–42).

▼**M8**

13. Výsledky získané v předběžné validační studii (21)(22) a v plné validační studii (8)(10)(11) prokázaly, že obě zkoušky na podráždění oka EpiOcular™ EIT i SkinEthic™ HCE jsou přenosné do laboratoří, které doposud tyto analýzy neprováděly, a také že jsou reprodukovatelné v rámci laboratoře i mezi laboratořemi. Podle těchto studií je míra reprodukovatelnosti z hlediska shody předpovědí, které lze od zkoušky na podráždění oka EpiOcular™ očekávat na základě údajů o 113 chemických látkách, řádově 95 % v rámci laboratoří a 93 % mezi laboratořemi. Míra reprodukovatelnosti z hlediska shody předpovědí, které lze očekávat od zkoušky na podráždění oka SkinEthic™ HCE na základě údajů o 120 chemických látkách, je řádově 92 % v rámci laboratoří a 95 % mezi laboratořemi.

14. Zkoušku na podráždění oka EpiOcular™ lze použít k identifikaci chemických látek, které není nutné klasifikovat jako látky mající dráždivé účinky na oči nebo vyvolávající vážné poškození očí podle klasifikačního systému GHS OSN a CLP. Podle údajů získaných ve validační studii (8) má zkouška na podráždění oka EpiOcular™ celkovou přesnost 80 % (podle 112 chemických látek), citlivost 96 % (podle 57 chemických látek), míru falešné negativity 4 % (podle 57 chemických látek), specifičnost 63 % (podle 55 chemických látek) a míru falešné pozitivity 37 % (podle 55 chemických látek) při porovnání s údaji z referenční oční zkoušky *in vivo* na králících (zkušební metoda B.5) (2)(14) klasifikovaných podle klasifikačního systému GHS OSN a CLP. Studie, v níž bylo zkoušeno 97 kapalných agrochemických přípravků ve zkoušce na podráždění oka EpiOcular™, prokázala podobnou výkonnost zkušební metody u tohoto druhu směsí, jaká byla získána ve validační studii (23). 97 přípravků bylo rozděleno takto: 21 kategorie 1, 19 kategorie 2A, 14 kategorie 2B a 43 bez kategorie, klasifikováno podle klasifikačního systému GHS OSN na základě údajů z referenční oční zkoušky *in vivo* na králících (zkušební metoda B.5) (2)(14). Byla dosažena celková přesnost 82 % (podle 97 přípravků), citlivost 91 % (podle 54 přípravků), míra falešné negativity 9 % (podle 54 přípravků), specifičnost 72 % (podle 43 přípravků) a míra falešné pozitivity 28 % (podle 43 přípravků) (23).

15. Zkoušku na podráždění očí SkinEthic™ HCE lze použít k identifikaci chemických látek, které není nutné klasifikovat jako látky mající dráždivé účinky na oči nebo vyvolávající vážné poškození očí podle klasifikačního systému GHS OSN a CLP. Podle údajů získaných ve validační studii (10)(11) má zkouška na podráždění oka SkinEthic™ HCE celkovou přesnost 84 % (podle 200 chemických látek), citlivost 95 % (podle 97 chemických látek), míru falešné negativity 5 % (podle 97 chemických látek), specifičnost 72 % (podle 103 chemických látek) a míru falešné pozitivity 28 % (podle 103 chemických látek) při porovnání s údaji z referenční oční zkoušky *in vivo* na králících (zkušební metoda B.5) (2)(14) klasifikovaných podle klasifikačního systému GHS OSN a CLP.

16. Míry falešné negativity zjištěné u obou zkoušek RhCE u látek nebo směsí spadají do 12 % celkové pravděpodobnosti, že chemické látky jsou při opakovaných testech v Draizově oční zkoušce *in vivo* identifikovány jako kategorie 2 podle GHS OSN a CLP nebo bez kategorie podle GHS OSN a CLP; je to způsobeno inherentní variabilitou metody v rámci zkoušky (24). Míry falešné pozitivity zjištěné u obou zkušebních metod RhCE u látek nebo směsí nejsou u této zkušební metody zásadně důležité, neboť všechny zkoušené chemické látky, které vykazují životaschopnost tkáně rovnou nebo nižší než stanovené mezní hodnoty (viz odstavec 44), budou vyžadovat další zkoušení pomocí jiných zkušebních metod *in vitro* nebo jako poslední možnost zkoušku na králících, v závislosti na požadavcích právních předpisů, s využitím strategie postupného zkoušení v rámci přístupu založeného na průkazných důkazech. Tyto zkušební metody lze použít pro všechny

▼M8

druhy chemických látek, přičemž negativní výsledek by měl být uznán pro neklasifikování chemické látky jako látky mající dráždivé účinky na oči a vyvolávající vážné poškození očí (bez kategorie GHS OSN a CLP). Použití zkoušek na podráždění oka EpiOcular™ a SkinEthic™ HCE podle jiných klasifikačních systémů než GHS OSN/CLP by mělo být předem konzultováno s příslušnými regulačními orgány.

17. Omezení této zkušební metody spočívá v tom, že neumožňuje rozlišit mezi podrážděním oka / vratnými účinky na oko (kategorie 2) a vážným poškozením oka / nevratnými účinky na oko (kategorie 1) podle definice GHS OSN a CLP, ani mezi látkami vyvolávajícími podráždění oka (volitelná kategorie 2A) a látkami vyvolávajícími mírné podráždění oka (volitelná kategorie 2B) podle definice GHS OSN (1). Pro tyto účely je nutné další zkoušení s použitím jiných zkušebních metod *in vitro*.

18. Termín „zkoušená chemická látka“ se v této zkušební metodě používá k označení toho, co se zkouší, ([1]) a netýká se použitelnosti zkušební metody RhCE ke zkoušení látek a/nebo směsí.

PRINCIP ZKOUŠKY

19. Zkoušená chemická látka se aplikuje lokálně na minimálně dvě trojrozměrné konstrukce tkáně RhCE a po expozici a inkubační době po ošetření se změří životaschopnost tkáně. Tkáně RhCE jsou rekonstruovány z primárních lidských epidermálních keratinocytů nebo lidských imortalizovaných buněk epitelu rohovky, které byly kultivovány po několik dnů, aby vytvořily stratifikovaný, vysoce diferencovaný dlaždicový epitel morfologicky podobný epitelu, který se nachází v lidské rohovce. Tkáňová konstrukce EpiOcular™ RhCE sestává alespoň ze 3 životaschopných vrstev buněk a nekeratinizovaného povrchu vykazujícího strukturu podobnou rohovce, která je analogická struktuře *in vivo*. Tkáňová konstrukce SkinEthic™ HCE RhCE sestává alespoň ze 4 životaschopných vrstev buněk, včetně cylindrických bazálních buněk, přechodových křídlových buněk a povrchových dlaždicových buněk, podobných buňkám normálního lidského epitelu rohovky (20) (26).

20. Chemicky vyvolané vážné poškození očí / podráždění očí, které se projevuje *in vivo* zejména zákalem rohovky, iritidou, zarudnutím spojivek anebo chemózou spojivek, je výsledkem kaskády událostí, která začíná proniknutím chemické látky přes rohovku anebo spojivku a vznikem poškození buněk. K poškození buněk může dojít několika způsoby účinku, včetně: lýzy buněčné membrány (např. působením povrchově aktivních látek, organických rozpouštědel); koagulace makromolekul (zejména bílkovin) (např. působením povrchově aktivních látek, organických rozpouštědel, alkalických látek a kyselin); saponifikace lipidů (např. působením alkalických látek); a alkylace nebo jiných kovalentních interakcí s makromolekulami (např. působením bělidel, peroxidů a alkylačních látek) (15)(27)(28). Bylo však prokázáno, že cytotoxicita hraje důležitou, pokud ne hlavní, mechanistickou roli při určování celkové odpovědi na působení chemické látky ve formě poškození oka / podráždění oka bez ohledu na fyzikálně chemické procesy, které jsou příčinou poškození tkáně (29)(30). Kromě toho potenciál chemické látky vyvolat vážné poškození oka / podráždění oka je v zásadě určen rozsahem počátečního poranění (31), které koreluje s rozsahem

([1]) V červnu 2013 bylo na společné schůzi OECD dohodnuto, že nyní by měl být v nových a aktualizovaných pokynech OECD ke zkoušení používán výraz „zkoušená chemická látka“ popisující to, co se zkouší, jednotněji.

▼M8

odumření buněk (29) a s rozsahem následných odpovědí a konečných výsledků (32). Slabě dráždivé látky tak obvykle zasáhnou pouze povrchový epitel rohovky, mírně a středně dráždivé látky poškozují zásadně epitel a povrchové vrstvy stromatu a silně dráždivé látky poškozují epitel, hluboké vrstvy stromatu a někdy i endotel rohovky (30)(33). Měření životaschopnosti tkáňové konstrukce RhCE po lokální expozici zkoušené chemické látce za účelem určení chemických látek, které nevyžadují klasifikaci jako látky vyvolávající vážné poškození oka / podráždění oka (bez kategorie podle GHS OSN a CLP), vychází z předpokladu, že všechny chemické látky vyvolávající vážné poškození oka nebo podráždění oka vyvolají cytotoxicitu v epitelu rohovky anebo ve spojivce.

21. Životaschopnost tkáně RhCE se klasicky měří enzymatickou přeměnou vitálního barviva MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyl-2H-tetrazolium-bromid; thiazolylová modř tetrazolium-bromid; číslo CAS 298–93-1] vitálními buňkami tkáně na sůl modrého formazanu MTT, jehož množství se změří po extrakci z tkání (16). Chemické látky, které nevyžadují klasifikaci a označení podle GHS OSN / CLP (bez kategorie), se určují jako látky, které nesnižují životaschopnost tkáně pod stanovenou mez (tj. životaschopnost tkáně > 60 % ve zkouškách EpiOcular™ EIT a SkinEthic™ HCE EITL ([1]), nebo > 50 % ve zkouškách na dráždění oka SkinEthic™ HCE EITS ([2])) (viz odstavec 44).

PROKÁZÁNÍ ZPŮSOBILOSTI

22. Dříve než začnou laboratoře rutinně používat zkoušky RhCE pro regulační účely, měly by prokázat svou odbornou způsobilost správnou predikcí patnácti vhodných chemických látek uvedených v tabulce 1. Tyto chemické látky byly vybrány z chemických látek použitých ve validačních studiích validovaných referenčních metod (8)(10)(11). Výběr zahrnuje pokud možno chemické látky, které: i) zahrnují různá skupenství; ii) celý rozsah odpovědí *in vivo* na vážné poškození očí / podráždění očí na základě kvalitních výsledků získaných v referenční oční zkoušce *in vivo* na králících (zkušební metoda B.5) (2)(14) a klasifikačního systému GHS OSN (tj. kategorie 1, 2A, 2B nebo bez kategorie) (1) a klasifikačního systému CLP (tj. kategorie 1, 2 nebo bez kategorie); iii) zahrnují různé faktory *in vivo* důležité pro klasifikaci (24)(25); iv) jsou charakteristické pro chemické třídy použité ve validační studii (8)(10)(11); v) zahrnují správné a široké zastoupení organických funkčních skupin (8)(10)(11); vi) mají chemické struktury, které jsou dobře definovány (8)(10)(11); vii) jsou zabarvené anebo přímo redukují MTT; viii) mají reprodukovatelné výsledky ve zkušebních metodách RhCE v průběhu validace; ix) byly správně predikovány zkušebními metodami RhCE v průběhu validace; x) zahrnují celý rozsah odpovědí *in vitro* na základě kvalitních údajů ze zkušebních metod RhCE (0 až 100 % životaschopnost); xi) jsou komerčně dostupné; a xii) nejsou spojeny s příliš vysokými pořizovacími náklady a/nebo náklady na likvidaci odpadu. V situacích, kdy uvedená chemická látka není k dispozici nebo ji nelze použít z jiných oprávněných důvodů, může být použita jiná chemická látka splňující výše popsaná kritéria, např. některá z chemických látek použitých při validaci validované referenční metody. Tyto změny by však měly být odůvodněny.

([1]) EITL: zkouška na podráždění oka pro kapaliny v případě SkinEthic™ HCE.
([2]) EITS: zkouška na podráždění oka pro pevné látky v případě SkinEthic™ HCE.

▼**M8**

Tabulka 1

Seznam vhodných chemických látek

Chemický název	CASRN	Organická funkční skupina ([1])	Skupenství	Životaschopnost VRM1 (%) ([2])	Životaschopnost VRM2 (%) ([3]) Předpověď VRM	Redukční činidlo MTT	Barevná interf.	Kategorie *in vivo* 1 ([4])
Methylthioglykolát								
2 365-48-2	ester kyseliny karboxylové; thioalkohol	K	10,9 ± 6,4	5,5 ± 7,4	nelze předpovědět	A (silně)	N	Hydroxyethylakrylát
818-61-1	akrylát;	alkohol	K	7,5 ± 4,7 ([5])	1,6 ± 1,0	nelze předpovědět	N	N
2,5-dimethyl-2,5-hexandiol	110-03-2	alkohol	PL	2,3 ± 0,2	0,2 ± 0,1	nelze předpovědět	N	N
Šťavelan sodný	62-76-0	kyselina oxokarboxylová	S	29,0 ± 1,2	5,3 ± 4,1	nelze předpovědět	N	N
Kategorie in vivo 2A ([4])								
2,4,11,13-tetraazatetradekan-diimidamid, N,N″-bis(4-chlorofenyl)-3,12-diimino-, di-D-glukonát (20 %, vodný) ([6])	18 472-51-0	aromatický heterocyklický halogenid; arylhalogenid; dihydroxylová skupina; guanidin	K	4,0 ± 1,1	1,3 ± 0,6	nelze předpovědět	N	A (slabě)
Benzoan sodný	532-32-1	aryl; karboxylová kyselina	PL	3,5 ± 2,6	0,6 ± 0,1	nelze předpovědět	N	N
***Kategorie in vivo* 2B** ([4])								
Diethyl-toluamid	134-62-3	benzamid	K	15,6 ± 6,3	2,8 ± 0,9	nelze předpovědět	N	N
2,2-dimethyl-3-methylenebicyklo [2.2.1] heptan	79-92-5	alkan, rozvětvený s terciárním uhlíkem; alken; bicykloheptan; můstky propojené cyklické uhlovodíky; cykloalkan	PL	4,7 ± 1,5	15,8 ± 1,1	nelze předpovědět	N	N
Bez kategorie in vivo ([4])								
1-ethyl-3-methylimidazol ethylsufát	3425 73-75-5	alkoxy; amonná sůl; aryl; imidazol; síran	K	79,9 ± 6,4	79,4 ± 6,2	bez kat.	N	N

▼**M8**

Chemický název	CASRN	Organická funkční skupina ([1])	Skupenství	Životaschopnost VRM1 (%) ([2])	Životaschopnost VRM2 (%) ([3]) Předpověď VRM	Redukční činidlo MTT	Barevná interf.	Kategorie *in vivo* 1 ([4])
Dikaprylylether	629-82-3	alkoxy; ether	K	97,8 ± 4,3	95,2 ± 3,0	bez kat.	N	N
Piperonylbutoxid	51-03-6	alkoxy; benzodioxol; benzyl; ether	K	104,2 ± 4,2	96,5 ± 3,5	bez kat.	N	N
Polyethylenglykol (PEG-40) hydrogenovaný ricinový olej	61788-85-0	acylal; alkohol; allyl; ether	viskózní	77,6 ± 5,4	89,1 ± 2,9	bez kat.	N	N
1-(4-chlorfenyl)-3-(3,4-dichlorfenyl) močovina	101-20-2	aromatický heterocyklický halogenid; arylhalogenid; deriváty močoviny	PL	106,7 ± 5,3	101,9 ± 6,6	bez kat.	N	N
2,2′-methylen-bis-[6-(2H-benzotriazol-2-yl)-4-(1,1,3,3-tetramethylbutyl)fenol]	1035 97-45-1	alkan, rozvětvený s kvartérním uhlíkem; kondenzovaná karbocyklická aromatická látka; kondenzované nasycené heterocykly; prekurzorové chinoidní sloučeniny; terc-butanol	PL	102,7 ± 13,4	97,7 ± 5,6	bez kat.	N	N
Tetrafluoroboritan draselný	14 075-53-7	anorganická sůl	S	88,6 ± 3,3	92,9 ± 5,1	bez kat.	N	N

Zkratky:

CASRN = Chemical Abstracts Service Registry Number (registrační číslo CAS); GHS OSN = Globálně harmonizovaný systém klasifikace a označování chemických látek Organizace spojených národů (1); VRM1 = validovaná referenční metoda, EpiOcular™ EIT; VRM2 = validovaná referenční metoda, SkinEthic™ HCE EIT; Barevná interf. = měření barevné interference se standardní absorbancí (optická hustota (OD)) formazanu MTT.

([1]) Organická funkční skupina stanovena podle vnořené analýzy pomocí souboru nástrojů OECD Toolbox 3.1 (8).

([2]) Podle výsledků zjištěných ve zkoušce na podráždění oka EpiOcular™ při validační studii podráždění oka EURL ECVAM/Cosmetics Europe (EIVS) (8).

([3]) Podle výsledků zjištěných ve zkoušce na podráždění oka SkinEthic™ HCE EIT při validační studii (10)(11).

([4]) Založena na oční zkoušce *in vivo* na králících (zkušební metoda B.5/pokyn OECD č. 405) (2)(14) a s použitím GHS OSN.

([5]) Podle výsledků zjištěných ve studii zkušební strategie *in vitro* na podráždění oka CEFIC CONsortium (CON4EI).

([6]) Klasifikace 2A nebo 2B závisí na interpretaci kritéria GHS OSN pro rozlišování mezi těmito dvěma kategoriemi, tj. pro stanovení klasifikace v kategorii 2A jsou nutné 1 ze 3 oproti 2 ze 3 zvířat s účinky v den 7. Studie *in vivo* byla provedena na 3 zvířatech. Všechny sledované vlastnosti kromě zákalu rohovky u jednoho zvířete se ke dni 7 nebo dříve vrátily zpět na nulovou hodnotu. Toto jedno zvíře, které se ke dni 7 zcela neuzdravilo, mělo skóre zákalu rohovky 1 (v den 7) a plně se uzdravilo v den 9.

23. V rámci zkoušení způsobilosti se doporučuje, aby uživatelé po obdržení modelu rekonstruované lidské epidermis ověřili bariérové vlastnosti tkání uvedené výrobcem tkáňové konstrukce RhCE (viz odstavce 25, 27 a 30). To je zvláště důležité v případě, že se tkáně zasílají na dlouhé vzdálenosti nebo že jejich přeprava trvá dlouhou dobu. Pokud je zkouška úspěšně zavedena a je získána a prokázána způsobilost správně ji používat, není nutno běžně provádět takové ověřování. Při běžném používání zkoušky se však doporučuje i nadále v pravidelných intervalech bariérové vlastnosti posuzovat.

▼M8

POSTUP

24. Zkoušky, které v současné době zahrnuje tato zkušební metoda, jsou vědecky platné zkoušky na podráždění oka EpiOcular™ EIT a SkinEthic™ HCET (9)(12)(13), nazývané validovaná referenční metoda (VRM1, respektive VRM2). K dispozici jsou standardní pracovní postupy pro zkušební metody RhCE, které by měly být používány pro provádění a využívání těchto zkušebních metod v laboratoři (34)(35). V následujících odstavcích a v dodatku 2 je uveden popis hlavních složek a postupů zkoušek RhCE.

SLOŽKY ZKUŠEBNÍ METODY RHCE

Obecné podmínky

25. Na rekonstrukci trojrozměrné epitelové tkáně podobné rohovce, která by se měla skládat z postupně stratifikovaných, nikoli však kornifikovaných buněk, se používají příslušné lidské derivované buňky. Tkáňová konstrukce RhCE se připravuje ve vložkách s porézní syntetickou membránou, přes kterou mohou do buněk procházet živiny. V rekonstruovaném epitelu podobném rohovce by mělo být přítomno několik vrstev životaschopných, nekeratinizovaných epitelových buněk. Tkáňová konstrukce RhCE by měla mít epitelový povrch v přímém kontaktu se vzduchem, aby byla možná přímá lokální expozice zkoušených chemických látek způsobem podobným tomu, jak by byl epitel rohovky exponován *in vivo*. Tkáňová konstrukce RhCE by měla tvořit funkční bariéru s dostatečnou robustností, aby odolala rychlému průniku cytotoxických referenčních látek, např. přípravku Triton X-100 nebo dodecylsulfátu sodného (SDS). Bariérová funkce by měla být prokázána a může být hodnocena stanovením doby expozice potřebné ke snížení životaschopnosti tkáně o 50 % (ET_{50}) po aplikaci referenční látky v pevně stanovené koncentraci (např. 100 µl 0,3 % (obj.) přípravku Triton X-100) nebo v koncentraci, při níž referenční látka snižuje životaschopnost tkání o 50 % (IC_{50}) po pevně stanovené době expozice (např. 30minutová expozice 50 µl SDS) (viz odstavec 30). Zadržovací vlastnosti tkáňové konstrukce RhCE by měly zabránit průchodu zkoušené chemické látky kolem okraje životaschopné tkáně, což by mohlo vést k nesprávnému modelování expozice rohovky. Lidské derivované buňky použité k vytvoření tkáňové konstrukce RhCE by neměly být kontaminovány bakteriemi, viry, mykoplazmaty ani houbovými mikroorganismy. Dodavatel by měl kontrolovat sterilitu tkáně rekonstrukce, zda není kontaminována houbami a bakteriemi.

Funkční podmínky

Životaschopnost

26. K určení míry životaschopnosti se používá zkouška MTT (16). Vitální buňky tkáňové konstrukce RhCE redukují vitální barvivo MTT na modrou sraženinu formazanu, která je poté z tkáně extrahována pomocí isopropylalkoholu (nebo podobného rozpouštědla). Extrahovaný formazan MTT může být kvantifikován pomocí standardního měření absorbance (optické hustoty (OD)) nebo spektrofotometrickým postupem HPLC/UPLC (36). Optická hustota samotného extrakčního rozpouštědla by měla být dostatečně malá, tzn. OD < 0,1. Uživatelé tkáňové konstrukce RhCE by měli zajistit, aby každá použitá šarže tkáňové konstrukce RhCE splňovala stanovená kritéria pro negativní kontrolu. Rozsahy přijatelnosti pro hodnoty OD negativní kontroly pro validované referenční metody jsou uvedeny v tabulce 2. Uživatel spektrofotometrie HPLC/UPLC by měl jako kritérium přijatelnosti pro negativní kontrolu používat rozsahy OD negativní kontroly uvedené v tabulce 2. V závěrečné zprávě je třeba doložit, že tkáně ošetřené negativní kontrolní látkou jsou stabilně kultivovány (poskytují podobné naměřené hodnoty životaschopnosti tkáně) po dobu trvání zkušební doby expozice.

▼M8

Podobný postup by měl používat výrobce tkání v rámci řízení kvality při propouštění šarží tkání, ale v tomto případě mohou platit jiná kritéria přijatelnosti než kritéria uvedená v tabulce 2. Rozsah přijatelnosti (horní a dolní mez) hodnot OD negativní kontroly (za podmínek zkušební metody QC) stanoví subjekt, který model RhCE vyvinul nebo dodává.

Tabulka 2

Rozsahy přijatelnosti pro hodnoty OD negativní kontroly (pro uživatele testu)

Zkouška	Dolní mez přijatelnosti	Horní mez přijatelnosti
EpiOcular™ EIT (OCL-200) – VRM1 (protokoly pro kapaliny i pevné látky)	> 0,8 ([1])	< 2,5
SkinEthic™ HCE EIT (HCE/S) – VRM2 (protokoly pro kapaliny i pevné látky)	> 1,0	≤ 2,5

([1]) V této mezi přijatelnosti je uvažována možnost delší doby přepravy/skladování (např. > 4 dny), která prokazatelně nemá vliv na účinnost zkušební metody (37).

Bariérová funkce

27. Tkáňová konstrukce RhCE by měla být dostatečně silná a robustní, aby odolávala rychlému průniku cytotoxických referenčních látek, podle odhadu na základě hodnoty ET_{50} (např. Triton X-100) nebo IC_{50} (SDS) (tabulka 3). Bariérovou funkci každé šarže použité tkáňové konstrukce RhCE by měl prokázat vývojář/prodejce modelu RhCE při dodávce tkání koncovému uživateli (viz odstavec 30).

Morfologie

28. Histologické vyšetření tkáňové konstrukce RhCE by mělo prokázat strukturu podobnou epitelu lidské rohovky (včetně alespoň 3 vrstev životaschopných epitelových buněk a nekeratinizovaného povrchu). Pro validované referenční metody stanovil vhodnou morfologii vývojář/dodavatel, a proto ji uživatel zkušební metody nemusí znovu prokazovat při každé použité šarži tkáně.

Reprodukovatelnost

29. Výsledky zkušební metody za použití pozitivních a negativních kontrol by měly prokázat reprodukovatelnost v průběhu času.

Kontrola kvality

30. Tkáňová konstrukce RhCE by měla být použita pouze v případě, že subjekt, který ji vyvinul nebo dodává, prokáže, že každá použitá šarže tkáňové konstrukce RhCE splňuje stanovená produkční kritéria pro uvolnění do oběhu, přičemž mezi nejvýznamnější z nich patří kritéria životaschopnosti (odstavec 26) a bariérové funkce (odstavec 27). Rozsah přijatelnosti (horní a dolní mez) pro bariérové funkce měřené podle hodnoty ET_{50} nebo IC_{50} (viz odstavce 25 a 26) stanoví vývojář/dodavatel tkáňové konstrukce RhCE. Rozsah přijatelnosti hodnot ET_{50} a IC_{50} použitý jako kritérium řízení kvality pro propouštění šarží u vývojáře/dodavatele tkáňových konstrukcí RhCE (použitých ve validovaných referenčních metodách) je uveden v tabulce 3. Údaje prokazující shodu se všemi výrobními kritérii pro propuštění by měl vývojář/dodavatel tkáňové konstrukce RhCE poskytnout uživatelům zkušební metody, aby je mohli uvést v závěrečné zprávě. Pro spolehlivou predikci chemických látek, které nevyžadují klasifikaci a označení jako látky vyvolávající podráždění oka nebo vážné poškození oka podle systému GHS OSN/CLP, lze akceptovat pouze výsledky získané u tkání splňujících všechna tato výrobní kritéria pro propuštění.

▼M8

Tabulka 3

Kritérium kontroly kvality pro uvolnění šarže do oběhu

Zkouška	Dolní mez přijatelnosti	Horní mez přijatelnosti
EpiOcular™ EIT (OCL-200) – VRM1 (100 µl 0,3 % (obj.) Tritonu X-100)	ET_{50} = 12,2 min	ET_{50} = 37,5 min
SkinEthic™ HCE EIT (HCE/S) – VRM2 (30minutová expozice 50 µl SDS)	IC_{50} = 1 mg/ml	IC_{50} = 3,2 mg/ml

Aplikace zkoušené chemické látky a kontrolních látek

31. Pro každou zkoušenou látku a každou kontrolní látku by se při každém provedení zkoušky měly použít alespoň dva tkáňové replikáty. Používají se dva různé zkušební protokoly, jeden pro kapalné zkoušené chemické látky a jeden pro pevné zkoušené chemické látky (34)(35). Před aplikací zkoušených chemických látek u obou metod a protokolů by měl být povrch tkáňové konstrukce zvlhčen Dulbeccovým fosfátovým pufrem bez vápníku a hořčíku (DPBS bez Ca^{2+}/Mg^{2+}), aby se napodobily vlhké podmínky lidského oka. Ošetření tkání se zahajuje expozicí zkoušené chemické látce (látkám) a kontrolní látkám. U obou zkušebních protokolů v obou validovaných referenčních metodách je zapotřebí nanést dostatečné množství zkoušené chemické látky nebo kontrolní látky, aby rovnoměrně pokryla povrch epitelu, a současně se vyhnout nekonečné dávce (viz odstavce 32 a 33) (dodatek 2).

32. Se zkoušenými chemickými látkami, které lze pipetovat při teplotě 37 °C nebo při nižších teplotách (v případě potřeby pomocí objemové pipety), se ve validovaných referenčních metodách nakládá jako s kapalinami, jinak by se s nimi mělo nakládat jako s pevnými látkami (viz odstavec 33). Ve validovaných referenčních metodách se kapalná zkoušená chemická látka rovnoměrně rozprostře na povrch tkáně (tj. aplikace minimálně 60 µl/cm^2) (viz dodatek 2, (33)(34)). V maximální možné míře by měly být vyloučeny kapilární jevy (účinky povrchového napětí), k nimž může dojít v důsledku malých objemů aplikovaných na vložku (na povrch tkáně), aby bylo zaručeno správné dávkování na tkáň. Tkáně ošetřené kapalnými zkoušenými chemickými látkami se inkubují po dobu 30 minut při standardních kultivačních podmínkách (37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95 % relativní vlhkost). Na konci expoziční doby je nutno kapalnou zkoušenou chemickou látku a kontrolní látky pečlivě odstranit z povrchu tkáně důkladným opláchnutím pomocí DPBS bez Ca^{2+}/Mg^{2+} při pokojové teplotě. Po opláchnutí následuje poexpoziční ponoření do čerstvého média při pokojové teplotě (aby se odstranila veškerá zkoušená chemická látka absorbovaná do tkáně) po stanovenou dobu, která se liší v závislosti na použité validované referenční metodě. Pouze u VMR1 platí poexpoziční inkubační doba v čerstvém médiu při standardních kultivačních podmínkách před provedením analýzy MTT (viz dodatek 2, (34)(35)).

33. Se zkoušenými chemickými látkami, které nelze pipetovat při teplotách do 37 °C, se ve validovaných referenčních metodách zachází jako s pevnými látkami. Množství aplikované zkoušené chemické látky by mělo být dostatečné, aby pokrylo celý povrch tkáně, tj. mělo by být aplikováno minimálně 60 mg/cm^2 (dodatek 2). Pevné látky by se měly pokud možno zkoušet ve formě jemného prášku. Tkáně ošetřené pevnými zkoušenými chemickými látkami se inkubují po stanovenou dobu (v závislosti na použité validované referenční metodě) při standardních kultivačních podmínkách (viz dodatek 2, (34)(35)). Na konci expoziční doby je nutno pevnou zkoušenou chemickou látku a kontrolní látky pečlivě odstranit z povrchu tkáně důkladným opláchnutím pomocí DPBS bez Ca^{2+}/Mg^{2+} při pokojové teplotě. Po opláchnutí následuje poexpoziční ponoření do čerstvého média při pokojové teplotě

▼M8

(aby se odstranila veškerá zkoušená chemická látka absorbovaná do tkáně) po stanovenou dobu, která se liší v závislosti na použité validované referenční metodě, a poexpoziční inkubace v čerstvém médiu při standardních kultivačních podmínkách před provedením analýzy MTT (viz dodatek 2, (34)(35)).

34. Do každého provedení zkoušky by se měly zařadit souběžné negativní a pozitivní kontroly, aby se prokázalo, že životaschopnost (stanovená při negativní kontrole) a citlivost (stanovená při pozitivní kontrole) tkání jsou v rámci rozpětí přijatelnosti definovaného podle dosavadních hodnot. Souběžná negativní kontrola poskytuje také výchozí hodnotu (100 % životaschopnost tkáně) pro výpočet relativní percentuální životaschopnosti tkání ošetřených zkoušenou chemickou látkou (%$Viability_{test}$). Doporučenou látkou pro pozitivní kontrolu, která se má používat u těchto validovaných referenčních metod, je čistý methyl-acetát (CAS č. 79-20-9, komerčně dostupný např. od společnosti Sigma-Aldrich, kat. č. 45997; kapalný). Doporučenými látkami pro negativní kontrolu, které se mají používat u VRM1 a VRM2, je ultračistá H_2O, respektive DPBS bez Ca^{2+}/Mg^{2+}. Tyto kontrolní látky byly použity ve validačních studiích validovaných referenčních metod a většina dosavadních údajů se týká právě těchto látek. Použití vhodných alternativních látek pro pozitivní nebo negativní kontrolu by mělo být adekvátně vědecky odůvodněno. Negativní a pozitivní kontroly by měly být zkoušeny podle stejného protokolu (protokolů), jako byly protokoly použité pro zkoušené chemické látky zařazené do provedení zkoušky (tj. pro kapaliny anebo pevné látky). Po jejich aplikaci by měla následovat experimentální expozice, oplach, poexpoziční ponoření, případně poexpoziční inkubace, jak je popsáno pro kontroly prováděné souběžně u kapalných zkoušených chemických látek (viz odstavec 32) nebo pro kontroly prováděné souběžně u pevných zkoušených chemických látek (viz odstavec 33) před provedením analýzy MTT (viz odstavec 35) (34)(35). Postačí jedna sada negativních a pozitivních kontrol pro všechny zkoušené chemické látky stejného skupenství (kapaliny nebo pevné látky) zařazené do stejného provedení zkoušky.

Měření životaschopnosti tkání

35. Zkouška MTT je standardizovaná kvantitativní metoda (16), která by se měla používat k měření životaschopnosti tkání podle této zkušební metody. Je slučitelná s použitím trojrozměrné tkáňové konstrukce. Analýza MTT se provádí okamžitě po poexpoziční inkubační době. Ve validovaných referenčních metodách se vzorek tkáňové konstrukce RhCE vloží do 0,3 ml roztoku MTT v koncentraci 1 mg/ml na dobu 180 ± 15 min při standardních kultivačních podmínkách. Životaschopné buňky tkáňové konstrukce RhCE redukují vitální barvivo MTT na modrou sraženinu formazanu MTT. Vysrážený modrý formazan MTT se poté z tkáně extrahuje pomocí příslušného množství isopropylalkoholu (nebo podobného rozpouštědla) (34)(35). Tkáně testované kapalnými zkoušenými chemickými látkami by měly být extrahovány z horní i dolní části tkání, zatímco tkáně testované pevnými zkoušenými chemickými látkami a barvenými kapalinami by měly být extrahovány pouze z dolní části tkáně (aby se minimalizovala potenciální kontaminace extrakčního roztoku isopropylalkoholu některou zkoušenou chemickou látkou, jež mohla zůstat v tkáni). Tkáně testované kapalnými zkoušenými chemickými látkami, které nelze snadno vymýt, mohou být také extrahovány pouze z dolní části tkáně. Se souběžně testovanými negativními a pozitivními kontrolními látkami se zachází podobně jako se zkoušenou chemickou látkou. Extrahovaný formazan MTT může být kvantifikován pomocí standardního měření absorbance (OD) při vlnové délce 570 nm za použití filtru o pásmové propustnosti nejvýše ± 30 nm nebo spektrofotometrickým postupem HPLC/UPLC (viz odstavce 42) (11)(36).

▼**M8**

36. Optické vlastnosti zkoušené látky nebo její chemické působení na MTT mohou měření formazanu MTT ovlivnit, což vede k nepravdivému odhadu životaschopnosti tkáně. Zkoušené chemické látky mohou interferovat s měřením formazanu MTT, a to přímou redukcí MTT na modrý formazan MTT, anebo barevnou interferencí, jestliže zkoušená chemická látka absorbuje, přirozeně nebo v důsledku experimentálních postupů, ve stejném rozsahu OD jako formazan MTT (tj. cca 570 nm). Před testováním by měly být provedeny předběžné zkoušky, aby bylo možné identifikovat potenciální přímá redukční činidla MTT anebo barevně interferující chemické látky, a k detekci a korekci potenciální interference těchto zkoušených chemických látek by měly být provedeny dodatečné kontroly (viz odstavce 37–41). To je zvláště důležité v případě, že se určitá zkoušená chemická látka opláchnutím z tkáňové konstrukce RhCE zcela neodstraní nebo že pronikne do epitelu podobného rohovce, takže je přítomna v tkáňových konstrukcích, když se provádí analýza MTT. U zkoušených chemických látek absorbujících světlo ve stejném pásmu jako formazan MTT (přirozeně nebo po expozici), které nejsou kompatibilní se standardním měřením absorbance (OD) formazanu MTT vzhledem k příliš velké interferenci, tj. silná absorbance při vlnové délce 570 ± 30 nm, může být na měření formazanu MTT použit HPLC/UPLC spektrofotometrický postup (viz odstavce 41 a 42) (11)(36). Podrobný popis, jak detekovat a korigovat přímou redukci MTT a interference způsobené barvivy, je k dispozici ve standardních prováděcích postupech validovaných referenčních metod (34)(35). V dodatku III, respektive IV jsou také uvedeny grafy ilustrující identifikaci a nakládání s přímými redukčními činidly MTT anebo barevně interferujícími chemickými látkami pro VRM1 a VRM2.

37. Aby bylo možné identifikovat potenciální interferenci zkoušených chemických látek absorbujících světlo ve stejném pásmu jako formazan MTT (přirozeně nebo po expozici) a rozhodnout, zda jsou nutné další kontroly, zkoušená chemická látka se přidá do vody anebo isopropylalkoholu a inkubuje se po vhodnou dobu při pokojové teplotě (viz dodatek 2, (34)(35)). Jestliže zkoušená chemická látka ve vodě anebo isopropylalkoholu absorbuje dostatečně světlo v pásmu 570 ± 20 nm u VRM1 (viz dodatek 3) nebo jestliže po smíchání zkoušené chemické látky s vodou vznikne zbarvený roztok u VRM2 (viz dodatek 4), považuje se zkoušená chemická látka za interferující se standardním měřením absorbance (OD) formazanu MTT a je třeba provést další kontroly s barvivy, případně použít spektrofotometrický postup HPLC/UPLC, přičemž v tomto případě nejsou tyto kontroly nutné (viz odstavce 41 a 42 a dodatky III a IV) (34)(35). Při provádění standardního měření absorbance (OD) by měla být každá interferující zkoušená chemická látka aplikována na alespoň dva životaschopné tkáňové replikáty, které se podrobí celému zkušebnímu postupu, ale v průběhu inkubačního kroku MTT se inkubují v médiu místo roztoku MTT za účelem vytvoření kontroly nespecifického zbarvení v živých tkáních (NSC_{living}) (34)(35). Vzhledem k inherentní biologické variabilitě živých tkání je třeba kontrolu NSC_{living} provádět současně se zkoušením zbarvené chemické látky a v případě většího počtu zkoušek je třeba u každé zkoušky (při každém provedení zkoušky) provést nezávislou kontrolu NSC_{living}. Skutečná životaschopnost tkáně se vypočte jako: percentuální životaschopnost tkáně získaná z živých tkání vystavených působení interferující zkoušené chemické látky a inkubovaných v roztoku MTT (% $Viability_{test}$) minus percentuální nespecifické zbarvení získané z živých tkání vystavených působení interferující zkoušené chemické látky a inkubovaných v roztoku bez MTT, prováděno současně s korigovanou zkouškou (% NSC_{living}), tj. skutečná životaschopnost tkáně = [%$Viability_{test}$]– [%NSC_{living}].

38. Aby bylo možné identifikovat přímá redukční činidla MTT, je třeba každou zkoušenou chemickou látku přidávat do čerstvě připraveného roztoku MTT. Do roztoku MTT se přidá vhodné množství zkoušené chemické látky a směs se inkubuje přibližně po dobu přibližně 3 hodin při standardních kultivačních

▼**M8**

podmínkách (viz dodatky III a IV) (34)(35). Jestliže směs MTT obsahující zkoušenou chemickou látku (nebo suspenzi u nerozpustných zkoušených chemických látek) zmodrá/zfialoví, je zkoušená chemická látka považována za přímé redukční činidlo MTT, přičemž je třeba provést další funkční kontrolu na neživotaschopných tkáňových konstrukcích RhCE nezávisle na použití standardního měření absorbance (OD) nebo spektrofotometrického postupu HPLC/UPLC. Tato další funkční kontrola využívá neživé tkáně, které mají pouze zbytkovou metabolickou aktivitu, ale absorbují a udržují v sobě zkoušenou chemickou látku podobně jako životaschopné tkáně. Neživé tkáně u VRM1 se připravují expozicí nízké teplotě („usmrcené zmrazením“). Neživé tkáně u VRM2 se připravují dlouhodobou inkubací (např. minimálně 24 ± 1 hodina) ve vodě s následným uložením při nízké teplotě („usmrcené vodou“). Každá zkoušená chemická látka redukující MTT se aplikuje na alespoň dva neživé tkáňové replikáty, které se podrobí celému zkušebnímu postupu, aby došlo ke kontrole na nespecifickou redukci MTT (NSMTT (34)(35). Postačí jedna kontrola NSMTT na zkoušenou chemickou látku bez ohledu na počet provedených nezávislých zkoušek/experimentů. Skutečná životaschopnost tkáně se vypočte jako: percentuální životaschopnost tkáně získaná z živých tkání vystavených působení redukčního činidla MTT (%$Viability_{test}$) minus percentuální nespecifická redukce MTT získaná z neživých tkání vystavených stejnému redukčnímu činidlu MTT, počítáno ve vztahu k negativní kontrole prováděné současně s korigovanou zkouškou (% NSMTT), tj. skutečná životaschopnost tkáně = [%$Viability_{test}$] – [%NSMTT].

39. Zkoušené chemické látky, u nichž se zjistí, že působí barevné interference (viz odstavec 37) i že přímo redukují MTT (viz odstavec 38), budou při provádění standardního měření absorbance (OD) také vyžadovat třetí skupinu kontrol vedle kontrol NSMTT a NSC_{living} popsaných v předchozích odstavcích. Obvykle je tomu tak u tmavě zbarvených zkoušených chemických látek absorbujících světlo v rozsahu 570 ± 30 nm (např. modré, fialové, černé), protože jejich vlastní barva narušuje posouzení jejich schopnosti přímo redukovat MTT, jak je popsáno v odstavci 38. Je tedy nutné použít standardně kontroly NSMTT společně s kontrolami NSC_{living}. Zkoušené chemické látky, u nichž je provedena kontrola NSMTT i NSC_{living}, mohou být absorbovány a zachyceny v živých i neživých tkáních. Proto v tomto případě kontrola NSMTT musí nejen korigovat potenciální přímou redukci MTT způsobenou zkoušenou chemickou látkou, ale také barevnou interferenci vznikající z absorpce a retence zkoušené chemické látky v neživých tkáních. Mohlo by to vést k dvojí korekci barevné interference, protože kontrola NSC_{living} již koriguje barevnou interferenci vznikající z absorpce a retence zkoušené chemické látky v živých tkáních. Aby byla vyloučena možná dvojí korekce barevné interference, je třeba provést třetí kontrolu na nespecifické zbarvení u neživých tkání (NSC_{killed}) (viz dodatky III a IV) (34)(35). Při této další kontrole se zkoušená chemická látka aplikuje na alespoň dva neživé tkáňové replikáty, které se podrobí celé zkoušce, ale v průběhu inkubačního kroku MTT se inkubují v médiu místo roztoku MTT. Postačí jedna kontrola NSC_{killed} na zkoušenou chemickou látku bez ohledu na počet provedených nezávislých zkoušek/experimentů, ale tuto kontrolu je třeba provést současně s kontrolou NSMTT a se stejnou šarží tkáně. Skutečná životaschopnost tkáně se vypočte jako: percentuální životaschopnost tkáně získaná z živých tkání vystavených působení zkoušené chemické látky (%$Viability_{test}$) minus % NSMTT minus % NSC_{living} plus percentuální nespecifické zbarvení získané z neživých tkání vystavených působení interferující zkoušené chemické látky a inkubovaných v roztoku bez MTT, počítáno ve vztahu k negativní kontrole provedené současně s korigovanou zkouškou (% NSC_{killed}), tj. skutečná životaschopnost tkáně = [%$Viability_{test}$] – [%NSMTT] – [%NSC_{living}] + [%NSC_{killed}].

▼**M8**

40. Je důležité uvést, že nespecifická redukce MTT a nespecifické barevné interference mohou zvyšovat OD (při provádění standardních měření absorbance) tkáňového extraktu nad rozsah linearity spektrofotometru a že nespecifická redukce MTT může také zvyšovat plochu píku formazanu MTT (při provádění HPLC/UPLC-spektrofotometrických měření) tkáňového extraktu nad rozsah linearity spektrofotometru. Proto je důležité, aby každá laboratoř stanovila OD / rozsah linearity plochy píku svého spektrofotometru s použitím např. formazanu MTT (CAS č. 57360-69-7), který je komerčně dostupný např. od společnosti Sigma-Aldrich (kat. č. M2003), než zahájí testování zkoušených chemických látek pro regulační účely.

41. Standardní měření absorbance (OD) pomocí spektrofotometru je vhodné pro posouzení zkoušených chemických látek, které přímo redukují MTT a působí barevné interference, když interference pozorované při měření formazanu MTT nejsou příliš silné (tzn. optická hustota tkáňových extraktů zjištěná za použití zkoušené chemické látky bez korekce přímé redukce MTT anebo barevné interference je v lineárním rozsahu spektrofotometru). Avšak výsledky u zkoušených chemických látek, které dávají % NSMTT anebo % NSC_{living} ≥ 60 % (protokol VRM1 a VRM2 pro kapaliny) nebo ≥ 50 % (protokol VRM2 pro pevné látky) negativní kontroly, je třeba posuzovat opatrně, neboť je to stanovená hraniční hodnota používaná ve validovaných referenčních metodách na odlišení klasifikovaných chemických látek od neklasifikovaných (viz odstavec 44). Standardní absorbanci (OD) však nelze měřit, když je interference s měřením formazanu MTT příliš silná (tj. vede k nesprávným hodnotám OD u zkoušených tkáňových extraktů spadajících mimo lineární rozsah spektrofotometru). Zabarvené zkoušené chemické látky nebo zkoušené chemické látky, které se zabarví při kontaktu s vodou nebo isopropylalkoholem a které interferují příliš silně se standardním měřením absorbance (OD) formazanu MTT, mohou být přesto hodnoceny pomocí HPLC/UPLC spektrofotometrie (viz dodatky III a IV). Je tomu tak proto, že systém HPLC/UPLC umožňuje oddělit formazan MTT od chemické látky před její kvantifikací (36). Z tohoto důvodu se při použití HPLC/UPLC spektrofotometrie nepožadují kontroly NSC_{living} ani NSC_{killed}, a to nezávisle na zkoušené chemické látce. Kontroly NSMTT by se však měly použít, pokud existuje podezření, že zkoušená chemická látka přímo redukuje MTT (podle postupu popsaného v odstavci 38). Kontroly NSMTT by se také měly použít u zkoušených chemických látek majících barvu (vlastní barvu nebo zbarvení ve vodě), která znesnadňuje posouzení jejich schopnosti přímé redukce MTT, jak je popsáno v odstavci 38. Při použití HPLC/UPLC spektrofotometrie na měření formazanu MTT se percentuální životaschopnost tkáně vypočítá jako percentuální plocha píku formazanu MTT získaná z živých tkání vystavených působení zkoušené chemické látky ve vztahu k píku formazanu MTT získanému při souběžné negativní kontrole. U zkoušených chemických látek, které dokážou přímo redukovat MTT, se skutečná životaschopnost tkáně vypočítá jako: % $Viability_{test}$ minus % NSMTT, jak je popsáno v poslední větě odstavce 38. Konečně je třeba uvést, že přímá redukční činidla MTT nebo přímá redukční činidla MTT, jež jsou také barevně interferující, která zůstanou v tkáních po expozici a redukují MTT tak silně, že to vede k takovým hodnotám optické hustoty (při využití standardního měření OD) nebo plochám píků (při použití UPLC/HPLC spektrofotometrie) zkoušených tkáňových extraktů, které spadají mimo rozsah linearity spektrofotometrie, nelze posuzovat zkušebními metodami RhCE, i když lze očekávat, že k tomu dochází velmi vzácně.

42. HPLC/UPLC spektrofotometrie může být použita u všech druhů zkoušených chemických látek (barevných, nebarevných, látek redukujících MTT i látek, které MTT neredukují) pro měření formazanu MTT (11)(36). Vzhledem k různým spektrofotometrickým systémům HPLC/UPLC není možné, aby každý uživatel vytvořil přesně stejné systémové podmínky. Proto je třeba

▼M8

prokázat způsobilost spektrofotometrického systému HPLC/UPLC před jeho použitím pro kvantifikaci formazanu MTT z tkáňových extraktů splněním kritérií přijatelnosti pro skupinu standardních parametrů způsobilosti vycházejících z parametrů popsaných v pokynu amerického Úřadu pro potraviny a léčiva pro průmysl k validaci bioanalytických metod (36)(38). Tyto klíčové parametry a jejich kritéria přijatelnosti jsou uvedeny v dodatku 5. Po splnění kritérií přijatelnosti definovaných v dodatku 5 je spektrofotometrický systém HPLC/UPLC považován za způsobilý a připravený na měření formazanu MTT za experimentálních podmínek popsaných v této zkušební metodě.

Kritéria přijatelnosti

43. U každého provedení zkoušky s použitím šarží tkáně RhCE, které splňují požadavky na kvalitu (viz odstavec 30), by tkáně ošetřené látkou pro negativní kontrolu měly vykazovat hodnoty OD odrážející kvalitu tkání, která vznikla po všech přepravních a přejímacích krocích a po všech procesech podle protokolu zkoušky, a neměly by být mimo doposud stanové meze popsané v tabulce 2 (viz odstavec 26). Podobně tkáně ošetřené látkou pro pozitivní kontrolu, tj. methylacetátem, by měly vykazovat střední životaschopnost tkáně < 50 % ve vztahu k negativní kontrole ve VRM1 u protokolu pro kapaliny i protokolu pro pevné látky a ≤ 30 % (protokol pro kapaliny) nebo ≤ 20 % (protokol pro pevné látky) ve vztahu k negativní kontrole ve VRM2, a odrážet tak schopnost tkání reagovat na dráždivou zkoušenou chemickou látku za podmínek zkušební metody (34)(35). Variabilita mezi tkáňovými replikáty u zkoušených chemických látek anebo kontrolních látek by měla spadat do přijatelných limitů (tj. rozdíl životaschopnosti mezi dvěma tkáňovými replikáty by měl být menší než 20 % a směrodatná odchylka (SD) mezi třemi tkáňovými replikáty by neměla přesahovat 18 %). Jestliže je negativní kontrola nebo pozitivní kontrola zařazená do zkoušky mimo přijatelné rozsahy, je toto provedení zkoušky považováno za „nezpůsobilé“ a zkoušku je třeba opakovat. Jestliže je variabilita mezi tkáňovými replikáty zkoušené chemické látky mimo přijatelný rozsah, je třeba zkoušku považovat za „nezpůsobilou“ a zkoušenou chemickou látku je třeba testovat znovu.

Interpretace výsledků a predikční model

44. Hodnoty OD / plochy píku zjištěné u replikovaných tkáňových extraktů pro každou zkoušenou chemickou látku se použijí k výpočtu střední percentuální životaschopnosti tkání (průměru z tkáňových replikátů) normalizované podle negativní kontroly, která je stanovena na 100 %. Percentuální hraniční hodnoty životaschopnosti tkání pro určení zkoušených chemických látek, které není nutné klasifikovat jako látky mající dráždivé účinky na oči nebo vyvolávající vážné poškození očí (bez kategorie GHS OSN/CLP), jsou uvedeny v tabulce 4. Výsledky by tedy měly být interpretovány takto:

— Zkoušená chemická látka je určena jako látka nevyžadující klasifikaci a označení podle systému GHS OSN a CLP (bez kategorie), jestliže je střední percentuální životaschopnost tkáně po expozici a poexpoziční inkubaci větší než (>) stanovená mezní hodnota percentuální životaschopnosti tkáně, jak je uvedeno v tabulce 4. V tomto případě není vyžadováno žádné další zkoušení jinými zkušebními metodami.

▼M8

— Jestliže je střední percentuální životaschopnost tkáně po expozici a poexpoziční inkubaci menší než nebo rovna (≤) stanovené mezní hodnotě percentuální životaschopnosti tkáně, nelze provést žádnou predikci, jak je uvedeno v tabulce 4. V tomto případě bude nutné další zkoušení jinými zkušebními metodami, protože zkušební metody RhCE vykazují určitý počet falešně pozitivních výsledků (viz odstavce 14–15) a nedokážou rozlišit mezi kategoriemi 1 a 2 podle GHS OSN a CLP (viz odstavec 17).

Tabulka 4

Predikční modely podle klasifikace GHS OSN a CLP

Validovaná referenční metoda	Bez kategorie	Nelze předpovědět
VRM 1 – EpiOcular™ EIT (pro oba protokoly)	střední životaschopnost tkáně > 60 %	střední životaschopnost tkáně ≤ 60 %
VRM 2 – SkinEthic™ HCE EIT (pro protokoly pro kapaliny)	střední životaschopnost tkáně > 60 %	střední životaschopnost tkáně ≤ 60 %
VRM2 – SkinEthic™ HCE EIT (pro protokol pro pevné látky)	střední životaschopnost tkáně > 50 %	střední životaschopnost tkáně ≤ 50 %

45. U zkoušené chemické látky s jednoznačným výsledkem by měla stačit jedna zkouška za použití alespoň dvou tkáňových replikátů. Avšak v případě hraničních výsledků, jako jsou například nesouhlasné výsledky opakovaných měření a/nebo průměrná hodnota životaschopnosti ve výši 60 ± 5 % (VRM1 a VRM2 pro protokol pro kapaliny) nebo 50 ± 5 % (VRM2 pro protokol pro pevné látky), by se měla zvážit druhá zkouška, jakož i třetí zkouška v případě nesouhlasných výsledků mezi prvními dvěma zkouškami.

46. Pokud je to vhodné a zdůvodněné, lze pro konkrétní druhy směsí uvažovat různé mezní hodnoty percentuální životaschopnosti tkání rozlišující klasifikované zkoušené chemické látky od neklasifikovaných, aby se zvýšila celková účinnost zkušební metody pro tyto druhy směsí (viz odstavec 14). Srovnávací chemické látky mohou být užitečné pro hodnocení potenciálu vážného poškození očí / podráždění očí neznámými zkoušenými chemickými látkami nebo třídami produktů nebo pro hodnocení potenciálu relativní toxicity klasifikované chemické látky pro oči ve specifickém rozmezí pozitivních odpovědí.

ÚDAJE A PŘEDKLÁDÁNÍ ZPRÁV

Údaje

47. Údaje získané ve zkoušce za použití jednotlivých tkáňových replikátů (např. hodnoty OD / plochy píku formazanu MTT a vypočítané údaje percentuální životaschopnosti tkání za zkoušenou chemickou látku a kontrolní látky a konečná predikce zkušební metody RhCE) by se měly vykazovat ve formě tabulky za každou zkoušenou chemickou látku, popřípadě včetně údajů z opakovaných zkoušek. Kromě toho by se za každou jednotlivou zkoušenou chemickou látku a kontrolní látku měla uvést střední percentuální životaschopnost tkáně a rozdíl životaschopnosti mezi dvěma tkáňovými replikáty (jestliže n = 2 replikované tkáně) nebo SD (jestliže n ≥ 3 replikované tkáně). Za každou zkoušenou chemickou látku je třeba uvést všechny pozorované interference zkoušené chemické látky s měřením formazanu MTT ve formě přímé redukce MTT anebo barevné interference.

ZÁVĚREČNÁ ZPRÁVA

48. Závěrečná zpráva by měla obsahovat tyto informace:

▼**M8**

Zkoušená chemická látka

Jednosložková látka:

— Chemická identifikace, např. název (názvy) IUPAC nebo CAS, číslo (čísla) CAS, kód SMILES nebo InChI, strukturní vzorec a/nebo jiné identifikátory,

— skupenství, těkavost, pH, logP, molekulová hmotnost, chemická třída a další důležité fyzikálně-chemické vlastnosti podstatné pro provedení studie, a to v rozsahu, v jakém jsou tyto informace dostupné,

— čistota, případně chemická identita nečistot, je-li to prakticky proveditelné atd.,

— případné ošetření před zkoušením (např. zahřívání, mletí),

— podmínky skladování a stabilita, v rozsahu, v jakém jsou tyto informace dostupné.

Vícesložková látka, UVCB a směs:

— Charakterizovaná v co možná největší míře např. chemickou identitou (viz výše), čistotou, kvantitativním výskytem a důležitými fyzikálně-chemickými vlastnostmi (viz výše) složek, v rozsahu, v jakém jsou tyto informace dostupné,

— skupenství a další důležité fyzikálně-chemické vlastnosti podstatné pro provedení studie, a to v rozsahu, v jakém jsou tyto informace dostupné,

— čistota, případně chemická identita nečistot, je-li to prakticky proveditelné atd.,

— případné ošetření před zkoušením (např. zahřívání, mletí),

— podmínky skladování a stabilita, v rozsahu, v jakém jsou tyto informace dostupné.

Látky pozitivní a negativní kontroly

— Chemická identifikace, např. název (názvy) IUPAC nebo CAS, číslo (čísla) CAS, kód SMILES nebo InChI, strukturní vzorec a/nebo jiné identifikátory,

— skupenství, těkavost, molekulová hmotnost, chemická třída a další důležité fyzikálně-chemické vlastnosti podstatné pro provedení studie, a to v rozsahu, v jakém jsou tyto informace dostupné,

— čistota, případně chemická identita nečistot, je-li to prakticky proveditelné atd.,

— případné ošetření před zkoušením (např. zahřívání, mletí),

— podmínky skladování a stabilita, v rozsahu, v jakém jsou tyto informace dostupné,

— zdůvodnění použití jiné negativní kontroly než ultračisté H_2O, případně DPBS bez Ca_2^+/Mg_2^+,

— zdůvodnění případného použití jiné pozitivní kontroly než čistého methyl-acetátu,

— odkaz na dosavadní výsledky pozitivních a negativních kontrol prokazující vhodnost kritérií přijatelnosti provedení.

Informace týkající se zadavatele a zkušebního zařízení

— Jméno a adresa zadavatele, zkušebního zařízení a vedoucího studie.

— *Použitý model tkáňové konstrukce RhCE a protokol (případně s uvedením zdůvodnění jejich volby)*

▼**M8**

Podmínky zkušební metody

— Použitá tkáňová konstrukce RhCE, včetně čísla šarže,

— (případně) vlnová délka a pásmová propustnost použitá pro kvantifikaci formazanu MTT a rozsah linearity měřicího zařízení (např. spektrofotometru),

— popis metody použité pro kvantifikaci formazanu MTT,

— případně popis použitého HPLC/UPLC spektrofotometrického systému,

— úplné podklady ke konkrétní použité tkáňové konstrukci RhCE včetně jejího chování při zkoušce. Ty by měly zejména zahrnovat:

  i) řízení kvality životaschopnosti (dodavatel);

  ii) životnost za podmínek zkušební metody (dodavatel);

  iii) řízení kvality bariérové funkce;

  iv) morfologii, je-li k dispozici;

  v) reprodukovatelnost a prediktivní schopnost;

  vi) jiné údaje o řízení kvality tkáňové konstrukce RhCE, jsou-li k dispozici,

— odkaz na dosavadní údaje tkáňové konstrukce RhCE. Měl by zejména zahrnovat: přijatelnost údajů z kontrol kvality s odkazem na dosavadní údaje o šaržích,

— prohlášení, že zkoušející zařízení prokázalo způsobilost při používání zkušební metody před rutinním použitím otestováním vhodných chemických látek.

Kritéria přijatelnosti provedení zkoušky

— Střední hodnoty pozitivních a negativních kontrol a rozpětí přijatelnosti založené na porovnání s historickými údaji,

— přijatelná variabilita mezi tkáňovými replikáty pro pozitivní a negativní kontroly,

— přijatelná variabilita mezi tkáňovými replikáty pro zkoušenou chemickou látku.

Postup zkoušky

— Podrobnosti použitého zkušebního postupu,

— dávky zkoušené chemické látky a použitých kontrolních látek,

— doba a teplota expozice, doba poexpozičního ponoření a (případně) doba poexpoziční inkubace,

— popis všech úprav zkušebního postupu,

▼M8

— přehled kontrol použitých pro látky, které přímo redukují MTT, případně pro zbarvující zkoušené chemické látky,

— počet tkáňových replikátů použitých na jednu zkoušenou chemickou látku a kontroly (pozitivní kontrola, negativní kontrola a NSMTT, případně NSC_{living} a NSC_{killed}).

Výsledky

— Tabulka s údaji o jednotlivých zkoušených chemických látkách a kontrolách pro každé provedení zkoušky (případně včetně opakovaných experimentů) a každé měření replikátů včetně hodnoty OD nebo plochy píku formazanu MTT, percentuální životaschopnosti tkáně, střední percentuální životaschopnosti tkáně, rozdílu mezi replikáty nebo směrodatnými odchylkami a konečné predikce,

— případně výsledky kontrol použitých pro přímá redukční činidla MTT anebo zbarvené zkoušené chemické látky včetně hodnot OD nebo plochy píku formazanu MTT, %NSMTT, $\%NSC_{living}$, $\%NSC_{killed}$, rozdílu mezi tkáňovými replikáty nebo směrodatnými odchylkami, konečné korigované percentuální životaschopnosti tkáně a konečné predikce,

— výsledky získané u zkoušených chemických látek a kontrolních látek ve vztahu k definovaným kritériím přijatelnosti provedení zkoušky,

— popis ostatních pozorovaných účinků, např. zbarvení tkání zbarvenou zkoušenou chemickou látkou.

Diskuse o výsledcích

Závěr

LITERATURA

(1) UN (2015). United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). ST/SG/AC.10/30/Rev.6, Sixth Revised Edition, New York and Geneva: United Nations. Dostupné na webových stránkách: http://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev06/English/ST-SG-AC10-30-Rev6e.pdf.

(2) Kapitola B.5 této přílohy, Akutní dráždivé/leptavé účinky na oči.

(3) Kapitola B.47 této přílohy, Zkušební metoda pro zákal a propustnost rohovky u skotu pro zjišťování i) chemických látek vyvolávajících vážné poškození očí a ii) chemických látek, které není nutné klasifikovat jako látky mající dráždivé účinky na oči nebo vyvolávající vážné poškození očí.

(4) Kapitola B.48 této přílohy, Zkušební metoda odděleného kuřecího oka pro zjišťování i) chemických látek vyvolávajících vážné poškození očí a ii) chemických látek, které není nutné klasifikovat.

(5) Kapitola B.61 této přílohy, Zkušební metoda průniku fluoresceinu ke zjišťování látek s leptavými a silně dráždivými účinky na oči.

▼**M8**

(6) Kapitola B.68 této přílohy, Zkušební metoda využívající krátkodobou expozici *in vitro* pro zjišťování i) chemických látek vyvolávajících vážné poškození očí a ii) chemických látek, které není nutné klasifikovat jako látky mající dráždivé účinky na oči nebo vyvolávající vážné poškození očí.

(7) Freeman, S.J., Alépée N., Barroso, J., Cole, T., Compagnoni, A., Rubingh, C., Eskes, C., Lammers, J., McNamee, P., Pfannenbecker, U., Zuang, V. (2010). Prospective Validation Study of Reconstructed Human Tissue Models for Eye Irritation Testing. *ALTEX* 27, Special Issue 2010,261-266.

(8) EC EURL-ECVAM (2014). The EURL ECVAM - Cosmetics Europe prospective validation study of Reconstructed human Cornea-like Epithelium (RhCE)-based test methods for identifying chemicals not requiring classification and labelling for serious eye damage/eye irritation: Validation Study Report. EUR 28125 EN; doi:10.2787/41680. Dostupné na webových stránkách: http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC100280.

(9) EURL ECVAM Science Advisory Committee (2014). ESAC Opinion on the EURL ECVAM Eye Irritation Validation Study (EIVS) on EpiOcular™ EIT and SkinEthic™ HCE and a related Cosmetics Europe study on HPLC/UPLC-spectrophotometry as an alternative endpoint detection system for MTT-formazan. ESAC Opinion No 2014-03 of 17 November 2014; EUR 28 173 EN; doi: LX 4610,2787/043697. Dostupné na webových stránkách: http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC103702.

(10) Alépée, N., Leblanc, V., Adriaens, E., Grandidier, M.H., Lelièvre, D, Meloni, M., Nardelli, L., Roper, C.S, Santirocco, E., Toner, F., Van Rompay, A., Vinall, J., Cotovio, J. (2016). Multi-laboratory validation of SkinEthic HCE test method for testing serious eye damage/eye irritation using liquid chemicals. *Toxicol. In Vitro* 31, 43-53.

(11) Alépée, N., Adriaens, E., Grandidier, M.H., Meloni, M., Nardelli, L., Vinall, C.J., Toner, F., Roper, C.S, Van Rompay, A.R., Leblanc, V., Cotovio, J. (2016). Multi-laboratory evaluation of SkinEthic HCE test method for testing serious eye damage/eye irritation using solid chemicals and overall performance of the test method with regard to solid and liquid chemicals testing. *Toxicol. Chem. In Vitro* 34, 55-70.

(12) EURL ECVAM Science Advisory Committee (2016). ESAC Opinion on the SkinEthic™ Human Corneal Epithelium (HCE) Eye Irritation Test (EIT). ESAC Opinion No 2016-02 of 24 June 2016; EUR 28175 EN; doi: LX 4610,2787/390390. Dostupné na webových stránkách: http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC103704.

(13) EC EURL-ECVAM (2016). Recommendation on the Use of the Reconstructed human Cornea-like Epithelium (RhCE) Test Methods for Identifying Chemicals not Requiring Classification and Labelling for Serious Eye Damage/Eye Irritation According to UN GHS. (Návrh).

(14) Draize, J.H., Woodard, G., Calvery, H.O. (1944). Methods for the Study of Irritation and Toxicity of Substances Applied Topically to the Skin and Mucous Membranes. Journal of *Pharmacol. and Exp. Therapeutics* 82, 377-390.

(15) Scott, L., Eskes, C., Hoffmann, S., Adriaens, E., Alépée, N., Bufo, M., Clothier, R., Facchini, D., Faller, C., Guest, R., Harbell, J., Hartung, T., Kamp, H., Le Varlet, B., Meloni, M., McNamee, P., Osborne, R., Pape, W., Pfannenbecker, U., Prinsen, M., Seaman, C., Spielman, H., Stokes, W., Trouba, K., Van den Berghe, C., Van Goethem, F., Vassallo, M., Vinardell, P., Zuang, V. (2010). A Proposed Eye Irritation Testing Strategy to Reduce and Replace *In Vivo* Studies Using Bottom-Up and Top-Down Approaches. *Toxicol. In Vitro* 24, 1-9.

▼**M8**

(16) Mosmann, T. (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J. Immunol. Methods* 65, 55-63.

(17) OECD (2016). Series on Testing and Assessment No 216: Performance Standards for the Assessment of Proposed Similar or Modified *In Vitro* Reconstructed Human Cornea-Like Epithelium (RhCE) Test Methods for Identifying Chemicals not Requiring Classification and Labelling for Eye Irritation or Serious Eye Damage, Based on the Validated Reference Methods EpiOcular™ EIT and SkinEthic™ HCE EIT described in TG 492. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(18) OECD (2005). Series on Testing and Assessment No 34: Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(19) Kaluzhny, Y., Kandárová, H., Hayden, P., Kubilus, J., d'Argembeau-Thornton, L., Klausner, M. (2011). Development of the EpiOcular™ Eye Irritation Test for Hazard Identification and Labelling of Eye Irritating Chemicals in Response to the Requirements of the EU Cosmetics Directive and REACH Legislation. *Altern. Lab. Anim.* 39, 339-364.

(20) Nguyen, D.H., Beuerman, R.W., De Wever, B., Rosdy, M. (2003). Three-dimensional construct of the human corneal epithelium for in vitro toxicology. In: Salem, H., Katz, S.A. (Eds), Alternative Toxicological Methods, CRC Press, pp. 147-159.

(21) Pfannenbecker, U., Bessou-Touya, S., Faller, C., Harbell, J., Jacob, T., Raabe, H., Tailhardat, M., Alépée, N., De Smedt, A., De Wever, B., Jones, P., Kaluzhny, Y., Le Varlet, B., McNamee, P., Marrec-Fairley, M., Van Goethem, F. (2013). Cosmetics Europe multi-laboratory pre-validation of the EpiOcular™ reconstituted Human Tissue Test Method for the Prediction of Eye Irritation. *Toxicol. Chem. In Vitro* 27, 619-626.

(22) Alépée, N., Bessou-Touya, S., Cotovio, J., de Smedt, A., de Wever, B., Faller, C., Jones, P., Le Varlet, B., Marrec-Fairley, M., Pfannenbecker, U., Tailhardat, M., van Goethem, F., McNamee, P. (2013). Cosmetics Europe Multi-Laboratory Pre-Validation of the SkinEthic™ Reconstituted Human Corneal Epithelium Test Method for the Prediction of Eye Irritation. *Toxicol. Chem. In Vitro* 27, 1476-1488.

(23) Kolle, S.N., Moreno, M.C.R., Mayer, W., van Cott, A., van Ravenzwaay, B., Landsiedel, R. (2015). The EpiOcular™ Eye Irritation Test is the Method of Choice for *In Vitro* Eye Irritation Testing of Agrochemical Formulations: Correlation Analysis of EpiOcular™ Eye Irritation Test and BCOP Test Data to UN GHS, US EPA and Brazil ANIVSA Classifications. *Altern. Lab. Anim.* 43, 1-18.

(24) Adriaens, E., Barroso, J., Eskes, C., Hoffmann, S., McNamee, P., Alépée, N., Bessou-Touya, S., De Smedt, A., De Wever, B., Pfannenbecker, U., Tailhardat, M., Zuang, V. (2014). Retrospective Analysis of the Draize Test for Serious Eye Damage/Eye Irritation: Importance of Understanding the *In Vivo* Endpoints Under UN GHS/EU CLP for the Development and Evaluation of *In Vitro* Test Methods. *Arch. Toxicol.* 88, 701-723.

(25) Barroso, J., Pfannenbecker, U., Adriaens, E., Alépée, N., Cluzel, M., De Smedt, A., Hibatallah, J., Klaric, M., Mewes, K.R., Millet, M., Templier, M., McNamee, P. (2017). Cosmetics Europe compilation of historical serious eye damage/eye irritation *in vivo* data analysed by drivers of classification to support the selection of chemicals for development and evaluation of alternative methods/strategies: the Draize eye test Reference Database (DRD). *Arch. Toxicol.* 91, 521-547.

(26) Meloni, M., De Servi, B., Marasco, D., Del Prete, S. (2011). Molecular mechanism of ocular surface damage: Application to an *in vitro* dry eye model on human corneal epithelium. *Molecular Vision* 17, 113-126.

▼**M8**

(27) Hackett, R.B., McDonald, T.O. (1991). Eye Irritation. In *Advances in Modern Toxicology: Dermatoxicology* Marzulli F.N.and Maibach H.I. (Eds.), 4th Edition, pp. 749–815. Washington, DC, USA: Hemisphere Publishing Corporation.

(28) Fox, D.A., Boyes, W.K. (2008). Toxic Responses of the Ocular and Visual System. In Cassaret and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons Klaassen C.D.(Ed.), 7th Edition, pp. 665–697. Withby, ON, Canada: McGraw-Hill Ryerson.

(29) Jester, J.V., Li, H.F., Petroll, W.M., Parker, R.D., Cavanagh, H.D., Carr, G.J., Smith, B., Maurer, J.K. (1998). Area and Depth of Surfactant Induced Corneal Injury Correlates with Cell Death. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 39, 922-936.

(30) Maurer, J.K., Parker, R.D., Jester, J.V. (2002). Extent of Corneal Injury as the Mechanistic Basis for Ocular Irritation: Key Findings and Recommendations for the Development of Alternative Assays. *Reg. Tox. Pharmacol.* 36, 106-117.

(31) Jester, J.V., Li, L., Molai, A., Maurer, J.K. (2001). Extent of Corneal Injury as a Mechanistic Basis for Alternative Eye Irritation Tests. *Toxicol. Chem. In Vitro* 15, 115–130.

(32) Jester, J.V., Petroll, W.M., Bean, J., Parker, R.D., Carr, G.J., Cavanagh, H.D., Maurer, J.K. (1998). Area and Depth of Surfactant-Induced Corneal Injury Predicts Extent of Subsequent Ocular Responses. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 39, 2610-2625.

(33) Jester, J.V. (2006). Extent of Corneal Injury as a Biomarker for Hazard Assessment and the Development of Alternative Models to the Draize Rabbit Eye Test. *Cutan. Ocul. Toxicol.* 25, 41-54.

(34) EpiOcular™ EIT SOP, Version 8 (March 05, 2013). EpiOcular™ EIT for the Prediction of Acute Ocular Irritation of Chemicals. Dostupné na webových stránkách: [https://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/beta/index.cfm/methodsAndProtocols/index].

(35) SkinEthic™ HCE EIT SOP, Version 1. (July 20, 2015). SkinEthic™ HCE Eye Irritation Test (EITL for Liquids, EITS for Solids) for the Prediction of Acute Ocular Irritation of Chemicals. Dostupné na webových stránkách: https://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/beta/index.cfm/methodsAndProtocols/index

(36) Alépée, N., Barroso, J., De Smedt, A., De Wever, B., Hibatallah, J., Klaric, M., Mewes, K.R., Millet, M., Pfannenbecker, U., Tailhardat, M., Templier, M., McNamee, P. (2015). Use of HPLC/UPLC-Spectrophotometry for Detection of Formazan in *In Vitro* Reconstructed Human Tissue (RhT)-Based Test Methods Employing the MTT-Reduction Assay to Expand their Applicability to Strongly Coloured Test Chemicals. *Toxicol. In Vitro* 29, 741-761.

(37) Kaluzhny, Y., Kandárová, H., Handa, Y., DeLuca, J., Truong, T., Hunter, A., Kearney, P., d'Argembeau-Thor135nton, L., Klausner, M. (2015). EpiOcular™ Eye Irritation Test (EIT) for Hazard Identification and Labeling of Eye Irritating Chemicals: Protocol Optimization for Solid Materials and Extended Shipment Times. *Altern. Lab Anim.* 43, 101-127.

(38) US FDA (2001). Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration. May 2001. Dostupné na webových stránkách: http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070107.pdf.

(39) OECD (2017). Guidance Document on an Integrated Approaches on Testing and Assessment for Serious Eye Damage and Eye irritation. Series on Testing and Assessment No. 263. ENV Publications, Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

▼M8

Dodatek 1

DEFINICE

Přesnost: Přesnost shody mezi výsledky zkušební metody a přijatými referenčními hodnotami. Je to míra funkčnosti zkušební metody a jeden z aspektů její „relevantnosti“. Tento pojem se často používá místo pojmu „soulad“ a rozumí se jím podíl správných výsledků zkušební metody (18).

Srovnávací chemická látka: Látka použitá jako norma pro srovnání se zkoušenou látkou. Srovnávací látka by měla mít tyto vlastnosti: i) neměnný a spolehlivý zdroj (zdroje) pro její určení a charakterizaci; ii) podobnost se strukturou, funkcí anebo chemickou či produktovou třídou se zkoušenou chemickou látkou (látkami); iii) známé fyzikálněchemické vlastnosti; iv) podklady ke známým účinkům; a v) známé účinky v rozsahu žádoucí reakce.

Přístup „zdola nahoru“: Postupný přístup používaný u zkoušených chemických látek, u nichž se předpokládá, že je není nutné klasifikovat a označovat jako látky mající dráždivé účinky na oči nebo vyvolávající vážné poškození očí, který začíná odlišením chemických látek, u nichž není nutná klasifikace a označení (negativní výsledek), od ostatních chemických látek (pozitivní výsledek).

Chemická látka: Látka nebo směs.

Soulad: Viz „přesnost“.

Rohovka: Průhledná přední část oční bulvy, která zahrnuje duhovku a zornici a propouští světlo dovnitř oka.

CV: Variační koeficient.

Dev: Odchylka.

EIT: Zkouška dráždivosti pro oči.

EURL-ECVAM: Referenční laboratoř EU pro alternativy ke zkouškám na zvířatech.

Podráždění očí: Vyvolání změn na oku po aplikaci zkoušené chemické látky na přední plochu oka, které jsou plně vratné do 21 dní od aplikace. Tento pojem je zaměnitelný s výrazy „vratné účinky na oko“ a „kategorie 2 GHS OSN/CLP“.

ET_{50}: Doba expozice potřebné k tomu, aby se životaschopnost tkáně snížila o 50 % po aplikaci referenční chemické látky v pevně stanovené koncentraci.

Míra falešné negativity: Podíl všech pozitivních látek falešně zjištěných zkušební metodou jako negativní. Je to jeden z ukazatelů výsledku zkušební metody.

Míra falešné pozitivity: Podíl všech negativních látek falešně zjištěných zkušební metodou jako pozitivní. Je to jeden z ukazatelů výsledku zkušební metody.

Nebezpečnost: Základní charakteristika látky nebo situace, která má potenciál vyvolat nepříznivé účinky, jsou-li organismus, systém nebo (sub)populace vystaveny této látce.

HCE: SkinEthic™ Human Corneal Epithelium (lidský rohovkový epitel).

▼M8

HPLC: Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

IC_{50}: Koncentrace, při níž referenční chemická látka snižuje životaschopnost tkání o 50 % po pevně stanovené době expozice (např. 30minutová expozice SDS).

Nekonečná dávka: Množství zkušební látky nanesené na tkáňovou konstrukci RhCE, které přesahuje množství potřebné k úplnému a rovnoměrnému pokrytí epitelového povrchu.

Nevratné účinky na oči: Viz „vážné poškození očí“.

LLOQ: Dolní mez kvantifikace.

logP: Logaritmus rozdělovacího koeficientu oktanol/voda

Směs: Směs nebo roztok složený ze dvou nebo více látek.

Jednosložková látka: Látka definovaná svým kvantitativním složením, v níž je přítomna jedna hlavní složka v míře alespoň 80 % hmot.

Vícesložková látka: Látka definovaná svým kvantitativním složením, v níž je přítomna více než jedna hlavní složka v koncentraci ≥ 10 % hmot. a < 80 % hmot. Vícesložková látka je výsledkem výrobního procesu. Rozdíl mezi směsí a vícesložkovou látkou spočívá v tom, že směs se získá smísením dvou nebo více látek bez chemické reakce. Vícesložková látka je výsledkem chemické reakce.

MTT: 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyl-2H-tetrazolium-bromid; thiazolylová modř tetrazolium-bromid.

Negativní kontrola: Vzorek obsahující všechny složky zkušebního systému a látku, o níž je známo, že nezpůsobuje pozitivní odpověď ve zkušebním systému. Tento vzorek se zpracovává se vzorky zkoušené chemické látky a jinými kontrolními vzorky a používá se na stanovení 100 % životaschopnosti.

Neklasifikované: Chemické látky, které nejsou klasifikované jako látky mající dráždivé účinky na oči (kategorie 2 GHS OSN/CLP, kategorie 2A nebo 2B GHS OSN) nebo jako látky vyvolávající vážné poškození očí (kategorie 1 GHS OSN/CLP). Tento pojem je zaměnitelný s pojmem „bez kategorie GHS OSN/CLP“.

NSC_{killed}: Nespecifická barva u neživých tkání.

NSC_{living}: Nespecifická barva u živých tkání.

NSMTT: Nespecifická redukce MTT.

OD: Optická hustota.

Standardy funkčnosti: Standardy založené na validované referenční metodě, která je považována za vědecky platnou, jež slouží jako základ pro hodnocení srovnatelnosti navrhované zkušební metody, která je mechanicky a funkčně podobná. Zahrnují se: i) zásadní složky zkušební metody; ii) minimální seznam srovnávacích látek vybraných z chemických látek používaných k prokázání přijatelné funkčnosti validované referenční metody a iii) srovnatelné hladiny přesnosti a spolehlivosti založené na hodnotách získaných u validované referenční metody, jež by navrhovaná zkušební metoda měla prokázat při vyhodnocení za použití minimálního seznamu srovnávacích látek (18).

▼**M8**

Pozitivní kontrola: Vzorek obsahující všechny složky zkušebního systému a látku, o níž je známo, že způsobuje pozitivní odpověď ve zkušebním systému. Tento vzorek se zpracovává se vzorky zkoušené chemické látky a jinými kontrolními vzorky. Aby se zajistilo, že proměnlivost v reakci na pozitivní kontrolu v čase bude možné vyhodnotit, rozsah pozitivní reakce by neměl být nadměrný.

Relevantnost: Popis vztahu zkoušky k účinku, který je předmětem zájmu, a také toho, zda je zkouška smysluplná a použitelná pro konkrétní účel. Vyjadřuje, do jaké míry zkouška správně měří nebo predikuje biologický účinek, který je předmětem zájmu. Relevantnost zahrnuje také posouzení přesnosti (shody) zkušební metody (18).

Spolehlivost: Měření rozsahu, v jakém může být zkušební metoda časem reprodukovatelná v laboratořích a mezi laboratořemi, když se provádí s použitím stejného protokolu. Hodnotí se to výpočtem laboratorní a mezilaboratorní reprodukovatelnosti a laboratorní opakovatelnosti (18).

Náhradní zkouška: Zkouška, která je koncipována tak, aby nahradila běžně používanou a uznávanou zkoušku, která slouží k určení nebezpečnosti a/nebo posouzení rizika a u níž je zjištěno, že poskytuje stejnou nebo lepší úroveň ochrany zdraví lidí nebo zvířat či případně ochrany životního prostředí ve srovnání s uznávanou zkouškou ve všech možných zkušebních situacích a pro všechny zkoušené chemické látky (18).

Reprodukovatelnost: Shoda mezi výsledky získanými při opakovaném zkoušení téže zkoušené chemické látky za použití stejného zkušebního protokolu (viz „spolehlivost“) (18).

Vratné účinky na oči: Viz „dráždivé účinky na oči“.

RhCE: Rekonstruovaný epitel podobný lidské rohovce.

Provedení zkoušky: Jedna či více zkoušených chemických látek se zkouší současně s negativní kontrolou a s pozitivní kontrolou.

SD: Směrodatná odchylka.

Citlivost: Podíl všech pozitivních/aktivních zkoušených látek, které jsou na základě zkoušky správně klasifikovány. Je měřítkem přesnosti zkušební metody, která poskytuje kategorické výsledky, a je důležitým prvkem při hodnocení relevantnosti zkušební metody (18).

▼M8

Vážné poškození očí: Tvorba poškození tkání v oku nebo závažné fyzikální slábnutí vidění po aplikaci zkoušené látky na přední plochu oka, které není plně vratné do 21 dní od aplikace. Tento pojem je zaměnitelný s výrazy „nevratné účinky na oči“ a „kategorie 1 GHS OSN a CLP“.

Standardní pracovní postupy (SOP): Formální písemné postupy, které podrobně popisují, jak se mají vykonávat konkrétní rutinní laboratorní operace a operace při konkrétních zkouškách. Jsou vyžadovány podle správné laboratorní praxe.

Specifičnost: Podíl všech negativních/neaktivních zkoušených látek, které jsou na základě zkoušky správně klasifikovány. Je měřítkem přesnosti zkušební metody, která poskytuje kategorické výsledky, a je důležitým prvkem při hodnocení relevantnosti zkušební metody (18).

Látka: Chemický prvek a jeho sloučeniny v přírodním stavu nebo získané výrobním postupem, včetně jakýchkoliv aditiv potřebných pro zachování stability výrobku a všech nečistot pocházejících z použitého postupu, ale s vyloučením všech rozpouštědel, která je možno oddělit bez ovlivnění stability dané látky nebo změny jejího složení.

Zkouška: Jedna zkoušená chemická látka, která byla souběžně zkoušena na minimálně dvou tkáňových replikátech příslušným standardním pracovním postupem.

Životaschopnost tkáně: Parametr, kterým se měří celková aktivita buněčné populace v rekonstruované tkáni jako její schopnost redukovat vitální barvivo MMT a který v závislosti na měřeném jevu a na použitém uspořádání zkoušky koreluje s celkovým počtem a/nebo vitalitou živých buněk.

Přístup „shora dolů“: Postupný přístup používaný u chemických látek, u nichž se předpokládá, že způsobují vážné poškození očí, který začíná odlišením chemických látek vyvolávajících vážné poškození očí (pozitivní výsledek) od jiných chemických látek (negativní výsledek).

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

Strategie postupného zkoušení: Strategie zkoušení po krocích, při které se zkušební metody využívají postupně. Všechny existující informace o zkoušené chemické látce se přezkoumávají na každém stupni s použitím hodnocení závažnosti důkazů, aby se zjistilo, zda jsou k dispozici dostačující informace pro rozhodnutí o klasifikaci nebezpečnosti, než se postoupí do dalšího stupně strategie. Pokud potenciál/intenzitu nebezpečnosti zkoušené chemické látky lze určit na základě existujících informací na daném stupni, další zkoušení není nutné (18).

ULOQ: Horní mez kvantifikace.

Globálně harmonizovaný systém klasifikace a označování chemických látek Organizace spojených národů (GHS OSN): Systém navrhující klasifikaci chemických látek (látek a směsí) podle standardizovaných typů a úrovní fyzikálních, zdravotních a environmentálních nebezpečí a řešící příslušné komunikační prvky, jako jsou piktogramy, signální slova, výroky o nebezpečí, výroky o bezpečnostních opatřeních a bezpečnostní datové listy, které obsahují informace o jejich nežádoucích účincích s ohledem na ochranu lidí (včetně zaměstnavatelů, zaměstnanců, přepravců, spotřebitelů a osob reagujících na havárie) a životního prostředí (1).

Kategorie 1 podle GHS OSN/CLP: Viz „vážné poškození očí“.

Kategorie 2 podle GHS OSN/CLP: Viz „dráždivé účinky na oči“.

Bez kategorie GHS OSN/CLP: Chemické látky, které nesplňují požadavky na klasifikaci v kategorii 1 nebo 2 GHS OSN/CLP (2A nebo 2B GHS OSN). Tento pojem je zaměnitelný s výrazem „neklasifikované“.

UPLC: Vysokoúčinná kapalinová chromatografie.

▼**M8**

UVCB: Látky s neznámým nebo proměnlivým složením, komplexní reakční produkty nebo biologický materiál.

Validovaná zkušební metoda: Zkušební metoda, u níž se má za to, že je dostatečně relevantní a spolehlivá pro určitý účel, a která je založena na vědecky spolehlivých zásadách. Zkušební metoda není nikdy validovaná v absolutním smyslu, ale pouze pro určitý konkrétní účel (18).

Validovaná zkušební metoda: Zkušební metoda, u níž byly provedeny validační studie k určení její relevantnosti (včetně přesnosti) a spolehlivosti pro konkrétní účel. Je důležité si uvědomit, že validovaná zkušební metoda nemusí mít dostatečnou funkčnost, pokud jde o přesnost a spolehlivost, aby mohla být shledána přijatelnou pro navrhovaný účel (18).

VRM: Validovaná referenční metoda.

VRM1: EpiOcular™ EIT se nazývá validovaná referenční metoda 1.

VRM2: SkinEthic™ HCE EIT se nazývá validovaná referenční metoda 2.

Váha důkazů: Postup zvažování silných a slabých stránek různých informací v dosahování a podpoře závěru týkajícího se potenciálu nebezpečnosti zkoušené látky.

▼M8

Dodatek 2

HLAVNÍ SLOŽKY ZKOUŠEK RHCE VALIDOVANÝCH PRO STANOVENÍ CHEMICKÝCH LÁTEK, KTERÉ NEVYŽADUJÍ KLASIFIKACI A OZNAČENÍ JAKO LÁTKY MAJÍCÍ DRÁŽDIVÉ ÚČINKY NA OČI NEBO VYVOLÁVAJÍCÍ VÁŽNÉ POŠKOZENÍ OČÍ

Složky zkoušky	EpiOcular™ EIT (VRM 1)		SkinEthic™ HCE EIT (VRM 2)	
Protokoly	Kapaliny (pipetovatelné při 37 ± 1°C nebo nižších teplotách po dobu 15 min)	Pevné látky (nepipetovatelné)	Kapaliny a viskózní látky (pipetovatelné)	Pevné látky (nepipetovatelné)
Povrch modelu	0,6 cm^2	0,6 cm^2	0,5 cm^2	0,5 cm^2
Počet tkáňových replikátů	nejméně 2	nejméně 2	nejméně 2	nejméně 2
Předběžná kontrola na barevnou interferenci	50 µl + 1 ml H_2O po dobu 60 min. při 37 ± 2°C, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95 % RH (nezbarvené zkoušené chemické látky) nebo 50 µl + 2 ml isopropylalkoholu míchaného po dobu 2–3 hod. při pokojové teplotě (zbarvené zkoušené chemické látky) → jestliže je OD zkoušené chemické látky při vlnové délce 570 ± 20 nm po odečtení OD isopropylalkoholu nebo vody > 0,08 (což odpovídá přibližně 5 % střední OD negativní kontroly), je třeba provést upravené kontroly na živé tkáni.	50 mg + 1 ml H_2O po dobu 60 min. při 37 ± 2°C, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95 % RH (nezbarvené zkoušené chemické látky) a/nebo 50 mg + 2 ml isopropylalkoholu míchaného po dobu 2–3 hod. při pokojové teplotě (zbarvené i nezbarvené zkoušené chemické látky) → jestliže je OD zkoušené chemické látky při vlnové délce 570 ± 20 nm po odečtení OD isopropylalkoholu nebo vody > 0,08 (což odpovídá přibližně 5 % střední OD negativní kontroly), je třeba provést upravené kontroly na živé tkáni.	10 µl + 90 µl H2O mícháno po dobu 30 ± 2 min. při pokojové teplotě (RT, 18–28 °C) → jestliže se zkoušená chemická látka zbarví, je třeba provést upravené kontroly na živé tkáni	10 mg + 90 µl H2O mícháno po dobu 30 ± 2 min. při pokojové teplotě → jestliže se zkoušená chemická látka zbarví, je třeba provést upravené kontroly na živé tkáni

▼M8

Složky zkoušky	EpiOcular™ EIT (VRM 1)		SkinEthic™ HCE EIT (VRM 2)	
Předběžná kontrola na přímou redukci MTT	50 µl + 1 ml MTT 1 mg/ml roztoku po dobu 180 ± 15 min při 37 ± 2°C, 5 ± 1 % CO2, ≥ 95 % RH → jestliže roztok zmodrá/zfialoví, je třeba provést upravené kontroly na tkáni usmrcené zmrazením (jako negativní kontrola se používá 50 µl sterilní deionizované vody v roztoku MTT)	50 mg + 1 ml MTT 1 mg/ml roztoku po dobu 180 ± 15 min při 37 ± 2°C, 5 ± 1 % CO2, ≥ 95 % RH → jestliže roztok zmodrá/zfialoví, je třeba provést upravené kontroly na tkáni usmrcené zmrazením (jako negativní kontrola se používá 50 µl sterilní deionizované vody v roztoku MTT)	30 µl + 300 µl MTT 1 mg/ml roztoku po dobu 180 ± 15 min při 37 ± 2°C, 5 ± 1 % CO2, ≥ 95 % RH → jestliže roztok zmodrá/zfialoví, je třeba provést upravené kontroly na tkáni usmrcené vodou (jako negativní kontrola se používá 30 µl sterilní deionizované vody v roztoku MTT)	30 mg + 300 µl MTT 1 mg/ml roztoku po dobu 180 ± 15 min při 37 ± 2°C, 5 ± 1 % CO2, ≥ 95 % RH → jestliže roztok zmodrá/zfialoví, je třeba provést upravené kontroly na tkáni usmrcené vodou (jako negativní kontrola se používá 30 µl sterilní deionizované vody v roztoku MTT)
Předběžné ošetření	20 µl Ca^{2+}/Mg^{2+}bez DPBS po dobu 30 ± 2 min při 37 ± 2°C, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95 % RH, chráněno před světlem.	20 µl Ca^{2+}/Mg^{2+} − bez DPBS po dobu 30±2 min při 37 ± 2°C, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95 % RH, chráněno před světlem.	-	-
Experimentální dávky a aplikace	50 µl (83,3 µl/cm^2)	50 mg (83,3 mg/cm^2) pomocí kalibrovaného nástroje (např. zarovnaná kalibrovaná odměrka s obsahem 50 mg chloridu sodného).	10 µl Ca^{2+}/Mg^{2+} bez DPBS + 30 ± 2 µl (60 µl/cm^2) U viskózních látek použijte nylonovou síťku	30 µl Ca^{2+}/Mg^{2+}bez DPBS + 30 ± 2 mg (60 mg/cm^2)
Doba a teplota expozice	30 min (± 2 min) v kultivačním médiu při 37 ± 2°C, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95 % RH	6 hodin (± 0,25 hod.) v kultivačním médiu při 37 ± 2°C, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95 % RH	30 min (± 2 min) v kultivačním médiu při 37 ± 2°C, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95 % RH	4 hodiny (± 0,1 hod.) v kultivačním médiu při 37 ± 2°C, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95 % RH
Propláchnutí při pokojové teplotě	3krát ve 100 ml DPBS bez Ca^{2+}/Mg^{2+}	3krát ve 100 ml DPBS bez Ca^{2+}/Mg^{2+}	20 ml DPBS bez Ca^{2+}/Mg^{2+}	25 ml DPBS bez Ca^{2+}/Mg^{2+}
Ponoření po expozici	12 min (± 2 min) při pokojové teplotě v kultivačním médiu	25 min (± 2 min) při pokojové teplotě v kultivačním médiu	30 min (± 2 min) při 37 °C, 5 % CO_2, 95 % RH v kultivačním médiu	30 min (± 2 min) při pokojové teplotě v kultivačním médiu

▼M8

Složky zkoušky	EpiOcular™ EIT (VRM 1)		SkinEthic™ HCE EIT (VRM 2)	
Inkubace po expozici	120 min (± 15 min) v kultivačním médiu při 37 ± 2°C, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95 % RH	18 hod. (± 0,25 hod.) v kultivačním médiu při 37 ± 2°C, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95 % RH	žádná	18 hod. (± 0,5 hod.) v kultivačním médiu při 37 ± 2°C, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95 % RH
Negativní kontrola	50 µl H_2O Zkoušeno současně	50 µl H_2O Zkoušeno současně	DPBS bez 30 ± 2µl Ca^{2+}/Mg^2 Zkoušeno současně	DPBS bez 30 ± 2µl Ca^{2+}/Mg^2 Zkoušeno současně
Pozitivní kontrola	50 µl methylacetátu Zkoušeno současně	50 µl methylacetátu Zkoušeno současně	30 ± 2µl methylacetátu Zkoušeno současně	30 ± 2µl methylacetátu Zkoušeno současně
Roztok MTT	300 µl 1 mg/ml	300 µl 1 mg/ml	300 µl 1 mg/ml	300 µl 1 mg/ml
Doba inkubace MTT a teplota	180 min (± 15 min) při 37 ± 2°C, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95 % RH	180 min (± 15 min) při 37 ± 2°C, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95 % RH	180 min (± 15 min) při 37 ± 2°C, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95 % RH	180 min (± 15 min) při 37 ± 2°C, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95 % RH
Extrakční rozpouštědlo	2 ml isopropylalkoholu (extrakce z horní a dolní části vložky propíchnutím tkáně)	2 ml isopropylalkoholu (extrakce z horní a dolní části vložky propíchnutím tkáně)	1,5 ml isopropylalkoholu (extrakce z horní a dolní části vložky)	1,5 ml isopropylalkoholu (extrakce z dolní části vložky)
Doba a teplota extrakce	2–3 hod. s protřepáváním (~120 ot./min.) při pokojové teplotě nebo přes noc při 4–10°C	2–3 hod. s protřepáváním (~120 ot./min.) při pokojové teplotě nebo přes noc při 4–10°C	4 hod. s protřepáváním (~120 ot./min.) při pokojové teplotě nebo alespoň přes noc bez protřepávání při 4–10°C	Alespoň 2 hod. s protřepáváním (~120 rpm) při pokojové teplotě
Odečet OD	570 nm (550–590 nm) bez referenčního filtru	570 nm (550–590 nm) bez referenčního filtru	570 nm (540–600 nm) bez referenčního filtru	570 nm (540–600 nm) bez referenčního filtru
Kontrola kvality tkání	Expozice za použití 100 µl 0,3 % (obj.) přípravku Triton X-100 12,2 min ≤ ET_{50} ≤ 37,5 min	Expozice za použití 100 µl 0,3 % (obj.) přípravku Triton X-100 12,2 min ≤ ET_{50} ≤ 37,5 min	30 min. expozice za použití SDS (50 µl) 1,0 mg/ml ≤ IC_{50} ≤ 3,5 mg/ml	30 min. expozice za použití SDS (50 µl) 1,0 mg/ml ≤ IC_{50} ≤ 3,2 mg/ml

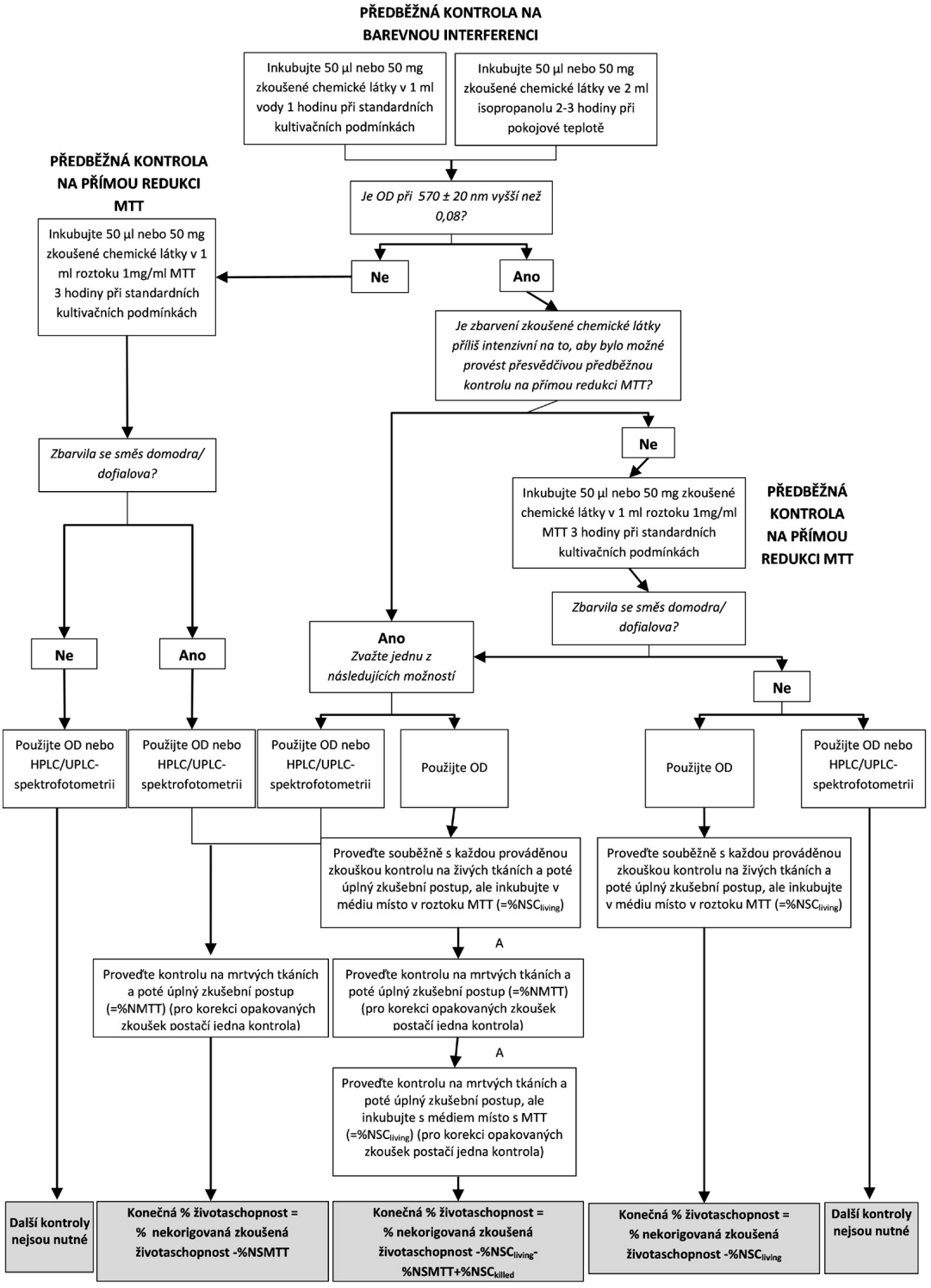
▼M8

Složky zkoušky	EpiOcular™ EIT (VRM 1)		SkinEthic™ HCE EIT (VRM 2)	
Kritéria přijatelnosti	1. Střední hodnota OD tkáňových replikátů vystavených působení negativní kontroly by měla být > 0,8 a < 2,5. 2. Střední životaschopnost tkáňových replikátů vystavených působení pozitivní kontroly po dobu 30 minut, vyjádřeno jako % negativní kontroly, by měla být < 50 %. 3. Rozdíl životaschopnosti mezi dvěma tkáňovými replikáty by měl být menší než 20 %.	1. Střední hodnota OD tkáňových replikátů vystavených působení negativní kontroly by měla být > 0,8 a < 2,5. 2. Střední životaschopnost tkáňových replikátů vystavených působení pozitivní kontroly po dobu 6 hodin, vyjádřeno jako % negativní kontroly, by měla být < 50 %. 3. Rozdíl životaschopnosti mezi dvěma tkáňovými replikáty by měl být menší než 20 %.	1. Střední hodnota OD tkáňových replikátů vystavených působení negativní kontroly by měla být > 1,0 a ≤ 2,5. 2. Střední životaschopnost tkáňových replikátů vystavených působení pozitivní kontroly po dobu 30 minut, vyjádřeno jako % negativní kontroly, by měla být ≤ 30 %. 3. Rozdíl životaschopnosti mezi dvěma tkáňovými replikáty by měl být menší než 20 %.	1. Střední hodnota OD tkáňových replikátů vystavených působení negativní kontroly by měla být > 1,0 a ≤ 2,5. 2. Střední životaschopnost tkáňových replikátů vystavených působení pozitivní kontroly po dobu 4 hodin, vyjádřeno jako % negativní kontroly, by měla být ≤ 20 %. 3. Rozdíl životaschopnosti mezi dvěma tkáňovými replikáty by měl být menší než 20 %.

▼**M8**

Dodatek 3

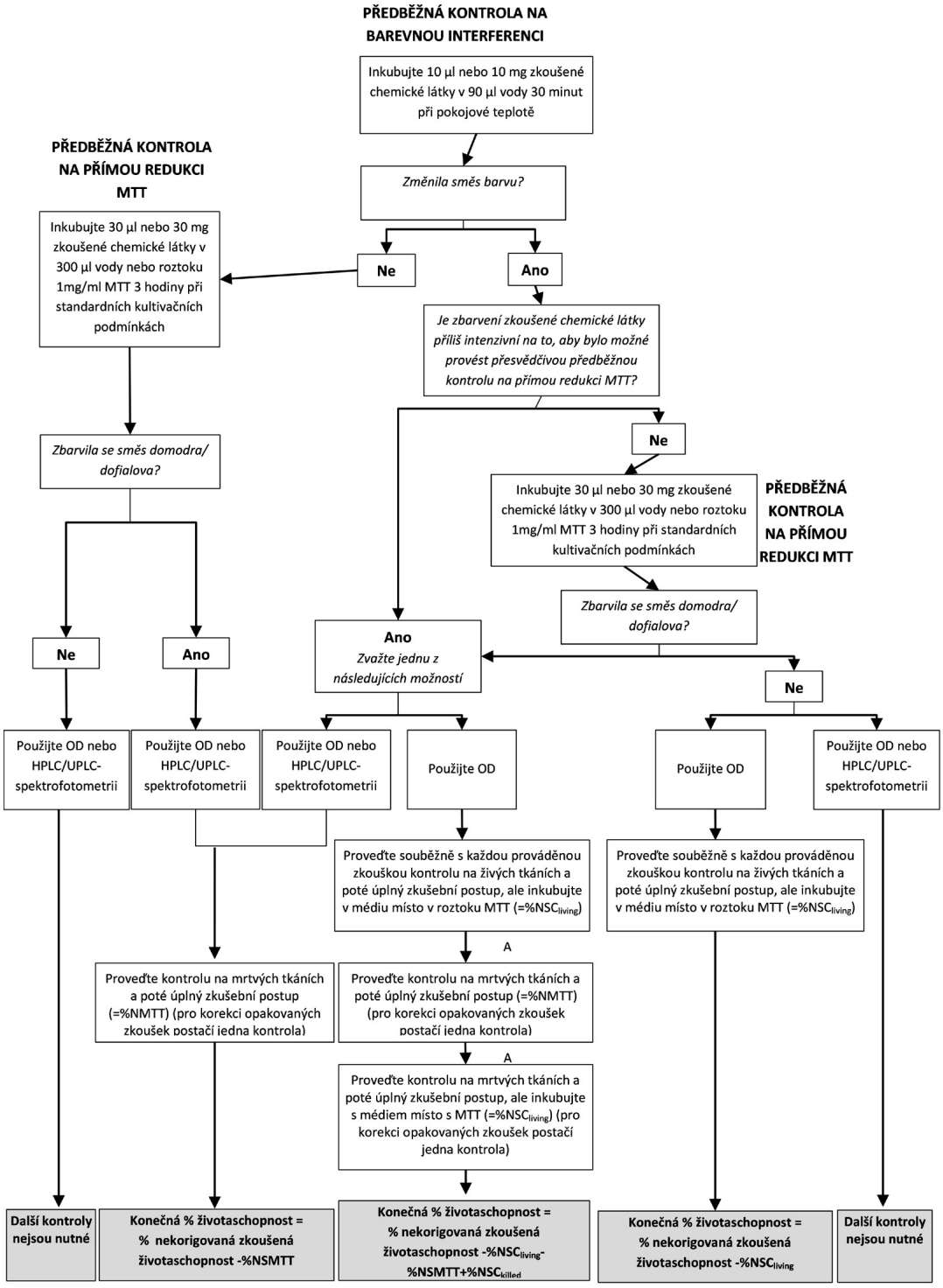
GRAF ILUSTRUJÍCÍ IDENTIFIKACI A NAKLÁDÁNÍ S PŘÍMÝMI REDUKČNÍMI ČINIDLY MTT ANEBO BAREVNĚ INTERFERUJÍCÍMI CHEMICKÝMI LÁTKAMI NA ZÁKLADĚ STANDARDNÍHO PRACOVNÍHO POSTUPU PRO VRM1



▼**M8**

Dodatek 4

GRAF ILUSTRUJÍCÍ IDENTIFIKACI A NAKLÁDÁNÍ S PŘÍMÝMI REDUKČNÍMI ČINIDLY MTT ANEBO BAREVNĚ INTERFERUJÍCÍMI CHEMICKÝMI LÁTKAMI NA ZÁKLADĚ STANDARDNÍHO PRACOVNÍHO POSTUPU PRO VRM2



▼**M8**

Dodatek 5

KLÍČOVÉ PARAMETRY A KRITÉRIA PŘIJATELNOSTI PRO ZPŮSOBILOST SPEKTROFOTOMETRICKÉHO SYSTÉMU HPLC/UPLC PRO MĚŘENÍ FORMAZANU MTT EXTRAHOVANÉHO Z TKÁŇOVÝCH KONSTRUKCÍ RHCE

Parametr	Protokol vycházející z pokynu FDA (36)(38)	Kritéria přijatelnosti
Selektivita	Analýza isopropylalkoholu, slepý pokus s živou tkání (isopropylalkoholový extrakt z tkáňových konstrukcí RhCE bez jakékoli expozice), slepý pokus s neživou tkání (isopropylalkoholový extrakt z tkáňových konstrukcí RhCE bez jakékoli expozice), a analýza barviva (např. methylenová modř)	$\text{plocha}_{\text{interference}} \leq 20\ \%\ \text{plochy}_{\text{LLOQ}}$ ([1])
Přesnost	Kontroly kvality (tj. formazan MTT při 1,6 μg/ml, 16 μg/ml a 160 μg/ml) v isopropylalkoholu (n = 5)	CV ≤ 15 % nebo ≤ 20 % pro LLOQ
Přesnost	Kontroly kvality v isopropylalkoholu (n = 5)	%Dev ≤ 15 % nebo ≤ 20 % pro LLOQ
Vlivy matrice	Kontroly kvality ve slepém pokusu s živou tkání (n = 5)	85 % ≤ % matricového jevu ≤ 115 %
Únik	Analýza isopropylalkoholu po standardu ULOQ ([2])	$\text{plocha}_{\text{interference}} \leq 20\ \%\ \text{plochy}_{\text{LLOQ}}$
Reprodukovatelnost (v rámci dne)	3 nezávislé kalibrační křivky (vycházející z 6 postupných třetinových ředění formazanu MTT v isopropylalkoholu s počátkem při ULOQ, tj. 200 μg/ml); Kontroly kvality v isopropylalkoholu (n = 5)	Kalibrační křivky: %Dev ≤ 15 % nebo ≤ 20 % pro LLOQ Kontroly kvality: %Dev ≤ 15 % a CV ≤ 15 %
Reprodukovatelnost (v rámci dne)	Den 1: 1 kalibrační křivka a kontroly kvality v isopropylalkoholu (n = 3) Den 2: 1 kalibrační křivka a kontroly kvality v isopropylalkoholu (n = 3) Den 3: 1 kalibrační křivka a kontroly kvality v isopropylalkoholu (n = 3)	
Krátkodobá stabilita formazanu MTT v tkáňovém extraktu RhCE	Kontroly kvality ve slepém pokusu s živou tkání (n = 3) analyzované v den přípravy a po 24 hodinách uložení při pokojové teplotě	%Dev ≤ 15 %
Dlouhodobá stabilita formazanu MTT v tkáňovém extraktu RhCE, v případě potřeby	Kontroly kvality ve slepém pokusu s živou tkání (n = 3) analyzované v den přípravy a po Několika dnech uložení při –20°C	%Dev ≤ 15 %

([1]) LLOQ: Dolní mez kvantifikace, definovaná, aby postihla 1–2 % tkáňovou životaschopnost, tj. 0,8 μg/ml.
([2]) ULOQ: Horní mez kvantifikace, definovaná tak, aby byla alespoň dvakrát vyšší než nejvyšší očekávaná koncentrace formazanu MTT v isopropylalkoholových extraktech z negativních kontrol (~70 μg/ml ve VRM), tj. 200 μg/ml.

▼M8

B.70 ZKOUŠKA *IN VITRO* S VYUŽITÍM REKOMBINANTNÍCH ESTROGENOVÝCH RECEPTORŮ NA DETEKCI CHEMICKÝCH LÁTEK S VAZEBNOU AFINITOU NA ER

VŠEOBECNÝ ÚVOD

Pokyn OECD vycházející z funkční způsobilosti

1. Tato zkušební metoda odpovídá pokynu OECD pro zkoušení (TG) 493 (2015). Pokyn č. 493 je pokyn vycházející z funkční způsobilosti (PBTG), který popisuje metodiku lidských rekombinantních analýz *in vitro* na detekci látek s vazebnou afinitou na estrogenové receptory (analýzy vazby hrER). Skládá se ze dvou mechanisticky a funkčně podobných analýz pro zjištění látek, které se vážou na estrogenový receptor (tj. ERα), a měl by usnadnit vypracování nových podobných nebo modifikovaných analýz podle zásad pro validaci stanovených v dokumentu OECD o validaci a mezinárodním uznání nových nebo aktualizovaných zkušebních metod pro posuzování nebezpečnosti (1). Plně validovanými referenčními zkušebními metodami (dodatek 2 a dodatek 3), které představují základ pro tuto metodiku vycházející z funkční způsobilosti, jsou:

— Freyberger-Wilsonova (FW) *in vitro* analýza vazby na estrogenové receptory (ER) s využitím celého lidského rekombinantního ERα (2) a

— *in vitro* analýza vazby na estrogenové receptory s využitím lidského rekombinantního proteinu s ligand vázající doménou Ústavu pro hodnocení a výzkum chemických látek (CERI) (2).

K dispozici jsou standardy funkčnosti (PS) (3), které usnadňují vývoj a validaci podobných zkušebních metod pro stejné riziko a umožňují včasnou změnu pokynu PBTG 493, aby mohly být do aktualizovaného pokynu přidány nové podobné analýzy. Podobné analýzy však budou přidány až po kontrole a dohodě s OECD, že splňují standardy funkčnosti. Analýzy zařazené do pokynu 493 mohou být použity libovolně pro řešení požadavků členských zemí OECD na výsledky zkoušek na vazbu na estrogenové receptory při využití vzájemného uznávání údajů podle postupu dohodnutého v rámci OECD.

Obecné informace a principy analýz zahrnutých do této zkušební metody

2. V roce 1998 zahájila OECD činnost vysoké priority, jejíž podstatou je revize stávajících a vytvoření nových pokynů pro screening a zkoušení potenciálních endokrinních disruptorů. V roce 2012 byl revidován koncepční rámec OECD pro zkoušky a hodnocení potenciálních endokrinních disruptorů. Původní i revidovaný koncepční rámec je uveden v přílohách standardizovaných pokynů pro zkoušení a posuzování endokrinních disruptorů (*Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption*) (4). Koncepční rámec je tvořen pěti úrovněmi, které odpovídají různým úrovním biologické komplexnosti. Analýzy vazby na ER popsané v této zkušební metodě představují úroveň 2, která zahrnuje „*analýzy in vivo poskytující údaje o vybraných endokrinních mechanismech/drahách*“. Tato zkušební metoda je v testech vazby ligandu na receptor *in vitro* určena na zjištění ligandů na lidský estrogenový receptor alfa (ERα).

▼M8

3. Relevance testu vazby ER *in vitro* pro biologické funkce byla jasně prokázána. Testy vazby ER jsou určeny k identifikaci chemických látek, které mají potenciál narušit dráhu estrogenových hormonů a v posledních dvou desetiletích se široce používají pro charakterizaci distribuce ER v tkáních, jakož i pro identifikaci agonistů/antagonistů ER. Tyto testy odrážejí interakci mezi ligandem a receptorem, což je první krok estrogenové signální dráhy, který je zásadně důležitý pro reprodukční funkci všech obratlovců.

4. Interakce estrogenů s estrogenovými receptory může ovlivnit transkripci estrogenem kontrolovaných genů a indukovat negenomové účinky, což může vést k indukci nebo inhibici buněčných procesů, včetně procesů nezbytných pro buněčnou proliferaci, normální vývoj plodu a reprodukční funkci (5)(6)(7). Narušení normálních estrogenních systémů může spustit nežádoucí účinky v oblasti normálního vývoje (ontogeneze), reprodukčního zdraví a správné funkce reprodukčního systému. Nesprávná signalizace ER může vést k takovým účinkům, jako je zvýšené riziko hormonálně dependentního karcinomu, narušení plodnosti a změny růstu a vývoje plodu (8).

5. Analýzy vazby *in vitro* vycházejí z přímé interakce látky s vazebným místem ligandu na specifický receptor, který reguluje transkripci genu. Hlavní složka testu vazby lidského rekombinantního estrogenového receptoru alfa (hrERα) měří schopnost radioizotopově značeného ligandu ([^{3}H]17β-estradiol) vázat se na ER v přítomnosti zvyšujících se koncentrací zkoušené chemické látky (tj. kompetitor). Zkoušené chemické látky, které mají vysokou afinitu na ER, konkurují radioizotopově značenému ligandu při nižší koncentraci v porovnání s chemickými látkami s nižší afinitou na tento receptor. Tato analýza sestává ze dvou hlavních složek: saturačního vazebného experimentu za účelem charakterizace parametrů interakce mezi receptorem a ligandem a dokumentace specifičnosti ER, po němž následuje kompetitivní vazebný experiment, který charakterizuje kompetici mezi zkoušenou chemickou látkou a radioizotopově značeným ligandem ve vazbě na ER.

6. Validační studie vazebných analýz CERI a FW prokázaly jejich relevanci a spolehlivost pro zamýšlený účel (2).

7. Definice a zkratky používané v této zkušební metodě jsou popsány v dodatku 1.

Platnost a omezení testů vazby ligandu na receptor

8. Tyto analýzy jsou navrženy pro účely screeningu a stanovení priorit, ale mohou také poskytovat informace o molekulární iniciační události (MIE), které lze použít při analýze průkaznosti výsledků. Týkají se chemické vazby na doménu ERα vázající ligand v systému *in vitro*. Výsledky proto nelze přímo extrapolovat na komplexní signalizaci a regulaci intaktního endokrinního systému *in vivo*.

▼**M8**

9. Vazba přirozeného ligandu, 17β-estradiolu, je prvním krokem v sérii molekulárních událostí, který aktivuje transkripci cílových genů a nakonec vrcholí fyziologickou změnou (9). Vazba na doménu ERα vázající ligand se tedy považuje za jeden z klíčových mechanismů narušení endokrinního systému (ED) mediovaného ER, i když existují i jiné mechanismy, jejichž prostřednictvím může k tomuto narušení dojít, včetně i) interakcí s místy ERα jinými, než je kapsa vázající ligand, ii) interakcí s jinými receptory relevantními pro estrogenovou signalizaci, ERβ a estrogenovým receptorem spřaženým s G-proteinem, jinými receptory a enzymatickými systémy v endokrinním systému, iii) syntézy hormonů, iv) metabolické aktivace anebo inaktivace hormonů, v) distribuce hormonů do cílových tkání a vi) clearance hormonů z těla. Žádná z analýz podle této zkušební metody se nezabývá těmito způsoby účinku.

10. Tato zkušební metoda se zabývá schopností látek vázat se na lidský ERα, ale nerozlišuje mezi agonisty a antagonisty ERα. Tyto analýzy neřeší další události v řetězci, jako je genová transkripce nebo fyziologické změny. Vzhledem k tomu, že při validaci byly použity pouze jednotlivé jednosložkové látky, nebyla řešena použitelnost na zkoušené směsi. Analýzy jsou však teoreticky použitelné i na zkoušení vícesložkových látek a směsí. Před použitím této zkušební metody ke zkoušení směsi s cílem získat údaje pro zamýšlené regulační účely by mělo být zváženo, zda tato metoda může pro tento účel poskytnout přiměřené výsledky, a pokud ano, proč je tomu tak. Takové úvahy nejsou nutné, pokud existuje právní požadavek na zkoušení dané směsi.

11. Receptorové systémy bez buněk nemají žádnou vnitřní metabolickou kapacitu a nebyly validovány v kombinaci s metabolickými enzymatickými systémy. Mohlo by však být možné začlenit metabolickou aktivitu do plánu studie, ale vyžadovalo by to další práci v oblasti validace.

12. Chemické látky, které by mohly protein (tj. receptorový protein) denaturovat, jako jsou povrchově aktivní látky nebo chemické látky, které mohou změnit pH zkušebního pufru, nesmí být testovány nebo mohou být testovány pouze při koncentracích, které tyto interakce vylučují. Jinak je rozsah koncentrací, které mohou být zkoušeny v testech zkoušené chemické látky, omezen na její rozpustnost ve zkušebním pufru.

13. V tabulce 1 jsou pro informaci uvedeny výsledky testu 24 látek, které byly zkoušeny oběma plně validovanými analýzami popsanými v této zkušební metodě. Z těchto látek je na základě publikovaných zpráv, včetně analýz *in vitro* na transkripční aktivaci ER anebo uterotrofní analýzy, 17 klasifikováno jako ER vázající látky a 6 jako ER nevázající látky (9)(10)(11)(12)(13)(14)(15). Pokud jde o údaje uvedené v tabulce 1, byla mezi oběma analýzami u klasifikace všech látek do 10^{-4} M téměř 100 % shoda, přičemž každá látka byla správně klasifikována jako ER vázající nebo nevázající. Doplňkové informace o této skupině látek i o dalších látkách zkoušených v analýzách vazby ER v průběhu validačních studií jsou uvedeny ve standardech funkčnosti pro analýzu vazby hrER (3), dodatek 2 (tabulky 1, 2 a 3).

▼M8

Tabulka 1

Klasifikace látek vázajících a nevázajících se na ER při zkoušení pomocí analýz vazby na hrER FW a CERI v porovnání s očekávanou odpovědí

	Název látky	CASRN	Předpokládaná odpověď	Analýza FW		Analýza CERI		MESH Chemická třída	Třída produktu
				Koncentrace Rozsah (M)	Klasifikace	Koncentrace Rozsah (M)	Klasifikace		
1	17β-estradiol	50-28-2	*váže se*	1×10^{-11} – 1×10^{-6}	váže se	1×10^{-11} – 1×10^{-6}	váže se	Steroid	Léčivý přípravek, veterinární látka
2	Norethynodrel	68-23-5 Org.	*váže se*	3×10^{-9} – 30×10^{-4}	váže se	3×10^{-9} – 30×10^{-4}	váže se	Steroid	Léčivý přípravek, veterinární látka
3	Norethindron	68-22-4	*váže se*	3×10^{-9} – 30×10^{-4}	váže se	3×10^{-9} – 30×10^{-4}	váže se	Steroid	Léčivý přípravek, veterinární látka
4	Di-n-butylftalát	84-74-2	*neváže se* (*)	1×10^{-10} – 1×10^{-4}	neváže se (**) (+)	1×10^{-10} – 1×10^{-4}	neváže se (**) (+)	Uhlovodík (cyklický), ester	Plastifikátor, chemický meziprodukt
5	DES	56-53-1	*váže se*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	váže se	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	váže se	Uhlovodík (cyklický), fenol	Léčivý přípravek, veterinární látka
6	17α-ethynylestradiol	57-63-6	*váže se*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	váže se	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	váže se	Steroid	Léčivý přípravek, veterinární látka
7	Meso-Hexestrol	84-16-2	*váže se*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	váže se	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	váže se	Uhlovodík (cyklický), fenol	Léčivý přípravek, veterinární látka
8	Genistein	446-72-0	*váže se*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	váže se	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	váže se	Uhlovodík (hetero-cyklický), flavonoid	Přírodní produkt

▼M8

	Název látky	CASRN	Předpokládaná odpověď	Analýza FW		Analýza CERI		MESH Chemická třída	Třída produktu
				Koncentrace Rozsah (M)	Klasifikace	Koncentrace Rozsah (M)	Klasifikace		
9	Equol	531-95-3	*váže se*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	váže se	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	váže se	Fytoestrogenový metabolit	Přírodní produkt
10	Butylparaben (*n* butyl-4-hydroxyben-zoan)	94-26-8	*váže se*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	váže se	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	váže se	Paraben	Konzervant
11	Nonylfenol (směs)	84852-15-3	*váže se*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	váže se	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	váže se	Alkylfenol	Meziprodukt
12	*o,p'*-DDT	789-02-6	*váže se*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	váže se	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	váže se	Organochlor	Insekticid
13	Kortikosteron	50-22-6	*neváže se* (*)	1×10^{-10} – 1×10^{-4}	neváže se	1×10^{-10} – 1×10^{-4}	neváže se	Steroid	Přírodní produkt
14	Zearalenon	17924-92-4 Org.	*váže se*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	váže se	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	váže se	Uhlovodík (hetero-cyklický), lakton	Přírodní produkt
15	Tamoxifen	10540-29-1	*váže se*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	váže se	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	váže se	Uhlovodík (cyklický)	Léčivý přípravek, veterinární látka
16	5α-dihydrotestos-teron	521-18-6	*váže se*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	váže se	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	váže se	Steroid, nefenolový	Přírodní produkt
17	Bisfenol A	80-05-7	*váže se*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	váže se	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	váže se	Fenol	Chemický meziprodukt
18	4-*n*-heptylphenol	1987-50-4	*váže se*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	neurčité ([a])	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	váže se	Alkylfenol	Meziprodukt

▼M8

	Název látky	CASRN	Předpokládaná odpověď	Analýza FW		Analýza CERI		MESH Chemická třída	Třída produktu
				Koncentrace Rozsah (M)	Klasifikace	Koncentrace Rozsah (M)	Klasifikace		
19	Kepon (Chlordecon)	143-50-0	*váže se*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	váže se	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	váže se	Uhlovodík (halogenovaný)	Pesticid
20	Benzo(a)anthracen	56-55-3	*neváže se*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	neváže se ([b])	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	neváže se ([b])	Aromatický uhlovodík	Meziprodukt
21	Enterolakton	78473-71-9	*váže se*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	váže se	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	váže se	Fytoestrogen	Přírodní produkt
22	Progesteron	57-83-0	*neváže se* (*)	1×10^{-10} – 1×10^{-4}	neváže se	1×10^{-10} – 1×10^{-4}	neváže se	Steroid	Přírodní produkt
23	Oktyltriethoxysilan	2943-75-1	*neváže se*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	neváže se	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	neváže se	Silan	Povrchový modifikátor
24	Atrazin	1912-24-9	*neváže se* (*)	1×10^{-10} – 1×10^{-4}	neváže se	1×10^{-10} – 1×10^{-4}	neváže se	Heterocyklická sloučenina	Herbicid

(*) Mez rozpustnosti $< 1 \times 10^{-4}$M.

(**) Použití klasifikace di-n-butylftalátu (DBP) jako látky, která se neváže, vycházelo ze zkoušení do 10^{-4} M, protože v některých laboratořích bylo v průběhu předvalidačních studií pozorováno, že látka je nerozpustná při 10^{-3}M (např. zákal).

(+) V průběhu validační studie byl di-*n*-butylftalát (DBP) testován jako zakódovaná zkoušená látka při koncentracích do 10^{-3}M. Za těchto podmínek bylo v některých laboratořích pozorováno snížení vazby radioligandu při nejvyšší koncentraci (10^{-3}M) anebo nejednoznačné vynesení křivky. V těchto provedeních zkoušky byl DBP klasifikován v 3/5 laboratoří, které použily analýzu CERI, a v 5/6 laboratoří, které použily analýzu FW, jako „neurčitý“ nebo „váže se“ (viz odkaz (2), části IV.B.3a,b a VI.A).

([a]) Klasifikace neodpovídala očekávané klasifikaci. Vzhledem ke klasifikaci 4-*n*-heptylfenolu jako „neurčitý“ nebo „váže se“ v 3/5 laboratoří byla průměrná klasifikace neurčitá. Bližší kontrola odhalila, že to bylo způsobeno omezením chemické rozpustnosti, což zabránilo vzniku celé vazebné křivky.

([b]) Při předvalidační studii byl benz(a)antracen přeřazen mezi látky, které se nevážou (tj. negativní), a to na základě zveřejněné literatury prokazující, že estrogenní aktivita *in vitro* uváděná u této látky (16) závisí primárně na její metabolické aktivaci (17)(18). Enzymatická metabolická aktivace látky by se v nebuněčných analýzách vazby na hrER použitých v této mezilaboratorní validační studii nepředpokládala. Správná klasifikace této látky tedy je „neváže se“ při použití za experimentálních podmínek pro analýzy FW a CERI.

▼M8

SLOŽKY VAZEBNÉ ANALÝZY hrER

Zásadní složky zkoušky

14. Tato zkušební metoda platí pro analýzy používající receptor ER a vhodný silný ligand na receptor, který může být použit jako marker/stopovací látka pro analýzu a se zvyšujícími se koncentracemi zkoušené chemické látky může být vytěsněn. Vazebné analýzy sestávají z těchto dvou hlavních složek: 1) saturační vazby a 2) kompetitivní vazby. Saturační vazebná analýza se používá na potvrzení specifičnosti a aktivity receptorových přípravků, zatímco kompetitivní vazebný experiment se používá na vyhodnocení schopnosti zkoušené chemické látky vázat se na hrER.

Kontroly

15. Je třeba popsat východisko pro navrhované souběžné referenční zkoušky s estrogenem a kontroly. Souběžné kontroly (rozpouštědlo (vehikulum), pozitivní (vazba na ER; silná a slabá afinita), negativní (neváže se)) slouží podle potřeby jako indikace, že analýza je za zkušebních podmínek funkční a poskytuje základ pro porovnání jednotlivých experimentů; obvykle jsou součástí kritérií přijatelnosti pro daný experiment (1). Při každém provedení zkoušky by měly být na jedné destičce použity celé křivky koncentrace pro referenční estrogen a kontroly (tj. slabá vazba a neváže se). Všechny ostatní destičky by měly obsahovat: 1) vysokou (přibližně úplné vytěsnění radioizotopově značeného ligandu) a střední (přibližně IC_{50}) koncentraci každého E2 a látky se slabou vazbou, a to třikrát; 2) kontrolu s rozpouštědlem a látkou s nespecifickou vazbou, a to vždy třikrát.

Standardní postupy kontroly kvality

16. Standardní postupy řízení kvality by měly být prováděny tak, jak je popsáno pro každou analýzu, aby byly zajištěny aktivní receptory a správné koncentrace chemické látky a aby bylo zajištěno, že toleranční meze zůstanou u vícečetných replikátů stabilní a bude zachována schopnost podávat očekávané odpovědi vazby na ER v průběhu času.

Prokázání odborné způsobilosti laboratoře

17. Před zkoušením neznámých chemických látek pomocí některé z analýz v rámci této zkušební metody by měla každá laboratoř prokázat odbornou způsobilost v používání analýzy provedením saturačních zkoušek na potvrzení specifičnosti a aktivity přípravku ER a kompetitivních vazebných zkoušek s referenčním estrogenem a kontrolami (s látkou se slabou vazbou a látkou, která se neváže). Laboratoř by si měla vytvořit historickou databázi s výsledky za referenční estrogen a kontroly získanými z 3–5 nezávislých experimentů provedených v různé dny. Tyto experimenty budou základem pro referenční estrogen a historické kontroly pro tuto laboratoř a budou použity jako částečné hodnocení přijatelnosti analýzy pro budoucí zkoušky.

18. Odpovědi zkušebního systému budou potvrzeny také zkoušením vhodných látek uvedených v tabulce 2. Seznam vhodných látek představuje podmnožinu referenčních látek uvedených ve standardech funkčnosti pro analýzy vazby na ER (3). Tyto látky jsou komerčně dostupné, představují třídy chemických látek běžně souvisejících s vazebnou aktivitou na ER a vykazují vhodný rozsah síly očekávané od látek, které se vážou na ER (tj. silné až slabé), a látek, které se na ER neváží (tj. negativní). U každé látky pro prokázání způsobilosti by měly zkoušené koncentrace zahrnovat rozmezí uvedené v tabulce 2. Pro každou látku by se měly provést alespoň tři experimenty a výsledky by měly být v souladu s očekávanou chemickou aktivitou. Každý experiment by se měl provádět nezávisle (tj. s čerstvými roztoky zředěného receptoru, chemickými látkami a reagenciemi), a to se třemi opakováními u každé koncentrace. Odborná způsobilost je prokázána správnou klasifikací (pozitivní/negativní) každé vhodné látky. Zkoušení odborné způsobilosti by měl provést každý technik, který se analýzy učí.

▼M8

Tabulka 2

Seznam kontrolních látek a látek pro prokázání způsobilosti pro kompetitivní vazebné analýzy hrER [1]

Č.	Název látky	CASRN [2]	Předpokládaná odpověď [3] [4]	Rozpětí zkušebních koncentrací (M)	Třída chemických látek MeSH [5]	Třída produktu [6]
Kontroly (referenční estrogen, slabá vazba, neváže se)						
1	17-εστραδιολ	50-28-2	váže se	$1 \times 10^{-11} – 1 \times 10^{-6}$	Steroid	Léčivý přípravek, veterinární látka
2	Norethynodrel (nebo) Norethindron	68-23-5 (or) 68-22-4	váže se	$3 \times 10^{-9} – 30 \times 10^{-6}$	Steroid	Léčivý přípravek, veterinární látka
3	Oktyltriethoxysilan	2943-75-1	neváže se	$1 \times 10^{-10} – 1 \times 10^{-3}$	Silan	Povrchový modifikátor
Vhodné látky [6]						
4	Diethylstilbestrol	56-53-1	váže se	$1 \times 10^{-11} – 1 \times 10^{-6}$	Uhlovodík (cyklický), fenol	Léčivý přípravek, veterinární látka
5	17α-ethynylestradiol	57-63-6	váže se	$1 \times 10^{-11} – 1 \times 10^{-6}$	Steroid	Léčivý přípravek, veterinární látka
6	meso-Hexestrol	84-16-2	váže se	$1 \times 10^{-11} – 1 \times 10^{-6}$	Uhlovodík (cyklický), fenol	Léčivý přípravek, veterinární látka
7	Tamoxifen	10540-29-1	váže se	$1 \times 10^{-11} – 1 \times 10^{-6}$	Uhlovodík (cyklický)	Léčivý přípravek, veterinární látka
8	Genistein	446-72-0	váže se	$1 \times 10^{-10} – 1 \times 10^{-3}$	Heterocyklická sloučenina, flavonoid	Přírodní produkt
9	Bisfenol A	80-05-7	váže se	$1 \times 10^{-10} – 1 \times 10^{-3}$	Fenol	Chemický meziprodukt
10	Zearalonone	17924-92-4	váže se	$1 \times 10^{-11} – 1 \times 10^{-3}$	Heterocyklická sloučenina, lakton	Přírodní produkt

▼M8

Č.	Název látky	CASRN ([2])	Předpokládaná odpověď ([3]) ([4])	Rozpětí zkušebních koncentrací (M)	Třída chemických látek MeSH ([5])	Třída produktu ([6])
11	Butylparaben	94-26-8	váže se	$1 \times 10^{-11} – 1 \times 10^{-3}$	Kyselina karboxylová, fenol	Konzervant
12	Atrazin	1912-24-9	neváže se	$1 \times 10^{-11} – 1 \times 10^{-6}$	Heterocyklická sloučenina	Herbicid
13	Di-n-butylftalát (DBP) ([7])	84-74-2	neváže se ([8])	$1 \times 10^{-10} – 1 \times 10^{-4}$	Uhlovodík (cyklický), ester	Plastifikátor, chemický meziprodukt
14	Kortikosteron	50-22-6	neváže se	$1 \times 10^{-11} – 1 \times 10^{-4}$	Steroid	Přírodní produkt

([1]) Jestliže vhodná látka již není komerčně dostupná, může být použita látka se stejnou klasifikací vazby na ER, srovnatelnou sílou a ze stejné chemické třídy.
([2]) Zkratky: CASRN = registrační číslo CAS (Chemical Abstracts Service Registry Number)
([3]) Klasifikace jako látka, která se váže na ERα, nebo látka, která se neváže, v průběhu validační studie pro analýzy vazby na hrER CERI a FW (2).
([4]) Vazebná aktivita na ER vycházela z dokumentů výboru ICCVAM (BRD) pro analýzy vazby ER a TA (9) a z empirických údajů a dalších informací získaných ze zveřejněných a kontrolovaných citovaných studií (10)(11)(12)(13)(14)(15).
([5]) Látky byly zařazeny do jedné nebo několika chemických tříd s použitím klasifikačního systému Národní knihovny názvů léků a léčivých látek (MeSH), mezinárodně uznávané standardizované klasifikace (k dispozici na: http://www.nlm.nih.gov/mesh).
([6]) Látky byly zařazeny do jedné nebo několika produktových tříd podle databáze nebezpečných látek americké Národní knihovny léčiv (k dispozici na: http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB)
([7]) DBP může být použit jako alternativní kontrola, která se neváže, zkoušená při maximální koncentraci 10^{-4} M.
([8]) Mez rozpustnosti pro tuto látku je 10^{-4} M. Použití klasifikace di-n-butylftalátu (DBP) jako látky, která se neváže, vycházelo ze zkoušení do 10^{-4} M, protože v některých laboratořích bylo v průběhu předvalidačních studií pozorováno, že látka je nerozpustná při 10^{-3}M (např. zákal).

▼M8

Zkoušení rozpustnosti a stanovení rozsahu koncentrace pro zkoušené chemické látky

19. Měla by být provedena předběžná zkouška, aby bylo možné stanovit mez rozpustnosti pro každou zkoušenou chemickou látku a zjistit vhodný rozsah koncentrace, jenž má být použit při provádění zkoušky. Mez rozpustnosti každé zkoušené chemické látky se nejprve stanoví v rozpouštědle a dále potvrdí za zkušebních podmínek. Konečná koncentrace zkoušená při analýze by neměla překročit 1 nm. Zkoušení za účelem zjištění rozsahu sestává z kontroly s rozpouštědlem společně s osmi log-sériovými ředěními, počínaje maximální přijatelnou koncentrací (např. 1 mM nebo menší, na základě meze rozpustnosti), přičemž je třeba zaznamenat přítomnost zákalu nebo sraženiny. Při druhém a třetím experimentu by se měla podle potřeby upravit koncentrace, aby lépe charakterizovala křivku závislosti odpovědi na koncentraci.

Kritéria přijatelnosti provedení zkoušky

20. Přijetí nebo odmítnutí provedené zkoušky vychází z hodnocení výsledků získaných pro referenční estrogen a kontrolu použitou pro každý experiment. Za prvé, na destičce 1 by měly celé křivky koncentrace pro referenční kontroly z každého experimentu odpovídat mírám funkčnosti u parametrů vynesené křivky (např. IC_{50} a Hillův koeficient) podle výsledků uvedených pro příslušné protokoly pro analýzy CERI a FW (dodatek 2 a 3) a dosavadních kontrolních dat z laboratoře provádějící zkoušku. Všechny kontroly (referenční estrogen, slabá vazba a neváže se) by měly být u každého experimentu správně klasifikovány. Za druhé, u kontrol na všech dalších destičkách je třeba posuzovat, zda odpovídají destičce 1. Mělo by být použito dostatečné rozmezí koncentrací, aby byl jednoznačně definován vrchol kompetitivní vazebné křivky. Variabilita mezi replikáty při každé koncentraci zkoušené chemické látky i mezi třemi nezávislými provedeními zkoušky by měla být přiměřená a vědecky obhajitelná. Schopnost konzistentního provedení analýzy by měla být prokázána vytvořením a údržbou historické databáze referenčního estrogenu a kontrol. Jako měřítko vnitrolaboratorní reprodukovatelnosti mohou být použity směrodatné odchylky (SD) nebo variační koeficienty (CV) pro střední hodnoty parametrů stanovené křivky referenčního estrogenu a slabé vazby z vícečetných experimentů. Při posuzování výsledků kontrol z každého provedení zkoušky i výsledků za každou zkoušenou chemickou látku je třeba postupovat s odborným úsudkem.

Kromě toho by měly být splněny tyto zásady, pokud jde o kritéria přijatelnosti:

— Údaje by měly postačovat na kvantitativní posouzení vazby na ER.

— Zkoušené koncentrace by měly zůstat v rozmezí rozpustnosti zkoušené chemické látky.

Analýza údajů

21. Stanovený postup analýzy údajů o nasycené a kompetitivní vazbě by měl odpovídat hlavním zásadám pro charakterizaci interakcí mezi receptorem a ligandem. Údaje o nasycené vazbě se obvykle analyzují promocí nelineárního regresního modelu, který zohledňuje celkovou a nespecifickou vazbu. Při určování B_{max} a K_d může být nutná korekce úbytku ligandu (např. Swillens, 1995 (19)). Data z kompetitivních vazebných analýz se obvykle transformují (např. percentuální specifická vazba a koncentrace zkoušené chemické látky (log M)). Odhady log (IC_{50}) za každou zkoušenou chemickou látku se stanoví pomocí vhodného softwaru pro nelineární vynesení křivky, aby byly vhodné pro čtyřparametrickou

▼M8

Hillovu rovnici. Po první analýze je třeba stanovit parametry vynesené křivky a vizuálně zkontrolovat, jak dobře vazebná data odpovídají generované kompetitivní vazebné křivce. V některých případech může být nutná další analýza, aby byl dosažen nejlepší tvar křivky (např. omezení horní anebo dolní části křivky, použití pravidla 10 %, viz dodatek 4 a odkaz 2 (oddíl III.A.2).

22. Splnění kritérií přijatelnosti (odstavec 20) ukazuje, že systém funguje správně, ale nezaručuje to, že konkrétní provedení zkoušky podá přesné údaje. Opakování správných výsledků první zkoušky je nejlepším důkazem, že údaje byly přesné.

Obecná kritéria interpretace údajů

23. V současné době neexistuje žádná univerzálně akceptovaná metoda pro interpretaci údajů o vazbě na ER. Kvalitativní (např. váže se / neváže se) anebo kvantitativní (např. log iC_{50}, relativní vazebná afinita (RBA) atd.) posouzení aktivity zprostředkované hrER by však mělo vycházet z empirických údajů a řádného vědeckého úsudku.

ZÁVĚREČNÁ ZPRÁVA

24. Závěrečná zpráva by měla obsahovat tyto informace:

Analýza:

— použitá analýza

Kontrola / referenční látka / zkoušená chemická látka

— zdroj, číslo šarže a je-li k dispozici, datum použitelnosti,

— stabilita zkoušené chemické látky samotné, je-li známa,

— rozpustnost a stabilita zkoušené chemické látky v rozpouštědle, jsou-li známy,

— měření pH, osmolality a sraženiny v kultivačním médiu, do něhož byla podle potřeby přidána zkoušená chemická látka.

Jednosložková látka:

— fyzický vzhled, rozpustnost ve vodě a další relevantní fyzikálně-chemické vlastnosti,

— chemická identifikace, např. název IUPAC nebo CAS, číslo CAS, SMILES nebo kód InChI, strukturní vzorec, čistota, případně chemická identita nečistot, je-li to prakticky proveditelné atd.

Vícesložková látka, látka s neznámým nebo proměnlivým složením, komplexní reakční produkt nebo biologický materiál a směsi:

— charakterizované pokud možno chemickou identitou (viz výše), kvantitativním výskytem a relevantními fyzikálně-chemickými vlastnostmi složek.

▼**M8**

Rozpouštědlo/vehikulum:

— charakterizace (povaha, dodavatel a šarže),

— zdůvodnění volby rozpouštědla/vehikula,

— rozpustnost a stabilita zkoušené chemické látky v rozpouštědle/vehikulu, jsou-li známy,

Receptory:

— zdroj receptoru (dodavatel, katalogové číslo, šarže, druh receptoru, koncentrace aktivního receptoru uvedená dodavatelem, certifikace dodavatele),

— charakterizace receptorů (včetně výsledků nasycené vazby): K_d, B_{max},

— uchovávání receptorů,

— radioizotopově značený ligand:

— dodavatel, katalogové číslo, šarže, měrná aktivita.

Zkušební podmínky:

— meze rozpustnosti za podmínek zkoušky,

— složení vazebného pufru,

— koncentrace receptoru,

— koncentrace stopovací látky (tj. radioizotopově značený ligand),

— koncentrace zkoušené chemické látky,

— procento vehikula v konečné analýze,

— teplota a doba inkubace,

— způsob separace vázané/volné látky,

— pozitivní a negativní kontroly / referenční látky,

— kritéria klasifikace zkoušky na pozitivní, negativní nebo dvojznačnou.

Kontrola přijatelnosti:

— skutečné hodnoty IC_{50} a hodnoty Hillova koeficientu pro souběžné pozitivní kontroly / referenční látky.

Výsledky:

— naměřená data a data o vázaných/volných látkách,

— případně kontrola potvrzení denaturace,

— pokud existuje, nejnižší účinná koncentrace (LEC),

— hodnoty RBA a IC_{50} podle potřeby,

— závislost účinku na koncentraci, pokud je to možné,

— případné statistické analýzy společně s měřítkem chyby a spolehlivosti (např. SEM, SD, CV nebo 95 % CI) a popis, jak byly tyto hodnoty získány.

▼**M8**

Diskuse o výsledcích:

— uplatnění pravidla 10 %.

Závěr

LITERATURA

(1) OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (No 34), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(2) OECD (2015). Integrated Summary Report: Validation of Two Binding Assays Using Human Recombinant Estrogen Receptor Alpha (hrERα), Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 226), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(3) OECD (2015). Performance Standards for Binding Assays Using Human Recombinant Estrogen Receptor Alpha (hrERα), Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 222), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(4) OECD (2012). Guidance Document on Standardized Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (No 150), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(5) Cavailles V. (2002). Estrogens and Receptors: an Evolving Concept, Climacteric, 5 Suppl 2: p. 20-6.

(6) Welboren W.J., *et al.* (2009). Genomic Actions of Estrogen Receptor Alpha: What are the Targets and how are they Regulated? *Endocr*. Relat. Cancer., 16(4): p. 1073-89.

(7) Younes M. and Honma N. (2011). Estrogen Receptor Beta, Arch. *Pathol*. Lab. Med., 135(1): 63-6.

(8) Diamanti-Kandarakis *et al.* (2009). Endocrine-Disrupting Chemicals: an Endocrine Society Sci. Statement, Endo Rev 30(4):293-342.

(9) ICCVAM (2002). Background Review Document. Current Status of Test Methods for Detecting Endocrine Disruptors: *In Vitro* Estrogen Receptor Binding Assays. (NIH Publication No 03-4504). National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC.

(10) ICCVAM (2003). ICCVAM Evaluation of *In Vitro* Test Methods for Detecting Potential Endocrine Disruptors: Estrogen Receptor and Androgen Receptor Binding and Transcriptional Activation Assays.

(11) ICCVAM (2006). ICCVAM Evaluation of *In Vitro* Test Methods for Detecting Potential Endocrine Disruptors: Estrogen Receptor and Androgen Receptor Binding and Transcriptional Activation Assays.

(12) Akahori Y. *et al.* (2008). Relationship Between the Results of *In Vitro* Receptor Binding Assay to Human Estrogen Receptor Alpha and *In Vivo* Uterotrophic Assay: Comparative Study with 65 Selected Chemicals, *Toxicol*. *In Vitro*, 22(1): 225-231.

(13) OECD (2007). Additional Data Supporting the Test Guideline on the Uterotrophic Bioassay in Rodents, Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 67), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

▼**M8**

(14) Takeyoshi, M. (2006). Draft Report of Pre-validation and Inter-laboratory Validation For Stably Transfected Transcriptional Activation (TA) Assay to Detect Estrogenic Activity - The Human Estrogen Receptor Alpha Mediated Reporter Gene Assay Using hER-HeLa-9903 Cell Line, Chemicals Evaluation and Research Institute (CERI): Japan. p. 1-188.

(15) Yamasaki, K; Noda, S; Imatanaka, N; Yakabe, Y. (2004). Comparative Study of the Uterotrophic Potency of 14 Chemicals in a Uterotrophic Assay and their Receptor-Binding Affinity, Toxicol. Letters, 146: 111-120.

(16) Kummer V; Maskova, J; Zraly, Z; Neca, J; Simeckova, P; Vondracek, J; Machala, M. (2008). Estrogenic Activity of Environmental Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Uterus of Immature Wistar Rats. *Toxicol.* Letters, 180: 213-221.

(17) Gozgit, JM; Nestor, KM; Fasco, MJ; Pentecost, BT; Arcaro, KF. (2004). Differential Action of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons on Endogenous Estrogen-Responsive Genes and on a Transfected Estrogen-Responsive Reporter in MCF-7 Cells. *Toxicol. and Applied Pharmacol*., 196: 58-67.

(18) Santodonato, J. (1997). Review of the Estrogenic and Antiestrogenic Activity of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Relationship to Carcinogenicity. Chemosphere, 34: 835-848.

(19) Swillens S (1995). Interpretation of Binding Curves Obtained with High Receptor Concentrations: Practical Aid for Computer Analysis, Mol Pharmacol 47(6):1197-1203.

▼**M8**

Dodatek 1

DEFINICE A ZKRATKY

Pravidlo 10 %: Možnost vyloučit z analýz datové body, pokud je průměr replikátů pro procento specifické vazby [^{3}H]17β-estradiolu o 10 % nebo více nad hodnotu pozorovanou u střední hodnoty při nižší koncentraci (viz dodatek 4).

Kritéria přijatelnosti: Minimální pravidla pro výkonnost experimentálních kontrol a referenčních standardů. Aby se experiment mohl považovat za platný, měla by být splněna všechna kritéria přijatelnosti.

Přesnost (soulad): Přesnost shody mezi výsledky analýzy a přijatými referenčními hodnotami. Je to měřítko funkčnosti analýzy a jeden z aspektů relevance. Tento pojem se často používá místo pojmu „soulad“ a rozumí se jím podíl správných výsledků analýzy (1).

CF: Koncepční rámec OECD pro zkoušky a hodnocení endokrinních distruptorů.

Chemická látka: Látka nebo směs.

CV: Variační koeficient.

E2: 17β-estradiol.

ED: Narušení endokrinní činnosti.

hERα: Lidský estrogenový receptor alfa.

ER: Estrogenový receptor.

Estrogenní aktivita: Schopnost chemické látky napodobit schopnost 17β-estradiolu vázat se na estrogenové receptory. Touto zkušební metodou lze detekovat vazbu na hERα.

IC 50: Poloviční maximální účinná koncentrace inhibiční zkoušené chemické látky.

ICCVAM: Meziagenturní koordinační výbor pro validaci alternativních metod.

Mezilaboratorní reprodukovatelnost: Míra, v jaké mohou různé kvalifikované laboratoře za použití stejného protokolu a při testování stejných látek získat kvalitativně a kvantitativně podobné výsledky. Mezilaboratorní reprodukovatelnost se určuje během předvalidačních a validačních postupů a ukazuje, do jaké míry lze analýzu úspěšně přenášet mezi různými laboratořemi (1).

Vnitrolaboratorní reprodukovatelnost: Určení míry, v jaké může kvalifikovaný personál ve stejné laboratoři jindy úspěšně dosáhnout stejných výsledků za použití určitého protokolu. Označuje se také jako „reprodukovatelnost v rámci laboratoře“ (1).

LEC: Nejnižší účinná koncentrace je nejnižší koncentrace zkoušené chemické látky, která dává odpověď (tj. nejnižší koncentrace zkoušené chemické látky, při níž je násobná indukce statisticky odlišná od souběžné kontroly vehikulem).

▼M8

Zkouška typu „me-too“: Hovorový výraz pro analýzu, která je strukturálně a funkčně podobná validované a uznávané referenční zkušební metodě. Používá se namísto podobné zkušební metody.

PBTG: Pokyn vycházející z funkční způsobilosti.

Standardy funkčnosti: Standardy založené na validované zkušební metodě, které slouží jako základ pro hodnocení srovnatelnosti navrhované analýzy, která je mechanicky a funkčně podobná. Zahrnují 1) zásadní složky analýzy; 2) minimální seznam srovnávacích látek vybraných z chemických látek používaných k prokázání přijatelné funkčnosti validované referenční metody; a 3) srovnatelné hladiny přesnosti a spolehlivosti založené na hodnotách získaných u validované zkušební metody, jež by navrhovaná analýza měla prokázat při vyhodnocení za použití minimálního seznamu srovnávacích látek (1).

Vhodné látky: Podsoubor referenčních látek zařazených do standardů funkčnosti, které mohou laboratoře použít k prokázání způsobilosti k provádění standardizované analýzy. Kritéria výběru u těchto látek obvykle zahrnují to, že reprezentují celou škálu odpovědí, jsou komerčně dostupné a jsou k nim dostupné kvalitní referenční údaje.

Způsobilost: Prokázaná schopnost řádně provést analýzu před zkoušením neznámých látek.

Referenční estrogen: 17ß-estradiol (E2, CAS 50-28-2).

Referenční zkušební metody: Analýzy, z nichž vychází pokyn PBTG č. 493.

RBA: Relativní vazebná afinita. RBA látky se vypočítá jako procento log (IC_{50}) pro látku vzhledem k log (IC_{50}) pro 17β-estradiol.

Relevantnost: Popis vztahu analýzy k účinku, který je předmětem zájmu, a také toho, zda je analýza smysluplná a použitelná pro konkrétní účel. Vyjadřuje, do jaké míry analýza správně měří nebo predikuje biologický účinek, který je předmětem zájmu. Relevantnost zahrnuje také posouzení přesnosti (shody) analýzy (1).

Spolehlivost: Míra rozsahu, v jakém může být analýza časem reprodukovatelná v laboratořích a mezi laboratořemi, když se provádí s použitím stejného protokolu. Vyhodnocuje se na základě výpočtu vnitrolaboratorní a mezilaboratorní reprodukovatelnosti.

SD: Směrodatná odchylka.

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

Validovaná zkušební metoda: Analýza, u níž byly provedeny validační studie k určení její relevantnosti (včetně přesnosti) a spolehlivosti pro konkrétní účel. Je důležité si uvědomit, že validovaná zkušební metoda nemusí mít dostatečnou funkčnost, pokud jde o přesnost a spolehlivost, aby mohla být shledána přijatelnou pro navrhovaný účel (1).

Validace: Proces, při němž je stanovena spolehlivost a relevance konkrétního přístupu, metody, analýzy, procesu nebo hodnocení pro definovaný účel (1).

▼**M8**

Dodatek 2

FREYBERGER-WILSONOVA (FW) IN VITRO SATURAČNÍ ANALÝZA A ANALÝZA KOMPETITIVNÍ VAZBY NA ESTROGENOVÝ RECEPTOR (ERA) S VYUŽITÍM CELÉ DÉLKY LIDSKÉHO REKOMBINANTNÍHO ERA

VÝCHOZÍ ÚVAHY A OMEZENÍ (VIZ TAKÉ VŠEOBECNÝ ÚVOD)

1. Tato *in vitro* analýza saturace a kompetitivní vazby na estrogenový receptor (ERα) používají celou délku lidského receptoru ERαα(hrERα), který je vytvořen a izolován z buněk hmyzu infikovaných bakulovirem. Protokol, který vypracovali Freyberger a Wilson, prošel mezinárodní validační studií v několika laboratořích (2), která prokázala jeho relevanci a spolehlivost pro zamýšlený účel analýzy.

2. Tato analýza je screeningovým postupem pro určení látek, které se mohou vázat na hrERα v celé délce. Používá se na určení schopnosti zkoušené chemické látky konkurovat 17β-estradiolu ve vazbě na hrERα. Výsledky kvantitativní analýzy mohou zahrnovat IC_{50} (míra koncentrace zkoušené chemické látky potřebná na vytěsnění poloviny [^{3}H]-17β-estradiolu z hrERα) a relativní vazebné afinity zkoušených chemických látek pro hrERα v porovnání s 17β-estradiol. Pro účely chemického screeningu mohou přijatelné výsledky kvalitativní analýzy zahrnovat klasifikace zkoušených chemických látek jako látek, které se vážou na hrERα, látek, které se na něj nevážou, nebo látek neurčitých, a to na základě kritérií popsaných u vazebných křivek.

3. Analýza používá radioaktivní ligand, což vyžaduje, aby laboratoř měla povolení nakládat s radioaktivními materiály. Při používání radioizotopů a nebezpečných chemických látek musí být dodržovány předpisy a postupy stanovené vnitrostátními právními předpisy.

4. Před použitím této analýzy pro regulační účely je třeba přečíst si části „**VŠEOBECNÝ ÚVOD**“ a „**SLOŽKY VAZEBNÉ ANALÝZY hrER**“. Definice a zkratky používané v této zkušební metodě jsou popsány v dodatku 1.

PRINCIPY ANALÝZY (VIZ TAKÉ VŠEOBECNÝ ÚVOD)

5. Test vazby na hrERα měří schopnost radioizotopově značeného ligandu ([3H]17β-estradiol) vázat se na ER v přítomnosti zvyšujících se koncentrací zkoušené chemické látky (tj. kompetitor). Zkoušené chemické látky, které mají vysokou afinitu na ER, konkurují radioizotopově značenému ligandu při nižší koncentraci v porovnání s chemickými látkami s nižší afinitou na tento receptor.

6. Tato analýza sestává ze dvou hlavních složek: saturačního vazebného experimentu za účelem charakterizace parametrů interakce mezi receptorem a ligandem a dokumentace specifičnosti ER, po němž následuje kompetitivní vazebný experiment, který charakterizuje kompetici mezi zkoušenou chemickou látkou a radioizotopově značeným ligandem ve vazbě na ER.

7. Účelem saturačního vazebného experimentu je charakterizovat konkrétní šarži receptorů z hlediska vazebné afinity a počtu při přípravě na kompetitivní vazebný experiment. Saturační vazebný experiment měří za rovnovážných podmínek afinitu pevně stanovené koncentrace estrogenového receptoru na jeho přirozený ligand (představovaný disociační konstantou K_d) a koncentraci míst aktivního receptoru (B_{max}).

▼**M8**

8. Kompetitivní vazebný experiment měří afinitu látky konkurovat [3H]17β-estradiolu ve vazbě na ER. Afinita je kvantifikována koncentrací zkoušené chemické látky, která za rovnovážného stavu inhibuje 50 % specifické vazby [3H]17β-estradiolu (nazývá se „50 % inhibiční koncentrace“ nebo IC_{50}). Může se hodnotit také pomocí relativní vazebné afinity (RBA, vzhledem k IC_{50} estradiolu měřené samostatně při stejném provedení zkoušky). Kompetitivní vazebný experiment měří vazbu [3H]17β-estradiolu při pevně stanovené koncentraci v přítomnosti širokého rozmezí (osm řádů) koncentrací zkoušené chemické látky. Data se poté vynesou pokud možno do určité formy Hillovy rovnice (Hill, 1910), která popisuje vytěsnění radioligandu kompetiční látkou s jedním vazebným místem. Rozsah vytěsnění radioizotopově značeného estradiolu v rovnovážném stavu se používá na charakterizaci zkoušené chemické látky jako látky, která se váže, která se neváže nebo která generuje neurčitou odpověď.

POSTUP

Prokázání funkční způsobilosti proteinu hrERα

9. Před rutinním prováděním saturačních a kompetitivních vazebných analýz by mělo být u každé nové šarže hrERα prokázáno, že v laboratoři, v níž bude používán, funguje správně. K prokázání způsobilosti by se měl použít proces zahrnující dva kroky. Jsou to tyto kroky:

— Proveďte saturační vazebnou analýzu [^{3}H]-17β-estradiolu na prokázání specifičnosti a saturace hrERα. V nelineární regresní analýze těchto dat (např. BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995) a na následném Scatchardově grafu by měla být dokumentována vazebná afinita hrERα vůči [^{3}H]-17β-estradiolu (K_d) a počet receptorů (B_{max}) pro každou šarži hrERα.

— Proveďte kompetitivní vazebnou analýzu pomocí kontrolních látek (referenčního estrogenu (17β-estradiol)), látky se slabou vazbou (např. norethynodrel nebo norethindron) a látky, která se neváže (oktyltriethoxysilan, OTES). Každá laboratoř by si měla vytvořit historickou databázi dokumentující konzistentnost hodnot IC_{50} a dalších relevantních hodnot pro referenční estrogen a látku se slabou vazbou u experimentů a různých šarží hrERα. Parametry kompetitivních vazebných křivek pro kontrolní látky by měly být v rozmezí 95 % konfidenčního intervalu (viz tabulka 1), který byl stanoven pomocí dat z laboratoří, jež se účastnily validační studie pro tuto analýzu (2).

Tabulka 1

Kritéria výkonnosti vypracovaná pro referenční estrogen a látku se slabou vazbou, vazebná analýza FW hrER

Látka	Parametr	Střední hodnota [a]	Směrodatná odchylka (n)	95 % konfidenční intervaly [b]	
				Dolní mez	Horní mez
17β-estradiol	Horní (%)	100,44	10,84 (67)	97,8	103,1
	Dolní (%)	0,29	1,25 (67)	–0,01	0,60
	Hillův koeficient	–1,06	0,20 (67)	–1,11	–1,02
	$logIC_{50}$ (M)	–8,92 ()	0,18 (67)	–8,97	–8,88

▼M8

Látka	Parametr	Střední hodnota [a]	Směrodatná odchylka (n)	95 % konfidenční intervaly [b]	
				Dolní mez	Horní mez
Norethynodrel	Horní (%)	99,42	8,90 (68)	97,27	101,60
	Dolní (%)	2,02	3,42 (68)	1,19	2,84
	Hillův koeficient	–1,01	0,38 (68)	–1,10	–0,92
	log IC_{50} (M)	–6,39	0,27 (68)	–6,46	–6,33
Norethindrone [c]	Horní (%)	96,14	8,44 (27)	92,80	99,48
	Dolní (%)	2,38	5,02 (27)	0,40	4,37
	Hillův koeficient	–1,41	0,32 (27)	–1,53	-1,28
	logIC_{50} (M)	–5,73	0,27 (27)	–5,84	–5,62

([a]) Střední hodnota (n) ± směrodatná odchylka (SD) byly vypočítány pomocí odhadu parametrů vynesené křivky (4parametrická Hillova rovnice) pro kontrolní zkoušky provedené ve čtyřech laboratořích při validační studii (viz příloha N k odkazu 2).

([b]) 95 % konfidenční intervaly jsou uvedeny jako vodítko pro kritéria přijatelnosti.

([c]) Testování norethindronu bylo ve validační studii v dílčím úkolu 4 volitelné (viz odkaz 2, viz dílčí úkol 4). Střední hodnota ± (SD) (n) byla tedy vypočítána pomocí odhadu vynesené křivky (4parametrická Hillova rovnice) pro kontrolní zkoušky provedené ve dvou laboratořích.
Rozsah IC_{50} *bude záviset na Kd receptorového přípravku a koncentraci radioizotopově značeného ligandu použitého v každé laboratoři. Vhodná úprava rozsahu* IC_{50} *podle podmínek použitých při provádění analýzy bude přijatelná.*

Prokázání odborné způsobilosti laboratoře

10. Viz odstavce 17 a 18 a tabulka 2 v části „**SLOŽKY VAZEBNÉ ANALÝZY hrER**“ této zkušební metody. Každá analýza (saturační a kompetitivní vazby) by měla zahrnovat tři nezávislé zkoušky (tzn. s čerstvě naředěným receptorem, chemickými látkami a reagenciemi) provedené v různé dny, přičemž každé provedení by mělo obsahovat tři opakování.

Určení koncentrace receptoru (hrERα)

11. Koncentrace aktivního receptoru se poněkud liší podle šarže a podmínek uchovávání. Z tohoto důvodu je třeba stanovit koncentraci aktivního receptoru přijatého od dodavatele. Získá se tím vhodná koncentrace aktivního receptoru v době provedení zkoušky.

12. Za podmínek odpovídajících kompetitivní vazbě (tj. 1 nM [^{3}H]-estradiol) by se měly nominální koncentrace receptoru 0,25, 0,5, 0,75 a 1 nM inkubovat v nepřítomnosti (celková vazba) a v přítomnosti (nespecifická vazba) 1 μM neznačeného estradiolu. Specifická vazba vypočítaná jako rozdíl celkové a nespecifické vazby se nanese proti nominální koncentraci receptoru. Koncentrace receptoru, která dává hodnoty specifické vazby odpovídající 20 % přidaného radioizotopového značení, souvisí s odpovídající nominální koncentrací receptoru a tato koncentrace receptoru se používá pro saturační a kompetitivní vazebné experimenty. Často bude tuto podmínku splňovat konečná koncentrace hrER 0,5 nM.

▼M8

13. Jestliže nelze opakovaně splnit 20 % kritérium, je třeba zkontrolovat, zda uspořádání experimentu neobsahuje možné chyby. Nedosažení 20 % kritéria může ukazovat, že v rekombinantní šarži je příliš málo aktivního receptoru, a potom je třeba zvážit použití jiné šarže receptoru.

Saturační analýza

14. Hodnotí se osm zvyšujících se koncentrací [^{3}H]17β-estradiolu v trojím provedení, a to za těchto tří podmínek (viz tabulka 2):

— Za nepřítomnosti neznačeného 17β-estradiolu a v přítomnosti ER. Je to stanovení celkové vazby měřením radioaktivity v jamkách, v nichž je pouze [3H]17β-estradiol.

— V přítomnosti tisícinásobně zvýšené koncentrace neznačeného 17β-estradiolu nad značený 17β-estradiol a v přítomnosti ER. Záměrem této podmínky je saturovat aktivní vazebná místa neznačeným 17β-estradiolem a změřením radioaktivity v jamkách stanovit nespecifickou vazbu. Případný zbývající radioaktivní estradiol, který se může vázat na receptor, se považuje za navázaný na nespecifické místo, neboť neradioaktivní estradiol by měl být v tak vysoké koncentraci, aby se navázal na všechna dostupná specifická místa na receptoru.

— Za nepřítomnosti neznačeného 17β-estradiolu a nepřítomnosti ER (stanovení celkové radioaktivity)

Příprava roztoků [^{3}H]-17β-estradiolu a neznačeného 17β-estradiolu

15. Zředěné roztoky [^{3}H]-17β-estradiolu se připravují přidáním zkušebního pufru do 12 nM zásobního roztoku [^{3}H]-17β-estradiolu, aby se získaly koncentrace v počátečním rozsahu od 0,12 nM do 12 nM. Přidáním 40 µl těchto roztoků do příslušných jamek 96jamkové mikrotitrační destičky (v konečném objemu 160 µl) se získají konečné zkušební koncentrace v rozsahu od 0,03 do 3,0 nM. Příprava zkušebního pufru, zásobního roztoku [^{3}H]-17β-estradiolu a zředěných roztoků a stanovení koncentrací je podrobně popsáno v protokolu FW (2).

16. Zředěné etanolové roztoky 17β-estradiolu se připravují přidáním zkušebního pufru, aby bylo dosaženo osmi zvyšujících se koncentrací v počátečním rozsahu od 0,06 µM do 6 µM. Přidáním 80 µl těchto roztoků do příslušných jamek 96jamkové mikrotitrační destičky (v konečném objemu 160 µl) se získají konečné zkušební koncentrace v rozsahu od 0,03 µM do 3,0 µM. Konečná koncentrace neznačeného 17β-estradiolu v jednotlivých jamkách nespecifické vazebné analýzy by měla být tisícinásobkem koncentrace značeného [^{3}H]-17β- estradiolu. Příprava roztoků neznačeného 17β-estradiolu je podrobně popsána v protokolu FW (2).

17. Měla by se použít taková nominální koncentrace receptoru, která dává specifickou vazbu 20 ± 5 % (viz odstavce 12–13). Roztok hrERα je třeba připravovat bezprostředně před použitím.

18. 96jamkové mikrotitrační destičky se připraví tak, jak je zobrazeno v tabulce 2, a to s třemi replikáty na každou koncentraci. Příklad uspořádání koncentrací a objemů [^{3}H]-17β-estradiolu, neznačeného 17β-estradiolu, pufru a receptoru je uveden v dodatku 2.2.

▼M8

Tabulka 2

Uspořádání mikrotitrační destičky při saturační vazebné analýze

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	0,03 nM [^{3}H] E2 + ER			0,06 nM [^{3}H] E2 + ER			0,08 nM [^{3}H] E2 + ER			0,10 nM [^{3} H] E2 + ER			Celková vazba (rozpouštědlo)
B	0,30 nM [^{3}H] E2 + ER			0,60 nM [^{3}H] E2 + ER			1,0 nM [^{3}H] E2 + ER			3,0 nM [^{3}H] E2 + ER			
C													
D	0,03 nM [^{3}H] E2 + ER + 0,03 μM E2			0,06 nM [^{3}H] E2 + ER + 0,06 μM E2			0,08 nM [^{3}H] E2 + ER + 0,08 μM E2			0,10 nM [3H] E2 + ER+ 0,10 μM E2			Nespecifická vazba
E	0,30 nM [^{3}H] E_2 + ER + 0,30 μM E2			0,60 nM [^{3}H] E2 + ER + 0,60 μM E2			1,0 nM [^{3}H] E_2 + ER + 1,0 μM E_2			3,0 nM [^{3}H] E2 + ER + 3,0 μM E2			
F													
G													
H													

[3H] E2:: [3H]-17β-estradiol
ER:: estrogenový receptor
E2:: neznačený 17β-estradiol

19. Experimentální mikrotitrační destičky se inkubují při 2–8 °C po dobou 16 až 20 hodin a v průběhu inkubace se umístí na otáčecí podložku.

Měření [3H]-17β-estradiolu navázaného na hrERα

20. [^{3}H]-17β-estradiol navázaný na hrERα se separuje z volného [^{3}H]-17β-estradiolu přidáním 80 μl studené suspenze DCC do každé jamky, mikrotitrační destičky se protřepávají po dobu 10 minut a odstřeďují po dobu 10 minut při 2 500 ot./min. Aby se v průběhu tohoto procesu minimalizovala disociace vázaného [^{3}H]-17β-estradiolu z hrERα, je velmi důležité, aby byly pufry i experimentální jamky udržovány při teplotě mezi 2 a 8 °C a aby byl každý krok proveden rychle. Pro efektivní a rychlé zpracování destiček je nezbytná třepačka na mikrotitrační destičky.

21. Poté se velmi opatrně odebere 50 μl supernatantu obsahujícího [^{3}H]-17β-estradiol navázaný na hrERα, aby nedošlo ke kontaminaci jamek dotykem DCC, a umístí se na druhou mikrotitrační destičku.

22. Pak se do každé jamky přidá 200 μl scintilační kapaliny, schopné přeměnit kinetickou energii jaderných emisí na světelnou energii (A1–B12 a D1 až E12). Jamky G1–H12 (označené jako celkové dpm) představují sériové naředěné roztoky [^{3}H]-17β-estradiolu (40 μl), které je třeba přemístit přímo do scintilační kapaliny v jamkách měřicí destičky, jak je vyznačeno v tabulce 3, tj. tyto jamky obsahují pouze 200 μl scintilační kapaliny a příslušně naředěný roztok [3H]-17β-estradiolu. Tato měření ukazují, kolik [^{3}H]-17β-estradiolu v dpm bylo přidáno do každé sady jamek pro celkovou vazbu a nespecifickou vazbu.

▼M8

Tabulka 3

Uspořádání mikrotitrační destičky při saturační vazebné analýze, měření radioaktivity

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	0,03 nM [^{3}H] E2 + ER			0,06 nM [^{3}H] E2 + ER			0,08 nM [^{3}H] E2 + ER			0,10 nM [^{3} H] E2 + ER			Celková vazba (rozpouštědlo)
B	0,30 nM [^{3}H] E2 + ER			0,60 nM [^{3}H] E2 + ER			1,0 nM [^{3}H] E2 + ER			3,0 nM [^{3}H] E2 + ER			
C													
D	0,03 nM [^{3}H] E2 + ER + 0,03 μM E2			0,06 nM [^{3}H] E2 + ER + 0,06 μM E2			0,08 nM [^{3}H] E2 + ER + 0,08 μM E2			0,10 nM [^{3}H] E2 + ER+ 0,10 μM E2			Nespecifická vazba
E	0,30 nM [^{3}H] E2 + ER + 0,30 μM E2			0,60 nM [^{3}H] E2 + ER + 0,60 μM E2			1,0 nM [^{3}H] E_2 + ER + 1,0 μM E_2			3,0 nM [^{3}H] E2 + ER + 3,0 μM E2			
F													
G	0,03 nM [3H] E2 (dpm celkem)			0,06 nM [3H] E2			0,08 nM [3H] E2			0,10 nM [3H] E2			Celkem dpm (*)
H	0,30 nM [^{3}H] E2			0,60 nM [^{3}H] E2			1,0 nM [^{3}H] E2			3,0 nM [^{3}H] E2			

[3H] E2:: [3H]-17β-estradiol
ER:: estrogenový receptor
E2:: neznačený 17β-estradiol
dpm:: rozpady za minutu
(*) Radioaktivní sériová ředění [^{3}H]-značeného estradiolu se zde přidávají přímo do 200 μl scintilační kapaliny v jamkách G1–H12.

23. Měření by mělo být zahájeno se zpožděním alespoň 2 hodiny a doba počítání by měla být 40 minut na jamku. Ke stanovení dpm/jamku s korekcí na zhášení se používá scintilační spektrometr mikrotitračních destiček. Není-li k dispozici scintilační spektrometr pro mikrotitrační destičky, mohou se vzorky alternativně měřit klasickým spektrometrem. Za těchto podmínek může být zváženo zkrácení doby počítání.

Kompetitivní vazebná analýza

24. Kompetitivní vazebná analýza měří vazbu jedné koncentrace [^{3}H]17β-estradiolu v přítomnosti zvyšujících se koncentrací zkoušené chemické látky. Při každé koncentraci by se měly v jednom provedení zkoušky použít tři souběžné replikáty. Kromě toho by se měla pro každou zkoušenou chemickou látku provést tři nesouběžná provedení zkoušky. Analýza se provádí v jedné nebo několika 96jamkových mikrotitračních destičkách.

Kontrolys

25. Při provádění analýzy by měly být do každého experimentu zařazeny souběžné testy s rozpouštědlem a kontroly (tj. referenční estrogen, slabá vazba a neváže se). Při každém provedení zkoušky by měly být na jedné destičce použity celé křivky koncentrace pro referenční estrogen a kontroly (tj. slabá vazba a neváže se). Všechny ostatní destičky by měly obsahovat i) vysokou (maximální vytěsnění) a střední (přibližně IC_{50}) koncentraci každého E2 a látky se slabou vazbou, a to třikrát; ii) kontrolu s rozpouštědlem a látkou s nespecifickou vazbou, a to vždy alespoň třikrát. Postupy pro přípravu experimentálního pufru, kontrol, [^{3}H]-17β-estradiolu, hrERα a roztoků zkoušených chemických látek jsou popsány v odkazu 2 (příloha K, viz protokol pro analýzu FW).

▼**M8**

Kontrola s rozpouštědlem:

26. Kontrola s rozpouštědlem ukazuje, že rozpouštědlo nereaguje se zkušebním systémem, a měří také celkovou vazbu (TB). Nejvhodnějším rozpouštědlem je ethanol. Jestliže nejvyšší koncentrace zkoušené chemické látky není rozpustná v ethanolu, může být alternativně použit DMSO. Koncentrace ethanolu nebo DMSO, je-li použit, v jamkách pro konečnou analýzu je 1,5 % a nesmí překročit 2 %.

Kontrola s pufrem:

27. Kontrola s pufrem (BC) by neměla obsahovat rozpouštědlo ani zkoušenou chemickou látku, ale všechny ostatní složky analýzy. Výsledky kontroly s pufrem se porovnají s kontrolou s rozpouštědlem za účelem ověření, že použité rozpouštědlo neovlivňuje zkušební systém.

Látka se silnou vazbou (referenční estrogen)

28. 17β-estradiol (CAS 50-28-2) je endogenní ligand a váže se s vysokou afinitou na ER, podtyp alfa. Pro každou kompetitivní vazebnou analýzu hrERα by měla být vypracována standardní křivka s použitím neznačeného 17β-estradiolu, aby bylo možné posoudit variabilitu při provádění analýzy v čase ve stejné laboratoři. Připraví se osm roztoků neznačeného 17β-estradiolu v ethanolu, přičemž koncentrace v jamkách jsou v rozmezí 100 nM–10 pM (od –7[logM] do –11[logM]), a to v těchto rozestupech: (–7[logM], –8[logM], –8,5[logM], –9[logM], –9,5[logM], –10[logM], –11[logM]). Nejvyšší koncentrace neznačeného 17β-estradiolu (1 μM) slouží také jako indikátor nespecifické vazby. Tato koncentrace je v tabulce 4 odlišena označením „NSB“, ačkoliv je také součástí standardní křivky.

Látka se slabou vazbou

29. Měla by být zařazena látka se slabou vazbou (norethynodrel (CAS 68-23-5) nebo norethindron (CAS 68-22-4)), aby se prokázala citlivost každého experimentu a aby se umožnilo posouzení variability při provádění analýzy v čase. Připraví se osm roztoků látky se slabou vazbou v ethanolu, přičemž koncentrace v jamkách jsou v rozmezí od 3 nM do 30 μM (od –8,5[logM] do –4,5[logM]), a to v těchto rozestupech: –4,5[logM], –5[logM], –5,5[logM], –6[logM], –6,5[logM], –7[logM], –7,5[logM], –8,5[logM].

Látka, která se neváže

30. Jako negativní kontrola (látka, která se neváže) se používá oktyltriethoxysilan (OTES, CAS 2 943-75-1). Poskytuje jistotu, že analýza, tak jak je prováděna, dokáže detekovat, když se zkoušené chemické látky nenavážou na hrERα. Připraví se osm roztoků látky, která se neváže, v ethanolu, přičemž koncentrace v jamkách jsou v rozmezí od 0,1 nM do 1 000 μM (od –10[logM] do –3[logM]), a to v logaritmických přírůstcích. Jako alternativní kontrolní látka, která se neváže, může být použit di-*n*-butylftalát (DBP). Bylo prokázáno, že jeho maximální rozpustnost je–4[logM].

Koncentrace hrERα

31. Mělo by se použít takové množství receptoru, které dává specifickou vazbu 20 ± 5 % 1 nM radioligandu (viz odstavce 12–13 v dodatku 2). Roztok hrERα je třeba připravovat bezprostředně před použitím.

[3H]-17β-estradiol

32. Koncentrace [^{3}H]-17β-estradiolu v jamkách by měla být 1,0 nM.

▼**M8**

Zkoušené chemické látky

33. V první řadě je třeba provést zkoušku rozpustnosti, aby bylo možné stanovit mez rozpustnosti pro každou zkoušenou chemickou látku a zjistit vhodný rozsah koncentrace, jenž má být použit při provádění zkušebního protokolu. Mez rozpustnosti každé zkoušené chemické látky se nejprve stanoví v rozpouštědle a dále potvrdí za zkušebních podmínek. Konečná koncentrace zkoušená při analýze by neměla překročit 1 mM. Zkoušení za účelem zjištění rozsahu sestává z kontroly s rozpouštědlem společně s 8 log-sériovými ředěními, počínaje maximální přijatelnou koncentrací (např. 1 mM nebo menší, na základě meze rozpustnosti), přičemž je třeba zaznamenat přítomnost zákalu nebo sraženiny (viz také odstavec 35). Zkoušená chemická látka by měla být testována s použitím 8 logaritmických křivek koncentrací v rozestupech definovaných předchozí zkouškou ke stanovení rozsahu. Při druhém a třetím experimentu by se měla podle potřeby upravit koncentrace, aby lépe charakterizovala křivku závislosti odpovědi na koncentraci.

34. Zkoušená chemická látka se naředí ve vhodném rozpouštědle (viz odstavec 26 v dodatku 2). Jestliže nejvyšší koncentrace zkoušené chemické látky není rozpustná v ethanolu ani v DMSO a přidání většího množství rozpouštědla by způsobilo, že koncentrace rozpouštědla v poslední zkumavce bude větší než přijatelná mez, může se nejvyšší koncentrace snížit na nejbližší nižší koncentraci. V tomto případě může být na dolní konec série koncentrací přidána další koncentrace. Ostatní koncentrace v sérii by měly zůstat beze změny.

35. Roztoky zkoušené chemické látky je třeba po přidání do jamky pečlivě sledovat, neboť zkoušená chemická látka se může po přidání do jamky srážet. Data za všechny jamky, které obsahují sraženinu, by měla být vyloučena z vynesené křivky a měl by být uveden důvod pro vyloučení těchto dat.

36. Jestliže již existují informace z jiných zdrojů, které uvádějí log(IC_{50}) zkoušené chemické látky, může být vhodné stanovit geometrické rozestupy ředění (tj. 0,5 log jednotky kolem předpokládané hodnoty log(IC_{50})). Konečný výsledek by měl odrážet dostatečný rozsah koncentrací na každé straně log(IC_{50}), včetně „horní“ a „dolní“, aby vazebná křivka mohla být adekvátně charakterizována.

Uspořádání zkušebních destiček

37. Připraví se označené mikrotitrační destičky pro šestinásobné inkubace s kódy pro kontrolu s rozpouštědlem, nejvyšší koncentraci referenčního estrogenu, který slouží také jako indikátor nespecifické vazby (NSB), a kontrolu s pufrem a pro trojnásobné inkubace s kódy pro každou z osmi koncentrací kontrolní látky, která se neváže (oktyltriethoxysilan), sedm nižších koncentrací pro referenční estrogen, osm úrovní koncentrace látky se slabou vazbou a osm koncentrací každé zkoušené chemické látky (TC). Příklad diagramu destičky pro celé koncentrační křivky pro referenční estrogen a kontrolu je uveden níže v tabulce 4. Pro zkoušené chemické látky se použijí další mikrotitrační destičky, které by měly obsahovat kontroly, tj. 1) vysokou (maximální vytěsnění) a střední (přibližně IC_{50}) koncentraci každého E2 a látky se slabou vazbou, a to třikrát; 2) kontrolu s rozpouštědlem a látkou

▼M8

s nespecifickou vazbou, a to vždy šestkrát (tabulka 5). Příklad postupu uspořádání mikrotitrační destičky pro kompetitivní analýzu s použitím tří neznámých zkoušených chemických látek je uveden v dodatku 2.3. Koncentrace uvedené v tabulkách 4 a 5 jsou konečné koncentrace analýzy. Maximální koncentrace pro E2 by měla být 1×10^{-7} M a pro látku se slabou vazbou by měla být použita nejvyšší koncentrace pro látku se slabou vazbou použitá na destičce 1. Koncentraci IC_{50} musí stanovit laboratoř na základě své dosavadní kontrolní databáze. Lze očekávat, že tato hodnota bude podobná hodnotě pozorované ve validačních studiích (viz tabulka 1).

Tabulka 4

Uspořádání mikrotitrační destičky při kompetitivní vazebné analýze, celé křivky koncentrace pro referenční estrogen a kontroly (destička 1)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TB (pouze rozpouštědlo)			TB (pouze rozpouštědlo)			NSB			NSB		
B	E2 (1×10^{-7})			E2 (1×10^{-8})			E2 ($1 \times 10^{-8,5}$)			E2 (1×10^{-9})		
C	E2 ($1 \times 10^{-9,5}$)			E2 (1×10^{-10})			E2 (1×10^{-11})			Slepý pokus (*)		
D	NE ($1 \times 10^{-4.5}$)			NE (1×10^{-5})			NE ($1 \times 10^{-5,5}$)			NE (1×10^{-6})		
E	NE ($1 \times 10^{-6,5}$)			NE (1×10^{-7})			NE ($1 \times 10^{-7,5}$)			NE ($1 \times 10^{-8,5}$)		
F	OTES (1×10^{-3})			OTES (1×10^{-4})			OTES (1×10^{-5})			OTES (1×10^{-6})		
G	OTES (1×10^{-7})			OTES (1×10^{-8})			OTES (1×10^{-9})			OTES (1×10^{-10})		
H	Slepý pokus (pro radioaktivní) (**)			Slepý pokus (pro radioaktivní) (**)			Kontrola s pufrem			Kontrola s pufrem		

V tomto příkladu je látkou se slabou vazbou norethinodrel (NE)
(*) skutečně slepý pokus, jamka nepoužita
(**) slepý pokus nepoužitý při inkubaci, ale použitý na potvrzení celkové přidané radioaktivity.

Tabulka 5

Uspořádání mikrotitrační destičky při analýze kompetitivní vazby, celé křivky koncentrace pro zkoušené chemické látky a kontroly

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TB (pouze rozpouštědlo)			TB (pouze rozpouštědlo)			NSB			NSB		
B	TC1 (1×10^{-3})			TC1 (1×10^{-4})			TC1 (1×10^{-5})			TC1 (1×10^{-6})		
C	TC1 (1×10^{-7})			TC1 (1×10^{-8})			TC1 (1×10^{-9})			TC1 (1×10^{-10})		
D	TC2 (1×10^{-3})			TC2 (1×10^{-4})			TC2 (1×10^{-5})			TC2 (1×10^{-6})		
E	TC2 (1×10^{-7})			TC2 (1×10^{-8})			TC2 (1×10^{-9})			TC2 (1×10^{-10})		
F	TC3 (1×10^{-3})			TC3 (1×10^{-4})			TC3 (1×10^{-5})			TC3 (1×10^{-6})		
G	TC3 (1×10^{-7})			TC3 (1×10^{-8})			TC3 (1×10^{-9})			TC3 (1×10^{-10})		
H	NE (IC_{50})			NE ($1 \times 10^{-4,5}$)			E2 (IC_{50})			E2 (1×10^{-7})		

V tomto příkladu je látkou se slabou vazbou norethinodrel (NE)

▼M8

Dokončení analýzy kompetitivní vazby

38. Jak je uvedeno v tabulce 6, přidá se do jamek 80 µl kontroly s rozpouštědlem, kontroly s pufrem, referenční estrogen, látka se slabou vazbou, látka, která se neváže, a zkušební chemické látky připravené ve zkušebním pufru. Poté se do každé jamky přidá 40 µl roztoku 4 nM [3H]-17β-estradiolu. Po mírném otáčení po dobu 10 až 15 minut při teplotě od 2 °C do 8 °C se přidá 40 µl roztoku hrERα. Experimentální mikrotitrační destičky se inkubují při 2 °C až 8 °C po dobou 16 až 20 hodin a v průběhu inkubace se umístí na otáčecí podložku.

Tabulka 6

Objem zkušebních složek pro kompetitivní vazebnou analýzu hrER, mikrotitrační destičky

Objem (µl)	Složka
80	Neznačený 17β-estradiol, norethynodrel, OTES, zkoušené chemické látky, rozpouštědlo nebo pufr
40	roztok 4 nM [^{3}H]-17β-estradiolu
40	roztok hrERα, určená koncentrace
160	**Celkový objem v každé jamce**

39. Poté se provede kvantifikace [^{3}H]-17β-estradiolu navázaného na hrERα po separaci [^{3}H]-17β-estradiolu navázaného na hrERα z volného [^{3}H]-17β-estradiolu přidáním 80 µl studené suspenze DCC do každé jamky, jak je popsáno v odstavcích 20–23 týkajících se saturační vazebné analýzy.

40. Jamky H1–6 (označené v tabulce 4 jako slepý pokus (pro radioaktivní látku)) představují dpm [^{3}H]-značeného-estradiolu v 40 µl. Alikvotní množství z 40 µl se přidá přímo do scintilační kapaliny v jamkách H1–H6.

Kritéria přijatelnosti

Saturační vazebná analýza

41. Křivka specifické vazby by měla dosáhnout plató s použitím zvyšujících se koncentrací [^{3}H]-17β-estradiolu, což ukazuje saturaci hrERα ligandem.

42. Specifická vazba při 1 nM [3H]-17β-estradiolu by měla být v přijatelném rozmezí 15 % až 25 % průměrné naměřené celkové radioaktivity přidané v průběhu jednotlivých provedení zkoušek. Občasná mírná vybočení mimo toto rozmezí jsou přijatelná, ale pokud jsou všechna provedení zkoušky mimo toto rozmezí nebo pokud je konkrétní provedení zkoušky výrazně mimo toto rozmezí, je třeba upravit koncentraci proteinu a saturační analýzu zopakovat.

43. Data by měla vytvořit lineární Scatchardův graf.

44. Nespecifická vazba by neměla být nadměrná. Hodnota nespecifické vazby by měla být typicky < 35 % celkové vazby. Tento poměr však může při měření velmi nízkých dpm u nejnižší koncentrace radioizotopově značeného zkoušeného 17β-estradiolu občas uvedený limit překročit.

▼**M8**

Analýza kompetitivní vazby

45. Zvyšující se koncentrace neznačeného 17β-estradiolu by měly vytěsnit [^{3}H]-17β- estradiol z receptoru způsobem odpovídajícím jednomístné kompetitivní vazbě.

46. Hodnota IC_{50} pro referenční estrogen (tj. 17β-estradiol) by se měla přibližně rovnat molární koncentraci [^{3}H]-17β-estradiolu plus Kd určený ze saturační vazebné analýzy.

47. Celková specifická vazba by měla být soustavně v přijatelném rozmezí 20 ± 5 %, když je průměrná naměřená koncentrace celkové radioaktivity přidaná do každé jamky 1 nM ve všech provedeních zkoušky. Občasná mírná vybočení mimo toto rozmezí jsou přijatelná, ale pokud jsou všechna provedení zkoušky mimo toto rozmezí nebo pokud je konkrétní provedení zkoušky výrazně mimo toto rozmezí, je třeba upravit koncentraci proteinu.

48. Rozpouštědlo by nemělo měnit citlivost ani reprodukovatelnost analýzy. Výsledky kontroly s rozpouštědlem (jamky TB) se porovnají s kontrolou s pufrem za účelem ověření, že použité rozpouštědlo neovlivňuje zkušební systém. Jestliže rozpouštědlo nemá na analýzu žádný vliv, měly by být výsledky TB a kontroly s rozpouštědlem srovnatelné.

49. Látka, která se neváže, by neměla vytěsnit více než 25 % [^{3}H]-17β-estradiolu z hrERα při zkoušení do 10^{-3} M (OTES) nebo 10^{-4} M (DBP).

50. Pro referenční estrogen a dvě látky se slabou vazbou (např. norethynodrel, norethindron) byla vypracována kritéria funkčnosti s použitím údajů z validační studie vazebné analýzy FW hrER (příloha N v odkazu 2). Jsou uvedeny 95 % konfidenční intervaly pro střední hodnotu (n) +/– SD za všechna kontrolní provedení zkoušky ve všech laboratořích účastnících se ve validační studii. Pro referenční estrogen a látky se slabou vazbou a pro $\log_{10}$RBA látek se slabou vazbou vzhledem k referenčnímu estrogenu byly vypočteny 95 % konfidenční intervaly pro parametry křivky (tj. horní, dolní, Hillův koeficient, $\log IC_{50}$), které jsou uvedeny jako kritéria funkčnosti pro pozitivní kontroly. V tabulce 1 jsou uvedeny očekávané rozsahy parametrů křivky, které mohou být použity jako kritéria funkčnosti. V praxi se může rozsah IC_{50} poněkud odlišovat v závislosti na Kd receptorového přípravku a koncentraci ligandu.

51. Pro parametry křivky pro zkoušené chemické látky nebyla vypracována žádná kritéria funkčnosti, protože stávajících potenciálních zkoušených chemických látek existuje velké množství a značně se liší jejich potenciální afinity a výsledky (např. celá křivka, částečná křivka, mimo křivku). Při posuzování výsledků z každého provedení zkoušky za zkoušenou chemickou látku je třeba postupovat s odborným úsudkem. Mělo by být použito dostatečné rozmezí koncentrací, aby byl jednoznačně definován vrchol (např. 90–100 % vazby) kompetitivní křivky. Variabilita mezi replikáty při každé koncentraci zkoušené chemické látky i mezi 3 zkouškami neprováděnými souběžně by měla být přiměřená a vědecky obhajitelná. Kontroly z každého provedení zkoušky by se u zkoušené chemické látky měly blížit mírám funkčnosti uvedeným pro tuto analýzu FW a měly by odpovídat dosavadním kontrolním údajům z každé příslušné laboratoře.

▼M8

ANALÝZA ÚDAJŮ

Saturační vazebná analýza

52. Měří se celková i nespecifická vazba. Z těchto hodnot se specifická vazba zvyšujících se koncentrací [^{3}H]-17β-estradiolu za rovnovážného stavu vypočítá odečtením nespecifické vazby od celkové. Graf specifické vazby proti koncentraci [^{3}H]-17β-estradiolu by měl dosáhnout plató u maximální specifické vazby indikující saturaci hrERα [^{3}H]-17β-estradiolem. Kromě toho by analýza dat měla dokumentovat vazbu [^{3}H]-17β-estradiolu na jedno vazebné místo s vysokou afinitou. Na křivce saturační vazby by měla být zobrazena nespecifická, celková a specifická vazba. Další rozbor těchto údajů by měl být proveden pomocí nelineární regresní analýzy (např. BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995) s konečným zobrazením dat ve formě Scatchardova grafu.

53. Při analýze dat se určuje B_{max} a K_d z údajů o celkové vazbě samotné, a to za použití předpokladu, že nespecifická vazba je lineární, není-li zdůvodněno použití jiné metody. Kromě toho by při určování nejlepších hodnot měla být použita robustní regrese, pokud není uvedeno zdůvodnění. Metoda zvolená pro robustní regresi by měla být uvedena. Při určování B_{max} a K_d z údajů o saturační vazbě by měla být vždy použita korekce úbytku ligandu (např. pomocí metody podle Swillense 1995).

Analýza kompetitivní vazby

54. Křivka kompetitivní vazby se vynáší jako specifická vazba [^{3}H]-17β-estradiolu proti koncentraci (log10 jednotky) kompetitora. Koncentrace zkoušené chemické látky, která inhibuje 50 % maximální specifické vazby [^{3}H]-17β-estradiolu, je hodnota IC_{50}.

55. Odhady log (IC_{50}) pro pozitivní kontroly (např. referenční estrogen a látku se slabou vazbou) se stanoví pomocí vhodného softwaru pro nelineární vynesení křivky, aby byly vhodné pro čtyřparametrickou Hillovu rovnici (např. BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995). Při vynášení těchto křivek se horní bod, dolní bod, sklon a log(IC_{50}) obvykle ponechávají bez omezení. Při určování nejlepších hodnot by měla být použita robustní regrese, pokud není uvedeno zdůvodnění. Korekce úbytku ligandu se nepoužívá. Po úvodní analýze je třeba každou vazebnou křivku zkontrolovat, aby bylo zajištěno, že je vhodně aplikována na model. Relativní vazebná afinita (RBA) pro látku se slabou vazbou se vypočítá jako procento log (IC_{50}) pro látku se slabou vazbou vzhledem k log (IC_{50}) pro 17β-estradiol. Výsledky z pozitivních kontrol a z kontroly s látkou, která se neváže, se posuzují pomocí měřítek účinnosti analýzy uvedených v odstavci 45–50 v tomto dodatku 2.

56. Data za všechny zkoušené chemické látky se analyzují postupně, aby bylo zajištěno, že data budou analyzována správně, a aby byla správně klasifikována každá kompetitivní vazebná křivka. Doporučuje se, aby každé provedení zkoušky u zkoušené chemické látky nejdříve prošlo standardizovanou analýzou dat, která je stejná jako analýza použitá pro kontroly s referenčním estrogenem a s látkou se slabou vazbou (viz odstavec 55 výše). Po dokončení je třeba provést technickou kontrolu parametrů vynesené křivky a vizuálně zkontrolovat, jak dobře data odpovídají generované kompetitivní vazebné křivce u každého provedení zkoušky. V průběhu této technické kontroly je pozorovaný pokles procenta specificky navázaného [^{3}H]-17β-estradiolu v závislosti na koncentraci, nízká variabilita mezi technickými replikáty při jednotlivých koncentracích chemické látky a konzistentní parametry u tří provedení zkoušky dobrým ukazatelem, že zkouška a analýzy dat byly provedeny správně.

▼M8

Interpretace údajů

57. Za předpokladu, že jsou splněna všechna kritéria přijatelnosti, lze zkoušenou chemickou látku považovat za látku, která se váže na hrERα, jestliže lze vynést vazebnou křivku a nejnižší bod na křivce odpovědi v rozsahu dat je menší než 50 % (obrázek 1).

58. Za předpokladu, že jsou splněna všechna kritéria přijatelnosti, lze zkoušenou chemickou látku považovat za látku, která se neváže na hrERα, jestliže:

— lze vynést vazebnou křivku a nejnižší bod na křivce odpovědi v rozsahu dat je nad 75 % nebo

— nelze vynést vazebnou křivku a nejnižší nevyhlazené průměrné procento vazby ze skupiny koncentrací v datech je nad 75 %.

59. Zkoušené chemické látky se považují za neurčité, jestliže není splněna žádná z výše uvedených podmínek (např. nejnižší bod na vynesené křivce odpovědi je mezi 76 a 51 %).

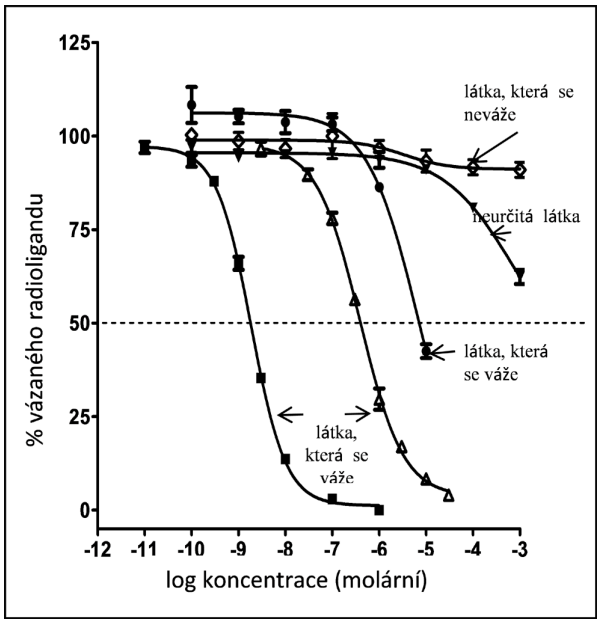
Tabulka 7

Kritéria pro stanovení klasifikace zkoušené chemické látky podle kompetitivní vazebné křivky

Klasifikace	Kritéria
váže se[a]	Lze vynést vazebnou křivku. **Nejnižší bod na křivce odpovědi v rozsahu dat je menší než 50 %.**
neváže se[b]	Jestliže lze vynést vazebnou křivku, **je nejnižší bod na křivce odpovědi v rozsahu dat nad 75 %.** Jestliže nelze vynést vazebnou křivku, **je nejnižší nevyhlazené průměrné procento vazby ze skupiny koncentrací v datech nad 75 %.**
Neurčitá[c]	Každé testovatelné provedení zkoušky, kdy se látka nechová ani jako látka, která se váže, ani jako látka, která se neváže **je nejnižší nevyhlazené průměrné procento vazby ze skupiny koncentrací v datech nad 75 %.**

Obrázek 1

Příklady klasifikace zkoušené chemické látky s použitím kompetitivní vazebné křivky



▼M8

60. Sloučí se několik testů zkoušené chemické látky provedených v laboratoři, každému testu se přiřadí numerická hodnota a jednotlivé testy se zprůměrují, jak je znázorněno v tabulce 8. Výsledky sloučených testů v rámci každé laboratoře se porovnají s předpokládanou klasifikací jednotlivých zkoušených chemických látek.

Tabulka 8

Metoda pro klasifikaci zkoušené chemické látky s použitím několika testů v rámci laboratoře

Přiřazení hodnoty každému testu:	
Klasifikace	**Číselná hodnota**
váže se	2
neurčitá	1
neváže se	0
Klasifikace průměru číselných hodnot ze všech testů:	
Klasifikace	**Číselná hodnota**
váže se	průměr ≥ 1,5
neurčitá	0,5 ≤ průměr < 1,5
neváže se	průměr < 0,5

ZÁVĚREČNÁ ZPRÁVA

61. Viz odstavec 24 „**SLOŽKY VAZEBNÉ ANALÝZY hrER**“ této zkušební metody.

▼**M8**

Dodatek 2.1

SEZNAM VÝRAZŮ

[^{3}H]E2: 17β-estradiol značený radioizotopem tritia

DCC: aktivní uhlí potažené dextranem

E2: neznačený 17β-estradiol (inertní)

Zkušební pufr: 10 mM Tris, 10 mg bovinního sérového albuminu /ml, 2 mM DTT, 10 % glycerol, 0,2 mM leupeptinu, pH 7,5

hrERα: lidský rekombinantní estrogenní receptor alfa

Replikát: Jedna z několika jamek, které obsahují stejný obsah ve stejné koncentraci a analyzují se souběžně v rámci jednoho provedení zkoušky. V tomto protokolu se každá koncentrace zkoušené chemické látky testuje třikrát; to znamená, že existují tři replikáty, které se analyzují současně při každé koncentraci zkoušené chemické látky.

Provedení zkoušky: Úplná sada jamek na mikrotitrační destičce analyzovaných souběžně, která poskytuje všechny informace potřebné pro charakterizaci vazby zkoušené chemické látky na hrERα (tzn. celkový [^{3}H]-17β-estradiol přidaný do zkušební jamky, maximální vazba [^{3}H]-17β-estradiolu na hrERα, nespecifická vazba a celková vazba při různých koncentracích zkoušené chemické látky). Provedení zkoušky může sestávat pouze z jedné jamky (tj. replikátu) na každou koncentraci, ale protože tento protokol vyžaduje trojí analyzování, sestává jedno provedení ze tří jamek na každou koncentraci. Dále tento protokol vyžaduje tři nezávislá (tj. nesouběžná) provedení na každou chemickou látku.

▼M8

Dodatek 2.2

TYPICKÁ SATURAČNÍ ANALÝZA [^{3}H]-17B-ESTRADIOLU SE TŘEMI REPLIKOVANÝMI JAMKAMI

Typická saturační analýza [3H]-17β-estradiolu se třemi replikovanými jamkami

Poloha	Replikát	Kód typu jamky	Výchozí koncentrace radioaktivního E2 (nM)	Objem radioaktivního E2 (µl)	Konečná koncentrace radioaktivního E2 (nM)	Výchozí koncentrace neradioaktivního E2 (µM)	Objem neradioaktivního E2 (µl)	Konečná koncentrace neradioaktivního E2 (µM)	Objem pufru (µl)	Objem receptoru (µl)	Celkový objem v jamkách
A1	1	H	0,12	40	0,03	—	—	—	80	40	160
A2	2	H	0,12	40	0,03	—	—	—	80	40	160
A3	3	H	0,12	40	0,03	—	—	—	80	40	160
A4	1	H	0,24	40	0,06	—	—	—	80	40	160
A5	2	H	0,24	40	0,06	—	—	—	80	40	160
A6	3	H	0,24	40	0,06	—	—	—	80	40	160
A7	1	H	0,32	40	0,08	—	—	—	80	40	160
A8	2	H	0,32	40	0,08	—	—	—	80	40	160
A9	3	H	0,32	40	0,08	—	—	—	80	40	160
A10	1	H	0,40	40	0,10	—	—	—	80	40	160
A11	2	H	0,40	40	0,10	—	—	—	80	40	160
A12	3	H	0,40	40	0,10	—	—	—	80	40	160
B1	1	H	1,20	40	0,30	—	—	—	80	40	160
B2	2	H	1,20	40	0,30	—	—	—	80	40	160
B3	3	H	1,20	40	0,30	—	—	—	80	40	160
B4	1	H	2,40	40	0,60	—	—	—	80	40	160
B5	2	H	2,40	40	0,60	—	—	—	80	40	160
B6	3	H	2,40	40	0,60	—	—	—	80	40	160
B7	1	H	4,00	40	1,00	—	—	—	80	40	160
B8	2	H	4,00	40	1,00	—	—	—	80	40	160

▼**M8**

Typická saturační analýza [3H]-17β-estradiolu se třemi replikovanými jamkami

Poloha	Replikát	Kód typu jamky	Výchozí koncentrace radioaktivního E2 (nM)	Objem radioaktivního E2 (µl)	Konečná koncentrace radioaktivního E2 (nM)	Výchozí koncentrace neradioaktivního E2 (µM)	Objem neradioaktivního E2 (µl)	Konečná koncentrace neradioaktivního E2 (µM)	Objem pufru (µl)	Objem receptoru (µl)	Celkový objem v jamkách
B9	3	H	4,00	40	1,00	—	—	—	80	40	160
B10	1	H	12,00	40	3,00	—	—	—	80	40	160
B11	2	H	12,00	40	3,00	—	—	—	80	40	160
B12	3	H	12,00	40	3,00	—	—	—	80	40	160
D1	1	HC	0,12	40	0,03	0,06	80	0,03	—	40	160
D2	2	HC	0,12	40	0,03	0,06	80	0,03	—	40	160
D3	3	HC	0,12	40	0,03	0,06	80	0,03	—	40	160
D4	1	HC	0,24	40	0,06	0,12	80	0,06	—	40	160
D5	2	HC	0,24	40	0,06	0,12	80	0,06	—	40	160
D6	3	HC	0,24	40	0,06	0,12	80	0,06	—	40	160
D7	1	HC	0,32	40	0,08	0,16	80	0,08	—	40	160
D8	2	HC	0,32	40	0,08	0,16	80	0,08	—	40	160
D9	3	HC	0,32	40	0,08	0,16	80	0,08	—	40	160
D10	1	HC	0,40	40	0,10	0,2	80	0,1	—	40	160
D11	2	HC	0,40	40	0,10	0,2	80	0,1	—	40	160
D12	3	HC	0,40	40	0,10	0,2	80	0,1	—	40	160
E1	1	HC	1,20	40	0,30	0,6	80	0,3	—	40	160
E2	2	HC	1,20	40	0,30	0,6	80	0,3	—	40	160
E3	3	HC	1,20	40	0,30	0,6	80	0,3	—	40	160
E4	1	HC	2,40	40	0,60	1,2	80	0,6	—	40	160
E5	2	HC	2,40	40	0,60	1,2	80	0,6	—	40	160
E6	3	HC	2,40	40	0,60	1,2	80	0,6	—	40	160

▼M8

Typická saturační analýza [3H]-17β-estradiolu se třemi replikovanými jamkami											
Poloha	**Replikát**	**Kód typu jamky**	**Výchozí koncentrace radioaktivního E2 (nM)**	**Objem radioaktivního E2 (µl)**	**Konečná koncentrace radioaktivního E2 (nM)**	**Výchozí koncentrace neradioaktivního E2 (µM)**	**Objem neradioaktivního E2 (µl)**	**Konečná koncentrace neradioaktivního E2 (µM)**	**Objem pufru (µl)**	**Objem receptoru (µl)**	**Celkový objem v jamkách**
E7	1	HC	4,00	40	1,00	2	80	1	—	40	160
E8	2	HC	4,00	40	1,00	2	80	1	—	40	160
E9	3	HC	4,00	40	1,00	2	80	1	—	40	160
E10	1	HC	12,00	40	3,00	6	80	3	—	40	160
E11	2	HC	12,00	40	3,00	6	80	3	—	40	160
E12	3	HC	12,00	40	3,00	6	80	3	—	40	160
G1	1	radioaktivní	0,12	40	0,03	—	—	—	—	—	40
G2	2	radioaktivní	0,12	40	0,03	—	—	—	—	—	40
G3	3	radioaktivní	0,12	40	0,03	—	—	—	—	—	40
G4	1	radioaktivní	0,24	40	0,06	—	—	—	—	—	40
G5	2	radioaktivní	0,24	40	0,06	—	—	—	—	—	40
G6	3	radioaktivní	0,24	40	0,06	—	—	—	—	—	40
G7	1	radioaktivní	0,32	40	0,08	—	—	—	—	—	40
G8	2	radioaktivní	0,32	40	0,08	—	—	—	—	—	40
G9	3	radioaktivní	0,32	40	0,08	—	—	—	—	—	40
G10	1	radioaktivní	0,40	40	0,10	—	—	—	—	—	40
G11	2	radioaktivní	0,40	40	0,10	—	—	—	—	—	40
G12	3	radioaktivní	0,40	40	0,10	—	—	—	—	—	40

▼M8

Typická saturační analýza [3H]-17β-estradiolu se třemi replikovanými jamkami

Poloha	Replikát	Kód typu jamky	Výchozí koncentrace radioaktivního E2 (nM)	Objem radioaktivního E2 (µl)	Konečná koncentrace radioaktivního E2 (nM)	Výchozí koncentrace neradioaktivního E2 (µM)	Objem neradioaktivního E2 (µl)	Konečná koncentrace neradioaktivního E2 (µM)	Objem pufru (µl)	Objem receptoru (µl)	Celkový objem v jamkách
H1	1	radioaktivní	1,20	40	0,30	—	—	—	—	—	40
H2	2	radioaktivní	1,20	40	0,30	—	—	—	—	—	40
H3	3	radioaktivní	1,20	40	0,30	—	—	—	—	—	40
H4	1	radioaktivní	2,40	40	0,60	—	—	—	—	—	40
H5	2	radioaktivní	2,40	40	0,60	—	—	—	—	—	40
H6	3	radioaktivní	2,40	40	0,60	—	—	—	—	—	40
H7	1	radioaktivní	4,00	40	1,00	—	—	—	—	—	40
H8	2	radioaktivní	4,00	40	1,00	—	—	—	—	—	40
H9	3	radioaktivní	4,00	40	1,00	—	—	—	—	—	40
H10	1	radioaktivní	12,00	40	3,00	—	—	—	—	—	40
H11	2	radioaktivní	12,00	40	3,00	—	—	—	—	—	40
H12	3	radioaktivní	12,00	40	3,00	—	—	—	—	—	40

Upozorňujeme, že „radioaktivní“ jamky jsou v průběhu inkubace prázdné. 40 µl se přidává až pro počítání scintilací.

▼**M8**

Dodatek 2.3:

USPOŘÁDÁNÍ JAMEK PŘI KOMPETITIVNÍ VAZEBNÉ ANALÝZE

Mikrodestička	**Poloha**	**Replikát**	**Typ jamky**	**Kód jamky**	**Kód koncentrace**	**Výchozí koncentrace kompetitora (M)**	**Zásobní hrER (µl)**	**Objem pufru (µl)**	**Objem stopovací látky (radioaktivní E2) (µl)**	**Objem z destičky s ředěním (µl)**	**Konečný objem (µl)**	**Konečná koncentrace kompetitora (M)**
S	A1	1	celková vazba	TB	TB1	–	40		40	80	160	–
P	A2	2	celková vazba	TB	TB2	–	40		40	80	160	–
P	A3	3	celková vazba	TB	TB3	–	40		40	80	160	-
P	A4	1	celková vazba	TB	TB4	–	40		40	80	160	–
P	A5	2	celková vazba	TB	TB5	–	40		40	80	160	–
P	A6	3	celková vazba	TB	TB6	–	40		40	80	160	–
P	A7	1	neradioaktivní E2 (vysoká)	NSB	S0	2.00E-06	40	–	40	80	160	1.0E-06
S	A8	2	neradioaktivní E2 (vysoká)	NSB	S0	2.00E-06	40	–	40	80	160	1.0E-06
S	A9	3	neradioaktivní E2 (vysoká)	NSB	S0	2.00E-06	40	–	40	80	160	1.0E-06
S	A10	1	neradioaktivní E2 (vysoká)	NSB	S0	2.00E-06	40	–	40	80	160	1.0E-06
S	A11	2	neradioaktivní E2 (vysoká)	NSB	S0	2.00E-06	40	–	40	80	160	1.0E-06
S	A12	3	neradioaktivní E2 (vysoká)	NSB	S0	2.00E-06	40	–	40	80	160	1.0E-06
S	B1	1	neradioaktivní E2	S	S1	2.00E-07	40	–	40	80	160	1.0E-07
S	B2	2	neradioaktivní E2	S	S1	2.00E-07	40	–	40	80	160	1.0E-07
S	B3	3	neradioaktivní E2	S	S1	2.00E-07	40	–	40	80	160	1.0E-07
S	B4	1	neradioaktivní E2	S	S2	2.00E-08	40	-	40	80	160	1.0E-08

▼**M8**

Mikrodestička	Poloha	Replikát	Typ jamky	Kód jamky	Kód koncentrace	Výchozí koncentrace kompetitora (M)	Zásobní hrER (µl)	Objem pufru (µl)	Objem stopovací látky (radioaktivní E2) (µl)	Objem z desetičky s ředěním (µl)	Konečný objem (µl)	Konečná koncentrace kompetitora (M)
S	B5	2	neradioaktivní E2	S	S2	2.00E-08	40	–	40	80	160	1.0E-08
S	B6	3	neradioaktivní E2	S	S2	2.00E-08	40	–	40	80	160	1.0E-08
S	B7	1	neradioaktivní E2	S	S3	6.00E-09	40	–	40	80	160	3.0E-09
S	B8	2	neradioaktivní E2	S	S3	6.00E-09	40	–	40	80	160	3.0E-09
S	B9	3	neradioaktivní E2	S	S3	6.00E-09	40	–	40	80	160	3.0E-09
S	B10	1	neradioaktivní E2	S	S4	2.00E-09	40	–	40	80	160	1.0E-09
S	B11	2	neradioaktivní E2	S	S4	2.00E-09	40	–	40	80	160	1.0E-09
S	B12	3	neradioaktivní E2	S	S4	2.00E-09	40	-	40	80	160	1.0E-09
S	C1	1	neradioaktivní E2	S	S5	6.00E-10	40	-	40	80	160	3.0E-10
S	C2	2	neradioaktivní E2	S	S5	6.00E-10	40	–	40	80	160	3.0E-10
S	C3	3	neradioaktivní E2	S	S5	6.00E-10	40	–	40	80	160	3.0E-10
S	C4	1	neradioaktivní E2	S	S6	2.00E-10	40	–	40	80	160	1.0E-10
S	C5	2	neradioaktivní E2	S	S6	2.00E-10	40	–	40	80	160	1.0E-10
S	C6	3	neradioaktivní E2	S	S6	2.00E-10	40	–	40	80	160	1.0E-10
S	C7	1	neradioaktivní E2	S	S7	2.00E-11	40	–	40	80	160	1.0E-11
S	C8	2	neradioaktivní E2	S	S7	2.00E-11	40	-	40	80	160	1.0E-11

▼**M8**

Mikrodestička	Poloha	Replikát	Typ jamky	Kód jamky	Kód koncentrace	Výchozí koncentrace kompetitora (M)	Zásobní hrER (µl)	Objem pufru (µl)	Objem stopovací látky (radioaktivní E2) (µl)	Objem z destičky s ředěním (µl)	Konečný objem (µl)	Konečná koncentrace kompetitora (M)
S	C9	3	neradioaktivní E2	S	S7	2.00E-11	40	-	40	80	160	1.0E-11
S	C10	1	slepá zkouška	slepá zkouška	B1	–	–	160	–	–	160	–
S	C11	2	slepá zkouška	slepá zkouška	B2	–	–	160	–	–	160	–
P	C12	3	slepá zkouška	slepá zkouška	B3	–	–	160	–	–	160	–
P	D1	1	norethynodrel	NE	WP1	6.00E-05	40	–	40	80	160	3.0E-05
S	D2	1	norethynodrel	NE	WP1	6.00E-05	40	–	40	80	160	3.0E-05
S	D3	1	norethynodrel	NE	WP1	6.00E-05	40	–	40	80	160	3.0E-05
S	D4	1	norethynodrel	NE	WP2	2.00E-05	40	–	40	80	160	1.0E-05
S	D5	1	norethynodrel	NE	WP2	2.00E-05	40	–	40	80	160	1.0E-05
S	D6	1	norethynodrel	NE	WP2	2.00E-05	40	–	40	80	160	1.0E-05
S	D7	1	norethynodrel	NE	WP3	6.00E-06	40	–	40	80	160	3.0E-06
S	D8	1	norethynodrel	NE	WP3	6.00E-06	40	–	40	80	160	3.0E-06
S	D9	1	norethynodrel	NE	WP3	6.00E-06	40	–	40	80	160	3.0E-06
S	D10	1	norethynodrel	NE	WP4	2.00E-06	40	–	40	80	160	1.0E-06
S	D11	1	norethynodrel	NE	WP4	2.00E-06	40	–	40	80	160	1.0E-06
S	D12	1	norethynodrel	NE	WP4	2.00E-06	40	–	40	80	160	1.0E-06
S	E1	1	norethynodrel	NE	WP	6.00E-07	40		40	80	160	3.0E-07
S	E2	2	norethynodrel	NE	WP	6.00E-07	40		40	80	160	3.0E-07
S	E3	3	norethynodrel	NE	WP	6.00E-07	40		40	80	160	3.0E-07
S	E4	1	norethynodrel	NE	WP	2.00E-07	40		40	80	160	1.0E-07
S	E5	2	norethynodrel	NE	WP	2.00E-07	40		40	80	160	1.0E-07
S	E6	3	norethynodrel	NE	WP	2.00E-07	40		40	80	160	1.0E-07
S	E7	1	norethynodrel	NE	WP	6.00E-08	40	-	40	80	160	3.0E-08

▼**M8**

Mikrodestička	Poloha	Replikát	Typ jamky	Kód jamky	Kód koncentrace	Výchozí koncentrace kompetitora (M)	Zásobní hrER (µl)	Objem pufru (µl)	Objem stopovací látky (radioaktivní E2) (µl)	Objem z desetičky s ředěním (µl)	Konečný objem (µl)	Konečná koncentrace kompetitora (M)
S	E8	2	norethyno-drel	NE	WP	6.00E-08	40	-	40	80	160	3.0E-08
S	E9	3	norethyno-drel	NE	WP	6.00E-08	40	-	40	80	160	3.0E-08
S	E10	1	norethyno-drel	NE	WP	6.00E-09	40	-	40	80	160	3.0E-09
S	E11	2	norethyno-drel	NE	WP	6.00E-09	40	-	40	80	160	3.0E-09
S	E12	3	norethyno-drel	NE	WP	6.00E-09	40	-	40	80	160	3.0E-09
S	F1	1	OTES	N	OTES	2.00E-03	40	-	40	80	160	1.0E-03
S	F2	2	OTES	N	OTES	2.00E-03	40	-	40	80	160	1.0E-03
S	F3	3	OTES	N	OTES	2.00E-03	40	-	40	80	160	1.0E-03
S	F4	1	OTES	N	OTES	2.00E-04	40	-	40	80	160	1.0E-04
S	F5	2	OTES	N	OTES	2.00E-04	40	-	40	80	160	1.0E-04
S	F6	3	OTES	N	OTES	2.00E-04	40	-	40	80	160	1.0E-04
S	F7	1	OTES	N	OTES	2.00E-05	40	-	40	80	160	3.0E-05
S	F8	2	OTES	N	OTES	2.00E-05	40	-	40	80	160	3.0E-05
S	F9	3	OTES	N	OTES	2.00E-05	40	-	40	80	160	3.0E-05
S	F10	1	OTES	N	OTES	2.00E-06	40	-	40	80	160	1.0E-06
S	F11	2	OTES	N	OTES	2.00E-06	40	-	40	80	160	1.0E-06
S	F12	3	OTES	N	OTES	2.00E-06	40	-	40	80	160	1.0E-06
S	G1	1	OTES	N	OTES	2.00E-07	40	-	40	80	160	3.0E-07
S	G2	2	OTES	N	OTES	2.00E-07	40	-	40	80	160	3.0E-07
S	G3	3	OTES	N	OTES	2.00E-07	40	-	40	80	160	3.0E-07
S	G4	1	OTES	N	OTES	2.00E-08	40	-	40	80	160	1.0E-08
S	G5	2	OTES	N	OTES	2.00E-08	40	-	40	80	160	1.0E-08

▼**M8**

Mikrodestička	Poloha	Replikát	Typ jamky	Kód jamky	Kód koncentrace	Výchozí koncentrace kompetitora (M)	Zásobní hrER (µl)	Objem pufru (µl)	Objem stopovací látky (radioaktivní E2) (µl)	Objem z destičky s ředěním (µl)	Konečný objem (µl)	Konečná koncentrace kompetitora (M)
S	G6	3	OTES	N	OTES	2.00E-08	40	-	40	80	160	1.0E-08
S	G7	1	OTES	N	OTES	2.00E-09	40	-	40	80	160	1.0E-09
S	G8	2	OTES	N	OTES	2.00E-09	40	-	40	80	160	1.0E-09
S	G9	3	OTES	N	OTES	2.00E-09	40	-	40	80	160	1.0E-09
S	G10	1	OTES	N	OTES	2.00E-10	40	-	40	-	160	1.0E-10
S	G11	2	OTES	N	OTES	2.00E-10	40	-	40	-	160	1.0E-10
S	G12	3	OTES	N	OTES	2.00E-10	40	-	40	-	160	1.0E-10
S	H1	1	radioaktivní	H	H	-	-	-	40	-	40	-
P	H2	1	radioaktivní	H	H	-	-	-	40	-	40	-
S	H3	1	radioaktivní	H	H	-	-	-	40	-	40	-
S	H4	1	radioaktivní	H	H	-	-	-	40	-	40	-
S	H5	1	radioaktivní	H	H	-	-	-	40	-	40	-
S	H6	1	radioaktivní	H	H	-	-	-	40	-	40	-
S	H7	1	kontrola s pufrem	BC	BC	-	40	80	40	-	160	-
S	H8	1	kontrola s pufrem	BC	BC	-	40	80	40	-	160	-
S	H9	1	kontrola s pufrem	BC	BC	-	40	80	40	-	160	-
S	H10	1	kontrola s pufrem	BC	BC	-	40	80	40	-	160	-
S	H11	1	kontrola s pufrem	BC	BC	-	40	80	40	-	160	-
S	H12	1	kontrola s pufrem	BC	BC	-	40	80	40	-	160	-

Upozorňujeme, že „radioaktivní“ jamky jsou v průběhu inkubace prázdné. 40 µl se přidává až pro počítání scintilací.

▼M8

Uspořádání jamek při kompetitivní vazebné analýze

Mikrodestička	Poloha	Replikát	Druh jamky	Kód jamky	Kód koncentrace	Výchozí koncentrace kompetitora (M)	Zásobní hrER (µl)	Objem pufru (µl)	Objem stopovací látky (radioaktivní E2) (µl)	Objem z destičky s ředěním (µl)	Konečný objem (µl)	Konečná koncentrace kompetitora (M)
P1	A1	1	celková vazba	TB	TBB1B1	-	40	-	40	80	160	-
P1	A2	2	celková vazba	TB	TB2	-	40	-	40	80	160	-
P1	A3	3	celková vazba	TB	TB3	-	40	-	40	80	160	-
P1	A4	1	celková vazba	TB	TB4	-	40	-	40	80	160	-
P1	A5	2	celková vazba	TB	TB5	-	40	-	40	80	160	-
P1	A6	3	celková vazba	TB	TB6	-	40	-	40	80	160	-
P1	A7	1	neradioaktivní E2 (vysoká)	NSB	S0	2.00E-06	40	-	40	80	160	1.0E-06
P1	A8	2	neradioaktivní E2 (vysoká)	NSB	S0	2.00E-06	40	-	40	80	160	1.0E-06
P1	A9	3	neradioaktivní E2 (vysoká)	NSB	S0	2.00E-06	40	-	40	80	160	1.0E-06
P1	A10	1	neradioaktivní E2 (vysoká)	NSB	S0	2.00E-06	40	-	40	80	160	1.0E-06
P1	A11	2	neradioaktivní E2 (vysoká)	NSB	S0	2.00E-06	40	-	40	80	160	1.0E-06
P1	A12	3	neradioaktivní E2 (vysoká)	NSB	S0	2.00E-06	40	-	40	80	160	1.0E-06
P1	B1	1	Zkoušená chemická látka 1	TC1	1	2.00E-03	40	0	40	80	160	1.0E-03
P1	B2	2	Zkoušená chemická látka 1	TC1	1	2.00E-03	40	0	40	80	160	1.0E-03
P1	B3	3	Zkoušená chemická látka 1	TC1	1	2.00E-03	40	0	40	80	160	1.0E-03
P1	B4	1	Zkoušená chemická látka 1	TC1	2	2.00E-04	40	0	40	80	160	1.0E-04
P1	B5	2	Zkoušená chemická látka 1	TC1	2	2.00E-04	40	0	40	80	160	1.0E-04
P1	B6	3	Zkoušená chemická látka 1	TC1	2	2.00E-04	40	0	40	80	160	1.0E-04
P1	B7	1	Zkoušená chemická látka 1	TC1	3	2.00E-05	40	0	40	80	160	1.0E-05
P1	B8	2	Zkoušená chemická látka 1	TC1	3	2.00E-05	40	0	40	80	160	1.0E-05
P1	B9	3	Zkoušená chemická látka 1	TC1	3	2.00E-05	40	0	40	80	160	1.0E-05
P1	B10	1	Zkoušená chemická látka 1	TC1	4	2.00E-06	40	0	40	80	160	1.0E-06
P1	B11	2	Zkoušená chemická látka 1	TC1	4	2.00E-06	40	0	40	80	160	1.0E-06
P1	B12	3	Zkoušená chemická látka 1	TC1	4	2.00E-06	40	0	40	80	160	1.0E-06

▼M8

Uspořádání jamek při kompetitivní vazebné analýze

Mikrodestička	Poloha	Replikát	Druh jamky	Kód jamky	Kód koncentrace	Výchozí koncentrace kompetitora (M)	Zásobní hrER (µl)	Objem pufru (µl)	Objem stopovací látky (radioaktivní E2) (µl)	Objem z destičky s ředěním (µl)	Konečný objem (µl)	Konečná koncentrace kompetitora (M)
P1	C1	1	Zkoušená chemická látka 1	TC1	5	2.00E-07	40	0	40	80	160	1.0E-07
P1	C2	2	Zkoušená chemická látka 1	TC1	5	2.00E-07	40	0	40	80	160	1.0E-07
P1	C3	3	Zkoušená chemická látka 1	TC1	5	2.00E-07	40	0	40	80	160	1.0E-07
P1	C4	1	Zkoušená chemická látka 1	TC1	6	2.00E-08	40	0	40	80	160	1.0E-08
P1	C5	2	Zkoušená chemická látka 1	TC1	6	2.00E-08	40	0	40	80	160	1.0E-08
P1	C6	3	Zkoušená chemická látka 1	TC1	6	2.00E-08	40	0	40	80	160	1.0E-08
P1	C7	1	Zkoušená chemická látka 1	TC1	7	2.00E-09	40	0	40	80	160	1.0E-09
P1	C8	2	Zkoušená chemická látka 1	TC1	7	2.00E-09	40	0	40	80	160	1.0E-09
P1	C9	3	Zkoušená chemická látka 1	TC1	7	2.00E-09	40	0	40	80	160	1.0E-09
P1	C10	1	Zkoušená chemická látka 1	TC1	8	2.00E-10	40	0	40	80	160	1.0E-10
P1	C11	2	Zkoušená chemická látka 1	TC1	8	2.00E-10	40	0	40	80	160	1.0E-10
P1	C12	3	Zkoušená chemická látka 1	TC1	8	2.00E-10	40	0	40	80	160	1.0E-10
P1	D1	1	Zkoušená chemická látka 2	TC2	1	2.00E-03	40	0	40	80	160	1.0E-03
P1	D2	2	Zkoušená chemická látka 2	TC2	1	2.00E-03	40	0	40	80	160	1.0E-03
P1	D3	3	Zkoušená chemická látka 2	TC2	1	2.00E-03	40	0	40	80	160	1.0E-03
P1	D4	1	Zkoušená chemická látka 2	TC2	2	2.00E-04	40	0	40	80	160	1.0E-04
P1	D5	2	Zkoušená chemická látka 2	TC2	2	2.00E-04	40	0	40	80	160	1.0E-04
P1	D6	3	Zkoušená chemická látka 2	TC2	2	2.00E-04	40	0	40	80	160	1.0E-04
P1	D7	1	Zkoušená chemická látka 2	TC2	3	2.00E-05	40	0	40	80	160	1.0E-05
P1	D8	2	Zkoušená chemická látka 2	TC2	3	2.00E-05	40	0	40	80	160	1.0E-05
P1	D9	3	Zkoušená chemická látka 2	TC2	3	2.00E-05	40	0	40	80	160	1.0E-05
P1	D10	1	Zkoušená chemická látka 2	TC2	4	2.00E-06	40	0	40	80	160	1.0E-06
P1	D11	2	Zkoušená chemická látka 2	TC2	4	2.00E-06	40	0	40	80	160	1.0E-06
P1	D12	3	Zkoušená chemická látka 2	TC2	4	2.00E-06	40	0	40	80	160	1.0E-06

▼M8

Uspořádání jamek při kompetitivní vazebné analýze

Mikrodestička	Poloha	Replikát	Druh jamky	Kód jamky	Kód koncentrace	Výchozí koncentrace kompetitora (M)	Zásobní hrER (µl)	Objem pufru (µl)	Objem stopovací látky (radioaktivní E2) (µl)	Objem z destičky s ředěním (µl)	Konečný objem (µl)	Konečná koncentrace kompetitora (M)
P1	E1	1	Zkoušená chemická látka 2	TC2	5	2.00E-07	40	0	40	80	160	1.0E-07
P1	E2	2	Zkoušená chemická látka 2	TC2	5	2.00E-07	40	0	40	80	160	1.0E-07
P1	E3	3	Zkoušená chemická látka 2	TC2	5	2.00E-07	40	0	40	80	160	1.0E-07
P1	E4	1	Zkoušená chemická látka 2	TC2	6	-	40	0	40	80	160	1.0E-08
P1	E5	2	Zkoušená chemická látka 2	TC2	6	-	40	0	40	80	160	1.0E-08
P1	E6	3	Zkoušená chemická látka 2	TC2	6	-	40	0	40	80	160	1.0E-08
P1	E7	1	Zkoušená chemická látka 2	TC2	7	2.00E-06	40	0	40	80	160	1.0E-09
P1	E8	2	Zkoušená chemická látka 2	TC2	7	2.00E-06	40	0	40	80	160	1.0E-09
P1	E9	3	Zkoušená chemická látka 2	TC2	7	2.00E-06	40	0	40	80	160	1.0E-09
P1	E10	1	Zkoušená chemická látka 2	TC2	8	2.00E-06	40	0	40	80	160	1.0E-10
P1	E11	2	Zkoušená chemická látka 2	TC2	8	2.00E-06	40	0	40	80	160	1.0E-10
P1	E12	3	Zkoušená chemická látka 2	TC2	8	2.00E-06	40	0	40	80	160	1.0E-10
P1	F1	1	Zkoušená chemická látka 3	TC3	1	2.00E-03	40	0	40	80	160	1.0E-03
P1	F2	2	Zkoušená chemická látka 3	TC3	1	2.00E-03	40	0	40	80	160	1.0E-03
P1	F3	3	Zkoušená chemická látka 3	TC3	1	2.00E-03	40	0	40	80	160	1.0E-03
P1	F4	1	Zkoušená chemická látka 3	TC3	2	2.00E-04	40	0	40	80	160	1.0E-04
P1	F5	2	Zkoušená chemická látka 3	TC3	2	2.00E-04	40	0	40	80	160	1.0E-04
P1	F6	3	Zkoušená chemická látka 3	TC3	2	2.00E-04	40	0	40	80	160	1.0E-04
P1	F7	1	Zkoušená chemická látka 3	TC3	3	2.00E-05	40	0	40	80	160	1.0E-05
P1	F8	2	Zkoušená chemická látka 3	TC3	3	2.00E-05	40	0	40	80	160	1.0E-05
P1	F9	3	Zkoušená chemická látka 3	TC3	3	2.00E-05	40	0	40	80	160	1.0E-05
P1	F10	1	Zkoušená chemická látka 3	TC3	4	2.00E-06	40	0	40	80	160	1.0E-06
P1	F11	2	Zkoušená chemická látka 3	TC3	4	2.00E-06	40	0	40	80	160	1.0E-06
P1	F12	3	Zkoušená chemická látka 3	TC3	4	2.00E-06	40	0	40	80	160	1.0E-06

▼M8

Uspořádání jamek při kompetitivní vazebné analýze

Mikrodestička	Poloha	Replikát	Druh jamky	Kód jamky	Kód koncentrace	Výchozí koncentrace kompetitora (M)	Zásobní hrER (µl)	Objem pufru (µl)	Objem stopovací látky (radioaktivní E2) (µl)	Objem z destičky s ředěním (µl)	Konečný objem (µl)	Konečná koncentrace kompetitora (M)
P1	G1	1	Zkoušená chemická látka 3	TC3	5	2.00E-07	40	0	40	80	160	1.0E-07
P1	G2	2	Zkoušená chemická látka 3	TC3	5	2.00E-07	40	0	40	80	160	1.0E-07
P1	G3	3	Zkoušená chemická látka 3	TC3	5	2.00E-07	40	0	40	80	160	1.0E-07
P1	G4	1	Zkoušená chemická látka 3	TC3	6	2.00E-08	40	0	40	80	160	1.0E-08
P1	G5	2	Zkoušená chemická látka 3	TC3	6	2.00E-08	40	0	40	80	160	1.0E-08
P1	G6	3	Zkoušená chemická látka 3	TC3	6	2.00E-08	40	0	40	80	160	1.0E-08
P1	G7	1	Zkoušená chemická látka 3	TC3	7	2.00E-09	40	0	40	80	160	1.0E-09
P1	G8	2	Zkoušená chemická látka 3	TC3	7	2.00E-09	40	0	40	80	160	1.0E-09
P1	G9	3	Zkoušená chemická látka 3	TC3	7	2.00E-09	40	0	40	80	160	1.0E-09
P1	G10	1	Zkoušená chemická látka 3	TC3	8	2.00E-10	40	0	40	80	160	1.0E-10
P1	G11	2	Zkoušená chemická látka 3	TC3	8	2.00E-10	40	0	40	80	160	1.0E-10
P1	G12	3	Zkoušená chemická látka 3	TC3	8	2.00E-10	40	0	40	80	160	1.0E-10
P1	H1	1	norethynodrel	NE		IC50	40	0	40	80	160	
P1	H2	2	norethynodrel	NE		IC50	40	0	40	80	160	
P1	H3	3	norethynodrel	NE		IC50	40	0	40	80	160	
P1	H4	1	norethynodrel	NE		1.00E-4,5	40	0	40	80	160	
P1	H5	2	norethynodrel	NE		1.00E-4,5	40	0	40	80	160	
P1	H6	3	norethynodrel	NE		1.00E-4,5	40	0	40	80	160	
P1	H7	1	neradioaktivní E2 S			IC50	40	0	40	80	160	
P1	H8	2	neradioaktivní E2 S			IC50	40	0	40	80	160	
P1	H9	3	neradioaktivní E2 S			IC50	40	0	40	80	160	
P1	H10	1	neradioaktivní E2 S			1,00E-7	40	0	40	80	160	
P1	H11	2	neradioaktivní E2 S			1,00E-7	40	0	40	80	160	
P1	H12	3	neradioaktivní E2 S			1,00E-7	40	0	40	80	160	

▼**M8**

Dodatek 3

ANALÝZA VAZBY NA ESTROGENOVÉ RECEPTORY *IN VITRO*S VYUŽITÍM LIDSKÉHO REKOMBINANTNÍHO PROTEINU S LIGAND VÁZAJÍCÍ DOMÉNOU PODLE ÚSTAVU PRO HODNOCENÍ A VÝZKUM CHEMICKÝCH LÁTEK (CERI)

VÝCHOZÍ ÚVAHY A OMEZENÍ (VIZ TAKÉ VŠEOBECNÝ ÚVOD)

1. Tato *in vitro* analýza saturační a kompetitivní vazby na estrogenový receptor (ERα) používá ligand vázající doménu lidského ERα (hrERα). Tato proteinová konstrukce, kterou vytvořil japonský Ústav pro hodnocení a výzkum chemických látek (CERI), existuje jako fúzní protein glutathion-S-transferáza (GST) a je exprimována v *E. coli.* Protokol CERI prošel mezinárodní validační studií v několika laboratořích (2), která prokázala jeho relevanci a spolehlivost pro zamýšlený účel analýzy.

2. Tato analýza je screeningovým postupem pro určení látek, které se mohou vázat na hrERα. Používá se na určení schopnosti zkoušené chemické látky konkurovat 17β-estradiolu ve vazbě na hrERα-LBD. Výsledky kvantitativní analýzy mohou zahrnovat IC_{50} (míra koncentrace zkoušené chemické látky potřebná na vytěsnění poloviny [^{3}H]-17β-estradiolu z hrERα) a relativní vazebné afinity zkoušených chemických látek pro hrERα v porovnání s 17β-estradiol. Pro účely chemického screeningu mohou přijatelné výsledky kvalitativní analýzy zahrnovat klasifikace zkoušených chemických látek jako látek, které se vážou na hrERα, látek, které se na něj nevážou, nebo látek neurčitých, a to na základě kritérií popsaných u vazebných křivek.

3. Analýza používá radioaktivní ligand, což vyžaduje, aby laboratoř měla povolení nakládat s radioaktivními materiály. Při používání radioizotopů a nebezpečných chemických látek musí být dodržovány předpisy a postupy stanovené vnitrostátními právními předpisy.

4. Před použitím této analýzy pro regulační účely je třeba přečíst si části „**VŠEOBECNÝ ÚVOD**“ a „**SLOŽKY VAZEBNÉ ANALÝZY hrER**“. Definice a zkratky používané v této zkušební metodě jsou popsány v dodatku 1.

PRINCIPY ANALÝZY (VIZ TAKÉ VŠEOBECNÝ ÚVOD)

5. Test vazby na hrERα měří schopnost radioizotopově značeného ligandu ([^{3}H]17β-estradiol) vázat se na ER v přítomnosti zvyšujících se koncentrací zkoušené chemické látky (tj. kompetitor). Zkoušené chemické látky, které mají vysokou afinitu na ER, konkurují radioizotopově značenému ligandu při nižší koncentraci v porovnání s chemickými látkami s nižší afinitou na tento receptor.

6. Tato analýza sestává ze dvou hlavních složek: saturačního vazebného experimentu za účelem charakterizace parametrů interakce mezi receptorem a ligandem, po němž následuje kompetitivní vazebný experiment, který charakterizuje kompetici mezi zkoušenou chemickou látkou a radioizotopově značeným ligandem ve vazbě na ER.

▼M8

7. Účelem saturačního vazebného experimentu je charakterizovat konkrétní šarži receptorů z hlediska vazebné afinity a počtu při přípravě na kompetitivní vazebný experiment. Saturační vazebný experiment měří za rovnovážných podmínek afinitu pevně stanovené koncentrace estrogenového receptoru na jeho přirozený ligand (představovaný disociační konstantou K_d) a koncentraci míst aktivního receptoru (B_{max}).

8. Kompetitivní vazebný experiment měří afinitu látky konkurovat [^{3}H]17β-estradiolu ve vazbě na ER. Afinita je kvantifikována koncentrací zkoušené chemické látky, která za rovnovážného stavu inhibuje 50 % specifické vazby [^{3}H]17β-estradiolu (nazývá se „50 % inhibiční koncentrace“ nebo IC_{50}). Může se hodnotit také pomocí relativní vazebné afinity (RBA, vzhledem k IC_{50} estradiolu měřené samostatně při stejném provedení zkoušky). Kompetitivní vazebný experiment měří vazbu [^{3}H]17β-estradiolu při pevně stanovené koncentraci v přítomnosti širokého rozmezí (osm řádů) koncentrací zkoušené chemické látky. Data se poté vloží pokud možno do určité formy Hillovy rovnice (Hill, 1910), která popisuje vytěsnění radioligandu kompetiční látkou s jedním vazebným místem. Rozsah vytěsnění radioizotopově značeného estradiolu v rovnovážném stavu se používá na charakterizaci zkoušené chemické látky jako látky, která se váže, která se neváže nebo která generuje neurčitou odpověď.

POSTUP

Prokázání funkční způsobilosti proteinu hrERα

9. Před rutinním prováděním saturačních a kompetitivních vazebných analýz by mělo být u každé nové šarže hrERα prokázáno, že v laboratoři, v níž bude používán, funguje správně. K prokázání způsobilosti by se měl použít proces zahrnující dva kroky. Jsou to tyto kroky:

— Proveďte saturační vazebnou analýzu [3H]-17β-estradiolu na prokázání specifičnosti a saturace hrERα. V nelineární regresní analýze těchto dat (např. BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995) a na následném Scatchardově grafu by měla být dokumentována vazebná afinita hrERα vůči [3H]-17β-estradiolu (K_d) a počet receptorů (B_{max}) pro konkrétní šarži hrERα.

— Proveďte kompetitivní vazebnou analýzu pomocí kontrolních látek (referenčního estrogenu (17β-estradiol), látky se slabou vazbou (např. norethynodrel nebo norethindron) a látky, která se neváže (oktyltriethoxysilan, OTES). Každá laboratoř by si měla vytvořit historickou databázi dokumentující konzistentnost hodnot IC50 a relevantních hodnot pro referenční estrogen a látku se slabou vazbou u experimentů a různých šarží hrERα. Dále by parametry kompetitivních vazebných křivek pro kontrolní látky měly být v rozmezí 95 % konfidenčního intervalu (viz tabulka 1), který byl stanoven pomocí dat z laboratoří, jež se účastnily validační studie pro tuto analýzu (2).

Tabulka 1

Kritéria výkonnosti vypracovaná pro referenční estrogen a látku se slabou vazbou, vazebná analýza CERI hrER

Látka	Parametr	Střední hodnota [a]	Směrodatná odchylka (n)	95 % konfidenční intervaly [b]	
				Dolní mez	Horní mez
17β-estradiol	Horní	104,74	13,12 (70)	101,6	107,9
	Spodní strana	0,85	2,41 (70)	0,28	1,43

▼M8

Látka	Parametr	Střední hodnota [a]	Směrodatná odchylka (n)	95 % konfidenční intervaly [b]	
				Dolní mez	Horní mez
	Hillův koeficient	–1,22	0,20 (70)	–1,27	–1,17
	$logIC_{50}$	–8,93	0,23 (70)	–8,98	–8,87
Norethynodrel	Horní	101,31	10,55 (68)	98,76	103,90
	Spodní strana	2,39	5,01 (68)	1,18	3,60
	Hillův koeficient	–1,04	0,21 (68)	–1,09	–0,99
	$LogIC_{50}$	–6,19	0,40 (68)	–6,29	–6,10
Norethindrone [c]	Nahoru	92,27	7,79 (23)	88,90	95,63
	Spodní strana	16,52	10,59 (23)	11,94	21,10
	Hillův koeficient	–1,18	0,32 (23)	–1,31	–1,04
	$logIC_{50}$	–6,01	0,54 (23)	–6,25	–5,78

[a] Střední hodnota (n) ± směrodatná odchylka (SD) byla vypočítána pomocí odhadu parametrů vynesené křivky (4parametrická Hillova rovnice) pro kontrolní zkoušky provedené ve čtyřech laboratořích při validační studii (viz příloha N k odkazu 2).

[b] 95 % konfidence je uvedena jako vodítko pro kritéria přijatelnosti.

[c] Testování norethindronu bylo ve validační studii v dílčím úkolu 4 volitelné (viz odkaz 2, viz dílčí úkol 4). Střední hodnota ± (SD) (n) byla tedy vypočítána pomocí odhadu vynesené křivky (4parametrická Hillova rovnice) pro kontrolní zkoušky provedené ve dvou laboratořích.
Rozsah IC_{50} bude záviset na Kd receptorového přípravku a koncentraci radioizotopově značeného ligandu použitého v každé laboratoři. Vhodná úprava rozsahu IC_{50} podle podmínek použitých při provádění analýzy bude přijatelná.

Prokázání odborné způsobilosti laboratoře

10. Viz odstavce 17 a 18 a tabulka 2 v části „**SLOŽKY VAZEBNÉ ANALÝZY hrER**“ této zkušební metody. Každá analýza (saturační a kompetitivní vazby) by měla zahrnovat tři nezávislé zkoušky (tzn. s čerstvě naředěným receptorem, chemickými látkami a reagenciemi) provedené v různé dny, přičemž každé provedení by mělo obsahovat tři opakování.

Určení koncentrace receptoru (hrERα)

11. Koncentrace aktivního receptoru se poněkud liší podle šarže a podmínek uchovávání. Z tohoto důvodu je třeba stanovit koncentraci aktivního receptoru přijatého od dodavatele. Získá se tím vhodná koncentrace aktivního receptoru v době provedení zkoušky.

12. Za podmínek odpovídajících kompetitivní vazbě (tj. 0,5 nM [^{3}H]-estradiol) by se měly nominální koncentrace receptoru 0,1, 0,2, 0,4 a 0,6 nM inkubovat v nepřítomnosti (úplná vazba) a v přítomnosti (nespecifická vazba) 1 μM neznačeného estradiolu. Specifická vazba, vypočítaná jako rozdíl úplné a nespecifické vazby, se nanese proti nominální koncentraci receptoru.

▼M8

Koncentrace receptoru, která dává hodnoty specifické vazby odpovídající 40 % přidaného radioizotopového značení, souvisí s odpovídající koncentrací receptoru a tato koncentrace receptoru se používá pro saturační a kompetitivní vazebné experimenty. Často bude tuto podmínku splňovat konečná koncentrace hrER 0,2 nM.

13. Jestliže nelze opakovaně splnit 40 % kritérium, je třeba zkontrolovat, zda uspořádání experimentu neobsahuje možné chyby. Nedosažení 40 % kritéria může ukazovat, že v rekombinantní šarži je příliš málo aktivního receptoru, a potom je třeba zvážit použití jiné šarže receptoru.

Saturační analýza

14. Hodnotí se osm zvyšujících se koncentrací [^{3}H]17β-estradiolu v trojím provedení, a to za těchto tří podmínek (viz tabulka 2):

a. Za nepřítomnosti neznačeného 17β-estradiolu a v přítomnosti ER. Je to stanovení úplné vazby měřením radioaktivity v jamkách, v nichž je pouze [^{3}H]17β-estradiol.

b. V přítomnosti 2000násobně zvýšené koncentrace neznačeného 17β-estradiolu přes značený 17β-estradiol a v přítomnosti ER. Záměrem této podmínky je saturovat aktivní vazebná místa neznačeným 17β-estradiolem a změřením radioaktivity v jamkách stanovit nespecifickou vazbu. Případný zbývající radioaktivní estradiol, který se může vázat na receptor, se považuje za navázaný na nespecifické místo, neboť neradioaktivní estradiol by měl být v tak vysoké koncentraci, aby se navázal na všechna dostupná specifická místa na receptoru.

c. Za nepřítomnosti neznačeného 17β-estradiolu a nepřítomnosti ER (stanovení celkové radioaktivity)

Příprava roztoků [^{3}H]-17β-estradiolu a neznačeného 17β-estradiolu a hrERα

15. 40 nM roztok [^{3}H]-17β-estradiolu se připraví z 1 μM zásobního roztoku [^{3}H]-17β-estradiolu v DMSO přidáním DMSO (pro přípravu 200 nM) a zkušebního pufru při pokojové teplotě (pro přípravu 40 nM). Pomocí tohoto 40 nM roztoku se připraví série naředěného [^{3}H]-17β-estradiolu v rozmezí od 0,313 nM do 40 nM se zkušebním pufrem při pokojové teplotě (jak je znázorněno ve sloupci 12 tabulky 2). Konečné zkušební koncentrace v rozmezí od 0,0313 do 4,0 nM se získají přidáním 10 μl těchto roztoků do příslušných jamek 96jamkové mikrotitrační destičky (viz tabulky 2 a 3). Příprava zkušebního pufru, výpočet původního zásobního roztoku [^{3}H]-17β-estradiolu podle jeho měrné aktivity, příprava zředěných roztoků a stanovení koncentrací je podrobně popsáno v protokolu CERI (2).

16. Zředěné roztoky neznačeného 17β-estradiolu se připraví z 1 nM zásobního roztoku 17β-estradiolu přidáním zkušebního pufru, aby bylo dosaženo osmi zvyšujících se koncentrací v počátečním rozsahu od 0,625 μM do 80 μM. Konečné zkušební koncentrace v rozmezí od 0,0625 do 8 μM se získají přidáním 10 μl těchto roztoků do příslušných jamek 96jamkové mikrotitrační destičky určené pro měření nespecifické vazby (viz tabulky 2 a 3). Příprava roztoků neznačeného 17β-estradiolu je podrobně popsána v protokolu CERI (2).

▼**M8**

17. Měla by se použít taková koncentrace receptoru, která dává specifickou vazbu 40±10 % (viz odstavce 12–13). Roztok hrERα se připraví s ledovým zkušebním pufrem bezprostředně před použitím, tj. až po přípravě všech jamek pro celkovou vazbu, nespecifickou vazbu a radioaktivní ligand samotný.

18. 96jamkové mikrotitrační destičky se připraví tak, jak je zobrazeno v tabulce 2, a to s třemi replikáty na každou koncentraci [^{3}H]-17β-estradiolu. Přiřazení objemů [^{3}H]-17β-estradiolu, neznačeného 17β-estradiolu, pufru a receptoru je uvedeno v tabulce 3.

Tabulka 2

Uspořádání mikrotitrační destičky při saturační vazebné analýze

	1 (*)	2 (*)	3 (*)	4 (*)	5 (*)	6 (*)	7 (*)	8 (*)	9 (*)	10	11 (**)	12 (**)
	Pro měření TB			Pro měření NSB			Pro určení radioaktivního ligandu samotného				Neznačená ředění E2 pro sloupec 4–6	Ředění [^{3}H]E2 pro sloupec 1–9
A	0,0313 nM [^{3}H] E2+ ER			0,0313 nM [^{3}H] E2+ 0,0625 μM E2+ ER			0,0313 nM				0,625 μM	0,313 nM
B	0,0625 nM [^{3}H] E2+ ER			0,0625 nM [^{3}H] E2+ 0,125 μM E2+ ER			0,0625 nM				1,25 μM	0,625 nM
C	30,125 nM [^{3}H] E2+ ER			0,125 nM [^{3}H] E2+ 0,25 μM E2+ ER			0,125 nM				2,5 μM	1,25 nM
D	0,250 nM [^{3}H] E2+ ER			0,250 nM [^{3}H] E2+ 0,5 μM E2+ ER			0,250 nM				5 μM	2,5 nM
E	0.50 nM [H] E2+ ER			0,50 nM [^{3}H] E2+ 1 μM E2+ ER			0,50 nM				10 μM	5 nM
F	1,00 nM [^{3}H] E2+ ER			1,00 nM [^{3}H] E2+ 2 μM E2+ ER			1,00 nM				20 μM	10 nM
G	2,00 nM [^{3}H] E2+ ER			2,00 nM [^{3}H] E2+ 4 μM E2+ ER			2,00 nM				40 μM	20 nM
H	4,00 nM [^{3}H] E2+ ER			4,00 nM [^{3}H] E2+ 8 μM E2+ ER			4,00 nM				80 μM	40 nM

TB:- celková vazba
NSB:- nespecifická vazba
[^{3}H] E2:- [^{3}H]17β-estradiol
E2:- neznačený 17β-estradiol
(*) Koncentrace zde uvedené jsou konečné koncentrace v každé jamce.
(**) Naředěné roztoky neznačeného E2 a [^{3}H]E2 mohou být připraveny na jiné destičce.

▼M8

Tabulka 3

Objemy reagencií pro saturační mikrotitrační destičku

Číslo sloupce		1	2	3	4	5	6	7 (*)	8 (*)	9 (*)
Postup přípravy		Jamky TB			Jamky NSB			Radioaktivní ligand samotný		
Objem komponentů pro výše uvedené reakční jamky a pořadí přidávání	pufr	60 µl			50 µl			90 µl		
	neznačený E2 ze sloupce 11 v tabulce 2	–			10 µl			–		
	[3H]E2 z řádku 12 v tabulce 2	10 µl			10 µl			10 µl		
	hrERα	30 µl			30 µl			–		
Celkový reakční objem		100 µl			100 µl			100 µl		
Inkubace		**REAKCE PO 2 HODINÁCH INKUBACE**						Kvantifikace radioaktivity ihned po přípravě. Bez inkubace		
Expozice 0,4 % DCC		Ano			Ano			**Ne**		
Objem 0,4 % DCC		100 µl			100 µl			–		
Filtrace		Ano			Ano			Ne		
MĚŘENÍ DPM										
Do scintilačního koktejlu přidán kvantifikační objem		100 µl (**)			100 µl (**)			50 µl		

(*) Jestliže se pro měření dpm používá LSC pro mikrotitrační destičky, není příprava radioaktivního ligandu samotného na stejné experimentální destičce s TB a NSB vhodná. Radioaktivní ligand samotný by měl být připravován na jiné destičce.

(**) Jestliže je k separaci DCC použito odstřeďování, je třeba 50 µl supernatantu změřit pomocí LSC, aby nedošlo ke kontaminaci DCC.

19. Mikrotitrační destičky pro stanovení celkové vazby a nespecifické vazby by se měly inkubovat při pokojové teplotě (22°C až 28°C) po dobu dvou hodin.

Měření [^{3}H]-17β-estradiolu navázaného na hrERα

20. Po dvouhodinové inkubaci by měl být [^{3}H]-17β-estradiol navázaný na hrERα separován od volného [^{3}H]-17β-estradiolu přidáním 100 µl ledové suspenze 0,4 % DCC do jamek. Destičky se poté umístí na led na 10 minut a reakční směs a suspenze DCC se přefiltruje přenesením na filtr mikrotitračních destiček, aby se odstranil DCC. Poté se 100 µl filtrátu přidá do scintilační kapaliny ve scintilačních lahvičkách pro stanovení rozpadů za minutu (dpm) na lahvičku pomocí kapalinového scintilačního spektrometru.

▼M8

21. Jestliže není k dispozici filtr na mikrotitrační destičky, lze DCC alternativně odstranit odstředěním. Poté se velmi opatrně odebere 50 µl supernatantu obsahujícího [^{3}H]-17β-estradiol navázaný na hrERα, aby nedošlo ke kontaminaci jamek dotykem DCC, a použije se pro počítání scintilací.

22. Pro stanovení rozpadu za minutu (dpm) [^{3}H]-17β-estradiolu přidaného do jamek se použije podmínka radioaktivního ligandu samotného. Radioaktivita se kvantifikuje ihned po přípravě. Tyto jamky se neinkubují a neexponují se suspenzi DCC, ale jejich obsah je třeba přemístit přímo do scintilační kapaliny. Tato měření ukazují, kolik [^{3}H]-17β-estradiolu v dpm bylo přidáno do každé sady jamek pro celkovou vazbu a nespecifickou vazbu.

Kompetitivní vazebná analýza

23. Kompetitivní vazebná analýza měří vazbu jedné koncentrace [^{3}H]17β-estradiolu v přítomnosti zvyšujících se koncentrací zkoušené chemické látky. Při každé koncentraci by se měly v jednom provedení zkoušky použít tři souběžné replikáty. Kromě toho by se měla pro každou zkoušenou chemickou látku provést tři nesouběžná provedení zkoušky. Analýza se provádí v jedné nebo několika 96jamkových mikrotitračních destičkách.

Kontroly

24. Při provádění analýzy by měly být do každého experimentu zařazeny souběžné testy s rozpouštědlem a kontroly (tj. referenční estrogen, slabá vazba a látka, která se neváže). Při každém provedení zkoušky by měly být na jedné destičce použity celé křivky koncentrace pro referenční estrogen a kontroly (tj. slabá vazba a neváže se). Všechny ostatní destičky by měly obsahovat i) vysokou (maximální vytěsnění, tj. přibližně úplné vytěsněni radioizotopově značeného ligandu) a střední (přibližně IC_{50}) koncentraci E2 a látky se slabou vazbou, a to třikrát; ii) kontrolu s rozpouštědlem a látkou s nespecifickou vazbou, a to vždy třikrát. Postupy pro přípravu experimentálního pufru, [^{3}H]-17β-estradiolu, hrERα a roztoků zkoušených chemických látek jsou podrobně popsány v protokolu CERI (2).

Kontrola s rozpouštědlem:

25. Kontrola s rozpouštědlem ukazuje, že rozpouštědlo nereaguje se zkušebním systémem, a měří také úplnou vazbu (TB). Nejvhodnějším rozpouštědlem je DMSO. Jestliže nejvyšší koncentrace zkoušené chemické látky není rozpustná v DMSO, může být alternativně použit ethanol. Koncentrace DMSO v jamkách při konečné analýze by měla být 2,05 % a může se zvyšovat do 2,5 % v případě nerozpustnosti zkoušené chemické látky. Koncentrace DMSO nad 2,5 % by se neměly prožívat vzhledem k interferenci vyšších koncentrací rozpouštědla s analýzou. U zkoušených chemických látek, které nejsou rozpustné v DMSO, ale jsou rozpustné v ethanolu, může být při analýze použit bez interference maximálně 2 % ethanol.

Kontrola s pufrem:

26. Kontrola s pufrem (BC) by neměla obsahovat rozpouštědlo ani zkoušenou chemickou látku, ale všechny ostatní složky analýzy. Výsledky kontroly s pufrem se porovnají s kontrolou s rozpouštědlem za účelem ověření, že použité rozpouštědlo neovlivňuje zkušební systém.

▼**M8**

Látka se silnou vazbou (referenční estrogen)

27. 17β-estradiol (CAS 50-28-2) je endogenní ligand a váže se s vysokou afinitou na ER, podtyp alfa. Pro každou kompetitivní vazebnou analýzu hrERα by měla být vypracována standardní křivka s použitím neznačeného 17β-estradiolu, aby bylo možné posoudit variabilitu při provádění analýzy v čase ve stejné laboratoři. Připraví se osm roztoků neznačeného 17β-estradiolu v DMSO a zkušebním pufru, přičemž konečné koncentrace v jamkách, které budou použity pro standardní křivku, budou v těchto rozestupech: 10^{-6}, 10^{-7}, 10^{-8}, $10^{-8,5}$, 10^{-9}, $10^{-9,5}$, 10^{-10}, 10^{-11} M. Nejvyšší koncentrace neznačeného 17β-estradiolu (1 μM) by měla sloužit také jako indikátor nespecifické vazby. Tato koncentrace je v tabulce 4 odlišena označením „NSB“, ačkoliv je také součástí standardní křivky.

Látka se slabou vazbou

28. Měla by být zařazena látka se slabou vazbou (norethynodrel (CAS68-23-5) nebo alternativně norethindron (CAS 68-22-4)), aby se prokázala citlivost každého experimentu a aby se umožnilo posouzení variability při provádění analýzy v čase. Připraví se osm roztoků látky se slabou vazbou v DMSO a zkušebním pufru, přičemž konečné koncentrace v jamkách budou: $10^{-4,5}$, $10^{-5,5}$, 10^{-6}, $10^{-6,5}$, 10^{-7}, $10^{-7,5}$, 10^{-8} a 10^{-9} M.

Látka, která se neváže

29. Jako negativní kontrola (látka, která se neváže) se používá oktyltriethoxysilan (OTES, CAS 2943-75-1). Poskytuje jistotu, že analýza, tak jak je prováděna, dokáže detekovat zkoušené chemické látky, které se nevážou na hrERα. Připraví se osm roztoků látky, která se neváže, v DMSO a zkušebním pufru, přičemž konečné koncentrace v jamkách budou: 10^{-3},10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6}, 10^{-7}, 10^{-8}, 10^{-9}, 10^{-10} M. Jako látka, která se neváže, může být alternativně použit di-n-butylftalát (DBP, CAS 84-72-2), ale může být zkoušen pouze do 10^{-4}M. Bylo prokázáno, že maximální rozpustnost DBP v analýze je 10^{-4} M.

Koncentrace hrERα

30. Mělo by se použít takové množství receptoru, které dává specifickou vazbu 40±10 % (viz odstavce 12–13 v dodatku 3). Roztok hrERα je třeba připravovat naředěním funkčního hrERα v ledovém zkušebním pufru bezprostředně před použitím.

[^{3}H]-17β-estradiol

31. Konečná koncentrace [^{3}H]-17β-estradiolu v jamkách by měla být 0,5 nM.

Zkoušené chemické látky

32. V první řadě je třeba provést zkoušku rozpustnosti, aby bylo možné stanovit mez rozpustnosti pro každou zkoušenou chemickou látku a zjistit vhodný rozsah koncentrace, jenž má být použit při provádění zkušebního protokolu. Mez rozpustnosti každé zkoušené chemické látky se nejprve stanoví v rozpouštědle a poté dále potvrdí za zkušebních podmínek. Konečná koncentrace zkoušená při analýze by neměla překročit 1 mM. Zkoušení za účelem zjištění rozsahu zahrnuje kontrolu s rozpouštědlem s alespoň 8 log-sériovými ředěními, počínaje maximální přijatelnou koncentrací (např. 1 mM nebo nižší, na základě meze rozpustnosti), přičemž je třeba zaznamenat přítomnost zákalu nebo sraženiny (viz také odstavec 35 v dodatku 3). Po stanovení rozsahu koncentrace pro zkoušení by zkoušená chemická látka

▼M8

měla být testována s použitím 8 logaritmických koncentrací v rozestupech vhodně definovaných předchozí zkouškou ke stanovení rozsahu. Při druhém a třetím experimentu by se měly podle potřeby dále upravit zkoušené koncentrace, aby lépe charakterizovaly křivku závislosti odpovědi na koncentraci, je-li to nezbytné.

33. Zkoušená chemická látka se naředí ve vhodném rozpouštědle (viz odstavec 25 v dodatku 3). Jestliže nejvyšší koncentrace zkoušené chemické látky není rozpustná v DMSO ani v ethanolu a přidání většího množství rozpouštědla by způsobilo, že koncentrace rozpouštědla v poslední zkumavce bude větší než přijatelná mez, může se nejvyšší koncentrace snížit na nejbližší nižší koncentraci. V tomto případě může být na dolní konec série koncentrací přidána další koncentrace. Ostatní koncentrace v sérii by měly zůstat beze změny.

34. Roztoky zkoušené chemické látky je třeba po přidání do jamky pečlivě sledovat, neboť zkoušená chemická látka se může po přidání do jamky srážet. Data za všechny jamky, které obsahují sraženinu, by měla být vyloučena z vynesené křivky a měl by být uveden důvod pro vyloučení těchto dat.

35. Jestliže již existují informace z jiných zdrojů, které uvádějí log(IC_{50}) zkoušené chemické látky, může být vhodné stanovit geometrické rozestupy ředění blíže kolem předpokládané hodnoty log(IC_{50}) (tj. 0,5 log jednotky). Konečné výsledky by měly ukazovat dostatečný rozsah koncentrací na každé straně log(IC_{50}), včetně „horní“ a „dolní“, aby vazebná křivka mohla být adekvátně charakterizována.

Uspořádání zkušebních destiček

36. Připraví se označené mikrotitrační destičky s použitím šestinásobné inkubace pro kontrolu s rozpouštědlem, nejvyšší koncentraci referenčního estrogenu (E2), který slouží také jako indikátor nespecifické vazby (NSB), kontrolu s pufrem, trojnásobná inkubace pro každou z osmi koncentrací kontrolní látky, která se neváže (oktyltriethoxysilan), sedm nižších koncentrací pro referenční estrogen (E2), osm koncentrací látky se slabou vazbou (norethynodrel nebo norethindron) a osm koncentrací každé zkoušené chemické látky (TC). Příklad diagramu uspořádání destičky pro celé koncentrační křivky pro referenční estrogen a kontroly je uveden níže v tabulce 4. Pro zkoušenou chemickou látku se použijí další mikrotitrační destičky, které by měly obsahovat kontroly (tj. i) vysokou (maximální vytěsnění) a střední (přibližně IC_{50}) koncentraci každého E2 a látky se slabou vazbou, a to třikrát; ii) kontrolu s rozpouštědlem (jako celkovou vazbu) a látkou s nespecifickou vazbou, a to vždy šestkrát (tabulka 5). Příklad postupu uspořádání mikrotitrační destičky pro kompetitivní analýzu s použitím tří neznámých zkoušených chemických látek je uveden v dodatku 3.3. Koncentrace uvedené v technologickém postupu a v tabulkách 4 a 5 jsou konečné koncentrace použité v každé jamce. Maximální koncentrace pro E2 by měla být 1×10^{-7} M a pro látku se slabou vazbou by měla být použita nejvyšší koncentrace pro látku se slabou vazbou použitá na destičce 1. Koncentraci IC_{50} musí stanovit laboratoř na základě své dosavadní kontrolní databáze. Lze očekávat, že tato hodnota bude podobná hodnotě pozorované ve validačních studiích (viz tabulka 1).

▼M8

Tabulka 4

Uspořádání mikrotitrační destičky při kompetitivní vazebné analýze ([1]) ([2]), celé křivky koncentrace pro referenční estrogen a kontroly (destička 1)

	1	*2*	*3*	*4*	*5*	*6*	*7*	*8*	*9*	*10*	*11*	*12*
	Kontrola s pufrem a pozitivní kontrola (E2)			Slabá pozitivní (norethynodrel)			Negativní kontrola (OTES)			TB a NSB		
A	Slepý pokus (*)			1×10^{-9} M			1×10^{-10} M			TB (kontrola s rozpouštědlem) (2,05 % DMSO)		
B	E2 (1×10^{-11} M)			1×10^{-8} M			1×10^{-9} M					
C	E2 (1×10^{-10} M)			$1\times10^{-7,5}$ M			1×10^{-8} M			NSB (10^{-6} M E2)		
D	E2 ($1\times10^{-9,5}$ M)			1×10^{-7} M			1×10^{-7} M					
E	E2 (1×10^{-9} M)			$1\times10^{-6,5}$ M			1×10^{-6} M			Kontrola s pufrem		
F	E2 ($1\times10^{-8,5}$ M)			1×10^{-6} M			1×10^{-5} M					
G	E2 (1×10^{-8} M)			$1\times10^{-5,5}$ M			1×10^{-4} M			Slepý pokus (pro radioaktivní) (**)		
H	E2 (1×10^{-7} M)			$1\times10^{-4,5}$ M			1×10^{-3} M					

([1]) Vzorové uspořádání standardní mikrotitrační destičky, které se použije při každém experimentu.
([2]) Nezapomeňte, že tato mikrotitrační destička je připravena s použitím naředěných roztoků z destičky s ředěním uvedeným pro standardy v předchozích částech.
V tomto příkladu je látkou se slabou vazbou norethinodrel (NE).
(*) skutečný slepý pokus, jamka nepoužita
(**) slepý pokus, nepoužito při inkubaci, ale použito na potvrzení celkové dodané radioaktivity.

Tabulka 5

Uspořádání mikrotitrační destičky při kompetitivní vazebné analýze, další destičky pro zkoušené chemické látky (TC) a kontroly

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	Zkoušená chemická látka 1 (TC-1)			Zkoušená chemická látka 2 (TC-2)			Zkoušená chemická látka 3 (TC-3)			Kontroly		
A	TC-1 (1×10^{-10} M)			TC-2 (1×10^{-10} M)			TC-3 (1×10^{-10} M)			E2 (1×10^{-7} M)		
B	TC-1 (1×10^{-9} M)			TC-2 (1×10^{-9} M)			TC-3 (1×10^{-9} M)			E2 (IC_{50})		
C	TC-1 (1×10^{-8} M)			TC-2 (1×10^{-8} M)			TC-3 (1×10^{-8} M)			NE ($1\times10^{-4.5}$ M)		
D	TC-1 (1×10^{-7} M)			TC-2 (1×10^{-7} M)			TC-3 (1×10^{-7} M)			NE (IC_{50})		
E	TC-1 (1×10^{-6} M)			TC-2 (1×10^{-6} M)			TC-3 (1×10^{-6} M)			NSB (10^{-6} M E2)		
F	TC-1 (1×10^{-5} M)			TC-2 (1×10^{-5} M)			TC-3 (1×10^{-5} M)					
G	TC-1 (1×10^{-4} M)			TC-2 (1×10^{-4} M)			TC-3 (1×10^{-4} M)			TB (kontrola s rozpouštědlem)		
H	TC-1 (1×10^{-3} M)			TC-2 (1×10^{-3} M)			TC-3 (1×10^{-3} M)					

V tomto příkladu je látkou se slabou vazbou norethinodrel (NE).

▼M8

Dokončení kompetitivní vazebné analýzy

37. S výjimkou jamek pro celkovou vazbu a slepé pokusy (pro radioaktivní látku), jak je uvedeno v tabulce 6, se do každé jamky dá 50 µl zkušebního pufru a smíchá se s 10 µl kontroly s rozpouštědlem, referenčního estrogenu (E2), látky se slabou vazbou, látky, která se neváže, a zkoušenými chemickými látkami, respektive s 10 µl roztoku 5 nM [3H]-17β-estradiolu. Poté se do každé destičky přidá 30 µl ledového roztoku receptoru a lehce promíchá. Roztok hrERα by měl být poslední přidávanou reagencií. Zkušební mikrotitrační destičky se inkubují při pokojové teplotě (22° až 28°C) po dobu 2 hodin.

Tabulka 6

Objem zkušebních složek pro kompetitivní vazebnou analýzu hrER, mikrotitrační destičky

Postup přípravy		Jiné než jamky TB	Jamky TB	Slepý pokus (pro radioaktivní látku)
Objem komponentů pro výše uvedené reakční jamky a pořadí přidávání	Zkušební pufr při pokojové teplotě	50 µl	60 µl	90 µl
	Neznačený E2, látka se slabou vazbou, látka, která se neváže, rozpouštědlo a zkoušené chemické látky (*)	10 µl	–	–
	[^{3}H]-17β-estradiol pro konečnou koncentraci 0,5 nM (tj. 5 nM)	10 µl	10 µl	10 µl
	určená koncentrace hrERα (viz odstavce 12–13)	30 µl	30 µl	–
Celkový objem v každé jamce		100 µl	100 µl	100 µl

(*) správně připravené, aby byla dosažena konečná koncentrace v rámci přijatelné koncentrace rozpouštědla

38. Poté se provede kvantifikace [^{3}H]-17β-estradiolu navázaného na hrERα po separaci [^{3}H]-17β-estradiolu navázaného na hrERα z volného [^{3}H]-17β-estradiolu přidáním 100 µl ledové suspenze DCC do každé jamky, jak je popsáno v odstavcích 21–23 dodatku 3 o saturační vazebné analýze.

39. Jamky G10–12 a H10–12 (označené v tabulce 4 jako slepý pokus (pro radioaktivní látku)) představují dpm [^{3}H]-značeného-estradiolu v 10 µl. Alikvotní množství z 10 µl se přidá přímo do scintilační kapaliny.

Kritéria přijatelnosti

Saturační vazebná analýza

40. Křivka specifické vazby by měla dosáhnout plató s použitím zvyšujících se koncentrací [^{3}H]-17β-estradiolu, což ukazuje saturaci hrERα ligandem.

41. Specifická vazba při 0,5 nM [^{3}H]-17β-estradiolu by měla být v přijatelném rozmezí 30 % až 50 % průměrné naměřené celkové radioaktivity přidané v průběhu jednotlivých provedení zkoušek. Občasná mírná vybočení mimo toto rozmezí jsou přijatelná, ale pokud jsou všechna provedení zkoušky mimo toto rozmezí nebo pokud je konkrétní provedení zkoušky výrazně mimo toto rozmezí, je třeba upravit koncentraci proteinu a saturační analýzu zopakovat.

▼**M8**

42. Data by měla vytvořit lineární Scatchardův graf.

43. Nespecifická vazba by neměla být nadměrná. Hodnota nespecifické vazby by měla být typicky <35 % celkové vazby. Tento poměr však může při měření velmi nízkých dpm u nejnižší koncentrace radioizotopově značeného zkoušeného 17β-estradiolu občas uvedený limit překročit.

Kompetitivní vazebná analýza

44. Zvyšující se koncentrace neznačeného 17β-estradiolu by měly vytěsnit [^{3}H]-17β- estradiol z receptoru způsobem odpovídajícím jednomístné kompetitivní vazbě.

45. Hodnota IC_{50} pro referenční estrogen (tj. 17β-estradiol) by se měla přibližně rovnat molární koncentraci [^{3}H]-17β-estradiolu plus Kd určený ze saturační vazebné analýzy.

46. Celková specifická vazba by měla být soustavně v přijatelném rozmezí 40 ± 10 %, když je průměrná naměřená koncentrace celkové radioaktivity přidaná do každé jamky 0,5 nM ve všech provedeních zkoušky. Občasná mírná vybočení mimo toto rozmezí jsou přijatelná, ale pokud jsou všechna provedení zkoušky mimo toto rozmezí nebo pokud je konkrétní provedení zkoušky výrazně mimo toto rozmezí, je třeba upravit koncentraci proteinu.

47. Rozpouštědlo by nemělo měnit citlivost ani reprodukovatelnost analýzy. Výsledky kontroly s rozpouštědlem (jamky TB) se porovnají s kontrolou s pufrem za účelem ověření, že použité rozpouštědlo neovlivňuje zkušební systém. Jestliže rozpouštědlo nemá na analýzu žádný vliv, měly by být výsledky TB a kontroly s rozpouštědlem srovnatelné.

48. Látka, která se neváže, by neměla vytěsnit více než 25 % [^{3}H]-17β-estradiolu z hrERα při zkoušení do 10^{-3} M (OTES) nebo 10^{-4} M (DBP).

49. Pro referenční estrogen a dvě látky se slabou vazbou (např. norethynodrel, norethindron) byla vypracována kritéria funkčnosti s použitím údajů z validační studie pro vazebnou analýzu CERI hrER (příloha N v odkazu 2). Jsou uvedeny 95 % konfidenční intervaly pro střední hodnotu ± SD (n) za všechna kontrolní provedení zkoušky ve čtyřech laboratořích účastnících se ve validační studii. Pro referenční estrogen a látky se slabou vazbou a pro $\log_{10}$RBA látek se slabou vazbou vzhledem k referenčnímu estrogenu byly vypočteny 95 % konfidenční intervaly pro parametry křivky (tj. horní, dolní, Hillův koeficient, log IC_{50}). V tabulce 1 jsou uvedeny očekávané rozsahy parametrů křivky, které mohou být použity jako kritéria funkčnosti. V praxi se může rozsah IC_{50} poněkud odlišovat v závislosti na experimentálně zjištěné Kd receptorového přípravku a koncentraci ligandu použitého pro analýzu.

50. Pro parametry křivky pro zkoušené chemické látky nebyla vypracována žádná kritéria funkčnosti, protože stávajících potenciálních zkoušených chemických látek existuje velké množství a značně se liší jejich potenciální afinity a výsledky (např. celá křivka, částečná křivka, chybějící křivka). Při posuzování výsledků z každého provedení zkoušky za zkoušenou chemickou látku je třeba postupovat s odborným úsudkem. Mělo by být použito dostatečné rozmezí koncentrací, aby byl jednoznačně definován vrchol (např. 90–100 % vazby) kompetitivní křivky. Variabilita mezi replikáty při každé

▼M8

koncentraci zkoušené chemické látky i mezi 3 zkouškami neprováděnými souběžně by měla být přiměřená a vědecky obhajitelná. Kontroly z každého provedení zkoušky by se u zkoušené chemické látky měly blížit mírám funkčnosti uvedeným pro tuto analýzu CERI a měly by odpovídat dosavadním kontrolním údajům z každé příslušné laboratoře.

ANALÝZA ÚDAJŮ

Saturační vazebná analýza

51. Měří se celková i nespecifická vazba. Z těchto hodnot se specifická vazba zvyšujících se koncentrací [^{3}H]-17β-estradiolu za rovnovážného stavu vypočítá odečtením nespecifické vazby od celkové. Graf specifické vazby proti koncentraci [^{3}H]-17β-estradiolu by měl dosáhnout plató u maximální specifické vazby indikující saturaci hrERα [^{3}H]-17β-estradiolem. Kromě toho by analýza dat měla dokumentovat vazbu [^{3}H]-17β-estradiolu na jedno vazebné místo s vysokou afinitou. Na křivce saturační vazby by měla být zobrazena nespecifická, celková a specifická vazba. Další rozbor těchto údajů by měl být proveden pomocí nelineární regresní analýzy (např. BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995) s konečným zobrazením dat ve formě Scatchardova grafu.

52. Při analýze dat se určuje B_{max} a K_d z údajů o celkové vazbě samotné, a to za použití předpokladu, že nespecifická vazba je lineární, není-li zdůvodněno použití jiné metody. Kromě toho by při určování nejlepších hodnot měla být použita robustní regrese, pokud není uvedeno zdůvodnění. Metoda zvolená pro robustní regresi by měla být uvedena. Při určování B_{max} a K_d z údajů o saturační vazbě by měla být vždy použita korekce úbytku ligandu (např. pomocí metody podle Swillense 1995).

Kompetitivní vazebná analýza

53. Křivka kompetitivní vazby se vynáší jako specifická vazba [^{3}H]-17β-estradiolu proti koncentraci (log10 jednotky) kompetitora. Koncentrace zkoušené chemické látky, která inhibuje 50 % maximální specifické vazby [^{3}H]-17β-estradiolu, je hodnota IC_{50}.

54. Odhady log (IC_{50}) pro pozitivní kontroly (např. referenční estrogen a látku se slabou vazbou) se stanoví pomocí vhodného softwaru pro nelineární vynesení křivky, aby byly vhodné pro čtyřparametrickou Hillovu rovnici (např. BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995). Při vynášení těchto křivek se horní bod, dolní bod, sklon a log(IC_{50}) obvykle ponechávají bez omezení. Při určování nejlepších hodnot by měla být použita robustní regrese, pokud není uvedeno zdůvodnění. Korekce úbytku ligandu se nepoužívá. Po úvodní analýze je třeba každou vazebnou křivku zkontrolovat, aby bylo zajištěno, že je vhodně aplikována na model. Relativní vazebná afinita (RBA) pro látku se slabou vazbou se vypočítá jako procento log (IC_{50}) pro látku se slabou vazbou vzhledem k log (IC_{50}) pro 17β-estradiol. Výsledky z pozitivních kontrol a z kontroly s látkou, která se neváže, se posuzují pomocí měřítek účinnosti analýzy uvedených v odstavci 44–49 tohoto dodatku 3.

▼M8

55. Data za všechny zkoušené chemické látky se analyzují postupně, aby bylo zajištěno, že data budou analyzována správně, a aby byla správně klasifikována každá kompetitivní vazebná křivka. Doporučuje se, aby každé provedení zkoušky u zkoušené chemické látky nejdříve prošlo standardizovanou analýzou dat, která je stejná jako analýza použitá pro kontroly s referenčním estrogenem a s látkou se slabou vazbou (viz odstavec 54 tohoto dodatku 3). Po dokončení je třeba provést technickou kontrolu parametrů vynesené křivky a vizuálně zkontrolovat, jak dobře data odpovídají generované kompetitivní vazebné křivce u každého provedení zkoušky. V průběhu této technické kontroly je pozorovaný pokles procenta specificky navázaného [^{3}H]-17β-estradiolu v závislosti na koncentraci, nízká variabilita mezi technickými replikáty při jednotlivých koncentracích zkoušené chemické látky a konzistentní parametry u tří provedení zkoušky dobrým ukazatelem, že zkouška a analýzy dat byly provedeny správně.

Interpretace údajů

56. Za předpokladu, že jsou splněna všechna kritéria přijatelnosti, lze zkoušenou chemickou látku považovat za látku, která se váže na hrERα, jestliže lze vynést vazebnou křivku a nejnižší bod na křivce odpovědi v rozsahu dat je menší než 50 % (obrázek 1).

57. Za předpokladu, že jsou splněna všechna kritéria přijatelnosti, lze zkoušenou chemickou látku považovat za látku, která se neváže na hrERα, jestliže:

— lze vynést vazebnou křivku a nejnižší bod na křivce odpovědi v rozsahu dat je nad 75 % nebo

— nelze vynést vazebnou křivku a nejnižší nevyhlazené průměrné procento vazby ze skupiny koncentrací v datech je nad 75 %.

58. Zkoušené chemické látky se považují za neurčité, jestliže není splněna žádná z výše uvedených podmínek (např. nejnižší bod na vynesené křivce odpovědi je mezi 76–51 %).

Tabulka 7

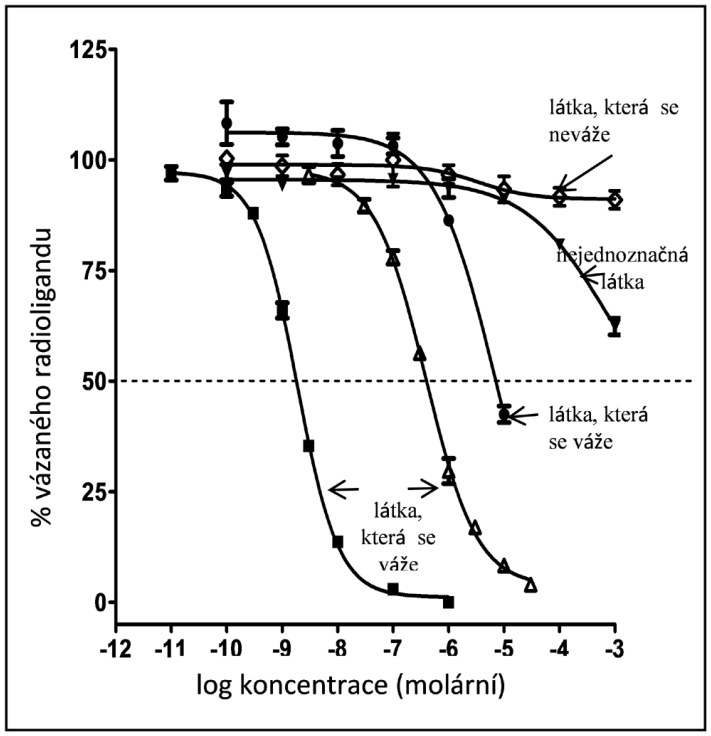
Kritéria pro stanovení klasifikace zkoušené chemické látky podle kompetitivní vazebné křivky

Klasifikace	Kritéria
Látka, která se váže[a]	Lze vynést vazebnou křivku. **Nejnižší bod na křivce odpovědi v rozsahu dat je menší než 50 %.**
Látka, která se neváže[b]	Jestliže lze vynést vazebnou křivku, **je nejnižší bod na křivce odpovědi v rozsahu dat nad 75 %.** Jestliže nelze vynést vazebnou křivku, **je nejnižší nevyhlazené průměrné procento vazby ze skupiny koncentrací v datech nad 75 %.**
Neurčitá[c]	Každé testovatelné provedení zkoušky, kdy se látka nechová ani jako látka, která se váže, ani jako látka, která se neváže (např. nejnižší bod na vynesené křivce odpovědi je mezi 76–51 %).

▼M8

Obrázek 1

Příklady klasifikace zkoušené chemické látky s použitím kompetitivní vazebné křivky



59. Sloučí se několik testů zkoušené chemické látky provedených v laboratoři, každému testu se přiřadí numerická hodnota a jednotlivé testy se zprůměrují, jak je znázorněno v tabulce 8. Výsledky sloučených testů v rámci každé laboratoře se porovnají s předpokládanou klasifikací jednotlivých zkoušených chemických látek.

Tabulka 8

Metoda pro klasifikaci zkoušené chemické látky s použitím několika testů v rámci laboratoře

Přiřazení hodnoty každému testu:

Klasifikace	**Číselná hodnota**
váže se	2
neurčitá	1
neváže se	0

Klasifikace průměru číselných hodnot ze všech testů:

Klasifikace	**Číselná hodnota**
váže se	průměr ≥ 1,5
neurčitá	0,5 ≤ průměr < 1,5
neváže se	průměr < 0,5

ZÁVĚREČNÁ ZPRÁVA

60. Viz odstavce 24 „SLOŽKY VAZEBNÉ ANALÝZY hrER“ této zkušební metody.

▼**M8**

Dodatek 3.1

SEZNAM VÝRAZŮ

[^{3}H]E2: 17β-estradiol značený radioizotopem tritia.

DCC: Aktivní uhlí potažené dextranem.

E2: Neznačený 17β-estradiol (inertní).

Zkušební pufr: 10 mM Tris-HCl, pH 7,4, s obsahem 1 mM EDTA, 1mM EGTA, 1 mM $NaVO_3$, 10 % glycerolu, 0,2 mM leupeptinu, 1 mM dithiothreitolu a 10 mg/ml bovinního sérového albuminu.

hrERα: Lidský rekombinantní estrogenní receptor alfa (ligand vázající doména).

Replikát: Jedna z několika jamek, které obsahují stejný obsah ve stejné koncentraci a analyzují se souběžně v rámci jednoho provedení zkoušky. V tomto protokolu se každá koncentrace zkoušené chemické látky testuje třikrát; to znamená, že existují tři replikáty, které se analyzují současně při každé koncentraci zkoušené chemické látky.

Provedení zkoušky: Úplná sada jamek na mikrotitrační destičce analyzovaných souběžně, která poskytuje všechny informace potřebné pro charakterizaci vazby zkoušené chemické látky na hrERα (tzn. celkový [^{3}H]-17β-estradiol přidaný do zkušební jamky, maximální vazba [^{3}H]-17β-estradiolu na hrERα, nespecifická vazba a celková vazba při různých koncentracích zkoušené chemické látky). Provedení zkoušky může sestávat pouze z jedné jamky (tj. replikátu) na každou koncentraci, ale protože tento protokol vyžaduje trojí analyzování, sestává jedno provedení ze tří jamek na každou koncentraci. Dále tento protokol vyžaduje tři nezávislá (tj. nesouběžná) provedení na každou chemickou látku.

▼**M8**

Dodatek 3.2

USPOŘÁDÁNÍ JAMEK PŘI KOMPETITIVNÍ VAZEBNÉ ANALÝZE

Mikrodestička	**Poloha**	**Replikát**	**Druh jamky**	**Kód jamky**	**Kód koncentrace**	**Výchozí koncentrace kompetitora (M)**	**Zásobní hrER (µl)**	**Objem pufru (µl)**	**Objem stopovací látky (radioaktivní E2) (µl)**	**Objem z destičky s ředěním (µl)**	**Konečný objem (µl)**	**Konečná koncentrace kompetitora (M)**
S	A1	1	Slepý pokus	BK	BK1	—	—	—	—	—	—	—
S	A2	2	Slepý pokus	BK	BK2	—	—	—	—	—	—	—
S	A3	3	Slepý pokus	BK	BK3	—	—	—	—	—	—	—
S	B1	1	neradioaktivní E2	S	S1	1.00E-10	30	50	10	10	100	1.0E-11
S	B2	2	neradioaktivní E2	S	S1	1.00E-10	30	50	10	10	100	1.0E-11
S	B3	3	neradioaktivní E2	S	S1	1.00E-10	30	50	10	10	100	1.0E-11
S	C1	1	neradioaktivní E2	S	S2	1.00E-09	30	50	10	10	100	1.0E-10
S	C2	2	neradioaktivní E2	S	S2	1.00E-09	30	50	10	10	100	1.0E-10
S	C3	3	neradioaktivní E2	S	S2	1.00E-09	30	50	10	10	100	1.0E-10
S	D1	1	neradioaktivní E2	S	S3	3.16E-09	30	50	10	10	100	3.2E-10
S	D2	2	neradioaktivní E2	S	S3	3.16E-09	30	50	10	10	100	3.2E-10
S	D3	3	neradioaktivní E2	S	S3	3.16E-09	30	50	10	10	100	3.2E-10
S	E1	1	neradioaktivní E2	S	S4	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
S	E2	2	neradioaktivní E2	S	S4	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
S	E3	3	neradioaktivní E2	S	S4	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
S	F1	1	neradioaktivní E2	S	S5	3.16E-08	30	50	10	10	100	3.2E-09
S	F2	2	neradioaktivní E2	S	S5	3.16E-08	30	50	10	10	100	3.2E-09
S	F3	3	neradioaktivní E2	S	S5	3.16E-08	30	50	10	10	100	3.2E-09
S	G1	1	neradioaktivní E2	S	S6	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08

▼**M8**

Mikrodestička	Poloha	Replikát	Druh jamky	Kód jamky	Kód koncentrace	Výchozí koncentrace kompetitora (M)	Zásobní hrER (µl)	Objem pufru (µl)	Objem stopovací látky (radioaktivní E2) (µl)	Objem z destičky s ředěním (µl)	Konečný objem (µl)	Konečná koncentrace kompetitora (M)
S	G2	2	neradioaktivní E2	S	S6	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08
S	G3	3	neradioaktivní E2	S	S6	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08
S	H1	1	neradioaktivní E2	S	S7	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
S	H2	2	neradioaktivní E2	S	S7	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
S	H3	3	neradioaktivní E2	S	S7	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
S	A4	1	norethynodrel	NE	WP1	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
S	A5	2	norethynodrel	NE	WP1	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
S	A6	3	norethynodrel	NE	WP1	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
S	B4	1	norethynodrel	NE	WP2	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08
S	B5	2	norethynodrel	NE	WP2	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08
S	B6	3	norethynodrel	NE	WP2	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08
S	C4	1	norethynodrel	NE	WP3	3.16E-07	30	50	10	10	100	3.2E-08
S	C5	2	norethynodrel	NE	WP3	3.16E-07	30	50	10	10	100	3.2E-08
S	C6	3	norethynodrel	NE	WP3	3.16E-07	30	50	10	10	100	3.2E-08
S	D4	1	norethynodrel	NE	WP4	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
S	D5	2	norethynodrel	NE	WP4	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
S	D6	3	norethynodrel	NE	WP4	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
S	E4	1	norethynodrel	NE	WP5	3.16E-06	30	50	10	10	100	3.2E-07
S	E5	2	norethynodrel	NE	WP5	3.16E-06	30	50	10	10	100	3.2E-07
S	E6	3	norethynodrel	NE	WP5	3.16E-06	30	50	10	10	100	3.2E-07

▼**M8**

Mikrodestička	Poloha	Replikát	Druh jamky	Kód jamky	Kód koncentrace	Výchozí koncentrace kompetitora (M)	Zásobní hrER (µl)	Objem pufru (µl)	Objem stopovací látky (radioaktivní E2) (µl)	Objem z destičky s ředěním (µl)	Konečný objem (µl)	Konečná koncentrace kompetitora (M)
S	F4	1	norethyno-drel	NE	WP6	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
S	F5	2	norethyno-drel	NE	WP6	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
S	F6	3	norethyno-drel	NE	WP6	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
S	G4	1	norethyno-drel	NE	WP7	3.16E-05	30	50	10	10	100	3.2E-06
S	G5	2	norethyno-drel	NE	WP7	3.16E-05	30	50	10	10	100	3.2E-06
S	G6	3	norethyno-drel	NE	WP7	3.16E-05	30	50	10	10	100	3.2E-06
S	H4	1	norethyno-drel	NE	WP8	3.16E-04	30	50	10	10	100	3.2E-05
S	H5	2	norethyno-drel	NE	WP8	3.16E-04	30	50	10	10	100	3.2E-05
S	H6	3	norethyno-drel	NE	WP8	3.16E-04	30	50	10	10	100	3.2E-05
S	A7	1	OTES	N	OTES1	1.00E-09	30	50	10	10	100	1.0E-10
S	A8	2	OTES	N	OTES1	1.00E-09	30	50	10	10	100	1.0E-10
S	A9	3	OTES	N	OTES1	1.00E-09	30	50	10	10	100	1.0E-10
S	B7	1	OTES	N	OTES2	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
S	B8	2	OTES	N	OTES2	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
S	B9	3	OTES	N	OTES2	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
S	C7	1	OTES	N	OTES3	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08
S	C8	2	OTES	N	OTES3	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08
S	C9	3	OTES	N	OTES3	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08
S	D7	1	OTES	N	OTES4	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
S	D8	2	OTES	N	OTES4	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
S	D9	3	OTES	N	OTES4	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
S	E7	1	OTES	N	OTES5	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
S	E8	2	OTES	N	OTES5	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
S	E9	3	OTES	N	OTES5	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06

▼**M8**

Mikrodestička	Poloha	Replikát	Druh jamky	Kód jamky	Kód koncentrace	Výchozí koncentrace kompetitora (M)	Zásobní hrER (µl)	Objem pufru (µl)	Objem stopovací látky (radioaktivní E2) (µl)	Objem z destičky s ředěním (µl)	Konečný objem (µl)	Konečná koncentrace kompetitora (M)
S	F7	1	OTES	N	OTES6	1.00E-04	30	50	10	10	100	1.0E-05
S	F8	2	OTES	N	OTES6	1.00E-04	30	50	10	10	100	1.0E-05
S	F9	3	OTES	N	OTES6	1.00E-04	30	50	10	10	100	1.0E-05
S	G7	1	OTES	N	OTES7	1.00E-03	30	50	10	10	100	1.0E-04
S	G8	2	OTES	N	OTES7	1.00E-03	30	50	10	10	100	1.0E-04
S	G9	3	OTES	N	OTES7	1.00E-03	30	50	10	10	100	1.0E-04
S	H7	1	OTES	N	OTES8-DBP7	1.00E-02	30	50	10	10	100	1.0E-03
S	H8	2	OTES	N	OTES88	1.00E-02	30	50	10	10	100	1.0E-03
S	H9	3	OTES	N	OTES8	1.00E-02	30	50	10	10	100	1.0E-03
S	A10	1	celková vazba	TB	TB1	-	30	60	10	-	100	-
P	A11	2	celková vazba	TB	TB2	-	30	60	10	-	100	-
P	A12	3	celková vazba	TB	TB3	-	30	60	10	-	100	-
P	B10	4	celková vazba	TB	TB4	-	30	60	10	-	100	-
S	B11	5	celková vazba	TB	TB5	-	30	60	10	-	100	-
S	B12	6	celková vazba	TB	TB6	-	30	60	10	-	100	-
S	C10	1	neradioaktivní E2 (vysoká)	NSB	S1	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
S	C11	2	neradioaktivní E2 (vysoká)	NSB	S2	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
S	C12	3	neradioaktivní E2 (vysoká)	NSB	S3	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
S	D10	4	neradioaktivní E2 (vysoká)	NSB	S4	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
S	D11	5	neradioaktivní E2 (vysoká)	NSB	S5	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06

▼**M8**

Mikrodestička	Poloha	Replikát	Druh jamky	Kód jamky	Kód koncentrace	Výchozí koncentrace kompetitora (M)	Zásobní hrER (µl)	Objem pufru (µl)	Objem stopovací látky (radioaktivní E2) (µl)	Objem z desetičky s ředěním (µl)	Konečný objem (µl)	Konečná koncentrace kompetitora (M)
S	D12	6	neradioaktivní E2 (vysoká)	NSB	S6	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
S	E10	1	Kontrola s pufrem	BC	BC1	-	-	100	-	-	100	-
S	E11	2	Kontrola s pufrem	BC	BC2	-	-	100	-	-	100	-
S	E12	3	Kontrola s pufrem	BC	BC3	-	-	100	-	-	100	-
S	F10	4	Kontrola s pufrem	BC	BC4	-	-	100	-	-	100	-
S	F11	5	Kontrola s pufrem	BC	BC5	-	-	100	-	-	100	-
S	F12	6	Kontrola s pufrem	BC	BC6	-	-	100	-	-	100	-
S	G10 (*)	1	Slepý pokus (pro radioaktivní látku)	radioaktivní	H1	-	90	-	10	-	100	-
S	G11 (*)	2	Slepý pokus (pro radioaktivní látku)	radioaktivní	H2	-	90	-	10	-	100	-
P	G12 (*)	3	Slepý pokus (pro radioaktivní látku)	radioaktivní	H3	-	90	-	10	-	100	-
S	H10 (*)	4	Slepý pokus (pro radioaktivní látku)	radioaktivní	H4	-	90	-	10	-	100	-

▼**M8**

Mikrodestička	Poloha	Replikát	Druh jamky	Kód jamky	Kód koncentrace	Výchozí koncentrace kompetitora (M)	Zásobní hrER (µl)	Objem pufru (µl)	Objem stopovací látky (radioaktivní E2) (µl)	Objem z desťičky s ředěním (µl)	Konečný objem (µl)	Konečná koncentrace kompetitora (M)
S	H11 (*)	5	Slepý pokus (pro radio-aktivní látku)	radi-oak-tivní	H5	-	90	-	10	-	100	-
S	H12	6	Slepý pokus (pro radio-aktivní látku)	radi-oak-tivní	H6	-	90	-	10	-	100	-
P1	A1	1	Neznámá 1	U1	1	1.00E-09	30	50	10	10	100	1.0E-10
P1	A2	2	Neznámá 1	U1	1	1.00E-09	30	50	10	10	100	1.0E-10
P1	A3	3	Neznámá 1	U1	1	1.00E-09	30	50	10	10	100	1.0E-10
P1	B1	1	Neznámá 1	U1	2	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
P1	B2	2	Neznámá 1	U1	2	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
P1	B3	3	Neznámá 1	U1	2	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
P1	C1	1	Neznámá 1	U1	3	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08
P1	C2	2	Neznámá 1	U1	3	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08
P1	C3	3	Neznámá 1	U1	3	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08
P1	D1	1	Neznámá 1	U1	4	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
P1	D2	2	Neznámá 1	U1	4	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
P1	D3	3	Neznámá 1	U1	4	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
P1	E1	1	Neznámá 1	U1	5	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
P1	E2	2	Neznámá 1	U1	5	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
P1	E3	3	Neznámá 1	U1	5	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
P1	F1	1	Neznámá 1	U1	6	1.00E-04	30	50	10	10	100	1.0E-05
P1	F2	2	Neznámá 1	U1	6	1.00E-04	30	50	10	10	100	1.0E-05
P1	F3	3	Neznámá 1	U1	6	1.00E-04	30	50	10	10	100	1.0E-05
P1	G1	1	Neznámá 1	U1	7	1.00E-03	30	50	10	10	100	1.0E-04
P1	G2	2	Neznámá 1	U1	7	1.00E-03	30	50	10	10	100	1.0E-04
P1	G3	3	Neznámá 1	U1	7	1.00E-03	30	50	10	10	100	1.0E-04
P1	H1	1	Neznámá 1	U1	8	1.00E-02	30	50	10	10	100	1.0E-03
P1	H2	2	Neznámá 1	U1	8	1.00E-02	30	50	10	10	100	1.0E-03

▼**M8**

Mikrodestička	Poloha	Replikát	Druh jamky	Kód jamky	Kód koncentrace	Výchozí koncentrace kompetitora (M)	Zásobní hrER (µl)	Objem pufru (µl)	Objem stopovací látky (radioaktivní E2) (µl)	Objem z desťičky s ředěním (µl)	Konečný objem (µl)	Konečná koncentrace kompetitora (M)
P1	H3	3	Neznámá 1	U1	8	1.00E-02	30	50	10	10	100	1.0E-03
P1	A4	1	Neznámá 2	U2	1	1.00E-09	30	50	10	10	100	1.0E-10
P1	A5	2	Neznámá 2	U2	1	1.00E-09	30	50	10	10	100	1.0E-10
P1	A6	3	Neznámá 2	U2	1	1.00E-09	30	50	10	10	100	1.0E-10
P1	B4	1	Neznámá 2	U2	2	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
P1	B5	2	Neznámá 2	U2	2	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
P1	B6	3	Neznámá 2	U2	2	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
P1	C4	1	Neznámá 2	U2	3	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08
P1	C5	2	Neznámá 2	U2	3	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08
P1	C6	3	Neznámá 2	U2	3	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08
P1	D4	1	Neznámá 2	U2	4	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
P1	D5	2	Neznámá 2	U2	4	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
P1	D6	3	Neznámá 2	U2	4	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
P1	E4	1	Neznámá 2	U2	5	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
P1	E5	2	Neznámá 2	U2	5	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
P1	E6	3	Neznámá 2	U2	5	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
P1	F4	1	Neznámá 2	U2	6	1.00E-04	30	50	10	10	100	1.0E-05
P1	F5	2	Neznámá 2	U2	6	1.00E-04	30	50	10	10	100	1.0E-05
P1	F6	3	Neznámá 2	U2	6	1.00E-04	30	50	10	10	100	1.0E-05
P1	G4	1	Neznámá 2	U2	7	1.00E-03	30	50	10	10	100	1.0E-04
P1	G5	2	Neznámá 2	U2	7	1.00E-03	30	50	10	10	100	1.0E-04
P1	G6	3	Neznámá 2	U2	7	1.00E-03	30	50	10	10	100	1.0E-04
P1	H4	1	Neznámá 2	U2	8	1.00E-02	30	50	10	10	100	1.0E-03
P1	H5	2	Neznámá 2	U2	8	1.00E-02	30	50	10	10	100	1.0E-03
P1	H6	3	Neznámá 2	U2	8	1.00E-02	30	50	10	10	100	1.0E-03
P1	A7	1	Neznámá 3	U3	1	1.00E-09	30	50	10	10	100	1.0E-10
P1	A8	2	Neznámá 3	U3	1	1.00E-09	30	50	10	10	100	1.0E-10

▼**M8**

Mikrodestička	Poloha	Replikát	Druh jamky	Kód jamky	Kód koncentrace	Výchozí koncentrace kompetitora (M)	Zásobní hrER (µl)	Objem pufru (µl)	Objem stopovací látky (radioaktivní E2) (µl)	Objem z destičky s ředěním (µl)	Konečný objem (µl)	Konečná koncentrace kompetitora (M)
P1	A9	3	Neznámá 3	U3	1	1.00E-09	30	50	10	10	100	1.0E-10
P1	B7	1	Neznámá 3	U3	2	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
P1	B8	2	Neznámá 3	U3	2	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
P1	B9	3	Neznámá 3	U3	2	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
P1	C7	1	Neznámá 3	U3	3	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08
P1	C8	2	Neznámá 3	U3	3	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08
P1	C9	3	Neznámá 3	U3	3	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08
P1	D7	1	Neznámá 3	U3	4	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
P1	D8	2	Neznámá 3	U3	4	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
P1	D9	3	Neznámá 3	U3	4	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
P1	E7	1	Neznámá 3	U3	5	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
P1	E8	2	Neznámá 3	U3	5	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
P1	E9	3	Neznámá 3	U3	5	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
P1	F7	1	Neznámá 3	U3	6	1.00E-04	30	50	10	10	100	1.0E-05
P1	F8	2	Neznámá 3	U3	6	1.00E-04	30	50	10	10	100	1.0E-05
P1	F9	3	Neznámá 3	U3	6	1.00E-04	30	50	10	10	100	1.0E-05
P1	G7	1	Neznámá 3	U3	7	1.00E-03	30	50	10	10	100	1.0E-04
P1	G8	2	Neznámá 3	U3	7	1.00E-03	30	50	10	10	100	1.0E-04
P1	G9	3	Neznámá 3	U3	7	1.00E-03	30	50	10	10	100	1.0E-04
P1	H7	1	Neznámá 3	U3	8	1.00E-02	30	50	10	10	100	1.0E-03
P1	H8	2	Neznámá 3	U3	8	1.00E-02	30	50	10	10	100	1.0E-03
P1	H9	3	Neznámá 3	U3	8	1.00E-02	30	50	10	10	100	1.0E-03
P1	A10	1	Kontrolní E2 (max)	S	E2max1	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.00E-07
P1	A11	2	Kontrolní E2 (max)	S	E2max2	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.00E-07
P1	A12	3	Kontrolní E2 (max)	S	E2max3	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.00E-07
P1	B10	1	Kontrolní E2 (IC50)	S	E2IC501	E2IC50x10	30	50	10	10	100	E2IC50

▼**M8**

Mikrodestička	Poloha	Replikát	Druh jamky	Kód jamky	Kód koncentrace	Výchozí koncentrace kompetitora (M)	Zásobní hrER (µl)	Objem pufru (µl)	Objem stopovací látky (radioaktivní E2) (µl)	Objem z desťičky s ředěním (µl)	Konečný objem (µl)	Konečná koncentrace kompetitora (M)
P1	B11	2	Kontrolní E2 (IC50)	S	E2IC502	E2IC50x10	30	50	10	10	100	E2IC50
P1	B12	3	Kontrolní E2 (IC50)	S	E2IC503	E2IC50x10	30	50	10	10	100	E2IC50
P1	C10	1	Kontrolní NE (max)	S	Nemax1	1.00E-3,5	30	50	10	10	100	1.00E-4,5
P1	C11	2	Kontrolní NE (max)	S	Nemax2	1.00E-3,5	30	50	10	10	100	1.00E-4,5
P1	C12	3	Kontrolní NE (max)	S	Nemax3	1.00E-3,5	30	50	10	10	100	1.00E-4,5
P1	D10	1	Kontrolní NE (IC50)	S	NEIC501	NEIC50 x10	30	50	10	10	100	NEIC50
P1	D11	2	Kontrolní NE (IC50)	S	NEIC502	NEIC50 x10	30	50	10	10	100	NEIC50
P1	D12	3	Kontrolní NE (IC50)	S	NEIC503	NEIC50 x10	30	50	10	10	100	NEIC50
P1	E10	1	neradioaktivní E2 (vysoká)	NSB	S1	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
P1	E11	2	neradioaktivní E2 (vysoká)	NSB	S2	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
P1	E12	3	neradioaktivní E2 (vysoká)	NSB	S3	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
P1	F10	4	neradioaktivní E2 (vysoká)	NSB	S4	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
P1	F11	5	neradioaktivní E2 (vysoká)	NSB	S5	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
P1	F12	6	neradioaktivní E2 (vysoká)	NSB	S6	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
P1	G10	1	celková vazba	TB	TB1	-	30	60	10	-	100	-
P1	G11	2	celková vazba	TB	TB2	-	30	60	10	-	100	-
P1	G12	3	celková vazba	TB	TB3	-	30	60	10	-	100	-

▼**M8**

Mikrodestička	Poloha	Replikát	Druh jamky	Kód jamky	Kód koncentrace	Výchozí koncentrace kompetitora (M)	Zásobní hrER (µl)	Objem pufru (µl)	Objem stopovací látky (radioaktivní E2) (µl)	Objem z destičky s ředěním (µl)	Konečný objem (µl)	Konečná koncentrace kompetitora (M)
P1	H10	4	celková vazba	TB	TB4	-	30	60	10	-	100	-
P1	H11	5	celková vazba	TB	TB5	-	30	60	10	-	100	-
P1	H12	6	celková vazba	TB	TB6	-	30	60	10	-	100	-

(*) Upozorňujeme, že „radioaktivní“ jamky jsou v průběhu inkubace prázdné. 10 µl se přidává až pro počítání scintilací.

▼M8

Dodatek 4

POZNÁMKY PRO ANALÝZU DAT Z KOMPETITIVNÍ VAZEBNÉ ANALÝZY HRER

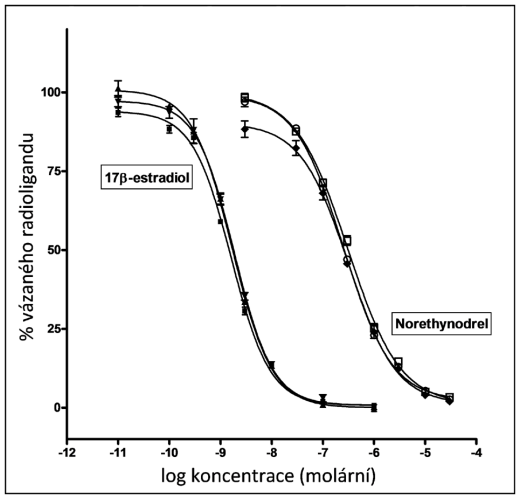
1. Kompetitivní vazebná analýza hrERα měří vazbu jedné koncentrace [^{3}H]17β-estradiolu v přítomnosti zvyšujících se koncentrací zkoušené chemické látky. Křivka kompetitivní vazby se vynáší jako specifická vazba [^{3}H]-17β-estradiolu proti koncentraci (log10 jednotky) kompetitora. Koncentrace zkoušené chemické látky, která inhibuje 50 % maximální specifické vazby [^{3}H]-17β-estradiolu, je hodnota IC_{50}.

ANALÝZA DAT PRO REFERENČNÍ ESTROGEN A LÁTKU SE SLABOU VAZBOU (1)

2. Data z kontrolních provedení zkoušek se transformují (tj. percentuální specifická vazba [^{3}H]-17β-estradiolu a log koncentrace kontrolní chemické látky) pro další analýzu. Odhady log (IC_{50}) pro pozitivní kontroly (např. referenční estrogen a látku se slabou vazbou) se stanoví pomocí vhodného softwaru pro nelineární vynesení křivky, aby byly vhodné pro čtyřparametrickou Hillovu rovnici (např. BioSoft; GraphPad Prism) (2). Při vynášení těchto křivek může být horní bod, dolní bod, sklon a log(IC50) obvykle ponechán bez omezení. Při určování nejlepších hodnot by měla být použita robustní regrese, pokud není uvedeno zdůvodnění. Metoda zvolená pro robustní regresi by měla být uvedena. U analýz FW nebo CERI hrER nebylo nutné provádět v korekci úbytku ligandu, ale v případě potřeby je možné její provedení zvážit. Po úvodní analýze je třeba každou vazebnou křivku zkontrolovat, aby bylo zajištěno, že je vhodně aplikována na model. Relativní vazebnou afinitu (RBA) pro látku se slabou vazbou lze vypočítat jako procento log (IC_{50}) pro látku se slabou vazbou vzhledem k log (IC_{50}) pro 17β-estradiol. Výsledky z pozitivních kontrol a z kontroly s látkou, která se neváže, se posuzují pomocí měřítek účinnosti analýzy a kritérií přijatelnosti uvedených v této zkušební metodě (odstavec 20), v dodatku 2 (analýza FW, odstavce 41–51) a v dodatku 3 (analýza CERI, odstavce 41–51). Na obrázku 1 jsou uvedeny příklady ze 3 provedení zkoušek na referenční estrogen a látku se slabou vazbou.

Obrázek 1

Příklady křivek kompetitivní vazby pro referenční estrogen a kontrolní látku se slabou vazbou.



▼**M8**

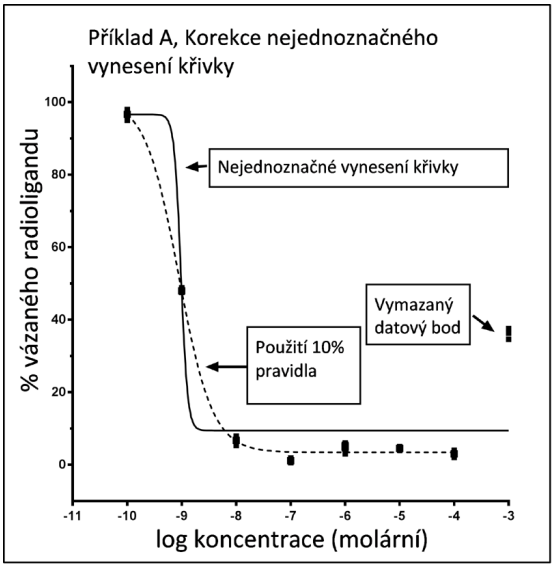
Analýza dat u zkoušených chemických látek

3. Data za všechny zkoušené chemické látky se analyzují postupně, aby bylo zajištěno, že data budou analyzována správně, a aby byla správně klasifikována každá kompetitivní vazebná křivka. Každé provedení zkoušky u zkoušené chemické látky by mělo nejdříve projít standardizovanou analýzou dat, která je stejná jako analýza použitá pro kontroly s referenčním estrogenem a s látkou se slabou vazbou. Po dokončení je třeba provést technickou kontrolu parametrů vynesené křivky a vizuálně zkontrolovat, jak dobře data odpovídají generované kompetitivní vazebné křivce u každého provedení zkoušky. V průběhu této technické kontroly je pozorovaný pokles procenta specificky navázaného [^{3}H]-17β-estradiolu v závislosti na koncentraci, nízká variabilita mezi technickými replikáty při jednotlivých koncentracích chemické látky a konzistentní parametry u tří provedení zkoušky dobrým ukazatelem, že zkouška a analýzy dat byly provedeny správně. Při posuzování výsledků z každého provedení zkoušky za zkoušenou chemickou látku je třeba používat odborný úsudek a data použitá ke klasifikaci jednotlivých zkoušených chemických látek jako látek, které se vážou, nebo látek, které se nevážou, by měla být vědecky obhajitelná.

4. Občas se mohou vyskytnout příklady dat, která vyžadují větší pozornost, aby byla data o vazbě hrER správně analyzována a interpretována. Předchozí studie ukázaly případy, kdy může být analýza a interpretace dat o kompetitivní vazbě na receptor komplikovaná v důsledku zvýšení percentuální specifické vazby při testování chemických látek při nejvyšších koncentracích (obrázek 2). Je to známý problém, který se vyskytuje při použití protokolů u řady analýz kompetitivní vazby na receptor (3). V těchto případech je pozorována odpověď závislá na koncentraci při nižších koncentracích, ale s tím, jak se koncentrace zkoušené chemické látky blíží mezi rozpustnosti, vytěsňování [^{3}H]17β-estradiolu již neklesá. V těchto případech data u vyšších koncentrací ukazují, že byla dosažena biologická mez analýzy. Tento jev je například často spojován s nerozpustností a srážením chemické látky při vysokých koncentracích, případně může také odrážet překročení kapacity aktivního uhlí potaženého dextranem zachytávat radioizotopově značený ligand v průběhu separace při nejvyšších koncentracích chemické látky. Ponechání těchto datových bodů při nanášení kompetitivních vazebných dat na sigmoidní křivku může někdy vést k chybné klasifikaci vazebného potenciálu zkoušené chemické látky na ER (obrázek 2). Aby k tomu nedocházelo, zahrnuje protokol pro vazebné analýzy FW a CERI hrER možnost vyloučit z analýz datové body, pokud je průměr replikátů pro procento specifické vazby [^{3}H]17β-estradiolu o 10 % nebo více nad průměrem pozorovaným při nižší koncentraci (tj. obvykle se to nazývá pravidlo 10 %). Toto pravidlo lze použít u dané křivky pouze jednou a musí zůstat data pro alespoň 6 koncentrací, aby mohla být křivka správně klasifikována.

Obrázek 2

Příklady, kompetitivní vazebné křivky s použitím pravidla 10 % a bez použití tohoto pravidla

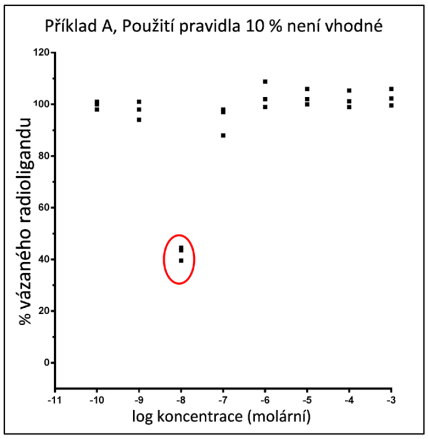


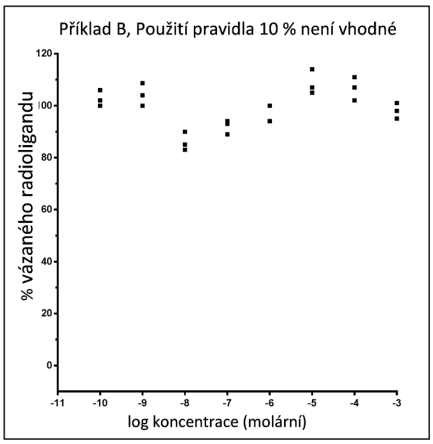
▼**M8**

5. Správné použití pravidla 10 % pro korekci těchto křivek by mělo být pečlivě zváženo a vyhrazeno pouze pro ty případy, kde existuje silná indikace, že jde o látku, která se váže na hrER. Při provádění experimentů pro validační studii analýzy vazby FW hrER bylo pozorováno, že pravidlo 10 % má někdy nezamýšlený a nepředpokládaný důsledek. Chemické látky, které nereagovaly s receptorem (tj. skutečné látky, které se nevážou), často vykazovaly variabilitu kolem 100 % vazby radioligandu, což bylo více než 10 % v celém rozmezí zkoušených koncentrací. Pokud se stalo, že nejnižší hodnota byla při nízké koncentraci, mohla být data při použití pravidla 10 % ze všech vyšších koncentrací z analýzy potenciálně vymazána, ačkoliv tyto koncentrace mohly být užitečné při určení, že tato chemická látka se neváže. Na obrázku 3 jsou uvedeny příklady, kdy použití pravidla 10 % není vhodné.

Obrázek 3

Příklady, data o kompetitivní vazbě, kdy použití pravidla 10 % není vhodné





▼**M8**

ODKAZY

(1) OECD (2015). *Integrated Summary Report: Validation of Two Binding Assays Using Human Recombinant Estrogen Receptor Alpha (hrERα)*, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 226), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(2) Motulsky H. and Christopoulos A. (2003). *The law of mass action, In Fitting Models to Biological Data Using Linear and Non-linear Regression*. GraphPad Software Inc., San Diego, CA, pp 187-191. Www.graphpad.com/manuals/Prism4/RegressionBook.pdf

(3) Laws SC, Yavanhxay S, Cooper RL, Eldridge JC. (2006). *Nature of the Binding Interaction for 50 Structurally Diverse Chemicals with Rat Estrogen Receptors*. Toxicological Sci. 94(1):46-56.

▼M8

B.71 ANALÝZY SENZIBILIZACE KŮŽE *IN VITRO* ZAMĚŘENÉ NA KLÍČOVOU UDÁLOST AKTIVACE DENDRITICKÝCH BUNĚK V DRÁZE NEŽÁDOUCÍCH ÚČINKŮ (AOP) VEDOUCÍCH K SENZIBILIZACI KŮŽE

VŠEOBECNÝ ÚVOD

Zkušební metoda vycházející z klíčové události aktivace dendritických buněk

1. Jako látka senzibilizující kůži se označuje látka, která po styku s kůží vyvolává alergickou odpověď, jak ji definuje globálně harmonizovaný systém klasifikace a označování chemických látek Organizace spojených národů (GHS OSN) (1) a nařízení Evropské unie (EU) č. 1272/2008 o klasifikaci, označování a balení látek a směsí (CLP) ([1]). Existuje všeobecná shoda, pokud jde o klíčové biologické procesy, jež zapříčiňují senzibilizaci kůže. Současné znalosti o chemických a biologických mechanismech souvisejících se senzibilizací kůže byly v rámci programu OECD zkoumajícího dráhy nežádoucích účinků (AOP) (2) shrnuty jako AOP, počínaje molekulární iniciační událostí přes průběžné události až po nepříznivý účinek, a sice alergickou kontaktní dermatitidu. V tomto případě je molekulární iniciační událostí (tj. první klíčová událost) kovalentní vazba elektrofilních látek na nukleofilní centra v kožních proteinech. Druhá klíčová událost v této metodě AOP se odehrává v keratinocytech a zahrnuje zánětlivé odpovědi, jakož i změny v expresi genů spojené se specifickými dráhami buněčné signalizace, např. dráhami závislými na antioxidačním/elektrofilním responzivním elementu (ARE). Třetí klíčovou událostí je aktivace dendritických buněk (DC), typicky hodnocená podle exprese specifických buněčných povrchových markerů, chemokinů a cytokinů. Čtvrtou klíčovou událostí je aktivace a proliferace T buněk, která se nepřímo hodnotí ve zkoušce s vyšetřením lokálních lymfatických uzlin na myších (LLNA) (3).

2. Tato zkušební metoda je rovnocenná Pokynu OECD pro zkoušení (TG) č. 442E (2017). Popisuje analýzy *in vitro*, které se zaměřují na mechanismy popsané v klíčové události aktivace dendritických buněk AOP u senzibilizace kůže (2). Tato zkušební metoda zahrnuje zkoušky, které se podpůrně používají k rozlišování mezi látkami senzibilizujícími kůži a látkami nesenzibilizujícími kůži v souladu s GHS OSN a s nařízením CLP.

Zkoušky popsané v této zkušební metodě jsou:

— Zkouška aktivace lidské buněčné linie (h-CLAT)

— Zkouška aktivace buněčné linie U937 (U-SENS™)

— Analýza reportérového genu pro interleukin-8 (analýza IL-8 Luc)

3. Zkoušky zahrnuté do této zkušební metody a odpovídající pokyn OECD se mohou lišit, pokud jde o postup použitý pro generování dat a naměřené hodnoty, ale pro zkoušení mohou být použity bez rozdílu pro účely požadavků jednotlivých zemí na výsledky zkoušek u klíčové události aktivace dendritických buněk AOP u senzibilizace kůže, přičemž může být využito vzájemné uznávání údajů podle postupu OECD.

([1]) Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1272/2008 ze dne 16. prosince 2008 o klasifikaci, označování a balení látek a směsí, o změně a zrušení směrnic 67/548/EHS a 1999/45/ES a o změně nařízení (ES) č. 1907/2006, Úř. věst. L 353, 31.12.2008, s. 1.

▼M8

Obecné informace a principy zkoušek zahrnutých do této zkušební metody vycházející z klíčové události

4. Hodnocení senzibilizace kůže bylo obvykle prováděno na pokusných zvířatech. Klasické metody, které používají morčata, Magnussonovu-Klingmannovu maximalizační zkoušku na morčatech (GPMT) a Bühlerovu zkoušku (zkušební metoda B.6) (4), hodnotí indukční i provokační fázi senzibilizace kůže. Zkoušky na myších, LLNA (zkušební metoda TM B.42) (3) a její dvě neradioaktivní modifikace, LLNA: DA (zkušební metoda B.50) (5) a LLNA: BrdU-ELISA (zkušební metoda B.51) (6), posuzují výlučně odpověď na indukci a také se prosadily, neboť ve srovnání se zkouškami na morčatech jsou vhodnější z hlediska dobrého zacházení se zvířaty a objektivního měření indukční fáze senzibilizace kůže.

5. V poslední době byly přijaty mechanisticky založené zkušební metody *in chemico* a *in vitro* zkoumající první klíčovou událost (zkušební metoda B.59; analýza přímé reaktivity peptidů (7)) a druhou klíčovou událost (zkušební metoda B.60; zkušební metoda se stanovením luciferázy ARE-Nrf2 (8)), neboť přispívají k hodnocení potenciální nebezpečnosti chemických látek z hlediska senzibilizace kůže.

6. Zkoušky popsané v této zkušební metodě kvantifikují změnu exprese buněčného povrchového markeru (markerů) spojenou s procesem aktivace monocytů a dendritických buněk po expozici senzibilizujícím látkám (např. CD54, CD86), nebo změny exprese IL-8, cytokinu souvisejícího s aktivací dendritických buněk. Bylo hlášeno, že látky senzibilizující kůži indukují expresi markerů na buněčné membráně, například CD40, CD54, CD80, CD83 a CD86, vedle indukce prozánětlivých cytokinů, jako jsou IL-1β a TNF-α, a několika chemokinů včetně IL-8 (CXCL8) a CCL3 (9) (10) (11) (12), souvisejících s aktivací dendritických buněk (2).

7. Protože však aktivace dendritických buněk představuje pouze jednu klíčovou událost AOP (2) (13), informace získané zkouškami měřícími markery aktivace dendritických buněk nemusí samy o sobě stačit k vyvození závěru o existenci či neexistenci potenciálu chemických látek způsobovat senzibilizaci kůže. Proto se navrhuje, aby údaje získané pomocí zkoušek popsaných v této zkušební metodě byly použity jako podpůrné údaje při rozlišení mezi látkami senzibilizujícími kůži (tj. GHS OSN/CLP kategorie 1) a látkami, které kůži nesenzibilizují, při použití v rámci integrovaných přístupů ke zkouškám a posuzování (IATA), společně s dalšími relevantními doplňujícími informacemi, pocházejícími např. ze zkoušek *in vitro* zkoumajících jiné klíčové události v rámci metody AOP pro stanovení senzibilizace kůže, jakož i z nezkušebních metod včetně údajů odvozených z analogických chemických látek (13). Příklady použití dat získaných z těchto zkoušek v rámci definovaných přístupů, tj. přístupů standardizovaných jak v souvislosti s použitými informačními zdroji, tak i s postupem uplatněným u dat za účelem vypracování předpovědí, byly publikovány (13) a mohou být využity jako užitečné prvky v rámci IATA.

8. Zkoušky popsané v této zkušební metodě nelze používat samy o sobě, a to ani k zařazení látek senzibilizujících kůži do podkategorií 1A a 1B, jak je definuje systém GHS OSN / CLP, ze strany orgánů zavádějících tyto dvě doplňkové podkategorie, ani k predikci účinnosti těchto látek při rozhodování v rámci posuzování bezpečnosti. V závislosti na regulačním rámci však kladné výsledky získané těmito metodami mohou být použity samy o sobě ke klasifikaci chemické látky v kategorii 1 GHS OSN / CLP.

▼M8

9. Termín „zkoušená chemická látka“ se v této zkušební metodě používá k označení toho, co se zkouší ([1]), a nesouvisí s použitelností zkoušek ke zkoušení jednosložkových látek, vícesložkových látek a/nebo směsí. V současnosti jsou k dispozici jen omezené informace o použitelnosti zkoušek ke zkoušení vícesložkových látek/směsí(14) (15). Tyto zkoušky jsou nicméně technicky použitelné i na zkoušení vícesložkových látek a směsí. Před použitím této zkušební metody ke zkoušení směsi za účelem získání údajů pro zamýšlené použití v právních předpisech by však mělo být zváženo, zda tato metoda může pro tento účel poskytnout přiměřené výsledky, a pokud ano, proč je tomu tak ([2]). Takové posouzení není nutné, pokud existuje právní požadavek na zkoušení dané směsi. Při zkoušení vícesložkových látek nebo směsí by se mimoto měly uvážit možné rušivé vlivy cytotoxických složek na pozorované odpovědi.

LITERATURA

(1) United Nations UN (2015). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Sixth revised edition. New York & Geneva: United Nations Publications. ISBN: 978-92-1-117006-1. Dostupný na: https://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev06/06files_e.html.

(2) OECD (2012). The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Series on Testing and Assessment No. Series on Testing and Assessment No. 168. Dostupné na: http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO(201210/PART1&docLanguage=En).

(3) Kapitola B.42 této přílohy: Zkouška s vyšetřením lokálních lymfatických uzlin.

(4) Kapitola B.6 této přílohy: Senzibilizace kůže.

(5) Kapitola B.50 této přílohy: Senzibilizace kůže: zkouška s vyšetřením lokálních lymfatických uzlin: DA.

(6) Kapitola B.51 této přílohy: Senzibilizace kůže: zkouška s vyšetřením lokálních lymfatických uzlin: BrdU-ELISA.

(7) Kapitola B.59 této přílohy: Senzibilizace kůže *in chemico*: zkouška přímé reaktivity peptidů (DPRA).

(8) Kapitola B.60 této přílohy: Senzibilizace kůže *in vitro*: zkušební metoda luciferázou s ARE-Nrf2.

(9) Steinman RM. (1991). The dendritic cell system and its role in immunogenicity. Annu Rev Immunol 9:271-96.

(10) Caux C, Vanbervliet B, Massacrier C, Azuma M, Okumura K, Lanier LL, and Banchereau J. (1994). B70/B7-2 is identical to CD86 and is the major functional ligand for CD28 expressed on human dendritic cells. J Exp Med 180:1841-7.

(11) Aiba S, Terunuma A, Manome H, and Tagami H. (1997). Dendritic cells differently respond to haptens and irritants by their production of cytokines and expression of co-stimulatory molecules. Eur J Immunol 27:3031-8.

([1]) V červnu 2013 bylo na společné schůzi OECD dohodnuto, že by měl být v nových a aktualizovaných pokynech OECD ke zkoušení používán výraz „zkoušená chemická látka“ popisující to, co se zkouší, jednotněji.

([2]) Tato věta byla navržena a schválena na zasedání pracovní skupiny WNT v dubnu 2014.

▼**M8**

(12) Aiba S, Manome H, Nakagawa S, Mollah ZU, Mizuashi M, Ohtani T, Yoshino Y, and Tagami. H. (2003). p38 mitogen-activated protein kinase and extracellular signal-regulated kinases play distinct roles in the activation of dendritic cells by two representative haptens, NiCl2 and DNCB. J Invest Dermatol 120:390-8.

(13) OECD (2016). Series on Testing & Assessment No 256: Guidance Document On The Reporting Of Defined Approaches And Individual Information Sources To Be Used Within Integrated Approaches To Testing And Assessment (IATA) For Skin Sensitisation, Annex 1 and Annex 2. ENV/JM/HA(2016)29. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Dostupné na webových stránkách: https://community.oecd.org/community/iatass.

(14) Ashikaga T, Sakaguchi H, Sono S, Kosaka N, Ishikawa M, Nukada Y, Miyazawa M, Ito Y, NishiyamaN, Itagaki H. (2010). A comparative evaluation of *in vitro* skin sensitisation tests: the human cell-line activation test (h-CLAT) versus the local lymph node assay (LLNA). Altern. Lab. Anim. 38, 275-284.

(15) Piroird, C., Ovigne, J.M., Rousset, F., Martinozzi-Teissier, S., Gomes, C., Cotovio, J., Alépée, N. (2015). The Myeloid U937 Skin Sensitization Test (U-SENS) addresses the activation of dendritic cell event in the adverse outcome pathway for skin sensitization. *Toxicol. Chem. In Vitro* 29, 901-916.

▼M8

Dodatek 1

SENZIBILIZACE KŮŽE IN VITRO: ZKOUŠKA AKTIVACE BUNĚČNÉ LINIE (H-CLAT)

VÝCHOZÍ ÚVAHY A OMEZENÍ

1. Zkouška h-CLAT kvantifikuje změny exprese buněčných povrchových markerů spojené s procesem aktivace monocytů a dendritických buněk (DC) (tj. CD86 a CD54) v buněčné linii lidské monocytární leukémie THP-1 po expozici senzibilizujícím látkám (1)(2). Naměřené úrovně exprese buněčných povrchových markerů CD86 a CD54 se poté použijí jako podpůrný údaj pro rozlišení mezi látkami senzibilizujícími kůži a látkami, které kůži nesenzibilizují.

2. Zkouška h-CLAT byla hodnocena ve validační studii koordinované Referenční laboratoří Evropské unie pro alternativy ke zkouškám na zvířatech (EURL ECVAM) a následně byla podrobena nezávislé odborné revizi, kterou provedl vědecký poradní výbor (ESAC) EURL ECVAM. S ohledem na všechny dostupné důkazy a příspěvky od regulátorů a účastníků doporučil EURL ECVAM (3) zkoušku h-CLAT pro použití v rámci přístupu IATA na podporu rozlišování mezi látkami senzibilizujícími kůži a látkami nesenzibilizujícími kůži za účelem klasifikace nebezpečnosti a označování. Příklady využití údajů h-CLAT v kombinaci s jinými informacemi jsou uvedeny v odborné literatuře (4)(5)(6)(7)(8)(9)(10)(11).

3. U zkoušky h-CLAT se prokázalo, že ji lze přenést do laboratoří, které mají zkušenosti s technikami používajícími buněčné kultury a analýzou pomocí průtokové cytometrie. Míra reprodukovatelnosti předpovědí, které lze od této zkoušky očekávat, činí řádově 80 % v rámci laboratoří a 80 % mezi laboratořemi (3)(12). Výsledky validační studie (13) a dalších zveřejněných studií (14) celkově ukazují, že v porovnání s výsledky zkušební metody LLNA je přesnost při odlišení kůži senzibilizujících látek (tj. kategorie 1 GHS OSN/CLP) od nesenzibilizujících látek 85 % (N=142) při citlivosti 93 % (94/101) a specifičnosti 66 % (27/41) (na základě opakované analýzy provedené EURL ECVAM (12) při zohlednění všech stávajících dat, přičemž nebyly brány v úvahu negativní výsledky chemických látek s log K_{ow} větším než 3,5, jak je uvedeno v odstavci 4). Falešně negativní předpovědi se u zkoušky h-CLAT pravděpodobněji týkají chemických látek vykazujících nízkou až střední potenci způsobovat senzibilizaci kůže (tj. podkategorie 1B GHS OSN / CLP) než chemických látek vykazujících vysokou potenci způsobovat senzibilizaci kůže (tj. podkategorie 1A GHS OSN / CLP (4)(13)(15). Celkově vzato tyto informace naznačují, že metoda h-CLAT může být užitečná a může přispět k zjištění nebezpečí senzibilizace kůže. Zde uvedené hodnoty přesnosti h-CLAT jako samostatné zkoušky jsou však pouze orientační, neboť tato zkouška by měla být posuzována v kombinaci s jinými zdroji informací v rámci IATA a v souladu s ustanoveními odstavců 7 a 8 ve Všeobecném úvodu. Při hodnocení metod posuzování senzibilizace kůže bez použití zvířat by se dále mělo vést v patrnosti, že ani zkouška LLNA a ani jiné zkoušky na zvířatech nemusí plně odrážet situaci u lidí.

4. Na základě nyní dostupných údajů bylo prokázáno, že metodu h-CLAT lze použít ke zkoušení chemických látek, které obsahují různé organické funkční skupiny, mají různé reakční mechanismy, různou potenci způsobovat senzibilizaci kůže (jak byla stanovena ve studiích *in vivo*) a různé fyzikálně-chemické vlastnosti (3)(14) (15). Metodu h-CLAT lze použít ke zkoušení rozpustných chemických látek nebo látek, jež tvoří stabilní disperzi (tj. koloid nebo suspenzi, ve které se zkoušená chemická látka neusazuje ani se neodděluje od rozpouštědla/vehikula do různých fází) ve vhodném rozpouštědle/ vehikulu (viz odstavec 14). Zkoušené chemické látky s log K_{ow} větším než 3,5 mají tendenci dávat falešně negativní výsledky (14). Negativní výsledky zkoušených chemických látek s log K_{ow} větším než 3,5 by proto neměly být brány v úvahu. Pozitivní výsledky získané u zkoušených chemických látek s log K_{ow} větším než 3,5 však přesto mohou být

▼M8

použity na podporu identifikace zkoušené chemické látky jako látky senzibilizující kůži. Z důvodu omezené metabolické schopnosti použité buněčné linie (16) a vzhledem k experimentálním podmínkám mohou prohapteny (tj. látky vyžadující enzymatickou aktivaci, například prostřednictvím enzymů P450) a prehapteny (tj. látky aktivované oxidací) zejména při nízké míře oxidace rovněž vykazovat negativní výsledky ve zkoušce h-CLAT (15). Zkouškou h-CLAT (17) mohou být hodnoceny fluorescenční zkoušené chemické látky, avšak silné fluorescenční zkoušené chemické látky vyzařující na stejné vlnové délce jako fluorescein-isothiokyanát (FITC) nebo jako propidiumiodid (PI) budou narušovat detekci pomocí průtokové cytometrie, a proto nemohou být správně hodnoceny pomocí konjugovaných protilátek FITC nebo PI. V takovém případě mohou být použity jiné protilátky značené fluorochromem, respektive jiné markery cytotoxicity, pokud lze prokázat, že poskytují podobné výsledky jako protilátky značené FITC (viz odstavec 24) nebo PI (viz odstavec 18), např. zkoušením vhodných látek uvedených v dodatku 1-2. Vzhledem k výše uvedenému by se měly negativní výsledky interpretovat v kontextu stanovených omezení a společně s jinými zdroji informací v rámci přístupu IATA. V případech, kdy existují důkazy prokazující nepoužitelnost metody h-CLAT na jiné specifické kategorie zkoušených chemických látek, neměla by se tato metoda ke zkoušení těchto specifických kategorií používat.

5. Jak bylo popsáno výše, metoda h-CLAT pomáhá rozlišovat mezi látkami senzibilizujícími kůži a látkami nesenzibilujícími kůži. Může však také potenciálně přispět k hodnocení senzibilizační potence (4)(5)(9), je-li používána v rámci integrovaných přístupů, například IATA. Pro určení toho, jak mohou výsledky h-CLAT potenciálně přispět k posuzování potence, nicméně bude nutný další výzkum, přednostně založený na údajích o účincích na člověka.

6. Definice jsou uvedeny v dodatku 1.1.

PODSTATA ZKOUŠKY

7. Metoda h-CLAT je analýza *in vitro*, která kvantifikuje změny exprese buněčných povrchových markerů (tj. CD86 a CD54) v buněčné linii lidské monocytární leukémie, na buňkách THP-1 po 24hodinové expozici zkoušené chemické látce. Tyto povrchové molekuly jsou typickými markery aktivace monocytických THP-1 a mohou napodobovat aktivaci DC, která hraje kritickou roli při primární aktivaci (primingu) T buněk. Změny exprese povrchových markerů se měří pomocí průtokové cytometrie po obarvení buněk protilátkami značenými fluorochromem. Rovněž se provádí paralelní měření cytotoxicity, aby bylo možné posoudit, zda při sub-cytotoxických koncentracích dochází k up-regulaci exprese povrchových markerů. Relativní intenzita fluorescence povrchových markerů v porovnání s kontrolou s rozpouštědlem/vehikulem se vypočítá a použije v predikčním modelu (viz odstavec 26) jako podpůrný údaj pro rozlišení mezi senzibilizujícími a nesenzibilizujícími látkami.

PROKÁZÁNÍ ZPŮSOBILOSTI

8. Před rutinním používáním zkoušky popsané v tomto dodatku ke zkušební metodě B.71 by měly laboratoře prokázat odbornou způsobilost použitím 10 látek pro prokazování způsobilosti, které jsou uvedeny v dodatku 1.2. Uživatelé zkoušky by si také měli vést historickou databázi údajů pocházejících ze zkoušek reaktivity (viz odstavec 11) a z pozitivních kontrol a kontrol s rozpouštědlem/vehikulem (viz odstavce 20–22) a používat tato data na potvrzení, že v jejich laboratoři je udržována reprodukovatelnost zkoušky v čase.

▼M8

POSTUP

9. Tato zkouška je založena na protokolu databázové služby pro alternativní metody k pokusům na zvířatech (DB-ALM) č. 158 (18), což je protokol použitý při validační studii provedené za koordinace EURL ECVAM. Při provádění a používání metody h-CLAT v laboratoři se doporučuje použít tento protokol. Dále je uveden popis hlavních složek a postupů metody h-CLAT, která zahrnuje dva kroky: *analýza pro stanovení dávky* a *měření exprese CD86/CD54*.

Příprava buněk

10. Metoda h-CLAT se používá s buněčnou linií lidské monocytární leukémie THP-1. Doporučuje se, aby byly buňky (TIB-202™) pořízeny z kvalifikované buněčné banky, jako je například Americká sbírka typových kultur.

11. Buňky THP-1 se kultivují při teplotě 37°C ve zvlhčené atmosféře s 5 % CO_2 v médiu RPMI-1640 doplněném 10 % fetálního bovinního séra (FBS), 0,05 mM 2-merkaptoethanolu, 100 jednotkami/ml penicilinu a 100 μg/ml streptomycinu. Použití penicilinu a streptomycinu v kultivačním médiu může být vynecháno. V takovém případě by si však uživatelé měli ověřit, že nepřítomnost antibiotik v kultivačním médiu nemá žádný vliv na výsledky, například otestováním vhodných látek uvedených v dodatku 1.2. Aby se minimalizovalo riziko kontaminace, měly by být v každém případě dodržovány správné postupy při kultivaci buněk nezávisle na tom, zda kultivační médium obsahuje antibiotika. Buňky THP-1 se rutinně nasazují každé 2–3 dny v hustotě 0,1 až 0,2 × 10^6 buněk/ml. Udržují se při hustotě 0,1 až 1,0 × 10^6 buněk/ml. Než se buňky použijí pro zkoušení, je třeba zjistit, zda jsou vhodné, provedením kontroly reaktivity. Kontrola reaktivity buněk se provádí pomocí pozitivních kontrol, 2,4-dinitrochlorobenzenu (DNCB) (CAS č. 97-00-7, čistota ≥ 99 %) a síranu nikelnatého ($NiSO_4$) (CAS č. 10101-97-0, čistota ≥ 99 %), a negativní kontroly, kyseliny mléčné (LA) (CAS č. 50-21-5, čistota ≥ 85 %), a to dva týdny po rozmrazení. DNCB i $NiSO_4$ by měly dát pozitivní odpověď buněčných povrchových markerů CD86 i CD54 a LA by měla dát negativní odpověď buněčných povrchových markerů CD86 i CD54. Pro analýzu se používají pouze buňky, které prošly kontrolou reaktivity. Buňky mohou být množeny až dva měsíce po rozmrazení. Počet pasáží by neměl překročit 30. Kontrola reaktivity se provádí podle postupů popsaných v odstavcích 20–24.

12. Pro zkoušení se buňky THP-1 nasadí v hustotě 0,1 × 10^6 buněk/ml nebo 0,2 × 10^6 buněk/ml a předběžně se kultivují v kultivačních baňkách po dobu 72 hodin, respektive 48 hodin. Je důležité, aby byla hustota buněk v kultivační baňce bezprostředně po předběžné kultivaci pokud možno stejná při každém experimentu (použitím jedné ze dvou podmínek předběžné kultivace popsaných výše), protože hustota buněk v kultivační baňce bezprostředně po předběžné kultivaci by mohla ovlivnit expresi CD86/CD54 indukovanou alergeny (19). V den zkoušky se buňky získané z kultivační baňky resuspendují v čerstvém kultivačním médiu při hustotě 2 × 10^6 buněk/ml. Poté se buňky rozdělí do 24jamkové destičky s plochým dnem (500 μl, 1 × 10^6 buněk/jamku) nebo do 96jamkové destičky s plochým dnem (80 μl, 1,6 × 10^5 buněk/jamku).

Analýza ke stanovení dávky

13. Analýza ke stanovení dávky se provádí za účelem stanovení CV75, což je koncentrace zkoušené chemické látky, která dává 75 % životaschopnost buněk (CV) v porovnání s kontrolou s rozpouštědlem/vehikulem. Hodnota CV75 se používá ke stanovení koncentrace zkoušených chemických látek pro měření exprese *CD86/CD54* (viz odstavce 20–24).

▼**M8**

Příprava zkoušených chemických látek a kontrolních látek

14. Zkoušené chemické látky a kontrolní látky se připraví v den zkoušení. Pro metodu h-CLAT se zkoušené chemické látky rozpustí nebo stabilně dispergují (viz také odstavec 4) ve fyziologickém roztoku nebo médiu jako rozpouštědle/vehikulu první volby nebo v dimethylsulfoxidu (DMSO, čistota ≥ 99 %) jako v rozpouštědle/vehikulu druhé volby, jestliže zkoušená chemická látka není rozpustná nebo netvoří stabilní disperzi v předchozích dvou rozpouštědlech/vehikulech, na finální koncentraci 100 mg/ml (ve fyziologickém roztoku nebo médiu) nebo 500 mg/ml (v DMSO). Jestliže je podáno dostatečné vědecké zdůvodnění, mohou být použita jiná rozpouštědla/vehikula než výše uvedená. Je třeba vzít v úvahu stabilitu zkoušené chemické látky ve finálním rozpouštědle/vehikulu.

15. Z počátečních 100 mg/ml (ve fyziologickém roztoku nebo médiu) nebo 500 mg/ml (v DMSO) zásobních roztoků zkoušených chemických látek se připraví tyto zředěné roztoky:

— Pro fyziologický roztok nebo médium jako rozpouštědlo/vehikulum: Připraví se osm zásobních roztoků (osm koncentrací) dvojnásobným postupným ředěním s použitím odpovídajícího rozpouštědla/vehikula. Tyto zásobní roztoky se poté dále naředí padesátinásobně na kultivační médium (pracovní roztoky). Jestliže je nejvyšší konečná koncentrace na destičce 1 000 μg/ml netoxická, je třeba znovu stanovit maximální koncentraci provedením nové zkoušky cytotoxicity. Konečná koncentrace na destičce by neměla přesahovat 5 000 μg/ml zkoušených chemických látek rozpuštěných nebo stabilně dispergovaných ve fyziologickém roztoku nebo médiu.

— Pro DMSO jako rozpouštědlo/vehikulum: Připraví se osm zásobních roztoků (osm koncentrací) dvojnásobným postupným ředěním s použitím odpovídajícího rozpouštědla/vehikula. Tyto zásobní roztoky se poté dále naředí 250násobně na kultivační médium (pracovní roztoky). Konečná koncentrace na destičce by neměla přesahovat 1 000 μg/ml ani v případě, že je tato koncentrace netoxická.

Nakonec se pracovní roztoky použijí pro expozici přidáním stejného objemu pracovního roztoku do objemu buněčné suspenze THP-1 na destičce (viz také odstavec 17), čímž se dosáhne dalšího dvojnásobného ředění) obvykle je konečný rozsah koncentrací na destičce 7,81–1 000 μg/ml).

16. Jako kontrola s rozpouštědlem/vehikulem se u metody h-CLAT používá kultivační médium (pro zkoušené chemické látky rozpustné nebo stabilně dispergované (viz odstavec 4) v médiu nebo ve fyziologickém roztoku) nebo DMSO (pro zkoušené chemické látky rozpustné nebo stabilně dispergované v DMSO) zkoušené v jedné konečné koncentraci na destičce 0,2 %. Provede se stejné ředění, jak je popsáno u pracovních roztoků v odstavci 15.

Aplikace zkoušených chemických látek a kontrolních látek

17. Kultivační médium nebo pracovní roztoky popsané v odstavcích 15 a 16 se smíchají 1:1 (obj.) s buněčnými suspenzemi připravenými ve 24jamkové nebo 96jamkové destičce s plochým dnem (viz odstavec 12). Exponované destičky se poté inkubují po dobu 24 ± 0,5 hodin při teplotě 37°C za přítomnosti 5 % CO_2. Mělo by se dbát na to, aby nedošlo k vypařování těkavých zkoušených chemických látek a ke vzájemné kontaminaci zkoušenou chemickou látkou mezi jamkami, např. tak, že se destičky před inkubací se zkoušenými chemickými látkami zapečetí (20).

▼**M8**

Barvení propidiumiodidem (PI)

18. Po 24 ± 0,5 hodinách expozice se buňky přenesou do zkumavek a odeberou se odstředěním. Supernatanty se zlikvidují a zbývající buňky se resuspendují s 200 µl (u 96jamkové destičky) nebo 600 µl (u 24jamkové destičky) fosfátového pufru obsahujícího 0,1 % bovinního sérového albuminu (barvicí pufr). 200 µl buněčné suspenze se přenese do 96jamkové destičky s oblým dnem (u 96jamkové destičky) nebo do mikrozkumavky (u 24jamkové destičky) a dvakrát se promyje 200 µl (u 96jamkové destičky) nebo 600 µl (u 24jamkové destičky) barvicího pufru. Nakonec se buňky resuspendují v barvicím pufru (např. 400 µl) a přidá se roztok PI (např. 20 µl) (konečná koncentrace PI činí například 0,625 µg/ml). Mohou být použity jiné markery cytotoxicity, jako je 7-aminoaktinomycin D (7-AAD), trypanová modř či jiné, pokud lze prokázat, například otestováním vhodných látek uvedených v dodatku 1.2, že alternativní barviva dávají podobné výsledky jako PI.

Měření cytotoxicity pomocí průtokové cytometrie a odhad hodnoty CV75

19. Příjem PI se analyzuje pomocí průtokové cytometrie s akvizičním kanálem FL-3. Připraví se celkem 10 000 živých buněk (PI negativních). Životaschopnost buněk lze vypočítat podle následující rovnice programem cytometrické analýzy. Když je životaschopnost buněk nízká, je třeba připravit až 30 000 buněk včetně odumřelých. Alternativně lze získat údaje za jednu minutu po zahájení analýzy.

$$Životaschopnost\ buněk = \frac{Počet\ živých\ buněk}{Celkový\ počet\ požadovaných\ buněk} \times 100$$

Hodnota CV75 (viz odstavec 13), tj. koncentrace vykazující 75 % přežití buněk THP-1 (25 % cytotoxicita), se vypočítá log-lineární interpolací podle této rovnice:

$$Log\ CV75 = \frac{(75 - c) \times Log(b) - (75 - a) \times Log(d)}{a - c}$$

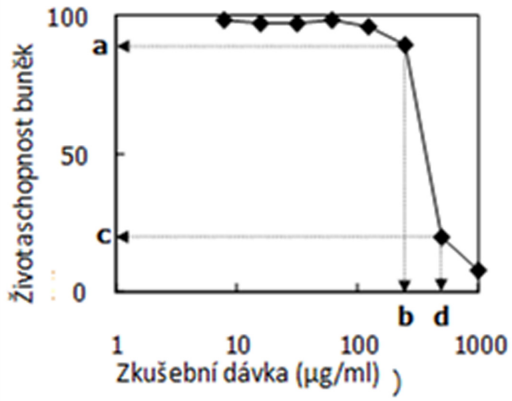
Kde:

a je minimální hodnota životaschopnosti buněk nad 75 %

c je maximální hodnota životaschopnosti buněk pod 75 %

b a d jsou koncentrace ukazující hodnotu životaschopnosti buněk a, respektive c

▼M8



Lze použít i jiné způsoby odvození hodnoty CV75, pokud je prokázáno, že to nemá vliv na výsledky (např. otestováním vhodných látek uvedených).

Měření exprese CD86/CD54

Příprava zkoušených chemických látek a kontrolních látek

20. Použije se vhodné rozpouštědlo/vehikulum (fyziologický roztok, médium nebo DMSO; viz odstavec 14) na rozpuštění nebo stabilní dispergování zkoušených chemických látek. Zkoušené chemické látky se nejprve naředí na koncentraci odpovídající 100násobku (pro fyziologický roztok nebo médium) nebo 500násobku (pro DMSO) hodnoty 1,2 × CV75 stanovené v *analýze pro zjištění dávky* (viz odstavec 19). Jestliže nelze stanovit hodnotu CV75 (tj. když v *analýze pro zjištění dávky* není pozorována dostatečná cytotoxicita), použije se jako výchozí koncentrace nejvyšší rozpustná nebo stabilně dispergovaná koncentrace zkoušené chemické látky připravená s každým rozpouštědlem/vehikulem. Nezapomeňte, že konečná koncentrace na destičce by neměla přesahovat 5 000 μg/ml (v případě fyziologického roztoku nebo média) nebo 1 000 μg/ml (v případě DMSO). Poté se připraví 1,2násobným sériovým ředěním s použitím odpovídajícího rozpouštědla/vehikula zásobní roztoky (osm koncentrací v rozsahu od 100×1,2 × CV75 do 100×0,335 × CV75 (pro fyziologický roztok nebo médium) nebo od 500×1,2 × CV75 do 500×0,335 × CV75 (pro DMSO)), které budou testovány metodou h-CLAT (viz protokol DB-ALM č. 158, kde je uveden příklad dávkování). Zásobní roztoky se poté dále naředí 50násobně (pro fyziologický roztok nebo médium) nebo 250násobně (pro DMSO) na kultivační médium (pracovní roztoky). Tyto pracovní roztoky se nakonec použijí pro expozici s dalším konečným dvojnásobným ředicím faktorem na destičce. Jestliže výsledky nesplňují kritéria přijatelnosti popsaná v odstavcích 29 a 30, pokud jde o životaschopnost buněk, může být zopakována *analýza ke stanovení dávky*, aby se určila přesnější hodnota CV75. Nezapomeňte, že pro měření exprese CD86/CD54 mohou být použity pouze 24jamkové destičky.

21. Připraví se kontrola s rozpouštědlem/vehikulem, jak bylo popsáno v odstavci 16. Jako pozitivní kontrola se u metody h-CLAT používá DNCB (viz odstavec 11), přičemž zásobní roztoky se připraví v DMSO a naředí podle popisu ředění zásobních roztoků uvedeného v odstavci 20. Jako pozitivní kontrola pro *měření exprese CD86/CD54* se používá DNCB v jedné konečné koncentraci na destičce (obvykle 4,0 μg/ml). Pro získání koncentrace DNCB na destičce 4,0 μg/ml se připraví 2 mg/ml zásobního roztoku DNCB v DMSO, který se dále naředí 250násobně s kultivačním médiem na 8 μg/ml pracovního roztoku. Alternativně může být použita jako koncentrace

▼M8

pozitivní kontroly také hodnota CV75 DNCB, která se stanoví v každém zkušebním zařízení. Lze použít i jiné vhodné pozitivní kontroly, pokud jsou k dispozici dosavadní údaje umožňující odvodit srovnatelná kritéria přijatelnosti daného provedení zkoušky. Jedna konečná koncentrace na destičce u pozitivních kontrol by neměla přesahovat 5 000 μg/ml (v případě fyziologického roztoku nebo média) nebo 1 000 μg/ml (v případě DMSO). Kritéria přijatelnosti provedení zkoušky jsou stejná jako kritéria přijatelnosti popsaná pro zkoušenou chemickou látku (viz odstavec 29), s výjimkou posledního kritéria přijatelnosti, neboť pozitivní kontrola se testuje v jedné koncentraci.

Aplikace zkoušených chemických látek a kontrolních látek

22. U každé zkoušené chemické látky a kontrolní látky je pro předpověď potřebný jeden experiment. Každý experiment sestává alespoň ze dvou nezávislých provedení zkoušky pro *měření exprese CD86/CD54* (viz odstavce 26-28). Každé nezávislé opakování se provádí v různý den nebo ve stejný den, pokud pro každé nezávislé provedení zkoušky: a) jsou připraveny nezávislé čerstvé zásobní roztoky zkoušené chemické látky a roztoky protilátek a b) jsou použity nezávisle sebrané buňky (tj. buňky se sbírají z různých kultivačních baněk); buňky však mohou pocházet ze stejné pasáže. Zkoušené chemické látky a kontrolní látky připravené jako pracovní roztoky (500 μl) se smíchají s 500 μl suspendovaných buněk ($1x10^6$ buněk) v poměru 1: 1 a buňky se inkubují po dobu 24 ± 0,5 hodiny, jak je popsáno v odstavcích 20 a 21. Při každém provedení zkoušky stačí jeden replikát pro každou koncentraci zkoušené chemické látky a kontrolní látky, protože predikce se získává alespoň ze dvou nezávislých provedení zkoušky.

Barvení a analýza buněk

23. Po 24±0,5 hodinách expozice se buňky přenesou z 24jamkové destičky do zkumavek, odeberou se odstředěním a poté se dvakrát promyjí 1 ml barvicího pufru (v případě potřeby může být provedeno další promytí). Po promytí se počet buněk upraví 600 μl tlumivého roztoku (barvicí pufr obsahující 0,01 % (m/v) globulinu (Cohnova frakce II, III, lidský; SIGMA, #G2388-10G nebo ekvivalentní)) a inkubují se při 4^oC po dobu 15 min. Po úpravě počtu se buňky rozdělí na tři díly po 180 μl do 96jamkové destičky s oblým dnem nebo mikrozkumavky.

24. Po odstředění se buňky barví 50 μl protilátky anti-CD86, anti-CD54 nebo myší IgG1 protilátky (izotyp) značené FITC při 4^oC po dobu 30 min. Protilátky popsané v protokolu č. 158 pro metodu h-CLAT DB-ALM (18) se používají po naředění 3:25 obj. (pro CD86 (BD-PharMingen, #555657; Klon: Fun-1)) nebo 3:50 obj. (pro CD54 (DAKO, #F7143; Klon: 6.5B5) a IgG1 (DAKO, #X0927)) v barvicím pufru. Vývojáři zkoušky definovali tyto ředicí faktory protilátek jako faktory, které poskytují nejlepší odstup signálu od šumu. Podle zkušeností vývojářů zkoušek je intenzita fluorescence protilátek obvykle u různých šarží konzistentní. Uživatelé však mohou zvážit titraci protilátek v podmínkách své vlastní laboratoře a definovat si tak nejlepší koncentrace pro použití. Mohou být použity jiné protilátky anti-CD86 a/nebo anti-CD54 značené fluorochromem, pokud lze prokázat, například otestováním vhodných látek uvedených v dodatku 1.2, že dávají podobné výsledky jako konjugované protilátky značené FITC. Je třeba poznamenat, že změna klonu nebo dodavatele protilátek, které jsou popsány v protokolu č. 158 pro metodu h-CLAT DB-ALM (18), může ovlivnit výsledky. Po dvojím nebo vícenásobném promytí 150 μl barvicího

▼M8

pufru se buňky resuspendují v barvicím pufru (např. 400 µl) a přidá se roztok PI (např. 20 µl pro dosažení konečné koncentrace 0,625 µg/ml) nebo roztok jiného markeru cytotoxicity (viz odstavec 18). Úrovně exprese CD86 a CD54 a životaschopnosti buněk se analyzují pomocí průtokové cytometrie.

ÚDAJE A PŘEDKLÁDÁNÍ ZPRÁV

Vyhodnocení údajů

25. Exprese CD86 a CD54 se analyzuje pomocí průtokové cytometrie s akvizičním kanálem FL-1. Na základě geometrického průměru intenzity fluorescence (MFI) se vypočítá relativní intenzita fluorescence (RFI) CD86 a CD54 pro buňky pozitivní kontroly (ctrl) a buňky exponované chemické látce podle této rovnice:

$$RFI = \frac{MFI\ buněk\ exponovaných\ chem.látce\ -\ MFI\ kontrolních\ buněk\ izotypu\ exponovaných\ chem.látce}{MFI\ ctrl\ buněk\ exponovaných\ ředidlu/vehikulu - FI\ ctrl\ buněk\ izotypu\ exponovaných\ ředidlu/vehikulu} \times 100$$

Podle rovnice uvedené v odstavci 19 se vypočítá také životaschopnost buněk z kontrolních (ctrl) buněk izotypu (které jsou obarveny myšími IgG1 (izotyp) protilátkami).

Predikční model

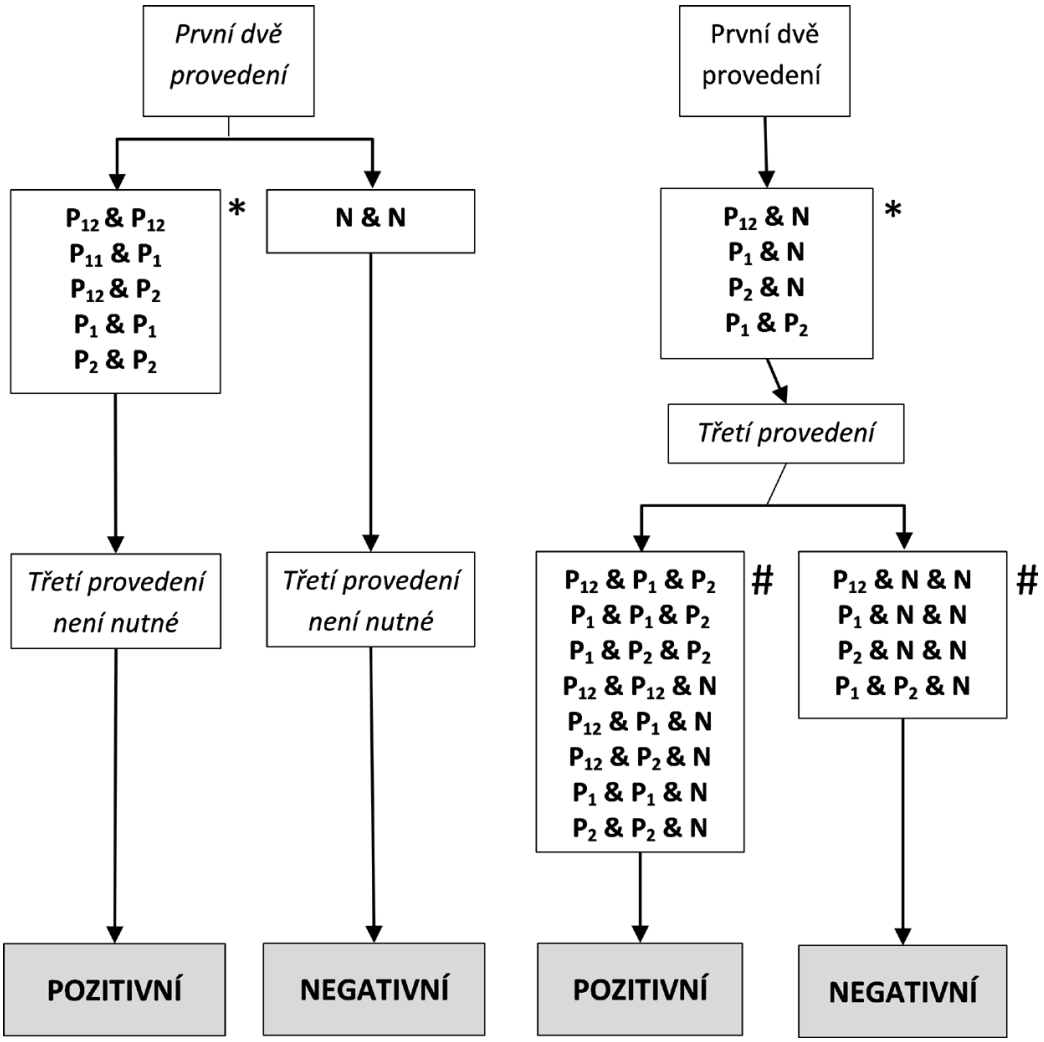
26. Pro měření exprese *CD86/CD54* se každá zkoušená chemická látka otestuje alespoň ve dvou nezávislých provedeních zkoušky, z nichž se odvodí jedna předpověď (POZITIVNÍ nebo NEGATIVNÍ). Předpověď získaná zkouškou h-CLAT se považuje za POZITIVNÍ, je-li splněna alespoň jedna z následujících podmínek ve 2 ze 2 opakování nebo alespoň ve 2 ze 3 nezávislých provedení zkoušky, jinak se předpověď získaná zkouškou h-CLAT považuje za NEGATIVNÍ (obrázek 1):

— RFI u CD86 se rovná nebo je větší než 150 % při jakékoliv zkoušené koncentraci (při životaschopnosti buněk ≥ 50 %);

— RFI u CD54 se rovná nebo je větší než 200 % při jakékoliv zkoušené koncentraci (při životaschopnosti buněk ≥ 50 %).

27. Pokud jsou první dvě provedení zkoušky u CD86 pozitivní anebo jsou pozitivní pro CD54, považuje se předpověď získaná zkouškou h-CLAT za POZITIVNÍ a třetí provedení zkoušky není nutné. Podobně, pokud jsou první dvě provedení zkoušky negativní, považuje se předpověď h-CLAT za NEGATIVNÍ (při zohlednění ustanovení odstavce 30), aniž by bylo nutné opakovat zkoušku potřetí. Pokud však první dvě provedení zkoušky nejsou shodné alespoň u jednoho z markerů (CD54 nebo CD86), je třeba provést zkoušku potřetí, přičemž konečná předpověď bude vycházet z většinového výsledku těchto tří jednotlivých provedení zkoušky (tj. 2 ze 3). V této souvislosti je třeba poznamenat, že pokud se provedou první dvě nezávislé zkoušky a jedna je pozitivní pouze pro CD86 (dále jen P_1) a druhá je pozitivní pouze pro CD54 (dále jen P_2), je třeba provést zkoušku potřetí. Jestliže je toto třetí provedení zkoušky negativní pro oba markery (dále jen N), považuje se předpověď h-CLAT za NEGATIVNÍ. Jestliže je však toto třetí provedení zkoušky pozitivní pro jeden z markerů (P_1 nebo P_2) nebo pro oba markery (dále jen P_{12}), považuje se předpověď h-CLAT za POZITIVNÍ.

▼**M8**



Obrázek 1: Predikční model používaný při metodě h-CLAT. Předpověď h-CLAT by měla být zvažována v rámci přístupu IATA a v souladu s ustanovením odstavců 7 a 8 Všeobecného úvodu.

P_1: provedení zkoušky pozitivní pouze u CD86; P_2; provedení zkoušky pozitivní pouze u CD54; P_{12}: provedení zkoušky pozitivní u CD86 i CD54; N: provedení zkoušky není pozitivní u CD86 ani CD54.

*Rámečky ukazují relevantní kombinace výsledků z prvních dvou provedení zkoušky, a to nezávisle na pořadí jejich získání.

#Rámečky ukazují relevantní kombinace výsledků ze tří provedení zkoušky na základě výsledků získaných v prvních dvou provedeních zkoušky znázorněných v rámečku výše, ale nevyjadřují pořadí jejich získání.

28. Pro zkoušené chemické látky, které jsou na základě metody h-CLAT považovány za POZITIVNÍ, lze doplňkově stanovit dvě hodnoty účinné koncentrace (EC), EC150 pro CD86 a EC200 pro CD54, tj. koncentrace, při níž zkoušené chemické látky indukují RFI 150 nebo 200. Tyto hodnoty EC mohou však také potenciálně přispět k hodnocení senzibilizační potence (9), jsou-li používány v rámci integrovaných přístupů, například IATA (4) (5) (6) (7) (8). Vypočítají se pomocí této rovnice:

▼M8

$$EC\ 150\ (for\ CD86) = B_{conc} + [(150 - B_{RFI})/A_{RFI} - B_{RFI}) \times (A_{conc} - B_{conc})]$$

$$EC\ 200\ (for\ CD86) = B_{conc} + [(200 - B_{RFI})/A_{RFI} - B_{RFI}) \times (A_{conc} - B_{conc})]$$

kde

A_{conc} je nejnižší koncentrace v μg/ml s RFI > 150 (CD86) nebo 200 (CD54)

B_{conc} je nejvyšší koncentrace v μg/ml s RFI < 150 (CD86) nebo 200 (CD54)

A_{RFI} je RFI při nejnižší koncentraci s RFI > 150 (CD86) nebo 200 (CD54)

B_{RFI} je RFI při nejvyšší koncentraci s RFI < 150 (CD86) nebo 200 (CD54)

Pro účely přesnějšího odvození hodnot EC150 a EC200 mohou být potřebná tři nezávislá provedení *měření expres*e *CD86/CD54*. Poté se stanoví konečné hodnoty EC150 a EC200 jako medián hodnot EC vypočtených ze tří nezávislých provedení zkoušky. Pokud kritéria pozitivity splňují pouze dvě ze tří nezávislých provedení zkoušky (viz odstavce 26-27), použije se vyšší ze dvou vypočtených hodnot EC150 nebo EC200.

Kritéria přijatelnosti

29. Při používání metody h-CLAT by měla být splněna tato kritéria přijatelnosti (22) (27).

— Životaschopnost buněk u kontroly s médiem a kontroly s rozpouštědlem/vehikulem by měla být vyšší než 90 %.

— Při kontrole s rozpouštědlem/vehikulem by hodnoty RFI u CD86 i CD54 neměly překročit pozitivní kritéria (CD86 RFI ≥ 150 % a CD54 RFI ≥ 200 %). Hodnoty RFI kontroly s rozpouštědlem/vehikulem se vypočítají podle vzorce uvedeného v odstavci 25 („MFI chemické látky“ se nahradí „MFI rozpouštědla/vehikula“ a „MFI rozpouštědla/vehikula“ se nahradí „MFI kontroly (s médiem)“).

— U kontroly s médiem i kontroly s rozpouštědlem/vehikulem by mělo být procento MFI u CD86 i CD54 > 105 % kontroly izotypu.

— Při pozitivní kontrole (DNCB) by hodnoty RFI u CD86 i CD54 měly splňovat pozitivní kritéria (CD86 RFI ≥ 150 a CD54 RFI ≥ 200) a životaschopnost buněk by měla být větší než 50 %.

— U zkoušené chemické látky by životaschopnost buněk měla být větší než 50 % alespoň u čtyř testovaných koncentrací při každém provedení zkoušky.

30. Negativní výsledky jsou přijatelné pouze u zkoušených chemických látek, které vykazují životaschopnost buněk menší než 90 % při nejvyšší zkoušené koncentraci (tj. 1.2 × CV75 podle schématu sériového ředění popsaného v odstavci 20). Jestliže se životaschopnost buněk při 1,2 × CV75 rovná nebo je vyšší než 90 %, je třeba negativní výsledek vyřadit. V takovém případě se doporučuje pokusit se zpřesnit výběr dávky zopakováním stanovení hodnoty CV75. Je třeba poznamenat, že když se jako maximální experimentální koncentrace zkoušené chemické látky použije 5 000 μg/ml ve fyziologickém roztoku (nebo médiu či jiných rozpouštědlech/vehikulech), 1 000 μg/ml v DMSO nebo nejvyšší rozpustná koncentrace, je negativní výsledek přijatelný i v případě, že je životaschopnost buněk nad 90 %.

▼M8

ZÁVĚREČNÁ ZPRÁVA

31. Závěrečná zpráva by měla obsahovat tyto informace.

Zkoušená chemická látka

Jednosložková látka:

— chemická identifikace, např. název (názvy) IUPAC nebo CAS, číslo (čísla) CAS, kód SMILES nebo InChI, strukturní vzorec a/nebo jiné identifikátory,

— fyzický vzhled, log K_{ow}, rozpustnost ve vodě, rozpustnost v DMSO, molekulová hmotnost a další důležité fyzikálně-chemické vlastnosti, v rozsahu, v jakém jsou tyto informace dostupné,

— čistota, případně chemická identita nečistot, je-li to prakticky proveditelné atd.,

— případné ošetření před zkoušením (např. zahřívání, mletí),

— zkušební koncentrace,

— podmínky skladování a stabilita, v rozsahu, v jakém jsou tyto informace dostupné,

— zdůvodnění volby rozpouštědla/vehikula pro každou zkoušenou chemickou látku.

Vícesložková látka, UVCB a směs:

— charakterizovaná v co možná největší míře např. chemickou identitou (viz výše), čistotou, kvantitativním výskytem a důležitými fyzikálně-chemickými vlastnostmi (viz výše) složek, v rozsahu, v jakém jsou tyto informace dostupné,

— fyzický vzhled, rozpustnost ve vodě, rozpustnost v DMSO, a další důležité fyzikálně-chemické vlastnosti, v rozsahu, v jakém jsou tyto informace dostupné,

— molekulová hmotnost nebo zdánlivá molekulová hmotnost v případě směsí/polymerů se známým složením nebo jiné informace důležité pro provedení studie,

— případné ošetření před zkoušením (např. zahřívání, mletí),

— zkušební koncentrace,

— podmínky skladování a stabilita, v rozsahu, v jakém jsou tyto informace dostupné,

— zdůvodnění volby rozpouštědla/vehikula pro každou zkoušenou chemickou látku.

Kontroly

Pozitivní kontrola:

— chemická identifikace, např. název (názvy) IUPAC nebo CAS, číslo (čísla) CAS, kód SMILES nebo InChI, strukturní vzorec a/nebo jiné identifikátory,

— případně fyzický vzhled, log K_{ow}, rozpustnost ve vodě, rozpustnost v DMSO, molekulová hmotnost a další důležité fyzikálně-chemické vlastnosti, v rozsahu, v jakém jsou tyto informace dostupné,

— čistota, případně chemická identita nečistot, je-li to prakticky proveditelné atd.,

▼**M8**

— případné ošetření před zkoušením (např. zahřívání, mletí),

— zkušební koncentrace,

— podmínky skladování a stabilita, v rozsahu, v jakém jsou tyto informace dostupné,

— odkaz na případné dosavadní výsledky pozitivních kontrol prokazující vhodnost kritérií přijatelnosti provedení.

Negativní kontrola a kontrola rozpouštědlem/vehikulem:

— chemická identifikace, např. název (názvy) IUPAC nebo CAS, číslo (čísla) CAS, kód SMILES nebo InChI, strukturní vzorec a/nebo jiné identifikátory,

— čistota, případně chemická identita nečistot, je-li to prakticky proveditelné atd.,

— fyzický vzhled, molekulová hmotnost a další důležité fyzikálně-chemické vlastnosti v případě použití jiného rozpouštědla/vehikula než rozpouštědel/vehikul uvedených v tomto pokynu, a to v rozsahu, v jakém jsou tyto informace dostupné,

— podmínky skladování a stabilita, v rozsahu, v jakém jsou tyto informace dostupné,

— zdůvodnění volby rozpouštědla/vehikula pro každou zkoušenou chemickou látku.

Zkušební podmínky

— jméno a adresa zadavatele, zkušebního zařízení a vedoucího studie,

— popis použité zkoušky,

— použité buněčné linie, podmínky skladování a zdroj (např. zařízení, z něhož byly získány),

— použitá průtoková cytometrie (např. model), včetně nastavení přístrojů, použitého globulinu a markeru cytotoxicity,

— postup použitý pro prokázání způsobilosti laboratoře k provádění této zkoušky zkoušením vhodných látek a postup použitý pro prokázání reprodukovatelného provedení zkoušky v čase, např. dosavadní kontrolní údaje anebo dosavadní údaje o kontrolách reaktivity.

Kritéria přijatelnosti zkoušky

— životaschopnost buněk, hodnoty MFI a RFI získané z kontroly s rozpouštědlem/vehikulem v porovnání s rozsahy přijatelnosti,

— životaschopnost buněk a hodnoty RFI získané z pozitivní kontroly v porovnání s rozsahy přijatelnosti,

— životaschopnost buněk všech testovaných koncentrací zkoušené chemické látky.

▼**M8**

Zkušební postup

— počet provedení zkoušky,

— koncentrace zkoušených chemických látek, použité doby aplikace a expozice (pokud se liší od doporučených),

— popis použitých hodnotících kritérií a kritérií rozhodování,

— popis všech změn zkušebního postupu.

Výsledky

— údaje ve formě tabulky, včetně CV75 (v relevantních případech), jednotlivých geometrických hodnot MFI, RFI, hodnot životaschopnosti buněk, hodnot EC150/EC200 (v relevantních případech) získaných pro zkoušenou chemickou látku a pro pozitivní kontrolu při každém provedení zkoušky a uvedení klasifikace zkoušené chemické látky podle predikčního modelu;

— případně popis jakýchkoli jiných důležitých zjištění z pozorování.

Diskuse o výsledcích

— diskuse o výsledcích získaných pomocí metody h-CLAT;

— diskuse o výsledcích zkoušky v rámci IATA, jsou-li k dispozici jiné příslušné informace.

Závěry

LITERATURA

(1) Ashikaga T, Yoshida Y, Hirota M, Yoneyama K, Itagaki H, Sakaguchi H, Miyazawa M, Ito Y, Suzuki H, Toyoda H. (2006). Development of an *in vitro* skin sensitization test using human cell lines: The human Cell Line Activation Test (h-CLAT) I. Optimization of the h-CLAT protocol. Toxicol. Chem. *In Vitro* 20, 767-773.

(2) Miyazawa M, Ito Y, Yoshida Y, Sakaguchi H, Suzuki H. (2007). Phenotypic alterations and cytokine production in THP-1 cells in response to allergens. Toxicol. Chem. *In Vitro* 21, 428-437.

(3) EC EURL-ECVAM (2013). Recommendation on the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for skin sensitisation testing. Dostupné na: https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/eurl-ecvam-recommendations

(4) Takenouchi O, Fukui S, Okamoto K, Kurotani S, Imai N, Fujishiro M, Kyotani D, Kato Y, Kasahara T, Fujita M, Toyoda A, Sekiya D, Watanabe S, Seto H, Hirota M, Ashikaga T, Miyazawa M. (2015). Test battery with the human cell line activation test, direct peptide reactivity assay and DEREK based on a 139 chemical data set for predicting skin sensitizing potential and potency of chemicals. J Appl Toxicol. 35, 1318-1332.

(5) Hirota M, Fukui S, Okamoto K, Kurotani S, Imai N, Fujishiro M, Kyotani D, Kato Y, Kasahara T, Fujita M, Toyoda A, Sekiya D, Watanabe S, Seto H, Takenouchi O, Ashikaga T, Miyazawa M. (2015). Evaluation of combinations of *in vitro* sensitization test descriptors for the artificial neural network-based risk assessment model of skin sensitization. J Appl Toxicol. 35, 1333-1347.

(6) Bauch C, Kolle SN, Ramirez T, Fabian E, Mehling A, Teubner W, van Ravenzwaay B, Landsiedel R. (2012). Putting the parts together: combining *in vitro* methods to test for skin sensitizing potencials. Regul Toxicol Parmacol. 63, 489-504.

▼**M8**

(7) Van der Veen JW, Rorije E, Emter R, Natch A, van Loveren H, Ezendam J. (2014). Evaluating the performance of integrated approaches for hazard identification of skin sensitizing chemicals. Regul Toxicol Pharmacol. 69, 371-379.

(8) Urbisch D, Mehling A, Guth K, Ramirez T, Honarvar N, Kolle S, Landsiedel R, Jaworska J, Kern PS, Gerberick F, Natsch A, Emter R, Ashikaga T, Miyazawa M, Sakaguchi H. (2015). Assessing skin sensitization hazard in mice and men using non-animal test methods. Regul Toxicol Parmacol. 71, 337-351.

(9) Jaworska JS, Natsch A, Ryan C, Strickland J, Ashikaga T, Miyazawa M. (2015). Bayesian integrated testing strategy (ITS) for skin sensitization potency assessment: a decision support system for quantitative weight of evidence and adaptive testing strategy. Arch Toxicol. 89, 2355-2383.

(10) Strickland J, Zang Q, Kleinstreuer N, Paris M, Lehmann DM, Choksi N, Matheson J, Jacobs A, Lowit A, Allen D, Casey W. (2016). Integrated decision strategies for skin sensitization hazard. J Appl Toxicol. DOI 10.1002/jat.3281.

(11) Nukada Y, Ashikaga T, Miyazawa M, Hirota M, Sakaguchi H, Sasa H, Nishiyama N. (2012). Prediction of skin sensitization potency of chemicals by human Cell Line Activation Test (h-CLAT) and an attempt at classifying skin sensitization potency. Toxicol. Chem. *In Vitro* 26, 1150-60.

(12) EC EURL-ECVAM (2015). Re-analysis of the within and between laboratory reproducibility of the human Cell Line Activation Test (h-CLAT). Dostupné na: https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/eurl-ecvam-recommendations/eurl-ecvam-recommendation-on-the-human-cell-line-activation-test-h-clat-for-skin-sensitisation-testing

(13) EC EURL ECVAM (2012). human Cell Line Activation Test (h-CLAT) Validation Study Report Accessible at: https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/eurl-ecvam-recommendations

(14) Takenouchi O, Miyazawa M, Saito K, Ashikaga T, Sakaguchi H. (2013). Predictive performance of the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for lipophilic with high octanol-water partition coefficients. A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. Sci. 38, 599-609.

(15) Ashikaga T, Sakaguchi H, Sono S, Kosaka N, Ishikawa M, Nukada Y, Miyazawa M, Ito Y, NishiyamaN, Itagaki H. (2010). A comparative evaluation of *in vitro* skin sensitisation tests: the human cell-line activation test (h-CLAT) versus the local lymph node assay (LLNA). Altern. Lab. Anim. 38, 275-284.

(16) Fabian E., Vogel D., Blatz V., Ramirez T., Kolle S., Eltze T., van Ravenzwaay B., Oesch F., Landsiedel R. (2013). Xenobiotic metabolizin enzyme activities in cells used for testing skin sensitization *in vitro*. Arch Toxicol 87, 1683-1969.

(17) Okamoto K, Kato Y, Kosaka N, Mizuno M, Inaba H, Sono S, Ashikaga T, Nakamura T, Okamoto Y, Sakaguchi H, Kishi M, Kuwahara H, Ohno Y. (2010). The Japanese ring study of a human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for predicting skin sensitization potential (6^{th} report): A study for evaluating oxidative hair dye sensitization potential using h-CLAT. AATEX 15, 81-88.

(18) DB-ALM (INVITTOX) (2014). Protocol 158: human Cell Line Activation Test (h-CLAT), 23pp. Dostupné na: http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/

▼**M8**

(19) Mizuno M, Yoshida M, Kodama T, Kosaka N, Okamato K, Sono S, Yamada T, Hasegawa S, Ashikaga T, Kuwahara H, Sakaguchi H, Sato J, Ota N, Okamoto Y, Ohno Y. (2008). Effects of pre-culture conditions on the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) results; Results of the 4th Japanese inter-laboratory study. AATEX 13, 70-82.

(20) Sono S, Mizuno M, Kosaka N, Okamoto K, Kato Y, Inaba H, , Nakamura T, Kishi M, Kuwahara H, Sakaguchi H, Okamoto Y, Ashikaga T, Ohno Y. (2010). The Japanese ring study of a human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for predicting skin sensitization potential (7th report): Evaluation of volatile, poorly soluble fragrance materials. AATEX 15, 89-96.

(21) OECD (2005). Guidance Document No 34 on The Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. OECD Series on Testing and Assessment. Organization for Economic Cooperation and Development, Paris, France, 2005, 96 pp.

(22) OECD (2012). The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Series on Testing and Assessment No. Series on Testing and Assessment No. 168. Dostupné na: http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO(201210/PART1&docLanguage=En)

(23) United Nations UN (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Fifth revised edition. New York & Geneva: United Nations Publications. ISBN: 978-92-1-117006-1. Dostupné na: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html

(24) ECETOC (2003). Contact sensitization: Classification according to potency. European Centre for Ecotoxicology & Toxicology of Chemicals (Technical Report No 87).

(25) Ashikaga T, Sakaguchi H, Okamoto K, Mizuno M, Sato J, Yamada T, Yoshida M, Ota N, Hasegawa S, Kodama T, Okamoto Y, Kuwahara H, Kosaka N, Sono S, Ohno Y. (2008). Assessment of the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for Skin Sensitization; Results of the First Japanese Inter-laboratory Study. AATEX 13, 27-35.

▼M8

Dodatek 1.1

DEFINICE

Přesnost: přesnost shody mezi výsledky zkoušky a přijatými referenčními hodnotami. Je to míra funkčnosti zkoušky a jeden z aspektů její relevantnosti. Tento pojem se často používá místo pojmu soulad a rozumí se jím podíl správných výsledků zkoušky (21).

AOP (mechanismy nežádoucích účinků): sled událostí od chemické struktury cílové chemické látky nebo skupiny podobných chemických látek přes molekulární iniciační událost po účinek *in vivo*, který je předmětem zájmu (22).

Chemická látka: látka nebo směs.

CV75: odhad koncentrace ukazující 75 % životaschopnost buněk.

EC150: koncentrace ukazující hodnoty RFI 150 v expresi CD86.

EC200: koncentrace ukazující hodnoty RFI 200 v expresi CD54.

Průtoková cytometrie: cytometrická technika, při níž buňky suspendované v kapalině protékají jedna po druhé přes ohnisko excitačního světla, které je rozptýleno do vzorů charakteristických pro buňky a jejich komponenty; buňky jsou často označeny fluorescenčními markery, aby bylo světlo nejprve absorbováno a poté emitováno v pozměněných frekvencích.

Nebezpečnost: základní charakteristika látky nebo situace, která má potenciál vyvolat nepříznivé účinky, jsou-li organismus, systém nebo (sub)populace vystaveny této látce.

IATA (jednotný přístup ke zkoušení a posuzování): strukturovaný přístup používaný pro zjišťování nebezpečnosti (potenciál), charakterizaci rizik (potence) a/nebo posouzení bezpečnosti (potenciál/potence a expozice) chemické látky nebo skupiny chemických látek, jenž strategicky integruje a váží všechny důležité údaje s cílem poskytnout informace pro přijetí regulačního rozhodnutí, které se týká potenciální nebezpečnosti a/nebo rizika a/nebo potřeby dalšího cíleného, a tudíž minimálního zkoušení.

Kontrola s médiem: neošetřená replika, která obsahuje všechny složky zkušebního systému. Tento vzorek se zpracovává se vzorky zkoušené chemické látky a jinými kontrolními vzorky, aby se zjistilo, zda rozpouštědlo/vehikulum vzájemně reaguje se zkušebním systémem.

Směs: směs nebo roztok složený ze dvou nebo více látek.

Jednosložková látka: látka definovaná svým kvantitativním složením, v níž je přítomna jedna hlavní složka v míře alespoň 80 % hmot.

Vícesložková látka: látka definovaná svým kvantitativním složením, v níž je přítomna více než jedna hlavní složka v koncentraci $\geq$ 10 % hmot. a $<$ 80 % hmot. Vícesložková látka je výsledkem výrobního procesu. Rozdíl mezi směsí a vícesložkovou látkou spočívá v tom, že směs se získá smísením dvou nebo více látek bez chemické reakce. Vícesložková látka je výsledkem chemické reakce.

▼M8

Pozitivní kontrola: replika obsahující všechny složky zkušebního systému a látku, o níž je známo, že způsobuje pozitivní reakci. Aby se zajistilo, že proměnlivost v reakci na pozitivní kontrolu bude možné časem vyhodnotit, rozsah pozitivní reakce by neměl být nadměrný.

Prehapteny: chemické látky, z nichž se abiotickou transformací staly senzibilizující látky.

Prohapteny: chemické látky vyžadující enzymatickou aktivaci, aby vykazovaly potenciál senzibilizace kůže.

Relativní intenzita fluorescence (RFI): relativní hodnoty geometrického průměru intenzity fluorescence (MFI) v buňkách exponovaných chemické látce v porovnání s hodnotou MFI v buňkách exponovaných rozpouštědlu/vehikulu.

Relevantnost: popis vztahu zkoušky k účinku, který je předmětem zájmu, a také toho, zda je zkouška smysluplná a použitelná pro konkrétní účel. Vyjadřuje, do jaké míry zkouška správně měří nebo predikuje biologický účinek, který je předmětem zájmu. Relevantnost zahrnuje také posouzení přesnosti (shody) zkoušky (21).

Spolehlivost: měření rozsahu, v jakém může být zkouška časem reprodukovatelná v laboratořích a mezi laboratořemi, když se provádí s použitím stejného protokolu. Hodnotí se to výpočtem laboratorní a mezilaboratorní reprodukovatelnosti a laboratorní opakovatelnosti (21).

Provedení zkoušky: jedna či více zkoušených chemických látek se zkouší současně s kontrolou s rozpouštědlem/vehikulem a s pozitivní kontrolou.

Citlivost: podíl všech pozitivních/aktivních chemických látek, které jsou na základě zkoušky správně zatříděny. Je to měřítko přesnosti zkoušky, která dává kategorické výsledky, a je důležitým prvkem při hodnocení relevance zkoušky (21).

Barvicí pufr: fosfátový pufr obsahující 0,1 % bovinního sérového albuminu.

Kontrola s rozpouštědlem/vehikulem: neexponovaný vzorek obsahující všechny složky zkušebního systému s výjimkou zkoušené chemické látky, ale včetně rozpouštědla/vehikula, které se používá. Používá se ke stanovení účinku na pozadí u vzorků exponovaných zkoušené chemické látce, která je rozpuštěna nebo stabilně dispergována ve stejném rozpouštědle/vehikulu. Pokud se vzorek zkouší souběžnou kontrolou s médiem, ukazuje také, zda rozpouštědlo/vehikulum vzájemně reaguje se zkušebním systémem.

Specifičnost: podíl všech negativních/neaktivních chemických látek, které jsou na základě zkušební metody správně zatříděny. Je to měřítko přesnosti zkušební metody, která dává kategorické výsledky, a je důležitým prvkem při hodnocení relevance zkušební metody (21).

Látka: chemický prvek a jeho sloučeniny v přírodním stavu nebo získané výrobním postupem, včetně jakýchkoliv aditiv potřebných pro zachování stability výrobku a všech nečistot pocházejících z použitého postupu, ale s vyloučením všech rozpouštědel, která je možno oddělit bez ovlivnění stability dané látky nebo změny jejího složení.

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

▼M8

Globálně harmonizovaný systém klasifikace a označování chemických látek Organizace spojených národů (GHS OSN): systém navrhující klasifikaci chemických látek (látek a směsí) podle standardizovaných typů a úrovní fyzikálních, zdravotních a environmentálních nebezpečí a řešící příslušné komunikační prvky, jako jsou piktogramy, signální slova, výroky o nebezpečí, výroky o bezpečnostních opatřeních a bezpečnostní datové listy, které obsahují informace o jejich nežádoucích účincích s ohledem na ochranu lidí (včetně zaměstnavatelů, dělníků, přepravců, spotřebitelů a osob reagujících na havárie) a životního prostředí (23).

UVCB: látky s neznámým nebo proměnlivým složením, komplexní reakční produkty nebo biologický materiál.

Validovaná zkouška: zkouška, u níž se má za to, že je dostatečně relevantní a spolehlivá pro určitý účel, a která je založena na vědecky spolehlivých zásadách. Zkouška není nikdy validovaná v absolutním smyslu, ale pouze pro určitý konkrétní účel (21).

▼**M8**

Dodatek 1.2

LÁTKY PRO PROKÁZÁNÍ ZPŮSOBILOSTI

Dříve než začnou laboratoře běžně používat zkoušku popsanou v tomto dodatku ke zkušební metodě B.71, měly by prokázat odbornou způsobilost správným získáním předpokládané předpovědi h-CLAT u 10 vhodných látek doporučených v tabulce 1 a získáním hodnot CV75, EC150 a EC200, které spadají do příslušného referenčního rozpětí, u nejméně 8 z 10 vhodných látek. Látky pro prokázání způsobilosti byly vybrány tak, aby představovaly rozpětí účinků na nebezpečí senzibilizace kůže. Dalšími kritérii výběru bylo, aby látky byly komerčně dostupné, aby k nim byly k dispozici kvalitní referenční údaje *in vivo* a také kvalitní údaje *in vitro* získané metodou h-CLAT. Pro metodu h-CLAT jsou také k dispozici zveřejněné referenční údaje (3) (14).

Tabulka 1

Doporučené látky pro prokázání odborné způsobilosti k používání metody h-CLAT

Látky pro prokázání způsobilosti	CASRN	Skupenství	Předpověď *in vivo* (1)	CV75 Odkaz Rozsah v µg/ml (2)	Výsledky h-CLAT pro CD86 (referenční rozmezí EC150 v µg/ml) (2)	Výsledky h-CLAT pro CD54 (referenční rozmezí EC200 v µg/ml) (2)
2,4-dinitrochlorbenzen	97-00-7	pevná látka	senzibilizující (extrémně)	2–12	pozitivní (0,5–10)	pozitivní (0,5–15)
benzen-1,4-diamin	106-50-3	pevná látka	senzibilizující (silně)	5–95	pozitivní (< 40)	negativní (> 1,5) (3)
síran nikelnatý	10101-97-0	pevná látka	senzibilizující (středně silně)	30–500	pozitivní (< 100)	pozitivní (10–100)
2-merkaptbenzothiazol	149-30-4	pevná látka	senzibilizující (středně silně)	30–400	negativní (> 10) (3)	pozitivní (10–140)
R(+)-limonen	5989-27-5	kapalina	senzibilizující (slabě)	> 20	negativní (> 5) (3)	pozitivní (< 250)
imidazolidinyl urea	39236-46-9	pevná látka	senzibilizující (slabě)	25–100	pozitivní (20–90)	pozitivní (20–75)
propan-2-ol	67-63-0	kapalina	není senzibilizující	> 5 000	negativní (> 5 000)	negativní (> 5 000)
glycerol	56-81-5	kapalina	není senzibilizující	> 5 000	negativní (> 5 000)	negativní (> 5 000)
kyselina mléčná	50-21-5	kapalina	není senzibilizující	1 500–5 000	negativní (> 5 000)	negativní (> 5 000)
kyselina 4-aminobenzoová	150-13-0	pevná látka	není senzibilizující	> 1 000	negativní (>1 000)	negativní (> 1 000)

Zkratky: CAS RN = registrační číslo CAS (Chemical Abstracts Service)

(1) Předpovědi nebezpečnosti a potence *in vivo* vycházejí z údajů ze zkoušek LLNA (3) (14). Potence *in vivo* je odvozena s použitím kritérií navržených střediskem ECETOC (24).

(2) Na základě dosavadních pozorovaných hodnot (13) (25).

(3) Doposud byla většina negativních výsledků získána u tohoto markeru, a proto se většinou očekává negativní výsledek. Uvedené rozmezí bylo definováno na základě několika doposud pozorovaných pozitivních výsledků. V případě pozitivního výsledku by měla být hodnota EC v rámci uvedeného referenčního rozmezí.

▼**M8**

Dodatek 2

SENZIBILIZACE KŮŽE *IN VITRO*: ZKOUŠKA AKTIVACE BUNĚČNÉ LINIE U937 (U-SENS™)

VÝCHOZÍ ÚVAHY A OMEZENÍ

1. Zkouška U-SENS™ kvantifikuje změnu exprese buněčného povrchového markeru spojenou s procesem aktivace monocytů a dendritických buněk (DC) (tj. CD86) v buněčné linii lidského histiocytického lymfomu U937 po expozici senzibilizujícím látkám (1). Naměřené úrovně exprese buněčného povrchového markeru CD86 v buněčné linii U937 se poté použijí jako podpůrný údaj pro rozlišení mezi látkami senzibilizujícími kůži a látkami, které kůži nesenzibilizují.

2. Zkouška U-SENS™ byla hodnocena ve validační studii (2) koordinované společností L'Oreal a poté podrobena odborné revizi poradního výboru (ESAC) referenční laboratoře EU pro alternativy ke zkouškám na zvířatech (EURL ECVAM) (3). S ohledem na všechny dostupné důkazy a příspěvky od regulátorů a účastníků doporučil EURL ECVAM (4) zkoušku U-SENS™ pro použití v rámci přístupu IATA na podporu rozlišování mezi látkami senzibilizujícími kůži a látkami nesenzibilizujícími kůži za účelem klasifikace nebezpečnosti a označování. OECD ve svých pokynech k předkládání zpráv o strukturovaných přístupech k integraci a individuálním zdrojům informací používaným v rámci postupu IATA pro senzibilizaci kůže v současné době rozebírá řadu případových studií popisujících různé strategie zkoušení a predikční modely. Jeden z různých definovaných přístupů vychází z analýzy U-SENS (5). Příklady využití údajů U-SENS™ v kombinaci s jinými informacemi, včetně dosavadních údajů a stávajících platných údajů o humánním použití (6), jsou uvedeny také jinde v odborné literatuře (4) (5) (7).

3. U zkoušky U-SENS™ se prokázalo, že ji lze přenést do laboratoří, které mají zkušenosti s technikami používajícími buněčné kultury a analýzou pomocí průtokové cytometrie. Míra reprodukovatelnosti předpovědí, které lze od této zkoušky očekávat, činí řádově 90 % v rámci laboratoří a 84 % mezi laboratořemi (8). Výsledky validační studie (8) a dalších zveřejněných studií (1) celkově ukazují, že přesnost při odlišení senzibilizujících látek (tj. kategorie 1 GHS OSN/CLP) od nesenzibilizujících látek činí 86 % (N=166) při citlivosti 91 % (118/129) a specifičnosti 65 % (24/37) ve srovnání s výsledky zkušební metody LLNA. V porovnání s výsledky při humánním použití je přesnost při odlišení senzibilizujících látek (tj. kategorie 1 GHS OSN/CLP) od nesenzibilizujících látek 77 % (N=101) při citlivosti 100 % (58/58) a specifičnosti 47 % (20/43). V porovnání s metodou LLNA se falešně negativní předpovědi u zkoušky U-SENS™ pravděpodobněji týkají chemických látek vykazujících nízkou až střední potenci způsobovat senzibilizaci kůže (tj. podkategorie 1B GHS OSN/CLP) než chemických látek vykazujících vysokou potenci způsobovat senzibilizaci kůže (tj. podkategorie 1A GHS OSN/CLP) (1) (8) (9). Celkově vzato tyto informace naznačují, že zkouška U-SENS™ může být užitečná a může přispět k zjištění nebezpečí senzibilizace kůže. Zde uvedené hodnoty přesnosti U-SENS™ jako samostatné zkoušky jsou však pouze orientační, neboť tato zkouška by měla být posuzována v kombinaci s jinými zdroji informací v rámci IATA a v souladu s ustanoveními odstavců 7 a 8 ve Všeobecném úvodu. Při hodnocení metod posuzování senzibilizace kůže bez použití zvířat by se dále mělo vést v patrnosti, že ani zkouška LLNA a ani jiné zkoušky na zvířatech nemusí plně odrážet situaci u lidí.

▼M8

4. Na základě údajů, které jsou v současné době k dispozici, bylo prokázáno, že zkouška U-SENS™ je použitelná u zkoušených chemických látek (včetně složek kosmetických přípravků, například konzervantů, povrchově aktivních látek, účinných látek, barviv) spadajících do nejrůznějších organických funkčních skupin, majících různé fyzikálně chemické vlastnosti, různou schopnost vyvolávat senzibilizaci kůže (podle stanovení ve studiích *in vivo*) a různé spektrum reakčních mechanismů, o nichž je známo, že souvisí se senzibilizací kůže (tj. Michaelův akceptor, vznik Schiffovy báze, agens acylového přenosu, nukleofilní bimolekulární substituce [SN2] nebo nukleofilní aromatická substituce [SNAr]) (1) (8) (9) (10). Metodu U-SENS™ lze použít ke zkoušení rozpustných chemických látek, které jsou rozpustné nebo které tvoří stabilní disperzi (tj. koloid nebo suspenzi, ve které se zkoušená chemická látka neusazuje ani se neodděluje od rozpouštědla/vehikula do různých fází) ve vhodném rozpouštědle/vehikulu (viz odstavec 13). Chemické látky ve skupině uvedené jako prehapteny (tj. látky aktivované oxidací) nebo prohapteny (tj. látky vyžadující enzymatickou aktivaci, například prostřednictvím enzymu P450) byly ve zkoušce U-SENS™ předpovězeny správně (1) (10). Látky narušující membránu mohou vést k falešně pozitivním výsledkům v důsledku nespecifického zvýšení exprese CD86, neboť 3 ze 7 falešně pozitivních výsledků u referenční klasifikace *in vivo*se týkaly povrchově aktivních látek (1). Proto je třeba pozitivní výsledky u povrchově aktivních látek posuzovat opatrně, zatímco negativní výsledky u povrchových látek přesto mohou být použity na podporu identifikace zkoušené chemické látky jako látky senzibilizující kůži. Zkouškou U-SENS™ (1) mohou být hodnoceny fluorescenční zkoušené chemické látky, avšak silné fluorescenční zkoušené chemické látky vyzařující na stejné vlnové délce jako fluorescein-isothiokyanát (FITC) nebo jako propidiumiodid (PI) budou narušovat detekci pomocí průtokové cytometrie, a proto nemohou být správně hodnoceny pomocí konjugovaných protilátek FITC (potenciálně falešně negativní) nebo PI (životaschopnost neměřitelná). V takovém případě mohou být použity jiné protilátky značené fluorochromem, respektive jiné markery cytotoxicity, pokud lze prokázat, že poskytují podobné výsledky jako protilátky značené FITC nebo PI (viz odstavec 18), např. zkoušením vhodných látek uvedených v dodatku 2.2. Vzhledem k výše uvedenému by se měly pozitivní výsledky u povrchově aktivních látek a negativní výsledky u silně fluorescenčních zkoušených chemických látek interpretovat v kontextu stanovených omezení a společně s jinými zdroji informací v rámci přístupu IATA. V případech, kdy existují důkazy prokazující nepoužitelnost zkoušky U-SENS™ na jiné specifické kategorie zkoušených chemických látek, neměla by se tato metoda ke zkoušení těchto specifických kategorií používat.

5. Jak bylo popsáno výše, zkouška U-SENS™ pomáhá rozlišovat mezi látkami senzibilizujícími kůži a látkami nesenzibilujícími kůži. Může však také potenciálně přispět k hodnocení senzibilizační potence, je-li používána v rámci integrovaných přístupů, například IATA. Pro určení toho, jak mohou výsledky U-SENS™ potenciálně přispět k posuzování potence, však bude nutný další výzkum, přednostně založený na údajích o účincích na člověka.

6. Definice jsou uvedeny v dodatku 2.1.

PODSTATA ZKOUŠKY

7. Zkouška U-SENS™ je analýza *in vitro*, která kvantifikuje změny exprese buněčného povrchového markeru CD86 na buněčné linii lidského histiocytického lymfomu, buňkách U937, po 45±3 hodinách expozice zkoušené chemické látce. Povrchový marker CD86 je jedním z typických markerů aktivace U937. O markeru CD86 je známo, že je kostimulační molekulou, která může napodobovat aktivaci monocytů, což hraje kritickou roli při primární aktivaci (primingu) T buněk. Změny exprese buněčného povrchového markeru CD86 se měří pomocí průtokové cytometrie po obarvení buněk obvykle protilátkami značenými fluorescein-isothiokyanátem (FITC). Rovněž se provádí paralelní měření cytotoxicity (např. pomocí PI), aby bylo možné posoudit, zda při sub-cytotoxických koncentracích dochází k up

▼M8

regulaci exprese buněčného povrchového markeru CD86. Stimulační index (S.I.) buněčného povrchového markeru CD86 v porovnání s kontrolou s rozpouštědlem/vehikulem se vypočítá a použije v predikčním modelu (viz odstavec 19) jako podpůrný údaj pro rozlišení mezi senzibilizujícími a nesenzibilizujícími látkami.

PROKÁZÁNÍ ZPŮSOBILOSTI

8. Před rutinním používáním zkoušky popsané v tomto dodatku ke zkušební metodě B.71 by měly laboratoře prokázat odbornou způsobilost použitím 10 látek pro prokazování způsobilosti, které jsou uvedeny v dodatku 2.2, a to v souladu s osvědčenými postupy pro metody *in vitro* (11). Uživatelé zkoušky by si také měli vést historickou databázi údajů pocházejících ze zkoušek reaktivity (viz odstavec 11) a z pozitivních kontrol a kontrol s rozpouštědlem/vehikulem (viz odstavce 15–16) a používat tato data k potvrzení, že v jejich laboratoři je udržována reprodukovatelnost zkoušky v čase.

POSTUP

9. Tato zkouška je založena na protokolu databázové služby pro alternativní metody k pokusům na zvířatech (DB-ALM) č. 183 (12) pro U-SENS™. Při zavádění a používání zkoušky U-SENS™ v laboratoři by měly být využívány standardní pracovní postupy. Na provádění zkoušky U-SENS™ může být využit automatizovaný systém, pokud lze prokázat, například otestováním vhodných látek uvedených v dodatku 2.2, že poskytuje podobné výsledky. Dále je uveden popis hlavních složek a postupů zkoušky U-SENS™.

Příprava buněk

10. Zkouška U-SENS™ se používá s buněčnou linií lidského histiocytického lymfomu U937 (13). Buňky (klon CRL1593.2) by měly být pořízeny z kvalifikované buněčné banky, jako je například Americká sbírka typových kultur.

11. Buňky U937 se kultivují při teplotě 37 °C ve zvlhčené atmosféře s 5 % CO_2 v médiu RPMI-1 640 doplněném 10 % fetálního telecího séra (FCS), 2 mM L-glutaminu, 100 jednotkami/ml penicilinu a 100 μg/ml streptomycinu (kompletní médium). Buňky U937 se rutinně pasážují každé 2–3 dny v hustotě 1,5, respektive 3×10^5 buněk/ml. Hustota buněk by neměla přesahovat 2×10^6 buněk/ml a životaschopnost buněk měřená vyloučením trypanové modři by měla být ≥ 90 % (nepoužije se při první pasáži po rozmrazení). Než se použijí pro zkoušení, je třeba provedením kontroly reaktivity zjistit, zda jsou všechny šarže buněk, FCS nebo protilátek vhodné. Kontrola reaktivity buněk se provádí pomocí pozitivní kontroly, kyseliny picrylsulfonové (kyselina 2,4,6-trinitrobenzensulfonová: TNBS) (CASRN 2 508-19-2, čistota ≥ 99 %) a negativní kontrola pomocí kyseliny mléčné (LA) (CASRN 50-21-5, čistota ≥ 85 %), alespoň jeden týden po rozmrazení. Při kontrole reaktivity je třeba pro každou ze dvou kontrol otestovat šest konečných koncentrací (TNBS: 1, 12,5, 25, 50, 75, 100 μg/ml a LA: 1, 10, 20, 50, 100, 200 μg/ml). TNBS rozpuštěná v kompletním médiu by měla dát pozitivní a na koncentraci závislou odpověď CD86 (např. když po pozitivní koncentraci, stimulační index CD86 ≥ 150, následuje koncentrace s rostoucím stimulačním indexem CD86) a LA rozpuštěná v kompletním médiu by měla dát negativní odpověď CD86 (viz odstavec 21). Pro analýzu se používají pouze šarže buněk, které dvakrát prošly kontrolou reaktivity. Buňky mohou být množeny až sedm týdnů po rozmrazení. Počet pasáží by neměl překročit 21. Kontrola reaktivity se provádí podle postupů popsaných v odstavcích 18–22.

▼M8

12. Pro zkoušení se buňky U937 nasadí v hustotě 3×10^5 buněk/ml nebo 6×10^5 buněk/ml a předběžně se kultivují v kultivačních baňkách po dobu 2 dnů, respektive 1 dne. Mohou být použity jiné podmínky předběžné kultivace, než je uvedeno výše, pokud je uvedeno dostatečné vědecké zdůvodnění a lze prokázat, například otestováním vhodných látek uvedených v dodatku 2.2, že poskytují podobné výsledky. V den zkoušky se buňky získané z kultivační baňky resuspendují v čerstvém kultivačním médiu při hustotě 5×10^5 buněk/ml. Poté se buňky rozdělí do 96jamkové destičky s plochým dnem s 100 µl (konečná hustota buněk $0{,}5 \times 10^5$ buněk/jamku).

Příprava zkoušených chemických látek a kontrolních látek

13. Před zkoušením se provede posouzení rozpustnosti. Za tímto účelem se zkoušené chemické látky rozpustí nebo stabilně dispergují při koncentraci 50 mg/ml v kompletním médiu jako rozpouštědle první volby nebo v dimethylsulfoxidu (DMSO, čistota ≥ 99 %) jako v rozpouštědle druhé volby, jestliže zkoušená chemická látka není rozpustná v kompletním médiu jako rozpouštědle/vehikulu. Pro zkoušení se zkoušená chemická látka rozpustí na konečnou koncentraci 0,4 mg/ml v kompletním médiu, jestliže je chemická látka rozpustná v tomto rozpouštědle/vehikulu. Pokud je chemická látka rozpustná pouze v DMSO, rozpustí se na koncentraci 50 mg/ml. Jestliže je podáno dostatečné vědecké zdůvodnění, mohou být použita jiná rozpouštědla/vehikula než výše uvedená. Je třeba vzít v úvahu stabilitu zkoušené chemické látky ve finálním rozpouštědle/vehikulu.

14. Zkoušené chemické látky a kontrolní látky se připraví v den zkoušení. Protože se neprovádí analýza ke stanovení dávky, při prvním provedení zkoušky se testuje 6 konečných koncentrací (1, 10, 20, 50, 100 a 200 µg/ml) v odpovídajícím rozpouštědle/vehikulu, a to buď v kompletním médiu, nebo v 0,4 % DMSO v médiu. Pro další provedení zkoušky, od 0,4 mg/ml v kompletním médiu nebo od 50 mg/ml v DMSO, se s použitím odpovídajícího rozpouštědla/vehikula připraví alespoň 4 pracovní roztoky zkoušených chemických látek (tj. alespoň 4 koncentrace). Nakonec se pracovní roztoky použijí pro expozici přidáním stejného objemu buněčné suspenze U937 (viz odstavec 11 výše) do objemu pracovního roztoku na destičce, čímž se dosáhne dalšího dvojnásobného ředění (12). Koncentrace (alespoň 4 koncentrace) pro případné další provedení zkoušky se zvolí na základě jednotlivých výsledků všech předchozích provedení zkoušky (8). Použitelné konečné koncentrace jsou 1, 2, 3, 4, 5, 7.5, 10, 12.5, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180 a 200 µg/ml. Maximální konečná koncentrace je 200 µg/ml. V případě, že je pozorována pozitivní hodnota CD86 při 1 µg/ml, hodnotí se 0,1 µg/ml, aby byla zjištěna koncentrace zkoušené chemické látky, která nevyvolává CD86 nad pozitivní prahovou hodnotu. Pro každé provedení zkoušky se vypočítá EC150 (koncentrace, při níž chemická látka dosáhne 150 % pozitivní prahové hodnoty CD86, viz odstavec 19), jestliže je pozorována odpověď na pozitivní koncentraci CD86. Pokud zkoušená chemická látka indukuje pozitivní odpověď CD86, která nezávisí na koncentraci, nemusí být výpočet EC150 relevantní, jak je uvedeno v protokolu ke zkušební metodě U-SENS™ DB-ALM č. 183 (12). Pro každé provedení zkoušky se vypočítá CV70 (koncentrace, při níž chemická látka dosáhne 70 % prahové hodnoty cytotoxicity, viz odstavec 19) (12). Pro zkoumání účinku nárůstu koncentrace na odpověď CD86 se zvolí jakékoli koncentrace z použitelných koncentrací rovnoměrně rozdělené mezi EC150 (neboli nejvyšší negativní necytotoxickou koncentraci CD86) a CV70 (neboli nejvyšší povolenou koncentraci tj. 200 µg/ml). Zkouší se minimálně 4 koncentrace v každém provedení zkoušky, přičemž alespoň 2 koncentrace jsou společné s předchozím provedením (provedeními) zkoušky, a to za účelem porovnání.

▼M8

15. Jako kontrola s rozpouštědlem/vehikulem se u zkoušky U-SENS™ používá kompletní médium (pro zkoušené chemické látky rozpustné nebo stabilně dispergované v kompletním mediu) (viz odstavec 4) nebo 0,4 % DMSO v kompletním médiu (pro zkoušené chemické látky rozpustné nebo stabilně dispergované v DMSO).

16. Pozitivní kontrolou používanou u zkoušky U-SENS™ je TNBS (viz odstavec 11) připravený v kompletním médiu. Jako pozitivní kontrola pro měření exprese CD86 se používá TNBS v jedné konečné koncentraci na destičce (50 μg/ml), což dává > 70 % životaschopnost buněk. Pro získání koncentrace TNBS na destičce 50 μg/ml se připraví 1 M (tj. 293 mg/ml) zásobního roztoku TNBS v kompletním médiu, který se dále naředí 2 930násobně s kompletním médiem na 100 μg/ml pracovního roztoku. Jako negativní kontrola se používá kyselina mléčná (LA, CAS 50-21-5) v koncentraci 200 μg/ml rozpuštěná v kompletním médiu (ze zásobního roztoku 0,4 mg/ml). Na každé destičce se při každém provedení zkoušky připraví tři replikáty neexponované kontroly v kompletním médiu, kontroly s rozpouštědlem/vehikulem, negativní kontroly a pozitivní kontroly (12). Lze použít i jiné vhodné pozitivní kontroly, pokud jsou k dispozici dosavadní údaje umožňující odvodit srovnatelná kritéria přijatelnosti daného provedení zkoušky. Kritéria přijatelnosti provedení zkoušky jsou stejná jako u zkoušené chemické látky (odstavec 12).

Aplikace zkoušených chemických látek a kontrolních látek

17. Kontrola s rozpouštědlem / vehikulem nebo pracovní roztoky popsané v odstavcích 14–16 se smíchají 1: 1 (obj.) s buněčnými suspenzemi připravenými ve 96jamkové destičce s plochým dnem (viz odstavec 12). Exponované destičky se poté inkubují po dobu 45±3 hodin při teplotě 37 °C za přítomnosti 5 % CO_2. Před inkubací se destičky zapečetí polopropustnou membránou, aby nedošlo k odpaření těkavých zkoušených chemických látek a křížové kontaminaci mezi buňkami exponovanými zkoušeným chemickým látkám (12).

Barvení buněk

18. Po 45 ± 3 hodinách expozice se buňky přenesou na mikrotitrační destičku s kónickým dnem a odeberou se odstředěním. Narušení rozpustnosti je definováno jako krystaly nebo kapky pozorované pod mikroskopem 45 ± 3 hodiny po expozici (před obarvením buněk). Supernatanty se zlikvidují a zbývající buňky se jednou promyjí se 100 μl ledově studeného fosfátového pufru (PBS) obsahujícího 5 % fetálního telecího séra (barvicí pufr). Po odstředění se buňky resuspendují se 100 μl barvicího pufru a barví se 5 μl (např. 0,25 μg) protilátek anti-CD86 nebo myšího IgG1 (izotyp) značených FITC při 4 °C po dobu 30 minut chráněny před světlem. Použijí se protilátky uvedené v protokolu ke zkušební metodě U-SENS™ DB-ALM č. 183 (12) (pro CD86: BD-PharMingen #5556 57 klon: Fun-1, nebo Caltag/Invitrogen # MHCD8601 klon: BU63; a pro IgG1: BD-PharMingen #5557 48, nebo Caltag/Invitrogen # GM4992). Podle zkušeností vývojářů zkoušek je intenzita fluorescence protilátek obvykle u různých šarží konzistentní. Pro analýzu mohou být použity jiné klony nebo protilátky od jiných dodavatelů, které prošly kontrolou reaktivity (viz odstavec 11). Uživatelé však mohou zvážit titraci protilátek v podmínkách své vlastní laboratoře, a definovat si tak nejlepší koncentrace pro použití. Může být použit jiný detekční systém, např. protilátky anti-CD86 značené fluorochromem, pokud lze prokázat, například otestováním vhodných látek uvedených v dodatku 2.2, že dávají podobné výsledky jako konjugované protilátky značené FITC. Po dvojím promytí 100 μl barvicího pufru a jednom promytí 100 μl ledově

▼M8

studeného PBS se buňky resuspendují v ledově studeném PBS (např. 125 µl pro vzorky analyzované ručně zkumavku po zkumavce nebo 50 µl s použitím automatické vzorkovací destičky) a přidá se roztok PI (konečná koncentrace 3 µg/ml). Mohou být použity jiné markery cytotoxicity, jako je 7-aminoaktinomycin D (7-AAD) nebo trypanová modř, pokud lze prokázat, například otestováním vhodných látek uvedených v dodatku 2.2, že alternativní barviva dávají podobné výsledky jako PI.

Analýza pomocí průtokové cytometrie

19. Úroveň exprese CD86 a životaschopnost buněk se analyzuje pomocí průtokové cytometrie. Buňky jsou zobrazeny na dot plot histogramu vyjadřujícím velikost (FSC) a granularitu (SSC) nastaveném na logaritmickou stupnici, aby byla jasně identifikována populace v první oblasti R1 a eliminovány zbytky. Pro každou jamku se připraví cílový počet celkem 10 000 buněk v oblasti R1. Buňky ze stejné oblasti R1 se zobrazí na dot plot diagramu FL3 nebo FL4 / SSC. Životaschopné buňky se vykreslí umístěním druhé oblasti R2 selektující populaci propidiumiodid negativních buněk (kanál FL3 nebo FL4). Životaschopnost buněk lze vypočítat podle následující rovnice programem cytometrické analýzy. Když je životaschopnost buněk nízká, lze připravit až 20 000 buněk včetně odumřelých. Alternativně lze získat údaje za jednu minutu po zahájení analýzy.

$$Cell\ viability = \frac{Number\ of\ living\ cells}{Total\ Number\ of\ aquired\ cells} \times 100$$

Poté se změří procento FL1 pozitivních buněk z těchto životaschopných buněk gateovaných na R2 (v oblasti R1). Exprese CD86 na buněčném povrchu se analyzuje na dot plot histogramu FL1 / SSC gatovaném na životaschopných buňkách (R2).

U jamek s kompletním médiem / IgG1 se marker analýzy stanoví v blízkosti hlavní populace, aby měly kontroly s kompletním médiem IgG1 v cílové zóně 0,6 až 0,9 %.

Barevná interference se definuje jako posun IgG1 značeného FITC na dot plot diagramu (geometrický průměr stimulačního indexu IgG1 FL1 ≥ 150 %).

Stimulační index (S.I.) CD86 pro kontrolní buňky (neexponované nebo v 0,4 % DMSO) a buňky exponované chemické látce se vypočítá podle této rovnice:.

$$S.I. = \frac{\%\ of\ CD86^{+} treated\ cells - \%\ of\ IgG1^{+} treated\ cells}{\%\ of\ CD86^{+} control\ cells - \%\ of\ IgG1^{+} control\ cells} \times 100$$

% $IgG1^{+}$ neexponovaných kontrolních buněk: uvedené jako procento FL1 pozitivních buněk IgG1 definovaných pomocí markeru analýzy (přijatelné rozmezí ≥ 0,6 % a < 1,5 %, viz odstavec 22) z životaschopných neexponovaných buněk.

% $IgG1^{+}$/$CD86^{+}$ kontrolních/exponovaných buněk: uvedené jako procento FL1 pozitivních buněk IgG1/CD86 měřeno bez pohybu markeru analýzy z životaschopných kontrolních/exponovaných buněk.

▼M8

ÚDAJE A PŘEDKLÁDÁNÍ ZPRÁV

Vyhodnocení údajů

20. Ve zkoušce U-SENS™ se vypočítávají tyto parametry: hodnota CV70, tj. koncentrace vykazující 70 % přežití buněk U937 (30 % cytotoxicita) a hodnota EC150, tj. koncentrace, při níž zkoušené chemické látky indukovaly stimulační index (S.I.) CD86 150 %.

CV70 se vypočítá log-lineární interpolací podle této rovnice:

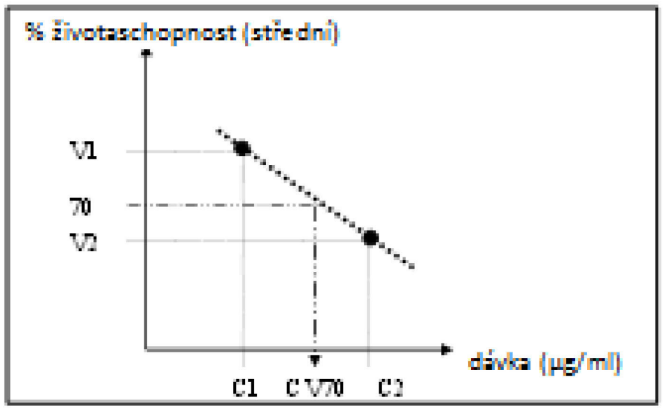
CV70 = C1 + [(V1 - 70) / (V1 – V2) * (C2 – C1)]

kde:

V1 je minimální hodnota životaschopnosti buněk nad 70 %

V2 je maximální hodnota životaschopnosti buněk pod 70 %

C1 a C2 jsou koncentrace ukazující hodnotu životaschopnosti buněk V1, respektive V2.



Lze použít i jiné způsoby odvození hodnoty CV70, pokud je prokázáno, že to nemá vliv na výsledky (např. otestováním vhodných látek uvedených).

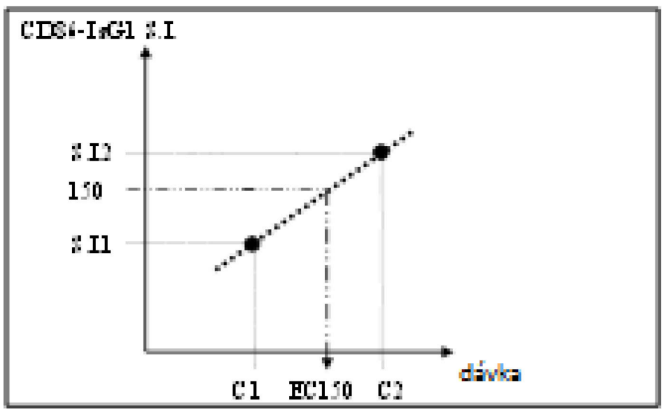
EC150 se vypočítá log-lineární interpolací podle této rovnice:

EC150 = C1 + [(150 – S.I.1) / (S.I.2 – S.I.1) * (C2 – C1)]

kde:

C1 je nejvyšší koncentrace v µg/ml se stimulačním indexem CD86 < 150 % (S.I. 1)

C2 je nejnižší koncentrace v µg/ml se stimulačním indexem CD86 > 150 % (S.I. 2).



▼M8

Hodnoty EC150 a CV70 se vypočítají

— pro každé provedení zkoušky: jednotlivé hodnoty EC150 a CV70 se použijí jako nástroj pro zkoumání účinku nárůstu koncentrace na odpověď CD86 (viz odstavec 14),

— na základě průměrné životaschopnosti se stanoví celková hodnota CV70 (12),

— na základě průměrných hodnot stimulačního indexu CD86 se stanoví celková hodnota EC150 pro zkoušenou chemickou látku predikovanou při použití metody U-SENS™ jako POZITIVNÍ (viz odstavec 21) (12).

Predikční model

21. Pro měření exprese CD86 se každá zkoušená chemická látka otestuje alespoň ve čtyřech nezávislých provedeních zkoušky (v různé dny), z nichž se odvodí jedna předpověď (NEGATIVNÍ nebo POZITIVNÍ).

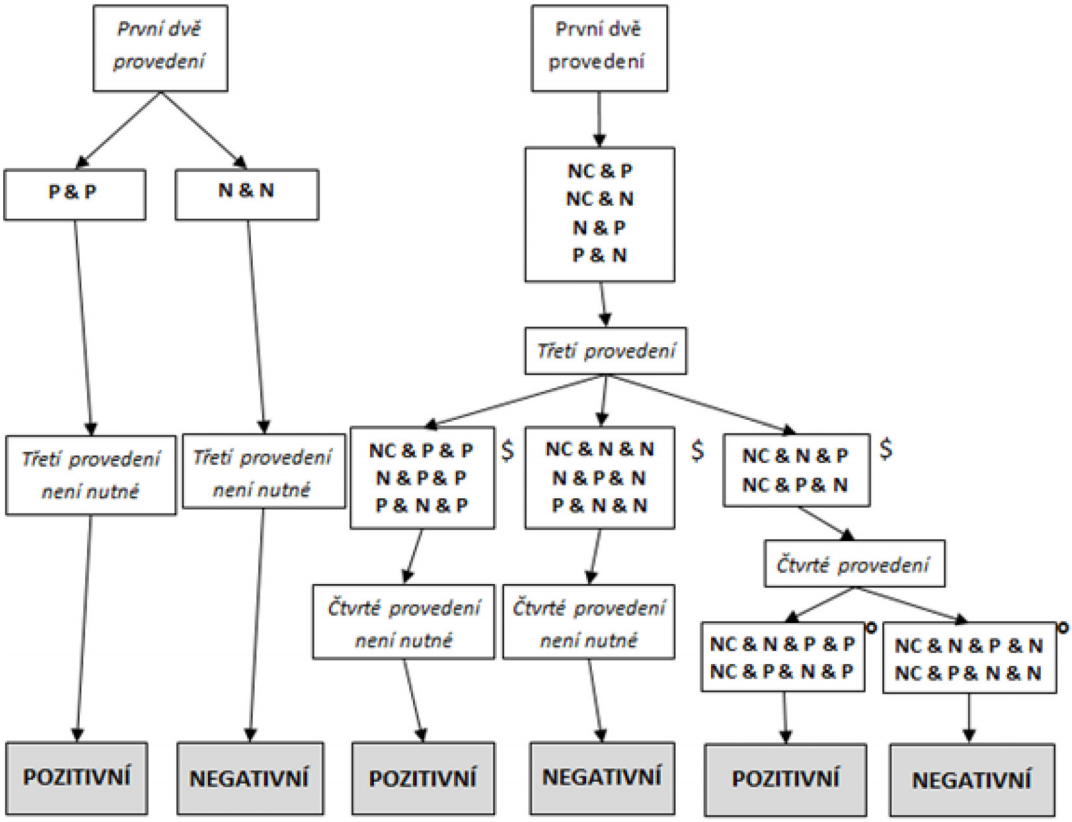
— Jednotlivé provedení zkoušky U-SENS™ se považuje za negativní (dále jen N), jestliže je stimulační index CD86 menší než 150 % při všech necytotoxických koncentracích (životaschopnost buněk ≥ 70 %) a jestliže není pozorována žádná interference (cytotoxicita, rozpustnost: viz odstavec 18 nebo barva: viz odstavec 19 bez ohledu na necytotoxické koncentrace, při nichž byla detekována interference). Ve všech ostatních případech: stimulační index CD86 vyšší než nebo rovný 150 % a pozorovány interference, je jednotlivé provedení zkoušky U-SENS™ považováno za pozitivní (dále jen P).

— Predikce na základě zkoušky U-SENS™ je považována za NEGATIVNÍ, jestliže jsou negativní (N) alespoň dvě nezávislá provedení zkoušky (obrázek 1). Pokud jsou první dvě provedení zkoušky negativní (N), považuje se předpověď získaná zkouškou U-SENS™ za NEGATIVNÍ a třetí provedení zkoušky není nutné.

— Predikce na základě zkoušky U-SENS™ je považována za POZITIVNÍ, jestliže jsou pozitivní (P) alespoň dvě nezávislá provedení zkoušky (obrázek 1). Pokud jsou první dvě provedení zkoušky pozitivní (P), považuje se předpověď získaná zkouškou U-SENS™ za POZITIVNÍ a třetí provedení zkoušky není nutné.

— Protože se neprovádí analýza ke stanovení dávky, je zde výjimka, pokud je při prvním provedení zkoušky stimulační index CD86 vyšší než nebo rovný 150 % pouze při nejvyšší necytotoxické koncentraci. Toto provedení zkoušky se poté považuje za NEPRŮKAZNÉ (NC) a v dalších provedeních je třeba testovat další koncentrace (mezi nejvyšší necytotoxickou koncentrací a nejnižší cytotoxickou koncentrací – viz odstavec 20). Pokud je provedení zkoušky určeno jako NC, je třeba provést alespoň 2 další zkoušky a v případě, že druhá a třetí zkouška nesouhlasí (N a/nebo P nezávisle), provádí se čtvrtá zkouška (obrázek 1). Další zkoušky budou považovány za pozitivní i v případě, že CD86 vyjde 150 % nebo vyšší pouze u jedné necytotoxické koncentrace, neboť nastavení koncentrace bylo pro tuto konkrétní zkoušenou chemickou látku upraveno. Konečná predikce bude vycházet z většinového výsledku tří nebo čtyř jednotlivých provedení zkoušky (tj. 2 ze 3 nebo 2 ze 4) (obrázek 1).

▼**M8**



Obrázek 1: Predikční model používaný při zkoušce U-SENS™. Předpověď U-SENS™ by měla být hodnocena v rámci přístupu IATA a v souladu s ustanoveními odstavce 4 a odstavců 7, 8 a 9 Obecného úvodu.

N: Provedení zkoušky bez pozitivního výsledku CD86 a bez pozorované interference;

P: Provedení zkoušky s pozitivním výsledkem CD86 a/nebo s pozorovanou interferencí (interferencemi);

NC: Neprůkazný výsledek. První provedení s neprůkazným výsledkem, když je CD86 pozitivní pouze při nejvyšší necytotoxické koncentraci;

#: Neprůkazný (NC) jednotlivý výsledek zjištěný pouze při prvním provedení zkoušky vede automaticky k nutnosti třetího provedení zkoušky, aby byla dosažena většina pozitivních (P) nebo negativních (N) výsledků při alespoň 2 ze 3 nezávislých provedení zkoušky.

$: Rámečky ukazují relevantní kombinace výsledků ze tří provedení zkoušky na základě výsledků získaných v prvních dvou provedeních zkoušky znázorněných v rámečku výše.

°: Rámečky ukazují relevantní kombinace výsledků ze čtyř provedení zkoušky na základě výsledků získaných v prvních třech provedeních zkoušky znázorněných v rámečku výše.

Kritéria přijatelnosti

22. Při používání zkoušky U-SENS™ by měla být splněna tato kritéria přijatelnosti (12).

— Na konci expozice v délce 45±3 hodin musí být střední životaschopnost trojích neexponovaných buněk U937 > 90 % a nesmí být pozorován žádný posun exprese CD86. Bazální exprese CD86 neexponovaných buněk U937 musí být v rozmezí ≥ 2 % a ≤ 25 %.

▼M8

— Když je jako rozpouštědlo použit DMSO, posuzuje se platnost kontroly s vehikulem DMSO pomocí výpočtu stimulačního indexu DMSO v porovnání s neexponovanými buňkami, přičemž střední životaschopnost trojích buněk musí být > 90 %. Kontrola s vehikulem je platná, když je střední hodnota trojího stimulačního indexu CD86 menší než 250 % střední hodnoty trojího stimulačního indexu CD86 neexponovaných buněk U937.

— Provedení zkoušky se považují za platná, jestliže alespoň dvě ze tří hodnot IgG1 neexponovaných buněk U937 spadají do rozmezí ≥ 0,6 % a < 1,5 %.

— Souběžně prováděná negativní kontrola (kyselina mléčná) se považuje za platnou, jestliže alespoň dva ze tří replikátů byly negativní (CD86 S.I. < 150 %) a necytotoxické (životaschopnost buněk ≥ 70 %).

— Pozitivní kontrola (TNBS) se považuje za platnou, jestliže alespoň dva ze tří replikátů byly pozitivní (CD86 S.I. ≥150 %) a necytotoxické (životaschopnost buněk ≥ 70 %).

ZÁVĚREČNÁ ZPRÁVA

23. Závěrečná zpráva by měla obsahovat tyto informace.

Zkoušená chemická látka

Jednosložková látka:

— chemická identifikace, např. název (názvy) IUPAC nebo CAS, číslo (čísla) CAS, kód SMILES nebo InChI, strukturní vzorec a/nebo jiné identifikátory,

— fyzický vzhled, úplná rozpustnost v médiu, rozpustnost v DMSO, molekulová hmotnost a další důležité fyzikálně-chemické vlastnosti, v rozsahu, v jakém jsou tyto informace dostupné,

— čistota, případně chemická identita nečistot, je-li to prakticky proveditelné atd.,

— případné ošetření před zkoušením (např. zahřívání, mletí),

— zkušební koncentrace,

— podmínky skladování a stabilita, v rozsahu, v jakém jsou tyto informace dostupné,

— zdůvodnění volby rozpouštědla/vehikula pro každou zkoušenou chemickou látku.

Vícesložková látka, UVCB a směs:

— charakterizovaná v co možná největší míře např. chemickou identitou (viz výše), čistotou, kvantitativním výskytem a důležitými fyzikálně-chemickými vlastnostmi (viz výše) složek, v rozsahu, v jakém jsou tyto informace dostupné,

— fyzický vzhled, rozpustnost v kompletním médiu, rozpustnost v DMSO, a další důležité fyzikálně-chemické vlastnosti, v rozsahu, v jakém jsou tyto informace dostupné,

— molekulová hmotnost nebo zdánlivá molekulová hmotnost v případě směsí/polymerů se známým složením nebo jiné informace důležité pro provedení studie;,

— případné ošetření před zkoušením (např. zahřívání, mletí),

— zkušební koncentrace,

— podmínky skladování a stabilita, v rozsahu, v jakém jsou tyto informace dostupné,

— zdůvodnění volby rozpouštědla/vehikula pro každou zkoušenou chemickou látku.

▼**M8**

Kontroly

Pozitivní kontrola:

— chemická identifikace, např. název (názvy) IUPAC nebo CAS, číslo (čísla) CAS, kód SMILES nebo InChI, strukturní vzorec a/nebo jiné identifikátory,

— fyzický vzhled, rozpustnost v DMSO, molekulová hmotnost a další důležité fyzikálně-chemické vlastnosti, v rozsahu, v jakém jsou tyto informace dostupné,

— čistota, případně chemická identita nečistot, je-li to prakticky proveditelné atd.,

— případné ošetření před zkoušením (např. zahřívání, mletí),

— zkušební koncentrace,

— podmínky skladování a stabilita, v rozsahu, v jakém jsou tyto informace dostupné,

— odkaz na případné dosavadní výsledky pozitivních kontrol prokazující vhodnost kritérií přijatelnosti provedení.

Negativní kontrola a kontrola rozpouštědlem/vehikulem:

— chemická identifikace, např. název (názvy) IUPAC nebo CAS, číslo (čísla) CAS, kód SMILES nebo InChI, strukturní vzorec a/nebo jiné identifikátory,

— čistota, případně chemická identita nečistot, je-li to prakticky proveditelné atd.,

— fyzický vzhled, molekulová hmotnost a další důležité fyzikálně-chemické vlastnosti v případě použití jiného rozpouštědla/vehikula než rozpouštědel/vehikul uvedených v tomto pokynu, a to v rozsahu, v jakém jsou tyto informace dostupné,

— podmínky skladování a stabilita v rozsahu, v jakém jsou tyto informace dostupné,

— zdůvodnění volby rozpouštědla/vehikula pro každou zkoušenou chemickou látku.

Zkušební podmínky

— jméno a adresa zadavatele, zkušebního zařízení a vedoucího studie,

— popis použité zkoušky,

— použité buněčné linie, podmínky skladování a zdroj (např. zařízení, z něhož byly získány),

— použitá průtoková cytometrie (např. model), včetně nastavení přístrojů, použitého globulinu a markeru cytotoxicity,

— postup použitý pro prokázání způsobilosti laboratoře k provádění této zkoušky zkoušením vhodných látek a postup použitý pro prokázání reprodukovatelného provedení zkoušky v čase, např. dosavadní kontrolní údaje anebo dosavadní údaje o kontrolách reaktivity.

Kritéria přijatelnosti zkoušky

— životaschopnost buněk a hodnoty stimulačního indexu CD86 získané z kontroly s rozpouštědlem/vehikulem v porovnání s rozsahy přijatelnosti,

▼M8

— životaschopnost buněk a hodnoty stimulačního indexu získané z pozitivní kontroly v porovnání s rozsahy přijatelnosti,

— životaschopnost buněk všech testovaných koncentrací zkoušené chemické látky.

Zkušební postup

— počet provedení zkoušky,

— koncentrace zkoušených chemických látek, použité doby aplikace a expozice (pokud se liší od doporučených),

— doba expozice,

— popis použitých hodnotících kritérií a kritérií rozhodování,

— popis jakýchkoli změn zkušebního postupu.

Výsledky

— údaje ve formě tabulky, včetně CV70 (v relevantních případech), stimulačního indexu, hodnot životaschopnosti buněk, hodnot EC150 (v relevantních případech) získaných pro zkoušenou chemickou látku a pro pozitivní kontrolu při každém provedení zkoušky a uvedení klasifikace zkoušené chemické látky podle predikčního modelu,

— případně popis jakýchkoli jiných důležitých zjištění z pozorování.

Diskuse o výsledcích

— diskuse o výsledcích získaných za pomoci zkoušky U-SENS™,

— diskuse o výsledcích zkoušky v rámci IATA, jsou-li k dispozici jiné příslušné informace.

Závěry

LITERATURA

(1) Piroird, C., Ovigne, J.M., Rousset, F., Martinozzi-Teissier, S., Gomes, C., Cotovio, J., Alépée, N. (2015). The Myeloid U937 Skin Sensitization Test (U-SENS) addresses the activation of dendritic cell event in the adverse outcome pathway for skin sensitization. *Toxicol. Chem. In Vitro* 29, 901-916.

(2) EURL ECVAM (2017). The U-SENS™ test method Validation Study Report. Dostupné na: http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/eurl-ecvam/eurl-ecvam-recommendations

(3) EC EURL-ECVAM (2016). ESAC Opinion No 2016-03 on the L'Oréal-coordinated study on the transferability and reliability of the U-SENS™ test method for skin sensitisation testing. EUR 28 178 EN; doi 10.2 787/8157 37. Dostupné na: [http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC103705].

(4) EC EURL-ECVAM (2017). EURL ECVAM Recommendation on the use of non-animal approaches for skin sensitisation testing. EUR 28 553 EN; doi 10.2 760/5889 55. Dostupné na: https://ec.europa.eu/jrc/en/publication/eur-scientific-and-technical-research-reports/eurl-ecvam-recommendation-use-non-animal-approaches-skin-sensitisation-testing.

(5) Steiling, W. (2016). Safety Evaluation of Cosmetic Ingredients Regarding their Skin Sensitization Potential. doi:10.3390/cosmetics3020014. *Cosmetics* 3, 14.

▼**M8**

(6) OECD (2016). Guidance Document on The Reporting of Defined Approaches and Individual Information Sources to be Used Within Integrated Approaches to Testing and Assessment (IATA) For Skin Sensitisation, Series on Testing & Assessment No 256, ENV/JM/MONO(2016)29. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Dostupné na webových stránkách: [http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm].

(7) Urbisch, D., Mehling, A., Guth, K., Ramirez, T., Honarvar, N., Kolle, S., Landsiedel, R., Jaworska, J., Kern, P.S., Gerberick, F., Natsch, A., Emter, R., Ashikaga, T., Miyazawa, M., Sakaguchi, H. (2015). Assessing skin sensitization hazard in mice and men using non-animal test methods. *Regul. Toxicol. Chem. Acute Exposure of the Neonatal Rat to Triethyltin Results in Persistent Changes in Neurotypic and Gliotypic Proteins.* 71, 337-351.

(8) Alépée, N., Piroird, C., Aujoulat, M., Dreyfuss, S., Hoffmann, S., Hohenstein, A., Meloni, M., Nardelli, L., Gerbeix, C., Cotovio, J. (2015). Prospective multicentre study of the U-SENS test method for skin sensitization testing. *Toxicol In Vitro* 30, 373-382.

(9) Reisinger, K., Hoffmann, S., Alépée, N., Ashikaga, T., Barroso, J., Elcombe, C., Gellatly, N., Galbiati, V., Gibbs, S., Groux, H., Hibatallah, J., Keller, D., Kern, P., Klaric, M., Kolle, S., Kuehnl, J., Lambrechts, N., Lindstedt, M., Millet, M., Martinozzi-Teissier, S., Natsch, A., Petersohn, D., Pike, I., Sakaguchi, H., Schepky, A., Tailhardat, M., Templier, M., van Vliet, E., Maxwell, G. (2014). Systematic evaluation of non-animal test methods for skin sensitisation safety assessment. *Toxicol. In Vitro* 29, 259-270.

(10) Fabian, E., Vogel, D., Blatz, V., Ramirez, T., Kolle, S., Eltze, T., van Ravenzwaay, B., Oesch, F., Landsiedel, R. (2013). Xenobiotic metabolizin enzyme activities in cells used for testing skin sensitization *in vitro*. *Arch. Toxicol.* 87, 1 683-1 696.

(11) OECD. (2018). Draft Guidance document: Good *In Vitro* Method Practices (GIVIMP) for the Development and Implementation of *In Vitro* Methods for Regulatory Use in Human Safety Assessment. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Dostupné na webových stránkách: http://www.oecd.org/env/ehs/testing/OECD Final Draft GIVIMP.pdf.

(12) DB-ALM (2016). Protocol no 183: Myeloid U937 Skin Sensitization Test (U-SENS™), 33pp. Dostupné na: [http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/].

(13) Sundström, C., Nilsson, K. (1976). Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937). *Int. J. Cancer* 17, 565-577.

(14) OECD (2005). Series on Testing and Assessment No. 34: Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Dostupné na webových stránkách: http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm.

(15) United Nations UN (2015). Globálně harmonizovaný systém klasifikace a označování chemických látek (GHC). ST/SG/AC.10/30/Rev.6, Sixth Revised Edition, New York & Geneva: United Nations Publications. Dostupné na: http://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev06/English/ST-SG-AC10-30-Rev6e.pdf.

(16) OECD (2012). Series on Testing and Assessment No 168: The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Series on Testing and Assessment No. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Dostupné na webových stránkách: http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm.

(17) ECETOC (2003). Technical Report No 87: Contact sensitization: Classification according to potency. European Centre for Ecotoxicology & Toxicology of Chemicals, Brussels. Dostupné na: https://ftp.cdc.gov/pub/Documents/OEL/06.%20Dotson/References/ECETOC_2003-TR87.pdf.

▼M8

Dodatek 2.1

DEFINICE

Přesnost: přesnost shody mezi výsledky zkoušky a přijatými referenčními hodnotami. Je to míra funkčnosti zkoušky a jeden z aspektů její relevantnosti. Tento výraz se často používá namísto výrazu soulad a rozumí se jím podíl správných výsledků zkoušky (14).

AOP (mechanismy nežádoucích účinků): sled událostí od chemické struktury cílové chemické látky nebo skupiny podobných chemických látek přes molekulární iniciační událost po účinek *in vivo*, který je předmětem zájmu (15).

Odpověď na koncentraci CD86: k závislosti na koncentraci (neboli odpovědi na koncentraci) dochází, když po pozitivní koncentraci (CD86 S.I. ≥ 150) následuje koncentrace se zvyšujícím se stimulačním indexem CD86.

Chemická látka: látka nebo směs.

CV70: odhad koncentrace ukazující 70 % životaschopnost buněk.

Posun: posun je definován tak, že i) korigovaná hodnota % $CD86^+$ neexponovaného kontrolního replikátu 3 je menší než 50 % střední hodnoty korigované hodnoty % $CD86^+$ neexponovaných kontrolních replikátů 1 a 2 a ii) korigovaná hodnota % $CD86^+$ negativního kontrolního replikátu 3 je menší než 50 % střední hodnoty korigované hodnoty % $CD86^+$ negativních kontrolních replikátů 1 a 2.

EC150: odhad koncentrací vykazujících 150 % stimulační index exprese CD86.

Průtoková cytometrie: cytometrická technika, při níž buňky suspendované v kapalině protékají jedna po druhé přes ohnisko excitačního světla, které je rozptýleno do vzorů charakteristických pro buňky a jejich komponenty; buňky jsou často označeny fluorescenčními markery, aby bylo světlo nejprve absorbováno a poté emitováno v pozměněných frekvencích.

Nebezpečnost: základní charakteristika látky nebo situace, která má potenciál vyvolat nepříznivé účinky, jsou-li organismus, systém nebo (sub)populace vystaveny této látce.

IATA (jednotný přístup ke zkoušení a posuzování): strukturovaný přístup používaný pro zjišťování nebezpečnosti (potenciál), charakterizaci rizik (potence) a/nebo posouzení bezpečnosti (potenciál/potence a expozice) chemické látky nebo skupiny chemických látek, jenž strategicky integruje a váží všechny důležité údaje s cílem poskytnout informace pro přijetí regulačního rozhodnutí, které se týká potenciální nebezpečnosti a/nebo rizika a/nebo potřeby dalšího cíleného, a tudíž minimálního zkoušení.

Směs: směs nebo roztok složený ze dvou nebo více látek.

Jednosložková látka: látka definovaná svým kvantitativním složením, v níž je přítomna jedna hlavní složka v míře alespoň 80 % hmot.

Vícesložková látka: látka definovaná svým kvantitativním složením, v níž je přítomna více než jedna hlavní složka v koncentraci ≥ 10 % hmot. a < 80 % hmot. Vícesložková látka je výsledkem výrobního procesu. Rozdíl mezi směsí a vícesložkovou látkou spočívá v tom, že směs se získá smísením dvou nebo více látek bez chemické reakce. Vícesložková látka je výsledkem chemické reakce.

▼M8

Pozitivní kontrola: replika obsahující všechny složky zkušebního systému a látku, o níž je známo, že způsobuje pozitivní reakci. Aby se zajistilo, že proměnlivost v reakci na pozitivní kontrolu bude možné časem vyhodnotit, rozsah pozitivní reakce by neměl být nadměrný.

Prehapteny: chemické látky, z nichž se abiotickou transformací, např. oxidací, staly senzibilizující látky.

Prohapteny: chemické látky vyžadující enzymatickou aktivaci, aby vykazovaly potenciál senzibilizace kůže.

Relevantnost: popis vztahu zkoušky k účinku, který je předmětem zájmu, a také toho, zda je zkouška smysluplná a použitelná pro konkrétní účel. Vyjadřuje, do jaké míry zkouška správně měří nebo predikuje biologický účinek, který je předmětem zájmu. Relevantnost zahrnuje také posouzení přesnosti (shody) zkoušky (14).

Spolehlivost: měření rozsahu, v jakém může být zkouška časem reprodukovatelná v laboratořích a mezi laboratořemi, když se provádí s použitím stejného protokolu. Hodnotí se to výpočtem laboratorní a mezilaboratorní reprodukovatelnosti a laboratorní opakovatelnosti (14).

Provedení zkoušky: jedna či více zkoušených chemických látek se zkouší současně s kontrolou s rozpouštědlem/vehikulem a s pozitivní kontrolou.

Citlivost: podíl všech pozitivních/aktivních chemických látek, které jsou na základě zkoušky správně zatříděny. Je měřítkem přesnosti zkušební metody, která poskytuje kategorické výsledky, a je důležitým prvkem při hodnocení relevantnosti zkušební metody (14).

S.I.: stimulační index. Relativní hodnoty geometrického průměru intenzity fluorescence v buňkách exponovaných chemické látce v porovnání s buňkami exponovanými rozpouštědlu.

Kontrola s rozpouštědlem/vehikulem: neexponovaný vzorek obsahující všechny složky zkušebního systému s výjimkou zkoušené chemické látky, ale včetně rozpouštědla/vehikula, které se používá. Používá se ke stanovení účinku na pozadí u vzorků exponovaných zkoušené chemické látce, která je rozpuštěna nebo stabilně dispergována ve stejném rozpouštědle/vehikulu. Pokud se vzorek zkouší souběžnou kontrolou s médiem, ukazuje také, zda rozpouštědlo/vehikulum vzájemně reaguje se zkušebním systémem.

Specifičnost: podíl všech negativních/neaktivních chemických látek, které jsou na základě zkušební metody správně zatříděny. Je to měřítko přesnosti zkušební metody, která dává kategorické výsledky, a je důležitým prvkem při hodnocení relevance zkušební metody (14).

Barvicí pufr: fosfátový pufr ve fyziologickém roztoku obsahující 5 % fetálního telecího séra.

Látka: chemický prvek a jeho sloučeniny v přírodním stavu nebo získané výrobním postupem, včetně jakýchkoliv aditiv potřebných pro zachování stability výrobku a všech nečistot pocházejících z použitého postupu, ale s vyloučením všech rozpouštědel, která je možno oddělit bez ovlivnění stability dané látky nebo změny jejího složení.

Zkoušená chemická látka: jakákoli látka nebo směs zkoušená touto zkouškou.

▼M8

Globálně harmonizovaný systém klasifikace a označování chemických látek Organizace spojených národů (GHS OSN): systém navrhující klasifikaci látek a směsí podle standardizovaných typů a úrovní fyzikálních, zdravotních a environmentálních nebezpečí a řešící příslušné komunikační prvky, jako jsou piktogramy, signální slova, výroky o nebezpečí, výroky o bezpečnostních opatřeních a bezpečnostní datové listy, které obsahují informace o jejich nežádoucích účincích s ohledem na ochranu lidí (včetně zaměstnavatelů, dělníků, přepravců, spotřebitelů a osob reagujících na havárie) a životního prostředí (16).

UVCB: látky s neznámým nebo proměnlivým složením, komplexní reakční produkty nebo biologický materiál.

Validovaná zkouška: zkouška, u níž se má za to, že je dostatečně relevantní a spolehlivá pro určitý účel, a která je založena na vědecky spolehlivých zásadách. Zkouška není nikdy validovaná v absolutním smyslu, ale pouze pro určitý konkrétní účel (14).

▼**M8**

Dodatek 2.2

LÁTKY PRO PROKÁZÁNÍ ZPŮSOBILOSTI

Dříve než začnou laboratoře běžně používat zkoušku popsanou v tomto dodatku ke zkušební metodě B.71, měly by prokázat odbornou způsobilost správným získáním předpokládané předpovědi U-SENS™ u 10 vhodných látek doporučených v tabulce 1 a získáním hodnot CV70 a EC150, které spadají do příslušného referenčního rozpětí, u nejméně 8 z 10 vhodných látek. Látky pro prokázání způsobilosti byly vybrány tak, aby představovaly rozpětí účinků na nebezpečí senzibilizace kůže. Dalšími kritérii výběru bylo, aby látky byly komerčně dostupné, aby k nim byly k dispozici kvalitní referenční údaje *in vivo* a také kvalitní údaje *in vitro* získané zkouškou U-SENS™. Pro zkoušku U-SENS™ jsou také k dispozici zveřejněné referenční údaje (1) (8).

Tabulka 1

Doporučené látky pro prokázání odborné způsobilosti k provádění zkoušky U-SENS™

Látky pro prokázání způsobilosti	**Fyzikální forma**	**Skupenství**	**Předpověď *in vivo* (1)**	**U-SENS Rozpouštědlo/vehikulum**	**U-SENS CV70 Odkaz Rozsah v µg/ml (2)**	**U-SENS (referenční rozmezí EC150 v µg/ml) (3)**
benzen-1,4-diamin	106-50-3 Org.	pevná látka	senzibilizující (silně)	kompletní médium (3)	< 30	pozitivní (≤ 10)
kyselina picrylsulfonová	2508-19-2	kapalina	senzibilizující (silně)	kompletní médium	> 50	pozitivní (≤ 50)
diethyl-maleinát	141-05-9	kapalina	senzibilizující (středně silně)	DMSO	10–100	pozitivní (≤ 20)
resorcin	108-46-3	pevná látka	senzibilizující (středně silně)	kompletní médium	> 100	pozitivní (≤ 50)
skořicový alkohol	104-54-1	pevná látka	senzibilizující (slabě)	DMSO	> 100	pozitivní (10–100)
estragol	140-67-0	kapalina	senzibilizující (slabě)	DMSO	> 100	pozitivní (< 200)
sacharin	81-07-2	pevná látka	není senzibilizující	DMSO	> 200	negativní (> 200)
glycerol	56-81-5	kapalina	není senzibilizující	kompletní médium	> 200	negativní (> 200)
kyselina mléčná	50-21-5	kapalina	není senzibilizující	kompletní médium	> 200	negativní (> 200)
kyselina salicylová	69-72-7	pevná látka	není senzibilizující	DMSO	> 200	negativní (> 200)

Zkratky: CAS RN = registrační číslo CAS (Chemical Abstracts Service)

(1) Předpovědi nebezpečnosti (a potence) *in vivo* vycházejí z údajů ze zkoušek LLNA (1) (8). Potence *in vivo* je odvozena s použitím kritérií navržených střediskem ECETOC (17).

(2) Na základě dosavadních pozorovaných hodnot (1) (8).

(3) Kompletní médium: Médium RPMI-1640 doplněném 10 % fetálního telecího séra, 2 mM L-glutaminu, 100 jednotkami/ml penicilinu a 100 µg/ml streptomycinu (8).

▼**M8**

Dodatek 3

SENZIBILIZACE KŮŽE *IN VITRO*: ANALÝZA IL-8 LUC

VÝCHOZÍ ÚVAHY A OMEZENÍ

1. Na rozdíl od zkoušek analyzujících expresi buněčných povrchových markerů kvantifikuje analýza L8-Luc změny v expresi IL-8, cytokinu spojeného s aktivací dendritických buněk (DC). V reportérové buněčné linii IL-8 odvozené od THP (THP-G8, vytvořené z buněčné linie lidské akutní monocytární leukémie THP-1) se měří exprese IL-8 po expozici senzibilizujícím látkám (1). Poté se použije exprese luciferázy jako pomůcka pro rozlišení mezi látkami senzibilizujícími kůži a látkami nesenzibilujícími kůži.

2. Analýza IL-8 Luc byla hodnocena ve validační studii (2) provedené Japonským střediskem pro validaci alternativních metod (JaCVAM), **ministerstvem hospodářství, obchodu a průmyslu** (METI) a Japonskou společností **pro alternativy experimentů na zvířatech (JSAAE**) a poté byla podrobena nezávislému hodnocení (3) pod záštitou střediska JaCVAM a ministerstva zdravotnictví, práce a sociálních věcí (MHLW) s podporou útvaru pro **Mezinárodní spolupráci při alternativních zkušebních** metodách (ICATM). S ohledem na všechny dostupné důkazy a příspěvky od regulátorů a účastníků je analýza IL-8 Luc považována za užitečnou v rámci přístupu IATA na rozlišení mezi látkami senzibilizujícími kůži a látkami nesenzibilizujícími kůži za účelem klasifikace nebezpečnosti a označování. Příklady využití údajů z analýzy IL-8 Luc v kombinaci s jinými informacemi jsou uvedeny v odborné literatuře (4) (5) (6).

3. U analýzy IL-8 Luc se prokázalo, že ji lze přenést do laboratoří, které mají zkušenosti s používáním buněčných kultur a měřením luciferázy. Reprodukovatelnost v rámci laboratoře a mezilaboratorní reprodukovatelnost činily 87,7 %, respektive 87,5 % (2). Údaje získané z validační studie (2) a dalších zveřejněných prací (1) (6) ukazují, že analýza IL-8 Luc určila 118 ze 143 chemických látek jako pozitivních nebo negativních a 25 jako neprůkazných a že přesnost analýzy IL-8 Luc při odlišení senzibilizujících látek (tj. kategorie 1 GHS OSN/CLP) od nesenzibilizujících látek (tj. bez kategorie GHS OSN/CLP) činí 86 % (101/118) při citlivosti 96 % (92/96) a specifičnosti 41 % (9/22). S vyloučením látek mimo oblast použitelnosti, jak je popsáno níže (odstavec 5), analýza IL-8 Luc určila 113 ze 136 chemických látek jako pozitivních nebo negativních a 23 jako neprůkazných, přičemž přesnost analýzy IL-8 Luc činí 89 % (101/113) při citlivosti 96 % (92/96) a specifičnosti 53 % (9/17). Podle údajů o použití u lidí citovaných v Urbisch et al. (7) analýza IL-8 Luc určila 76 z 90 chemických látek jako pozitivních nebo negativních a 14 jako neprůkazných, přičemž přesnost činí 80 % (61/76), citlivosti 93 % (54/58) a specifičnost 39 % (7/18). S vyloučením látek mimo oblast použitelnosti analýza IL-8 Luc určila 71 z 84 chemických látek jako pozitivních nebo negativních a 13 chemických látek jako neprůkazných, přičemž přesnost činí 86 % (61/71) při citlivosti 93 % (54/58) a specifičnosti 54 % (7/13). Falešně negativní předpovědi se u analýzy IL-8 Luc pravděpodobněji týkají chemických látek vykazujících nízkou/střední potenci způsobovat senzibilizaci kůže (podkategorie 1B GHS OSN/CLP) než chemických látek vykazujících vysokou potenci (podkategorie 1A GHS OSN/CLP) (6). Celkově vzato tyto informace podporují roli, kterou může analýza IL-8 Luc sehrát při identifikaci nebezpečí senzibilizace kůže.

▼**M8**

Uvedená přesnost analýzy IL-8 Luc jako samostatné zkoušky je však pouze orientační, neboť tato zkouška by měla být posuzována v kombinaci s jinými zdroji informací v rámci IATA a v souladu s ustanoveními odstavců 7 a 8 ve Všeobecném úvodu. Při hodnocení zkoušek na senzibilizaci kůže bez použití zvířat by se dále mělo vést v patrnosti, že zkouška LLNA a ani jiné zkoušky na zvířatech nemusí plně odrážet situaci u lidí.

4. Na základě nyní dostupných údajů bylo prokázáno, že analýzu IL-8 Luc lze použít ke zkoušení chemických látek, které obsahují různé organické funkční skupiny, mají různé reakční mechanismy, různou potenci způsobovat senzibilizaci kůže (jak byla stanovena ve studiích *in vivo*) a různé fyzikálně-chemické vlastnosti (2) (6).

5. Ačkoli analýza IL-8 Luc používá jako rozpouštědlo X-VIVO™ 15, správně vyhodnotila chemické látky s log K_{ow} >3,5 a chemické látky s rozpustností ve vodě 100 μg/ml podle výpočtu pomocí EPI Suite™ a její schopnost detekovat senzibilizující látky špatně rozpustné ve vodě je lepší než v případě analýzy IL-8 Luc používající jako rozpouštědlo dimethylsulfoxid (DMSO) (2). Negativní výsledky u zkoušených chemických látek, které se nerozpouštějí při 20 mg/ml, však mohou dávat falešně negativní výsledky vzhledem k jejich nerozpustnosti v X-VIVO™ 15. Negativní výsledky u těchto zkoušených chemických látek by proto neměly být brány v úvahu. Ve validační studii byla pozorována vysoká míra falešně negativních výsledků u anhydridů. Dále z důvodu omezené metabolické schopnosti buněčné linie (8) a vzhledem k experimentálním podmínkám mohou prohapteny (látky vyžadující metabolickou aktivaci) a prehapteny (látky aktivované oxidací) při analýze vykazovat negativní výsledky. Ačkoliv by však měly být negativní výsledky u pravděpodobných pre/prohaptenů interpretovány opatrně, analýza IL-8 Luc správně posoudila 11 z 11 prehaptenů, 6/6 prohaptenů a 6/8 pre/prohaptenů v souboru dat analýzy IL-8 Luc (2). Na základě nedávno provedené komplexní revize tří zkoušek neprováděných na zvířatech (DPRA, KeratinoSens™ a h-CLAT) na detekci pre- a prohaptenů (9) a na základě skutečnosti, že buňky THP-G8 používané při analýze IL-8 Luc jsou buněčná linie derivovaná z buněk THP-1, které se používají při zkoušce h-CLAT, může analýza IL-8 Luc také přispět ke zvýšení citlivosti zkoušek prováděných na zvířatech, které jsou určeny na detekci pre- a prohaptenů, v kombinaci s jinými zkouškami. Zkoušené povrchově aktivní látky zatím dávaly (falešně) pozitivní výsledky bez ohledu na jejich druh (např. kationtové, aniontové nebo neiontové). Konečně, zkoušené chemické látky, jež ovlivňují luciferázu, mohou zkreslit její aktivitu/měření, neboť způsobují zjevnou inhibici nebo zvýšenou luminiscenci (10). Uvádí se například, že koncentrace fytoestrogenu vyšší než 1 μM ovlivnila luminiscenční signály v jiných zkouškách reportérových genů založených na luciferáze v důsledku nadměrné aktivace reporterového genu luciferázy. V důsledku toho je nutné pečlivě zkoumat exprese luciferázy získané při vysoké koncentraci fytoestrogenů nebo sloučenin, u nichž existuje podezření, že vyvolávají aktivaci reporterového genu luciferázy podobně jako fytoestrogeny (11). Na základě výše uvedeného jsou povrchově aktivní látky, anhydridy a chemické látky interferující s luciferázou mimo oblast použitelnosti této analýzy. V případech, kdy existují důkazy prokazující nepoužitelnost analýzy IL-8 Luc na jiné specifické kategorie zkoušených chemických látek, neměla by se tato zkouška u těchto specifických kategorií používat.

6. Jak bylo popsáno výše, pomáhá analýza IL-8 Luc rozlišovat mezi látkami senzibilizujícími kůži a látkami nesenzibilujícími kůži. Ke stanovení toho, zda mohou výsledky analýzy IL-8 Luc přispět k hodnocení potence při posuzování v kombinaci s jinými zdroji informací, však bude zapotřebí další výzkum, nejlépe založený na údajích o účincích na člověka.

▼M8

7. Definice jsou uvedeny v dodatku 3.1.

PODSTATA ZKOUŠKY

8. Analýza IL-8 Luc využívá buněčnou linii THP-1 lidské monocytární leukemie, která byla získána z Americké sbírky typových kultur (Manassas, VA, USA). S využitím této buněčné linie vytvořila Katedra dermatologie Lékařské fakulty Univerzity v Tohoku reportérovou buněčnou linii IL-8 derivovanou z buněk THP-1, THP-G8, která obsahuje geny stabilní luciferázové oranže (SLO) a stabilní luciferázové červeně (SLR) pod kontrolou promotérů IL-8, respektive glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenázy **(**GAPDH) (1). To umožňuje kvantitativní měření indukce genu luciferázy pomocí lumuniscenční detekce za použití známých substrátů pro luciferázu produkujících světlo jako ukazatele aktivity transkripčního faktoru IL-8 a GAPDH v buňkách po expozici senzibilizujícím látkám.

9. Duální barevný zkušební systém sestává z luciferázy emitující oranžovou (SLO; λmax = 580 nm) (12) pro genovou expresi promotéru IL-8 a z luciferázy emitující červenou (SLR; λmax = 630 nm) (13) pro genovou expresi interního kontrolního promotéru, GAPDH. Tyto dvě luciferázy emitují po reakci s d-luciferinem světlušek různé barvy, přičemž jejich luminiscence se měří současně v jednostupňové reakci rozdělením emise z analyzované směsi pomocí optického filtru (14) (dodatek 3.2).

10. Buňky THP-G8 se po dobu 16 hodin exponují zkoušené chemické látce a poté se změří aktivita luciferázy SLO (SLO-LA), která vyjadřuje aktivitu promotéru IL-8 a aktivitu luciferázy SLR (SLR-LA), vyjadřující aktivitu promotéru GAPDH. Aby byly zkratky snadno pochopitelné, označují se SLO-LA a SLR-LA jako IL8LA, respektive GAPLA. V tabulce 1 je uveden popis výrazů souvisejících s aktivitou luciferázy při analýze IL-8 Luc. Naměřené hodnoty se používají pro výpočet normalizované hodnoty IL8LA (nIL8LA), což je poměr IL8LA ke GAPLA; indukce nIL8LA (Ind-IL8LA), což je poměr aritmetických průměrů čtyřnásobně změřených hodnot nIL8LA buněk THP-G8 exponovaných zkoušené chemické látce a hodnot nIL8LA neexponovaných buněk THP-G8; a inhibice GAPLA (Inh-GAPLA), což je poměr aritmetických průměrů čtyřnásobně změřených hodnot GAPLA buněk THP-G8 exponovaných zkoušené chemické látce a hodnot GAPLA neexponovaných buněk THP-G8, a použijí se jako ukazatel cytotoxicity.

Tabulka 1

Popis výrazů souvisejících s aktivitou luciferázy při analýze IL-8 Luc

Zkratky	Definice
GAPLA	Aktivita luciferázy SLR vyjadřující aktivitu promotéru GAPDH
IL8LA	Aktivita luciferázy SLO vyjadřující aktivitu promotéru IL-8
nIL8LA	IL8LA / GAPLA
Ind-IL8LA	nIL8LA buněk THP-G8 exponovaných chemickým látkám / nIL8LA neexponovaných buněk

▼**M8**

Zkratky	Definice
Inh-GAPLA	GAPLA buněk THP-G8 exponovaných chemickým látkám / GAPLA neexponovaných buněk
CV05	Nejnižší koncentrace chemické látky, při níž je Inh-GAPLA < 0,05.

11. Jsou k dispozici technické parametry (PS) (15), které usnadní validaci pozměněných zkoušek luciferázy IL-8 *in vitro* obdobných analýze IL-8 Luc a umožní včas provést změnu pokynu OECD 442E, aby do ní mohly být zahrnuty. Vzájemné uznávání údajů podle postupu OECD (MAD) bude zaručeno pouze u zkoušek validovaných podle těchto technických parametrů, pokud tyto zkoušky byly podrobeny revizi a pokud je OECD zahrnula do pokynu ke zkoušení 442E (16).

PROKÁZÁNÍ ZPŮSOBILOSTI

12. Před rutinním používáním zkoušky popsané v tomto dodatku ke zkušební metodě B.71 by měly laboratoře prokázat odbornou způsobilost použitím 10 látek pro prokazování způsobilosti, které jsou uvedeny v dodatku 3.3, a to v souladu s osvědčenými postupy pro metody *in vitro* (17). Uživatelé zkoušky by si také měli vést historickou databázi údajů pocházejících ze zkoušek reaktivity (viz odstavec 15) a z pozitivních kontrol a kontrol s rozpouštědlem/vehikulem (viz odstavce 21–24) a používat tato data na potvrzení, že v jejich laboratoři je udržována reprodukovatelnost zkoušky v čase.

POSTUP

13. Jsou k dispozici standardní pracovní postupy pro analýzu IL-8 Luc a měly by být používány pro provádění této zkoušky (18). Laboratoře, jež chtějí tuto zkoušku provádět, mohou získat rekombinantní buněčnou linii výkonnostních standardů od společnosti GPC Lab. Co. Ltd., Tottori, Japonsko po uzavření smlouvy o prodeji materiálu (MTA) v souladu s podmínkami uvedenými ve vzoru OECD. Dále je uveden popis hlavních složek a postupů analýzy.

Příprava buněk

14. Při provádění analýzy IL-8 Luc by se měla používat buněčná linie THP-G8 od společnosti GPC Lab. Co. Ltd., Tottori, Japonsko (viz odstavce 8 a 13). Buňky se po obdržení pomnoží (2–4 pasáže) a skladují se zmrazené jako homogenní kmen. Buňky z této zásoby mohou být pasážovány maximálně 12krát nebo maximálně 6 týdnů. K množení se používá kultivační médium RPMI-1640 obsahující 10 % fetálního bovinního séra (FBS), antibiotický/antimykotický roztok (100 jednotek/ml penicilinu G, 100 µg/ml streptomycinu a 0,25 µg/ml amfotericinu B v 0,85 % fyziologickém roztoku) (např. GIBCO kat. č. 15240-062), 0,15 µg/ml Puromycinu (např. CAS:58-58-2) a 300 µg/ml G418 (např. CAS:108321-42-2).

15. Než se buňky použijí pro zkoušení, je třeba zjistit, zda jsou vhodné, provedením kontroly reaktivity. Tato kontrola se provádí 1–2 týdny nebo 2–4 pasáže po rozmrazení za použití pozitivní kontroly, 4-nitrobenzyl-bromidu (4-NBB) (CAS:100-11-8, čistota ≥ 99 %) a negativní kontroly, kyseliny mléčné (LA) (CAS:50-21-5, čistota ≥ 85 %). 4-NBB by měl dát pozitivní odpověď na Ind-IL8LA (≥ 1,4), zatímco kyselina mléčná by měla dát negativní odpověď na Ind-IL8LA (< 1,4). Pro analýzu se používají pouze buňky, které prošly kontrolou reaktivity. Kontrola se provádí podle postupů popsaných v odstavcích 22–24.

▼M8

16. Pro zkoušení se buňky THP-G8 nasadí v hustotě 2 až 5 × 10^5 buněk/ml a předběžně se kultivují v kultivačních baňkách po dobu 48 až 96 hodin. V den zkoušky se buňky získané z kultivační baňky promyjí RPMI-1640 s obsahem 10 % FBS bez jakýchkoli antibiotik a poté resuspendují s RPMI-1640 s obsahem 10 % FBS bez jakýchkoli antibiotik při 1 × 10^6 buněk/ml. Poté se buňky rozdělí do 96jamkové destičky s plochým dnem (např. Costar kat. č. 3603) s 50 µl (5 × 10^4 buněk/jamka).

Příprava zkoušené chemické látky a kontrolních látek

17. Zkoušená chemická látka a kontrolní látky se připraví v den zkoušení. Pro analýzu IL-8 Luc se zkoušené chemické látky rozpustí v X-VIVO™ 15, komerčně dostupném médiu bez séra (Lonza, 04-418Q), na konečnou koncentraci 20 mg/ml. X-VIVO™ 15 se přidá do 20 mg zkoušené chemické látky (bez ohledu na rozpustnost chemické látky) ve zkumavce do mikroodstředivky a doplní se na objem 1 ml a poté se silně odstředí a promíchává na rotoru při maximální rychlosti 8 ot/min. po dobu 30 minut při okolní teplotě přibližně 20 °C. Pokud jsou pevné chemické látky stále nerozpustné, zkumavka se poté vloží do ultrazvukové lázně, dokud se chemická látka zcela nerozpustí nebo dokud není stabilně dispergována. U zkoušených chemických látek, které jsou rozpustné v X-VIVO™ 15, se roztok naředí přípravkem X-VIVO™ 15 faktorem 5 a použije jako zásobní roztok X-VIVO™ 15 zkoušené chemické látky (4 mg/ml). U zkoušených chemických látek, které nejsou rozpustné v X-VIVO™ 15, se směs opět promíchává po dobu alespoň 30 minut, poté se odstředí při 15000 ot/min (≈ 20000 *g*) po dobu 5 minut; výsledný supernatant se použije jako zásobní roztok X-VIVO™ 15 zkoušené chemické látky. Pro použití jiných rozpouštědel, jako je DMSO, voda nebo kultivační médium, je třeba uvést vědecké zdůvodnění. Podrobný postup rozpuštění chemických látek je uveden v dodatku 3.5. Roztoky X-VIVO™ 15 popsané v odstavcích 18–23 se smíchají 1: 1 (obj.) s buněčnými suspenzemi připravenými ve 96jamkové destičce s plochým dnem (viz odstavec 16).

18. Cílem prvního provedení zkoušky je stanovit cytotoxickou koncentraci a zkoumat potenciál chemických látek senzibilizovat kůži. Pomocí X-VIVO™ 15 se připraví sériově naředěné zásobní roztoky X-VIVO™ 15 zkoušených chemických látek při faktoru ředění dva (viz dodatek 3.5) s použitím 96jamkového zkušebního bloku (např. Costar kat. č. EW-01729-03). Poté se 50 µl/jamku naředěného roztoku přidá do 50 µl buněčné suspenze v 96jamkové černé destičce s plochým dnem. Pro zkoušené chemické látky, které jsou rozpustné v X-VIVO ™ 15, bude tedy konečná koncentrace zkoušených chemický látek v rozsahu od 0,002 do 2 mg/ml (dodatek 3.5). Pro zkoušené chemické látky, které nejsou rozpustné v X-VIVO ™ 15 při 20 mg/ml, se stanoví pouze faktory ředění v rozsahu od 2 do 2^{10}, přestože jsou skutečné konečné koncentrace zkoušených chemických látek nejisté a závisí na saturované koncentraci zkoušených chemických látek v zásobním roztoku X-VIVO ™ 15.

19. Při dalších provedeních zkoušky (tj. druhý, třetí a čtvrtý replikát) se zásobní roztoky X-VIVO™ 15 připraví při koncentraci čtyřikrát vyšší, než je koncentrace životaschopnosti buněk 05 (CV05; nejnižší koncentrace, při níž je Inh-GAPLA < 0,05) v prvním experimentu. Jestliže Inh-GAPLA neklesne při prvním provedení zkoušky pod 0,05 při nejvyšší koncentraci, zásobní roztok X-VIVO™ 15 se připraví v nejvyšší koncentraci při prvním provedení zkoušky. Koncentrace CV05 se vypočítá vydělením koncentrace zásobního roztoku v prvním provedení zkoušky faktorem ředění pro CV05 (X) (faktor ředění CV05 (X); faktor ředění potřebný pro naředění zásobního roztoku na CV05) (viz dodatek 3.5). Pro zkoušené látky, které nejsou rozpustné v X-VIVO při 20 mg/ml, se CV05 určí podle koncentrace zásobního roztoku × 1/X. Pro provedení zkoušky 2 až 4 se připraví druhý zásobní roztok jako 4 × CV05 (dodatek 3.5).

▼M8

20. Připraví se sériově naředěné druhé zásobní roztoky X-VIVO™ 15 při faktoru ředění 1,5 s použitím 96jamkového zkušebního bloku. Poté se 50 µl/jamku naředěného roztoku přidá do 50 µl buněčné suspenze v jamkách 96jamkové černé destičky s plochým dnem. Každá koncentrace každé zkoušené chemické látky by měla být testována ve 4 jamkách. Vzorky se poté míchají na třepačce a inkubují po dobu 16 hodin při 37°C a 5 % CO_2 a poté se změří aktivita luciferázy, jak je popsáno níže.

21. Kontrola s rozpouštědlem je směs 50 µl/jamku X-VIVO™ 15 a 50 µl/jamku buněčné suspenze v RPMI-1640 s obsahem 10 % FBS.

22. Doporučená pozitivní kontrola je 4-NBB. 20 mg 4-NBB se připraví ve zkumavce do mikroodstředivky o objemu 1,5 ml a doplní se přípravkem X-VIVO™ 15 na objem 1 ml. Zkumavka se silně odstředí a promíchává na rotoru při maximální rychlosti 8 ot/min. po dobu alespoň 30 minut. Po odstředění při 20000 g po dobu 5 minut se supernatant naředí faktorem 4 přípravkem X-VIVO™ 15 a 500 µl naředěného supernatantu se přenese do jamky 96jamkového zkušebního bloku. Naředěný supernatant se dále naředí přípravkem přípravkem X-VIVO™ 15 při faktoru 2 a 4 a 50 µl roztoku se přidá do 50 µl buněčné suspenze THP-G8 v jamkách 96jamkové černé destičky s plochým dnem (dodatek 3.6). Každá koncentrace pozitivní kontroly by měla být testována ve 4 jamkách. Destička se míchá na třepačce a inkubuje v CO_2 po dobu 16 hodin (37 °C, 5 % CO_2) a poté se změří aktivita luciferázy, jak je popsáno odstavci 29.

23. Doporučená negativní kontrola je kyselina mléčná. 20 mg kyseliny mléčné se připraví ve zkumavce do mikroodstředivky o objemu 1,5 ml a doplní se přípravkem X-VIVO™ 15 na objem 1 ml (20 mg/ml). 20 mg/ml roztoku kyseliny mléčné se naředí faktorem 5 přípravkem X-VIVO™ 15 (4 mg/ml); 500 µl tohoto roztoku kyseliny mléčné 4 mg/ml se přenese do jamky 96jamkového zkušebního bloku. Tento roztok se naředí faktorem 2 přípravkem X-VIVO™ 15 a poté se opět naředí faktorem 2, aby vznikly roztoky 2 mg/ml a 1 mg/ml. 50 µl těchto 3 roztoků a kontroly s vehikulem (X-VIVO™ 15) se přidá do 50 µl buněčné suspenze THP-G8 v jamkách 96jamkové černé destičky s plochým dnem. Každá koncentrace negativní kontroly by měla být testována ve 4 jamkách. Destička se míchá na třepačce a inkubuje v CO_2 po dobu 16 hodin (37 °C, 5 % CO_2) a poté se změří aktivita luciferázy, jak je popsáno odstavci 29.

24. Lze použít i jiné vhodné pozitivní nebo negativní kontroly, pokud jsou k dispozici dosavadní údaje umožňující odvodit srovnatelná kritéria přijatelnosti daného provedení zkoušky.

25. Mělo by se dbát na to, aby nedošlo k vypařování těkavých zkoušených chemických látek a ke vzájemné kontaminaci zkoušenou chemickou látkou mezi jamkami, např. tak, že se destičky před inkubací se zkoušenými chemickými látkami zapečetí.

26. Zkoušené chemické látky a kontrola s rozpouštědlem vyžadují 2 až 4 provedení zkoušky, aby mohla být stanovena pozitivní nebo negativní predikce (viz tabulka 2). Každé opakování se provádí v různý den s čerstvým zásobním roztokem X-VIVO™ 15 zkoušených chemických látek a s nezávisle sklizenými buňkami. Buňky mohou pocházet ze stejné pasáže.

▼M8

Měření aktivity luciferázy

27. Luminiscence se měří pomocí luminometru na 96jamkové destičky vybaveného optickými filtry, např. Phelios (ATTO, Tokyo, Japonsko), Tristan 941 (Berthold, Bad Wildbad, Německo) a ARVO series (PerkinElmer, Waltham, MA, USA). Luminometr musí být kalibrován pro každou zkoušku, aby byla zajištěna reprodukovatelnost (19). Pro tuto kalibraci se dodávají rekombinantní luciferázy emitující oranžovou a červenou.

28. Do každé jamky destičky obsahující buněčnou suspenzi exponovanou nebo neexponovanou chemické látce se přenese 100 µl ohřáté reagencie Tripluc® Luciferase (Tripluc). Destička se protřepává po dobu 10 minut při okolní teplotě přibližně 20°C. Destička se umístí do luminometru a změří se aktivita luciferázy. Bioluminiscence se měří po dobu 3 sekund, a to bez optického filtru (F0) a s optickým filtrem (F1). Při použití alternativního uspořádání, např. v závislosti na modelu použitého luminometru, je třeba uvést zdůvodnění.

29. Z naměřených hodnot se vypočítají parametry pro každou koncentraci, např. IL8LA, GAPLA, nIL8LA, Ind-IL8LA, Inh-GAPLA, střední hodnota ±SD IL8LA, střední hodnota ±SD GAPLA, střední hodnota ±SD nIL8LA, střední hodnota ±SD Ind-IL8LA, střední hodnota ±SD Inh-GAPLA a 95 % konfidenční interval Ind-IL8LA. Definice parametrů použitých v tomto odstavci jsou uvedeny v dodatcích 3.1 a 3.4.

30. Před měřením se zajistí barevné rozlišení u vícebarevných reportérových analýz obvykle pomocí detektorů (luminometr a čtečka destiček) vybavených optickými filtry, jako jsou např. sharp-cut (dlouhovlnné nebo krátkovlnné průchodové) filtry nebo pásmové průchodové filtry. Před zkouškou je třeba kalibrovat prostupové koeficienty filtru pro každou barvu bioluminiscenčního signálu podle dodatku 3.2.

ÚDAJE A PŘEDKLÁDÁNÍ ZPRÁV

Vyhodnocení údajů

31. Kritéria pro pozitivní/negativní rozhodnutí vyžadují, aby při každém provedení zkoušky:

— byla predikce při analýze IL-8 Luc určena jako pozitivní, jestliže má zkoušená chemická látka Ind-IL8LA ≥ 1,4 a dolní limit 95 % konfidenčního intervalu Ind-IL8LA ≥ 1,0,

— byla predikce při analýze IL-8 Luc určena jako negativní, jestliže má zkoušená chemická látka Ind-IL8LA < 1,4 a/nebo dolní limit 95 % konfidenčního intervalu Ind-IL8LA < 1,0.

Predikční model

32. Zkoušené chemické látky, které dávají dva pozitivní výsledky z 1., 2., 3. nebo 4. provedení zkoušky, jsou určeny jako pozitivní, zatímco zkoušené chemické látky, které dávají tři negativní výsledky z 1., 2., 3. nebo 4. provedení zkoušky, jsou určeny jako pravděpodobně negativní (tabulka 2). Z pravděpodobně negativních chemických látek jsou chemické látky, které se rozpouštějí při 20 mg/ml X-VIVO™ 15, určeny jako negativní, zatímco chemické látky, které se nerozpouštějí při 20 mg/ml X-VIVO™ 15, by neměly být brány v úvahu (obrázek 1).

▼M8

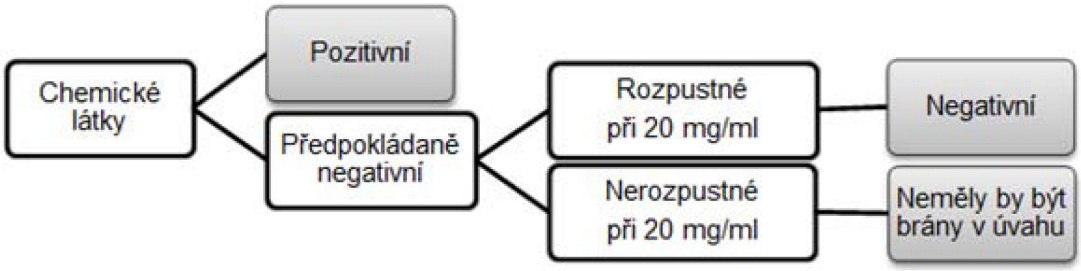
Tabulka 2

Kritéria pro identifikaci pozitivních a pravděpodobně negativních látek

1. provedení	2. provedení	3. provedení	4. provedení	Konečná predikce
pozitivní	pozitivní	–	–	pozitivní
	negativní	pozitivní	–	pozitivní
		negativní	pozitivní	pozitivní
			negativní	pravděpodobně negativní
negativní	pozitivní	pozitivní	–	pozitivní
		negativní	pozitivní	pozitivní
			negativní	pravděpodobně negativní
	negativní	pozitivní	pozitivní	pozitivní
			negativní	pravděpodobně negativní
		negativní	–	pravděpodobně negativní

Obrázek 1

Predikční model pro konečné posouzení



Kritéria přijatelnosti

33. Při použití zkoušky IL-8 Luc by měla být splněna tato kritéria přijatelnosti:

— Ind-IL8LA by mělo být větší než 5,0 alespoň v jedné koncentraci pozitivní kontroly, 4-NBB, při každém provedení zkoušky.

— Ind-IL8LA by mělo být menší než 1,4 při jakékoli koncentraci negativní kontroly, kyselina mléčná, při každém provedení zkoušky.

— Údaje z destiček, kde je GAPLA kontrolních jamek s buňkami a přípravkem Tripluc, ale bez chemických látek menší než pětinásobek této hodnoty jamek obsahujících pouze zkoušené médium (50 µl/jamku RPMI-1640 s obsahem 10 % FBS a 50 µl/jamku X-VIVO™ 15), se vyřadí.

— Údaje z destiček, kde je Inh-GAPLA všech koncentrací zkoušené chemické látky nebo kontrolních chemických látek menší než 0,05, se vyřadí. V takovém případě by měla být první zkouška zopakována, tak aby byla nejvyšší konečná koncentrace opakované zkoušky stejná jako nejnižší konečná koncentrace předchozí zkoušky.

▼M8

ZÁVĚREČNÁ ZPRÁVA

34. Závěrečná zpráva by měla obsahovat tyto informace:

Zkoušené chemické látky

Jednosložková látka:

— chemická identifikace, např. název (názvy) IUPAC nebo CAS, číslo (čísla) CAS, kód SMILES nebo InChI, strukturní vzorec a/nebo jiné identifikátory,

— fyzický vzhled, rozpustnost ve vodě, molekulová hmotnost a další důležité fyzikálně-chemické vlastnosti, v rozsahu, v jakém jsou tyto informace dostupné,

— čistota, případně chemická identita nečistot, je-li to prakticky proveditelné atd.,

— případné ošetření před zkoušením (např. zahřívání, mletí),

— rozpustnost v X-VIVO^{TM} 15. U chemických látek, které jsou nerozpustné v X-VIVO^{TM} 15, zda je po odstředění pozorována sraženina nebo flotace,

— zkušební koncentrace,

— podmínky skladování a stabilita, v rozsahu, v jakém jsou tyto informace dostupné,

— zdůvodnění volby rozpouštědla/vehikula pro každou zkoušenou chemickou látku, jestliže nebyl použit X-VIVO^{TM} 15.

Vícesložková látka, UVCB a směs:

— charakterizovaná v co možná největší míře např. chemickou identitou (viz výše), čistotou, kvantitativním výskytem a důležitými fyzikálně-chemickými vlastnostmi (viz výše) složek, v rozsahu, v jakém jsou tyto informace dostupné,

— fyzický vzhled, rozpustnost ve vodě a další důležité fyzikálně-chemické vlastnosti, v rozsahu, v jakém jsou tyto informace dostupné,

— molekulová hmotnost nebo zdánlivá molekulová hmotnost v případě směsí/polymerů se známým složením nebo jiné informace důležité pro provedení studie,

— případné ošetření před zkoušením (např. zahřívání, mletí),

— rozpustnost v X-VIVO^{TM} 15. U chemických látek, které jsou nerozpustné v X-VIVO^{TM} 15, zda je po odstředění pozorována sraženina nebo flotace,

— zkušební koncentrace,

— podmínky skladování a stabilita, v rozsahu, v jakém jsou tyto informace dostupné,

— zdůvodnění volby rozpouštědla/vehikula pro každou zkoušenou chemickou látku, jestliže nebyl použit X-VIVO^{TM} 15.

Kontroly

Pozitivní kontrola:

— chemická identifikace, např. název (názvy) IUPAC nebo CAS, číslo (čísla) CAS, kód SMILES nebo InChI, strukturní vzorec a/nebo jiné identifikátory,

— případně fyzický vzhled, rozpustnost ve vodě, molekulová hmotnost a další důležité fyzikálně-chemické vlastnosti, v rozsahu, v jakém jsou tyto informace dostupné,

▼**M8**

— čistota, případně chemická identita nečistot, je-li to prakticky proveditelné atd.,

— případné ošetření před zkoušením (např. zahřívání, mletí),

— zkušební koncentrace,

— podmínky skladování a stabilita, v rozsahu, v jakém jsou tyto informace dostupné,

— odkaz na případné dosavadní výsledky pozitivních kontrol prokazující vhodnost kritérií přijatelnosti.

Negativní kontrola:

— chemická identifikace, např. název (názvy) IUPAC nebo CAS, číslo (čísla) CAS a/nebo jiné identifikátory,

— čistota, případně chemická identita nečistot, je-li to prakticky proveditelné atd.,

— fyzický vzhled, molekulová hmotnost a další důležité fyzikálně-chemické vlastnosti v případě použití jiných negativních kontrol, než které jsou uvedeny v tomto pokynu, a to v rozsahu, v jakém jsou tyto informace dostupné,

— podmínky skladování a stabilita, v rozsahu, v jakém jsou tyto informace dostupné,

— zdůvodnění volby rozpouštědla pro každou zkoušenou chemickou látku.

Zkušební podmínky

— jméno a adresa zadavatele, zkušebního zařízení a vedoucího studie,

— popis použité zkoušky,

— použitá buněčná linie, podmínky skladování a zdroj (např. zařízení, z něhož byla získána),

— číslo šarže a původ FBS, jméno dodavatele, číslo šarže 96jamkové černé destičky s plochým dnem a číslo šarže reagencie Tripluc,

— číslo pasáže a hustota buněk použitých ke zkoušení,

— metoda počítání buněk použitá při jejich nasazování před zkoušením a opatření přijatá k zajištění homogenní distribuce počtu buněk,

— použitý luminometr (např. model), včetně nastavení přístroje, použitý substrát pro luciferázu a prokázání přiměřeného měření luminiscence na základě kontrolního testu, který je popsán v dodatku 3.2,

— postup použitý pro prokázání způsobilosti laboratoře k provádění této zkoušky (např. zkoušením vhodných látek) nebo pro prokázání reprodukovatelného provedení této zkoušky v průběhu doby.

Zkušební postup

— počet replikátů a počet provedení zkoušky,

— koncentrace zkoušených chemických látek, postup aplikace a doba expozice (pokud se liší od doporučených),

▼**M8**

— popis použitých hodnotících kritérií a kritérií rozhodování,

— popis použitých kritérií přijatelnosti studie,

— popis jakýchkoli změn zkušebního postupu.

Výsledky

— měření IL8LA a GAPLA,

— výpočty pro nIL8LA, Ind-IL8LA a Inh-GAPLA,

— 95 % konfidenční interval Ind-IL8LA,

— graf zobrazující křivky dávka-odpověď pro indukci aktivity luciferázy a životaschopnost,

— případně popis jakýchkoli jiných důležitých zjištění z pozorování.

Diskuse o výsledcích

— diskuse o výsledcích získaných za pomoci analýzy IL-8 Luc,

— diskuse o výsledcích analýzy v rámci IATA, jsou-li k dispozici jiné příslušné informace.

Závěr

LITERATURA

(1) Takahashi T, Kimura Y, Saito R, Nakajima Y, Ohmiya Y, Yamasaki K, and Aiba S. (2011). An *in vitro* test to screen skin sensitizers using a stable THP-1-derived IL-8 reporter cell line, THP-G8. Toxicol Sci 124:359-69.

(2) OECD (2017). Validation report for the international validation study on the IL-8 Luc assay as a test evaluating the skin sensitizing potential of chemicals conducted by the IL-8 Luc Assay. Series on Testing and Assessment No 267, ENV/JM/MONO(2017)19. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Dostupné na webových stránkách: http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm.

(3) OECD (2017). Report of the Peer Review Panel for the IL-8 Luciferase (IL-8 Luc) Assay for *in vitro* skin sensitisation. Series on Testing and Assessment No 258, ENV/JM/MONO(2017)20. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Dostupné na webových stránkách: http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm.

(4) OECD (2016) Guidance Document On The Reporting Of Defined Approaches And Individual Information Sources To Be Used Within Integrated Approaches To Testing And Assessment (IATA) For Skin Sensitisation, Series on Testing & Assessment No 256, ENV/JM/MONO(2016)29. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Dostupné na webových stránkách: http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm.

(5) van der Veen JW, Rorije E, Emter R, Natsch A, van Loveren H, and Ezendam J. (2014). Evaluating the performance of integrated approaches for hazard identification of skin sensitizing chemicals. Regul Toxicol Pharmacol 69:371-9.

(6) Kimura Y, Fujimura C, Ito Y, Takahashi T, Nakajima Y, Ohmiya Y, and Aiba S. (2015). Optimization of the IL-8 Luc assay as an *in vitro* test for skin sensitization. Toxicol *In Vitro* 29:1816-30.

▼**M8**

(7) Urbisch D, Mehling A, Guth K, Ramirez T, Honarvar N, Kolle S, Landsiedel R, Jaworska J, Kern PS, Gerberick F, et al. (2015). Assessing skin sensitization hazard in mice and men using non-animal test methods. Regul Toxicol Pharmacol 71:337-51.

(8) Ashikaga T, Sakaguchi H, Sono S, Kosaka N, Ishikawa M, Nukada Y, Miyazawa M, Ito Y, Nishiyama N, and Itagaki H. (2010). A comparative evaluation of *in vitro* skin sensitisation tests: the human cell-line activation test (h-CLAT) versus the local lymph node assay (LLNA). Alternatives to laboratory animals: ATLA 38:275-84.

(9) Patlewicz G, Casati S, Basketter DA, Asturiol D, Roberts DW, Lepoittevin J-P, Worth A and Aschberger K (2016) Can currently available non-animal methods detect pre and pro haptens relevant for skin sensitisation? Regul Toxicol Pharmacol, 82:147-155.

(10) Thorne N, Inglese J, and Auld DS. (2010). Illuminating insights into firefly luciferase and other bioluminescent reporters used in chemical biology. Chem Biol 17:646-57.

(11) OECD (2016). Test No 455: Performance-Based Test Guideline for Stably Transfected Transactivation *In Vitro* Assays to Detect Estrogen Receptor Agonists and Antagonists, OECD Publishing, Paris. http://dx.doi.org/10.1787/9789264265295-en.

(12) Viviani V, Uchida A, Suenaga N, Ryufuku M, and Ohmiya Y. (2001). Thr226 is a key residue for bioluminescence spectra determination in beetle luciferases. Biochem Biophys Res Commun 280:1286-91.

(13) Viviani VR, Bechara EJ, and Ohmiya Y. (1999). Cloning, sequence analysis, and expression of active Phrixothrix railroad-worms luciferases: relationship between bioluminescence spectra and primary structures. Biochemistry 38:8271-9.

(14) Nakajima Y, Kimura T, Sugata K, Enomoto T, Asakawa A, Kubota H, Ikeda M, and Ohmiya Y. (2005). Multicolor luciferase assay system: one-step monitoring of multiple gene expressions with a single substrate. Biotechniques 38:891-4.

(15) OECD (2017). Bude vydáno - Performance Standards for the assessment of proposed similar or modified *in vitro* skin sensitisation IL-8 luc test methods. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment. OECD, Paris, France

(16) OECD (2005). Guidance Document the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. OECD Environment, Health and Safety publications, OECD Series on Testing and Assessment No 34. OECD, Paris, France.

(17) OECD (2018). Draft Guidance document: Good *In Vitro* Method Practices (GIVIMP) for the Development and Implementation of *In Vitro* Methods for Regulatory Use in Human Safety Assessment. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Dostupné na webových stránkách: http://www.oecd.org/env/ehs/testing/OECD Final Draft GIVIMP.pdf.

(18) JaCVAM (2016). IL-8 Luc assay protocol, Available at. http://www.jacvam.jp/en_effort/effort02.html.

(19) Niwa K, Ichino Y, Kumata S, Nakajima Y, Hiraishi Y, Kato D, Viviani VR, and Ohmiya Y. (2010). Quantum yields and kinetics of the firefly bioluminescence reaction of beetle luciferases. Photochem Photobiol 86:1046-9.

▼**M8**

(20) OECD (2012). The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins, Part 1: Series on Testing and Assessment No. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 168. OECD, Paris, France.

(21) United Nations (2015). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Sixth revised edition. New York & Geneva: United Nations Publications. ISBN: 978-92-1-117006-1. Dostupné: na webových stránkách: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html.

▼M8

Dodatek 3.1

DEFINICE

Přesnost: přesnost shody mezi výsledky zkoušky a přijatými referenčními hodnotami. Je to míra funkčnosti zkoušky a jeden z aspektů její relevantnosti. Tento výraz se často používá namísto výrazu soulad a rozumí se jím podíl správných výsledků zkoušky (16).

AOP (mechanismy nežádoucích účinků): sled událostí od chemické struktury cílové chemické látky nebo skupiny podobných chemických látek přes molekulární iniciační událost po účinek *in vivo*, který je předmětem zájmu (20).

Chemická látka: látka nebo směs.

CV05: životaschopnost buněk 05, tj. minimální koncentrace, při níž vykazují chemické látky méně než 0,05 Inh-GAPLA.

FInSLO-LA: zkratka, která se používá ve validační zprávě a v předchozích publikacích týkajících se analýzy IL-8 Luc na označení Ind-IL8LA. Viz Ind-IL8LA, kde je uvedena definice.

GAPLA: luciferázová aktivita stabilní luciferázové červeně (SLR) (λmax = 630 nm), regulované promotérem GAPDH, která prokazuje životaschopnost buněk a počet životaschopných buněk.

Nebezpečnost: základní charakteristika látky nebo situace, která má potenciál vyvolat nepříznivé účinky, jsou-li organismus, systém nebo (sub)populace vystaveny této látce.

IATA (jednotný přístup ke zkoušení a posuzování): strukturovaný přístup používaný pro zjišťování nebezpečnosti (potenciál), charakterizaci rizik (potence) a/nebo posouzení bezpečnosti (potenciál/potence a expozice) chemické látky nebo skupiny chemických látek, jenž strategicky integruje a váží všechny důležité údaje s cílem poskytnout informace pro přijetí regulačního rozhodnutí, které se týká potenciální nebezpečnosti a/nebo rizika a/nebo potřeby dalšího cíleného, a tudíž minimálního zkoušení.

II-SLR-LA: zkratka, která se používá ve validační zprávě a v předchozích publikacích týkajících se analýzy IL-8 Luc na označení Inh-GAPLA. Viz Inh-GAPLA, kde je uvedena definice.

IL-8 (Interleukin-8): cytokin derivovaný z endotelových buněk, fibroblastů, keratinocytů, makrofágů a monocytů, který vyvolává chemotaxi neutrofilů a T-lymfocytů.

IL8LA: luciferázová aktivita stabilní luciferázové oranžové (SLO) (λmax = 580 nm), regulované promotérem IL-8.

Ind-IL8LA: násobná indukce nIL8LA. Stanoví se vydělením nIL8LA buněk THP-G8 exponovaných chemickým látkám touto hodnotou nestimulovaných buněk THP-G8 a představuje indukci aktivity promotéru IL-8 chemickými látkami.

Inh-GAPLA: inhibice GAPLA. Stanoví se vydělením GAPLA buněk THP-G8 exponovaných chemickým látkám touto hodnotou neexponovaných buněk THP-G8 a představuje cytotoxicitu chemických látek.

Minimální prahová hodnota indukce (MIT): nejnižší koncentrace, při níž chemická látka splňuje pozitivní kritéria.

▼M8

Směs: směs nebo roztok složený ze dvou nebo více látek.

Jednosložková látka: látka definovaná svým kvantitativním složením, v níž je přítomna jedna hlavní složka v míře alespoň 80 % hmot.

Vícesložková látka: látka definovaná svým kvantitativním složením, v níž je přítomna více než jedna z hlavních složek v koncentraci ≥ 10 % hmot. a < 80 % hmot. Vícesložková látka je výsledkem výrobního procesu. Rozdíl mezi směsí a vícesložkovou látkou spočívá v tom, že směs se získá smísením dvou nebo více látek bez chemické reakce. Vícesložková látka je výsledkem chemické reakce.

nIL8LA: aktivita luciferázy SLO vyjadřující aktivitu promotéru IL-8 (IL8LA) normalizovaná aktivitou luciferázy SLR vyjadřující aktivitu promotéru GAPDH (GAPLA). Představuje aktivitu promotéru IL-8 po zohlednění životaschopnosti buněk nebo počtu buněk.

nSLO-LA: zkratka, která se používá ve validační zprávě a v předchozích publikacích týkajících se analýzy IL-8 Luc na označení nIL8LA. Viz nIL8LA, kde je uvedena definice.

Pozitivní kontrola: replika obsahující všechny složky zkušebního systému a látku, o níž je známo, že způsobuje pozitivní reakci. Aby se zajistilo, že proměnlivost v reakci na pozitivní kontrolu bude možné časem vyhodnotit, rozsah pozitivní reakce by neměl být nadměrný.

Prehapteny: chemické látky, z nichž se abiotickou transformací staly senzibilizující látky.

Prohapteny: chemické látky vyžadující enzymatickou aktivaci, aby vykazovaly potenciál senzibilizace kůže.

Relevantnost: popis vztahu zkoušky k účinku, který je předmětem zájmu, a také toho, zda je zkouška smysluplná a použitelná pro konkrétní účel. Vyjadřuje, do jaké míry zkouška správně měří nebo predikuje biologický účinek, který je předmětem zájmu. Relevantnost zahrnuje také posouzení přesnosti (shody) zkoušky (16).

Spolehlivost: měření rozsahu, v jakém může být zkouška časem reprodukovatelná v laboratořích a mezi laboratořemi, když se provádí s použitím stejného protokolu. Hodnotí se to výpočtem laboratorní a mezilaboratorní reprodukovatelnosti a laboratorní opakovatelnosti (16).

Provedení zkoušky: jedna či více zkoušených chemických látek se zkouší současně s kontrolou s rozpouštědlem/vehikulem a s pozitivní kontrolou.

Citlivost: podíl všech pozitivních/aktivních chemických látek, které jsou na základě zkoušky správně zatříděny. Je to měřítko přesnosti zkušební metody, která dává kategorické výsledky, a je důležitým prvkem při hodnocení relevance zkušební metody (16).

SLO-LA: zkratka, která se používá ve validační zprávě a v předchozích publikacích týkajících se analýzy IL-8 Luc na označení IL8LA. Viz IL8LA, kde je uvedena definice.

▼M8

SLR-LA: zkratka, která se používá ve validační zprávě a v předchozích publikacích týkajících se analýzy IL-8 Luc na označení GAPLA. Viz GAPLA, kde je uvedena definice.

Kontrola s rozpouštědlem/vehikulem: neexponovaný vzorek obsahující všechny složky zkušebního systému s výjimkou zkoušené chemické látky, ale včetně rozpouštědla/vehikula, které se používá. Používá se ke stanovení účinku na pozadí u vzorků exponovaných zkoušené chemické látce, která je rozpuštěna nebo stabilně dispergována ve stejném rozpouštědle/vehikulu. Pokud se vzorek zkouší souběžnou kontrolou s médiem, ukazuje také, zda rozpouštědlo/vehikulum vzájemně reaguje se zkušebním systémem.

Specifičnost: podíl všech negativních/neaktivních chemických látek, které jsou na základě zkušební metody správně zatříděny. Je to měřítko přesnosti zkušební metody, která dává kategorické výsledky, a je důležitým prvkem při hodnocení relevance zkušební metody (16).

Látka: chemický prvek a jeho sloučeniny v přírodním stavu nebo získané výrobním procesem včetně všech přídatných látek nutných k uchování stability výrobku a všech nečistot vznikajících v použitém procesu, ale s vyloučením všech rozpouštědel, která je možno oddělit bez ovlivnění stability látky nebo změny jejího složení.

Smáčedlo: nazývané též povrchově aktivní látka je látka jako např. detergent, která je schopna snížit povrchové napětí kapaliny a umožnit jí vytvářet pěnu nebo pronikat do pevných látek; je též známa jako sufraktant. (TG437)

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

THP-G8: reportérova buněčná linie IL-8, která se používá při analýze IL-8 Luc. Lidská buněčná linie THP-1 podobná makrofágům byla transfekována geny luciferázy SLO a SLR pod kontrolou promotéru IL-8, respektive GAPDH.

Globálně harmonizovaný systém klasifikace a označování chemických látek Organizace spojených národů (GHS OSN): systém navrhující klasifikaci chemických látek (látek a směsí) podle standardizovaných typů a úrovní fyzikálních, zdravotních a environmentálních nebezpečí a řešící příslušné komunikační prvky, jako jsou piktogramy, signální slova, výroky o nebezpečí, výroky o bezpečnostních opatřeních a bezpečnostní datové listy, které obsahují informace o jejich nežádoucích účincích s ohledem na ochranu lidí (včetně zaměstnavatelů, dělníků, přepravců, spotřebitelů a osob reagujících na havárie) a životního prostředí (21).

UVCB: látky s neznámým nebo proměnlivým složením, komplexní reakční produkty nebo biologický materiál.

Validovaná zkušební metoda: zkouška, u níž se má za to, že je dostatečně relevantní a spolehlivá pro určitý účel, a která je založena na vědecky spolehlivých zásadách. Zkouška není nikdy validovaná v absolutním smyslu, ale pouze pro určitý konkrétní účel.

▼**M8**

Dodatek 3.2

PRINCIP MĚŘENÍ AKTIVITY LUCIFERÁZY A STANOVENÍ PROSTUPOVÝCH KOEFICIENTŮ OPTICKÉHO FILTRU PRO SLO A SLR

Multireportérový analytický systém Tripluc se může používat s luminometrem na mikrodestičky s vícebarevným detekčním systémem, který může zahrnovat optický filtr (např. Phelios AB-2350 (ATTO), ARVO (PerkinElmer), Tristar LB941 (Berthold)). Optický filtr použitý při měření je dlouhovlnný nebo krátkovlnný průchodový filtr 600–620 nm nebo pásmový průchodový filtr 600–700 nm.

Měření Dvoubarevných Luciferáz S Optickým Filtrem.

V tomto příkladu se používá přístroj Phelios AB-2350 (ATTO). Tento luminometr je vybaven dlouhovlnným průchodovým filtrem 600 nm (R60 HOYA Co., 600 nm LP, filtr 1) pro rozdělení luminiscence SLO (λmax = 580 nm) a SLR (λmax = 630 nm).

Pro stanovení prostupových koeficientů filtru 600 nm LP se nejprve pomocí purifikovaných enzymů luciferázy SLO a SLR změří i) SLO a intenzita bioluminiscence SLR bez filtru (F0), ii) intenzita bioluminiscence SLO a SLR, která prošla přes filtr 600 nm LP (filtr 1), a iii) vypočítají se prostupové koeficienty filtru 600 nm LP pro SLO a SLR uvedené níže.

Prostupové koeficienty		Zkratka	Definice
SLO	filtr 1 prostupové koeficienty	κO_{R60}	prostupový koeficient filtru u SLO
SLR	filtr 1 prostupové koeficienty	κR_{R60}	prostupový koeficient filtru u SLR

Když je ve zkušebním vzorku definována intenzita SLO a SLR jako O, respektive R, i) je intenzita světla bez filtru (celooptický) F0 a ii) intenzita světla, které prochází přes filtr 600 nm LP (filtr 1) F1 popsána, jak je uvedeno níže.

$F0 = O + R$

$F1 = \kappa O_{R60} \times O + \kappa R_{R60} \times R$

Tyto vzorce lze vyjádřit takto:

$$\begin{pmatrix} F0 \\ F1 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1 & 1 \\ \kappa O_{R60} & \kappa R_{R60} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} O \\ R \end{pmatrix}$$

Poté můžete pomocí vypočtených činitelů prostupnosti (κO_{R60} a κR_{R60}) a změřených hodnot F0 a F1 vypočítat hodnoty O a R takto:

$$\begin{pmatrix} O \\ R \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1 & 1 \\ \kappa O_{R60} & \kappa R_{R60} \end{pmatrix}^{-1} \begin{pmatrix} F0 \\ F1 \end{pmatrix}$$

▼M8

Materiál a metody pro stanovení činitele prostupnosti

1) *Reagencie*

Jednotlivé purifikované luciferázové enzymy:

lyofilizovaný purifikovaný enzym SLO

lyofilizovaný purifikovaný enzym SLR

(které byly pro validaci získány od společnosti GPC Lab. Co. Ltd., Tottori, Japonsko s buněčnou linií THP-G8)

Zkušební reagencie:

zkušební reagencie Tripluc® Luciferase (např. od společnosti TOYOBO kat. č. MRA-301)

Médium: pro analýzu luciferázy (30 ml, uchováváno při 2–8°C)

reagencie	konc.	konečná konc. v médiu	potřebné množství
RPMI-1640	–	–	27 ml
FBS	–	10 %	3 ml

2) *Příprava enzymatického roztoku*

Lyofilizovaný purifikovaný enzym luciferázy rozpusťte ve zkumavce s 200 µl 10 ~ 100 mM Tris/HCl nebo Hepes/HCl (pH 7,5 ~ 8,0) a doplňte 10 % (objemové hmotnosti) glycerolu, enzymatický roztok rozdělte po 10 µl do jednorázových zkumavek o objemu 1,5 ml a uložte je do mrazničky při –80°C. Zmrazený enzymatický roztok můžete používat po dobu 6 měsíců. Při použití přidejte do každé zkumavky obsahující enzymatický roztok (naředěný enzymatický roztok) 1 ml média pro analýzu luciferázy (RPMI-1640 s 10 % FBS) a uložte je na led, abyste zabránili deaktivaci.

3) *Měření bioluminiscence*

Rozmrazte zkušební reagencii Tripluc® Luciferase (Tripluc) a nechte ji při pokojové teplotě ve vodní lázni nebo při teplotě okolního vzduchu. Luminometr zapněte 30 minut před zahájením měření, aby se stabilizoval fotonásobič. Přeneste 100 µl naředěného enzymatického roztoku do černé 96jamkové destičky (s plochým dnem) (referenční vzorek SLO do jamek B1, B2, B3, referenční vzorek SLR do jamek D1, D2, D3). Poté napipetujte 100 µl předem ohřátého přípravku Tripluc do každé jamky destičky obsahující naředěný enzymatický vzorek. Pomocí třepačky protřepávejte destičku po dobu 10 minut při pokojové teplotě (přibližně 25°C). Pokud se v roztoku v jamkách objeví bublinky, odstraňte je. Destičku vložte do luminometru a změřte aktivitu luciferázy. Bioluminiscence se měří po dobu 3 sekund, a to bez optického filtru (F0) a s optickým filtrem (F1).

Prostupové koeficienty optického filtru byly vypočteny takto:

Prostupový koeficient (SLO (κO_{R60})) = (#B1 z F1+ #B2 z F1+ #B3 z F1) / (#B1 z F0+ #B2 z F0+ #B3 z F0)

▼**M8**

Prostupový koeficient (SLR (κR_{R60})) = (#D1 z F1+ #D2 z F1+ #D3 z F1) / (#D1 z F0+ #D2 z F0+ #D3 z F0)

Vypočítané prostupové faktory se použijí pro všechna měření prováděná pomocí stejného luminometru.

KONTROLA KVALITY VYBAVENÍ

Použijí se postupy uvedené v protokolu k analýze IL-8 Luc (18).

▼**M8**

Dodatek 3.3

LÁTKY PRO PROKÁZÁNÍ ZPŮSOBILOSTI

Dříve než začnou laboratoře běžně používat zkoušku popsanou v tomto dodatku ke zkušební metodě B.71, měly by prokázat odbornou způsobilost získáním předpokládané předpovědi analýzy IL-8 Luc u 9 vhodných látek doporučených v tabulce 1 a získáním hodnot, které spadají do příslušného referenčního rozpětí, u nejméně 8 z 9 vhodných látek (zvolených tak, aby zastupovaly celý rozsah odpovědí pro rizika senzibilizace kůže). Dalšími kritérii výběru bylo, aby látky byly komerčně dostupné, aby k nim byly k dispozici kvalitní referenční údaje *in vivo* a také kvalitní údaje *in vitro* získané analýzou IL-8 Luc. Pro analýzu IL-8 Luc jsou také k dispozici zveřejněné referenční údaje (6) (1).

Tabulka 1

Doporučené látky pro prokázání odborné způsobilosti k provádění analýzy IL-8 Luc

Látky pro prokázání způsobilosti	č. CAS	Skupenství	Rozpustnost v X-VIVO15 při 20 mg/ml	Předpověď *in vivo* (1)	Predikce podle IL-8 Luc (2)	Referenční rozpětí (µg/ml) (3)	
						CV_{05} (4)	IL-8 Luc MIT (5)
2,4-dinitrochlorbenzen	97-00-7	pevná látka	nerozpustná	senzibilizující (extrémně)	pozitivní	2,3–3,9	0,5–2,3
formaldehyd	50-00-0	kapalina	rozpustná	senzibilizující (silně)	pozitivní	9–30	4–9
2-sulfanylbenzothiazol	149-30-4	pevná látka	nerozpustná	senzibilizující (středně silně)	pozitivní	250–290	60–250
ethylendiamin	107-15-3	kapalina	rozpustná	senzibilizující (středně silně)	pozitivní	500–700	0,1–0,4
ethylenglykol-dimethakrylát	97-90-5	kapalina	nerozpustná	senzibilizující (slabě)	pozitivní	> 2000	0,04–0,1
4-allylanizol (estragol)	140-67-0	kapalina	nerozpustná	senzibilizující (slabě)	pozitivní	> 2000	0,01–0,07
streptomycin sulfát	3810-74-0	pevná látka	rozpustná	není senzibilizující	negativní	> 2000	> 2000
glycerol	56-81-5	kapalina	rozpustná	není senzibilizující	negativní	> 2000	> 2000
Propan-2-ol	67-63-0	kapalina	rozpustná	není senzibilizující	negativní	> 2000	> 2000

Zkratky: Číslo CAS = registrační číslo Chemical Abstracts Service
(1) Potence *in vivo* je odvozena s použitím kritérií navržených střediskem ECETOC (19).
(2) Na základě dosavadních pozorovaných hodnot (1) (6).
(3) CV_{05} a IL-8 Luc MIT byly vypočteny pomocí rozpustnosti ve vodě uvedené v EPI Suite™.
(4) CV_{05}: minimální koncentrace, při níž vykazují chemické látky méně než 0,05 Inh-GAPLA.
(5) MIT: nejnižší koncentrace, při níž chemická látka splňuje pozitivní kritéria.

▼M8

Dodatek 3.4

INDEXY A KRITÉRIA POSUZOVÁNÍ

nIL8LA (nSLO-LA)

Pro IL8LA (SLO-LA), respektive GAPLA (SLR-LA) se měří j-té opakování (j = 1–4) i-té koncentrace (i = 0–11). Normalizovaná IL8LA, označovaná nIL8LA (nSLO-LA), je definována jako:

$nIL8LA_{ij} = IL8LA_{ij}/GAPLA_{ij}$

Je to základní jednotka měření v této analýze.

Ind-IL8LA (FInSLO-LA)

Násobné zvýšení zprůměrované nIL8LA (nSLO-LA) pro opakování i-té koncentrace v porovnání s touto hodnotou při koncentraci 0, Ind-IL8LA je primárním měřítkem této analýzy. Tento poměr se zapisuje pomocí následující rovnice:

$$\mathrm{Ind-IL8LA_i} = \left\{(1/4) \times \sum_{j} \mathrm{nIL8LA_{ij}}\right\} / \left\{(1/4) \times \sum_{j} \mathrm{nIL8LA_{0j}}\right\}$$

Vedoucí laboratoř navrhla, aby pozitivnímu výsledku pro zkoušenou chemickou látku odpovídala hodnota 1,4. Tato hodnota vychází ze studia dosavadních údajů vedoucí laboratoře. Tým pro správu dat poté používal tuto hodnotu ve všech fázích validační studie. Primární výsledek, Ind-IL8LA, je podíl dvou aritmetických průměrů, jak ukazuje rovnice.

95 % Konfidenční Interval (95 % CI)

Může být odhadnut 95 % konfidenční interval (95 % CI) na základě podílu, který ukazuje přesnost tohoto primárního výsledného měřítka. Dolní limit 95 % CI ≥ 1 ukazuje, že nIL8LA v i-té koncentraci je významně větší než tato hodnota při kontrole s rozpouštědlem. 95 % CI lze sestavit několika způsoby. V této studii jsme použili metodu známou jako Fiellerův teorém. Tento teorém 95 % konfidenčního intervalu se získá z následujícího vzorce:

$$\left[\frac{-B - \sqrt{B^2 - 4AC}}{2A}, \frac{-B + \sqrt{B^2 - 4AC}}{2A}\right],$$

kde .

$$A = \bar{x}_0^2 - t_{0.975(v)}^2 \times \frac{sd_0^2}{n_0}$$

$$B = -2 \times \bar{x} \times \bar{y}$$

$$C = \bar{y}_i^2 - t_{0.975(v)}^2 \times \frac{sd_{yi}^2}{n_{yi}}, \text{ and } n_0 = 4$$

$\bar{x}_0 = (1/n_0) \times \sum_j nIL8LA_{0j}$

▼**M8**

$sd_0^2 = \{1/(n_0 - 1)\} \times \sum_j (nIL8LA_{0j} - \overline{x}_0)^2$

$n_{yi} = 4$

$\overline{y}_i = (1/n_{yi}) \times \sum_j (nIL8LA_{ij})$

$sd_{yi}^2 = \{1/(n_{yj} - 1)\} \times \sum_j (nIL8LA_{ij} - \overline{y}_i)^2$

je 97,5 percentil centrálního t rozdělení s ν stupněmi volnosti, kde

$$\nu = \left(\frac{sd_0^2}{n_0} + \frac{sd_{yi}^2}{n_{yi}}\right) / \left\{ \left(\frac{sd_0^2}{n_0}\right)^2 / (n_0 - 1) + \left(\frac{sd_{yi}^2}{n_{yi}}\right) / (n_{yi} - 1) \right\}.$$

Inh-GAPLA (II-SLR-LA)

Inh-GAPLA je poměr zprůměrované GAPLA (SLR-LA) pro opakování i-té koncentrace v porovnání s koncentrací u kontroly s rozpouštědlem a zapisuje se jako

$$Inh - GAPLA_i = \left\{ (1/4) \times \sum_j GAPLA_{ij} \right\} / \left\{ (1/4) \times \sum_j GAPLA_{0j} \right\}.$$

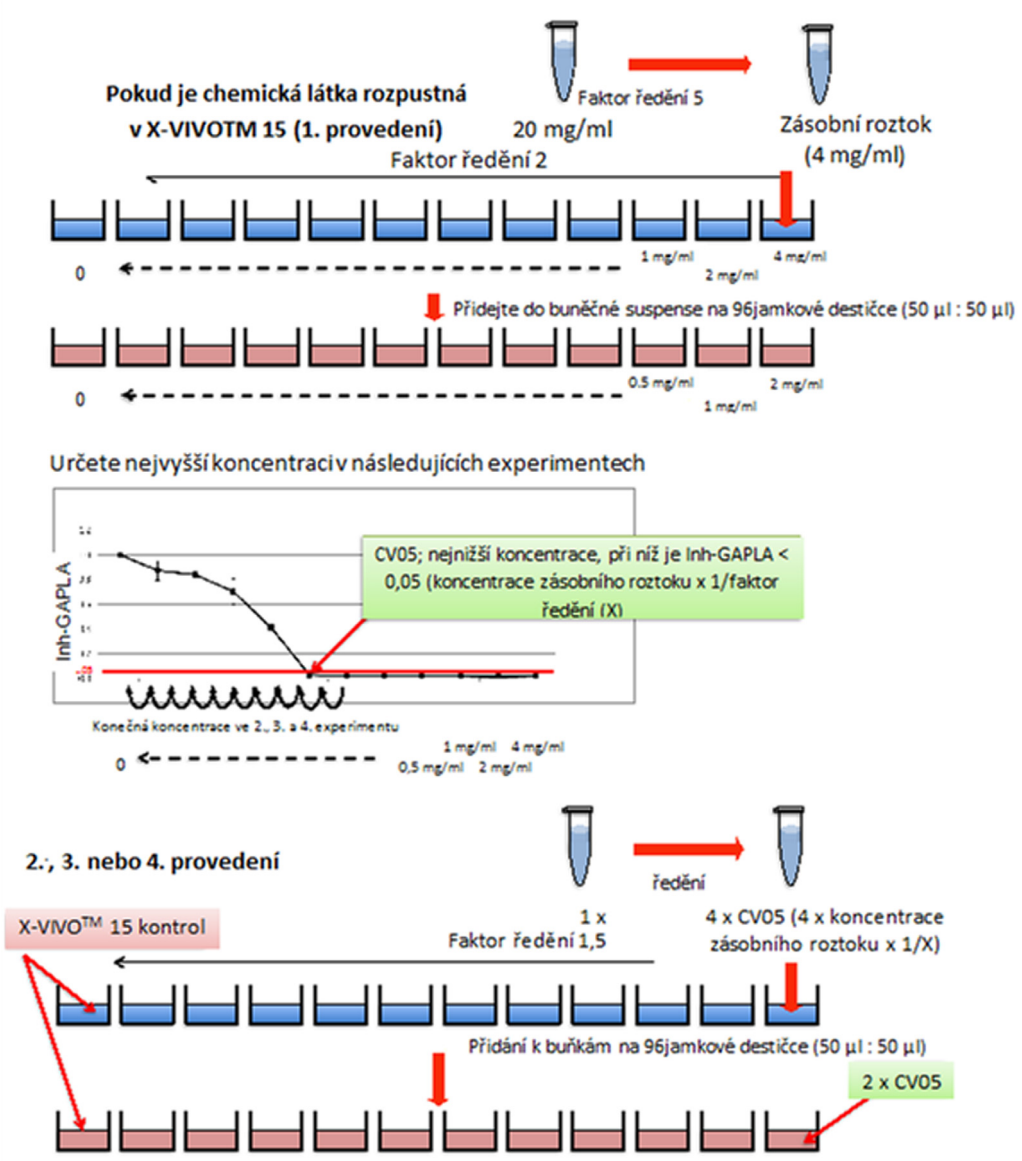
Protože GAPLA je jmenovatelem nIL8LA, působí extrémně malá hodnota velkou odchylku v nIL8LA. Hodnoty Ind-IL8LA s extrémně malou hodnotou Inh-GAPLA (méně než 0,05) mohou být tedy považovány za špatnou přesnost.

▼**M8**

Dodatek 3.5

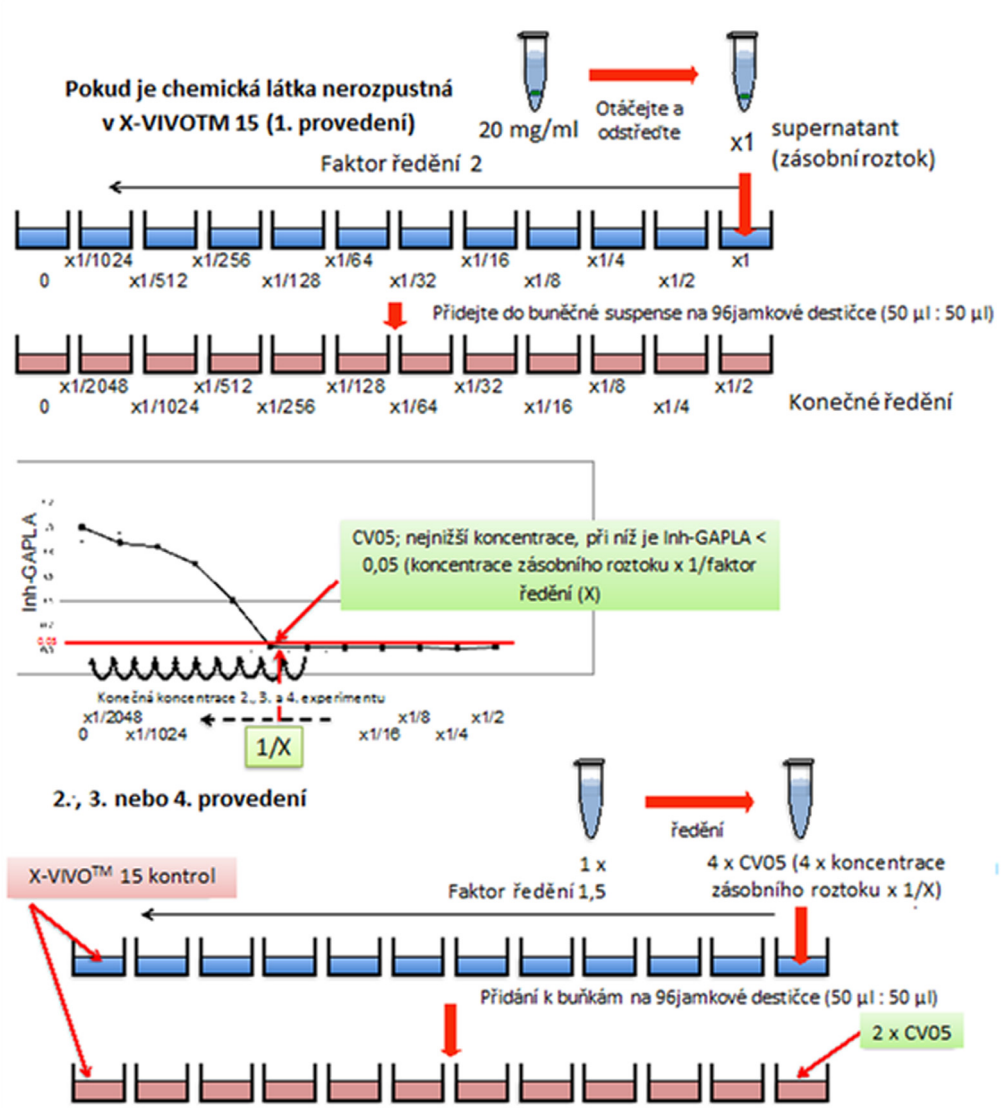
SCHÉMA METOD ROZPOUŠTĚNÍ CHEMICKÝCH LÁTEK PRO ANALÝZU IL-8 LUC.

a) Pro chemické látky rozpustné v X-VIVO™ 15 při 20 mg/ml



▼**M8**

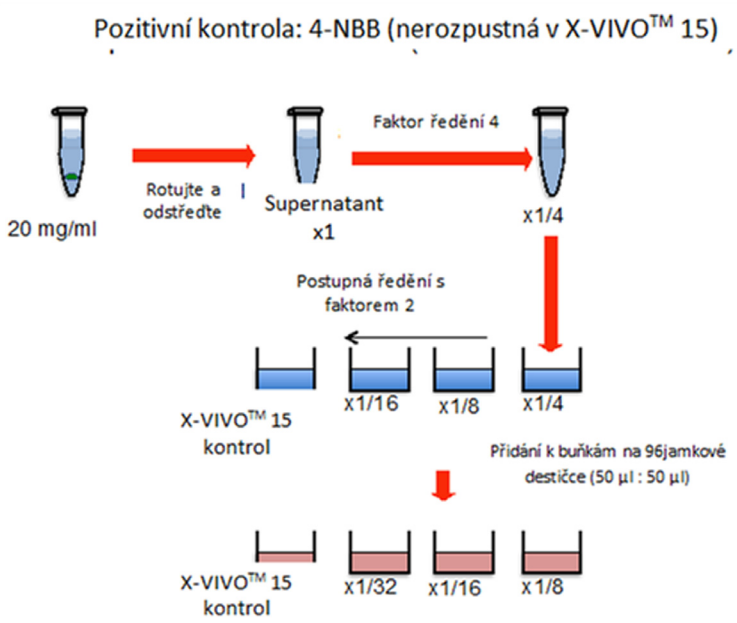
b) Pro chemické látky nerozpustné v X-VIVO™ 15 při 20 mg/ml



▼**M8**

Dodatek 3.6

SCHÉMA METOD ROZPOUŠTĚNÍ 4-NBB PRO POZITIVNÍ KONTROLU ANALÝZY IL-8 LUC.



▼B

ČÁST C: METODY STANOVENÍ EKOTOXICITY

OBSAH

C.1. AKUTNÍ TOXICITA PRO RYBY

C.2. ZKOUŠKA AKUTNÍ IMOBILIZACE DAFNIÍ (*DAPHNIA* SP.)

C.3. ZKOUŠKA INHIBICE RŮSTU SLADKOVODNÍCH ŘAS A SINIC

C.4. STANOVENÍ „SNADNÉ“ BIOLOGICKÉ ROZLOŽITELNOSTI

ČÁST I. OBECNÉ ÚVAHY

ČÁST II. ZKOUŠKA NA ÚBYTEK DOC (Metoda C.4-A)

ČÁST III. MODIFIKOVANÁ SCREENINGOVÁ ZKOUŠKA OECD (Metoda C.4-B))

ČÁST IV. ZKOUŠKA NA UVOLŇOVÁNÍ CO_2 (Metoda C.4-C)

ČÁST V. ZKOUŠKA MANOMETRICKOU RESPIROMETRIÍ (Metoda C.4-D)

ČÁST VI. ZKOUŠKA V UZAVŘENÝCH LAHVIČKÁCH (Metoda C.4-E)

ČÁST VII. ZKOUŠKA MITI (Metoda C.4-F)

C.5. ROZKLAD – BIOCHEMICKÁ SPOTŘEBA KYSLÍKU

C.6. ROZKLAD – CHEMICKÁ SPOTŘEBA KYSLÍKU

C.7. ABIOTICKÝ ROZKLAD – HYDROLÝZA JAKO FUNKCE PH

C.8. TOXICITA PRO ŽÍŽALY

C.9. BIOLOGICKÁ ROZLOŽITELNOST – ZAHN – WELLENSOVA ZKOUŠKA

C.10. SIMULAČNÍ ZKOUŠKA AEROBNÍHO ČIŠTĚNÍ ODPADNÍCH VOD: C.10-A: JEDNOTKY AKTIVOVANÉHO KALU – C.10-B: BIOFILMY

C.11. ZKOUŠKA INHIBICE DÝCHÁNÍ AKTIVOVANÉHO KALU (OXIDACE UHLÍKU A AMONIA)

C.12. BIOLOGICKÁ ROZLOŽITELNOST – MODIFIKOVANÁ ZKOUŠKA SCAS

C.13. BIOAKUMULACE V RYBÁCH: EXPOZICE VE VODNÍM PROSTŘEDÍ A V POTRAVĚ

C.14. RŮSTOVÁ ZKOUŠKA NA NEDOSPĚLÝCH RYBÁCH

C.15. ZKOUŠKA KRÁTKODOBÉ TOXICITY NA RYBÍM EMBRYU A VÁČKOVÉM PLŮDKU

C.16. ZKOUŠKA AKUTNÍ ORÁLNÍ TOXICITY PRO VČELU MEDONOSNOU

C.17. VČELA MEDONOSNÁ – ZKOUŠKA AKUTNÍ KONTAKTNÍ TOXICITY

C.18. STANOVENÍ ADSORPCE/DESORPCE ŠARŽOVITOU ROVNOVÁŽNOU METODOU

▼B

C.19.	ODHAD ADSORPČNÍHO KOEFICIENTU (K_{OU}) PRO PŮDY A ČISTÍRENSKÉ KALY POMOCÍ VYSOKOÚČINNÉ KAPALINOVÉ CHROMATOGRAFIE (HPLC)
C.20.	ZKOUŠKA TOXICITY PRO REPRODUKCI U *DAPHNIA MAGNA*
C.21.	PŮDNÍ MIKROORGANISMY: ZKOUŠKA NA TRANSFORMACI DUSÍKU
C.22.	PŮDNÍ MIKROORGANISMY: ZKOUŠKA NA TRANSFORMACI UHLÍKU
C.23.	AEROBNÍ A ANAEROBNÍ TRANSFORMACE V PŮDĚ
C.24.	AEROBNÍ A ANAEROBNÍ TRANSFORMACE V SYSTÉMECH VODA/SEDIMENT
C.25	AEROBNÍ MINERALIZACE V POVRCHOVÉ VODĚ – SIMULAČNÍ ZKOUŠKA BIOLOGICKÉHO ROZKLADU
C.26.	ZKOUŠKA INHIBICE RŮSTU DRUHŮ *LEMNA*
C.27.	TEST TOXICITY NA CHIRONOMIDAE V SYSTÉMU SEDIMENT-VODA ZA POUŽITÍ OBOHACENÉHO SEDIMENTU
C.28.	TEST TOXICITY NA CHIRONOMIDAE V SYSTÉMU SEDIMENT–VODA ZA POUŽITÍ OBOHACENÉ VODY
C.29.	HODNOCENÍ SNADNÉ BIOLOGICKÉ ROZLOŽITELNOSTI – UVOLŇOVÁNÍ CO_2 V TĚSNĚ UZAVŘENÝCH LAHVIČKÁCH (*HEADSPACE TEST*)
C.30.	BIOAKUMULACE U TERESTRICKÝCH MÁLOŠTĚTINATCŮ
C.31.	ZKOUŠKA SUCHOZEMSKÝCH ROSTLIN: ZKOUŠKA VZCHÁZIVOSTI OSIVA A RŮSTU SEMENÁČKŮ
C.32.	ZKOUŠKA TOXICITY PRO REPRODUKCI ROUPICOVITÝCH
C.33.	ZKOUŠKA TOXICITY PRO REPRODUKCI ŽÍŽAL (*EISENIA FETIDA/EISENIA ANDREI)*
C.34.	STANOVENÍ INHIBICE AKTIVITY ANAEROBNÍCH BAKTERIÍ – SNÍŽENÍ PRODUKCE PLYNŮ Z ANAEROBNĚ ROZKLÁDAJÍCÍHO (ČISTÍRENSKÉHO) KALU
C.35.	ZKOUŠKA TOXICITY PRO ROD *LUMBRICULUS* V SYSTÉMU SEDIMENT-VODA ZA POUŽITÍ SEDIMENTU SE ZNÁMÝM PŘÍDAVKEM ZKOUŠENÉ CHEMICKÉ LÁTKY
C.36.	DRAVÍ ROZTOČI (*HYPOASPIS (GEOLAELAPS) ACULEIFER*): ZKOUŠKA TOXICITY PRO REPRODUKCI V PŮDĚ
C.37.	21DENNÍ ZKOUŠKA NA RYBÁCH: KRÁTKODOBÝ SCREENING ESTROGENNÍ A ANDROGENNÍ AKTIVITY A INHIBICE AROMATÁZY
C.38.	ZKOUŠKA METAMORFÓZY OBOJŽIVELNÍKŮ
C.39.	ZKOUŠKA TOXICITY PRO REPRODUKCI CHVOSTOSKOKŮ V PŮDĚ

▼B

C.40. ZKOUŠKA TOXICITY BĚHEM ŽIVOTNÍHO CYKLU *CHIRONOMIDAE* V SYSTÉMU SEDIMENT-VODA ZA POUŽITÍ OBOHACENÉ VODY NEBO OBOHACENÉHO SEDIMENTU

C.41. ZKOUŠKA POHLAVNÍHO VÝVOJE RYB

C.42. BIOLOGICKÁ ROZLOŽITELNOST V MOŘSKÉ VODĚ

C.43. ANAEROBNÍ BIOLOGICKÁ ROZLOŽITELNOST ORGANICKÝCH LÁTEK VE VYHNILÉM KALU MĚŘENÍM PRODUKCE PLYNU

C.44. VYPLAVOVÁNÍ V PŮDNÍCH SLOUPCÍCH

C.45. ODHAD EMISÍ ZE DŘEVA OŠETŘENÉHO KONZERVAČNÍMI PŘÍPRAVKY DO ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ: LABORATORNÍ METODA PRO VÝROBKY ZE DŘEVA, KTERÉ NEJSOU ZAKRYTÉ A JSOU V KONTAKTU SE SLADKOU NEBO SLANOU VODOU

C.46. BIOAKUMULACE V BENTICKÝCH MÁLOŠTĚTINATCÍCH PŘEBÝVAJÍCÍCH V SEDIMENTECH

C.47. ZKOUŠKA TOXICITY NA RYBÁCH V RANÉM STADIU ŽIVOTA

C.48. KRÁTKODOBÁ ZKOUŠKA PŮSOBENÍ NA REPRODUKCI RYB

C.49. ZKOUŠKA AKUTNÍ TOXICITY NA RYBÍCH EMBRYÍCH (FET)

C.50. ZKOUŠKA TOXICITY NA *MYRIOPHYLLUM SPICATUM* BEZ SEDIMENTU

C.51. ZKOUŠKA TOXICITY NA *MYRIOPHYLLUM SPICATUM* V SYSTÉMU VODA-SEDIMENT

C.52. ROZŠÍŘENÁ JEDNOGENERAČNÍ ZKOUŠKA REPRODUKCE HALANČÍKA JAPONSKÉHO (MEOGRT)

C.53. ANALÝZA RŮSTU A VÝVOJE LAREV OBOJŽIVELNÍKŮ (LAGDA)

▼B

C.1. AKUTNÍ TOXICITA PRO RYBY

1. METODA

1.1. ÚVOD

Účelem této zkoušky je stanovit akutní letální toxicitu látek pro sladkovodní ryby. Pro usnadnění výběru nejvhodnější zkušební metody (statické, semistatické nebo průtokové) s cílem zajistit dostatečně konstantní koncentrace zkoušené látky po celou dobu experimentu je žádoucí mít pokud možno k dispozici data o rozpustnosti látky ve vodě, o tenzi par, chemické stálosti, disociačních konstantách a o biologické rozložitelnosti látky.

Další informace (např. strukturní vzorec, stupeň čistoty, povaha a podíl významných nečistot v procentech, přítomnost a množství přísad a rozdělovací koeficient n-oktanol/voda) je třeba vzít v úvahu při plánování zkoušky i při interpretaci výsledků.

1.2. DEFINICE A JEDNOTKY

Akutní toxicitou se rozumí zřetelný nepříznivý účinek, který je v krátké době (řádově ve dnech) v organismu vyvolán expozicí látce. V této zkoušce se akutní toxicita vyjadřuje prostřednictvím střední letální koncentrace (LC_{50}), tj. takové koncentrace látky ve vodě, která během nepřetržité expozice po určitou dobu způsobí úhyn 50 % jedinců ve zkušební skupině ryb.

Všechny koncentrace zkoušené látky se udávají v hmotnosti na jednotku objemu (mg/l). Mohou se také vyjádřit v hmotnostních podílech ($mg.kg^{-1}$).

1.3. REFERENČNÍ LÁTKY

Zkoušky s referenčními látkami mohou být provedeny s cílem prokázat, že se reakce zkušebních druhů za laboratorních zkušebních podmínek podstatně nezměnila.

Referenční látky nejsou pro tuto zkoušku stanoveny.

1.4. PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

Může být provedena limitní zkouška s koncentrací 100 mg/l, s cílem prokázat, že LC_{50} je vyšší než tato koncentrace.

Ryby se vystaví účinku různým koncentracím zkoušené látky přidané do vody po dobu 96 hodin. Úhyn se zaznamenává nejméně každých 24 hodin a je-li to možné, vypočtou se při každém pozorování koncentrace, které způsobí úhyn 50 % ryb (LC_{50}).

1.5. KRITÉRIA JAKOSTI

Kritéria jakosti se vztahují jak na limitní zkoušku, tak na úplný zkušební postup.

Mortalita v kontrolních skupinách nesmí být na konci zkoušky větší než 10 % (nebo jedna ryba, pokud se použije méně než deset ryb).

Koncentrace rozpuštěného kyslíku musí být po celou dobu zkoušky vyšší než 60 % hodnoty nasycení vzduchem.

▼B

Koncentrace zkoušené látky nesmí po celou zkoušky klesnout pod 80 % původních hodnot koncentrací.

U látek, které se ve zkušebním médiu lehce rozpouštějí a dávají stálé roztoky, tj. v podstatné míře netěkají, nerozkládají se, nehydrolyzují nebo se neadsorbují, lze počáteční koncentraci pokládat za ekvivalentní s nominální koncentrací. Musí být potvrzeno, že byly koncentrace po celou zkoušku udrženy a že kritéria jakosti byla dodržena.

U látek, které:

i) jsou ve zkušebním médiu špatně rozpustné nebo

ii) mohou vytvářet stálé emulze nebo disperse nebo

iii) jsou ve vodných roztocích nestálé,

musí být počáteční koncentrace brána jako koncentrace naměřená v roztoku (nebo, není-li to technicky možné, ve vodním sloupci) na začátku zkoušky. Koncentrace se stanoví po určité době jejího ustálení, avšak před nasazením zkušebních ryb.

Ve všech uvedených případech musí být během zkoušky provedena další měření s cílem potvrdit skutečné expoziční koncentrace nebo dodržení kritérií jakosti.

pH by se nemělo změnit o více než o 1.

1.6. POPIS ZKUŠEBNÍ METODY

Mohou být použity tři postupy:

Statická zkouška:

Zkouška, při níž zkušební roztok neprotéká. (Roztoky se během celé zkoušky nemění.)

Semistatická metoda:

Zkouška, při níž zkušební roztok neprotéká, ale je pravidelně po delších časových úsecích (např. po 24 hodinách) zcela vyměňován.

Průtoková metoda:

Zkouška toxicity, při níž se voda ve zkušebních nádržích neustále obměňuje, přičemž se zkoušená látka přivádí s vodou, kterou se zkušební médium obnovuje.

1.6.1. **Činidla**

1.6.1.1. *Roztoky zkoušených látek*

Zásobní roztoky o požadované koncentraci se připraví rozpuštěním látky v deionizované vodě nebo ve vodě podle bodu 1.6.1.2.

Zvolené zkoušená koncentrace se připraví ředěním zásobního roztoku. Jsou-li zkoušeny vysoké koncentrace látky, lze látku rozpustit přímo v ředicí vodě.

▼B

Látky se obvykle zkouší až do meze jejich rozpustnosti. U některých látek (např. u látek s nízkou rozpustností ve vodě nebo vysokou hodnotou P_{ow}, nebo u látek, které ve vodě vytvářejí spíše stálé disperse než pravé roztoky) je možné provést zkoušku při koncentraci vyšší, než je mez rozpustnosti, aby bylo zajištěno, že je dosaženo maximální koncentrace odpovídající maximální rozpustnosti/stálosti. Je ovšem nutné, aby tato koncentrace jinak nenarušovala zkušební systém (např. vytvořením filmu na hladině bránícího okysličení vody atd.).

Pro přípravu zásobních roztoků látek s nízkou rozpustností ve vodě nebo pro usnadnění rozptýlení látky ve zkušebním médiu lze použít ultrazvukovou dispergaci, organická rozpouštědla či emulgátory nebo dispergátory. Použijí-li se takové pomocné látky, měly by všechny zkušební koncentrace obsahovat stejné množství těchto pomocných látek a stejné koncentraci pomocné látky jako ve zkušebních sériích by měly být exponovány další kontrolní ryby. Koncentrace pomocných látek by měla být minimální a v žádném případě by neměla překročit 100 mg/l zkušebního média.

Zkouška se provede bez úpravy pH. Existují-li známky toho, že dochází k výrazné změně pH, doporučuje se zkoušku opakovat s úpravou pH a výsledky zaznamenat. V takovém případě se upraví pH zásobního roztoku na pH vody k ředění, pokud proti tomu neexistuji specifické důvody. Při úpravě pH se dává přednost HCl a NaOH. Úprava pH se provede tak, aby nebyla koncentrace zkoušené látky v zásobním roztoku v podstatné míře změněna. Dojde-li úpravou ve zkušebním médiu k chemické reakci nebo ke srážení, skutečnosti se zaznamenají.

1.6.1.2. *Voda pro chov ryb a ředění*

Může být použita pitná voda (nekontaminovaná potenciálně škodlivými koncentracemi chloru, těžkých kovů nebo jiných látek), kvalitní přírodní voda nebo upravená voda (viz doplněk 1). Upřednostňuje se voda o celkové tvrdosti od 10 do 250 mg/l (vztaženo na $CaCO_3$) a pH od 6,0 do 8,5.

1.6.2. **Přístroje**

Veškeré přístroje musí být vyrobeny z chemicky inertního materiálu:

— systém pro automatické ředění (pro průtokovou metodu),

— přístroj pro měření koncentrace kyslíku,

— vybavení pro stanovení tvrdosti vody,

— vhodný přístroj pro měření teploty,

— pH-metr.

1.6.3. **Testovací ryby**

Ryby by měly být zdravé a bez zjevných malformací.

▼B

Použitý druh by měl být zvolen podle praktických kritérií, jako je jejich dostupnost po celý rok, snadný chov, vhodnost pro zkoušení, relativní citlivost k chemickým látkám a jakékoli další významné ekonomické a biologické faktory. Při výběru druhu ryb by měla být také zohledněna potřeba srovnatelnosti získaných dat a mezinárodní harmonizace (1).

Seznam doporučených druhů ryb pro provedení této zkoušky je uveden v doplňku 2; dává se přednost druhům danio pruhované a pstruh duhový.

1.6.3.1. *Chov*

Ryby by měly pocházet pokud možno z jednoho chovu a měly by být stejné délky a stejného stáří. Ryby musí být chovány nejméně 12 dní v těchto podmínkách:

Obsádka:

Vhodná vzhledem k metodě (metoda s recirkulací nebo průtoková metoda) a druhu ryb.

Voda:

Viz 1.6.1.2.

Osvětlení:

Osvětlení 12 až 16 hodin denně.

Koncentrace rozpuštěného kyslíku:

Nejméně 80 % hodnoty nasycení vzdušným kyslíkem.

Krmení:

Třikrát týdně nebo jednou za den; vysazení krmení 24 hodin před začátkem zkoušky.

1.6.3.2. *Mortalita*

Po 48hodinové aklimatizaci se zaznamená mortalita a použijí se tato kritéria:

— mortalita vyšší než 10 % populace za 7 dní:

celá obsádka ryb se vyřadí,

— mortalita 5 až 10 % populace:

v chovu se pokračuje dalších 7 dní.

Nedojde-li k dalším případům úhynu, obsádka se použije, v opačném případě musí být vyřazena,

— mortalita menší než 5 % populace:

obsádka je pro zkoušku použitelná.

1.6.4. **Aklimatizace**

Všechny ryby musí být nejméně na 7 dnů před použitím ve zkoušce nasazeny do vody stejné kvality a stejné teploty, jaká se použije při zkoušce.

▼B

1.6.5. **Zkušební postup**

Před vlastní zkouškou může být provedena předběžná zkouška s cílem získat informace o rozsahu koncentrací, které mají být použity v hlavní zkoušce.

Kromě sérií zkoušek se provede kontrolní zkouška bez zkoušené látky a podle potřeby kontrolní zkouška s pomocnou látkou.

V závislosti na fyzikálních a chemických vlastnostech zkoušené látky se zvolí statická, semistatická nebo průtoková zkouška, aby byla splněna kritéria jakosti.

Ryby se exponují zkoušené látce za níže uvedených podmínek:

— délka expozice: 96 hodin,

— počet ryb: nejméně 7 na každou koncentraci,

— nádrže: vhodný objem vzhledem k doporučené obsádce,

— obsádka: pro statickou a semistatickou zkoušku se doporučuje 1,0 g/l; v průtokovém systému je přijatelná vyšší obsádka,

— zkušební koncentrace: nejméně pět koncentrací, které jsou odstupňovány faktorem nepřevyšujícím 2,2 a které pokrývají rozsah mortality od 0 % do 100 %,

— voda: viz 1.6.1.2,

— osvětlení: osvětlení 12 až 16 hodin denně,

— teplota: podle druhu ryb (doplněk 2), avšak v rámci dané zkoušky kolísající v toleranci ± 1 ^{o}C,

— koncentrace rozpuštěného kyslíku: ne nižší než 60 % hodnoty nasycení vzdušným kyslíkem při dané teplotě,

— krmení: žádné.

Ryby se kontrolují po prvních 2 až 4 hodinách a dále nejméně každých 24 hodin. Ryby se považují za mrtvé, jestliže při dotyku ocasní ploutve nedochází k žádné reakci a nejsou-li patrné žádné dýchací pohyby. Mrtvé ryby se odstraní, jakmile jsou zpozorovány, a úhyn se zaznamená. Zaznamenají se všechny zjevné abnormality (např. ztráta rovnováhy, změny v plavání, chování, v dýchací funkci, v pigmentaci atd.).

Měření pH, obsahu rozpuštěného kyslíku a teploty se provádí denně.

Limitní zkouška

S využitím postupů popsaných v této metodě může být provedena limitní zkouška s koncentrací 100 mg/l s cílem prokázat, že LC_{50} je vyšší než tato koncentrace.

Je-li povaha zkoušené látky taková, že ve vodě nelze dosáhnout koncentrace 100 mg/l, provede se limitní zkouška při koncentraci odpovídající rozpustnosti této látky v použitém médiu (nebo při maximální koncentraci, kdy látka vytváří stálou disperzi) (viz také bod 1.6.1.1).

▼B

Limitní zkouška se provede se 7 až 10 rybami a se stejným počtem ryb v kontrole (kontrolách). (Podle teorie binomického rozdělení je při použití 10 ryb a při nulové mortalitě 99,9 % pravděpodobnost, že je LC_{50} větší než 100 mg/l. Při 7, 8 nebo 9 rybách znamená nulová mortalita nejméně 99 % pravděpodobnost, že je LC_{50} větší než koncentrace použitá v limitní zkoušce.)

Dojde-li k úhynům, musí se provést celá studie. Jsou-li pozorovány subletální účinky, zaznamenají se.

2. **DATA A HODNOCENÍ**

Na pravděpodobnostní logaritmický papír se pro každé období, kdy byla prováděna pozorování (24, 48, 72 a 96 hodin), vynese pro každou dobu expozice mortalita v procentech proti koncentraci.

Pokud je to možné, odhadnou se standardními postupy pro každou délku expozice hodnoty LC_{50} a meze spolehlivost ($p = 0,05$); tyto hodnoty se zaokrouhlí na jednu, nebo nejvýše na dvě platné číslice (příklad zaokrouhlení na dvě platné číslice: 173,5 se zaokrouhlí na 170, 0,127 na 0,13, 1,21 na 1,2).

V případech, kdy je sklon křivky závislosti mortality v procentech na koncentraci látky příliš strmý, aby umožnil výpočet hodnoty LC_{50}, postačuje grafický odhad této hodnoty.

Jestliže dvě po sobě jdoucí koncentrace lišící se faktorem 2,2 vyvolají mortalitu 0 a 100 %, jsou dostatečnou informací o tom, že se LC_{50} nachází mezi těmito hodnotami.

Zjistí-li se, že není možné udržet stálost nebo homogenitu zkoušené látky, uvede se to ve zprávě a výsledky se interpretují s opatrností.

3. **ZPRÁVY**

Protokol o zkoušce má pokud možno obsahovat tyto údaje:

— údaje o zkušebních rybách (vědecký název, kmen, dodavatel, veškerá předchozí ošetření, velikost a počet ryb použitých při každé zkušební koncentraci),

— zdroj ředicí vody a hlavní chemické charakteristiky (pH, tvrdost, teplota),

— u látek s malou rozpustností ve vodě údaj o metodě přípravy zásobních a zkušebních roztoků,

— koncentrace všech pomocných látek,

— přehled použitých koncentrací a veškeré dostupné informace o stálosti zkoušené látky ve zkušebním roztoku při použitých koncentracích,

— jestliže byly provedeny chemické analýzy, údaje o použitých metodách a získané výsledky,

— výsledek limitní zkoušky, pokud byla provedena,

— důvody pro volbu použitého zkušebního postupu a podrobnosti o něm (např. statický, semistatický, dávkování, průtoková rychlost, zda byla voda provzdušňována obsádka ryb atd.),

▼B

— popis zkušebního zařízení,

— světelný režim,

— koncentrace rozpuštěného kyslíku, hodnoty pH, teplota zkušebních roztoků každých 24 hodin,

— důkaz, že byla splněna kritéria jakosti,

— tabulka kumulativních hodnot mortality při každé koncentraci a při kontrolní zkoušce (a popřípadě při kontrolní zkoušce s pomocnou látkou) při každé z doporučených dob pozorování,

— graf křivky závislosti účinku, vyjádřeného v procentech, na koncentraci na konci zkoušky,

— podle možnosti hodnoty LC_{50} při každé z doporučených dob pozorování (při 95 % intervalu spolehlivosti),

— použité statistické metody stanovení hodnot LC_{50},

— při použití referenční látky údaj o získaných výsledcích,

— nejvyšší zkušební koncentrace, která nevyvolala za dobu zkoušky úhyn ryb,

— nejnižší zkušební koncentrace, která vyvolala za dobu zkoušky 100 % mortalitu.

4. **LITERATURA**

1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 203, Decision of the Council C(81) 30 final and updates.

2) AFNOR -Determination of the acute toxicity of a substance to *Brachydanio rerio* -Static and Flow Through methods – NFT 90-303 June 1985.

3) AFNOR- Determination of the acute toxicity of a substance to *Salmo gairdneri* -Static and Flow – Through methods – NFT 90-305 June 1985.

4) ISO 7346/1,/2 and/3 -Water Quality -Determination of the acute lethal toxicity of substances to a fresh water fish (*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan -Teleostei, Cyprinidae). Part 1: Static method. Part 2: Semi-static method. Part 3: Flow-through method.

5) Eidgenössisches Department des Innern, Schweiz: Richtlinien fur Probenahme und Normung von Wasseruntersuchungsmethoden – Part II 1974.

6) DIN Testverfahren mit Wasserorganismen, 38 412 (11) und 1 (15).

7) JIS k 0102, Acute toxicity test for fish.

8) NEN 6506- Water -Bepaling van de akute toxiciteit met behulp van *Poecilia reticulata*, 1980.

9) Environmental Protection Agency, Methods for the acute toxicity tests with fish, macroinvertebrates and amphibians. The Committee on Methods for Toxicity Tests with Aquatic Organisms, Ecological Research Series EPA-660-75-009, 1975.

10) Environmental Protection Agency, Environmental monitoring and support laboratory, Office of Research and Development, EPA-600/4-78-012, January 1978.

▼B

11) Environmental Protection Agency, Toxic Substance Control, Part IV, 16 March 1979.

12) Standard methods for the examination of water and wastewater, fourteen edition, APHA-AWWA-WPCF, 1975.

13) Commission of the European Communities, Inter-laboratory test programme concerning the study of the ecotoxicityof a chemical substance with respect to the fish. EEC Study D.8368, 22 March 1979.

14) Verfahrensvorschlag des Umweltbundesamtes zum akuten Fisch-Test. Rudolph, P. und Boje, R. Okotoxikologie, Grundlagen fur die okotoxikologische Bewertung von Umweltchemikalien nach dem Chemikaliengesetz, ecomed 1986.

15) Litchfield, J. T .and Wilcoxon, F., A simplified method for evaluating dose effects experiments, J. Pharm, tExp. Therap., 1949, vol. 96, 99.

16) Finney, D.J. Statistical Methods in Biological Assay. Griffin, Weycombe, U.K., 1978.

17) Sprague, J .B. Measurement of pollutant toxicity to fish. Bioassay methods for acute toxicity. Water Res., 1969, vol. 3, 793–821.

18) Sprague, J.B. Measurement of pollutant toxicity to fish. II Utilising and applying bioassay results. Water Res. 1970, vol. 4, 3–32.

19) Stephan, C.E. Methods for calculating an LC_{50}. In Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation (edited by F.I. Mayer and J.L. Hamelink). American Society for Testing and Materials, ASTM STP 634, 1977, 65–84.

20) Stephan, C.E., Busch, K.A., Smith, R., Burke, J. and Andrews, R.W. A computer program for calculating an LC_{50}. US EPA.

▼B

Doplněk 1

Upravená voda

Příklad vhodné ředicí vody

Všechny chemikálie musí být čistoty p.a.

Voda musí být kvalitní destilovaná nebo deionizovaná s vodivostí menší než 5 μS/cm.

Destilační přístroj nesmí obsahovat žádné měděné části.

Zásobní roztoky

$CaCl_2$. $2H_2O$ (chlorid vápenatý dihydrát) 11,76 g

se rozpustí ve vodě a doplní vodou na 1 litr.

$MgSO_4$. $7H_2O$ (síran hořečnatý heptahydrát) 4,93 g

se rozpustí ve vodě a doplní vodou na 1 litr.

$NaHCO_3$ (hydrogenuhličitan sodný) 2,59 g

se rozpustí ve vodě a doplní vodou na 1 litr.

KCl (chlorid draselný) 0,23 g

se rozpustí ve vodě a doplní vodou na 1 litr.

Upravená ředicí voda

Smísí se po 25 ml všech čtyř zásobních roztoků a doplní vodou na 1 litr.

Provzdušňuje se, dokud koncentrace rozpuštěného kyslíku neodpovídá koncentraci nasycení vzdušným kyslíkem.

pH musí být 7,8 ± 0,2.

Podle potřeby se pH upraví pomocí NaOH (hydroxid sodný) nebo HCl (kyselina chlorovodíková).

Tato ředicí voda se nechá 12 hodin stát a nemusí být dále provzdušňována.

Koncentrace úhrnu iontů Ca a Mg v tomto roztoku je 2,5 mmol/l. Poměr množství iontů Ca: Mg je 4:1 a poměr množství iontů Na:k je 10:1. Celková koncentrace alkalických kovů v tomto roztoku je 0,8 mmol/l.

Jakákoli odchylka v přípravě vody k ředění nesmí změnit složení ani vlastnosti vody.

▼B

Doplněk 2

Druhy ryb doporučené pro zkoušení

Doporučený druh	Doporučený rozsah teplot při zkoušce (°C)	Doporučená celková délka ryb (cm)
Brachydanio rerio (*Teleostei, Cyprinidae*) (Hamilton-Buchanan), danio pruhované	20 až 24	3,0 ± 0,5
Pimephales promelas (*Teleostei, Cyprinidae*) (Rafinesque), střevle	20 až 24	5,0 ± 2,5
Cyprinus carpio (*Teleostei, Cyprinidae*) (Linneaus 1758), kapr obecný	20 až 24	6,0 ± 2,0
Oryzias latipes (*Teleostei, Poeciliidae*) Cyprinodontidae (Tomminck and Schlege 1850), halančík japonský	20 až 24	3,0 ± 1,0
Poecilia reticulata (*Teleostei, Poeciliidae*) (Peters 1859), živorodka duhová	20 až 24	3,0 ± 1,0
Lepomis macrochirus (*Teleostei, Centrarchidae)* (Rafinesque Linneaus 1758), slunečnice modrá	20 až 24	5,0 ± 2,0
Onchorhynchus mykiss (*Teleostei, Salmonidae*) (Walbaum 1988), pstruh duhový	12 až 17	6,0 ± 2,0
Leuciscus idus (*Teleostei, Cyprinidae*) (Linneaus 1758), jelec jesen	20 až 24	6,0 ± 2,0

Opatřování ryb

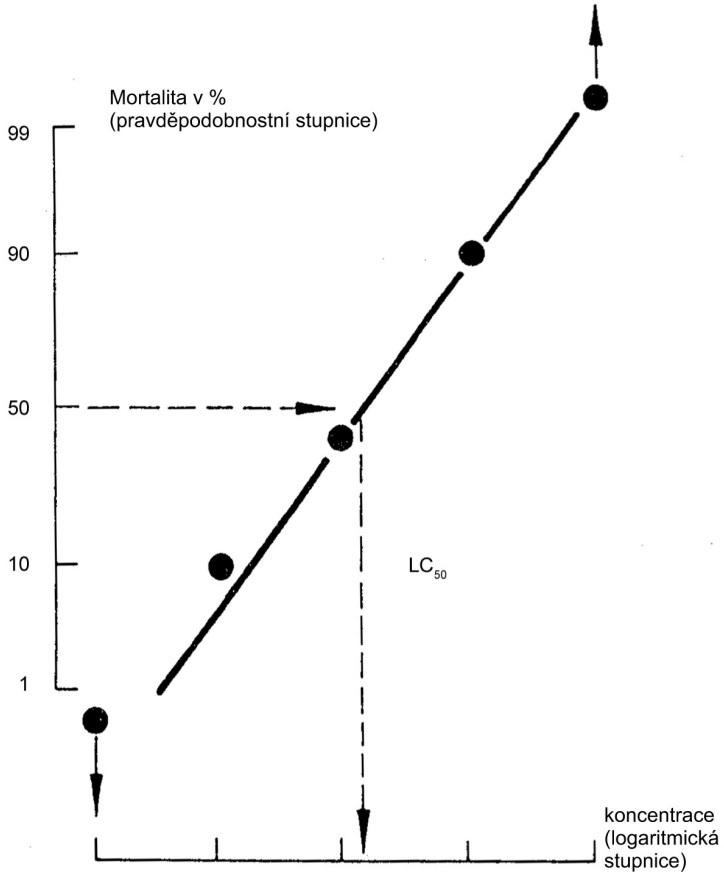
Ryby uvedené v seznamu se snadno chovají nebo jsou dobře dostupné po celý rok. Lze je množit a chovat buď v rybích farmách, nebo v laboratoři za kontrolovaných zdravotních a parazitologických podmínek tak, aby ryby byly zdravé a byly známého původu. Tyto ryby jsou dostupné v mnoha částech světa.

▼B

Doplněk 3

Příklad křivky závislosti mortality, vyjádřené v procentech, na koncentraci

Příklad stanovení LC_{50} na pravděpodobnostním logaritmickém papíru



▼B

C.2. ZKOUŠKA AKUTNÍ IMOBILIZACE DAFNIÍ (*DAPHNIA* SP.)

1. METODA

Tato zkušební metoda akutní imobilizace je ekvivalentní testu OECD TG 202 (2004).

1.1. ÚVOD

Tato metoda popisuje zkoušku akutní toxicity ke stanovení účinku chemických látek na dafnie. Stávající zkušební metody byly užity v největším možném rozsahu (1, 2, 3).

1.2. DEFINICE

V kontextu této metody jsou použity tyto definice:

EC_{50}: je koncentrace odhadnutá pro imobilizaci 50 % dafnií během stanovené expoziční doby. Je-li použita jiná definice, musí to být uvedeno spolu s příslušným odkazem.

Imobilizace: Dafnie neschopné plavat do 15 sekund po mírném zamíchání zkušební nádoby jsou pokládány za imobilizované (a to i když stále ještě mohou hýbat tykadly).

1.3. PRINCIP ZKUŠEBNÍ METODY

Mladé dafnie, staré méně než 24 hodin při zahájení zkoušky, jsou vystaveny zkoušené látce v určitém rozsahu koncentrací po dobu 48 hodin. Imobilizace je zaznamenána po 24 hodinách a po 48 hodinách a porovnána s kontrolními hodnotami. Výsledky jsou analyzovány s cílem vypočíst hodnotu EC_{50} po 48 hodinách (viz definici v oddílu 1.2). Stanovení hodnoty EC_{50} pro 24 hodin je volitelné.

1.4. ÚDAJE O ZKOUŠENÉ LÁTCE

Pro zkoušenou látku by měla být známa rozpustnost ve vodě a tenze par a spolehlivá analytická metoda ke stanovení koncentrace dotyčné látky v zkoušeném roztoku s udanou účinností znovuzáchytu a měly by být dostupné meze stanovení. Užitečné údaje zahrnují strukturní vzorec, čistotu látky, stabilitu ve vodě nebo vůči světlu, rozdělovací koeficient P_{ow} a výsledky zkoušek snadné biologické rozložitelnosti (viz metoda C.4).

Poznámka: Návod pro zkoušení látek s fyzikálně-chemickými vlastnostmi, které činí jejich zkoušení obtížné, je uveden v položce seznamu literatury (4).

1.5. REFERENČNÍ LÁTKY

Hodnoty EC_{50} pro referenční látky mohou být změřeny pro ověření, že zkušební podmínky jsou spolehlivé. K tomuto účelu jsou doporučeny toxické látky použité v mezinárodních mezilaboratorních zkouškách (1, 5) ([1]). Zkoušky s referenčními látkami by měly být prováděny přednostně každý měsíc a nejméně dvakrát ročně.

([1]) Výsledky těchto mezilaboratorních zkoušek a technická oprava normy ISO 6341 udává EC_{50} – 24 hodin pro dvojchroman draselný ($K_2Cr_2O_7$) v rozmezí 0,6 mg/l až 1,7 mg/l.

▼B

1.6. KRITÉRIA JAKOSTI

Platnost zkoušky je podmíněna splněním následujících kritérií:

— při kontrolách, včetně kontroly zahrnující solubilizační činidlo, nesmí být imobilizováno více než 10 % dafnií,

— koncentrace rozpuštěného kyslíku na konci zkoušky musí být ≥ 3 mg/l v kontrolní i ve zkušební nádobě.

Poznámka: Pro první kritérium smí být imobilizováno nebo vykazovat jiné známky choroby nebo stresu, např. odbarvení, neobvyklé chování jako např. zdržování se na povrchu vody, ne více než 10 % kontrolních dafnií.

1.7. POPIS ZKUŠEBNÍ METODY

1.7.1. **Aparatura**

Zkušební nádoby a další aparatura, která přichází do styku se zkoušenými roztoky, by měla být zhotovena ze skla nebo z jiného chemicky inertního materiálu. Zkušebními nádobami běžně budou skleněné zkumavky či kádinky; před každým použitím by měly být umyty standardními laboratorními postupy. Zkušební nádoby by měly být volně překryty ke snížení ztrát vody odparem a k předcházení vnikání prachu do roztoků. Těkavé látky by měly být zkoušeny v plně zaplněných a uzavřených nádobách dostatečně velkých k předcházení příliš nízkým nebo limitním koncentracím kyslíku (viz oddíl 1.6 nebo první odstavec oddílu 1.8.3).

Navíc budou použity některé nebo všechna následující zařízení: kyslíková sonda (s mikroelektrodou nebo jiným vhodným čidlem pro měření koncentrace rozpuštěného kyslíku v nízkoobjemových vzorcích); pH-metr; dostatečný termostat; vybavení pro stanovení koncentrace celkového organického uhlíku (TOC), vybavení pro stanovení chemické spotřeby kyslíku (ChSK); vybavení pro stanovení tvrdosti atd.

1.7.2. **Zkušební organismy**

Preferovaným zkušebním druhem je *Daphnia magna* Straus, ačkoli v této zkoušce lze využívat i další druhy dafnií (např. *Daphnia pulex*). Na začátku zkoušky by dafnie měly být méně než 24 hodin staré a ke snížení rozptylu je silně doporučeno nepoužívat první generaci potomků. Dafnie by měly pocházet ze zdravého matečného rodu (tj. bez příznaků stresu, jako jsou vysoká úmrtnost, přítomnost samců nebo efipií (vajíček dafnií), zpoždění líhnutí prvních potomků, změna barvy organismů atd.). Všechny organismy použité konkrétní zkoušky by měly pocházet z kultur vypěstovaných ze stejného matečného rodu. Tento rod dafnií musí být chován v kultivačních podmínkách (světlo, teplota, médium) podobných podmínkám v použité zkoušce. Má-li být kultivační médium dafnií použité ve zkoušce odlišné od rutinního kultivačního média dafnií, je správnou praxí zařadit předzkouškové aklimatizační období. K tomuto účelu by generace dafnií měla být chována ve zřeďovací vodě při teplotě zkoušky, a to nejméně 48 hodin před začátkem zkoušky.

▼B

1.7.3. **Zásobní voda a zřeďovací voda**

Přírodní voda (povrchová nebo podzemní), rekonstituovaná voda nebo odchlorovaná vodovodní voda je přijatelná jako zásobní a zřeďovací voda, pokud v ní dafnie přežijí po dobu kultivace, aklimatizace a zkoušení bez známek stresu. Jako zkušební voda je přijatelná jakákoli voda, která vyhovuje chemickým vlastnostem přijatelných zřeďovacích vod uvedeným v dodatku 1. Měla by mít stálou jakost během doby zkoušení. Rekonstituovaná voda může být připravena přídavkem určitého množství reagencií uznané analytické čistoty k deionizované nebo destilované vodě. Příklady rekonstituované vody jsou uvedeny v položkách seznamu literatury (1, 6) a v dodatku 2. Důležité je, že média obsahující známá chelatační činidla, např. média M4 a M7 uvedená v dodatku 2, by měla být vyloučena ze zkoušení látek obsahujících kovy. Hodnoty pH by měly ležet v rozmezí 6 až 9. Pro *Daphnia magna* je doporučena tvrdost mezi 140 a 250 mg/l (jako $CaCO_3$), zatímco pro jiné druhy dafnií může být vhodná nižší tvrdost. Zřeďovací voda může být před zkouškou provzdušňována tak, aby koncentrace rozpuštěného kyslíku dosáhla koncentrace nasycení.

Je-li použita přírodní voda, parametry jakosti by měly být měřeny nejméně dvakrát ročně nebo kdykoli vznikne podezření, že se tyto parametry mohly významně změnit (viz předchozí odstavec a dodatek 1). Rovněž by mělo být provedeno stanovení těžkých kovů (např. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni). Je-li použita odchlorovaná vodovodní voda, je žádoucí každodenní analýza chloru. Pochází-li zřeďovací voda ze zdrojů povrchových nebo podzemních vod, měla by být stanovena vodivost a celkový organický uhlík (TOC) nebo chemická spotřeba kyslíku (ChSK).

1.7.4. **Zkoušené roztoky**

Zkoušené roztoky zvolené koncentrace jsou obvykle připraveny ředěním zásobního roztoku. Zásobní roztoky by měly být připraveny přednostně rozpuštěním zkoušené látky ve zřeďovací vodě. Používání rozpouštědel, emulgačních a dispergačních činidel by mělo být podle možností vyloučeno. V některých případech však mohou být takováto činidla nutná k přípravě vhodně koncentrovaného zásobního roztoku. Pokyny k výběru vhodných rozpouštědel, emulgačních a dispergačních činidel jsou uvedeny v položce seznamu literatury (4). V žádném případě by koncentrace zkoušené látky ve zkoušených roztocích neměla překročit rozpustnost ve zřeďovací vodě.

Zkouška by měla být provedena bez úpravy pH. Nezůstane-li pH v rozmezí 6–9, lze provést druhou zkoušku s upraveným pH zásobního roztoku na hodnotu pH zřeďovací vody před přidáním zkoušené látky. Hodnota pH zásobního roztoku by měla být upravena tak, aby se koncentrace zásobního roztoku významně nezměnila a aby nedošlo k žádné chemické reakci se zkoušenou látkou nebo k jejímu vysrážení. Upřednostněny jsou HCl a NaOH.

▼B

1.8. POSTUP

1.8.1. **Podmínky expozice**

1.8.1.1. *Zkoušené skupiny a kontroly*

Zkušební nádoby jsou naplněny vhodným objemem zřeďovací vody a roztoku zkoušené látky. Poměr objemů vzduchu a vody v nádobě by měl být stejný pro zkušební i kontrolní skupinu. Dafnie jsou pak vneseny do zkušební nádoby. Pro každou zkoušenou koncentraci a pro kontroly by mělo být užito přinejmenším 20 organismů, přednostně rozdělených do čtyř skupin s pěti organismy v každé skupině. Na každý organismus by mělo být dáno nejméně 2 ml zkoušeného roztoku (tj. objem 10 ml pro pět dafnií ve zkušební nádobě). Zkouška může proběhnout semistaticky doplňováním roztoku nebo v průtočném systému, pokud koncentrace zkoušené látky není stabilní.

Navíc k expoziční řadě musí být provedena jedna řada kontrol zřeďovací vody, a je-li to relevantní, tak též kontrolní řada obsahující solubilizační činidlo.

1.8.1.2. *Zkušební koncentrace*

Nejsou-li dostupné údaje o toxicitě zkoušené látky, lze rozsah koncentrací konečné zkoušky stanovit testem pro stanovení rozsahu. K tomuto účelu jsou dafnie exponovány řadě široce odstupňovaných koncentrací zkoušené látky. Každé zkušební koncentraci by mělo být exponováno pět dafnií po dobu 48 hodin nebo méně, replikace nejsou zapotřebí. Expoziční dobu lze zkrátit (např. na 24 hodin nebo méně), lze-li vhodné údaje pro test ke stanovení rozsahu získat v kratší době.

Mělo by být použito nejméně pět zkušebních koncentrací. Ty by měly tvořit geometrickou řadu s dělícím faktorem přednostně nepřesahujícím 2,2. Použití méně než pěti koncentrací by mělo být zdůvodněno. Nejvyšší zkoušená koncentrace by měla přednostně vést ke 100 % imobilizaci, a nejnižší zkoušená koncentrace by neměla mít žádné pozorovatelné účinky.

1.8.1.3. *Inkubační podmínky*

Teplota by měla být v rozsahu 18 °C až 22 °C, a v každé jednotlivé zkoušce by měla být konstantní v rozpětí ± 1 °C. Doporučen je cyklus 16 hodin světla a 8 hodin temna. Úplná tma je rovněž přijatelná, zejména pro zkoušené látky nestabilní na světle.

Zkušební nádoby nesmí být během zkoušky provzdušňovány. Zkouška probíhá bez úpravy hodnot pH. Během zkoušky by dafnie neměly být krmeny.

1.8.1.4. *Doba trvání zkoušky*

Doba trvání zkoušky je 48 hodin.

1.8.2. **Pozorování**

V každé zkušební nádobě by měl být zkontrolován počet imobilizovaných dafnií po 24 a 48 hodinách po zahájení zkoušky (viz definice v oddílu 1.2). Kromě imobilizace by mělo být uvedeno jakékoli nestandardní chování nebo vzhled.

▼B

1.8.3. **Analytická měření**

Koncentrace rozpuštěného kyslíku a pH jsou měřeny na počátku a na konci zkoušky v kontrolách a u zkoušky při nejvyšší koncentraci zkoušené látky. Koncentrace rozpuštěného kyslíku v kontrolách by měla odpovídat kritériu platnosti (viz oddíl 1.6). Hodnota pH by se neměla standardně v žádné zkoušce změnit o více než 1,5 jednotky. Teplota je obvykle měřena v kontrolních nádobách nebo v okolním ovzduší a měla by být registrována nejlépe nepřetržitě během zkoušky, nebo alespoň na začátku a na konci zkoušky.

Koncentrace zkoušené látky by měla být měřena alespoň při nejvyšší a nejnižší zkoušené koncentraci na začátku a na konci zkoušky (4). Doporučeno je výsledky zakládat na měřených koncentracích. Jsou-li však dostupné důkazy prokazující, že během zkoušky byly koncentrace zkoušené látky uspokojivě udrženy s přesností ± 20 % jmenovité koncentrace nebo z počáteční naměřené koncentrace, lze výsledky zakládat na jmenovitých nebo počátečních změřených hodnotách.

1.9. MEZNÍ ZKOUŠKA

Mezní zkouška může být provedena postupy popsanými v této metodě při koncentraci zkoušené látky 100 mg/l nebo až při její mezní rozpustnosti ve zkoušeném médiu s cílem prokázat, že hodnota EC_{50} je vyšší než tato koncentrace. Mezní zkouška by měla být provedena s 20 dafniemi (přednostně rozdělenými do čtyř skupin po pěti organismech) se stejným počtem v kontrole či v kontrolách. Dojde-li k jakékoli imobilizaci, měla by být provedena úplná studie. Pozorované nestandardní chování by mělo být zaznamenáno.

2. **ÚDAJE**

Údaje by měly být shrnuty v tabulkách, uvádějících pro každou exponovanou skupinu a kontrolu počet použitých a z toho imobilizovaných dafnií pro všechna pozorování. Procentní podíl imobilizovaných dafnií za 24 hodin a za 48 hodin je vynesen proti zkoušeným koncentracím. Údaje jsou analyzovány vhodnými statistickými metodami (např. probit analýzou atd.) k výpočtu směrnice dotyčné křivky dávka – odezva a hodnot EC_{50} s 95 % intervalem spolehlivosti ($p = 0,05$) (7, 8).

Nelze-li ze získaných údajů vypočíst EC_{50} standardními metodami, měla by být hodnota EC_{50} aproximována jako geometrická střední hodnota z nejvyšší koncentrace nezpůsobující žádnou imobilizaci a nejnižší koncentrace způsobující 100 % imobilitu.

3. **ZPRÁVY**

3.1. ZKUŠEBNÍ PROTOKOL

Zkušební protokol musí obsahovat toto:

Zkoušená látka:

— fyzikální povaha, fyzikálně-chemické vlastnosti,

▼B

— chemické identifikační údaje včetně čistoty.

Zkušební druhy:

— zdroj a druhy dafnií *Daphnia*, dodavatel zdroje (je-li znám) a použité kultivační podmínky (včetně zdroje, druhu a množství potravy a frekvence krmení).

Zkušební podmínky:

— popis zkušební nádoby: typ nádoby, objem roztoku, počet dafnií ve zkušební nádobě, počet zkušebních nádob (replikací) při dané koncentraci,

— metody přípravy zásobních a zkoušených roztoků včetně použití jakýchkoli rozpouštědel nebo dispergačních činidel, použité koncentrace,

— podrobné údaje o zřeďovací vodě: zdroj a charakteristiky jakosti vody (pH, tvrdost, poměr Ca/Mg a Na/K, alkalita, vodivost atd.); složení rekonstituované vody, je-li použita,

— inkubační podmínky: teplota, intenzita a periodicita světla, koncentrace rozpuštěného kyslíku, pH atd.

Výsledky:

— počet a procentní podíl dafnií imobilizovaných nebo vykazujících nepříznivé účinky (včetně nestandardního chování) v kontrolách a v každé exponované skupině, v každém pozorovacím čase a popis povahy pozorovaných účinků,

— výsledky a datum zkoušky provedené s referenční látkou, jsou-li dostupné,

— jmenovité zkoušené koncentrace a výsledky všech analýz ke stanovení koncentrace zkoušené látky ve zkušebních nádobách; regenerační účinnost metody a mez stanovení by rovněž měla být uvedena,

— veškerá fyzikálně-chemická měření teploty, pH a koncentrace rozpuštěného kyslíku provedená během zkoušky,

— hodnoty EC_{50} po 48 hodinách pro imobilizaci s uvedením intervalu spolehlivosti a grafů proloženého modelu použitého pro jejich výpočet, směrnice křivek dávka – odezva a jejich standardní odchylka; statistické postupy použité ke stanovení hodnoty EC_{50} (pokud byly měřeny tyto datové položky i pro 24 hodin, měly by být rovněž uvedeny),

— vysvětlení jakýchkoli odchylek od této zkušební metody a případné ovlivnění výsledků těmito odchylkami.

4. **LITERATURA**

1) ISO 6341. (1996). Water quality – Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) – Acute toxicity test. Third edition, 1996.

2) EPA OPPTS 850.1010. (1996). Ecological Effects Test Guidelines – Aquatic Invertebrate Acute Toxicity Test, Freshwater Daphnids.

▼B

3) Environment Canada. (1996) Biological test method. Acute Lethality Test Using *Daphnia* spp. EPS 1/RM/11. Environment Canada, Ottawa, Ontario, Canada.

4) Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environmental Health and Safety Publication. Series on Testing and Assessment. No. 23. Paris 2000.

5) Commission of the European Communities. Study D8369. (1979). Inter-laboratory Test Programme concerning the study of the ecotoxicity of a chemical substance with respect to *Daphnia.*

6) OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Guideline 211: *Daphnia magna* Reproduction Test, adopted September 1998.

7) Stephan C.E. (1977). Methods for calculating an LC_{50}. In Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation (edited by F.I. Mayer and J.L. Hamelink). ASTM STP 634 – American Society for Testing and Materials. s. 65–84.

8) Finney D.J. (1978). Statistical Methods in Biological Assay. 3rd ed. London. Griffin, Weycombe, UK.

▼B

DODATEK 1

NĚKTERÉ CHEMICKÉ CHARAKTERISTIKY PŘIJATELNÉ ZŘEĎOVACÍ VODY

Látka	Koncentrace
Hmotné částice (prach)	< 20 mg/l
Celkový organický uhlík	< 2 mg/l
Volný (neiontový) amoniak	< 1 µg/l
Zbytkový chlor	< 10 µg/l
Celkové organofosforové pesticidy	< 50 ng/l
Celkové organické chlorované pesticidy a polychlorované bifenyly	< 50 ng/l
Celkový organicky vázaný chlor	< 25 ng/l

▼B

DODATEK 2

PŘÍKLADY VHODNÉ REKONSTITUOVANÉ ZKUŠEBNÍ VODY

Zkušební voda ISO (1)

Zásobní roztok (jednotlivé látky)		K přípravě rekonstituované vody přidejte následující objem zásobních roztoků k 1 litru vody (*)
Látka	Navážka přidaná k 1 litru vody (*)	
Chlorid vápenatý $CaCl_2$, $2H_2O$	11,76 g	25 ml
Síran hořečnatý $MgSO_4$, $7H_2O$	4,93 g	25 ml
Hydrouhličitan sodný $NaHCO_3$	2,59 g	25 ml
Chlorid draselný KCl	0,23 g	25 ml

(*) Voda vhodné čistoty, např. deionizovaná, destilovaná nebo čištěná reversní osmosou s vodivostí nepřesahující 10 μS/cm.

Elendtovo médium M7 a M4

Aklimatizace na Elendtova média M4 a M7

V některých laboratořích nastaly potíže s přímým vnášením dafnií do médií M4 a M7. Určitý úspěch však byl dosažen postupnou aklimatizací, tj. s předáním z vlastního média do 30 % Elendtova média, poté do 60 % Elendtova média a nakonec do 100 % Elendtova média. Potřebné délky dob aklimatizace mohou být až měsíc.

Příprava

Stopové prvky

Ve vodě vhodné čistoty, např. v deionizované nebo destilované vodě nebo ve vodě přečištěné reversní osmosou, se nejprve připraví samostatné zásobní roztoky (I) jednotlivých stopových prvků. Z těchto oddělených zásobních roztoků (I) se připraví jeden zásobní roztok (II) obsahující všechny stopové prvky (směsný roztok), tj.:

Zásobní roztoky I (jednotlivá látka)	Množství přidané do vody (mg/l)	Koncentrace (vzhledem k médiu M4)	Kombinovaný zásobní roztok II se připraví přidáním následujícího množství zásobního roztoku I do vody (ml/l)	
			M4	M7
H_3 BO_3	57 190	20 000	1,0	0,25
$MnCl_2$ $4H_2O$	7 210	20 000	1,0	0,25
LiCl	6 120	20 000	1,0	0,25

▼B

Zásobní roztoky I (jednotlivá látka)	Množství přidané do vody (mg/l)	Koncentrace (vzhledem k médiu M4)	Kombinovaný zásobní roztok II se připraví přidáním následujícího množství zásobního roztoku I do vody (ml/l)	
			M4	M7
RbCl	1 420	20 000	1,0	0,25
$SrCl_2$ $6H_2O$	3 040	20 000	1,0	0,25
NaBr	320	20 000	1,0	0,25
Na_2 MoO_4 $2H_2O$	1 230	20 000	1,0	0,25
$CuCl_2$ $2H_2O$	335	20 000	1,0	0,25
$ZnCl_2$	260	20 000	1,0	1,0
$CoCl_2$ $6H_2O$	200	20 000	1,0	1,0
KI	65	20 000	1,0	1,0
Na_2 SeO_3	43,8	20 000	1,0	1,0
NH_4 VO_3	11,5	20 000	1,0	1,0
Na_2 EDTA $2H_2O$	5 000	2 000	—	—
$FeSO_4$ $7H_2O$	1 991	2 000	—	—

Jak roztok Na 2 EDTA, tak roztok $FeSO_4$ se připraví samostatně, spojí se a ihned se autoklávují.

Získají se:

2 l Fe-EDTA roztoku		1 000	20,0	5,0

Média M4 a M7

Média M4 a M7 se připraví ze zásobního roztoku II, makroživin a vitaminů tímto způsobem:

	Množství přidané do vody (mg/l)	Koncentrace (vzhledem k médiu M4)	Množství zásobního roztoku přidané za účelem přípravy média II (ml/l)	
			M4	M7
Zásobní roztok II (obsahující kombinaci stopových prvků)		20	50	50
Zásobní roztok makroživin (jednotlivá látka)				
$CaCl_2 \cdot 2H_20$	293 800	1 000	1,0	1,0
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	246 600	2 000	0,5	0,5
KCl	58 000	10 000	0,1	0,1
$NaHCO_3$	64 800	1 000	1,0	1,0
Na_2 $SiO_3 \cdot 9H_2O$	50 000	5 000	0,2	0,2
$NaNO_3$	2 740	10 000	0,1	0,1
KH_2 PO_4	1 430	10 000	0,1	0,1
K_2HPO_4	1 840	10 000	0,1	0,1

▼B

	Množství přidané do vody (mg/l)	Koncentrace (vzhledem k médiu M4)	Množství zásobního roztoku přidané za účelem přípravy média II (ml/l)	
			M4	M7
Kombinovaný vitaminový zásobní roztok	—	10 000	0,1	0,1
Kombinovaný vitaminový zásobní roztok se připraví přidáním 3 vitaminů do 1 litru vody takto:				
Thiamin-hydrochlorid	750	10 000		
Kyanokobalamin (B_{12})	10	10 000		
Biotin	7,5	10 000		

Kombinovaný vitaminový zásobní roztok se uchovává v malých zmrazených podílech. Vitaminy se přidají do média krátce před použitím.

Poznámka: Vysrážení solí při přípravě kompletního média se zabrání přidáním podílů zásobních roztoků do přibližně 500–800 ml deionizované vody a objem se poté doplní na 1 litr.

Poznámka: Poprvé byly informace o médiu M4 uvedeny v práci Elendt, B. P. (1990). Selenium deficiency in crustacea; an ultrastructual approach to antennal damage in *Daphnia magna* Straus. Protoplasma, 154, 25–33.

▼M6

C.3. ZKOUŠKA INHIBICE RŮSTU SLADKOVODNÍCH ŘAS A SINIC

ÚVOD

1. Tato zkušební metoda je rovnocenná Pokynu OECD pro zkoušení 201 (2006, příloha opravena v roce 2011). Bylo potřebné rozšířit zkušební methodu tak, aby zahrnovala další druhy, a aktualizovat ji, aby splňovala požadavky na posouzení nebezpečnosti a klasifikaci chemických látek. Tato přepracovaná verze byla dokončena na základě rozsáhlých praktických zkušeností, vědeckého pokroku na poli studia toxicity řas a širokého uplatňování příslušných právních předpisů, k němuž došlo od přijetí původního znění.

2. Použité definice jsou uvedeny v dodatku 1.

PODSTATA ZKOUŠKY

3. Účelem této zkoušky je stanovit účinek látky na růst sladkovodních mikrořas a/nebo sinic (*Cyanophyta*). Exponenciálně rostoucí zkušební organismy jsou vystaveny zkoušené chemické látce v sérii kultur obvykle po dobu 72 hodin. Navzdory relativně krátké době trvání zkoušky lze posoudit účinky na několik generací.

4. Systémovou odezvou je snížení růstu v řadě kultur řas (zkušebních jednotek) vystavených různým koncentracím zkoušené látky. Odezva se vyhodnocuje jako funkce expoziční koncentrace v porovnání s průměrným růstem neexponovaných kontrolních kultur použitých k opakování. Pro úplné vyjádření odezvy systému na toxické účinky (optimální citlivost) se kultury ponechají exponenciálně růst bez omezení za podmínek dostatečné výživy a nepřetržitého osvětlení po dostatečnou dobu, aby bylo možné změřit snížení specifické růstové rychlosti.

5. Růst a inhibice (zpomalení) růstu se kvantifikují měřeními biomasy řas jako funkce času. Biomasa řas se definuje jako hmotnost sušiny na objem, např. mg řas/litr zkušebního roztoku. Ovšem hmotnost sušiny se měří obtížně, proto se používají náhradní parametry. Z těchto náhrad se nejčastěji používají počty buněk. Mezi další náhradní parametry patří buněčný objem, fluorescence, optická hustota atd. Je třeba znát přepočítávací faktor mezi naměřeným náhradním parametrem a biomasou.

6. Cílovým ukazatelem zkoušky je inhibice růstu vyjádřená jako logaritmické zvýšení biomasy (průměrná specifická růstová rychlost) během expoziční doby. Z průměrných specifických růstových rychlostí zaznamenaných v řadě zkušebních roztoků se stanoví koncentrace způsobující stanovenou x % inhibici růstové rychlosti (např. 50 %) a vyjádří se jako E_rC_x (např. E_rC_{50}).

7. Další proměnnou odezvy použitou v této zkušební metodě je výtěžek, který může být nezbytný ke splnění specifických právních požadavků v některých zemích. Je definován jako biomasa na konci expoziční doby minus biomasa na počátku expoziční doby. Z výtěžku zaznamenaného v řadě zkušebních roztoků se vypočítá koncentrace způsobující stanovenou x % inhibici výtěžku (např. 50 %) a vyjádří se jako E_yC_x (např. E_yC_{50}).

8. Kromě toho se může statisticky určit nejnižší koncentrace s pozorovaným účinkem (LOEC) a koncentrace bez pozorovaných účinků (NOEC).

▼**M6**

INFORMACE O ZKOUŠENÉ CHEMICKÉ LÁTCE

9. Informace o zkoušené chemické látce, které mohou být užitečné pro účely stanovení podmínek zkoušky, jsou strukturní vzorec, čistota, stálost na světle, stálost za podmínek zkoušky, vlastnosti světelné absorpce, pK_a a výsledky studií transformace, včetně biologické rozložitelnosti ve vodě.

10. Měly by být známy rozpustnost zkoušené chemické látky ve vodě, její rozdělovací koeficient oktanol/voda (P_{ow}) a tlak jejích par; měla by být k dispozici validovaná metoda kvantitativního stanovení látky ve zkušebních roztocích, a to s doloženou výtěžností a mezí detekce.

PLATNOST ZKOUŠKY

11. Má-li být zkouška platná, musí být splněna tato kritéria platnosti:

— Biomasa by se měla v kontrolních kulturách během 72 hodin trvání zkoušky zvýšit exponenciálně, a to nejméně na šestnáctinásobek. To odpovídá specifické růstové rychlosti 0,92.den^{-1}. U nejčastěji používaných druhů je růstová rychlost obvykle podstatně vyšší (viz dodatek 2). Může se stát, že se toto kritérium nesplní, pokud se používají druhy, které rostou pomaleji než druhy uvedené v seznamu v dodatku 2. V takovém případě je třeba prodloužit dobu zkoušky, aby bylo dosaženo nejméně 16násobného nárůstu kontrolních kultur, přičemž růst musí být v průběhu zkoušky exponenciální. Trvání zkoušky lze zkrátit až na minimální dobu 48 hodin, aby se během zkoušky udržel neomezený exponenciální růst, pokud bude dosaženo minimálního násobícího faktoru 16.

— Střední variační koeficient pro specifické růstové rychlosti v jednotlivých obdobích (dny 0–1, 1–2 a 2–3 při 72hodinových zkouškách) v kontrolních kulturách (viz dodatek 1 odstavec „variační koeficient“) nesmí překročit 35 %. Výpočet specifické růstové rychlosti v jednotlivých obdobích je uveden v odstavci 49. Toto kritérium platí pro střední hodnotu variačních koeficientů vypočítaných pro opakované kontrolní kultury.

— Variační koeficient průměrných specifických růstových rychlostí během celého zkušebního období u kontrolních kultur replik nesmí překročit 7 % u zkoušek s *Pseudokirchneriella subcapitata* a *Desmodesmus subspicatus*. U jiných, méně často zkoušených druhů by hodnota neměla překročit 10 %.

REFERENČNÍ CHEMICKÉ LÁTKY

12. Jako prostředek kontroly zkušebního postupu lze zkoušet referenční látku (látky), například 3,5-dichlorfenol použitý v mezinárodní kroužkové zkoušce (1). Dvojchroman draselný lze rovněž použít jako referenční látku pro zelené řasy. Je žádoucí zkoušet referenční látku nejméně dvakrát ročně.

POUŽITELNOST ZKOUŠKY

13. Tato metoda se nejsnáze používá pro látky rozpustné ve vodě, které za podmínek zkoušky pravděpodobně ve vodě zůstanou. Pro zkoušení látek, které jsou těkavé, silně adsorbují, jsou zbarvené, mají nízkou rozpustnost ve vodě nebo látek, které mohou nepříznivě ovlivňovat dostupnost živin či

▼M6

minerálů ve zkušebním médiu, mohou být potřebné určité úpravy popsaného postupu (např. uzavřený systém, klimatizace zkušebních nádob). Pokyny k některým vhodným úpravám jsou uvedeny v literatuře (2, 3 a 4).

POPIS ZKUŠEBNÍ METODY

Přístroje

14. Zkušební nádoby a jiné přístroje, které přijdou do styku se zkušebními roztoky, by měly být celoskleněné nebo vyrobeny z jiného chemicky inertního materiálu. Jednotlivé komponenty musí být pečlivě umyty, aby se zajistilo, že žádné organické nebo anorganické kontaminující látky nebudou rušit růst řas nebo ovlivňovat složení zkušebních roztoků.

15. Zkušební nádoby jsou běžně skleněné baňky takové velikosti, že pojmou dostatečný objem kultury během zkoušky a umožní dostatečný přenos CO_2 z atmosféry (viz odstavec 30). Objem kapaliny musí být dostatečný pro analytická stanovení (viz odstavec 37).

16. Kromě toho bude nezbytné veškeré následující vybavení nebo jeho část:

— Kultivační zařízení: doporučuje se skříň nebo komora, ve které může být udržována zvolená inkubační teplota ± 2 °C.

— Přístroje na měření světla: je důležité mít na paměti, že metoda měření intenzity osvětlení, a zejména typ snímače (kolektoru), může ovlivnit naměřenou hodnotu. Měření by se mělo provádět nejlépe pomocí kulového (4 π) snímače (reaguje na přímé a odražené světlo ze všech úhlů nad a pod rovinou měření), nebo 2 π snímače (reaguje na světlo ze všech úhlů nad rovinou měření).

— Zařízení pro stanovení biomasy řas. Počet buněk, který je nejčastěji používaným náhradním parametrem pro biomasu řas, lze určit pomocí elektronického počítače částic, mikroskopu s počítací komůrkou nebo průtokovým cytometrem. Další náhrady biomasy lze měřit průtokovým cytometrem, fluorimetrem, spektrofotometrem nebo kolorimetrem. Je užitečné vypočítat faktor pro přepočet počtu buněk na hmotnost sušiny. Aby bylo možné zajistit užitečná měření při nízkých koncentracích biomasy za použití spektrofotometru, může být nutné používat kyvety s dráhou světla nejméně 4 cm.

Zkušební organismy

17. Lze použít několik druhů nevázaných mikrořas a sinic. Kmeny uvedené v dodatku 2 se ukázaly jako vhodné při použití zkušebního postupu uvedeného v této zkušební metodě.

18. Jestliže se použijí jiné druhy, je třeba uvést v závěrečné zprávě kmen a/nebo původ. Musí se potvrdit, že lze udržovat exponenciální růst vybraných zkušebních řas po dobu zkoušky za převažujících podmínek.

Růstové médium

19. Doporučují se dvě alternativní růstová média, média OECD a AAP. Složení těchto médií je uvedeno v dodatku 3. Uvědomte si, že počáteční hodnota pH a pufrovací kapacita (regulující zvýšení pH) těchto dvou médií jsou rozdílné. Proto se mohou výsledky zkoušek lišit v závislosti na použitém médiu, zejména při zkoušení ionizujících látek.

▼M6

20. Pro určité účely může být nezbytná úprava růstových médií, např. když se zkoušejí kovy a chelatační činidla nebo když se provádějí zkoušky při různých hodnotách pH. Použití upraveného média musí být podrobně popsáno a zdůvodněno (3, 4).

Počáteční koncentrace biomasy

21. Počáteční biomasa musí být stejná ve všech zkušebních kulturách a dostatečně nízká, aby umožňovala exponenciální růst po celou inkubační dobu bez rizika vyčerpání živin. Počáteční biomasa by neměla překročit 0,5 mg/l pro hmotnost sušiny. Doporučují se následující počáteční koncentrace buněk:

Pseudokirchneriella subcapitata	$5 \times 10^3 – 10^4$ buněk/ml
Desmodesmus subspicatus	$2 – 5 \times 10^3$ buněk/ml
Navicula pelliculosa	10^4 buněk/ml
Anabaena flos-aquae	10^4 buněk/ml
Synechococcus leopoliensis	$5 \times 10^4 – 10^5$ buněk/ml

Koncentrace zkoušené chemické látky

22. Koncentrační rozmezí, ve kterém lze očekávat účinky, lze určit na základě výsledků orientačních zkoušek. Pro závěrečnou hlavní zkoušku je zapotřebí vybrat alespoň pět koncentrací tvořících geometrickou posloupnost s faktorem nepřekračujícím 3,2. U zkoušených látek vykazujících plochou křivku závislosti odezvy na koncentraci může být opodstatněný vyšší faktor. Posloupnosti koncentrací by nejlépe měly pokrývat rozmezí způsobující 5–75 % inhibici růstové rychlosti řas.

Opakování a kontroly

23. Uspořádání zkoušky by mělo zahrnovat tři opakování s každou zkoušenou koncentrací. Jestliže se nepožaduje stanovení NOEC (koncentrace bez pozorovaných účinků), uspořádání zkoušky lze pozměnit tak, že se zvýší počet koncentrací a sníží počet opakování pro příslušnou koncentraci. Počet kontrolních opakování musí být nejméně tři a v ideálním případě by měl být dvojnásobkem počtu opakování používaných pro každou zkoušenou koncentraci.

24. Pro analytická stanovení koncentrací zkoušených chemických látek se může připravit samostatná sada zkušebních roztoků (viz odstavce 36 a 38).

25. Pokud se k rozpouštění zkoušené látky používá rozpouštědlo, musí být do uspořádání zkoušky zahrnuty dodatečné kontroly obsahující rozpouštědlo o stejné koncentraci, jaká se používá v zkušebních kulturách.

Příprava očkovací kultury

26. Pro přizpůsobení zkušebních řas podmínkám zkoušky a zajištění toho, aby řasy byly v exponenciální růstové fázi, když se použijí pro naočkování zkušebních roztoků, se očkovací kultura v zkušebním médiu připravuje 2 až 4 dny před zahájením zkoušky. Biomasu řas je třeba upravit, aby mohl do zahájení zkoušky v očkovací kultuře převážit exponenciální růst. Očkovací kultura se musí inkubovat za stejných podmínek jako zkušební kultury. Měří se nárůst biomasy v očkovací kultuře, aby bylo zajištěno, že je růst

▼M6

v rámci normálního rozmezí pro zkušební kmen za podmínek kultivace. Příklad postupu pro kultivaci řas je popsán v dodatku 4. Aby se předešlo synchronnímu dělení buněk během zkoušky, může být potřebné provést druhý krok propagace očkovací kultury.

Příprava zkušebních roztoků

27. Všechny zkušební roztoky musí obsahovat stejné koncentrace růstového média a počáteční biomasy zkušebních řas. Zkušební roztoky zvolených koncentrací se obvykle připravují smísením zásobního roztoku zkoušené chemické látky s růstovým médiem a očkovací kulturou. Zásobní roztoky se obyčejně připravují rozpuštěním chemické látky ve zkušebním médiu.

28. Jako nosiče pro přidávání látek o nízké rozpustnosti ve vodě do zkušebního média mohou být použita rozpouštědla, např. aceton, terc-butylalkohol a dimethylformamid (2, 3). Koncentrace rozpouštědla by neměla překročit 100 µl/l a do všech kultur (včetně kontrolních) ve zkušební řadě by měla být přidána stejná koncentrace rozpouštědla.

Inkubace

29. Zkušební nádoby se uzavřou zátkami, které propouštějí vzduch. Nádoby se protřepou a umístí do kultivačního zařízení. Během zkoušky je nezbytné udržovat řasy v suspensi a umožnit přenos CO_2. Za tímto účelem je třeba provádět nepřetržité třepání nebo míchání. Kultury je třeba udržovat při teplotě v rozsahu 21 až 24 °C, která je regulována s přesností na ± 2 °C. Pro druhy jiné než uvedené v seznamu v dodatku 2, např. tropické druhy, mohou být vhodné vyšší teploty, pokud je možné splnit kritéria platnosti. Doporučuje se umístit baňky náhodně a denně je v inkubátoru přemísťovat.

30. Hodnota pH kontrolního média by neměla během zkoušky vzrůst o více než 1,5. U kovů a chemických látek, které částečně ionizují při pH blížící se pH zkoušky, může být nezbytné omezit posun pH pro získání opakovatelných a dobře definovaných výsledků. Posun hodnoty pH o $< 0,5$ je technicky proveditelný a lze jej dosáhnout zajištěním adekvátní rychlosti přesunu hmoty CO_2 z okolního vzduchu do zkušebního roztoku, např. zvýšením rychlosti třepání. Další možností je snížit potřebu CO_2 snížením počáteční biomasy nebo doby trvání zkoušky.

31. Povrch, kde jsou kultury inkubovány, by měl být trvale osvětlen jednotným fluorescenčním světlem, např. „chladným bílým“ nebo „denním“ světlem. Jednotlivé kmeny řas a sinic mají různé požadavky na osvětlení. Intenzita světla by měla být zvolena tak, aby vyhovovala použitému zkušebnímu organismu. Pro doporučené druhy zelených řas se intenzita světla na hladině zkušebních roztoků zvolí v rozmezí 60–120 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$, přičemž se měří ve fotosynteticky efektivním rozsahu vlnových délek od 400 do 700 nm pomocí vhodného snímače. Některé druhy, zejména *Anabaena flos-aquae*, dobře rostou při nízkých intenzitách světla a mohou být při vysokých intenzitách poškozeny. U takových druhů by měla být zvolena průměrná intenzita světla 40–60 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$. (Měří-li se intenzita osvětlení luxmetry, ekvivalentní rozpětí 4 440 až 8 880 luxů pro chladné bílé světlo odpovídá přibližně doporučené světelné intenzitě 60–120 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$). Nad inkubační plochou musí být udržována intenzita světla v rozmezí ± 15 % od průměrné intenzity světla.

▼M6

Doba trvání zkoušky

32. Zkouška obvykle trvá 72 hodin. Lze však použít kratší nebo delší doby trvání zkoušky, pokud lze splnit všechna kritéria platnosti uvedená v odstavci 11.

Měření a analytická stanovení

33. Biomasa řas se v každé baňce určí během doby zkoušky nejméně jednou denně. Jestliže se měření provádí na malých objemech odebraných ze zkušebního roztoku pipetou, tyto se nenahrazují.

34. Měření biomasy se provádí ručním počítáním buněk pod mikroskopem nebo pomocí elektronického počítače částic (počty buněk a/nebo biologický objem). Alternativní techniky, jako jsou např. průtoková cytometrie, fluorescence chlorofylu *in vitro* nebo *in vivo* (5, 6) nebo optická hustota, lze použít za předpokladu, že je možné prokázat uspokojivou korelaci s biomasou v rozmezí, v němž se biomasa během zkoušky vyskytuje.

35. pH roztoků se měří na počátku a na konci zkoušky.

36. Pokud je dostupný analytický postup k určení zkoušené chemické látky v rozmezí použitých koncentrací, zkušební roztoky je třeba analyzovat, aby se ověřily počáteční koncentrace a udržení expozičních koncentrací během zkoušky.

37. Analýza koncentrace zkoušené chemické látky na počátku a konci zkoušky při nízké a vysoké zkušební koncentraci a koncentrace okolo očekávané EC_{50} mohou být dostatečné, jestliže je pravděpodobné, že se expoziční koncentrace budou během zkoušky lišit o méně než 20 % od nominálních hodnot. Analýza všech zkušebních koncentrací na počátku a konci zkoušky se doporučuje v případě, kdy je nepravděpodobné, že koncentrace zůstanou v rozmezí 80 až 120 % nominální hodnoty. U těkavých, nestabilních nebo silně adsorbujících zkoušených chemických látek se doporučuje provést dodatečný odběr vzorků k analýze v 24hodinových intervalech během expoziční doby s cílem lépe definovat ztrátu zkoušené chemické látky. U těchto chemických látek mohou být zapotřebí dodatečná opakování. Ve všech případech se určení koncentrací zkoušené chemické látky provádí pouze u jedné z opakovaných kultur při každé zkušební koncentraci (nebo u sdruženého obsahu nádob ze všech opakovaných kultur).

38. Zkušební média specificky připravená k analýze expozičních koncentrací během zkoušky by měla být exponována stejným způsobem jako zkušební média použitá ke zkoušení, tj. měla by být naočkována řasami a inkubována za identických podmínek. Jestliže se požaduje analýza koncentrace rozpuštěné zkoušené látky, může být nezbytné oddělit řasy od média. Oddělení by se mělo nejlépe provádět odstřeďováním při nízké gravitační síle dostatečné pro usazení řas.

39. Lze-li prokázat, že byla po celou dobu zkoušky koncentrace zkoušené chemické látky uspokojivě udržována v rozmezí ± 20 % nominální nebo naměřené počáteční koncentrace, může být analýza výsledků založena na nominálních nebo naměřených počátečních hodnotách. Je-li odchylka od nominální nebo naměřené počáteční koncentrace větší než ± 20 %, analýza výsledků by měla být založena na geometrické střední koncentraci během expozice nebo na modelech popisujících pokles koncentrace zkoušené chemické látky (3, 7).

▼M6

40. Zkouška inhibice růstu řas je dynamičtější zkušební systém než většina jiných krátkodobých zkoušek vodní toxicity. V důsledku toho může být obtížné definovat skutečné expoziční koncentrace, zvláště u adsorbujících látek zkoušených při nízkých koncentracích. V takových případech vymizení zkoušené látky z roztoku adsorpcí do zvyšující se biomasy řas neznamená, že se ztratila ze zkušebního systému. Při analýze výsledku zkoušky je třeba zkontrolovat, jestli je pokles koncentrace zkoušené chemické látky v průběhu zkoušky doprovázen poklesem inhibice růstu. Pokud tomu tak je, lze zvážit použití vhodného modelu popisujícího pokles koncentrace zkoušené chemické látky (7). Pokud tomu tak není, může být vhodné založit analýzu výsledků na počátečních (nominálních či naměřených) koncentracích.

Další pozorování

41. Pro ověření normálního a zdravého vzhledu očkovací kultury a sledování jakéhokoliv abnormálního vzhledu řas (které může být způsobeno expozicí zkoušené chemické látce) na konci zkoušky by mělo být provedeno mikroskopické pozorování.

Limitní zkouška

42. Za určitých okolností, např. pokud předběžná zkouška naznačuje, že zkoušená chemická látka nemá žádné toxické účinky při koncentracích až do 100 mg/l nebo až do meze své rozpustnosti v zkušebním médiu (podle toho, co je nižší), může být provedena limitní zkouška zahrnující porovnání odezvy v kontrolní skupině a odezvy v jedné exponované skupině (100 mg/l nebo koncentrace rovná mezi rozpustnosti). Důrazně se doporučuje podpořit tuto zkoušku analýzou expozičních koncentrací. Všechny dříve popsané zkušební podmínky a kritéria platnosti se vztahují i na limitní zkoušku s výjimkou toho, že by mělo být provedeno alespoň šest opakování s exponovanými vzorky. Proměnné odezvy v kontrolní a exponované skupině mohou být analyzovány pomocí statistického testu pro porovnání středních hodnot, např. Studentova t-testu. Jestliže rozptyly obou skupin nejsou shodné, je třeba provést t-test upravený pro nerovnost rozptylů.

ÚDAJE A PŘEDKLÁDÁNÍ ZPRÁV

Vynášení růstových křivek

43. Biomasa ve zkušebních nádobách může být vyjádřena v jednotkách náhradního parametru použitého pro měření (např. počet buněk, fluorescence).

44. Pro vynesení růstových křivek do grafu sestavte tabulku odhadovaných koncentrací biomasy ve zkušebních kulturách a kontrolních kulturách společně s koncentracemi zkušebního materiálu a časy měření zaznamenanými v rozlišení nejméně na celé hodiny. V tomto prvním stadiu mohou být užitečné jak logaritmické, tak lineární stupnice, ale logaritmické stupnice jsou povinné a obecně poskytují lepší zobrazení odchylek ve vzorci růstu během zkušebního období. Nezapomeňte, že exponenciální růst má při vynesení na logaritmické stupnici podobu přímky a že sklon (směrnice) přímky ukazuje specifickou růstovou rychlost.

45. Po vynesení do grafu prověřte, jestli kontrolní kultury rostou exponenciálně očekávanou rychlostí po celou dobu zkoušky. Kriticky zhodnoťte všechny datové body a vzhled grafů a zkontrolujte, zda v hrubých datech a postupech nejsou chyby. Zejména zkontrolujte všechny body grafu, u nichž se zdá, že se odchylují na základě systematické chyby. Pokud je zřejmé, že lze rozpoznat procesní chyby a/nebo je lze považovat za vysoce pravděpodobné, konkrétní datový bod se označí jako odlehlá hodnota a nebude zahrnut do následné statistické analýzy. (Nulová koncentrace řas v jedné ze dvou nebo tří nádob-replik může ukazovat na to, že nádoba nebyla správně naočkována nebo byla nesprávně vyčištěna.) Důvody pro vyřazení bodu jako odlehlé

▼M6

hodnoty jasně uveďte v závěrečné zprávě. Přijatelnými důvody jsou pouze (vzácné) procesní chyby, a nikoli jen malá preciznost. Statistické postupy pro rozpoznání odlehlé hodnoty mají u tohoto typu problému pouze omezené použití a nemohou nahradit odborné posouzení. Odlehlé hodnoty (takto označené) by nejlépe měly zůstat mezi údaji zobrazenými v jakékoliv následné grafické či tabelární prezentaci dat.

Proměnné odezvy

46. Účelem této zkoušky je stanovit účinky zkoušené chemické látky na růst řas. Tato zkušební metoda popisuje dvě proměnné odezvy, protože jurisdikce v členských zemích mají odlišné preference a právní požadavky. Mají-li být výsledky zkoušky přijatelné ve všech členských zemích, účinky je třeba vyhodnotit pomocí obou proměnných odezvy a) a b) popsaných dále.

a) Průměrná specifická růstová rychlost: tato proměnná odezvy se vypočítá na základě logaritmického zvýšení biomasy během zkušebního období a vyjádří se v jednotkách za den.

b) Výtěžek: tato proměnná odezvy je biomasa na konci zkoušky minus počáteční biomasa.

47. Je třeba uvést, že hodnoty toxicity vypočítané pomocí těchto dvou proměnných odezvy nejsou srovnatelné a při používání výsledků zkoušky se musí vzít tento rozdíl na vědomí. Hodnoty EC_x založené na průměrné specifické růstové rychlosti (E_rC_x) budou všeobecně vyšší než výsledky založené na výtěžku (E_yC_x), pokud se dodrží zkušební podmínky této zkušební metody, a to vzhledem k matematickému základu příslušných přístupů. Tuto skutečnost nelze vykládat jako rozdíl v citlivosti mezi těmito dvěma proměnnými odezvy; hodnoty jsou jednoduše matematicky odlišné. Koncepce průměrné specifické růstové rychlosti je založena na obecném průběhu exponenciálního růstu řas v nelimitovaných kulturách, u nichž se toxicita odhaduje na základě účinků na růstovou rychlost, aniž by závisela na absolutní úrovni specifické růstové rychlosti kontrolní kultury, na sklonu křivky závislosti koncentrace-odezva nebo na době trvání zkoušky. Naproti tomu výsledky založené na proměnné odezvy „výtěžek“ jsou závislé na všech těchto ostatních proměnných. E_yC_x závisí na specifické růstové rychlosti druhů řas použitých v každé zkoušce a na maximální specifické růstové rychlosti, která se může lišit u jednotlivých druhů, a dokonce i u různých kmenů řas. Tato proměnná odezvy by se neměla používat pro srovnávání citlivosti na toxické látky mezi druhy řas, nebo dokonce mezi různými kmeny. Přestože se z vědeckého hlediska dává přednost použití průměrné specifické růstové rychlosti pro odhad toxicity, odhady toxicity založené na výtěžku jsou rovněž do této zkušební metody zahrnuty, aby uspokojily současné právní požadavky v některých zemích.

Průměrná růstová rychlost

48. Průměrná specifická růstová rychlost pro konkrétní období se vypočítá jako logaritmické zvýšení biomasy z rovnice pro každou jednotlivou nádobu s kontrolními a exponovanými vzorky:

▼M6

$$\mu_{i-j} = \frac{\ln X_j - \ln X_i}{t_j - t_i} (\text{den}^{-1}) \qquad [1],$$

kde:

μ_{i-j} je průměrná specifická růstová rychlost od doby *i* do doby *j*,

X_i je biomasa v čase *i*,

X_j je biomasa v čase *j*.

Pro každou exponovanou skupinu a kontrolní skupinu vypočítejte střední hodnotu růstové rychlosti a odhady rozptylu.

49. Vypočítejte průměrnou specifickou růstovou rychlost po celou dobu trvání zkoušky (obvykle 0 až 3 dny), přičemž namísto naměřené počáteční hodnoty použijte jako počáteční hodnotu spíše nominálně naočkovanou biomasu, protože se tímto způsobem obvykle dosáhne větší přesnosti. Jestliže zařízení použité pro měření biomasy umožňuje dostatečně přesné určení nízké biomasy inokula (např. průtokovým cytometrem), pak lze použít naměřenou počáteční koncentraci biomasy. Rovněž vyhodnoťte růstovou rychlost po jednotlivých časových úsecích vypočtenou jako specifické růstové rychlosti pro každý den v průběhu zkoušky (dny 0–1, 1–2 a 2–3) a zkontrolujte, zda růstová rychlost v kontrolním vzorku zůstává konstantní (viz kritéria platnosti, odstavec 11). Významně nižší specifická růstová rychlost v den jedna v porovnání s celkovou průměrnou specifickou růstovou rychlostí může poukazovat na fázi iniciace. Zatímco v kontrolních kulturách lze fázi iniciace minimalizovat a prakticky vyloučit správnou kultivací předkultury, fáze iniciace v exponovaných kulturách může být známkou obnovy po počátečním toxickém stresu nebo známkou snížené expozice vyvolané ztrátou zkoušené chemické látky (včetně sorpce na biomasu řas) po počáteční expozici. Odpovídajícím způsobem lze růstovou rychlost vyhodnocovat v jednotlivých časových úsecích s cílem zhodnotit účinky zkoušené látky, které se vyskytly během expoziční doby. Významné rozdíly mezi růstovou rychlostí v jednotlivých časových úsecích a průměrnou růstovou rychlostí jsou známkou odchylky od konstantního exponenciálního růstu a vyžadují důkladné prozkoumání růstových křivek.

50. Vypočítejte procentuální inhibici růstové rychlosti u jednotlivých opakování s exponovanými vzorky se vypočítá z rovnice [2]:

$$\%I_r = \frac{\mu_C - \mu_T}{\mu_C} \times 100 \qquad [2],$$

kde:

$\%\ I_r$ = procentuální inhibice průměrné specifické růstové rychlosti,

μ_C = střední hodnota průměrné specifické růstové rychlosti (μ) v kontrolní skupině,

μ_T = průměrná specifická růstová rychlost při opakování s exponovaným vzorkem.

51. Jestliže se k přípravě zkušebních roztoků používají rozpouštědla, pro výpočet procentuální inhibice by se měly namísto kontrol bez rozpouštědel používat kontroly s rozpouštědly.

Výtěžek

52. Výtěžek se vypočítá jako biomasa na konci zkoušky minus počáteční biomasa pro každou jednotlivou nádobu s kontrolními a exponovanými vzorky. Pro každou zkušební koncentraci a kontrolu vypočítejte střední hodnotu výtěžku a odhady rozptylu. Procentuální inhibici výtěžku ($\%\ I_y$) lze vypočítat pro každé opakování s exponovanými vzorky následovně:

▼M6

$$\% I_y = \frac{(Y_c - Y_T)}{Y_c} \times 100 \qquad [3]$$

kde:

$\% I_y$ = procentuální inhibice výtěžku,

Y_C = střední hodnota výtěžku v kontrolní skupině,

Y_T = hodnota výtěžku u jedné repliky s exponovaným vzorkem.

Vynášení křivky závislosti koncentrace-odezva

53. Vyneste procentuální hodnotu inhibice proti logaritmu koncentrace zkušební látky a vynesené body pečlivě prozkoumejte, přičemž neberte v úvahu žádný datový bod, který byl v první fázi vyloučen jako odlehlá hodnota. Od oka nebo pomocí počítačové interpolace proložte datovými body hladkou křivku, abyste získali první dojem o vztahu koncentrace a odezvy; poté přistupte k podrobnější metodě, nejlépe počítačové statistické metodě. V závislosti na zamýšleném použití dat, jakosti (přesnosti) a množství dat, jakož i na dostupnosti nástrojů pro analýzu dat je možné rozhodnout (a někdy je to dostatečně odůvodněno) o ukončení analýzy dat v tomto stadiu a klíčové hodnoty EC_{50} a EC_{10} (a/nebo EC_{20}) se jednoduše odečtou z křivky vytvořené od oka (rovněž viz následující bod o stimulačních účincích). Platnými důvody pro nepoužití statistické metody mohou být:

— Údaje nejsou vhodné pro počítačové metody, které neposkytnou spolehlivější výsledky než ty, které lze získat odborným posouzením – v takových situacích mohou dokonce některé počítačové programy selhat při získání spolehlivého řešení (iterace nemusí konvergovat atd.).

— Stimulační růstové odezvy nelze odpovídajícím způsobem zpracovat pomocí dostupných počítačových programů (viz níže).

Statistické postupy

54. Cílem je získat kvantitativní vztah mezi koncentrací a účinkem pomocí regresní analýzy. Je možné použít váženou lineární regresi po provedení linearizující transformace dat odezvy – například do probitových nebo logitových či Weibullových jednotek (8), ale dává se přednost nelineárním regresním postupům, s jejichž pomocí se lépe zpracovávají nevyhnutelné nepravidelnosti dat a odchylky od hladkých distribucí. Při přiblížení se k nule či úplné inhibici mohou být takové nepravidelnosti zesíleny transformací a rušit při analýze (8). Je třeba uvést, že standardní metody analýzy používající probitové, logitové nebo Weibullovy transformace jsou určeny k použití s kvantálními daty (např. mortalita nebo přežití) a musí se upravit, aby se mohly použít na data růstu či biomasy. Speciální postupy pro stanovení hodnoty EC_x ze spojitých dat lze nalézt v literatuře (9, 10 a 11). Použití nelineární regresní analýzy je dále podrobně popsáno v dodatku 5.

55. Pro každou proměnnou odezvy, která se má analyzovat, se použije vztah koncentrace-odezva pro výpočet bodových odhadů hodnot EC_x. Je-li to možné, je zapotřebí určit 95 % intervaly spolehlivosti pro každý odhad. Dobrou shodu dat odezvy s regresním modelem je zapotřebí vyhodnotit buď graficky, nebo statisticky. Regresní analýza by se měla provádět pomocí odezev jednotlivých opakování, nikoliv pomocí středních hodnot exponovaných skupin. Pokud však je proložení nelineární křivky obtížné či neúspěšné kvůli příliš velkému rozptylu dat, lze problém obejít provedením regrese na skupinových středních hodnotách, což je praktický

▼M6

způsob, jak snížit vliv podezřelých odlehlých hodnot. Použití této možnosti je zapotřebí zaznamenat v závěrečné zprávě jako odchylku od normálního postupu v důsledku skutečnosti, že křivka vyhovující jednotlivým opakováním nevedla k uspokojivému výsledku.

56. Odhady EC_{50} a intervaly spolehlivosti lze rovněž získat lineární interpolací s bootstrapem (metoda postupného výpočtu) (13), pokud se dostupné regresní modely/metody pro příslušná data nehodí.

57. Pro odhad LOEC, a tedy i NOEC, a pro účinky zkoušené chemické látky na růstovou rychlost je nezbytné porovnat střední hodnoty exponovaných vzorků pomocí metod analýzy rozptylu (ANOVA). Střední hodnota pro každou koncentraci musí být poté porovnána se střední hodnotou pro kontrolní skupinu, a to vhodnou metodou vícenásobného porovnání nebo metodou zkoušky trendu. Užitečný může být Dunnettův nebo Williamsův test (12, 14, 15, 16, 17). Je nezbytné vyhodnotit, zda je splněn předpoklad homogenity rozptylu nezbytný pro ANOVA. Toto hodnocení lze provádět graficky nebo formálním testem (17). Vhodné jsou testy podle Levenea nebo Bartletta. Nesplnění předpokladu homogenity rozptylů může být někdy korigováno logaritmickou transformací dat. Jestliže je heterogenita rozptylů extrémní a nelze ji napravit transformací, pak je třeba zvážit analýzu takovými metodami, jako je sestupný Jonckheerův trend test. Další pokyny pro stanovení NOEC lze nalézt v (11).

58. Vědecký vývoj poslední doby vedl k doporučení opustit koncepci NOEC a nahradit ji odhady bodů EC_x na základě regresní analýzy. Vhodná hodnota pro x nebyla pro tuto zkoušku pomocí řas stanovena. Zdá se, že vhodné je rozmezí od 10 do 20 % (v závislosti na zvolené proměnné odezvy) a nejlépe by se měly v závěrečné zprávě uvádět jak EC_{10}, tak EC_{20}.

Stimulace růstu

59. Při nízkých koncentracích bývá někdy pozorována stimulace růstu (negativní inhibice). To může být důsledkem buď hormese („toxická stimulace“), nebo přidání stimulujících růstových faktorů se zkušebním materiálem k minimálnímu použitému médiu. Nezapomeňte, že přidání anorganických živin by nemělo mít žádný přímý účinek, protože zkušební médium by mělo po celou dobu zkoušky udržovat přebytek živin. Stimulaci nízkými dávkami lze ve výpočtech EC_{50} obvykle ignorovat, pokud není extrémní. Je-li však extrémní nebo má-li být vypočtena hodnota EC_x pro nízké x, mohou být zapotřebí speciální postupy. K vymazání stimulačních odezev z analýzy dat by nemělo pokud možno dojít, a pokud dostupný software pro stanovení křivky nemůže drobnou stimulaci přijmout, lze použít lineární interpolaci s bootstrapem. Jestliže je stimulace extrémní, lze zvážit použití modelu předpokládajícího hormesi (18).

Netoxická inhibice růstu

60. Zkušební materiály absorbující světlo mohou způsobit snížení růstové rychlosti, protože stínění snižuje množství dostupného světla. Takové účinky fyzikální povahy je zapotřebí oddělit od toxických účinků, a to úpravou zkušebních podmínek, přičemž takové fyzikální účinky je nutno uvádět v závěrečné zprávě samostatně. Pokyny lze nalézt v literatuře (2 a 3).

ZÁVĚREČNÁ ZPRÁVA

61. V závěrečné zprávě musí být uvedeny tyto údaje:

▼**M6**

Zkoušená látka:

— fyzikální povaha a relevantní fyzikálně-chemické vlastnosti, včetně meze rozpustnosti ve vodě,

— údaje o chemické identifikaci (např. číslo CAS), včetně čistoty (nečistot).

Zkušební systém/druh:

— kmen, dodavatel nebo zdroj a použité podmínky kultivace.

Zkušební podmínky:

— datum zahájení zkoušky a délka jejího trvání,

— popis uspořádání zkoušky: zkušební nádoby, objemy kultur, hustota biomasy na počátku zkoušky,

— složení média,

— zkušební koncentrace a opakování (například počet opakování, počet zkušebních koncentrací a použitá geometrická progrese),

— popis přípravy zkušebních roztoků včetně použití rozpouštědel atd.,

— kultivační zařízení,

— intenzita a kvalita světla (zdroj, homogenita),

— teplota,

— zkušební koncentrace: nominální zkušební koncentrace a jakékoliv výsledky analýz pro stanovení koncentrace zkoušené chemické látky v zkušebních nádobách. V závěrečné zprávě je třeba uvést výtěžnost metody a mez kvantifikace ve zkušební matrici,

— všechny odchylky od této zkušební metody,

— metoda stanovení biomasy a důkaz o korelaci mezi naměřeným parametrem a hmotností sušiny.

Výsledky:

— hodnoty pH na počátku a konci zkoušky u všech expozic,

— biomasa pro každou baňku v každém měřicím bodě a metoda měření biomasy,

— růstové křivky (vynášení biomasy vůči času),

— vypočítané proměnné odezvy pro jednotlivé repliky s exponovanými vzorky, spolu se středními hodnotami a variačním koeficientem ze všech opakování,

— grafické znázornění vztahu koncentrace/odezva,

▼M6

— odhady toxicity pro proměnné odezvy, např. EC_{50}, EC_{10}, EC_{20}, a související intervaly spolehlivosti. Jestliže se počítají LOEC a NOEC, uvedou se jejich hodnoty a statistické metody použité k jejich stanovení,

— jestliže byla použita ANOVA, uvede se velikost účinku, který lze detekovat (např. nejmenší významný rozdíl),

— jakákoliv stimulace růstu zjištěná v jakémkoli exponovaném vzorku,

— jakékoliv jiné pozorované účinky, např. morfologické změny řas,

— diskuse výsledků včetně případného vlivu na výsledek zkoušky v důsledku odchylek od této zkušební metody.

LITERATURA

1) International Organisation for Standardisation (1993). ISO 8692 Water quality – Algal growth inhibition test.

2) International Organisation for Standardisation (1998). ISO/DIS 14442. Water quality – Guidelines for algal growth inhibition tests with poorly soluble materials, volatile compounds, metals and waste water.

3) OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and mixtures. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment, no. 23. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.

4) International Organisation for Standardisation (1998). ISO 5667-16 Water quality – Sampling – Part 16: Guidance on Biotesting of Samples.

5) Mayer, P., Cuhel, R. and Nyholm, N. (1997). A simple in vitro fluorescence method for biomass measurements in algal growth inhibition tests. Water Research 31: 2525-2531.

6) Slovacey, R.E. and Hanna, P.J. (1997). In vivo fluorescence determinations of phytoplancton chlorophyll, Limnology & Oceanography 22: 919-925.

7) Simpson, S.L., Roland, M.G.E., Stauber, J.L. and Batley, G.E. (2003). Effect of declining toxicant concentrations on algal bioassay endpoints. Environ. Toxicol. Chem. 22: 2073-2079.

8) Christensen, E.R., Nyholm, N. (1984). Ecotoxicological Assays with Algae: Weibull Dose-Response Curves. Env. Sci. Technol. 19: 713-718.

9) Nyholm, N. Sørensen, P.S., Kusk, K.O. and Christensen, E.R. (1992). Statistical treatment of data from microbial toxicity tests. Environ. Toxicol. Chem. 11: 157-167.

10) Bruce, R.D.,and Versteeg, D.J. (1992). A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. Environ. Toxicol. Chem. 11: 1485-1494.

11) OECD (2006). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.

▼**M6**

12) Dunnett, C.W. (1955). A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. J. Amer. Statist. Assoc. 50: 1096-1121.

13) Norberg-King T.J. (1988). An interpolation estimate for chronic toxicity: The ICp approach. National Effluent Toxicity Assessment Center Technical Report 05-88. US EPA, Duluth, MN.

14) Dunnett, C.W. (1964). New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics 20: 482-491.

15) Williams, D.A. (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics 27: 103-117.

16) Williams, D.A. (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics 28: 519-531.

17) Draper, N.R. and Smith, H. (1981). Applied Regression Analysis, second edition. Wiley, New York.

18) Brain, P. and Cousens, R. (1989). An equation to describe dose-responses where there is stimulation of growth at low doses. Weed Research, 29, 93-96.

▼M6

Dodatek 1

Definice

Pro účely této zkušební metody se používají následující definice a zkratky:

Biomasa je hmotnost sušiny živé hmoty přítomné v populaci vyjádřená ve vztahu k danému objemu; např. mg řas/litr zkušebního roztoku. „Biomasa“ je obvykle definována jako hmota, ale v rámci této zkoušky se toto slovo používá pro hmotu vztaženou na objem. V této zkoušce se obvykle měří náhrady biomasy, například počet buněk, fluorescence atd., a používání termínu „biomasa“ tedy rovněž odkazuje na tyto náhradní míry.

Chemická látka je látka nebo směs.

Variační koeficient je bezrozměrná veličina proměnlivosti parametru definovaná jako poměr směrodatné odchylky a střední hodnoty. Lze jej rovněž vyjádřit jako procentuální údaj. Střední variační koeficient průměrné specifické růstové rychlosti v kontrolních kulturách použitých k opakování se počítá následovně:

1. vypočítejte % variační koeficient průměrné specifické růstové rychlosti z denních růstových rychlostí nebo růstových rychlostí po jednotlivých časových úsecích pro příslušnou repliku;

2. vypočítejte střední hodnotu ze všech hodnot vypočítaných v bodě 1 pro získání středního variačního koeficientu denní specifické růstové rychlosti nebo specifické růstové rychlosti po jednotlivých časových úsecích v opakovaných kontrolních kulturách.

EC_x je koncentrace zkoušené chemické látky rozpuštěné ve zkušebním médiu, která pro danou expoziční dobu vede k x % (např. 50 %) snížení růstu zkušebního organismu (musí se výslovně uvést, pokud se odchyluje od plné či normální doby trvání zkoušky). Pro jednoznačné označení hodnoty EC odvozené z růstové rychlosti nebo výtěžku se symbol „E_rC“ používá pro růstovou rychlost a „E_yC“ pro výtěžek.

Růstové médium je úplné syntetické kultivační médium, v němž rostou zkušební řasy při expozici zkoušené chemické látce. Zkoušená chemická látka bude za normálních podmínek ve zkušebním médiu rozpuštěna.

Růstová rychlost (průměrná specifická růstová rychlost) je logaritmické zvýšení biomasy během doby expozice.

Nejnižší koncentrace s pozorovaným účinkem (LOEC) je nejnižší zkušební koncentrace, při níž je pro danou expoziční dobu pozorován statisticky významný účinek chemické látky na snížení růstu (na hladině spolehlivosti $p < 0,05$) ve srovnání s kontrolou. Všechny zkušební koncentrace vyšší než LOEC musí však mít stejné nebo vážnější škodlivé účinky, než jsou účinky pozorované při koncentraci LOEC. Nelze-li tyto dvě podmínky splnit, musí být podrobně vysvětleno, jak byla LOEC (a tedy i NOEC) zvolena.

Koncentrace bez pozorovaných účinků (NOEC) je zkušební koncentrace bezprostředně nižší než LOEC.

Proměnná odezvy je proměnná pro odhad toxicity odvozená z jakýchkoliv naměřených parametrů, jež popisují biomasu, různými metodami výpočtu. U této metody jsou proměnnými odezvy růstová rychlost a výtěžek, které se odvozují přímo z měření biomasy nebo jakékoliv z uvedených náhrad.

▼M6

Specifická růstová rychlost je proměnná odezvy definovaná jako podíl rozdílu přirozených logaritmů sledovaného parametru (v této zkušební metodě je jím biomasa) a příslušného časového období.

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

Výtěžek je hodnota proměnné měření na konci expoziční doby minus hodnota proměnné měření na počátku expoziční doby, která vyjadřuje nárůst biomasy během zkoušky.

▼**M6**

Dodatek 2

Kmeny, u nichž byla prokázána vhodnost pro zkoušku

Zelené řasy

Pseudokirchneriella subcapitata (dříve známá jako *Selenastrum capricornutum*), ATCC 22662, CCAP 278/4, 61.81 SAG

Desmodesmus subspicatus (dříve známá jako *Scenedesmus subspicatus*), 86.81 SAG

Rozsivky

Navicula pelliculosa, UTEX 664

Sinice

Anabaena flos-aquae, UTEX 1444, ATCC 29413, CCAP 1403/13A

Synechococcus leopoliensis, UTEX 625, CCAP 1405/1

Zdroje kmenů

Doporučené kmeny jsou dispozici v jednodruhových kulturách z následujících sbírek (v abecedním pořadí):

ATCC: American Type Culture Collection (Americká sbírka kultur druhů)
10801 University Boulevard
Manassas, Virginia 20110-2209
USA

CCAP, Culture Collection of Algae and Protozoa (Sbírka kultur řas a prvoků)
Institute of Freshwater Ecology,
Windermere Laboratory
Far Sawrey, Amblerside
Cumbria LA22 0LP
Spojené království

SAG: Collection of Algal Cultures (Sbírka kultur řas)
Inst. Plant Physiology
University Göttingen
Nicholausberger Weg 18
37073 Göttingen
Německo

UTEX Culture Collection of Algae (Sbírka kultur řas)
Section of Molecular, Cellular a Developmental Biology
School of Biological Sciences
the University of Texas at Austin
Austin, Texas 78712
USA.

▼M6

Vzhled a charakteristiky doporučených druhů

	P. subcapitata	*D. subspicatus*	*N. pelliculosa*	*A. flos-aquae*	*S. leopoliensis*
Vzhled	zakřivené, zkroucené jednotlivé buňky	oválné, většinou jednotlivé buňky	tyčinky	řetězce oválných buněk	tyčinky
Velikost (d × š) µm	8–14 × 2–3	7–15 × 3–12	7,1 × 3,7	4,5 × 3	6 × 1
Buněčný objem (μm^3/buňka)	40–60 ([1])	60–80 ([1])	40–50 ([1])	30–40 ([1])	2,5 ([2])
Hmotnost buněčné sušiny (mg/buňku)	$2–3 \times 10^{-8}$	$3–4 \times 10^{-8}$	$3–4 \times 10^{-8}$	$1–2 \times 10^{-8}$	$2–3 \times 10^{-9}$
Růstová rychlost ([3]) (den^{-1})	1,5–1,7	1,2–1,5	1,4	1,1–1,4	2,0–2,4

([1]) Měřeno pomocí elektronického počítače částic
([2]) Vypočítáno z velikosti
([3]) Nejčastěji pozorovaná růstová rychlost v médiu OECD při intenzitě světla přibližně 70 µE m^{-2} s^{-1} a 21 °C

Specifická doporučení pro kultivaci doporučených zkušebních druhů a nakládání s nimi

Pseudokirchneriella subcapitata a Desmodesmus subspicatus

Tyto zelené řasy se obecně snadno udržují v různých kultivačních médiích. Informace o vhodných médiích lze získat ze sbírek kultur. Buňky jsou normálně osamocené a měření hustoty buněk lze snadno provádět použitím elektronického počítače částic nebo mikroskopu.

Anabaena flos-aquae

Pro uchovávání zásobní kultury lze použít různá růstová média. Zejména je důležité zabránit tomu, aby vsázková kultura překročila při obnově fázi logaritmického růstu; zpětné získání je v tomto bodě obtížné.

Anabaena flos-aquae vytváří shluky vnořených řetězců buněk. Velikost těchto shluků se může měnit s podmínkami kultivace. Může vzniknout potřeba tyto shluky rozrušit, pokud se ke stanovení biomasy použije počítání pod mikroskopem nebo elektronický počítač částic.

Pro snížení variability počtu mohou být v dílčích vzorcích použity k rozrušení řetězců ultrazvukové vlny (tzv. sonikace). Delší aplikace ultrazvuku, než je zapotřebí pro rozrušení řetězců na kratší úseky, může buňky zničit. Intenzita a délka aplikace musí být stejná pro každé zpracování.

Spočítejte dostatečný počet políček na hemocytometru (alespoň 400 buněk), což pomůže kompenzovat variabilitu. Tím se zvýší spolehlivost mikroskopického stanovení hustoty.

Pro stanovení celkového buněčného objemu sinic rodu *Anabaena* po rozrušení řetězců buněk opatrnou sonikací lze použít elektronický počítač částic. Energii ultrazvuku je třeba nastavit tak, aby se předešlo narušení buněk.

Použijte vířivou míchačku nebo podobnou odpovídající metodu, abyste zajistili, že suspenze řas použitá pro inokulaci zkušebních nádob bude dobře promíchaná a homogenní.

▼**M6**

Zkušební nádoby je nutno umístit na desku orbitální nebo reciproké třepačky při přibližně 150 otáčkách za minutu. Případně je možné použít občasné promíchávání pro snížení sklonu sinic rodu *Anabaena* vytvářet shluky. Jestliže ke shlukování dojde, je třeba věnotvat péči tomu, abyste získali reprezentativní vzorky pro měření biomasy. Před odběrem vzorků může být nezbytné intenzívní třepání pro rozrušení shluků sinic.

Synechococcus leopoliensis

Pro uchovávání zásobní kultury lze použít různá růstová média. Informace o vhodných médiích lze získat ze sbírek kultur.

Synechococcus leopoliensis vyrůstají jako jednotlivé buňky tyčinkovitého tvaru. Buňky jsou velmi malé, což komplikuje použití počítání pod mikroskopem pro měření biomasy. Užitečné jsou elektronické počítače částic vybavené pro počítání částic až do velikosti přibližně 1 μm. Rovněž jsou využitelná fluorimetrická měření *in vitro*.

Navicula pelliculosa

Pro uchování zásobní kultury lze použít různá růstová média. Informace o vhodných médiích lze získat ze sbírek kultur. Je třeba mít na paměti, že v médiu musí být přítomen křemičitan.

Za určitých růstových podmínek může *Navicula pelliculosa* vytvářet shluky. Kvůli produkci lipidů mají buňky řas někdy tendenci se shlukovat v povrchovém filmu. Za těchto okolností se musí přijmout zvláštní opatření při odběru dílčích vzorků pro stanovení biomasy, aby se získaly reprezentativní vzorky. Patrně bude třeba intenzívní protřepávání, např. použitím vířivé míchačky.

▼**M6**

Dodatek 3

Růstová média

Lze použít jedno z následujících dvou růstových médií:

— Médium OECD: původní médium podle Pokynu OECD pro zkoušení 201, rovněž podle normy ISO 8692.

— Médium US. EPA AAP rovněž podle ASTM.

Při přípravě těchto médií je třeba použít chemické látky analytické čistoty nebo na úrovni činidel a deionizovanou vodu.

Složení média AAP (US. EPA) a média podle Pokynu OECD pro zkoušení 201.

Složka	AAP		OECD	
	mg/l	mM	mg/l	mM
$NaHCO_3$	15,0	0,179	50,0	0,595
$NaNO_3$	25,5	0,300		
NH_4Cl			15,0	0,280
$MgCl_2 \cdot 6(H_2O)$	12,16	0,0598	12,0	0,0590
$CaCl_2 \cdot 2(H_2O)$	4,41	0,0300	18,0	0,122
$MgSO_4 \cdot 7(H_2O)$	14,6	0,0592	15,0	0,0609
K_2HPO_4	1,044	0,00599		
KH_2PO_4			1,60	0,00919
$FeCl_3 \cdot 6(H_2O)$	0,160	0,000591	0,0640	0,000237
$Na_2EDTA \cdot 2(H_2O)$	0,300	0,000806	0,100	0,000269*
H_3BO_3	0,186	0,00300	0,185	0,00299
$MnCl_2 \cdot 4(H_2O)$	0,415	0,00201	0,415	0,00210
$ZnCl_2$	0,00327	0,000024	0,00300	0,0000220
$CoCl_2 \cdot 6(H_2O)$	0,00143	0,000006	0,00150	0,00000630
$Na_2MoO_4 \cdot 2(H_2O)$	0,00726	0,000030	0,00700	0,0000289
$CuCl_2 \cdot 2(H_2O)$	0,000012	0,00000007	0,00001	0,00000006
pH	7,5		8,1	

Molární poměr EDTA k železu je mírně větší než jedna. Tím se zabrání srážení železa a současně se minimalizuje chelatace iontů těžkých kovů.

Při zkoušce s rozsivkou *Navicula pelliculosa* musí být obě média doplněna $Na_2SiO_3 \cdot 9H_20$ pro dosažení koncentrace 1,4 mg Si/l.

▼**M6**

pH média se získá při rovnováze mezi uhličitanovým systémem média a parciálním tlakem CO_2 v atmosférickém vzduchu. Přibližný vztah mezi pH při 25 °C a molární koncentrací hydrogenuhličitanu je:

$pH_{rovn} = 11{,}30 + \log[HCO_3]$

S 15 mg $NaHCO_3$/l, pH_{rovn} = 7,5 (médium U.S. EPA) a s 50 mg $NaHCO_3$/l, pH_{rovn} = 8,1 (médium OECD).

Prvkové složení zkušebních médií

Prvek	AAP	OECD
	mg/l	mg/l
C	2,144	7,148
N	4,202	3,927
P	0,186	0,285
K	0,469	0,459
Na	11,044	13,704
Ca	1,202	4,905
Mg	2,909	2,913
Fe	0,033	0,017
Mn	0,115	0,115

Příprava média OECD

Živina	Koncentrace v zásobním roztoku
Zásobní roztok č. 1: makroživiny	
NH_4Cl	1,5 g/l
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	1,2 g/l
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	1,8 g/l
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	1,5 g/l
KH_2PO_4	0,16 g/l
Zásobní roztok č. 2: železo	
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	64 mg/l
$Na_2EDTA \cdot 2H_2O$	100 mg/l
Zásobní roztok č. 3: stopové prvky	
H_3BO_3	185 mg/l
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	415 mg/l
$ZnCl_2$	3 mg/l

▼**M6**

Živina	Koncentrace v zásobním roztoku
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	1,5 mg/l
$CuCl_2 \cdot 2H_2O$	0,01 mg/l
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	7 mg/l
Zásobní roztok č. 4: hydrogenuhličitan	
$NaHCO_3$	50 g/l
$Na_2SiO_3 \cdot 9H_20$	

Zásobní roztoky vysterilizujte membránovou filtrací (střední průměr pórů 0,2 μm) nebo v autoklávu (120 °C, 15 min). Roztoky skladujte v temnu při 4 °C.

Zásobní roztoky 2 a 4 neošetřujte v autoklávu, ale sterilizujte membránovou filtrací.

Připravte růstové médium přidáním odpovídajícího objemu zásobních roztoků 1 až 4 do vody:

Do 500 ml sterilizované vody přidejte:

10 ml zásobního roztoku č. 1

1 ml zásobního roztoku č. 2

1 ml zásobního roztoku č. 3

1 ml zásobního roztoku č. 4

Doplňte do 1 000 ml sterilizovanou vodou.

Nechte stát dostatečně dlouhou dobu na to, aby se vytvořila rovnováha média s atmosférickým CO_2, v případě potřeby pomocí probublávání sterilním filtrovaným vzduchem po dobu několika hodin.

Příprava U.S. EPA média

1. Přidejte 1 ml každého zásobního roztoku v 2.1–2.7 do přibližně 900 ml deionizované nebo destilované vody a poté zřeďte do 1 litru.

2. Zásobní roztoky makroživin se připraví rozpuštěním následujících látek v 500 ml deionizované nebo destilované vody. Činidla 2.1, 2.2, 2.3 a 2.4 se mohou spojit do jednoho zásobního roztoku.

2.1	$NaNO_3$	12,750 g.
2.2	$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	6,082 g.
2.3	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	2,205 g.
2.4	Zásobní roztok mikroživin (viz 3).	
2.5	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	7,350 g.
2.6	K_2HPO_4	0,522 g.
2.7	$NaHCO_3$	7,500 g.
2.8	$Na_2SiO_3 \cdot 9H_2O$	viz poznámka 1.

▼**M6**

Poznámka 1: Používejte pouze pro zkušební druhy rozsivek. Může se přidat přímo (202,4 mg) nebo prostřednictvím zásobního roztoku, aby bylo dosaženo konečné koncentrace 20 mg/l Si v médiu.

3. Zásobní roztok mikroživin se připraví rozpuštěním následujících látek v 500 ml deionizované nebo destilované vody:

3.1	H_3BO_3	92,760	mg	
3.2	$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	207,690	mg	
3.3	$ZnCl_2$	1,635	mg	
3.4	$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	79,880	mg	
3.5	$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0,714	mg	
3.6	$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	3,630	mg	
3.7	$CuCl_2 \cdot 2H_2O$	0,006	mg	
3.8	$Na_2EDTA \cdot 2H_2O$	150,000	mg	[dinatrium-ethylendiamintetraacetát dihydrát].
3.9	$Na_2SeO_4 \cdot 5\ H_2O$	0,005	mg	viz poznámka 2.

Poznámka 2: Použije se pouze v médiu pro zásobní kultury druhů rozsivek.

4. pH upravte na 7,5 ± 0,1 přidáním 0,1 *N* nebo 1,0 *N* NaOH nebo HCl.

5. Odfiltrujte média do sterilní nádoby buď přes 0,22 μm membránový filtr, jestliže se má použít počítač částic; pokud se počítač částic použít nemá, přes filtr 0,45 μm.

6. Médium skladujte až do použití v temnu při teplotě přibližně 4 °C.

▼M6

Dodatek 4

Příklad postupu kultivace řas

Všeobecné poznámky

Účelem kultivace následujícím postupem je získání kultur řas pro zkoušky toxicity.

Použijte vhodné metody, které zajistí, že kultury řas nebudou infikovány bakteriemi. Axenické (zbavené cizích organismů) kultury mohou být vhodné, avšak musí se vytvořit a používat jednodruhové kultury.

Všechny operace se musí provádět za sterilních podmínek, aby nedošlo ke kontaminaci bakteriemi a jinými řasami.

Zařízení a materiály

Viz zkušební metoda: Přístroje a pomůcky

Postupy při získávání kultur řas

Příprava živných roztoků (média):

Všechny soli živin média se připraví jako koncentrované zásobní roztoky a skladují se v temnu a chladu. Tyto roztoky se sterilizují filtrací nebo autoklávem.

Médium se připraví přidáním správného množství zásobního roztoku do sterilní destilované vody, přičemž se dbá na to, aby nedošlo k žádné infekci. K získání pevného média se doplní 0,8 % agaru.

Kmenová kultura:

Kmenové kultury jsou malé kultury řas, které se pravidelně přenášejí do čerstvého média, kde slouží jako výchozí zkušební materiál. Nejsou-li kultury pravidelně používány, naočkovávají se na šikmý agar. Poté se nejméně jednou za dva měsíce přenášejí do čerstvého média.

Kmenové kultury se pěstují v Erlenmeyerových baňkách obsahujících vhodné médium (objem přibližně 100 ml). Jsou-li řasy kultivovány při teplotě 20 °C a za stálého osvětlení, musí se přenášet každý týden.

Při přeočkování se přenese sterilní pipetou do baňky s čerstvým médiem takové množství „staré“ kultury, aby byla počáteční koncentrace u rychle rostoucího druhu řas asi stokrát menší než koncentrace kultury staré.

Růstovou rychlost druhu řas lze odečíst z růstové křivky. Je-li známa, lze z ní odhadnout hustotu, při níž musí být kultura přenesena do čerstvého média. K tomu musí dojít před fází odumírání kultury.

Předkultura:

Účelem předkultur je poskytnout dostatečné množství řas potřebných pro naočkování zkušebních kultur. Předkultura se kultivuje za zkušebních podmínek a použije se ještě během exponenciálního růstu, to znamená obvykle po inkubační době o délce 2 až 4 dní. Obsahují-li kultury řas deformované nebo abnormální buňky, musí se odstranit.

▼M6

Dodatek 5

Analýza dat pomocí nelineární regrese

Obecné poznámky

Odezva ve zkouškách růstu řas a jiných zkouškách mikrobiálního růstu – růstu biomasy – je svojí povahou spojitá nebo metrická proměnná – rychlost procesu, jestliže se použije růstová rychlost, a její integrál během doby, pokud se zvolí biomasa. Obě jsou popsány příslušnou střední odezvou neexponovaných kontrolních replik, jež vykazují maximální odezvu při daných podmínkách – přičemž světlo a teplota jsou primární určující faktory ve zkoušce růstu řas. Systém je distribuovaný nebo homogenní a na biomasu je možné nahlížet jako na kontinuum, aniž by se braly v úvahu jednotlivé buňky. Distribuce rozptylu typu odezvy pro takový systém závisí výhradně na experimentálních faktorech (obvykle popsaných lognormálními nebo normálními distribucemi chyb). To je v kontrastu s typickými odezvami biozkoušek s kvantálními daty, u nichž se často předpokládá, že tolerance (obvykle s binomickou distribucí) jednotlivých organismů je dominantní složkou rozptylu. Kontrolní odezvy jsou zde nulové nebo na základní úrovni.

V nekomplikované situaci normalizovaná nebo relativní odezva, *r*, klesá monotónně z 1 (nulová inhibice) na 0 (100 % inhibice). Je třeba mít na paměti, že všechny odezvy mají přidruženou chybu a že očividně negativní inhibice se dají vypočítat pouze jako výsledek náhodných chyb.

Regresní analýza

Modely

Cílem regresní analýzy je kvantitativně popsat křivku závislosti koncentrace a odezvy ve formě matematické regresní funkce $Y = f(C)$ nebo častěji $F(Z)$, kde $Z = \log C$. Použití inverzní funkce $C = f^{-1}(Y)$ dovoluje vypočítat hodnoty EC_x, včetně EC_{50}, EC_{10} a EC_{20}, a jejich 95 % intervaly spolehlivosti. Prokázalo se, že vztah koncentrace a odezvy získané ve zkouškách inhibice růstu řas úspěšně popisuje několik jednoduchých matematických funkcí. Funkce například obsahují logistickou rovnici, nesymetrickou Weibulovu rovnici a lognormální distribuční funkci, které jsou všechny esovitými křivkami asymptoticky se blížícími nule pro $C \rightarrow 0$ a jedné pro $C \rightarrow$ nekonečno.

Použití modelů spojité prahové funkce (např. Kooijmanův model „pro inhibici populačního růstu“, Kooijman a kol. 1996) bylo nedávno navrženo jako alternativa k asymptotickým modelům. Tento model nepředpokládá žádné účinky při koncentracích pod určitou prahovou hodnotou EC_0+, která se odhaduje extrapolací vztahu odezva-koncentrace, aby došlo k protnutí osy koncentrace pomocí jednoduché spojité funkce, která není v počátečním bodě diferencovatelná.

Je třeba mít na paměti, že analýza může být prostou minimalizací reziduálních součtů čtverců (za předpokladu konstantního rozptylu) nebo vážených čtverců, jestliže je kompenzuje heterogenita rozptylu.

Postup

Postup lze nastínit následovně: zvolte vhodnou funkční rovnici $Y = f(C)$ a uzpůsobte ji podle údajů pomocí nelineární regrese. Je lepší použít měření z každé jednotlivé baňky než střední hodnoty opakování, aby se z dat získalo co nejvíce informací. Je-li rozptyl vysoký, praktická zkušenost naopak naznačuje, že střední

▼M6

hodnoty opakování mohou poskytovat spolehlivější matematický odhad, který bude méně ovlivněn systematickými chybami v datech, než je tomu u každého zachovaného jednotlivého datového bodu.

Vyneste vytvořenou křivku a naměřená data a prozkoumejte, zda byla křivka vynesena správně. Analýza reziduálních hodnot může být pro tento účel zvláště užitečným nástrojem. V případě, že zvolený funkční vztah pro vyjádření odezvy koncentrace nepopisuje dobře celou křivku nebo některou její zásadně důležitou část, jako je např. odezva při nízkých koncentracích, zvolte jinou variantu vložení křivky – např. nesymetrickou křivku, jako je Weibulova funkce – místo křivky symetrické. Negativní inhibice mohou představovat problém, například u lognormální distribuční funkce, která podobně vyžaduje alternativní regresní funkci. Takovým negativním hodnotám se nedoporučuje přiřazovat nulu nebo malou kladnou hodnotu, protože se tím zkresluje distribuce chyb. Vhodným postupem může být na části křivky nasadit samostatnou křivku, například v části s nízkou inhibicí, pro odhad hodnot $EC_{nízké\ x}$. Vypočítejte ze vsazené rovnice (metodou „inverzního odhadu“, $C = f^{-1}(Y)$) odhady charakteristického bodu EC_x a uveďte přinejmenším EC_{50} a jeden nebo dva odhady $EC_{nízké\ x}$. Zkušenost z praktických zkoušek ukázala, že přesnost zkoušky růstu řas obvykle umožňuje přiměřeně přesný odhad na úrovni 10 % inhibice, jsou-li datové body dostačující – ledaže by se vyskytla stimulace při nízkých koncentracích jakožto zkreslující faktor. Přesnost odhadu EC_{20} je často podstatně lepší než přesnost odhadu EC_{10}, protože EC_{20} se obvykle nachází na přibližně lineární části centrální křivky odezvy koncentrace. Někdy se EC_{10} interpretuje obtížně kvůli růstové stimulaci. Tudíž zatímco EC_{10} se dá obvykle zjistit s dostatečnou přesností, doporučuje se vždy v závěrečné zprávě uvádět také EC_{20}.

Váhové faktory

Experimentální rozptyl není obecně konstantní a obvykle zahrnuje proporcionální složku, proto je výhodné běžně provádět váženou regresi. Obvykle se předpokládá, že váhové faktory pro takovou analýzu jsou nepřímo úměrné rozptylu:

$$W_i = 1/Var(r_i)$$

Řada regresních programů umožňuje váženou regresní analýzu s váhovými faktory uvedenými v tabulce. Váhové faktory by se měly pohodlně normalizovat vynásobením $n/\Sigma\ w_i$ (n je počet datových bodů) tak, aby se jejich součet rovnal jedné.

Normalizace odezev

Normalizování střední kontrolní odezvou přináší určité principiální problémy a vede ke vzniku poněkud komplikované struktury rozptylu. Dělením odezev střední kontrolní odezvou pro získání procentuální hodnoty inhibice se zavádí dodatečná chyba způsobená chybou kontrolní střední hodnoty. Pokud tato chyba není zanedbatelně malá, musí se opravit váhové faktory v regresní analýze a intervaly spolehlivosti na kovarianci (Draper a Smith, 1981). Je nutné mít na paměti, že je důležitá vysoká přesnost u odhadované střední kontrolní odezvy pro minimalizaci celkového rozptylu u relativní odezvy. Tento rozptyl je následující:

(Dolní index *i* znamená úroveň koncentrace i a dolní index *0* odkazuje na kontroly)

$$Yi = \text{Relativní odezva} = r_i/r_0 = 1 - I = f(C_i)$$

▼**M6**

s rozptylem $Var(Y_i) = Var\ (r_i/r_0) \cong (\partial Yi/\partial r_i)^2 \cdot Var(r_i) + ((\partial Y_i/\partial r_0)^2 \cdot Var(r_0)$

a jelikož $(\partial Y_i/\partial\ r_i) = 1/r_0$ a $(\partial Y_i/\partial r_0) = r_i/r_0^2$

pro data s normální distribucí a opakováními m_i a m_0: $Var(r_i) = \sigma^2/m_i$

se pak celkový rozptyl relativní odezvy Y_i vypočítá:

$$Var(Y_i) = \sigma^2/(r_0^2 \cdot m_i) + r_i^2 \cdot \sigma^2/r_0^4 \cdot m_0$$

Chyba kontrolní střední hodnoty je nepřímo úměrná druhé odmocnině počtu zprůměrovaných kontrolních replik, přičemž někdy může být opodstatněné zanést historická data, čímž se chyba značně sníží. Alternativním postupem je data nenormalizovat a nevynášet absolutní odezvy včetně dat kontrolní odezvy, ale zavést hodnoty kontrolní odezvy jako dodatečný parametr, který bude upraven nelineární regresí. Zatímco obvyklá regresní rovnice je dvouparametrická, tato metoda vyžaduje vnesení tří parametrů a proto potřebuje více datových bodů než nelineární regrese prováděná s daty, která jsou normalizována pomocí předem stanovené kontrolní odezvy.

Inverzní intervaly spolehlivosti

Výpočet nelineárních regresních intervalů spolehlivosti inverzním odhadem je poněkud komplikovaný a není to dostupná standardní možnost v běžných balících statistických počítačových programů. Přibližné intervaly spolehlivosti lze získat pomocí standardních programů nelineární regrese s opakovanou parametrizací (Bruce a Versteeg, 1992), což zahrnuje přepisování matematické rovnice za použití požadovaných odhadů bodů, např. EC_{10} a EC_{50} jakožto parametrů, které se mají odhadnout. (Nechť je funkce I = f (α, β, koncentrace); využijte definiční vztahy f (α, β, EC_{10}) = 0,1 a f (α, β, EC_{50}) = 0,5 k nahrazení f (α, β, koncentrace) ekvivalentní funkcí g (EC_{10}, EC_{50}, koncentrace).

Přímější výpočet (Andersen a kol. 1998) se provádí zachováním původní rovnice a použitím Taylorova rozvoje okolo středních hodnot r_i a r_0.

V poslední době začaly být oblíbené metody „bootstrap“ (metody postupného výpočtu). Tyto metody používají naměřené údaje a častý opakovaný odběr vzorků určovaný generátorem náhodných čísel pro odhad empirické distribuce rozptylů.

LITERATURA

Kooijman, S.A.L.M.; Hanstveit, A.O.; Nyholm, N. (1996): No-effect concentrations in algal growth inhibition tests. *Water Research*, 30, 1625-1632.

Draper, N.R. and Smith, H. (1981). Applied Regression Analysis, second edition. Wiley, New York.

Bruce, R..D. and Versteeg,, D.J. (1992). A Statistical Procedure for Modelling Continuous Ecotoxicity Data. *Environ. Toxicol. Chem.* 11, 1485-1494.

Andersen, J.S., Holst, H., Spliid, H., Andersen, H., Baun, A. & Nyholm, N. (1998). Continuous ecotoxicological data evaluated relative to a control response. *Journal of Agricultural, Biological and Environmental Statistics*, 3, 405-420.

▼B

C.4. STANOVENÍ „SNADNÉ“ BIOLOGICKÉ ROZLOŽITELNOSTI

ČÁST I. OBECNÉ ÚVAHY

I.1. ÚVOD

Je popsáno šest metod, které umožňují screeningové posouzení snadné biologické rozložitelnosti chemických látek v aerobním vodním prostředí:

a) zkouška na úbytek rozpuštěného organického uhlíku (DOC) (metoda C.4-A);

b) modifikovaná screeningová zkouška OECD – na úbytek DOC (metoda C.4-B);

c) zkouška na uvolňování oxidu uhličitého (CO_2) (modifikovaná Sturmova zkouška) (metoda C.4-C);

d) zkouška manometrickou respirometrií (metoda C.4-D);

e) zkouška v uzavřených lahvičkách (metoda C.4-E);

f) zkouška MITI (Ministerstvo zahraničního obchodu a průmyslu – Japonsko) (metoda C.4-F).

Obecné a společné úvahy pro všech šest zkoušek jsou uvedeny v části I metody. Specifické body jednotlivých metod jsou uvedeny v částech II až VII. Dodatky obsahují definice, vzorce a návody.

Mezilaboratorní srovnávací test OECD provedený v roce 1988 ukázal, že metody poskytují shodné výsledky. V závislosti na fyzikálním charakteru látky, která má být zkoušena, se však může dávat přednost určité metodě.

I.2. VÝBĚR VHODNÉ METODY

Pro volbu nejvhodnější metody jsou nezbytné informace o rozpustnosti, tenzi par a o adsorpčních vlastnostech chemické látky. Pro výpočet teoretických hodnot a/nebo ověření naměřených hodnot parametrů, např. TSK, TCO_2, DOC, TOC, CHSK (viz dodatky 1 a 2) je nutné znát chemickou strukturu nebo vzorec.

Zkoušené chemické látky, jejichž rozpustnost ve vodě je alespoň 100 mg/l, lze zkoušet všemi metodami za předpokladu, že netěkají a neadsorbují se. Pro látky špatně rozpustné ve vodě, které těkají nebo se adsorbují, jsou vhodné metody uvedené v tabulce 1. Způsob, jakým je třeba zacházet s látkami špatně rozpustnými ve vodě a s látkami těkavými, je popsán v dodatku 3. Mírně těkavé látky je možno zkoušet metodou úbytku DOC, pokud je ve zkušebních nádobách (které musí být vhodně uzavřeny) dostatečně velký prostor pro plyn. V tomto případě musí být provedena abiotická kontrola pro zohlednění případné fyzikální ztráty.

▼B

Tabulka 1

Použitelnost zkušebních metod

Zkouška	Analytická metoda	Vhodnost pro látky		
		špatně rozpustné	těkavé	adsorbující se
na úbytek DOC	rozpuštěný organický uhlík	-	-	+/-
modif. zkouška OECD – na úbytek DOC	rozpuštěný organický uhlík	-	-	+/-
na uvolňování CO_2	respirometrie: uvolňování CO_2	+	-	+
manometrická respirometrie	manometrická respirome-trie: spotřeba kyslíku	+	+/-	+
zkouška v uzavřených lahvičkách	respirometrie: rozpuštěný kyslík	+/-	+	+
MITI	respirometrie: spotřeba kyslíku	+	+/-	+

Pro interpretaci získaných výsledků, zejména pokud jsou výsledky nízké nebo marginální, se vyžadují informace o čistotě nebo relativních podílech hlavních složek zkoušeného materiálu.

Pro volbu vhodných zkušebních koncentrací mohou být velmi užitečné informace o toxicitě zkoušené chemické látky pro bakterie (dodatek 4); tyto informace mohou být důležité pro správnou interpretaci nízkých hodnot biologického rozkladu.

I.3. REFERENČNÍ LÁTKY

Pro ověření postupu se souběžně se zkouškou a ve vlastní baňce zkoušejí referenční chemické látky, které splňují kritéria snadné biologické rozložitelnosti.

Vhodnými chemickými látkami jsou anilin (čerstvě předestilovaný), natriumacetát, natriumbenzoát. Všechny tyto referenční chemické látky se za podmínek v uvedených metodách rozkládají, i když se záměrně nepřidá žádné inokulum.

Byl podán návrh hledat referenční chemickou látku, která by byla snadno rozložitelná, avšak vyžadovala by přidání inokula. Navržen byl kaliumhydrogenftalát. O této látce je třeba ještě získat více údajů, než ji bude možné přijmout jako referenční látku.

V respirometrických zkouškách mohou v důsledku nitrifikace ovlivnit spotřebu kyslíku látky obsahující dusík (viz dodatky 2 a 5).

I.4. PODSTATA ZKUŠEBNÍCH METOD

Roztok nebo suspense zkoušené látky v minerálním prostředí se inokuluje a kultivuje v aerobních podmínkách v temnu nebo v difuzním světle. Množství DOC ve zkušebním roztoku pocházející z inokula se musí udržovat ve srovnání s DOC pocházejícího ze zkoušené látky co nejnižší. Endogenní aktivita inokula se zohlední na základě souběžné slepé zkoušky s inokulem, avšak bez zkoušené látky, třebaže endogenní aktivita buněk v přítomnosti látky přesně neodpovídá aktivitě v endogenní kontrolní zkoušce. Za účelem kontroly postupu se souběžně provádí zkouška s referenční látkou.

▼B

Obecně se rozklad sleduje stanovením parametrů jako DOC, tvorba CO_2 nebo spotřeba kyslíku a měření se provádějí v dostatečně krátkých intervalech, aby bylo možné identifikovat začátek a konec biologického rozkladu. Měření automatickými respirometry je kontinuální. Někdy se doplňkově k jinému parametru měří DOC, avšak obvykle pouze na začátku a na konci zkoušky. Lze rovněž použít specifickou chemickou analýzu, kterou se vyhodnotí primární rozklad zkoušené látky nebo kterou se stanoví koncentrace kteréhokoli vzniklého meziproduktu (ve zkoušce MITI povinné).

Zkouška obvykle trvá 28 dnů. Je však možné ukončit měření před uplynutím 28 dní, tj. jakmile vykazuje křivka biologického rozkladu plató po tři po sobě následující měření. Je také možné měření po 28 dnech prodloužit, jestliže z křivky vyplývá, že biologický rozklad začal, avšak 28. dne ještě nebylo ještě dosaženo plató.

I.5. KRITÉRIA JAKOSTI

I.5.1. **Reprodukovatelnost**

Vzhledem k charakteru biologického rozkladu a směsných populací bakterií používaných jako inokula se stanovení provádějí nejméně duplicitně.

Je obecně známo, že čím vyšší je koncentrace mikroorganismů přidaných na počátku do zkušebního média, tím menší jsou rozdíly mezi vícenásobnými měřeními. Okružní testy rovněž ukázaly, že mezi výsledky získanými různými laboratořemi mohou být velké rozdíly, avšak u snadno biologicky rozložitelných sloučenin se obvykle dosahuje dobré shody.

I.5.2. **Platnost zkoušky**

Zkouška se považuje za platnou, je-li na konci zkoušky nebo popřípadě na konci 10denního období rozkladu rozdíl hodnot krajních výsledků vícenásobných měření rozkladu zkoušené chemické látky v oblasti plató křivky menší než 20 % a dosáhl-li stupeň rozkladu referenční látky vyjádřený v procentech úrovně snadné biologické rozložitelnosti do 14 dní. Není-li splněna kterákoli z těchto podmínek, měření se opakuje. Vzhledem k náročnosti metod neznamenají nízké hodnoty nutně skutečnost, že zkoušená látka není v podmínkách životního prostředí biologicky rozložitelná, ale znamenají, že k prokázání biologické rozložitelnosti jsou třeba další studie.

Jestliže ve zkoušce toxicity zahrnující jak zkoušenou látku, tak referenční chemickou látku došlo během 14 dnů k méně než 35 % rozkladu (stanoveného podle DOC) nebo k méně než 25 % rozkladu (stanoveného podle TSK nebo TCO_2), lze zkoušené chemické látky považovat za inhibující (viz také dodatek 4). Série zkoušek by měla být opakována, pokud možno s nižší koncentrací zkoušené chemické látky a/nebo s vyšší koncentrací inokula, avšak ne s koncentrací vyšší než 30 mg pevných látek v litru.

I.6. OBECNÉ POSTUPY A PŘÍPRAVA

Obecné podmínky pro zkoušky jsou shrnuty v tabulce 2. Přístroje a další experimentální podmínky specifické pro jednotlivé metody jsou popsány dále v kapitolách pro tyto příslušné metody.

▼B

Tabulka 2

Zkušební podmínky

Zkouška	Zkouška na úbytek DOC	Zkouška na uvolňování CO_2	Manometrická respirometrie	Modif. screeningová zkouška OECD	Zkouška v uzavřených lahvičkách	Zkouška MITI (I)
Koncentrace zkoušené látky					2–10	100
mg/l			100			
mg DOC/l	10–40	10–20		10–40		
mg TSK/l			50–100		5–10	
Koncentrace inokula (buňky/1, přibližně)	≤ 30 mg/l SL nebo ≤ 100 ml odpadní vody/l (10^7–10^8)			0,5 ml sekundární odpadní vody/l (10^5)	≤ 5 ml odpadní vody/l (10^4–10^6)	30 mg/l SL (10^7–10^8)
Koncentrace prvků v minerálním médiu (v mg/l)						
P	116				11,6	29
N	1,3				0,13	1,3
Na	86				8,6	17,2
K	122				12,2	36,5
Mg	2,2				2,2	6,6
Ca	9,9				9,9	29,7
Fe	0,05-0,1				0,05-0,1	0,15
pH	7,4 ± 0,2					nejlépe 7,0
Teplota	22 ± 2 °C					25 ± 1 °C

DOC = rozpuštěný organický uhlík, TSK = teoretická spotřeba kyslíku, SL = suspendované látky

I.6.1. **Ředicí voda**

Používá se deionizovaná nebo destilovaná voda neobsahující inhibující koncentrace toxických látek (např. ionty Cu^{2+}). Voda smí obsahovat nejvýše 10 % obsahu organického uhlíku vneseného zkoušeným materiálem. Vysoká čistota vody pro zkoušky je nezbytná proto, aby se nevyskytovaly vysoké hodnoty slepého pokusu. Kontaminace může pocházet z vlastních přítomných nečistot, z materiálu měniče iontů, z rozkladných látek z bakterií a řas. Pro každou sérii měření se použije pouze jedna šarže vody, která byla předem překontrolována analýzou DOC. Tato kontrola není nutná u zkoušky v uzavřených lahvičkách, spotřeba kyslíku vodou však musí být nízká.

▼B

I.6.2. **Zásobní roztoky minerálních složek**

Pro přípravu zkušebních roztoků se připraví zásobní roztoky o vhodných koncentracích minerálních složek. Níže uvedené zásobní roztoky je možné použít (při různých zřeďovacích faktorech) pro metodu s úbytkem DOC, modifikovanou screeningovou metodu OECD, metodu s uvolňováním CO_2, pro manometrickou respirometrii a pro metodu s uzavřenými lahvičkami.

Zřeďovací faktory a specifická příprava minerálního media pro zkoušku MITI jsou uvedeny v oddílech pro jednotlivé zkoušky.

Zásobní roztoky:

Za použití reakčních činidel čistoty p.a. se připraví tyto zásobní roztoky:

a) Dihydrogenfosforečnan draselný, KH_2PO_4 8,50 g

Hydrogenfosforečnan didraselný, K_2HPO_4 21,75 g

Hydrogenfosforečnan disodný dihydrát, $Na_2HPO_4 . 2 H_2O$ 33,40 g

Chlorid amonný, NH_4Cl 0,50 g

Rozpustí se ve vodě a doplní na 1 litr. pH roztoku musí být 7,4.

b) Chlorid vápenatý bezvodý, $CaCl_2$ 27,50 g

nebo chlorid vápenatý dihydrát, $CaCl_2, 2 H_2O$ 36,40 g

Rozpustí se ve vodě a doplní na 1 litr.

c) Síran hořečnatý heptahydrát, $MgSO_4 . 7H_2O$ 22,50 g

Rozpustí se ve vodě a doplní na 1 litr.

d) Chlorid železitý hexahydrát, $FeC1_3 . 6H_2O$ 0,25 g

Rozpustí se ve vodě a doplní na 1 litr.

Poznámka: Aby nebylo nutné připravovat tento roztok bezprostředně před použitím, přidá se jedna kapka koncentrované kyseliny chlorovodíkové nebo 0,4 g disodné soli kyseliny ethylendiamintetraoctové (EDTA) na 1 litr.

I.6.3. **Zásobní roztoky chemických látek**

Pokud je rozpustnost vyšší než 1 g/l, rozpustí se například 1–10 g (podle potřeby) zkoušené nebo referenční látky v deionizované vodě a doplní se na 1 litr. Jinak se zásobní roztoky připravují v minerálním médiu, nebo se chemická látka přidá přímo do minerálního média. Pokud jde o postup s méně rozpustnými chemickými látkami, viz dodatek 3; ve zkoušce MITI (metoda C.4-F) se nepoužívají ani rozpouštědla, ani emulgační činidla.

▼B

I.6.4. **Inokula**

Inokulum lze získat z řady zdrojů: z aktivovaného kalu, ze splaškových vod (nechlorovaných), z povrchových vod a půd nebo z jejich směsi. Používá-li se aktivovaný kal ve zkoušce na úbytek DOC, na uvolňování CO_2 a ve zkoušce manometrickou respirometrií, měl by být odebrán z čistírny nebo z laboratorní jednotky čistící převážně domovní odpadní vody. U inokulí z jiných zdrojů byl zjištěn větší rozptyl výsledků. V modifikované screeningové zkoušce OECD a ve zkoušce v uzavřených lahvičkách je potřebné zředěnější inokulum bez vloček kalu a nejvhodnějším zdrojem je voda z druhého stupně čistírny domovních odpadních vod nebo z laboratorní jednotky. Pro zkoušku MITI se inokulum získává ze směsi zdrojů a je popsáno v oddílu věnovaném této zkoušce.

I.6.4.1. *Inokulum z aktivovaných kalů*

Odebere se čerstvý vzorek aktivovaného kalu z aerační nádrže čistírny odpadních vod nebo laboratorní jednotky čistící převážně domovní odpadní vody. Podle potřeby se filtrací přes jemné síto odstraní hrubé částice a kal se udržuje v aerobních podmínkách.

Jinou možností je usazení nebo odstředění (např. 10 minut při 1 100 g) po odstranění hrubých částic. Voda nad usazeninou se odstraní. Kal se promyje minerálním médiem. Koncentrovaný kal se suspenduje v minerálním médiu na koncentraci 3–5 g suspendovaných pevných látek na litr a až do použití se provzdušňuje.

Kal by měl být odebrán z dobře fungující konvenční čistírny. Je-li nutné odebrat kal z čistírny s vysokým výkonem nebo předpokládá-li se, že kal obsahuje inhibitory, je třeba jej promýt. Po důkladném promíchání se kal nechá usadit nebo se odstředí, voda nad usazeninou se odstraní a promytý kal se opět suspenduje v nové dávce minerálního média. Tento postup se opakuje, dokud se kal nepovažuje za prostý přebytečného substrátu nebo inhibitoru.

Po opakovaném suspendování nebo z neupravovaného kalu se těsně před použitím odebere vzorek pro stanovení hmotnosti sušiny suspendovaných pevných látek.

Další možností je homogenizace aktivovaného kalu (3–5 g suspendovaných látek v litru). Kal se 2 minuty zpracovává v mechanickém mísiči při střední rychlosti. Promíchaný kal se nechá 30 minut, popřípadě déle, usazovat a kapalina se dekantuje pro použití jako inokulum v koncentraci 10 ml/l minerálního média.

I.6.4.2. *Jiné zdroje inokula*

Inokulum lze získat z výstupu z druhého stupně čistírny odpadních vod nebo laboratorní jednotky zpracovávající převážně domovní odpadní vody. Odebere se čerstvý vzorek a během přepravy se udržuje v aerobních podmínkách. Nechá se 1 hodinu usadit nebo se zfiltruje přes hrubý filtrační papír a dekantovaná kapalina nebo filtrát se až do použití udržuje v aerobních podmínkách. Na litr média lze použít až 100 ml tohoto typu inokula.

▼B

Dalším zdrojem inokula je povrchová voda. V tomto případě se odebere vzorek vhodné povrchové vody, např. říční nebo jezerní vody, a uchovává se až do použití v aerobních podmínkách. V případě potřeby se inokulum zkoncentruje filtrací nebo odstředěním.

I.6.5. **Předběžná úprava inokulí**

Inokula je možné předběžně upravit pro experimentální podmínky, ale nikoli předběžně adaptovat na zkušenou látku. Předběžná úprava spočívá v aeraci aktivovaného kalu v minerálním médiu nebo výstupu z druhého stupně čistírny po dobu 5–7 dnů při zkušební teplotě. Předběžná úprava někdy zlepší přesnost zkušebních metod snížením hodnot ze slepých pokusů. Předúprava inokula pro zkoušku MITI se nepovažuje za nutnou.

I.6.6. **Abiotické kontroly**

V případě potřeby se kontroluje možný abiotický rozklad zkoušené látky stanovením úbytku DOC, příjmu kyslíku nebo uvolňování oxidu uhličitého ve sterilních kontrolách bez inokula. Sterilizace se provádí filtrací přes membránu (0,2–0,45 μm) nebo přidáním vhodné toxické látky v odpovídající koncentraci. Používá-li se membránová filtrace, odebírají se vzorky asepticky, aby byla zachována sterilita. Pokud nebyla předem vyloučena adsorpce zkoušené látky, měly by zkoušky, kterými se sleduje biologický rozklad podle úbytku DOC, zejména při použití inokula z aktivovaného kalu, zahrnovat abiotickou kontrolu, která je inokulována a intoxikována.

I.6.7. **Počet nasazených baněk**

Počet nasazených baněk v typické zkoušce je uveden v oddílech věnovaných jednotlivým zkouškám.

Mohou být použity tyto baňky:

— zkušební suspense: obsahující zkoušenou látku a inokulum,

— slepá zkouška s inokulem: obsahující pouze inokulum,

— kontrolní zkouška postupu: obsahující referenční látku a inokulum,

— abiotická sterilní kontrola: sterilní, obsahující zkoušenou látku (viz I.6.6),

— kontrola adsorpce: obsahující zkoušenou látku, inokulum a sterilizační činidlo,

— kontrola toxicity: obsahující zkoušenou látku, referenční látku a inokulum.

Stanovení ve zkušební suspensi a slepý pokus s inokulem musí být prováděny souběžně. Doporučuje se, aby stanovení v ostatních baňkách bylo prováděno rovněž souběžně.

To však nemusí být vždy možné. Je třeba zajistit, aby se odebíral dostatečný počet vzorků nebo aby se prováděl dostatečný počet odečtů pro vyhodnocení procenta úbytku v 10denním období rozkladu.

▼B

I.7. DATA A HODNOCENÍ

Při výpočtu rozkladu v procentech D_t se použijí střední hodnoty z měření parametru provedených duplicitně v obou zkušebních nádobách a ze slepého pokusu s inokulem.Vzorce jsou uvedeny dále v oddílech pro jednotlivé zkoušky. Průběh rozkladu se znázorní graficky a vyznačí se 10denní období rozkladu. Vypočte se a uvede úbytek v procentech dosažený na konci 10denního období rozkladu a hodnota pro plató křivky nebo popřípadě hodnota odpovídající konci zkoušky.

V respirometrických zkouškách mohou v důsledku nitrifikace ovlivnit spotřebu kyslíku látky obsahující dusík (viz dodatky 2 a 5).

I.7.1. **Měření rozkladu prostřednictvím stanovení DOC**

Za účelem posouzení platnosti zkoušky (viz I.5.2) by se měla hodnota rozkladu D_t v procentech v každém časovém okamžiku, ve kterém se odebral vzorek, vypočítat odděleně pro každou baňku obsahující zkoušenou látku, a to pomocí středních hodnot měření DOC provedených duplicitně. Vypočte se podle této rovnice:

$$D_t = \left(1 - \frac{C_t - C_{bt}}{C_o - C_{bo}}\right) \times 100$$

kde:

D_t = rozklad v procentech v čase t,

C_o = střední počáteční koncentrace DOC v inokulovaném kultivačním médiu obsahujícím zkoušenou látku (v mg DOC na litr),

C_t = střední koncentrace DOC v inokulovaném kultivačním médiu obsahujícím zkoušenou látku v čase t (v mg DOC na litr),

C_{bo} = střední počáteční koncentrace DOC ve slepém inokulovaném minerálním médiu (v mg DOC na litr),

C_{bt} = střední koncentrace DOC ve slepém inokulovaném minerálním médiu v čase t (v mg DOC na litr).

Všechny koncentrace se stanoví experimentálně.

I.7.2. **Rozklad měřený specifickou analýzou**

Je-li možné získat specifické analytické údaje, vypočte se primární biologický rozklad z rovnice:

$$D_t = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

kde:

D_t = rozklad v procentech v čase t, obvykle po 28 dnech,

S_a = zbylé množství zkoušené látky v médiu s inokulem na konci zkoušky (mg),

S_b = zbylé množství zkoušené látky ve slepém pokusu s vodou/médiem, do kterých byla přidána pouze zkoušená látka (mg).

▼B

1.7.3. **Abiotický rozklad**

Použije-li se abiotická sterilní kontrola, vypočte se abiotický rozklad v procentech podle rovnice:

$$\text{abiotický rozklad v\%} = \frac{C_{s(o)} - C_{s(t)}}{C_{s(o)}} \times 100$$

kde:

$C_{s(o)}$ = koncentrace DOC ve sterilní kontrole v den 0,

$C_{s(t)}$ = koncentrace DOC ve sterilní kontrole v den t.

I.8. ZPRÁVY

Protokol o zkoušce má pokud možno obsahovat tyto údaje:

— zkoušené a referenční chemické látky a jejich čistota,

— zkušební podmínky,

— inokulum: charakter a místo/místa odběru, koncentrace a jakákoli předúprava,

— podíl a charakter průmyslového odpadu obsaženého v odpadní vodě, jsou-li známy,

— délka zkoušky a teplota,

— v případě špatně rozpustných zkoušených látek použitý způsob zpracování,

— použitá zkušební metoda; měly by být uvedeny vědecké důvody a vysvětlení pro veškeré změny postupu,

— přehled dat,

— veškeré pozorované projevy inhibice,

— jakýkoli pozorovaný abiotický rozklad,

— specifická analytická data o chemické látce, pokud existují,

— analytická data o meziproduktech, pokud existují,

— graf závislosti rozkladu v procentech na čase pro zkoušenou a referenční látku; je třeba zřetelně označit fázi iniciace, fázi rozkladu, 10denní období rozkladu a směrnici (dodatek 1). Vyhovuje-li zkouška kritériím jakosti, je možné v grafu použít střední hodnotu rozkladu v procentech v baňkách obsahujících zkoušenou látku,

— rozklad v procentech po 10denním období rozkladu, v oblasti plató a na konci zkoušky.

ČÁST II. **ZKOUŠKA NA ÚBYTEK DOC** (metoda C.4-A)

II.1. PODSTATA METODY

Odměřený objem inokulovaného minerálního média obsahujícího známou koncentraci zkoušené látky (10–40 mg DOC na litr) jako nominální jediný zdroj organického uhlíku se provzdušňuje v temnu nebo v difusním světle při 22 ± 2 °C.

▼B

Rozklad se sleduje v krátkých intervalech během 28denního období prostřednictvím analýzy DOC. Stupeň biologického rozkladu se vypočte vyjádřením koncentrace rozloženého DOC (opravené na koncentraci DOC ve slepé zkoušce s inokulem) v procentech koncentrace, která byla přítomna na začátku. Stupeň primárního biologického rozkladu lze rovněž vypočítat z doplňkové chemické analýzy provedené na začátku a na konci kultivace.

II.2. POPIS METODY

II.2.1. **Aparatura**

a) Erlenmeyerovy baňky, např. 250 ml až 2 litry, podle objemu potřebného pro analýzu DOC;

b) třepačka upravená pro umístění Erlenmeyerových baněk, buď s automatickou regulací teploty nebo používaná v místnosti s konstantní teplotou, a s dostatečným výkonem pro udržení aerobních podmínek ve všech baňkách;

c) filtrační aparatura s vhodnými membránami;

d) analyzátor DOC;

e) přístroj pro stanovení rozpuštěného kyslíku;

f) odstředivka.

II.2.2. **Příprava minerálního média**

Příprava zásobních roztoků je popsána v bodě I.6.2.

Smísí se 10 ml roztoku a) s 800 ml ředicí vody, přidá se po 1 ml roztoků b) až d) a doplní se ředicí vodou na 1 litr.

II.2.3. **Příprava a předběžná úprava inokula**

Inokulum lze získat z řady zdrojů: z aktivovaného kalu, ze splaškových vod, z povrchových vod, z půd nebo z jejich směsi.

Viz I.6.4, I.6.4.1, I.6.4.2 a I.6.5.

II.2.4. **Příprava baněk**

Do dvoulitrových Erlenmeyerových baněk se například odměří 800 ml minerálního média a do jednotlivých baněk se přidají dostatečná množství zásobních roztoků zkoušené a referenční látky tak, aby se získaly koncentrace látky odpovídající 10–40 mg DOC na litr. Zkontrolují se hodnoty pH a popřípadě se upraví na 7,4. Baňky se inokulují aktivovaným kalem nebo jiným zdrojem inokula (viz I.6.4.), aby se získala výsledná koncentrace nejvýše 30 mg suspendovaných látek na litr. Připraví se rovněž kontroly s inokulem v minerálním médiu, avšak bez zkoušené nebo referenční látky.

Podle potřeby se použije jedna nádoba ke kontrole možného inhibičního účinku zkoušené látky inokulací roztoku, který obsahuje srovnatelná množství jak zkoušené, tak referenční chemické látky v minerálním médiu.

Podle potřeby se také použije další, sterilní baňka s roztokem chemické látky bez inokula, a to ke kontrole, zda se zkoušená chemická látka rozkládá abioticky (viz I.6.6).

▼B

Existuje-li dále podezření, že se zkoušená látka významně adsorbuje na skle, kalu apod., provede se předběžný odhad pravděpodobného rozsahu adsorpce, a tedy vhodnosti zkoušky pro danou látku (viz tabulka 1). Nasadí se baňka obsahující zkoušenou látku, inokulum a sterilizační činidlo.

Obsah všech baněk se doplní minerálním médiem na 1 litr a po promíchání se z každé baňky odebere vzorek pro stanovení počáteční koncentrace DOC (viz bod 4 dodatku 2). Ústí baněk se zakryjí např. hliníkovou fólií tak, aby byla umožněna volná výměna vzduchu mezi baňkami a okolní atmosférou. Baňky se poté umístí do třepačky a zahájí se zkouška.

II.2.5. **Počet baněk v typické zkoušce**

Baňka 1 a 2: Zkušební suspense

Baňka 3 a 4: Slepá zkouška s inokulem

Baňka 5: Kontrolní zkouška postupu

Dále se doporučují nebo se podle potřeby použijí:

Baňka 6: Abiotická sterilní kontrola

Baňka 7: Kontrola adsorpce

Baňka 8: Kontrola toxicity

Viz také bod I.6.7.

II.2.6. **Provedení zkoušky**

Během zkoušky se ve známých časových intervalech duplicitně stanovuje koncentrace DOC v každé baňce, a to dostatečně často, aby bylo možné určit začátek 10denního období rozkladu a úbytek v procentech na konci 10denního období rozkladu. Pro každé stanovení se odebere pouze minimální nezbytné množství zkušební suspense.

Před každým odběrem vzorků se podle potřeby nahradí ztráty odpařováním z baněk přidáním potřebného množství ředicí vody (1.6.1). Před odběrem vzorků se kultivační médium dobře promíchá a zajistí se, aby látky ulpělé na stěnách nádob přešly do roztoku nebo suspense. Vzorky se ihned po odběru zfiltrují přes membránu nebo odstředí (viz bod 4 dodatku 2). Zfiltrované nebo odstředěné vzorky se analyzují týž den, v opačném případě se uchovávají nejdéle 48 hodin při 2–4 °C nebo delší dobu při teplotě nižší než –18 °C.

II.3. ÚDAJE A PŘEDKLÁDÁNÍ ZPRÁV

II.3.1. **Zpracování výsledků**

Rozklad v procentech v čase t se vypočte podle bodu I.7.1 (stanovení DOC) nebo podle bodu I.7.2 (specifická analýza).

Všechny výsledky se uvedou na příslušných formulářích přehledu dat.

▼B

II.3.2. **Platnost výsledků**

Viz bod I.5.2.

II.3.3. **Zprávy**

Viz bod I.8.

II.4. PŘEHLED DAT

Dále je uveden příklad přehledu dat.

ZKOUŠKA NA ÚBYTEK DOC

1. **LABORATOŘ**

2. **DATUM POČÁTKU ZKOUŠKY**

3. **ZKOUŠENÁ LÁTKA**

Název:

Koncentrace chemické látky v zásobním roztoku: mg/l

Počáteční koncentrace chemické látky v médiu v čase t_0: mg/l

4. **INOKULUM**

Zdroj:

Provedená úprava:

Předběžná úprava, pokud byla provedena:

Koncentrace suspendovaných látek v reakční směsi: mg/l

5. **STANOVENÍ UHLÍKU**

Analyzátor uhlíku:

	Baňka č.		DOC po n dnech (mg/l)				
			0	n_1	n_2	n_3	n_x
Zkoušená látka a inokulum	1	a_1					
		a_2					
		a, střední hodnota $C_{a(t)}$					
	2	b_1					
		b_2					
		b, střední hodnota $C_{b(t)}$					

▼B

	Baňka č.		DOC po n dnech (mg/l)				
			0	n_1	n_2	n_3	n_x
Slepá zkouška s inokulem bez zkoušené látky	3	c_1					
		c_2					
		c, střední hodnota $C_{c(t)}$					
	4	d_1					
		d_2					
		d, střední hodnota $C_{d(t)}$					
	$C_{bl(t)} = \frac{C_{c(t)} + C_{d(t)}}{2}$						

6. **VYHODNOCENÍ NAMĚŘENÝCH DAT**

Baňka č.		Rozklad v % po n dnech				
		0	n_1	n_2	n_3	n_x
1	$D_1 = \left(1 - \frac{C_{a(t)} - C_{bl(t)}}{C_{a(o)} - C_{bl(o)}}\right) \times 100$	0				
2	$D_2 = \left(1 - \frac{C_{b(t)} - C_{bl(t)}}{C_{b(o)} - C_{bl(o)}}\right) \times 100$	0				
Střední hodnota (*)	$D = \frac{D_1 - D_2}{2}$	0				

(*) Hodnoty D_1 a D_2 by neměly být průměrovány, pokud je mezi nimi významný rozdíl.

Poznámka: Podobné formuláře lze použít pro referenční chemickou látku a kontrolu toxicity.

7. **ABIOTICKÁ KONTROLA** (nepovinná)

	Čas (dny)	
	0	t
DOC (mg/l) ve sterilní kontrole	$C_{s(o)}$	$C_{s(t)}$

$$\text{abiotický rozklad v\%} = \frac{C_{s(o)} - C_{s(t)}}{C_{s(o)}} \times 100$$

8. **SPECIFICKÁ CHEMICKÁ ANALÝZA** (nepovinná)

	Zbylé množství zkoušené chemické látky na konci zkoušky (mg/l)	Primární rozklad v procentech
Sterilní kontrola	S_b	

▼B

	Zbylé množství zkoušené chemické látky na konci zkoušky (mg/l)	Primární rozklad v procentech
Inokulované zkušební médium	S_a	$\frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$

ČÁST III. **MODIFIKOVANÁ SCREENINGOVÁ ZKOUŠKA OECD** (metoda C.4-B)

III.1. PODSTATA METODY

Odměřený objem minerálního média obsahujícího známou koncentraci zkoušené látky (10–40 mg DOC na litr) jako jediný zdroj organického uhlíku se inokuluje 0,5 ml odpadní vody na litr média. Směs se provzdušňuje v temnu nebo v difusním světle při 22 ± 2 °C.

Rozklad se sleduje v krátkých intervalech během 28denního období prostřednictvím analýzy DOC. Stupeň biologického rozkladu se vypočte vyjádřením koncentrace rozloženého DOC (opravené na koncentraci DOC ve slepé zkoušce s inokulem) v procentech koncentrace, která byla přítomna na začátku. Stupeň primárního biologického rozkladu lze rovněž vypočítat z doplňkové chemické analýzy provedené na začátku a na konci inkubace.

III.2. POPIS METODY

III.2.1 Aparatura

a) Erlenmeyerovy baňky, např. 250 ml až 2 litry, podle objemu potřebného pro analýzu DOC;

b) třepačka pro umístění Erlenmeyerových baněk, buď s automatickou regulací teploty nebo používaná v místnosti s konstantní teplotou, a s dostatečným výkonem pro udržení aerobních podmínek ve všech baňkách;

c) filtrační aparatura s vhodnými membránami;

d) analyzátor DOC;

e) přístroj pro stanovení rozpuštěného kyslíku;

f) odstředivka.

III.2.2. **Příprava minerálního média**

Příprava zásobních roztoků je popsána v bodě I.6.2.

Smísí se 10 ml roztoku a) s 80 ml ředicí vody, přidá se po 1 ml roztoků b) až d) a doplní se ředicí vodou na 1 litr.

V této metodě se používá jako inokulum pouze 0,5 ml odpadní vody na litr, a proto je nutné do média dodat stopové prvky a růstové faktory. Toho se dosáhne přidáním 1 ml každého z dále uvedených roztoků na jeden litr výsledného média:

▼B

Roztok stopových prvků:

Síran manganatý tetrahydrát, $MnSO_4 . 4H_2O$	39,9 mg
Kyselina boritá, H_3BO_3	57,2 mg
Síran zinečnatý heptahydrát, $ZnSO_4 . 7 H_2O$	42,8 mg
Heptamolybdenan hexaamonný, $(NH_4)_6 Mo_7O_{24}$	34,7 mg
Chelát Fe ($FeCl_3$ s kyselinou ethylendiamintetraoctovou)	100,0 mg

Rozpustí se v ředicí vodě a doplní se touto vodou na 1 000 ml.

Vitaminový roztok:

Kvasničný extrakt	15,0 mg

Kvasničný extrakt se rozpustí ve 100 ml vody. Sterilizuje se průchodem membránou 0,2 μm, nebo se připraví čerstvě.

III.2.3. **Příprava a předběžná úprava inokula**

Inokulum lze získat z výstupu z druhého stupně čistírny odpadních vod nebo laboratorní jednotky zpracovávající převážně domovní odpadní vody. Viz I.6.4.2 a I.6.5.

Použije se 0,5 ml na litr minerálního média.

III.2.4. **Příprava baněk**

Do dvoulitrových Erlenmeyerových baněk se například odměří 800 ml minerálního média a do jednotlivých baněk se přidají dostatečná množství zásobních roztoků zkoušené a referenční látky tak, aby se získaly koncentrace látky odpovídající 10–40 mg DOC na litr. Zkontrolují se hodnoty pH a popřípadě se upraví na 7,4. Baňky se inokulují odpadní vodou z druhého stupně čištění odpadních vod (viz I.6.4.2) v objemu 0,5 ml na litr. Připraví se rovněž kontroly s inokulem v minerálním médiu, avšak bez zkoušené nebo referenční látky.

Podle potřeby se použije jedna nádoba ke kontrole možného inhibičního účinku zkoušené látky inokulací roztoku, který obsahuje srovnatelná množství jak zkoušené, tak referenční chemické látky v minerálním médiu.

Podle potřeby se také použije další, sterilní baňka s roztokem chemické látky bez inokula, a to ke kontrole, zda se zkoušená chemická látka rozkládá abioticky (viz I.6.6).

Existuje-li dále podezření, že se zkoušená látka významně adsorbuje na skle, kalu apod., provede se předběžný odhad pravděpodobného rozsahu adsorpce, a tedy vhodnosti zkoušky pro danou látku (viz tabulka 1). Nasadí se baňka obsahující zkoušenou látku, inokulum a sterilizační činidlo.

Obsah všech baněk se doplní minerálním médiem na 1 litr a po promíchání se z každé baňky odebere vzorek pro stanovení počáteční koncentrace DOC (viz bod 4 dodatku 2). Ústí baněk se zakryjí např. hliníkovou fólií tak, aby byla umožněna volná výměna vzduchu mezi baňkami a okolní atmosférou. Baňky se poté umístí do třepačky a zahájí se zkouška.

▼B

III.2.5. **Počet baněk v typické zkoušce**

Baňka 1 a 2: Zkušební suspense

Baňka 3 a 4: Slepá zkouška s inokulem

Baňka 5: Kontrolní zkouška postupu

Dále se doporučují nebo se podle potřeby použijí:

Baňka 6: Abiotická sterilní kontrola

Baňka 7: Kontrola adsorpce

Baňka 8: Kontrola toxicity

Viz také bod I.6.7.

III.2.6. **Provedení zkoušky**

Během zkoušky se ve známých časových intervalech duplicitně stanovuje koncentrace DOC v každé baňce, a to dostatečně často, aby bylo možné určit začátek 10denního období rozkladu a úbytek v procentech na konci 10denního období rozkladu. Pro každé stanovení se odebere pouze minimální nezbytné množství zkušební suspense.

Před každým odběrem vzorků se podle potřeby nahradí ztráty odpařováním z baněk přidáním potřebného množství ředicí vody (1.6.1). Před odběrem vzorků se kultivační médium dobře promíchá a zajistí se, aby látky ulpělé na stěnách nádob přešly do roztoku nebo suspense. Vzorky se ihned po odběru zfiltrují přes membránu nebo odstředí (viz bod 4 dodatku 2). Zfiltrované nebo odstředěné vzorky se analyzují týž den, v opačném případě se uchovávají nejdéle 48 hodin při 2–4 °C nebo delší dobu při teplotě nižší než –18 °C.

III.3. ÚDAJE A PŘEDKLÁDÁNÍ ZPRÁV

III.3.1. **Zpracování výsledků**

Rozklad v procentech v čase t se vypočte podle bodu I.7.1 (stanovení DOC) nebo podle bodu I.7.2 (specifická analýza).

Všechny výsledky se uvedou na příslušných formulářích přehledu dat.

III.3.2 Platnost výsledků

Viz bod I.5.2.

III.3.3 Zprávy

Viz bod I.8.

III.4. PŘEHLED DAT

Dále je uveden příklad přehledu dat.

MODIFIKOVANÁ SCREENINGOVÁ ZKOUŠKA OECD

1. **LABORATOŘ**

2. **DATUM POČÁTKU ZKOUŠKY**

▼B

3. **ZKOUŠENÁ LÁTKA**

Název:

Koncentrace chemické látky v zásobním roztoku: … mg/l

Počáteční koncentrace chemické látky v médiu v čase t_0: … mg/l

4. **INOKULUM**

Zdroj:

Provedená úprava:

Předběžná úprava, pokud byla provedena:

Koncentrace suspendovaných látek v reakční směsi: … mg/l

5. **STANOVENÍ UHLÍKU**

Analyzátor uhlíku:

	Baňka č.		DOC po n dnech (mg/l)				
			0	n_1	n_2	n_3	n_x
Zkoušená látka a inokulutn	1	a_1					
		a_2					
		a, střední hodnota $C_{a(t)}$					
	2	b_1					
		b_2					
		b, střední hodnota $C_{b(t)}$					
Slepá zkouška s inokuletn bez zkoušené látky	3	c_1					
		C_2					
		c, střední hodnota $C_{c(t)}$					
	4	d_1					
		d_2					
		d, střední hodnota $C_{d(t)}$					
	$C_{bl(t)} = \frac{C_{c(t)} + C_{d(t)}}{2}$						

6. **VYHODNOCENÍ NAMĚŘENÝCH DAT**

Baňka č.		Rozklad po n dnech				
		0	n_1	n_2	n_3	n_x
1	$D_1 = \left(1 - \frac{C_{a(t)} - C_{bl(t)}}{C_{a(o)} - C_{bl(o)}}\right) \times 100$	0				

▼B

Baňka č.		Rozklad po n dnech				
		0	n_1	n_2	n_3	n_x
2	$D_2 = \left(1 - \frac{C_{b(t)} - C_{bl(t)}}{C_{b(o)} - C_{bl(o)}}\right) \times 100$	0				
Střední hodnota ([1])	$D = \frac{D_1 - D_2}{2}$	0				

([1]) Hodnoty D_1 a D_2 by neměly být průměrovány, pokud je mezi nimi významný rozdíl.

Poznámka: Podobné formuláře lze použít pro referenční chemickou látku a kontrolu toxicity.

7. **ABIOTICKÁ KONTROLA** (nepovinná)

	Cas (dny)	
	0	t
DOC (mg/l) ve sterilní kontrole	$C_{s(o)}$	$C_{s(t)}$

$$\text{abiotický rozklad v\%} = \frac{C_{s(o)} - C_{s(t)}}{C_{s(o)}} \times 100$$

8. **SPECIFICKÁ CHEMICKÁ ANALÝZA** (nepovinná)

	Zbylé množství zkoušené chemické látky na konci zkoušky (mg/l)	Primární rozklad v procentech
Sterilní kontrola	S_b	
Inokulované zkušební médium	S_a	$\frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$

ČÁST IV. ZKOUŠKA NA UVOLŇOVÁNÍ CO_2 (metoda C.4-C)

IV.1. PODSTATA METODY

Odměřený objem inokulovaného minerálního média obsahující známou koncentraci zkoušené látky (10–20 mg DOC nebo TOC na litr), která je jediným zdrojem uhlíku, se provzdušňuje v temnu nebo v difusním světle regulovaným proudem vzduchu bez CO_2. Rozklad se sleduje po dobu 28 dnů prostřednictvím vznikajícího CO_2 jímaného v roztoku hydroxidu barnatého nebo sodného, kde se stanoví titrací zbytkového hydroxidu nebo jako anorganický uhlík. Množství CO_2 vzniklého ze zkoušené látky (po korekci na CO_2 pocházející z čistého inokula) se vyjádří v procentech TCO_2. Stupeň biologického rozkladu může být také vypočten z doplňkového stanovení DOC na začátku a na konci inkubace.

▼B

IV.2. POPIS METODY

IV.2.1. **Přístroje a pomůcky**

a) baňky na 2–5 l vybavené provzdušňovací trubicí dosahující až ke dnu nádoby a výstupním otvorem;

b) magnetické míchačky pro zkoušení špatně rozpustných látek;

c) absorpční lahev;

d) zařízení pro regulaci a měření průtoku vzduchu;

e) zařízení pro odstraňování CO_2 při přípravě vzduchu bez CO_2, popřípadě může být použita směs kyslíku bez CO_2 a dusíku bez CO_2 ve správném poměru (20 % O_2 a 80 % N_2) z lahví se stlačenými plyny;

f) zařízení na stanovení CO_2 buď titračně nebo pomocí analyzátoru anorganického uhlíku;

g) zařízení pro membránovou filtraci (podle volby);

h) analyzátor DOC (podle volby).

IV.2.2. **Příprava minerálního média**

Příprava zásobních roztoků je popsána v bodě I.6.2.

Smísí se 10 ml roztoku a) s 800 ml ředicí vody, přidá se po 1 ml roztoků b) až d) a doplní se ředicí vodou na 1 litr.

IV.2.3. **Příprava a předběžná úprava inokula**

Inokulum lze získat z řady zdrojů: z aktivovaného kalu, ze splaškových vod, z povrchových vod, z půd nebo z jejich směsi.

Viz I.6.4, I.6.4.1, I.6.4.2 a I.6.5.

IV.2.4. **Příprava baněk**

Jako příklad jsou uvedeny hodnoty pro baňky na 5 litrů obsahující 3 litry suspense. V případě použití menších objemů se hodnoty úměrně upraví, musí být ovšem zajištěno, aby bylo možné přesně měřit vznikající CO_2.

Do každé baňky na 5 litrů se přenese 2 400 ml minerálního média. Přidá se vhodné množství připraveného inokula (viz I.6.4.1 a I.6.5), aby koncentrace suspendovaných látek v konečném objemu 3 litry inokulované směsi byla 30 mg/l. Eventuálně lze nejdříve zředit připravený kal v minerálním médiu na suspensi o koncentraci 500–1 000 mg/l a poté přidat alikvotní části do baňky na 5 litrů, aby byla dosažena koncentrace 30 mg/l; zajistí se tím větší přesnost. Mohou být použity i jiné zdroje inokula (viz I.6.4.2).

Inokulovaná směs se přes noc provzdušňuje vzduchem bez CO_2, aby se ze systému odstranil oxid uhličitý.

▼B

Odděleně do dvojic baněk se ze zásobních roztoků přidá zkoušená látka a referenční látka tak, aby koncentrace pocházející z chemických látek byla v rozmezí 10 až 20 mg DOC nebo TOC na litr; některé lahve se nasadí jako kontrola inokula bez přidání chemických látek. Špatně rozpustné látky se odváží nebo odměří přímo do baněk, nebo se postupuje podle dodatku 3.

Podle potřeby se jedna baňka použije ke kontrole možného inhibičního účinku zkoušené látky, a to přidáním zkoušené i referenční látky ve stejných koncentracích jako v ostatních baňkách.

Podle potřeby se další baňka použije k ověření, zda se zkoušená látka nerozkládá abioticky, přičemž se použije roztok chemické látky bez inokula (viz I.6.6). Sterilizace se provádí přidáním vhodné koncentrace toxické látky.

Ve všech baňkách se upraví objem na 3 litry přídavkem minerálního média bez CO_2. Podle potřeby lze odebrat vzorky pro stanovení DOC (viz bod 4 dodatku 2) a/nebo pro specifickou analýzu. Poté se na výstup plynů u baněk připojí absorpční lahve.

V případě použití hydroxidu barnatého se za každou baňku na 5 litrů zařadí tři absorpční lahve, každá obsahující 100 ml roztoku $Ba(OH)_2$ o koncentraci 0,0125 mol/l. Roztok nesmí obsahovat sraženinu síranů a uhličitanu barnatého a jeho koncentrace musí být stanovena bezprostředně před použitím. Je-li použit hydroxid sodný, spojí se dvě absorpční lahve, z nichž druhá slouží jako kontrola, že byl veškerý CO_2 zachycen v první absorpční lahvi. K tomuto účelu se hodí absorpční lahve opatřené sérovými uzávěry. Do každé absorpční lahve se přidá po 200 ml roztoku NaOH o koncentraci 0,05 mol/l, což postačuje k absorpci veškerého oxidu uhličitého, který by se uvolnil při úplném rozkladu látky. Roztok hydroxidu sodného, i když je čerstvě připraven, obsahuje stopy uhličitanů; korekce se provede odečtením množství uhličitanů ve slepém pokusu.

IV.2.5. **Počet baněk v typické zkoušce**

Baňka 1 a 2: Zkušební suspense

Baňka 3 a 4: Slepá zkouška s inokulem

Baňka 5: Kontrolní zkouška postupu

Dále se doporučují nebo se podle potřeby použijí:

Baňka 6: Abiotická sterilní kontrola

Baňka 7: Kontrola toxicity

Viz také bod I.6.7.

IV.2.6. **Provedení zkoušky**

Zkouška se zahájí probubláváním vzduchu bez CO_2 suspensí při průtoku 30–100 ml/min. Za účelem analýzy obsahu CO_2 se pravidelně odebírají vzorky absorbentu. Doporučuje se, aby se v průběhu prvních 10 dnů prováděly analýzy každý druhý až třetí den a dále pak každý pátý den až do 28. dne, což umožní rozpoznat období 10denního období rozkladu.

▼B

28. den se (nepovinně) odebere vzorek pro stanovení DOC a/nebo pro specifickou analýzu, změří se pH suspensí a poté se do každé baňky přidá 1 ml koncentrované HCl; provzdušňuje se přes noc, aby se odstranil CO_2 přítomný v suspensi. Poslední analýza uvolněného CO_2 se provede 29. den.

Ve dnech, kdy se provádí stanovení CO_2, se odpojí absorpční lahev s hydroxidem barnatým bližší zkušební baňce a roztok hydroxidu barnatého se titruje 0,05 M HCl za přítomnosti fenolftaleinu jako indikátoru. Zbývající dvě absorpční lahve se posunou k baňce a na konec řady se zařadí nová absorpční lahev se 100 ml čerstvě připraveného 0,0125 M hydroxidu barnatého. Titrace se provádějí podle potřeby, např. je-li pozorována v první absorpční lahvi zřetelná sraženina a před tím, než vznikne viditelná sraženina ve druhé absorpční lahvi, nebo alespoň jednou týdně. Jinou možností je provést při použití NaOH jako absorbentu odběr malého vzorku hydroxidu sodného pomocí injekční stříkačky (podle použitého analyzátoru uhlíku) z absorpční lahve, která je nejblíž k baňce. Vzorek se nastříkne přímo do IC-části analyzátoru uhlíku pro analýzu anorganického uhlíku.

Obsah druhé absorpční lahve se analyzuje pouze na konci zkoušky s cílem stanovit korekci na možný únik CO_2.

IV.3. DATA A PŘEDKLÁDÁNÍ ZPRÁV

IV.3.1. **Zpracování výsledků**

Množství CO_2 zachyceného v absorpční lahvi je v případě titračního stanovení dáno vztahem:

$$\text{mg } CO_2 = (100 \times C_B - 0{,}5 \times V \times C_A) \times 44$$

kde:

V = objem HCl spotřebovaný při titraci 100 ml obsahu absorpční lahve (ml),

C_B = koncentrace roztoku hydroxidu barnatého (mol/l),

C_A = koncentrace roztoku kyseliny chlorovodíkové (mol/l).

Je-li CB 0,0125 mol/l a CA 0,05 mol/l, je spotřeba pro titraci 100 ml roztoku $Ba(OH)_2$ 50 ml a hmotnost CO_2 je dána vztahem:

$$\frac{0{,}05}{2} \times 44 \times \text{počet ml HCl spotřebované při titraci} = 1{,}1 \times \text{ml HCl}$$

V tomto případě se tedy k přepočtu objemu HCl spotřebovaného při titraci na hmotnost vzniklého CO_2 použije faktor 1,1.

S použitím příslušných výsledků titrace se vypočte hmotnost CO_2 vzniklého ze samotného inokula a inokula se zkoušenou látkou a jejich rozdíl je hmotnost CO_2 vzniklého ze samotné zkoušené látky.

Je-li např. výsledkem titrace samotného inokula 48 ml a inokula se zkoušenou látkou 45 ml, je množství

$$CO_2 \text{ z inokula} = 1{,}1 \times (50 - 48) = 2{,}2 \text{ mg},$$

▼B

CO_2 z inokula a zkoušené látky = 1,1 × (50 – 45) = 5,5 mg,

a tedy hmotnost CO_2 vzniklého ze zkoušené látky 3,3 mg.

Biologický rozklad v procentech se vypočte podle vztahu:

$$\text{rozklad v procentech} = \frac{\text{vzniklý } CO_2 \text{ v mg} \times 100}{TCO_2 \times \text{přidaná zkušební látka v mg}}$$

nebo

$$\text{rozklad v procentech} = \frac{\text{vzniklý } CO_2 \text{ v mg} \times 100}{\text{TCO přidaný ve zkoušce v mg} \times 3{,}67}$$

přičemž 3,67 je převodní faktor (44/12) pro uhlík a oxid uhličitý.

Rozklad v procentech se po každém období vypočte dosazením hodnoty TCO_2 vypočítané pro každý den až do doby, kdy byl měřen.

Při zachytávání do NaOH se vypočte hmotnost vzniklého CO_2, vyjádřeného jako anorganický uhlík v mg, vynásobením koncentrace anorganického uhlíku v absorpční lahvi objemem absorpčního roztoku.

Rozklad v procentech se vypočte podle vztahu:

$$\%\ ThCO_2 = \frac{\text{anorg. C ze zkušeb. baňky v mg} - \text{anorg. C ze slep. pokusu v mg}}{\text{TOC přidaný jako zkoušená látka v mg}} \times 100$$

Úbytky DOC se (nepovinně) vypočítají podle bodu I.7. Tento výsledek spolu s ostatními výsledky se zaznamenají do příslušného formuláře přehledu dat.

IV.3.2. **Platnost výsledků**

Obsah anorganického uhlíku ve zkušební suspensi v minerálním médiu na začátku zkoušky musí být menší než 5 % TC a celkové množství CO_2 vzniklé na konci slepé zkoušky s inokulem nesmí za normálních okolností překročit 40 mg na litr média. Jsou-li hodnoty větší než 70 mg CO_2 na litr, měla by být data i experimentální postup kriticky přehodnoceny.

Viz také I.5.2.

IV.3.3. **Zprávy**

Viz bod I.8.

IV.4. PŘEHLED DAT

Dále je uveden příklad přehledu dat.

ZKOUŠKA NA UVOLŇOVÁNÍ OXIDU UHLIČITÉHO

1. **LABORATOŘ**

2. **DATUM POČÁTKU ZKOUŠKY**

3. **ZKOUŠENÁ LÁTKA**

Název:

Koncentrace chemické látky v zásobním roztoku: … mg/l

▼B

Počáteční koncentrace chemické látky v médiu: … mg/l

Celkové množství uhlíku přidaného do baňky: … mg C

TCO_2: mg CO_2

4. **INOKULUM**

Zdroj:

Provedená úprava:

Předběžná úprava, pokud byla provedena:

Koncentrace suspendovaných látek v reakční směsi: … mg/l

Čas (dny)	CO_2 uvolněný ve zkoušce (mg)		CO_2 uvolněný ve slepé zkoušce (mg)		Celkové množství CO_2 (průměr ve zkoušce minus průměr ve slepé zkoušce) (mg)		TCO_2 kumulativní $\frac{CO_2}{ThCO_2} \times 100$		
	1 / 2	průměr	3 / 4	průměr	1	2	1	2	průměr
0									
n_1									
n_2									
n_3									
28									

Poznámka: podobný formulář lze použil i pro referenční látku a pro kontroly toxicity.

6. **ANALÝZA UHLÍKU** (podle volby)

Analyzátor uhlíku:

Čas (dny)	Slepý pokus ($mg \cdot l^{-1}$)	Zkoušená látka ($rng.l^{-1}$)
0	$C_{b(o)}$	C_O
28 ([1])	$C_{b(t)}$	C_t

([1]) nebo na konci kultivace.

▼B

$$\text{odstraněný DOC v\%} = \left(1 - \frac{C_t - C_{b(t)}}{1 - C_t - C_{b(o)}}\right) \times 100$$

7. **ABIOTICKÝ ROZKLAD** (nepovinné)

$$\text{abiotický rozklad v \%} = \frac{CO_2 - \text{tvorba CO2 ve steril. podm. po 28 dnech v mg}}{TCO_2} \times 100$$

ČÁST V. **ZKOUŠKA MANOMETRICKOU RESPIROMETRIÍ** (metoda C.4-D)

V.1. PODSTATA METODY

Odměřený objem inokulovaného minerálního média obsahující známou koncentraci zkoušené chemické látky (100 mg zkoušené látky na litr, dávající nejméně 50–100 mg TSK na litr), která je jediným zdrojem organického uhlíku, se míchá v uzavřené nádobě při konstantní teplotě (tolerance ± 1 °C nebo menší) po dobu 28 dnů. Spotřeba kyslíku se stanoví buď měřením množství kyslíku (elektrolyticky produkovaného), který je potřebný k udržení konstantního objemu plynu v respirační nádobce, nebo ze změn objemu nebo tlaku (nebo obojího) v aparatuře. Uvolněný CO_2 se jímá v roztoku hydroxidu draselného nebo v jiném vhodném absorbentu. Množství kyslíku, které je zkoušenou látkou spotřebováno (korigované na spotřebu kyslíku inokulem ve slepé zkoušce, která se provádí současně), se vyjádří v procentech TSK nebo CHSK. Popřípadě může být z doplňkové specifické chemické analýzy provedené na začátku a na konci kultivace vypočten primární biologický rozklad a z analýzy DOC úplný biologický rozklad.

V.2. POPIS METODY

V.2.1. **Přístroje**

a) vhodný respirometr;

b) regulátor teploty s přesností na ± 1 °C nebo lepší;

c) zařízení pro membránovou filtraci (nepovinné);

d) analyzátor uhlíku (nepovinné).

V.2.2. **Příprava minerálního média**

Příprava zásobních roztoků je popsána v bodě I.6.2.

Smísí se 10 ml roztoku a) s 800 ml ředicí vody, přidá se po 1 ml roztoků b) až d) a doplní se ředicí vodou na 1 litr.

V.2.3. **Příprava a předběžná úprava inokula**

Inokulum lze získat z řady zdrojů: z aktivovaného kalu, ze splaškových vod, z povrchových vod, z půd nebo z jejich směsi.

Viz I.6.4, I.6.4.1, I.6.4.2 a I.6.5.

V.2.4. **Příprava baněk**

S použitím zásobních roztoků se připraví samostatné sady roztoků zkoušené chemické látky a referenční chemické látky v minerálním médiu o koncentraci odpovídající obvykle 100 mg chemické látky na litr (dávající nejméně 50–100 mg TSK na litr).

▼B

TSK se vypočte z tvorby amoniových solí, pokud lze vyloučit nitrifikaci, v opačném případě by měl být výpočet založen na tvorbě dusičnanů (viz bod 2 dodatku 2).

Změří se pH a v případě potřeby se upraví na 7,4 ± 0,2.

Špatně rozpustné látky se přidají v pozdějším stádiu (viz dále).

Má-li se stanovit toxicita zkoušené látky, připraví se další roztok v minerálním médiu, jenž obsahuje referenční i zkoušenou látku, a to ve stejných koncentracích jako v roztocích obsahujících jen jednu látku.

Požaduje-li se stanovení fyzikálně-chemické spotřeby kyslíku, připraví se roztok zkoušené látky obvykle o koncentraci 100 mg TSK na litr sterilizovaný přídavkem vhodné toxické látky (viz I.6.6).

Připravené objemy roztoků zkoušené a referenční chemické látky se rozdělí alespoň duplicitně do baněk. Do dalších baněk se přidá pouze minerální médium (pro kontrolu inokula) a podle potřeby směs roztoku zkoušené a referenční chemické látky a sterilní roztok.

Je-li zkoušená chemická látka špatně rozpustná, odváží se nebo odměří v tomto stadiu přímo do baněk, nebo se postupuje podle dodatku 3. Do lahví pro absorpci CO_2 se přidá hydroxid draselný, pelety hydroxidu sodného nebo jiný absorbent.

V.2.5. **Počet baněk v typické zkoušce**

Baňka 1 a 2: Zkušební suspense

Baňka 3 a 4: Slepá zkouška s inokulem

Baňka 5: Kontrolní zkouška postupu

Dále se doporučují nebo se podle potřeby použijí:

Baňka 6: Sterilní kontrola

Baňka 7: Kontrola toxicity

Viz také bod I.6.7.

V.2.6. **Provedení zkoušky**

V baňkách se nechá ustavit požadovaná teplota a vybrané baňky se inokulují přidáním aktivovaného kalu nebo jiného zdroje inokula, aby nebyla koncentrace suspendovaných látek větší než 30 mg/l. Zařízení se sestaví, spustí se míchačka, přezkouší se na vzduchotěsnost a zahájí se měření spotřeby kyslíku. Obvykle není třeba věnovat zkoušce žádnou zvláštní pozornost, kromě nezbytných odečtů a denní kontroly teploty a míchání.

Z pravidelných častých odečtů se podle postupu uvedeného výrobcem zařízení vypočte spotřeba kyslíku. Na konci inkubace, obvykle po 28 dnech, se změří pH v baňkách, a to zvláště tehdy, je-li spotřeba kyslíku malá nebo větší než TSK_{NH4} (platí pro látky obsahující dusík).

▼B

V případě potřeby se na začátku a na konci odebírá vzorek z respiračních nádobek pro stanovení DOC nebo pro specifickou analýzu (viz bod 4 dodatku 2). Při počátečním odběru z baňky se zajistí, aby byl znám objem zkušební suspense, která v baňce zůstala. Je-li kyslík spotřebováván látkami obsahujícími dusík, stanoví se přírůstek koncentrací dusičnanů a dusitanů za 28 dnů a vypočte se korekce na spotřebu kyslíku nitrifikací (dodatek 5).

V.3. DATA A PŘEDKLÁDÁNÍ ZPRÁV

V.3.1. **Zpracování výsledků**

Spotřeba kyslíku (mg) zkoušenou látkou za danou dobu (korigovaná na spotřebu kyslíku inokulem za stejnou dobu ve slepé zkoušce) se podělí hmotností zkoušené látky v baňce. Získá se tak hodnota BSK vyjádřená v mg kyslíku na mg zkoušené látky:

$$\text{BOD} = \frac{(\text{spotř. } O_2 \text{ zk. chem. látkou v mg} - \text{spotř. } O_2 \text{ ve slep zkoušce v mg})}{(\text{hmotnost zkoušené chem. látky v baňce v mg})}$$

= mg O_2 na mg zkoušené chemické látky.

Biologický rozklad v procentech se vypočte buď z rovnice:

$$\text{biolog. rozklad v \%} = \%\text{ThOD} = \frac{\text{BOD}(\text{mg } O_2/\text{mg BSK (mg O2 na mg chem. látky)})}{\text{ThOD}(\text{mg } O_2 \text{ /mg TSK (mg O2 na mg chem. látky)})} \times 100$$

nebo z rovnice:

$$\%\ \text{COD} = \frac{\text{BOD}(\text{mg } O_2/\text{mg BSK (mg O2 na mg chem. látky)})}{\text{ThOD}(\text{mg } O_2 \text{ /mg COD (mg O2 na mg chem. látky)})} \times 100$$

Je třeba poznamenat, že tyto dvě metody nemusí poskytovat stejné hodnoty; přednost se dává první metodě.

Pro látky, jež obsahují dusík, se použije vhodná hodnota TSK (pro NH_4 nebo NO_3) podle toho, zda se očekává nitrifikace, či nikoli (bod 2 dodatku 2). Jestliže k nitrifikaci dochází, avšak není úplná, vypočte se korekce na spotřebu kyslíku při nitrifikaci ze změn koncentrace dusitanů a dusičnanů (dodatek 5).

V případě, že se provádí nepovinné stanovení organického uhlíku a/nebo specifické chemické látky, vypočte se stupeň rozkladu podle bodu I.7.

Všechny výsledky se zaznamenají do příslušného formuláře přehledu dat.

V.3.2. **Platnost výsledků**

Obvyklá spotřeba kyslíku inokulem je 20–30 mg O_2 na litr a neměla by být větší než 60 mg/l za 28 dnů. Hodnoty větší než 60 mg/l vyžadují kritické přehodnocení výsledků a experimentální techniky. Je-li pH mimo rozpětí 6–8,5 a spotřeba kyslíku zkoušenou látkou je menší než 60 %, měla by být zkouška opakována s nižší koncentrací zkoušené látky.

Viz také I.5.2.

▼B

V.3.3. **Zprávy**

Viz I.8.

V.4. **PŘEHLED DAT**

Dále je uveden příklad přehledu dat.

ZKOUŠKA MANOMETRICKOU RESPIROMETRIÍ

1. **LABORATOŘ**

2. **DATUM POČÁTKU ZKOUŠKY**

3. **ZKOUŠENÁ LÁTKA**

Název:

Koncentrace chemické látky v zásobním roztoku: ... mg/l

Počáteční koncentrace v médiu, C_0: ... mg/l

Objem zkušební baňky (V): ... ml

TSK nebo CHSK: ... v mg O_2/mg zkoušené látky (NH_4 nebo NO_3)

4. **INOKULUM**

Zdroj:

Provedená úprava:

Předběžná úprava, pokud byla provedena:

Koncentrace suspendovaných látek v reakční směsi: mg/l

5. **SPOTŘEBA KYSLÍKU: BIOLOGICKÁ ROZLOŽITELNOST**

		Čas (dny)											
		0		7		14			21			28	
Spotřeba O_2 (mg) zkoušenou látkou	1												
	2												
	a, průměr												
Spotřeba O_2 (mg) ve slepé zkoušce	3												
	4												
	b, průměr												
Korigovaná BSK (mg)	$(a_1 - b_m)$												
	$(a_2 - b_m)$												
BSK na mu zkoušené látky	$\frac{(a_1 - b)}{C_o V}$												
	$\frac{(a_2 - b)}{C_o V}$												

▼B

		Čas (dny)											
		0		7		14			21			28	
Rozklad v % $\frac{BOD}{ThOD} \times 100$	$D_{1\ (a1)}$												
	$D_{2\ (a2)}$												
	Průměr (1)												

V = objem média ve zkušební baňce
(1) Hodnoty D_1 a D_2 by neměly být průměrovány, je-li mezd nimi výrazný rozdil.

Poznámka: Podobný formulát lze použit i pro referenční látku a pro kontroly toxicity.

6. **KOREKCE NA NITRIFIKACI** (viz příloha V)

Den		0	28	Rozdíl
i)	Koncentrace dusičnanů (mg N na litr)			M
ii)	Kyslíkový ekvivalent (4,57 × N × V) (mg)	—	—	
iii)	Koncentrace dusitanů (mg N na litr)			(N)
iv)	Kyslíkový ekvivalent (3,43 × N × V) (mg)	—	—	
ii+iv)	Celkový kyslíkový ekvivalent	—	—	

7. **ANALÝZA UHLÍKU** (podle volby)

Analyzátor uhlíku:

Čas (dny)	Slepá zkouška (mg· l^{-1})	Zkoušená látka (mg/l)
0	(C_{blo})	(C_o)
28 (1)	(C_{blt})	(C_t)

(1) nebo na konci inkubace

$$\text{odstraněný DOC v\%} = \left(1 - \frac{C_t - C_{blt}}{C_o - C_{blo}}\right) \times 100$$

8. **SPECIFICKÁ ANALÝZA** (nepovinné)

S_b = koncentrace ve fyzikálně-chemické kontrole (sterilní) po 28 dnech,

S_a = koncentrace v inokulované baňce po 28 dnech.

$$\text{biologický rozklad v\%} = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

9. **ABIOTICKÝ ROZKLAD** (nepovinné)

a = spotřeba kyslíku ve sterilních baňkách po 28 dnech v mg

$$\text{spotřeba kyslíku na mg zkoušené chemické látky} = \frac{a}{C_0 V}$$

▼B

(viz oddíl 1 a 3)

$$\text{abiotický rozklad v\%} = \frac{a \times 100}{C_o V \times ThOD}$$

ČÁST VI. **ZKOUŠKA V UZAVŘENÝCH LAHVIČKÁCH**
(metoda C.4-E)

VI.1. PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

Roztok zkoušené látky v minerálním médiu, obvykle o koncentraci 2–5 mg/l, se inokuluje malým množstvím mikroorganismů ze směsné kultury a udržuje se ve zcela naplněných uzavřených lahvičkách, v temnu a při konstantní teplotě. Rozklad se sleduje po dobu 28 dnů prostřednictvím analýzy rozpuštěného kyslíku. Množství spotřebovaného kyslíku po korekci na souběžnou slepou zkoušku s inokulem se vyjádří jako TSK nebo CHSK.

VI.2. POPIS METODY

VI.2.1. **Přístroje a pomůcky**

a) lahve pro analýzu BSK se skleněnými zátkami, např. na 250 až 300 ml;

b) vodní lázeň nebo inkubátor pro udržování lahviček při konstantní teplotě (tolerance ± 1 °C nebo menší) v temnu;

c) velké skleněné lahve na 2–5 litry pro přípravu média a pro naplnění lahviček pro analýzu BSK;

d) kyslíková elektroda a oxymetr nebo vybavení a činidla pro Winklerovu titrační metodu.

VI.2.2. **Příprava minerálního média**

Příprava zásobních roztoků je popsána v bodě I.6.2.

Smísí se po 1 ml roztoků a) až d) a doplní se vodou na 1 litr.

VI.2.3. **Příprava inokula**

Inokulum lze získat z výstupu z druhého stupně čistírny odpadních vod nebo laboratorní jednotky zpracovávající převážně domovní odpadní vody. Alternativním zdrojem inokula může být povrchová voda. Obvykle se použije jedna kapka (0,05 ml) až 5 ml filtrátu na litr média; k nalezení optimálního objemu dané odpadní vody může být nezbytné provést pokusy (viz I.6.4.2 a I.6.5).

VI.2.4. **Příprava baněk**

Minerální médium se alespoň 20 minut silně provzdušňuje. Všechny série zkoušek se provedou s minerálním médiem ze stejné dávky. Obecně je médium připraveno k použití po 20 hodinách stání při zkušební teplotě. Pro kontrolu se stanoví obsah kyslíku v médiu; jeho obsah by měl být asi 9 mg/l při 20 °C. Všechny operace přenosu média nasyceného vzduchem a jeho plnění se provedou tak, aby nevznikaly bublinky, např. pomocí nasávaček.

▼B

Připravují se shodné skupiny lahviček pro analýzu BSK pro stanovení se zkoušenou látkou a referenční látkou v souběžných sériích experimentů. Připraví se dostatečný počet lahviček, včetně slepých pokusů, tak, aby v každém zvoleném časovém intervalu, např. 0, 7, 14, 21 a 28 dnů, bylo možné provést alespoň dvě měření spotřeby kyslíku. K tomu, aby bylo možné rozpoznat 10denní období rozkladu, může být potřeba více lahviček.

Velké lahve se přibližně do jedné třetiny naplní provzdušněným médiem. Poté se zvlášť do jednotlivých velkých lahví přidá dostatečný objem zásobního roztoku zkoušené látky a referenční látky, a to obvykle tak, aby nebyla konečná koncentrace chemických látek větší než 10 mg/l. Ke slepému pokusu v další velké lahvi se nepřidávají žádné chemické látky.

S cílem zajistit, aby aktivita inokula nebyla omezená, nesmí koncentrace kyslíku v lahvičkách pro analýzu BSK klesnout pod 0,5 mg/l. Toto omezuje koncentraci zkoušené látky na 2 mg/l. Pro látky, které se špatně rozkládají, a pro látky s nízkou hodnotou TSK lze použít koncentraci 5–10 mg/l. V některých případech se doporučuje provést souběžné série měření při dvou různých koncentracích zkoušené látky, např. při 2 a 5 mg/l. Obvykle se TSK počítá na základě tvorby amonných solí, ale v případech, kdy se předpokládá nitrifikace nebo kdy dochází k nitrifikaci, se TSK vypočte na základě tvorby dusičnanů (TSK_{NO3}, viz bod 2 dodatku 2). V případech, kdy nitrifikace není úplná, se provede korekce na změny analyticky stanovených koncentrací dusitanů a dusičnanů (viz dodatek 5).

Má-li být vyšetřena toxicita zkoušené látky (např. v případě dříve zjištěné nízké biologické rozložitelnosti), je nezbytné nasadit další sérii lahviček.

Připraví se další velká láhev s provzdušněným minerálním médiem (naplněná asi do jedné třetiny objemu), do které se přidá zkoušená a referenční chemická látka o konečné koncentraci obvykle stejné jako v případě ostatních velkých lahví.

Roztoky ve velkých lahvích se inokulují výstupem z druhého stupně čistírny odpadních vod (jedna kapka nebo 0,05 až 5 ml/l) nebo z jiného zdroje inokula, jako je např. říční voda (viz I.6.4.2). Nakonec se lahve doplní na objem provzdušněným minerálním médiem za použití hadičky, která sahá na dno, aby se dosáhlo dostatečného promíchání.

VI.2.5. **Počet lahviček v typické zkoušce**

V typické zkoušce se použijí tyto lahvičky:

— nejméně 10 lahviček se zkoušenou látkou a inokulem (zkušební suspense),

— nejméně 10 lahviček pouze s inokulem (slepá zkouška s inokulem),

— nejméně 10 lahviček s referenční látkou a inokulem (kontrolní zkouška postupu),

▼B

— a podle potřeby 6 lahviček se zkoušenou látkou, referenční látkou a inokulem (kontrola toxicity). Pro rozpoznání 10denního období rozkladu je však potřebný dvojnásobný počet lahviček.

VI.2.6 Provedení zkoušky

Všechny připravené roztoky se ihned po přípravě rozdělí do příslušné skupiny lahviček pro analýzu BSK, a to pomocí hadičky zavedené do spodní čtvrtiny velké lahve (nikoliv ke dnu) tak, aby se všechny lahvičky pro analýzu BSK zcela naplnily. Jemně se poklepe, aby se odstranily bublinky. V lahvičkách se Winklerovou metodou nebo pomocí oxymetru ihned stanoví obsah rozpuštěného kyslíku k počátku zkoušky (k času nula). Obsah lahviček lze konzervovat pro pozdější analýzu přídavkem síranu manganatého a hydroxidu sodného (prvním Winklerovým činidlem). Před provedením zbývajících kroků Winklerovy metody se pečlivě uzavřené lahvičky obsahující kyslík vázaný ve formě hydratovaného oxidu manganitého skladují v temnu nejdéle 24 hodin při teplotě 10–20 °C. Zbývající souběžně připravené lahvičky se uzavřou tak, aby v nich nezůstaly bublinky vzduchu, a inkubují se v temnu při 20 °C. Každá série musí být doprovázena úplnou sérií slepého pokusu s inokulovaným médiem. Ve všech sériích se během 28 dnů inkubace v pravidelných intervalech (nejméně jednou týdně) stanoví alespoň ve dvou lahvičkách obsah rozpuštěného kyslíku.

Týdenní vzorky umožní stanovení rozkladu v procentech ve 14denním období rozkladu, zatímco vzorky odebírané každé 3–4 dny umožní rozpoznat 10denní období rozkladu, což vyžaduje dvojnásobný počet lahviček.

U látek obsahujících dusík se provede korekce na spotřebu kyslíku při nitrifikaci. K tomuto účelu se stanoví koncentrace rozpuštěného kyslíku oxymetrem a poté se z lahvičky pro analýzu BSK odebere vzorek pro stanovení dusitanů a dusičnanů. Z přírůstku koncentrace dusitanů a dusičnanů se vypočte množství spotřebovaného kyslíku (viz dodatek 5).

VI.3. DATA A PŘEDKLÁDÁNÍ ZPRÁV

VI.3.1. **Zpracování výsledků**

Nejprve se vypočte BSK, ke které došlo po každé časové periodě, a to odečtením spotřeby kyslíku (v mg O_2/litr) ve slepém pokusu s inokulem od spotřeby zkoušenou chemickou látkou. Takto korigovaná spotřeba se vydělí koncentrací zkoušené látky (mg/l) a získá se specifická BSK v mg kyslíku na mg zkoušené látky. Biologická rozložitelnost v procentech se vypočte jako podíl specifické BSK a specifické TSK (vypočtené podle bodu 2 dodatku 2) nebo CHSK (stanovené analyticky, viz bod 3 dodatku 2), tedy:

$$\text{BOD} = \frac{(\text{spotř. } O_2 \text{ zk. chem. látkou v mg} - \text{spotř. } O_2 \text{ ve slep. pokusu v mg})}{(\text{hmotnost zkoušené chem. látky v baňce v mg})}$$

▼B

= mg O_2 na mg zkoušené chemické látky.

$$\text{rozklad v \%} = \frac{\text{BOD}(\text{mg } O_2/\text{mg BSK (mg O2 na mg zkušeb. chem. látky)})}{\text{ThOD}(\text{mg } O_2/\text{mg TSK (mg O2 na mg zkušeb. chem. látky)})} \times 100$$

nebo

$$\text{Rozklad v \%} = \frac{\text{BOD}(\text{mg } O_2/\text{mg BSK (mg O2 na mg zkušeb. chem. látky)})}{\text{COD}(\text{mg } O_2/\text{mg COD (mg O2 na mg zkušeb. chem. látky)})} \times 100$$

Je třeba poznamenat, že tyto dvě metody nemusí poskytovat stejné hodnoty; přednost se dává první metodě.

Pro látky, jež obsahují dusík, se použije vhodná hodnota TSK (pro NH_4 nebo NO_3) podle toho, zda se očekává nitrifikace, či nikoli (bod 2 dodatku 2). Jestliže k nitrifikaci dochází, avšak není úplná, vypočte se korekce na spotřebu kyslíku při nitrifikaci ze změn koncentrace dusitanů a dusičnanů (dodatek 5).

VI.3.2. **Platnost výsledků**

Spotřeba kyslíku ve slepém pokusu s inokulem by neměla být po 28 dnech vyšší než 1,5 mg/l. Vyšší hodnoty vyžadují přešetření experimentální techniky. Zbytková koncentrace kyslíku ve zkušebních lahvičkách by neměla nikdy klesnout pod 0,5 mg/l. Takto nízké úrovně kyslíku jsou platné pouze tehdy, lze-li použitou metodou stanovení rozpuštěného kyslíku tak nízké úrovně přesně změřit.

Viz také I.5.2.

VI.3.3. **Zprávy**

Viz I.8.

VI.4. PŘEHLED DAT

Dále je uveden příklad přehledu dat.

ZKOUŠKA V UZAVŘENÝCH LAHVIČKÁCH

1. **LABORATOŘ**

2. **DATUM POČÁTKU ZKOUŠKY**

3. **ZKOUŠENÁ LÁTKA**

   Název:

   Koncentrace chemické látky v zásobním roztoku: … mg/l

   Počáteční koncentrace v lahvičce: … mg/l

   TSK nebo CHSK: v mg O_2/mg zkoušené látky

4. **INOKULUM**

   Zdroj:

   Provedená úprava:

▼B

Předběžná úprava, pokud byla provedena:

Koncentrace v reakční směsi: … mg/l

5. **STANOVENÍ ROZPUŠTĚNÉHO KYSLÍKU**

Metoda: Winklerova metoda/oxymetr

Analýzy lahviček

Doba kultivace (d}			Rozpuštěný kyslík (mg/l)			
			0	n_1	n_2	
(bez chemické látky)	1	C_1				
	2	C_2				
Průměr	$m_b = \frac{C_1 + C_2}{2}$					
Zkoušená chemická látka	1	a_1				
	2	a_2				
Průměr	$m_t = \frac{a_1 + a_2}{2}$					

Poznámka: Podobný formulář lze použít i pro referenční látku a pro kontroly toxicity.

6. **KOREKCE NA NITRIFIKACI** (viz příloha V)

Doba kultivace		0	n_1	n_2	n_3
i)	Koncentrace dusičnanů (mg N na litr)				
ii)	Změna koncentrace dusičnanů (mg N na litr)	—			
iii)	Kyslíkový ekvivalent (mg. l^{-1})	—			
iv)	Koncentrace dusitanů (mg N na litr)				
v)	Změna koncentrace dusitanů (mg N na litr)	—			
vi)	Kyslíkový ekvivalent (mg· l^{-1})	—			
iii + vi)	Celkový kyslíkový ekvivalent (mg· l^{-1})	—			

7. **ÚBYTEK ROZPUŠTĚNÉHO KYSLÍKU: ROZKLAD V PROCENTECH**

	Úbytek po n dnech (mg/l)			
	n_1	n_2	n_3	
LAHVIČKA 1: $(m_{to} - m_{tx}) - (m_{bo} - m_{bx})$				
LAHVIČKA 2: $(m_{to} - m_{tx}) - (m_{bo} - m_{bx})$				

▼B

	Úbytek po n dnech (mg/l)			
	n_1	n_2	n_3	
LAHVIČKA 1: $\%D_1 = \frac{[(m_{to} - m_{tx}) - (m_{bo} - m_{bx})] \times 100}{\text{konc. zkuš. chem} \times \text{ThOD látky}}$				
LAHVIČKA 2 $\%\ D_2 = \frac{[(m_{to} - m_{tx}) - (m_{bo} - m_{bx})] \times 100}{\text{konc. zkuš. chem} \times \text{ThOD látky}}$				
průměr (1) $\%\ D = \frac{D_1 - D_2}{2}$				

(1) Hodnoty nelze průměrovat, je-li mezi nimi výrazný rozdíl.

m_{to} = hodnota pro zkušební lahvičku v čase 0

m_{tx} = hodnota pro zkušební lahvičku v čase x

m_{bo} = hodnota pro slepý pokus v čase 0

m_{bx} = hodnota pro slepý pokus v čase x

Použijí se rovněž korekce na nitrifikaci z bodu iii + vi v oddílu 6.

8. **ÚBYTEK ROZPUŠTĚNÉHO KYSLÍKU VE SLEPÉM POKUSU**

Spotřeba kyslíku ve slepém pokusu je: ($m_{b0} - m_{b28}$) v mg/l. Tato spotřeba je důležitá pro platnost zkoušky. Měla by být menší než 1,5 mg/l.

ČÁST VII. **ZKOUŠKA MITI** (Metoda C.4-F)

VII.1. PODSTATA METODY

Měření spotřeby kyslíku v míchaném roztoku nebo suspensi zkoušené chemické látky v minerálním médiu inokulovaném speciální kulturou neadaptovaných mikroorganismů se provádí automaticky po dobu 28 dnů za tmy v uzavřeném respirometru při 25 ± 1 °C. Uvolňovaný oxid uhličitý se jímá v hydroxidu sodném. Biologická rozložitelnost se vyjádří jako spotřeba kyslíku (korigovaná na slepý pokus) vyjádřená v procentech teoretické spotřeby kyslíku (TSK). Primární biologická rozložitelnost vyjádřená v procentech se rovněž vypočte z doplňkové specifické chemické analýzy provedené na začátku a na konci kultivace, popřípadě z analýzy DOC.

VII.2. POPIS METODY

VII.2.1. **Přístroje a pomůcky**

a) automatický elektrolytický měřič BSK nebo respirometr standardně vybavený 6 baňkami na 300 ml opatřenými uzávěry obsahujícími absorbent CO_2;

▼B

b) místnost s konstantní teplotou nebo vodní lázeň nastavená na 25 ± 1 °C;

c) zařízení pro membránovou filtraci (nepovinné);

d) analyzátor uhlíku (nepovinné).

VII.2.2. **Příprava minerálního média**

Za použití reakčních činidel čistoty p.a. se připraví tyto zásobní roztoky (I.6.1):

a) Dihydrogenfosforečnan draselný, KH_2PO_4 8,50 g

Hydrogenfosforečnan didraselný, K_2HPO_4 21,75 g

Hydrogenfosforečnan disodný dodekahydrát, Na_2HPO_4 12 H_2O 44,60 g

Chlorid amonný, NH_4Cl 1,70 g

Rozpustí se ve vodě a doplní na 1 litr.

PH roztoku musí být 7,2.

b) Síran hořečnatý heptahydrát, $MgSO_4$ 7 H_2O 22,50 g

Rozpustí se ve vodě a doplní na 1 litr.

c) Chlorid vápenatý bezvodý, $CaCl_2$ 27,50 g

Rozpustí se ve vodě a doplní na 1 litr.

d) Chlorid železitý hexahydrát, $FeCl_3$ 6 H_2O 0,25 g

Rozpustí se ve vodě a doplní na 1 litr.

Spojí se po 3 ml roztoků a), b), c), a d) a doplní se na 1 litr.

VII.2.3. **Příprava inokula**

Odeberou se čerstvé vzorky nejméně z deseti lokalit, kde se používají a vypouštějí různé chemické látky. Z míst, jako jsou čistírny městských a průmyslových odpadních vod, řeky, jezera a moře, se odeberou litrové vzorky kalu, povrchových půd, vody atd., které se pečlivě smíchají. Po odstranění vyplavených látek a ustálení se pH supernatantu upraví na 7 ± 1 hydroxidem sodným nebo kyselinou fosforečnou.

Vhodným objemem filtrovaného supernatantu se naplní nádoba na aktivaci kalu a kapalina se 23,5 hodiny provzdušňuje. Třicet minut po ukončení provzdušňování se odlije přibližně jedna třetina celkového objemu supernatantu a k usazenému materiálu se přidá stejný objem roztoku (pH 7), který obsahuje vždy po 0,1 % glukosy, peptonu a dihydrogenfosforečnanu draselného, a obnoví se provzdušňování. Tento postup se opakuje jednou denně. Kalová jednotka musí být provozovaná podle zásad správné laboratorní praxe: odtok má být čirý, teplota má být udržována při 25 ± 2 °C, pH má být 7 ± 1, kal se má dobře usazovat, provzdušňování musí být za všech okolností dostatečné, mají být přítomni prvoci a aktivita kalu se má kontrolovat pomocí referenční látky nejméně každé tři měsíce. Inokulum se nepoužívá dříve než po 1 měsíci kultivace, ale ne později než po čtyřech měsících. Proto se v pravidelných intervalech jednou za tři měsíce odebírají vzorky z 10 míst.

▼B

K udržení stejné aktivity čerstvého a starého kalu se filtrovaný supernatant aktivovaného použitého kalu mísí se stejným objemem filtrovaného supernatantu čerstvě odebraného kalu pocházejícího z deseti zdrojů a směs se kultivuje podle výše uvedeného postupu. Kal se použije jako inokulum až 18–24 hodin po uvedeném zpracování.

VII.2.4. **Příprava baněk**

Připraví se těchto 6 baněk:

Baňka č. 1: zkoušená chemická látka v ředicí vodě, 100 mg/l

Baňka č. 2, 3 a 4: zkoušená chemická látka v minerálním médiu, 100 mg/l

Baňka č. 5: referenční látka (např. anilin) v minerálním médiu, 100 mg/l

Baňka č. 6: pouze minerální médium

Špatně rozpustné chemické látky se odváží nebo odměří, nebo se zpracují podle dodatku 3, s výjimkou těch, u nichž nesmějí být použita rozpouštědla ani emulgátory. Do speciálních uzávěrů všech lahví se přidá absorbent oxidu uhličitého. pH v baňkách č. 2, 3 a 4 se upraví na 7,0.

VII.2.5. **Provedení zkoušky**

Baňky č. 2, 3 a 4 (zkušební suspense), č. 5 (kontrola aktivity), č. 6 (slepý pokus s inokulem) se inokulují malým množstvím inokula tak, aby byla výsledná koncentrace kalu 30 mg/l. Do lahve č. 1 se inokulum nepřidává, slouží jako abiotická kontrola. Zařízení se sestaví, přezkouší se na vzduchotěsnost, spustí se míchačka a v temnu se zahájí měření spotřeby kyslíku. Denně se kontroluje teplota, míchání, coulometrický zapisovač spotřeby kyslíku a zaznamenají se všechny změny barvy obsahu baněk. Spotřeba kyslíku pro 6 baněk se odečítá přímo, např. šestikanálovým zapisovačem, čímž se získá křivka BSK. Na konci kultivace, obvykle po 28 dnech, se změří pH v baňkách a stanoví se zbytková koncentrace zkoušené chemické látky a jejích produktů rozkladu a v případě zkoušení látek rozpustných ve vodě také koncentrace DOC (postup podle bodu 4 dodatku 2). Zvláštní pozornost je třeba věnovat těkavým látkám. Pokud se předpokládá nitrifikace, stanoví se podle možnosti koncentrace dusičnanů a dusitanů.

VII.3. DATA A PŘEDKLÁDÁNÍ ZPRÁV

VII.3.1. **Zpracování výsledků**

Spotřeba kyslíku (mg) zkoušenou látkou za danou dobu (korigovaná na spotřebu inokulem za stejnou dobu ve slepém pokusu) se podělí hmotností použité zkoušené látky. Získá se tak hodnota BSK vyjádřená v mg kyslíku na mg zkoušené látky:

$$\mathrm{BOD} = \frac{(\text{spotř. } O_2 \text{ zk. chem. látkou v mg} - \text{spotř. } O_2 \text{ ve slepé zkoušce v mg})}{(\text{hmotnost zkoušené chem. látky v baňce v mg})}$$

= mg O_2 na mg zkoušené chemické látky.

▼B

Biologický rozklad v procentech se potom vypočte z rovnice:

$$\text{biolog. rozklad v \%} = \%\ \text{ThOD} = \frac{\text{BOD(mg } O_2 \text{ BSK (mg O2 na mg chem. látky))}}{\text{ThOD(mg } O_2 \text{ TSK (mg O2 na mg chem. látky))}} \times 100$$

Pro směsi se TSK vypočte z elementární analýzy, tak jako pro jednoduché sloučeniny. Použije se odpovídající hodnota TSK (TSK_{NH4} nebo TSK_{NO3}) podle toho, zda se očekává nitrifikace, či nikoli (bod 2 dodatku 2). Jestliže k nitrifikaci dochází, avšak není úplná, vypočte se korekce na spotřebu kyslíku při nitrifikaci ze změn koncentrace dusitanů a dusičnanů (dodatek 5).

Vypočte se primární biologický rozklad v procentech z úbytku specifické (výchozí) chemické látky (viz I.7.2):

$$D_t = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

Zjistí-li se při měření fyzikálně-chemického úbytku ztráta zkoušené chemické látky v baňce č. 1, zaznamená se to a jako koncentrace zkoušené látky (S_b) po 28 dnech se pro výpočet biologické rozložitelnosti dosadí tato koncentrace.

Stanovuje-li se koncentrace DOC (nepovinné), vypočte se konečná hodnota biologického rozkladu v procentech podle vztahu:

$$D_t = \left(1 - \frac{C_t - C_{bt}}{C_o - C_{bo}}\right) \times 100$$

jak je uvedeno v bodě I.7.1. Zjistí-li se při měření fyzikálně-chemického úbytku ztráta DOC v baňce č. 1, použije se při výpočtu biologického rozkladu v procentech tato koncentrace DOC.

Všechny výsledky se zaznamenají do příslušného formuláře přehledu dat.

VII.3.2. **Platnost výsledků**

Obvyklá spotřeba kyslíku inokulem je 20–30 mg O_2 na litr a neměla by být větší než 60 mg/l za 28 dnů. Hodnoty větší než 60 mg/l vyžadují kritické přehodnocení výsledků a experimentální techniky. Je-li pH mimo rozpětí 6–8,5 a spotřeba kyslíku zkoušenou látkou je menší než 60 %, měla by být zkouška opakována s nižší koncentrací zkoušené látky.

Viz také I.5.2.

Pokud procenta rozkladu anilinu vypočítaná ze spotřeby kyslíku nepřekročí 40 % po 7 dnech a 65 % po 14 dnech, test je považován za neplatný.

VII.3.3. **Zprávy**

Viz I.8.

VII.4. PŘEHLED DAT

Dále je uveden příklad přehledu dat:

ZKOUŠKA MITI (I)

1. **LABORATOŘ**

2. **DATUM POČÁTKU ZKOUŠKY**

▼B

3. **ZKOUŠENÁ LÁTKA**

Název:

Koncentrace chemické látky v zásobním roztoku: … mg/l

Počáteční koncentrace v médiu, C_0: … mg/l

Objem reakční směsi, V: … ml

TSK: mg O_2/litr

4. **INOKULUM**

Místa odběru kalu:

1. …
2. …
3. …
4. …
5. …
6. …
7. …
8. …
9. …
10. …

Koncentrace suspendovaných látek v aktivovaném kalu po aklimatizaci se syntetickými splašky = … mg/l.

Objem aktivovaného kalu v litru konečného média = … ml

Koncentrace kalu v konečném médiu = … mg/l

5. **SPOTŘEBA KYSLÍKU BIOLOGICKÁ ROZLOŽITELNOST**

Typ použitého respirometru:

			Čas {dny)				
			0	7	14	il	2S
Spotřeba O_2 (mg) zkoušenou látkou	a_1						
	a_2						
	a_3						
Spotřeba O_2 (mg) ve slepé zkoušce	b						
Korigovaná spotřeba O_2 (mg)	$(a_1 - b)$ $(a_1 - b)$ $(a_1 - b)$						
BSK na mg zkoušené látky	$\frac{(a - b)}{C_o V}$	Baňka 1					
		Baňka 2					
		Baňka 3					
Rozklad v % BOD $\frac{BOD}{ThOD} \times 100$		1					
		2					
		3					
		Průměr ([1])					

([1]) Hodnoty nelze průměrovat. je-li mezi nimi výrazný rozdíl.

▼B

Poznámka: podobný formulár lze použít i pro referenční látku.

6. **ANALÝZA UHLÍKU** (podle volby)

Analyzátor uhlíku:

Baňka	DOC				úbytek DOC v %	Průměr
	Naměřená hodnota		Korigovaná hodnota			
Voda + zkoušená látka	a				—	—
Kal + zkoušená látka	b_1		$b_1 - c$			
Kal + zkoušená látka	b_2		$b_2 - c$			
Kal + zkoušená látka	b_3		$b_3 - c$			
Kontrolní slepá zkouška	c		—		—	—

$$\text{odstraněný DOC v\%} = \frac{a_1 - (b - c)}{a} \times 100$$

7. **DATA ZE SPECIFICKÉ CHEMICKÉ ANALÝZY**

	Zbytkové množství zkoušené chemické látky na konci zkoušky	Rozklad v %
Slepá zkouška s vodou	S_b	
Inokulované médium	S_{a1}	
	S_{a2}	
	S_{a3}	

$$\text{rozklad v\%} = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

Rozklad v % se vypočte pro baňky a1, a2, a3.

8. **POZNÁMKY**

Připojí se křivka závislosti BSK na čase, je-li k dispozici.

▼B

DODATEK 1

ZKRATKY A DEFINICE

DO: Rozpuštěný kyslík (dissolved oxygen) (mg/l) je koncentrace kyslíku, který je rozpuštěn ve vodném vzorku.

BSK: Biochemická spotřeba kyslíku (biochemical oxygen demand, BOD) (g) je množství kyslíku, jež je v průběhu metabolizace zkoušené látky spotřebováno mikroorganismy; vyjadřuje se také jako spotřeba kyslíku v gramech na gram zkoušené látky (viz metoda C.5).

CHSK: Chemická spotřeba kyslíku (chemical oxygen demand, COD) (g) je množství kyslíku, jež je spotřebováno v průběhu oxidace zkoušené látky horkým kyselým dichromanem; je měřítkem množství přítomných oxidovatelných látek; vyjadřuje se také v gramech kyslíku spotřebovaného na gram zkoušené látky (viz metoda C.6).

DOC: Rozpuštěný organický uhlík (dissolved organic carbon) je celkový organický uhlík, který je přítomný v roztoku nebo projde přes filtr o velikosti pórů 0,45 μm nebo zůstane v supernatantu po odstřeďování po dobu 15 minut při zrychlení 40 000 m/s^2 (asi 4 000 g).

TSK: Teoretická spotřeba kyslíku (theoretical oxygen demand, ThOD) (mg) je celkové množství kyslíku nezbytné pro úplnou oxidaci chemické látky; vypočte se z molekulového vzorce látky (viz bod 2 dodatku 2) a vyjadřuje se také jako množství kyslíku v mg nezbytné na mg zkoušené látky.

TCO_2: Teoretický oxid uhličitý (theoretical carbon dioxide, $ThCO_2$) je množství oxidu uhličitého, které bymělo vzniknout ze známého nebo změřeného obsahu uhlíku ve zkoušené látce za předpokladu její úplné mineralizace; vyjadřuje se v mg oxidu uhličitého uvolněného z 1 mg zkoušené látky.

TOC: Celkový organický uhlík (total organic carbon) ve vzorku je součtem organického uhlíku v roztoku a v suspensi.

IC: Anorganický uhlík (inorganic carbon).

TC: Celkový uhlík (total carbon) je součtem organického a anorganického uhlíku ve vzorku.

Primární biologický rozklad:

jsou změny chemické struktury látky způsobené biologickým působením, vedoucí ke ztrátě specifických vlastností látky.

Úplný biologický rozklad (aerobní):

je stupeň rozkladu látky dosažený po jejím úplném zužitkování mikroorganismy, vedoucí k produkci oxiduuhličitého, vody, minerálních solí a nové mikrobiální buněčné hmoty (biomasy).

Snadno biologicky rozložitelná:

je dohodnutá klasifikace chemických látek, které prošly screeningovými zkouškami úplné biologické rozložitelnosti; tyto zkoušky jsou tak přísné, že lze předpokládat, že se látky budou ve vodném prostředí za aerobních podmínek rychle a úplně biologicky rozkládat.

▼B

Biologicky rozložitelná:

je klasifikace chemických látek, pro něž existuje nepochybný důkaz o jejich biologické rozložitelnosti (primární nebo konečné) v kterékoli uznávané zkoušce biologické rozložitelnosti.

Odstranitelnost:

je náklonnost látek k jejich odstranění při biologickém čištění odpadních vod, aniž by byl nepříznivě ovlivněn normální průběh čisticích pochodů. Látky snadno biologicky rozložitelné jsou obecně odstranitelné, avšak ne všechny rozložitelné látky jsou odstranitelné. Mohou zde působit také abiotické procesy.

Fáze iniciace:

je doba, ve zkoušce na úbytek rozpuštěného organického uhlíku, od inokulace do dosažení alespoň 10 % biologického rozkladu. Fáze iniciace je často různě dlouhá a špatně reprodukovatelná.

Doba rozkladu:

je doba od konce fáze zdržení do dosažení 90 % maximální dosažitelné úrovně rozkladu.

10denní období rozkladu:

je 10 dnů, které následují bezprostředně po dosažení 10 % rozkladu.

▼B

DODATEK 2

VÝPOČET A STANOVENÍ NĚKTERÝCH SOUHRNNÝCH PARAMETRŮ

V závislosti na zvolené zkušební metodě se vyžaduje určení některých souhrnných parametrů. V následujícím oddíle je popsán výpočet těchto hodnot. Využití těchto parametrů je popsáno u jednotlivých metod.

1. **Obsah uhlíku**

Obsah uhlíku se počítá ze známého elementárního složení nebo se stanoví analýzou prvků ve zkoušené látce.

2. **Teoretická spotřeba kyslíku (TSK)**

Teoretickou spotřebu kyslíku (TSK) lze vypočítat ze znalosti elementárního složení nebo z výsledků analýzy prvků. Pro látku

$C_cH_hCl_{cl}N_nNa_{na}O_oP_pS_s$

bez nitrifikace

$$ThOD_{NH4} = \frac{16\ [2\ c + 1/2(h - cl - 3\ n) + 3\ s + 5/2\ p + 1/2\ na - o]}{MW} mg/mg$$

nebo s nitrifikací

$$ThOD_{NO3} = \frac{16\ [2\ c + 1/2(h - cl) + 5/2\ n + 3\ s + 5/2\ p + 1/2\ na - o]}{MW}\ mg/mg$$

3. **Chemická spotřeba kyslíku (CHSK)**

Chemická spotřeba kyslíku (CHSK) se stanoví metodou C.6.

4. **Rozpuštěný organický uhlík (DOC)**

Rozpuštěným organickým uhlíkem je podle definice organický uhlík přítomný ve vodném roztoku chemické látky nebo směsi, který projde přes filtr o velikosti pórů 0,45 μm.

Odeberou se vzorky ze zkušebních nádob a ihned se filtrují pomocí filtračního zařízení s vhodným membránovým filtrem. Prvních 20 ml (toto množství může být při použití malých filtrů zmenšeno) se odstraní. 10–20 ml, nebo v případě nástřiku menší objem (objem závisí na množství potřebném pro analýzu), se uschová pro analýzu uhlíku. Koncentrace DOC se stanoví pomocí analyzátoru organického uhlíku, který umožňuje přesné stanovení koncentrace uhlíku, která je menší nebo rovna 10 % počáteční koncentrace DOC použité ve zkoušce.

Zfiltrované nebo odstředěné vzorky se analyzují týž den, v opačném případě se uchovávají nejdéle 48 hodin při 2–4 °C nebo delší dobu při teplotě nižší než –18 °C.

Poznámky:

Membránové filtry jsou často impregnovány povrchově aktivními látkami za účelem jejich hydrofilizace. Filtr tedy může obsahovat až několik mg rozpustného organického uhlíku, který může ovlivnit stanovení biologické rozložitelnosti. Povrchově aktivní látky a jiné rozpustné organické látky se z filtrů odstraňují vyvařením třikrát jednu hodinu v deionizované vodě. Filtry lze poté skladovat 1 týden ve vodě. Při použití filtračních patron pro jedno použití se musí u každé šarže ověřit, zda neobsahuje rozpustný organický uhlík.

▼B

V závislosti na typu membránového filtru může docházet k adsorpci zkoušené látky na filtru. Doporučuje se ověřit, zda k adsorpci zkoušené chemické látky na filtru nedochází.

Místo filtrace lze použít k rozlišení TOC od DOC odstřeďování při 40 000 $m \cdot s^{-2}$ (4 000 g) po dobu 15 minut. Tato metoda však není spolehlivá při počáteční koncentraci DOC < 10 mg/l, protože buď nelze odstranit všechny bakterie, nebo se zpětně rozpouští uhlík, který je součástí bakteriální plasmy.

LITERATURA

— Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 12th ed, Am. Pub. Hlth. Ass., Am. Wat. Poll. Control Fed., Oxygen Demand, 1965, P 65.

— Wagner, R., Von Wasser, 1976, vol. 46, 139.

— DIN-Entwurf 38 409 Teil 41 Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung, Summarische Wirkungs- und Stoffkenngrößen (Gruppe H). Bestimmung des Chemischen Sauerstoffbedarfs (CSB) (H 41), Normenausschuß Wasserwesen (NAW) in DIN Deutsches Institut für Normung e. V.

— Gerike, P., The biodegradability testing of poorly water soluble compounds. Chemosphere, 1984, vol 13 (1), 169.

▼B

DODATEK 3

VYHODNOCENÍ BIOLOGICKÉ ROZLOŽITELNOSTI ŠPATNĚ ROZPUSTNÝCH LÁTEK

Při zkouškách biologické rozložitelnosti špatně rozpustných látek si zaslouží zvláštní pozornost následující aspekty.

Zatímco odběr vzorků homogenních kapalin je problémem jen zřídka, u pevných látek se doporučuje provést homogenizaci vhodnými prostředky, aby v důsledku nehomogenity nedošlo k chybám. Zvláštní pozornost musí být věnována odběrům reprezentativních vzorků o několika miligramech ze směsí látek, které obsahují velké množství nečistot.

V průběhu zkoušek lze použít různé způsoby míchání. Je třeba věnovat pozornost tomu, aby míchání bylo přiměřené právě pro udržení látky v disperzi a nedocházelo k přehřívání, nadměrnému pěnění a nadměrným třecím silám.

Může se použít emulgátor vytvářející stálé disperzi chemické látky. Nesmí být toxický pro bakterie a nesmí se biologicky rozkládat nebo pěnit za zkušebních podmínek.

Stejná kritéria jako pro emulgátory platí i pro rozpouštědla.

U pevných zkoušených látek se nedoporučuje používat pevné nosiče, mohou však být vhodné v případě olejovitých látek.

Použijí-li se pomocné látky, jako jsou emulgátory, rozpouštědla a nosiče, musí být proveden slepý pokus s pomocnou látkou.

Pro studium biologické rozložitelnosti špatně rozpustných látek lze použít kteroukoli ze tří respirometrických zkoušek (zkouška na úbytek CO_2, na BSK, zkouška MITI).

LITERATURA

— de Morsier, A. et al., Biodegradation tests for poorly soluble compounds. Chemosphere, 1987, vol. 16, 833.

— Gerike, P., The Biodegradability testing of poorly water soluble compounds. Chemosphere, 1984, vol. 13, 169.

▼B

DODATEK 4

VYHODNOCENÍ BIOLOGICKÉ ROZLOŽITELNOSTI LÁTEK POTENCIÁLNĚ TOXICKÝCH PRO INOKULUM

Je-li chemická látka podrobena zkoušení snadné biologické rozložitelnosti a jeví se jako biologicky nerozložitelná, doporučuje se postupovat při požadavku rozlišit inhibiční působení od odolnosti látky vůči rozkladu následujícím způsobem (Reynolds et al., 1987).

Ve zkouškách toxicity i ve zkouškách biologické rozložitelnosti se použijí podobná nebo stejná inokula.

K posouzení toxicity chemických látek zkoušených ve zkouškách snadné biologické rozložitelnosti se doporučuje použít zkoušku inhibice dýchání aktivovaného kalu (směrnice 88/302/EHS), stanovení BSK nebo metodu inhibice růstu nebo kombinaci těchto metod.

Nemá-li dojít k inhibici z důvodu toxicity, měla by být koncentrace zkoušené látky použitá ve zkouškách snadné biologické rozložitelnosti menší než 1/10 hodnoty EC_{50} (nebo menší než EC_{20}) zjištěné zkouškou toxicity. Látky s EC_{50} > 300 mg/l pravděpodobně nemají při zkouškách snadné biologické rozložitelnosti toxické účinky.

Hodnoty EC_{50} < 20 mg/l mohou při následném zkoušení působit potíže. Měly by být použity nízké koncentrace, což vyžaduje použít přísné a citlivé zkoušky v uzavřených lahvičkách nebo materiál značený ^{14}C. Použití vyšších koncentrací zkoušené látky může být popřípadě umožněno nasazením aklimatizovaného inokula. V tomto případě se však ztrácí specifické kritérium zkoušky snadné biologické rozložitelnosti.

LITERATURA

Reynolds, L. et al., Evaluation of the toxicity of substances to be assessed for biodegradability. Chemosphere, 1987, vol. 16, 2259.

▼B

DODATEK 5

KOREKCE NA SPOTŘEBU KYSLÍKU PŘI NITRIFIKACI

Chyby způsobené tím, že při stanovení spotřeby kyslíku ve zkouškách látek, které neobsahují dusík, není vzata v úvahu nitrifikace, nejsou významné (nejsou větší než 5 %), i když je oxidace amoniakálního dusíku ve zkušebních nádobách a ve slepém pokusu nepravidelná. U zkoušených látek obsahujících dusík může dojít ke značným chybám.

Dochází-li k nitrifikaci, avšak nikoli úplné, musí být spotřeba kyslíku reakční směsí korigována na množství kyslíku spotřebovaného na oxidaci amoniaku a amonných iontů na dusitany a dusičnany, jsou-li změny koncentrace dusitanů a dusičnanů během kultivace stanoveny pomocí těchto rovnic:

$$2\ NH_4Cl + 3O_2 = 2\ HN\ O_2 + 2\ HCI + 2\ H_2O \quad (1)$$

$$2\ HNO_2 + O_2 = 2\ HNO_3 \quad (2)$$

Celkově:

$$2\ NH_4Cl + 4\ O_2 = 2\ HNO_3 + 2\ HCl + 2\ H_2O \quad (3)$$

Podle rovnice 1 je spotřeba kyslíku při oxidaci 28 g dusíku obsaženého v NH_4Cl na dusitan 96 g, tzn., že přepočítávací faktor je 3,43 (96/28). Stejně tak je podle rovnice 3 spotřeba kyslíku při oxidaci na dusičnan 128 g, tzn. přepočítávací faktor je 4,57 (128/28).

Protože popsané reakce následují po sobě, přičemž jsou realizovány odlišnými druhy bakterií, může koncentrace dusitanů stoupat i klesat; při poklesu roste odpovídajícím způsobem koncentrace dusičnanů. Spotřeba kyslíku při tvorbě dusičnanů se tedy vypočte vynásobením přírůstku koncentrace dusičnanů faktorem 4,57, zatímco spotřeba kyslíku při tvorbě dusitanů se vypočte vynásobením přírůstku koncentrace dusitanů faktorem 3,43, nebo při poklesu obsahu dusitanů se ztráty kyslíku vypočtou vynásobením poklesu koncentrace faktorem - 3,43.

To znamená:

O_2 spotřebovaný při tvorbě dusičnanů = 4,57 × přírůstek koncentrace dusičnanů (4)

a

O_2 spotřebovaný při tvorbě dusitanů = 3,43 × přírůstek koncentrace dusitanů (5)

a

O_2 při úbytku dusitanů: = - 3,43 × pokles koncentrace dusitanů (6)

Tedy

spotřeba O_2 při nitrifikaci = ± 3,43 × změna koncentrace dusitanů + 4,57 × změna koncentrace dusičnanů (7)

a tedy

spotřeba O_2 při oxidaci uhlíku = celková zjištěná spotřeba – spotřeba při nitrifikaci (8)

Jestliže se stanoví pouze celkový oxidovaný dusík, bude se v prvním přiblížení rovnat spotřeba kyslíku při nitrifikaci hodnotě 4,57 × přírůstek koncentrace oxidovaného dusíku.

Korigovaná hodnota spotřeby kyslíku při oxidaci uhlíku se poté porovná s TSK NH_3 vypočtenou podle dodatku 2.

▼B

C.5. ROZKLAD – BIOCHEMICKÁ SPOTŘEBA KYSLÍKU

1. METODA

1.1. ÚVOD

Metoda je určena pro měření biochemické spotřeby kyslíku (BSK) pevných nebo kapalných organických látek.

Data získaná při této zkoušce platí pro látky rozpustné ve vodě; těkavé látky a látky s nízkou rozpustností ve vodě lze touto metodou alespoň v zásadě rovněž zkoušet.

Metodu lze použít pouze pro organické látky, které nemají v koncentracích používaných při zkoušce inhibiční účinek na bakterie. Není-li daná látka při koncentracích používaných ve zkoušce rozpustná, může být nezbytné použít pro dosažení dobré dispergace zkoušeného materiálu zvláštní postupy, např. dispergaci ultrazvukem.

Informace o toxicitě chemické látky mohou být užitečné při interpretaci nízkých hodnot výsledku zkoušky a při volbě vhodných zkoušených koncentrací.

1.2. DEFINICE A JEDNOTKY

Biochemická spotřeba kyslíku (BSK) je definována jako množství rozpuštěného kyslíku, které je nutné k biochemické oxidaci určitého objemu roztoku látky za předepsaných podmínek.

Výsledky se vyjadřují v gramech spotřeby kyslíku (BSK) na 1 g zkoušené látky.

1.3. REFERENČNÍ LÁTKY

Je žádoucí použít vhodnou referenční látku pro kontrolu aktivity inokula.

1.4. PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

Předem stanovené množství látky rozpuštěné nebo dispergované ve vhodném, dobře provzdušněném médiu se inokuluje mikroorganismy a kultivuje se v temnu za stálé, definované teploty.

BSK se stanoví z rozdílu mezi obsahem rozpuštěného kyslíku na začátku a na konci zkoušky. Zkouška musí trvat nejméně pět dní a nejdéle 28 dní.

Souběžně musí být provedena slepá zkouška bez obsahu zkoušené látky.

1.5. KRITÉRIA JAKOSTI

Stanovení BSK nelze považovat za ověřené stanovení biologické rozložitelnosti látky. Tuto zkoušku lze považovat pouze za screenigovou zkoušku.

1.6. POPIS ZKUŠEBNÍ METODY

Připraví se předběžný roztok nebo disperse zkoušené látky o koncentraci vhodné pro použitou metodu. Poté se stanoví BSK některou vhodnou národní nebo mezinárodní standardizovanou metodou.

▼B

2. **DATA A HODNOCENÍ**

BSK předběžného roztoku se vypočte vybranou normalizovanou metodou a přepočte se na BSK vyjádřenou v gramech na 1 g zkoušené látky.

3. **ZPRÁVY**

Uvede se použitá metoda.

Biochemická spotřeba kyslíku se vypočte jako průměr výsledků alespoň tří platných měření.

Musí být uvedeny všechny informace a poznámky, které jsou důležité pro interpretaci výsledků a které by mohly ovlivnit výsledek, zejména pokud jde o nečistoty, fyzikální stav, toxické účinky a vlastní složení zkoušené látky.

Použití přísad pro inhibici biologické nitrifikace musí být uvedeno.

4. LITERATURA

Seznam příkladů standardizovaných metod:

NF T 90-103: Determination of the biochemical oxygen demand.

NBN 407: Biochemical oxygen demand.

NEN 32355.4: Bepaling van het biochemish zuurstofverbruik (BZV).

The determination of biochemical oxygen demand, Methods for the examination of water and associated materials, HMSO, London.

ISO 5815: Determination of biochemical oxygen demand after n days.

▼B

C.6. ROZKLAD – CHEMICKÁ SPOTŘEBA KYSLÍKU

1. METODA

1.1. ÚVOD

Metoda je určena pro měření chemické spotřeby kyslíku (CHSK) pevných nebo kapalných organických látek prováděné standardním dohodnutým způsobem za pevně stanovených laboratorních podmínek.

Pro provedení této zkoušky a pro interpretaci výsledků jsou užitečné informace o chemickém vzorci látky (např. zda jde o soli halogenů, železnaté soli organických sloučenin, organické sloučeniny chloru).

1.2. DEFINICE A JEDNOTKY

Chemická spotřeba kyslíku (CHSK) je mírou oxidovatelnosti látky, která se vyjadřuje jako ekvivalentní množství kyslíku oxidačního činidla spotřebovaného látkou za pevně stanovených laboratorních podmínek.

Výsledek se vyjadřuje jako množství spotřebovaného kyslíku (COD) v gramech na 1 g zkoušené látky.

1.3. REFERENČNÍ LÁTKY

Při vyšetřování nové látky není nutné vždy používat referenční látky. Měly by v první řadě sloužit k občasné kontrole provedení metody a ke vzájemnému porovnávání výsledků získaných jinými metodami.

1.4. PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

Předem stanovené množství látky rozpuštěné nebo dispergované ve vodě se za přítomnosti síranu stříbrného jako katalyzátoru oxiduje dichromanem draselným v prostředí koncentrované kyseliny sírové pod zpětným chladičem. Přebytečný dichroman se stanoví titrací odměrným roztokem síranu amonnoželeznatého.

U látek obsahujících chlór se pro omezení rušení chloridy přidává síran rtuťnatý ([1]).

1.5. KRITÉRIA JAKOSTI

Vzhledem k dohodnutým podmínkám stanovení je CHSK „ukazatelem oxidovatelnosti“ a jako takový se používá pro hodnocení organických látek.

Ve zkoušce mohou rušit chloridy; na stanovení CHSK mohou mít rovněž vliv anorganické redukční a oxidační látky.

U některých cyklických sloučenin a u řady těkavých sloučenin (např. u nižších mastných kyselin) nedochází v této zkoušce k úplné oxidaci.

1.6. POPIS ZKUŠEBNÍ METODY

Připraví se počáteční roztok nebo disperse látky tak, aby bylo dosaženo CHSK od 250 do 600 mg/l.

([1]) S roztoky obsahujícími rtuť se po použití nakládá tak, aby nedošlo k průniku rtuti do životního prostředí.

▼B

Poznámky:

U špatně rozpustných nebo nedispergovatelných látek lze jemně rozmělněnou látku nebo kapalinu v množství odpovídajícím 5 mg CHSK odvážit a vpravit přímo do experimentální aparatury s vodou.

Často je výhodné, zejména v případě špatně rozpustných látek, stanovit CHSK upravenou metodou, tj. v uzavřeném systému s vyrovnávačem tlaku (H. Kelkenberg, 1975). Touto upravenou metodou lze často úspěšně kvantifikovat i látky, u nichž je stanovení konvenční metodou obtížné – např. kyselinu octovou. Metoda však také selhává v případě pyridinu. Zvýší-li se koncentrace dichromanu draselného předepsaná v (1) na 0,25 N (0,0416 M), usnadní se přímé navažování 5–10 mg látky, což je důležité pro stanovení CHSK látek obtížně rozpustných ve vodě (2).

Jinak se CHSK stanoví vhodnou národní nebo mezinárodní metodou.

2. **DATA A HODNOCENÍ**

CHSK obsahu experimentální baňky se vypočte vybranou normalizovanou metodou a přepočte se na CHSK vyjádřenou v gramech na 1 g zkoušené látky.

3. **ZPRÁVY**

Uvede se odkaz na použitou metodu.

Chemická spotřeba kyslíku se vypočte jako průměr výsledků alespoň tří měření. Jsou-li známy, musí být uvedeny všechny informace a poznámky, které jsou důležité pro interpretaci výsledků a které by mohly ovlivnit výsledek, zejména pokud jde o nečistoty, fyzikální stav a základní vlastnosti zkoušené látky.

Uvede se použití síranu rtuťnatého za účelem omezení rušení chloridy.

4. **LITERATURA**

1) Kelkenberg, H., Z. von Wasser und Abwasserforschung, 1975, vol. 8, 146.

2) Gerike, P. The biodegradability testing of poorly water soluble compounds. Chemosphere, 1984, vol. 13, 169.

Seznam příkladů normovaných metod:

NBN T 91-201 Determination of the chemical oxygen demand.

ISBN O 11 7512494 Chemical oxygen demand (dichromate value) of polluted and waste waters.

NF T 90-101 Determination of the chemical oxygen demand.

DS 217 = water analysis Determination of the chemical oxygen demand.

DIN 38409-H-41 Determination of the chemical oxygen demand (COD) within the range above 15 mg per litre.

NEN 3235 5.3 Bepaling van het chemisch zuurstofverbruik.

ISO 6060 Water quality: chemical oxygen demand dichromate methods.

▼B

C.7. ABIOTICKÝ ROZKLAD – HYDROLÝZA JAKO FUNKCE PH

1. METODA

Tato zkušební metoda odpovídá pokynům OECD TG 111 (2004).

1.1. ÚVOD

Chemikálie mohou vstupovat do povrchových vod cestami, jako je přímá aplikace, rozprášený postřik, odplavení, odvodňování, zneškodňování odpadu, průmyslové odpadní vody, odpadní vody z domácností a ze zemědělství a atmosférické depozice, a v těchto vodách se mohou chemickými (např. hydrolýza, oxidace), fotochemickými a/nebo mikrobiálními procesy měnit. Tyto pokyny popisují laboratorní zkušební metody pro hodnocení abiotických hydrolytických přeměn chemikálií ve vodních systémech při hodnotách pH běžně se nacházejících v životním prostředí (pH 4–9), přičemž vycházejí ze stávajících pokynů (1, 2, 3, 4, 5, 6 a 7).

Pokusy se provádějí pro stanovení i) rychlosti hydrolýzy zkoušené látky jako funkce pH a ii) identity nebo povahy a rychlosti tvorby a rozkladu produktů hydrolýzy, kterým mohou být organismy vystaveny. Tyto studie lze požadovat pro chemikálie, které se aplikují přímo do vody, nebo u nichž existuje pravděpodobnost, že vniknou do životního prostředí jinými než výše popsanými cestami.

1.2. DEFINICE A JEDNOTKY

Viz příloha 2.

1.3. VHODNOST ZKUŠEBNÍ METODY

Tato metoda je obecně použitelná na chemické látky (radioizotopově neznačené nebo značené), pro které je k dispozici analytická metoda s dostatečnou přesností a citlivostí. Je použitelná na slabě těkavé a netěkavé směsi dostatečné rozpustnosti ve vodě. Zkouška by se neměla používat na chemikálie, které jsou vysoce těkavé z vody (např. fumiganty, organická rozpouštědla), a nelze je tedy udržovat v roztoku za experimentálních podmínek této zkoušky. Zkouška může být obtížně proveditelná v případě látek s minimální rozpustností ve vodě (8).

1.4. PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

Sterilní vodní pufrační roztoky různých hodnot pH (pH 4, 7 a 9) se podrobují chemickému působení zkušební látkou a inkubují v temnu za regulovaných laboratorních podmínek (při konstantních teplotách). Po příslušném časovém intervalu se pufrační roztoky analyzují pro přítomnost zkoušené látky a produktů hydrolýzy. Látkovou bilanci lze snadněji stanovit u radioizotopově značených zkoušených látek (např. ^{14}C).

Tato zkušební metoda je navržena jako stupňovitý přístup, dále uvedený a vysvětlený v příloze 1. Každý stupeň závisí na výsledcích předchozího stupně.

▼B

1.5. ÚDAJE O ZKOUŠENÉ LÁTCE

Pro měření rychlosti hydrolýzy lze použít radioizotopově neznačených nebo značených zkoušených látek. Pro studium způsobu hydrolýzy a pro stanovení hmotnostní bilance se obvykle dává přednost radioizotopově značené látce. Ve zvláštních případech však nemusí být radioizotopové značení nezbytně nutné. Doporučuje se radioizotopové značení ^{14}C, ale použití jiných izotopů jako ^{13}C, ^{15}N, ^{3}H může být také vhodné. Pokud je to možné, mělo by se značení nacházet v nejstabilnější části molekuly. Pokud například zkoušená látka obsahuje jedno jádro, vyžaduje se značení na tomto řetězci. Jestliže zkoušená látka obsahuje dvě nebo více jader, bude potřeba provést oddělené studie pro zhodnocení rozpadu každého značeného jádra a získání odpovídajících informací o vzniku produktů hydrolýzy. Čistota zkoušené látky by měla být alespoň 95 %.

Před prováděním hydrolytických zkoušek by měly být o zkoušené látce známy tyto informace:

a) rozpustnost ve vodě (zkušební metoda A.6);

b) rozpustnost v organických rozpouštědlech;

c) tlak par (zkušební metoda A.4) a/nebo Henryho konstanta;

d) rozdělovací koeficient oktanol/voda (zkušební metoda A.8);

e) disociační konstanta (pK_a) (pokyny OECD 112) (9);

f) rychlost případné přímé a nepřímé fototransformace ve vodě.

Měly by být k dispozici analytické metody pro kvantitativní stanovení zkoušené látky a případně pro identifikaci a kvantitativní stanovení produktů hydrolýzy ve vodných roztocích (viz také oddíl 1.7.2).

1.6. REFERENČNÍ LÁTKY

Kde je to možné, měly by být pro identifikaci a kvantitativní stanovení produktů hydrolýzy pomocí spektroskopické a chromatografické metody nebo jiné dostatečně citlivé metody použity referenční látky.

1.7. KRITÉRIA JAKOSTI

1.7.1. **Výtěžek metody**

Analýza alespoň dvou pufračních roztoků nebo jejich extraktů okamžitě po přidání zkoušené látky poskytuje první údaje o opakovatelnosti analytické metody a o shodnosti postupu použití zkoušené látky. Výtěžky v posledních fázích pokusů závisí na příslušných hmotnostních bilancích (při použití radioizotopově značené látky). Výtěžky by se měly pohybovat od 90 % do 110 % u radioizotopově značených a radioizotopově neznačených chemikálií (7). V případě, že je technicky obtížné dosáhnout tohoto rozpětí, je pro radioizotopově neznačené chemikálie přípustný výtěžek 70 %. V tomto případě však musí být poskytnuto zdůvodnění.

▼B

1.7.2. **Opakovatelnost a citlivost analytické metody**

Opakovatelnost analytické metody použité pro kvantitativní stanovení zkoušené látky a produktů hydrolýzy v pozdějších stadiích lze zkontrolovat dvojí analýzou stejných pufračních roztoků (nebo jejich extraktů) poté, co vznikne dostatečné množství produktů hydrolýzy pro jejich kvantitativní stanovení.

Analytická metoda by měla být dostatečně citlivá na to, aby bylo možno kvantitativně stanovit zkoušenou látku v koncentraci až do 10 % počáteční koncentrace nebo nižší. Je-li to potřeba, měly by být analytické metody také dostatečně citlivé, aby bylo možno kvantitativně stanovit všechny produkty hydrolýzy představující 10 % nebo více aplikované zkoušené látky (a to aplikované kdykoli během studie) a 25 % nebo méně její maximální koncentrace.

1.7.3. **Intervaly spolehlivosti hydrolytických kinetických dat**

Intervaly spolehlivosti by měly být vypočítány a uvedeny pro všechny regresní koeficienty, rychlostní konstanty, poločasy a další kinetické parametry (např. DT50).

1.8. POPIS ZKUŠEBNÍ METODY

1.8.1. **Přístroje a pomůcky**

Studie by se měla provádět ve skleněných nádobách (např. zkumavky, malé baňky) v temnu a ve sterilních podmínkách, pokud ovšem předběžná informace (jako rozdělovací koeficient oktanol/voda) nenaznačuje, že by zkoušená látka mohla lnout ke sklu. V těchto případech je potřeba zvážit alternativní materiály (jako teflon). Problém lnutí ke sklu by mohlo také být možné zmírnit použitím jedné nebo více z následujících metod:

— stanovení hmotnosti zkoušené látky a produktů hydrolýzy sorbovaných ke zkušební nádobě,

— použití ultrazvukové lázně,

— zajištění omytí skla rozpouštědlem mezi každým intervalem odběru vzorku,

— použití upravených přípravků,

— použití zvýšeného množství kosolventu pro přidávání zkoušené látky do systému; v případě použití kosolventu by se měl použít kosolvent, který nezpůsobuje hydrolýzu zkoušené látky.

Pro inkubaci různých zkušebních roztoků je obvykle potřeba použít třepací vodní lázně s regulací teploty nebo inkubátory s termostatickou regulací.

Vyžaduje se standardní laboratorní vybavení, zejména:

— pH-metr,

▼B

— analytické přístroje jako zařízení pro GC, HPLC, TLC, včetně odpovídajících detekčních systémů pro analýzu radioizotopově značených a neznačených látek nebo inverzní zřeďovací metodu pro izotopy,

— přístroje pro účely identifikace (např. MS, GC-MS, HPLC-MS, NMR atd.),

— tekutý scintilační počítač,

— dělicí nálevky na extrakci kapalina-kapalina,

— přístroje pro zvyšování koncentrace roztoků a extraktů (např. rotační odpařovací zařízení),

— zařízení pro regulaci teploty (např. vodní lázeň).

Chemická činidla zahrnují například:

— organická rozpouštědla, činidla analytické kvality jako hexan, dichlormetan atd.,

— scintilační kapalinu,

— pufrační roztoky (podrobnosti viz v oddíle 1.8.3).

Veškeré sklo, voda čistoty p.a. a pufrační roztoky používané v hydrolytických zkouškách by měly být sterilizované.

1.8.2. **Aplikace zkoušené látky**

Zkoušená látka by se měla aplikovat jako vodný roztok do různých pufračních roztoků (viz dodatek 3). Je-li to nutné pro dosažení řádného rozpuštění, je dovoleno pro aplikaci a distribuci zkoušené látky použít malé množství rozpouštědel mísitelných s vodou (jako acetonitril, aceton, etanol), neměly by však překročit 1 % obj. Uvažuje-li se o vyšší koncentraci rozpouštědel (např. v případě málo rozpustných zkoušených látek), je to možné pouze tehdy, lze-li dokázat, že rozpouštědlo nemá žádný vliv na hydrolýzu zkoušené látky.

Použití upraveného přípravku se běžně nedoporučuje, protože nelze vyloučit, že by složky formulace neměly vliv na hydrolytický proces. U zkoušených látek špatně rozpustných ve vodě nebo u látek, které lnou ke sklu (viz oddíl 1.8.1), však může být použití upraveného materiálu vhodnou alternativou.

Použít by se měla jen jedna koncentrace zkoušené látky. Neměla by překročit 0,01 M nebo polovinu koncentrace nasyceného roztoku (viz dodatek 1).

▼B

1.8.3. **Pufrační roztoky**

Hydrolytická zkouška by se měla provádět při hodnotách pH 4, 7 a 9. K tomuto účelu se za použití chemikálií a vody čistoty p.a. připraví pufrační roztoky. Některé vhodné pufrační roztoky jsou uvedeny v příloze 3. Je třeba poznamenat, že použitý pufrační roztok může mít vliv na rychlost hydrolýzy. Je-li tomu tak, je třeba zvolit jiný pufrační roztok ([1]).

Hodnota pH každého pufračního roztoku by se měla ověřit kalibrovaným pH-metrem s přesností alespoň 0,1 při požadované teplotě.

1.8.4. **Zkušební podmínky**

1.8.4.1. *Zkušební teplota*

Hydrolytické pokusy by se měly provádět za konstantních teplot. Pro účely extrapolace je důležité udržovat teplotu alespoň na ± 0,5°C.

Není-li hydrolytické chování zkoušené látky známé, měla by se předběžná zkouška (stupeň 1) provést při teplotě 50 °C. Pokud zkouška stupně 1 neprokáže, že je zkoušená látka stálá vůči hydrolýze, měly by se kinetické zkoušky vyšších stupňů provést minimálně při třech různých teplotách (včetně zkoušky při 50 °C). Doporučovaný rozsah teplot je 10–70 °C (nejlépe s alespoň jednou teplotou pod 25 °C), což bude zahrnovat vykazovanou teplotu 25 °C a většinu teplot vyskytujících se v poli.

1.8.4.2. *Světlo a kyslík*

Všechny hydrolytické zkoušky by měly být provedeny s využitím vhodné metody, která umožní zabránit fotolytickým vlivům. Měla by se přijmout veškerá vhodná opatření proti vlivu kyslíku (např. pětiminutovým probubláváním roztoku heliem, dusíkem nebo argonem před přípravou roztoku).

1.8.4.3. *Trvání zkoušky*

Předběžná zkouška by se měla provádět 5 dní, zatímco zkoušky vyššího stupně by se měly provádět až do 90 % hydrolýzy zkoušené látky nebo po dobu 30 dní podle toho, co nastane dříve.

1.8.5. **Provedení zkoušky**

1.8.5.1. *Předběžná zkouška (stupeň 1)*

Předběžná zkouška se provede při teplotě 50 ± 0,5°C a při hodnotách pH 4,0; 7,0 a 9,0. Pokud se po 5 dnech pozoruje stupeň hydrolýzy nižší než 10 % ($t_{0.525\ °C}$ > 1 rok), považuje se zkoušená látka za hydrolyticky stálou a obvykle nejsou žádné zkoušky potřeba. Je-li o látce známo, že je za teplot běžných v životním prostředí ([2]) nestálá, není předběžná zkouška nutná. Analytická metoda musí být dostatečně přesná a citlivá pro zjištění úbytku počáteční koncentrace o 10 %.

([1]) Mabey a Mill doporučují použít namísto fosforečnanových pufračních roztoků boritanové a acetátové pufrační roztoky (11).

([2]) Tato informace může pocházet z jiných zdrojů, jako jsou hydrolytické údaje o strukturně podobných směsích z literatury, nebo z jiných předběžných, semikvantitativních hydrolytických zkoušek se zkoušenou látkou v ranější fázi vývoje.

▼B

1.8.5.2. *Hydrolýzy nestabilních látek (stupeň 2)*

Zkoušky vyššího stupně by se měly provádět při hodnotách pH, při kterých bylo na základě předběžné zkoušky zjištěno, že je zkoušená látka nestálá. Pufrační roztoky zkoušených látek by se měly přechovávat v termostatech při zvolených teplotách. Pro zkoušku reakce prvního řádu by se měl každý reakční roztok analyzovat v časových intervalech, které dávají minimálně šest bodů obvykle mezi 10 % a 90 % hydrolýzy zkoušené látky. Měly by se odebrat jednotlivé paralelní zkušební vzorky (minimálně dva vzorky obsažené v oddělených reakčních nádobách) a jejich obsah by se měl při každém z minimálně šesti odběrů vzorků analyzovat (pro získání minimálně dvanácti paralelních bodů). Použití jednoho souhrnného vzorku, ze kterého se odeberou jednotlivé podíly zkoušeného roztoku v každém intervalu odběru vzorku, se považuje za nevhodné, protože tento způsob neumožňuje analýzu proměnnosti dat a může vést k problémům s kontaminací zkušebního roztoku. Na konci zkoušky vyššího stupně (tj. buď při dosažení 90 % hydrolýzy nebo po 30 dnech) by se měly provést zkoušky potvrzení sterility. Pokud však není pozorován žádný rozklad (tj. přeměna), nepovažují se zkoušky sterility za nutné.

1.8.5.3. *Určení produktů hydrolýzy (stupeň 3)*

Všechny důležité produkty hydrolýzy, alespoň ty, které představují více než 10 % aplikované dávky, by se měly identifikovat pomocí příslušných analytických metod.

1.8.5.4. *Nepovinné zkoušky*

U hydrolyticky nestálých zkoušených látek se mohou požadovat další zkoušky při jiných hodnotách pH než 4, 7 a 9. Například pro fyziologické účely lze požadovat zkoušku provedenou za kyselejších podmínek (např. pH 1,2) s využitím jediné fyziologicky významné teploty (37 ^{o}C).

2. **ÚDAJE**

Množství zkoušené látky a případně produktů hydrolýzy by mělo být vyjádřeno jako % počáteční aplikované koncentrace a tam, kde to je vhodné, jako množství vyjádřené v mg/l pro každý interval odběru vzorku a každou hodnotu pH a zkušební teplotu. Kromě toho v případě použití radioizotopově značené zkoušené látky by měla být hmotnostní bilance vyjádřena jako procento aplikované počáteční koncentrace.

Ve zprávě by mělo být uvedeno grafické znázornění logaritmicky převedených údajů o koncentracích zkoušené látky v závislosti na čase. Určeny by měly být všechny důležité produkty hydrolýzy, alespoň ty, které představují 10 % anebo více, a stejným způsobem jako u původní látky by měly být zakresleny také jejich logaritmicky převedené koncentrace, aby byla zřejmá rychlost tvorby a rozkladu těchto produktů hydrolýzy.

▼B

2.1. ZPRACOVÁNÍ VÝSLEDKŮ

Použitím vhodných výpočtů podle kinetických modelů by mělo být možno přesněji stanovit poločasy nebo hodnoty DT_{50}. Pro každé pH a teplotu by měly být vykázány hodnoty poločasu a/nebo DT_{50} (včetně intervalů spolehlivosti), a to společně s popisem použitého modelu, řádem kinetiky a koeficientem určení (r^2). Je-li to vhodné, měly by být výpočty použity také na produkty hydrolýzy.

V případě studia rychlosti provedeného při různých teplotách by měly být rychlostní konstanty hydrolytických reakcí pseudoprvního řádu ($k_{pozorov}$) popsány jako funkce teploty. Výpočet by měl vycházet jak z rozdělení $k_{pozorov}$ do rychlostních konstant pro hydrolýzu s kyselým katalyzátorem, neutrální hydrolýzu a hydrolýzu se zásaditým katalyzátorem (k_H, $k_{neutral}$ a k_{OH}) tak z Arrheniovy rovnice:

$$k_{pozorov} = k_H[H^+] + k_{neutral} + k_{OH}[OH^-] = \sum_{i = H,neutral,OH} A_i e^{-B_i/T}$$

kde A_i a B_i jsou regresní konstanty z úseku a směrnice nejlépe proložených křivek získaných lineární regresí ln k_i proti převrácené hodnotě absolutní teploty v kelvinech (T). Pomocí využití Arrheniovy rovnice pro kyselé, neutrální a zásadité hydrolýzy lze vypočítat rychlostní konstanty reakcí pseudoprvního řádu, a tudíž poločasy pro ostatní teploty, pro které nelze stanovit rychlostní konstantu přímým experimentálním stanovením (10).

2.2. VYHODNOCENÍ A INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

Většina hydrolytických reakcí sleduje zřejmé rychlosti reakcí prvního řádu, proto jsou poločasy nezávislé na koncentraci (viz rovnici 4 v příloze 2). To obvykle umožňuje použití laboratorních výsledků stanovených při látkovém množství 10^{-2} až 10^{-3} M na podmínky životního prostředí ($\leq 10^{-6}$ M) (10). Mabey a Mill (11) publikovali několik příkladů dobré shody mezi rychlostmi hydrolýzy naměřenými v čisté vodě i v přírodních vodách u různých chemikálií za předpokladu, že byly měřeny jak pH, tak teplota.

3. **ZPRÁVY**

3.1. PROTOKOL O ZKOUŠCE

Protokol o zkoušce musí obsahovat alespoň tyto informace:

Zkoušená látka:

— obecný název, chemický název, číslo CAS, strukturní vzorec (uvádějící místo značení v případě použití radioizotopově značeného materiálu) a příslušné fyzikálně-chemické vlastnosti (viz oddíl 1.5),

— čistota (znečištění) zkoušené látky,

— izotopová čistota radioizotopově značené chemikálie a molární aktivita (kde to je možné).

▼B

— Pufrační roztoky:

— data přípravy a podrobnosti o přípravě,

— použité pufry a vody,

— molarita a pH pufračních roztoků.

Zkušební podmínky:

— data provedení studií,

— množství aplikované zkoušené látky,

— metoda a rozpouštědla (druh a množství) použitá pro aplikaci zkoušené látky,

— objem inkubovaných pufračních roztoků zkoušené látky,

— objem inkubovaných pufračních roztoků zkoušené látky,

— pH a teplota během studie,

— časy odběrů vzorků,

— metody extrakce,

— metody pro kvantitativní stanovení a identifikaci zkoušené látky a produktů její hydrolýzy v pufračních roztocích,

— počet paralelních vzorků.

Výsledky:

— opakovatelnost a citlivost použitých analytických metod,

— výtěžky (procentuální hodnoty pro platnou studii jsou uvedeny v oddíle 1.7.1),

— paralelní údaje a prostředky ve formě tabulky,

— hmotnostní bilance během studií a na jejich konci (v případě použití radioizotopově značené zkoušené látky),

— výsledky předběžné zkoušky,

— rozbor a interpretace výsledků,

— všechny původní údaje a čísla.

Následující informace jsou potřeba, pouze je-li stanovena rychlost hydrolýzy:

— grafy závislosti koncentrací na čase pro zkoušenou látku a popřípadě produkt hydrolýzy při každé hodnotě pH a teplotě,

— tabulky výsledků Arrheniovy rovnice pro teploty 20 °C/25 °C, s hodnotami pH, rychlostní konstantou (h^{-1} nebo den^{-1}), poločasem nebo DT_{50}, teplotami (°C) včetně intervalů spolehlivosti a korelačních koeficientů (r^2) nebo srovnatelných informací,

— navrhovaný způsob hydrolýzy.

▼B

4. **LITERATURA**

1) OECD (1981). Hydrolysis as a Function of pH. OECD Guideline for Testing of Chemicals Nr. 111, adopted 12 May 1981.

2) US-Environmental Protection Agency (1982). 40 CFR 796.3500, Hydrolysis as a Function of pH at 25 °C. Pesticide Assessment Guidelines, Subdivision N. Chemistry: Environmental Fate.

3) Agriculture Canada (1987). Environmental Chemistry and Fate Guidelines for registration of pesticides in Canada.

4) European Union (EU) (1995). Commission Directive 95/36/EC amending Council Directive 91/414/EEC concerning the placing of plant protection products on the market. Annex V: Fate and Behaviour in the Environment.

5) Dutch Commission for Registration of Pesticides (1991). Application for registration of a pesticide. Section G: Behaviour of the product and its metabolites in soil, water and air.

6) BBA (1980). Merkblatt Nr. 55, Teil I und II: Prüfung des Verhaltens von Pflanzenbehandlungsmitteln im Wasser (October 1980).

7) SETAC (1995). Procedures for Assessing the Environmental Fate and Ecotoxicity of Pesticides. Mark R. Lynch, Ed.

8) OECD (2000). Guidance document on aquatic toxicity testing of difficult substances and mixtures, OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment Nr. 23.

9) OECD (1993). Guidelines for the Testing of Chemicals. Paris. OECD (1994–2000): Addenda 6-11 to Guidelines for the Testing of Chemicals.

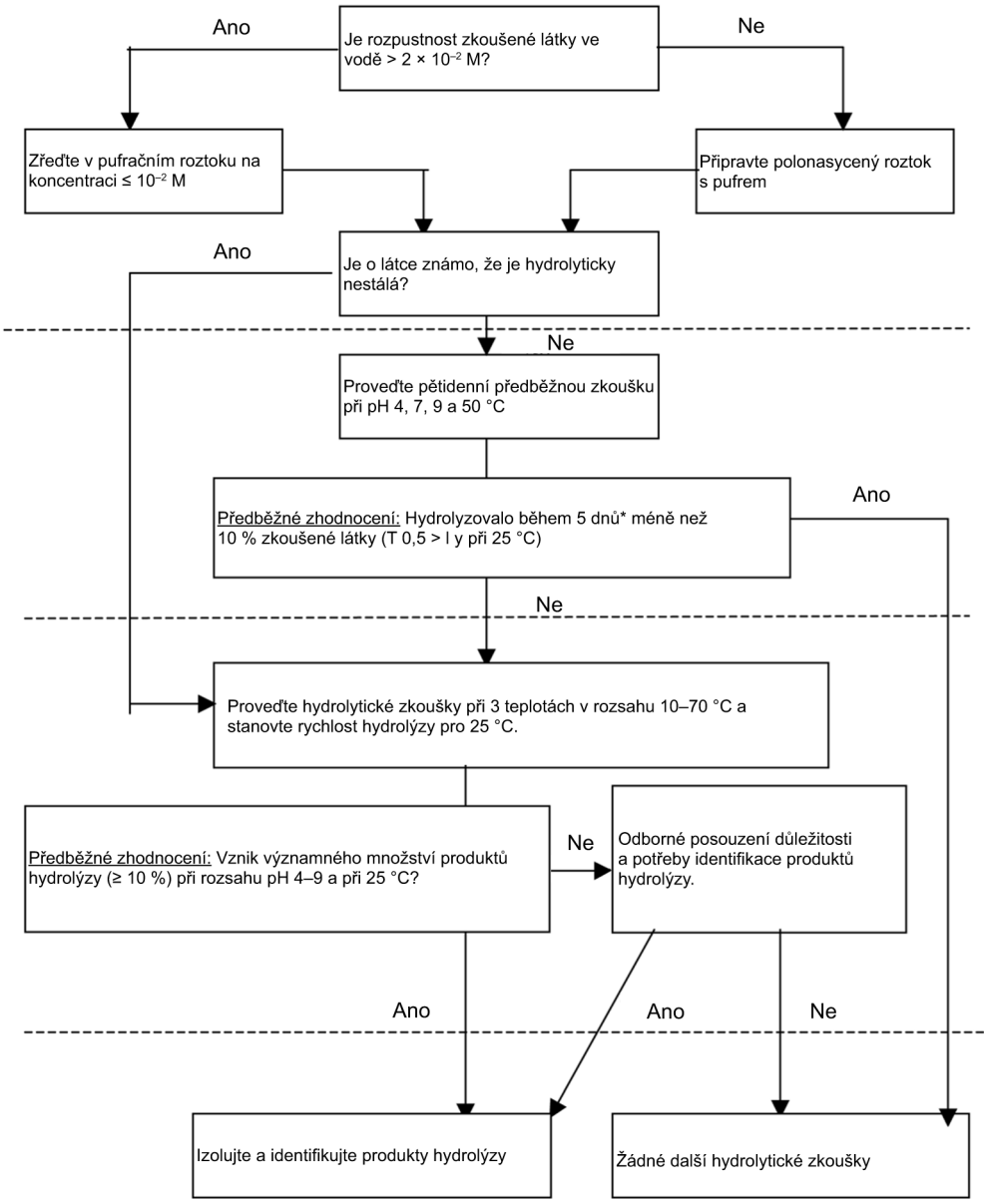
10) Nelson, H, Laskowski D, Thermes S, and Hendley P. (1997) Recommended changes in pesticide fate study guidelines for improving input to computer models. (Text version of oral presentation at the 14th Annual Meeting of the Society of Environmental Toxicology and Chemistry, Dallas TX, November 1993).

11) Mabey, W. and Mill, T. (1978). Critical review of hydrolysis of organic compounds in water under environmental conditions. J. Phys. Chem. Ref. Data 7, 383-41

▼B

DODATEK 1

Schéma stupňovité hydrolytické zkoušky



* 10% hydrolýza zkoušené látky při teplotě 50 °C odpovídá poločasu přibližně 30 dní, což odpovídá přibližné délce 1 roku při 25 °C.

▼B

DODATEK 2

Definice a jednotky

V každém případě by se měly používat **standardní mezinárodní jednotky (SI).**

Zkoušená látka: jakákoli látka, ať už původní látka, nebo příslušné produkty přeměny.

Produkty přeměny: veškeré látky vzniklé reakcemi biotické nebo abiotické přeměny zkoušené látky.

Produkty hydrolýzy: veškeré látky vzniklé reakcemi hydrolytické přeměny zkoušené látky.

Hydrolýza je reakce zkoušené látky RX s vodou s prostou výměnou skupiny X za skupinu OH v reakčním centru:

$$RX + HOH \rightarrow ROH + HX \qquad [1]$$

Rychlost, kterou klesá koncentrace látky RX v tomto zjednodušeném procesu, je dána vztahem:

rychlost = $k\ [H_2O]\ [RX]$ reakce druhého řádu

nebo

rychlost = $k\ [RX]$ reakce prvního řádu

v závislosti na kroku určujícím rychlost. Protože je voda přítomna vůči zkoušené látce ve velkém přebytku, označuje se obvykle tento typ reakce jako reakce pseudoprvního řádu, ve které je pozorovaná rychlostní konstanta dána vztahem

$$k_{pozorov.} = k\ [H_2O] \qquad [2]$$

a lze ji určit z výrazu (*)

$$k_{pozorov.} = \frac{1}{t} \ln \frac{C_o}{C_t} \qquad [3]$$

kde:

kde t = čas

a C_o, C_t = koncentrace látky RX v časech 0 a t.

Jednotky této konstanty mají rozměr $(čas)^{-1}$ a poločas reakce (čas pro zreagování 50 % látky RX) je dán vztahem

$$t_{0,5} = \frac{\ln 2}{k_{pozorov.}} \qquad [4]$$

Poločas: ($t_{0,5}$) je čas pro dosažení 50 % hydrolýzy zkoušené látky, kdy lze reakci popsat pomocí kinetiky prvního řádu; je závislý na koncentraci.

(*) Jestliže vynesení logaritmicky převedených údajů proti času nemá lineární funkci (rovnající se rychlosti reakce prvního řádu), potom není použití rovnice [3] vhodné pro stanovení rychlostní konstanty hydrolýzy zkoušené látky.

▼B

DT_{50} (čas úbytku 50): je čas, během kterého dojde k 50 % snížení koncentrace zkoušené látky; liší se od poločasu $t_{0,5}$, kdy reakce nesleduje kinetiku prvního stupně.

Odhad k při odlišné teplotě

Jsou-li rychlostní konstanty známy pro dvě teploty, lze vypočítat rychlostní konstantu při jiných teplotách pomocí Arrheniovy rovnice:

$$k = A \times e^{-\frac{E}{R \times T}} \text{ nebo } \ln k = \frac{-E}{R \times T} + \ln A$$

Vynesením ln k proti 1/T do grafu vzniká rovná čára se směrnicí – E/R

kde:

k = rychlostní konstanta naměřená při různých teplotách

E = aktivační energie [kJ/mol]

T = absolutní teplota [K]

R = plynová konstanta [8,314 J/mol.K]

Aktivační energie byla vypočtena pomocí regresní analýzy nebo následující rovnice:

$$E = R \times \frac{\ln k_2 - ln\, k_1}{\left(\frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_2}\right)}$$

kde: $T_2 > T_1$.

▼B

DODATEK 3

Pufrační roztoky

A. **CLARK A LUBS:**

Pufrační směsi CLARKA a LUBSE (*)

Složení	pH
0,2 N HC1 A 0,2 N KC1 PŘI 20°C	
47,5 ml HC1 + 25 ml KC1 doplnit do 100 ml	1,0
32,25 ml HC1 + 25 ml KC1 doplnit do 100 ml	1,2
20,75 ml HC1 + 25 ml KC1 doplnit do 100 ml	1,4
13,15 ml HC1 + 25 ml KC1 doplnit do 100 ml	1,6
8,3 ml HC1 + 25 ml KC1 doplnit do 100 ml	1,8
5,3 ml HC1 + 25 ml KC1 doplnit do 100 ml	2,0
3,35 ml HC1 + 25 ml KC1 doplnit do 100 ml	2,2
0,1 M hydrogenftalát draselný + 0,1 N HC1 při 20°C	
46,70 ml 0,1 N HC1 + 50 ml hydrogenftalátu do 100 ml	2,2
39,60 ml 0,1 N HC1 + 50 ml hydrogenftalátu do 100 ml	2,4
32,95 ml 0,1 N HC1 + 50 ml hydrogenftalátu do 100 ml	2,6
26,42 ml 0,1 N HC1 + 50 ml hydrogenftalátu do 100 ml	2,8
20,32 ml 0,1 N HC1 + 50 ml hydrogenftalátu do 100 ml	3,0
14,70 ml 0,1 N HC1 + 50 ml hydrogenftalátu do 100 ml	3,2
9,90 ml 0,1 N HC1 + 50 ml hydrogenftalátu do 100 ml	3,4
5,97 ml 0,1 N HC1 + 50 ml hydrogenftalátu do 100 ml	3,6
2,63 ml 0,1 N HC1 + 50 ml hydrogenftalátu do 100 ml	3,8
0,1 M hydrogenftalát draselný + 0,1 N NaOH při 20 °C	
0,40 ml 0,1 N NaOH + 50 ml hydrogenftalátu do 100 ml	4,0
3,70 ml 0,1 N NaOH + 50 ml hydrogenftalátu do 100 ml	4,2
7,50 ml 0,1 N NaOH + 50 ml hydrogenftalátu do 100 ml	4,4
12,15 ml 0,1 N NaOH + 50 ml hydrogenftalátu do 100 ml	4,6
17,70 ml 0,1 N NaOH + 50 ml hydrogenftalátu do 100 ml	4,8

(*) Hodnoty pH uvedené v těchto tabulkách byly vypočteny na základě potenciálních měření pomocí Sörensenových standardních rovnic (1909). Odpovídající hodnoty pH jsou o 0,04 jednotek vyšší než hodnoty uvedené v tabulkách.

▼B

Složení	pH
23,85 ml 0,1 N NaOH + 50 ml hydrogenftalátu do 100 ml	5,0
29,95 ml 0,1 N NaOH + 50 ml hydrogenftalátu do 100 ml	5,2
35,45 ml 0,1 N NaOH + 50 ml hydrogenftalátu do 100 ml	5,4
39,85 ml 0,1 N NaOH + 50 ml hydrogenftalátu do 100 ml	5,6
43,00 ml 0,1 N NaOH + 50 ml hydrogenftalátu do 100 ml	5,8
45,45 ml 0,1 N NaOH + 50 ml hydrogenftalátu do 100 ml	6,0

Pufrační směsi CLARKA a LUBSE (pokračování)

0,1 M dihydrogenfosforečnan draselný + 0,1 N NaOH při 20 °C	
5,70 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosforečnanu do 100 ml	6,0
8,60 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosforečnanu do 100 ml	6,2
12,60 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosforečnanu do 100 ml	6,4
17,80 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosforečnanu do 100 ml	6,6
23,45 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosforečnanu do 100 ml	6,8
29,63 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosforečnanu do 100 ml	7,0
35,00 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosforečnanu do 100 ml	7,2
39,50 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosforečnanu do 100 ml	7,4
42,80 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosforečnanu do 100 ml	7,6
45,20 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosforečnanu do 100 ml	7,8
46,80 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosforečnanu do 100 ml	8,0
0,1 M H_3B0_3 v 0,1 M KC1 + 0,1 N NaOH při 20 °C	
2,61 ml 0,1 N NaOH + 50 ml kyseliny borité do 100 ml	7,8
3,97 ml 0,1 N NaOH + 50 ml kyseliny borité do 100 ml	8,0
5,90 ml 0,1 N NaOH + 50 ml kyseliny borité do 100 ml	8,2
8,50 ml 0,1 N NaOH + 50 ml kyseliny borité do 100 ml	8,4
12,00 ml 0,1 N NaOH + 50 ml kyseliny borité do 100 ml	8,6
16,30 ml 0,1 N NaOH + 50 ml kyseliny borité do 100 ml	8,8
21,30 ml 0,1 N NaOH + 50 ml kyseliny borité do 100 ml	9,0
26,70 ml 0,1 N NaOH + 50 ml kyseliny borité do 100 ml	9,2

▼B

32,00 ml 0,1 N NaOH + 50 ml kyseliny borité do 100 ml	9,4
36,85 ml 0,1 N NaOH + 50 ml kyseliny borité do 100 ml	9,6
40,80 ml 0,1 N NaOH + 50 ml kyseliny borité do 100 ml	9,8
43,90 ml 0,1 N NaOH + 50 ml kyseliny borité do 100 ml	10,0

B. **KOLTHOFF A VLEESCHHOUWER:**

Citrátové pufry KOLTHOFFA a VLEESCHHOUWERA

Složení	pH
0,1 M citrát monodraselný a 0,1 N HC1 při 18°C (*)	
49,7 ml 0,1 N HC1 + 50 ml citrátu doplnit do 100 ml	2,2
43,4 ml 0,1 N HC1 + 50 ml citrátu doplnit do 100 ml	2,4
36,8 ml 0,1 N HC1 + 50 ml citrátu doplnit do 100 ml	2,6
30,2 ml 0,1 N HC1 + 50 ml citrátu doplnit do 100 ml	2,8
23,6 ml 0,1 N HC1 + 50 ml citrátu doplnit do 100 ml	3,0
17,2 ml 0,1 N HC1 + 50 ml citrátu doplnit do 100 ml	3,2
10,7 ml 0,1 N HC1 + 50 ml citrátu doplnit do 100 ml	3,4
4,2 ml 0,1 N HC1 + 50 ml citrátu doplnit do 100 ml	3,6
0,1 M citrát monodraselný a 0,1 N NaOH při 18 °C (*)	
2,0 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrátu doplnit do 100 ml	3,8
9,0 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrátu doplnit do 100 ml	4,0
16,3 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrátu doplnit do 100 ml	4,2
23,7 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrátu doplnit do 100 ml	4,4
31,5 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrátu doplnit do 100 ml	4,6
39,2 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrátu doplnit do 100 ml	4,8
46,7 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrátu doplnit do 100 ml	5,0
54,2 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrátu doplnit do 100 ml	5,2
61,0 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrátu doplnit do 100 ml	5,4
68,0 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrátu doplnit do 100 ml	5,6
74,4 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrátu doplnit do 100 ml	5,8
81,2 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrátu doplnit do 100 ml	6,0

(*) Přidejte malý krystalek thymolu nebo podobné látky pro zabránění vzniku plísní.

▼B

C. **SÖRENSEN:**

SÖRENSENOVY boritanové směsi

Složení		Sörensen 18 °C	Walbum, pH při		
ml boraxu	ml HCl/NaOH		10 °C	40 °C	70 °C
0,05 M boraxu + 0,1 N HC1					
5,25	4,75	7,62	7,64	7,55	7,47
5,50	4,50	7,94	7,98	7,86	7,76
5,75	4,25	8,14	8,17	8,06	7,95
6,00	4,00	8,29	8,32	8,19	8,08
6,50	3,50	8,51	8,54	8,40	8,28
7,00	3,00	8,08	8,72	8,56	8,40
7,50	2,50	8,80	8,84	8,67	8,50
8,00	2,00	8,91	8,96	8,77	8,59
8,50	1,50	9,01	9,06	8,86	8,67
9,00	1,00	9,09	9,14	8,94	8,74
9,50	0,50	9,17	9,22	9,01	8,80
10,00	0,00	9,24	9,30	9,08	8,86
0,05 M boraxu + 0,1 N NaOH					
10,0	0,0	9,24	9,30	9,08	8,86
9,0	1,0	9,36	9,42	9,18	8,94
8,0	2,0	9,50	9,57	9,30	9,02
7,0	3,0	9,68	9,76	9,44	9,12
6,0	4,0	9,97	10,06	9,67	9,28

SÖRENSENOVY fosfátové směsi

Složení	pH
0,0667M dihydrogenfosforečnanu draselného + 0,0667 M hydrogenfosforečnanu disodného při 20 °C	
99,2 ml KH_2PO_4 + 0,8 ml Na_2HPO_4	5,0
98,4 ml KH_2PO_4 + 1,6 ml Na_2HPO_4	5,2
97,3 ml KH_2PO_4 + 2,7 ml Na_2HPO_4	5,4
95,5 ml KH_2PO_4 + 4,5 ml Na_2HPO_4	5,6
92,8 ml KH_2PO_4 + 7,2 ml Na_2HPO_4	5,8
88,9 ml KH_2PO_4 + 11,1 ml Na_2HPO_4	6,0
83,0 ml KH_2PO_4 + 17,0 ml Na_2HPO_4	6,2
75,4 ml KH_2PO_4 + 24,6 ml Na_2HPO_4	6,4
65,3 ml KH_2PO_4 + 34,7 ml Na_2HPO_4	6,6

▼B

53,4 ml KH_2PO_4 + 46,6 ml Na_2HPO_4	6,8
41,3 ml KH_2PO_4 + 58,7 ml Na_2HPO_4	7,0
29,6 ml KH_2PO_4 + 70,4 ml Na_2HPO_4	7,2
19,7 ml KH_2PO_4 + 80,3 ml Na_2HPO_4	7,4
12,8 ml KH_2PO_4 + 87,2 ml Na_2HPO_4	7,6
7,4 ml KH_2PO_4 + 92,6 ml Na_2HPO_4	7,8
3,7 ml KH_2PO_4 + 96,3 ml Na_2HPO_4	8,0

▼B

C.8. **TOXICITA PRO ŽÍŽALY**

ZKOUŠKA NA UMĚLÉ PŮDĚ

1. **METODA**

1.1. ÚVOD

V této laboratorní zkoušce se zkoušená látka přidá do umělé půdy, do které se na 14 dní umístí žížaly. Po této době (a popřípadě po sedmi dnech) se vyšetří letální účinek látky na žížaly. Zkouška je metodou pro relativně krátkodobý orientační screening účinku chemických látek na žížaly při dermálním a dietárním příjmu.

1.2. DEFINICE A JEDNOTKY

LC_{50}: Koncentrace látky, u níž lze očekávat, že způsobí během zkoušky uhynutí 50 % testovacích zvířat.

1.3. REFERENČNÍ LÁTKA

Referenční látka se použije k pravidelnému ověřování toho, že se citlivost zkušebního systému podstatně nezměnila.

Jako referenční látka se doporučuje chloracetamid analytické čistoty.

1.4. PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

Půda je proměnlivé prostředí, takže se pro tuto zkoušku používá pečlivě definovaná umělá hlinitá půda. V definované umělé půdě se chovají dospělé žížaly druhu *Eisenia foetida* (viz poznámka v příloze) a exponují se různým koncentracím zkoušené látky. Obsah nádob se po 14 dnech (a popřípadě i po sedmi dnech) po začátku zkoušky rozprostře na podložku a spočítají se žížaly, které při jednotlivých koncentracích přežily.

1.5. KRITÉRIA JAKOSTI

Zkouška je navržena tak, aby byla z hlediska zkušebního substrátu a organismů co nejreprodukovatelnější. Úhyn v kontrolních skupinách nesmí na konci zkoušky překročit 10 %, jinak je zkouška neplatná.

1.6. POPIS ZKUŠEBNÍ METODY

1.6.1. *Materials*

1.6.1.1. Zkušební substrát

Jako základní substrát pro zkoušku se používá definovaná umělá půda.

a) Základní substrát (procenta jsou vztažena k hmotnosti sušiny):

— 10 % sfagnové rašeliny (o pH co nejblíže 5,5 až 6,0, bez viditelných zbytků rostlin a jemně mleté),

▼B

— 20 % kaolinitického jílu, pokud možno s více než 50 % kaolinitu,

— asi 69 % průmyslového křemenného písku (převažuje jemný písek s více než 50 % částic velikosti 0,05 až 0,2 mm). Pokud zkoušená látka není dostatečně dispergovatelná ve vodě, je třeba ponechat k dispozici pro pozdější míšení se zkoušenou látkou 10 g na každou zkušební nádobu,

— asi 1 % práškového chemicky čistého uhličitanu vápenatého ($CaCO_3$), přidaného pro úpravu pH na pH 6,0 ± 0,5.

b) Zkušební substrát:

Zkušební substrát obsahuje základní substrát, zkoušenou látku a deionizovanou vodu.

Obsah vody činí asi 25 až 42 % suché hmotnosti základního substrátu. Obsah vody v substrátu se stanoví vysušením vzorku do konstantní hmotnosti při 105 °C. Klíčovým kritériem je, aby byla umělá půda zvlhčena tak, aby neobsahovala stojící vodu. Mísení musí být prováděno pečlivě, aby bylo dosaženo rovnoměrného rozdělení zkoušené látky a substrátu. Způsob vpravení zkoušené látky do substrátu je třeba uvést ve zprávě. The way of introducing the test substance to the substrate has to be reported.

c) Kontrolní substrát:

Kontrolní substrát obsahuje základní substrát a vodu. Přidává-li se přísada, musí další kontrola obsahovat stejné množství přísady

1.6.1.2. Zkušební nádoby

Skleněné nádoby asi na jeden litr (řádně přikryté víky z plastu, miskami nebo fólií z plastu s větracími otvory) naplněné takovým množstvím vlhkého zkušebního nebo kontrolního substrátu, které odpovídá 500 g suchého substrátu.

1.6.2. *Zkušební podmínky*

Nádoby se uchovávají v klimatizovaných komorách při teplotě 20 ± 2 °C se stálým světlem. Intenzita světla by měla být 400 až 800 lx.

Doba trvání zkoušky je 14 dní, avšak úhyn lze popřípadě vyhodnotit po sedmi dnech od začátku zkoušky.

1.6.3. *Zkušební postup*

Zkoušené koncentrace

Koncentrace zkoušené látky se vyjádří v hmotnosti látky vztažené na jednotku suché hmotnosti základního substrátu (mg/kg).

Orientační zkouška

Rozsah koncentrací, které způsobují úhyn od 0 do 100 %, lze stanovit v orientační zkoušce, která poskytne informace o vhodném rozmezí koncentrací pro hlavní zkoušku.

▼B

Látka se zkouší při těchto koncentracích: 1 000; 100; 10; 1; 0,1 mg látky na kg (suché hmotnosti) zkušebního substrátu.

Je-li třeba provést úplnou hlavní zkoušku, stačí pro orientační zkoušku jedna zkušební skupina o 10 žížalách na každou koncentraci a jedna pro neexponovanou kontrolu.

Hlavní zkouška

Výsledky orientační zkoušky se použijí pro volbu nejméně pěti koncentrací tvořících geometrickou řadu, lišících se faktorem nepřekračujícím 1,8 a přesně pokrývajících rozsah 0 až 100 % mortality.

Zkoušky s těmito řadami koncentrací by měly umožnit co nejpřesnější odhad hodnoty LC_{50} a jejího intervalu spolehlivosti.

V hlavní zkoušce se použijí nejméně čtyři zkušební skupiny na každou koncentraci a čtyři neexponované kontrolní skupiny, každá o 10 žížalách. Jako výsledek pro tyto replikované skupiny se uvede průměr a standardní směrodatná odchylka.

Vyvolají-li dvě po sobě jdoucí koncentrace lišící se faktorem 1,8 úhyn 0 a 100 %, jsou tyto dvě hodnoty dostatečné pro identifikaci oblasti, ve které se nachází hodnota LC_{50}.

Mísení základního zkušebního substrátu a zkoušené látky

Zkušební substrát musí být pokud možno připraven bez jakýchkoli jiných přísad, než je voda. Těsně před začátkem zkoušky se emulze nebo disperse zkoušené látky v deionizované vodě nebo v jiném rozpouštědle smísí se základním zkušebním substrátem nebo se na něj rovnoměrné rozstříká jemným rozprašovačem pro chromatografii nebo podobným rozprašovačem.

Je-li zkoušená látka nerozpustná ve vodě, může být rozpuštěna v co nejmenším objemu vhodného organického rozpouštědla (např. hexanu, acetonu nebo chloroformu).

K rozpuštění, dispergaci nebo emulgaci zkoušené látky mohou být použita pouze činidla, která snadno vytěkají. Zkušební substrát musí být před použitím odvětrán. Množství odpařené vody musí být nahrazeno. Kontroly musí obsahovat stejné množství všech přísad.

Není-li zkoušená látka rozpustná, dispergovatelná ani emulgovatelná v organických rozpouštědlech, připraví se směs 10 g křemenného písku a takového množství zkoušené látky, které je potřebné pro zapracování do 500 g zkušebního substrátu (suchá hmotnost), a ta se smísí s 490 g základního substrátu (suchá hmotnost).

Pro každou zkušební skupinu se do skleněné nádoby vpraví množství vlhkého zkušebního substrátu, která odpovídá 500 g suchého substrátu, a na povrch substrátu se umístí 10 žížal, které byly před použitím 24 hodin aklimatizovány v podobném vlhkém základním substrátu, poté rychle omyty a zbaveny přebytečné vody osušením na filtračním papíru.

▼B

Nádoby se přikryjí víky z plastu s otvory, miskami nebo fólií, aby se zabránilo vysychání substrátu, a udržují se ve zkušebních podmínkách 14 dní.

Vyhodnocení se provede 14 dní (popřípadě i sedm dní) po zahájení zkoušky. Substrát se rozprostře na podnos ze skla nebo korozivzdorné oceli. Žížaly se vyšetří a stanoví se počet přežívajících jedinců. Žížaly se považují za mrtvé, jestliže nereagují na jemné mechanické podráždění na předním konci.

Provádí-li se vyšetření po sedmi dnech, nádoba se opět naplní substrátem a přežívající žížaly se opět vloží na povrch téhož zkušebního substrátu.

1.6.4. *Zkušební organismy*

Ve zkoušce se použijí dospělé žížaly druhu *Eisenia foetida* (viz poznámku v doplňku) (alespoň dva měsíce staré s klitellem) o hmotnosti (ve vlhkém stavu) 300 až 600 mg. (Metody množení viz doplněk.)

2. **ÚDAJE**

2.1. ZPRACOVÁNÍ A VYHODNOCENÍ VÝSLEDKŮ

Uvedou se koncentrace zkoušené látky a odpovídající podíl mrtvých žížal v procentech.

Jsou-li údaje dostačující, stanoví se standardními metodami (Litchfield a Wilcoxon, 1949, nebo rovnocenná metoda) hodnota LC_{50} a interval spolehlivosti ($p = 0,05$). LC_{50} se udává v mg zkoušené látky na kg (suché hmotnosti) zkušebního substrátu.

V případech, kdy je sklon koncentrační křivky pro výpočet LC_{50}, příliš strmý, stačí grafický odhad této hodnoty.

Vyvolají-li dvě po sobě jdoucí koncentrace lišící se faktorem 1,8 úhyn 0 a 100 %, jsou tyto dvě hodnoty dostatečné pro identifikaci oblasti, ve které se nachází hodnota LC_{50}.

3. **ZPRÁVY**

3.1. PROTOKOL O ZKOUŠCE

Protokol o zkoušce má pokud možno obsahovat tyto údaje:

— prohlášení, že zkouška byla provedena v souladu s výše uvedenými kritérii jakosti,

— provedené zkoušky (orientační zkouška a/nebo hlavní zkouška),

— přesný popis zkušebních podmínek nebo prohlášení, že zkouška byla provedena podle této metody; musí být uvedeny všechny odchylky,

— přesný popis způsobu smísení zkoušené látky se základním substrátem,

— informace o zkušebních organismech (druhy, stáří, průměrná hmotnost a rozpětí hmotnosti, podmínky množení, původ),

▼B

— metoda použitá pro stanovení LC_{50},

— výsledky zkoušky včetně všech použitých údajů,

— popis pozorovaných symptomů nebo změn v chování zkušebních organismů,

— úhyn v kontrolách,

— hodnota LC_{50} nebo nejvyšší zkoušená koncentrace nevyvolávající úhyn a nejnižší zkoušená koncentrace vyvolávající 100 % úhyn 14 dní (popřípadě i sedm dní) od začátku zkoušky,

— graf závislosti koncentrace/odezva,

— výsledky získané s referenční látkou, ať v souvislosti s touto zkouškou, nebo z dřívějších zkoušek kontroly jakosti.

4. **LITERATURA**

1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 207, rozhodnutí Rady C(81)30 v konečném znění.

2) Edwards, C. A. and Lofty, J. R., 1977, Biology of Earthworms, Chapman and Hall, london, str. 331.

3) Bouche. M. B., 1972, Lombriciens de France, Ecologie et Systematique, Institut National de la Recherche Agronomique, str. 671.

4) Litchfield, J. T. andWilcoxon, F., A simplified method of evaluation dose effect experiments. I. Pharm. Exp. Therap., vol. 96, 1949, str. 99.

5) Komise Evropských společenství, Development of a standardized laboratory method for assessing the toxicity of chemical substances to earthworms, Report EUR 8714 EN, 1983.

6) Umweltbundesamt/Biologische Bundesanstalt für land- und Forstwirtschaft, Berlin, 1984, Verfahrensvorschlag „Toxizitätstest am Regenwurm *Eisenia foetida* in künstlichem Boden“, in: Rudolph/Boje, Ökotoxikologie, ecomed, Landsberg, 1986.

▼B

Doplněk

Množení a chov žížal před zkouškou

Pro účely množení se 30 až 50 dospělých žížal umístí do chovné schránky s čerstvým substrátem a vyjmou se po 14 dnech. Tyto jedince je možné použít pro další chovné vsázky. Žížaly vylíhlé ze zámotků se použijí ke zkoušení poté, co dospějí (v uvedených podmínkách po dvou až třech měsících).

Podmínky chovu a množení

Klimatizovaná komora:	teplota 20 ± 2 °C, nejlépe s nepřetržitým osvětlením (intenzita 400–800 lx).
Chovné nádoby:	vhodné mělké nádoby o objemu 10 až 20 l.
Substrát:	druh *Eisenia foetida* je možné chovat v různých zvířecích exkrementech. Jako chovné médium se doporučuje používat směs 50 % (obj.) rašeliny a 50 % (obj.) hovězího nebo koňského hnoje. Médium musí mít pH asi 6 až 7 (upraví se uhličitanem vápenatým) a nízkou iontovou vodivost (méně než 6 mmhos nebo s 0,5 % koncentrací solí). Substrát musí být vlhký, ale ne příliš mokrý. Kromě výše uvedené metody je možné používat i jiné úspěšné postupy.

Poznámka: Druh *Eisenia foetida* existuje ve dvou formách, které někteří taxonomové rozlišili na druhy (Bouche, 1972). Jsou si morfologicky podobné, avšak jeden, *Eisenia foetida foetida*, má na článcích typické příčné pruhování nebo páskování a druhý, *Eisenia foetida andrei*, toto pruhování postrádá a je různě červeně zbarven. Pokud je to možné, použije se *Eisenia foetida andrei*. Jiné druhy je možné použít, pokud je k dispozici potřebná metodika.

▼B

C.9. BIOLOGICKÁ ROZLOŽITELNOST

ZAHN-WELLENSOVA ZKOUŠKA

1. METODA

1.1. ÚVOD

Účelem metody je posoudit statickou zkouškou možnost úplné biologické rozložitelnosti netěkavých organických látek rozpustných ve vodě, jsouli vystaveny účinku poměrně vysokých koncentrací mikroorganismů.

Může docházet k fyzikálně-chemické adsorpci na suspendovaných pevných částicích; tato skutečnost musí být zohledněna při interpretaci výsledků (viz bod 3.2).

Zkoušené látky jsou používány v koncentracích odpovídajících hodnotám DOC od 50 do 400 mg/l nebo hodnotám CHSK od 100 do 1 000 mg/l (DOC = rozpuštěný organický uhlík, CHSK = chemická spotřeba kyslíku). Tyto poměrně vysoké koncentrace umožňují spolehlivou analýzu. Sloučeniny s toxickými vlastnostmi mohou však proces rozkladu zpomalit nebo zastavit.

V této metodě se úplná biologická rozložitelnost zkoušené látky posuzuje podle míry rozpuštěného organického uhlíku nebo chemické spotřeby kyslíku.

Současným použitím specifické analytické metody může být stanovena také primární biologická rozložitelnost látek (úbytek výchozí chemické látky).

Touto metodou mohou být zkoušeny pouze organické látky, které mají při koncentracích použitých ve zkoušce tyto vlastnosti:

— jsou za zkušebních podmínek rozpustné ve vodě,

— mají za zkušebních podmínek zanedbatelný tlak par,

— neinhibují bakterie,

— jsou ve zkušebním systému pouze omezeně adsorbovány,

— pěněním nedochází ve zkoušeném roztoku ke ztrátám.

Při interpretaci získaných výsledků budou užitečné informace o relativním podílu hlavních složek zkušebního materiálu, zejména pokud jsou stanovené hodnoty biologické rozložitelnosti nízké nebo marginální.

Informace o toxicitě zkoušené látky pro mikroorganismy jsou důležité rovněž pro interpretaci nižších hodnot biologické rozložitelnosti a volbu vhodných koncentrací zkoušené látky.

▼B

1.2. DEFINICE A JEDNOTKY

Po ukončení zkoušky se míra rozkladu označí za „biologickou rozložitelnost stanovenou ZahnWellensovou zkouškou“:

$$D_t = \left[1 - \frac{C_T - C_B}{C_A - C_{BA}}\right] \times 100$$

kde:

D_t = rozklad (%) v čase t,

C_A = hodnoty DOC (nebo CHSK) zkušební směsi měřené tři hodiny po zahájení zkoušky (mg/l) (DOC = rozpuštěný organický uhlík, CHSK = chemická spotřeba kyslíku),

C_T = hodnoty DOC nebo CHSK zkušební směsi v době odběru vzorku (mg/l),

C_B = hodnoty DOC nebo CHSK slepého pokusu v době odběru vzorku (mg/l),

C_{BA} = hodnoty DOC nebo CHSK slepého pokusu tři hodiny po zahájení zkoušky (mg/l).

Stupeň rozložitelnosti se zaokrouhlí na celá procenta.

Jako procentuální rozložitelnost se uvede procentuální snížení hodnot DOC (nebo CHSK) zkoušené látky.

Rozdíl mezi hodnotou naměřenou po třech hodinách a vypočítanou nebo přednostně naměřenou počáteční hodnotou poskytuje užitečnou informaci o rozložitelnosti zkoušené látky (viz bod 3.2 Interpretace výsledků).

1.3. REFERENČNÍ LÁTKY

V některých případech mohou být při posuzování nových látek využity referenční látky; zatím však nelze doporučit žádné specifické referenční látky.

1.4. PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

Aktivovaný kal, minerální živné médium a zkoušená látka jako zdroj uhlíku ve vodném roztoku se smíchají ve skleněné nádobě na jeden až čtyři litry s míchadlem a provzdušňovacím zařízením. Suspense se míchá a provzdušňuje až 28 dní při teplotě 20–25 °C při rozptýleném světle nebo v temnu. Rozklad se sleduje denně nebo v jiných vhodně stanovených pravidelných časových intervalech prostřednictvím měření hodnot DOC (nebo CHSK) v odebraném vzorku po jeho filtraci. Procentuální hodnota biologického rozkladu v čase se vyjádří jako poměr hodnot DOC (nebo CHSK) v době odběru vzorku a hodnoty po třech hodinách od zahájení zkoušky a slouží jako míra rozkladu v daném čase. Výsledky se vynesou do grafu proti času a vytvoří křivku biologického rozkladu.

Při použití specifické analytické metody se měří změny koncentrací původní molekuly látky způsobené biologickým rozkladem (míra primární biologické rozložitelnosti).

▼B

1.5. KRITÉRIA JAKOSTI

Reprodukovatelnost této zkoušky byla ověřena mezilaboratorními okružními testy.

Citlivost metody je značně závislá na variabilitě slepého vzorku, v menší míře na přesnosti stanovení množství rozpuštěného organického uhlíku a na koncentraci zkoušené látky v suspensi.

1.6. POPIS ZKUŠEBNÍHO POSTUPU

1.6.1. *Příprava*

1.6.1.1. Reakční činidla

Zkušební voda: pitná voda s obsahem organického uhlíku menším než 5 mg/l. Koncentrace vápenatých a hořečnatých iontů nesmí překročit 2,7 mmol/l; v opačném případě je nutné jako rozpouštědlo použít deionizovanou nebo destilovanou vodu.

Kyselina sírová p.a	50 g/l
Hydroxid sodný p.a	40 g/l
Minerální živné médium: v jednom litru deionizované vody se rozpustí:	
Chlorid amonný NH_4Cl p.a.	38,5 g
Dihydrogenfosforečnan sodný, $NaH_2PO_4.2H_2O$ p.a.	33,4 g
Dihydrogenfosforečnan draselný, KH_2PO_4 p.a.	8,5 g
Hydrogenfosforečnan draselný, KH_2PO_4 p.a.	21,75 g

Tento roztok slouží jako živný roztok a jako pufr pH.

1.6.1.2. Přístroje a pomůcky

Skleněné nádoby na jeden až čtyři litry (např. válcové nádoby).

Míchačka se skleněným nebo kovovým míchadlem na vhodné stopce (míchadlo by mělo být umístěno 5–10 cm nad dnem nádoby). Namísto toho lze použít magnetické míchadlo dlouhé 7–10 cm.

Skleněná provzdušňovací trubice o vnitřním průměru 2–4 mm. Vyústění trubice by mělo být umístěno asi 1 cm nad dnem nádoby.

Odstředivka (cca 3 550g).

pH-metr.

Oxymetr.

Papírové filtry.

▼B

Zařízení pro membránovou filtraci.

Membránové filtry o velikosti pórů 0,45 μm. Vhodné membránové filtry nesmí během filtrace uvolňovat ani absorbovat uhlík.

Analyzátor ke stanovení obsahu organického uhlíku a vybavení ke stanovení CHSK.

1.6.1.3. Příprava inokula

Aktivovaný kal z biologické čistírny se promyje zkušební vodou (viz výše), a to buď (opakovanou) centrifugací, nebo sedimentací.

Aktivovaný kal musí mít vhodné složení. Takový kal se vyskytuje v řádně fungujících čistírnách odpadních vod. Má-li být získáno co nejvíce různých druhů nebo kmenů bakterií, může být vhodné namíchat inokulum z různých zdrojů (např. z různých čistíren, z půdního extraktu, z říčních vod atd.). Směs se zpracuje výše uvedeným způsobem.

Kontrola aktivity aktivovaného kalu je popsána níže v bodu 1.6.2 v odstavci Funkční kontrola aktivovaného kalu.

1.6.1.4. Příprava zkušebních roztoků

Do zkušební nádoby se odměří 500 ml zkušební vody, 2,5 ml minerálního živného roztoku na litr a přidá se aktivovaný kal v množství odpovídajícím 0,2 až 1,0 g sušiny v litru konečné směsi. Přidá se takový objem základního roztoku zkoušené látky, aby byla dosaženo koncentrace rozpuštěného organického uhlíku 50 až 400 mg na litr suspense. Odpovídající hodnoty CHSK jsou 100 až 1 000 mg/l. Směs se doplní vodou do celkového objemu jeden až čtyři litry. Celkový zvolený objem je závislý na počtu odebíraných vzorků nutných ke stanovení hodnot DOC nebo CHSK a na tom, jaký objem budou mít odběry požadované pro analytický postup.

Zpravidla se za dostatečný objem považují dva litry. Současně se s každou zkušební sérií nasadí alespoň jeden kontrolní slepý vzorek; obsahuje pouze aktivovaný kal a minerální živné médium doplněné vodou na stejný objem jako zkoušená směs.

1.6.2. *Postup zkoušky*

Zkušební nádoby se promíchávají magnetickými míchadly nebo šroubovitými míchadly při rozptýleném světle nebo v temnu při teplotě 20–25 °C. Nádoba se provzdušňuje tlakovým vzduchem, který je podle potřeby čištěn vatovým filtrem a přes promývačku. Musí být zajištěno, aby nedošlo k usazení kalu a aby koncentrace rozpuštěného kyslíku neklesla pod 2 mg/l.

V pravidelných intervalech (např. denně) se měří pH a podle potřeby se upraví na pH 7–8.

▼B

Ztráty vypařováním se před každým odběrem vzorku vyrovnají potřebným množstvím destilované nebo deionizované vody. Je účelné vyznačit na nádobě hladinu kapaliny před začátkem zkoušky. Nové vyznačení se provede vždy po odebrání vzorku (při vypnutém provzdušňování a míchaní). První vzorky se odebírají vždy tři hodiny po zahájení zkoušky s cílem zjistit míru adsorpce zkoušeného materiálu na aktivovaném kalu.

Rozklad zkoušené látky se sleduje stanovením hodnoty DOC a CHSK prováděným denně nebo v jiných pravidelných intervalech. Vzorky ze zkušební nádoby a ze slepého pokusu se zfiltrují přes pečlivě promytý papírový filtr. Prvních 5 ml filtrátu se odstraní. Kaly, které se špatně filtrují, mohou být odděleny desetiminutovým odstřeďováním. Provádí se nejméně dvě souběžná stanovení DOC a CHSK. Směs se nechá inkubovat až 28 dní.

Poznámka: Vzorky, které zůstávají zakalené, se zfiltrují přes membránový filtr. Membránový filtr nesmí uvolňovat ani adsorbovat žádné organické látky.

Funkční kontrola aktivovaného kalu

Souběžně s každou sérií pokusů se nasadí nádoba se známou látkou, která slouží ke kontrole funkční kapacity aktivovaného kalu. Jako vhodná látka pro tento účel se ukázal diethylenglykol.

Adaptace

Jsou-li v poměrně krátkých časových intervalech (např. denně) prováděny analýzy, lze na křivce rozložitelnosti rozlišit adaptační fázi (viz obrázek 2). Proto by zkouška neměla být nasazována na konci pracovního týdne.

Jestliže k adaptaci dochází na konci normální délky zkoušky, může být zkouška prodloužena až do konečného rozložení zkoušené látky.

Poznámka: Je-li třeba důkladně poznat chování aktivovaného kalu, exponuje se tentýž aktivovaný kal ještě jednou zkoušené látce takto:

Míchadlo a provzdušňovací zařízení se vypnou, aby se mohl aktivovaný kal usadit. Supernatant se odlije, dekantovaný kal v nádobě se doplní vodou na objem dvou litrů, 15 minut se míchá a opět se nechá sedimentovat. Po dekantaci supernatantu se zkouška opakuje se sedimentovaným kalem a stejnou zkoušenou látkou postupem podle výše uvedených bodů 1.6.1.4 a 1.6.2. Aktivovaný kal může být namísto usazováním oddělen centrifugací.

Adaptovaný kal může být smíchán s čerstvým aktivovaným kalem tak, aby bylo dosaženo koncentrace 0,2–1 g sušiny na litr suspense.

▼B

Příprava pro analýzu

Vzorky se obvykle zfiltrují přes pečlivě promytý papírový filtr (k promývání se použije deionizovaná voda).

Vzorky, které zůstanou zakalené, se zfiltrují přes membránové filtry (0,45 μm).

Ve filtrátech vzorku (prvních 5 ml filtrátu se odstraní) se přístrojem pro měření TOC provedou dvě stanovení koncentrace rozpuštěného uhlíku (DOC). Nemůže-li být filtrát analyzován v den odběru vzorku, musí být do příštího dne uchován v ledničce. Delší skladování se nedoporučuje.

CHSK se ve filtrátu vzorku stanoví analytickým postupem pro stanovení CHSK popsaným níže v literatuře (2).

2. **ÚDAJE A VYHODNOCENÍ**

Koncentrace DOC a/nebo CHSK se stanoví alespoň ve dvou duplikátních vzorcích postupem uvedeným výše v bodu 1.6.2. Rozklad v čase t se vypočte podle vzorce (s definicemi) uvedeného výše v bodu 1.2.

Hodnota stupně rozkladu se zaokrouhlí na celá procenta. Dosažená rozložitelnost na konci zkoušky se označí za „biologickou rozložitelnost stanovenou Zahn-Wellensovou zkouškou“.

Poznámka: Je-li dosaženo úplného rozkladu zkoušené látky před řádným termínem ukončení zkoušky a výsledek je potvrzen druhý den další analýzou, může být zkouška ukončena.

3. **ZPRÁVY**

3.1. PROTOKOL O ZKOUŠCE

Protokol o zkoušce má pokud možno obsahovat tyto údaje:

— počáteční koncentrace látky,

— všechny informace a experimentální výsledky týkající se zkoušené látky, popřípadě referenční látky a kontrolního vzorku,

— koncentrace látky po třech hodinách,

— křivka biologického rozkladu s popisem,

— datum a místo odběru zkušebních organismů, stav adaptace, použitá koncentrace atd.,

— vědecké odůvodnění všech změn ve zkušebního postupu.

3.2. INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

Postupné ubývání DOC nebo snižování CHSK, ke kterému dochází během dnů až týdnů, naznačuje, že zkoušená látka je biologicky rozkládána.

▼B

V mnoha případech však může ovlivňovat výsledky zkoušky fyzikálně-chemická adsorpce; to lze prokázat tím, že se zjistí úplné nebo částečné ubývání DOC nebo snižování CHSK během prvních tří hodin zkoušky a že rozdíl mezi supernatantem ze slepého vzorku a ze zkoušeného vzorku je nečekaně malý.

Má-li se rozlišit biologická rozložitelnost (nebo částečná biologická rozložitelnost) od adsorpce, je třeba provést další zkoušky.

To lze provést několika způsoby, nejsprávnější je však použít supernatant nebo kal jako inokulum v některé základní zkoušce (nejlépe ve zkoušce respirometrií).

Zkoušené látky, které vykazují velký úbytek DOC nebo pokles CHSK, který není ovlivněn adsorpcí, lze pokládat za biologicky rozložitelné. Částečný, neadsorpční úbytek znamená, že látka je alespoň částečně biologicky rozložitelná. Nízký nebo nulový úbytek DOC nebo pokles CHSK může být způsoben inhibicí mikroorganismů zkoušenou látkou, která se může projevovat rozpuštěním nebo úbytkem kalu nebo zákalem supernatantu. V takových případech se zkouška opakuje s nižšími koncentracemi zkoušené látky.

Vyšší citlivosti může být dosaženo specifickými analytickými metodami nebo použitím zkoušených látek značených 14C. Při použití zkoušené látky značené 14C bude probíhající rozklad zkoušené látky potvrzen vývinem $14CO_2$.

Pokud se výsledek udává jako primární biologická rozložitelnost, měly by být podle možnosti uvedeny změny v chemické struktuře, které způsobily, že se snížil signál výchozí zkoušené látky.

Musí být popsána vhodnost analytické metody a výsledky stanovení ve slepém živném médiu.

4. **LITERATURA**

1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 302 B, rozhodnutí Rady C(81) 30 v konečném znění.

2) Příloha V směrnice Komise 84/449/EHS (Úř. věst. L 251, 19.9.1984, s. 1), metoda C.9 Rozložitelnost: Chemická spotřeba kyslíku.

▼B

Doplněk

PŘÍKLAD VYHODNOCENÍ

Organická látka	4-ethoxybenzoová kyselina
Teoretická koncentrace ve zkoušce	600 mg/l
Teoretický DOC:	390 mg/l
Inokulum	čistírna odpadních vod v …
Koncentrace:	1 g sušiny na litr
Adaptace:	bez adaptace
Analýza:	stanovení DOC
Množství vzorku:	3 ml
Referenční látka:	diethylenglykoll
Toxicita zkoušené látky:	žádné toxické účinky při koncentraci menší než 1 000 mg/l Použitá zkouška: zkouška ve fermentačních trubicích

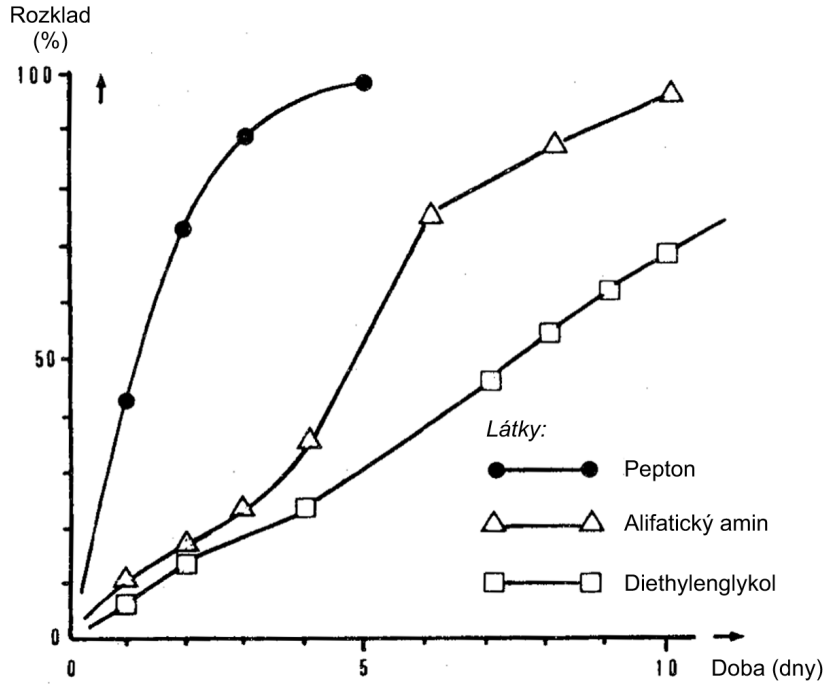
Čas v průběhu zkoušky	Referenční látka				Zkoušená látka		
	Slepý vzorek DOC ([1]) mg/l	DOC ([1]) mg/l	DOC (netto) mg/l	Rozklad %	DOC ([1]) mg/l	DOC (netto) mg/l	Rozklad %
0	—	—	300,0	—	—	390,0	—
3 hodiny	4,0	298,0	294,0	2	371,6	367,6	6
1 den	6,1	288,3	282,2	6	373,3	367,2	6
2 dny	5,0	281,2	276,2	8	360,0	355,0	9
5 dnů	6,3	270,5	264,2	12	193,8	187,5	52
6 dnů	7,4	253,3	245,9	18	143,9	136,5	65
7 dnů	11,3	212,5	201,2	33	104,5	93,2	76
8 dnů	7,8	142,5	134,7	55	58,9	51,1	87
9 dnů	7,0	35,0	28,0	91	18,1	11,1	97
10 dnů	18,0	37,0	19,0	94	20,2	2,0	99

([1]) Střední hodnota ze tří stanovení.

▼B

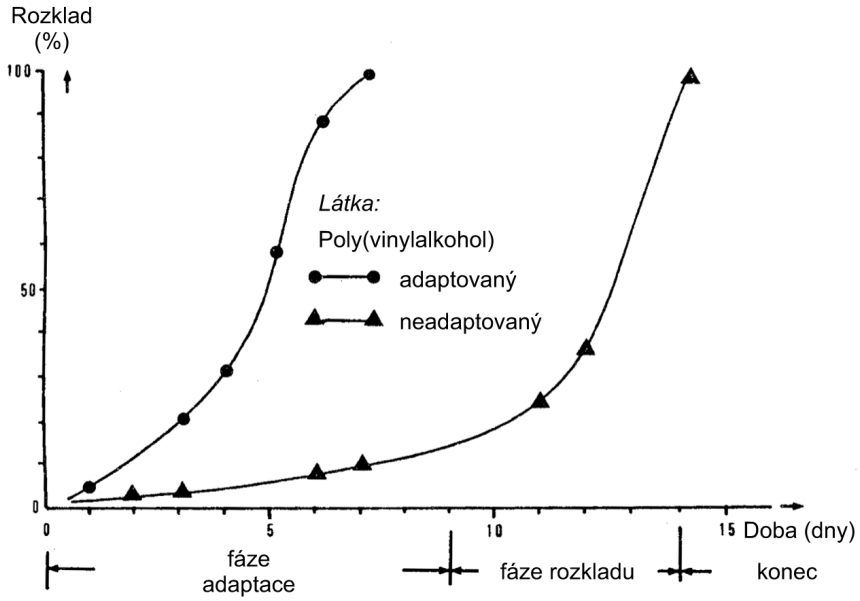
Obrázek 1

Příklad křivek biologického rozkladu



Obrázek 2

Příklady adaptace kalu



▼M4

C.10 **SIMULAČNÍ ZKOUŠKA AEROBNÍHO ČIŠTĚNÍ ODPADNÍCH VOD: C.10-A: JEDNOTKY AKTIVOVANÉHO KALU – C.10-B: BIOFILMY**

C.10-A: Jednotky aktivovaného kalu

ÚVOD

1. Tato zkušební metoda odpovídá pokynu OECD pro zkoušení (TG) 303 (2001). V 50. letech bylo zjištěno, že nově zavedené povrchově aktivní látky způsobují nadměrné pěnění v čistírnách odpadních vod a v řekách. Tyto látky nebyly zcela odstraněny při aerobním čištění a v některých případech omezovaly odstraňování jiných organických látek. Tato skutečnost byla důvodem celé řady šetření, jakým způsobem by bylo možno odstranit povrchově aktivní látky z odpadních vod a zda by byly nové chemické látky produkované průmyslem vhodné pro čištění odpadních vod. Za tímto účelem byly použity modelové jednotky reprezentující dva hlavní druhy aerobního biologického čištění odpadních vod (aktivovaný kal a biologická perkolační nebo skrápěná filtrace). Bylo by nepraktické a velmi nákladné distribuovat každou novou chemikálii a sledovat velké čistírny odpadních vod, a to i v místním měřítku.

VÝCHOZÍ ÚVAHY

Jednotky aktivovaného kalu

2. Jsou popsány modelové jednotky aktivovaného kalu, jejichž velikost se pohybuje od 300 ml přibližně do 2 000 ml. Některé byly věrnou napodobeninou plnohodnotných čistíren, kde se usazovací nádrže s usazeným kalem přečerpávají zpět do aerační nádrže, zatímco jiné neměly žádná usazovací zařízení, např. Swisher (1). Velikost zařízení je kompromisem; na jedné straně musí být dostatečně velké, aby umožňovalo úspěšné provedení mechanických operací a zajišťovalo dostatečné množství vzorků, aniž by byl ovlivněn provoz, avšak na druhé straně by nemělo být tak velké, aby kladlo nadměrné nároky na prostor a materiál.

3. Rozsáhle a uspokojivě jsou využívány dva druhy zařízení – Husmannův model (2) a zařízení s porézní nádobou (3),(4), jichž bylo poprvé užito při studii povrchově aktivních látek; jejich popis je uveden v této zkušební metodě. S uspokojivým výsledkem byla použita i další zařízení, například Eckenfelderův model (5). Vzhledem k poměrně vysoké ceně a náročnosti použití této simulační zkoušky byly současně zkoumány jednodušší a levnější screeningové zkoušky, které jsou nyní začleněny do kapitoly C.4 A - F této přílohy (6). Zkušenosti s celou řadou povrchově aktivních látek a dalších chemických látek ukázaly, že chemické látky, které prošly screeningovými zkouškami (snadno biologicky rozložitelné látky) se rozložily i při simulační zkoušce. Některé chemické látky, které neprošly screeningovou zkouškou, prošly zkouškami vlastní biologické rozložitelnosti (kapitoly C.12 (7) a C.19 (8) této přílohy), ale pouze některé z této posledně jmenované skupiny se rozložily při simulační zkoušce, zatímco chemické látky, které neprošly zkouškou vlastní biologické rozložitelnosti, se nerozložily ani při simulačním zkoušce (9), (10), (11).

4. Pro některé účely jsou simulační zkoušky prováděné na základě jediného souboru pracovních podmínek dostatečné; výsledky jsou vyjádřeny procentem úbytku zkoušené chemické látky nebo rozpuštěného organického uhlíku (DOC). Popis takové zkoušky je uveden v této zkušební metodě. Nicméně na rozdíl od předchozí verze této kapitoly, která popisovala pouze jeden typ zařízení čistícího syntetické odpadní vody ve spřaženém režimu pomocí poměrně hrubé metody odstraňování kalů, tento text uvádí celou řadu variant. Popisuje alternativy typu zařízení, způsobu provozu, likvidace

▼M4

odpadních vod a odstraňování kalu. Tento text se úzce drží textu normy ISO 11733 (12), který byl během jeho přípravy pečlivě zkoumán, přestože uvedená metoda nebyla podrobena mezilaboratorní porovnávací zkoušce.

5. Pro jiné účely je zapotřebí zjistit koncentraci zkoušené chemické látky v odtoku a k tomu je nezbytné použít složitější metodu. Je například nezbytná přesnější kontrola rychlosti odtahu kalu v průběhu každého dne a po celou dobu zkoušky a zařízení je nutno provozovat při řadě různých rychlostí odtahů kalu. U plně komplexní metody by měly zkoušky probíhat rovněž při dvou nebo třech různých teplotách: tuto metodu popisuje Birch (13), (14) a je shrnuta v dodatku 6. Na základě současných znalostí však nelze rozhodnout, který z těchto kinetických modelů lze uplatnit na biologickou rozložitelnost chemických látek při čištění odpadních vod a ve vodném prostředí obecně. Použití kinetiky dle Monoda, které je uvedeno v dodatku 6 jako příklad, je omezeno na chemické látky přítomné v množství 1 mg/l a větším, ale podle některých názorů je i toto užití nutno odůvodnit. Zkoušky při koncentracích, které věrněji odrážejí koncentrace v odpadních vodách, jsou uvedeny v dodatku 7, ale tyto zkoušky a rovněž zkoušky v dodatku 6 jsou uvedeny v dodatcích, místo aby byly vydány jako samostatné zkušební metody.

Filtry

6. Mnohem menší pozornost byla věnována modelu biologických skrápěných filtrů, pravděpodobně proto, že jsou těžkopádnější a méně kompaktní než modelová zařízení s aktivovaným kalem. Gerike se spolupracovníky vyvinul zařízení pro skrápěnou filtraci a provozoval je ve spřaženém režimu (15). Tyto filtry byly poměrně velké (výška 2 m, objem 60 l) a každý z nich vyžadoval až 2 l/h odpadní vody. Baumann se spolupracovníky (16) simuloval skrápěné filtry vložením proužků polyesterového „rouna“ do trubek o délce 1 m (vnitřní průměr 14 mm) poté, co byly tyto proužky na dobu 30 minut ponořeny do koncentrovaného aktivovaného kalu. Zkoušená chemická látka jako jediný zdroj C v roztoku minerálních solí byla čerpána do svislé trubky a biologický rozklad byl posouzen na základě měření hodnot DOC v odtoku a CO_2 ve vzniklém plynu.

7. Biofiltry byly simulovány jiným způsobem (15), na vnitřní plochy rotačních trubek skloněné pod malým úhlem k vodorovné rovině se přiváděla odpadní voda (asi 250 ml/h) se zkoušenou látkou a bez ní a shromážděný odtok pak byl analyzován na přítomnost DOC a/nebo konkrétní zkoušené chemické látky.

PODSTATA ZKOUŠKY

8. Touto metodou se stanoví odstranitelnost a primární a/nebo úplný biologický rozklad ve vodě rozpustných organických látek aerobními mikroorganismy v kontinuálně pracujícím testovacím systému simulujícím proces s aktivovaným kalem. Jedinými zdroji uhlíku a energie pro mikroorganismy jsou snadno rozložitelné organické médium a zkoušená organická látka.

9. Dva kontinuálně pracující modely (modely aktivace nebo modely s porézní nádobou) pracují paralelně za stejných podmínek zvolených tak, aby vyhovovaly účelu zkoušky. Průměrná hydraulická doba zdržení je obvykle 6 h a průměrné stáří kalu (doba zdržení kalu) se pohybuje od 6 do 10 dnů. Kal se odtahuje jednou ze dvou metod; zkoušená chemická látka se zpravidla přidává do přítoku (organického média) pouze jednoho z modelů v koncentraci odpovídající 10–20 mg/l rozpuštěného organického uhlíku (DOC). Druhý model se provozuje jako kontrolní model pro stanovení biologické rozložitelnosti organického média.

▼M4

10. V pravidelných intervalech se odebírají vzorky odtoků, ve kterých se stanovuje v optimálním případě DOC, nebo chemická spotřeba kyslíku (CHSK) a rovněž koncentrace zkoušené chemické látky (je-li vyžadována) specifickou analýzou v odtoku z modelu, do něhož je vypouštěna zkoušená chemická látka. Předpokládá se, že rozdíl mezi koncentrací DOC nebo CHSK v odtoku ze zkušebního a kontrolního modelu pochází ze zkoušené chemické látky nebo jejích organických metabolitů. Tento rozdíl se porovná s koncentrací DOC nebo CHSK v přítoku pocházející ze zkoušené chemické látky, aby se určila její rozložitelnost.

11. Biologický rozklad lze zpravidla odlišit od bioadsorpce pečlivým prozkoumáním křivky odstranitelnosti v čase a obecně jej lze potvrdit pomocí zkoušky snadného biologického rozkladu pomocí aklimatizovaného inokula z modelu, do něhož je vypouštěna zkoušená chemická látka.

INFORMACE O ZKOUŠENÉ CHEMICKÉ LÁTCE

12. Pro správnou interpretaci výsledků by měla být známa čistota zkoušené chemické látky, její rozpustnost ve vodě, těkavost a adsorpční vlastnosti. Těkavé a nerozpustné chemické látky lze zpravidla zkoušet jen tehdy, jsou-li přijata zvláštní opatření (viz dodatek 5). Pro výpočet teoretických hodnot a/nebo pro ověření naměřených hodnot parametrů, např. teoretické spotřeby kyslíku (ThOD), rozpuštěného organického uhlíku (DOC) a chemické spotřeby kyslíku (CHSK) je rovněž nutno znát chemickou strukturu nebo alespoň empirický vzorec.

13. Pro volbu vhodných zkušebních koncentrací mohou být užitečné informace o toxicitě zkoušené chemické látky pro mikroorganismy (viz dodatek 4); tyto informace mohou být důležité pro správnou interpretaci nízkých hodnot biologického rozkladu.

HODNOTY, PŘI NICHŽ VÝROBEK VYHOVUJE

14. Při původním uplatnění této simulační (potvrzující) zkoušky na primární biologický rozklad povrchově aktivních látek je vyžadováno odstranění více než 80 % určité chemické látky, aby mohla být povrchově aktivní látka uvedena na trh. Pokud není dosaženo hodnoty 80 %, lze použít tuto simulační (potvrzující) zkoušku a povrchově aktivní látku uvést na trh pouze za předpokladu odstranění více než 90 % dané chemické látky. Obecně se chemické látky neposuzují z hlediska vyhověla/nevyhověla a při přibližných výpočtech pravděpodobné koncentrace v životním prostředí, které se užívají při posuzování rizik plynoucích z chemických látek, lze použít získané hodnoty procenta úbytku. Výsledky mají tendenci sledovat vzorec tzv. „všechno nebo nic“. V řadě studií čistých chemických látek bylo zjištěno procento úbytku DOC > 90 % u více než tří čtvrtin a > 80 % u více než 90 % chemických látek, které nevykazují žádný významný stupeň biologické rozložitelnosti.

15. V odpadní vodě je přítomno relativně málo chemických látek (např. povrchově aktivních chemických látek) v koncentracích (asi 10 mg C/l) užitých při této zkoušce. Některé chemické látky mohou být v těchto koncentracích inhibující, zatímco kinetika úbytku jiných látek se může v nízkých koncentracích lišit. Přesnější stanovení rozkladu lze provést s využitím modifikovaných metod pomocí realisticky nízkých koncentrací zkoušené chemické látky a získané údaje by mohly být použity pro výpočet kinetických konstant. Potřebné experimentální techniky však dosud nejsou plně validovány a rovněž nebyly stanoveny modely kinetiky popisující reakce biologického rozkladu (viz dodatek 7).

▼M4

REFERENČNÍ CHEMICKÉ LÁTKY

16. Aby bylo zajištěno správné provedení experimentálního postupu, je vhodné současně se zkoumáním zkoušených chemických látek provádět občasné zkoušky látek, jejichž chování je známé. Tyto chemické látky zahrnují kyselinu adipovou, 2-fenyl fenol, 1-naftol, kyselinu difenovou,1-kyselinu naftoovou apod. (9)(10)(11).

REPRODUKOVATELNOST VÝSLEDKŮ ZKOUŠKY

17. Existuje mnohem méně zpráv o studiích simulačních zkoušek než o zkouškách snadné biologické rozložitelnosti. Reprodukovatelnost mezi (simultánními) opakováními je dobrá (v rozmezí 10–15 %) u zkoušených látek rozložených z 80 % nebo více, ale u hůře rozložitelných chemických látek je variabilita větší. Také u některých hraničních chemických látek byly při různých příležitostech v průběhu 9 týdnů povolených v testu zaznamenány zcela rozdílné výsledky (např. 10 %, 90 %).

18. U výsledků získaných z uvedených dvou typů aparatur byly zaznamenány jen malé rozdíly, ale u některých chemických látek proběhl rozsáhlejší a konzistentnější rozklad za přítomnosti domovních odpadních vod než za přítomnosti syntetické odpadní vody dle OECD.

POPIS ZKUŠEBNÍ METODY

Přístroje a pomůcky

Zkušební systém

19. Zkušební systém pro jednu zkoušenou chemickou látku se skládá ze zkušebního a kontrolního modelu; pokud se však provádějí pouze specifické analýzy (primární biologický rozklad), je vyžadován pouze zkušební model. Jeden kontrolní model může být použit pro více zkušebních zařízení, do nichž se vypouštějí buď stejné, nebo odlišné zkoušené chemické látky. V případě spřaženého zařízení (dodatek 3) se používá jeden kontrolní model pro každé zkušební zařízení. Zkušebním zařízením může být buď model aktivace, tj. Husmannův model (dodatek 1, obr. 1), nebo model s porézní nádobou (Dodatek 1, obr. 2). V obou případech se použijí zásobní nádoby s dostatečným objemem pro přítok a odtok a dávkovací čerpadla pro přítok, a to buď ve směsi s roztokem zkoušené chemické látky, nebo odděleně.

20. Každý model aktivace se skládá z aerační nádrže se známým objemem přibližně 3 litry aktivovaného kalu a sedimentační nádoby (sekundární dosazovací nádrže), s pracovním objemem přibližně 1,5 litru; objem lze do určité míry měnit nastavením výšky sedimentační nádoby. Jsou přípustné i nádoby s odlišnými objemy, pokud model pracuje s podobným hydraulickým zatížením. Pokud není možno udržet ve zkušební místnosti teplotu v požadovaném rozsahu, doporučuje se modely temperovat vodním pláštěm. Pro kontinuální nebo v pravidelných intervalech přerušovanou recirkulaci aktivovaného kalu z dosazovací nádrže do aerační nádrže se používá dávkovací čerpadlo nebo mamutka.

21. Model s porézní nádobou se skládá z vnitřního porézního válce s kuželovitým zakončením, který je vložen do poněkud větší nádoby stejného tvaru z nepropustného plastového materiálu. Jako materiál pro porézní nádobu může být použit porézní polyethylen s maximální velikostí pórů 90 μm a s tloušťkou 2 mm. K separaci kalu od upraveného organického média dochází filtrací porézní stěnou. Odtok se shromažďuje v prostoru mezi nádobami a odtéká do sběrné nádoby. Nedochází k sedimentaci, a proto aktivovaný kal nerecirkuluje. Celé zařízení může být umístěno v termostatované vodní lázni. Někdy dojde v počátečním stadiu k ucpání porézní nádoby a obsah přeteče. V takovém případě se ucpaný porézní válec nahradí novým, přičemž se kal z nádoby nejprve přelije do čisté nádoby a ucpaný válec se odstraní. Po otření nepropustného vnějšího válce se vloží čistý vnitřní válec a kal se vrátí do

▼M4

nádoby. Veškerý kal, který ulpí na stěnách ucpaného vnitřního válce, se rovněž pečlivě seškrábe a přenese. Ucpané válce se čistí nejprve pomocí tenkého proudu vody pro odstranění zbývajícího kalu a poté ponořením do zředěného roztoku chlornanu sodného, pak do vody a nakonec se vodou dokonale vypláchnou.

22. Pro oba modely lze použít vhodné způsoby provzdušňování kalu v aerační nádrži, například různé provzdušňovací krychličky (rozvaděče) a tlakový vzduch. Pokud je to nutné, musí být vzduch čištěn, například vhodným filtrem a promýváním. Provzdušňování musí být dostatečné, aby byly v systému po celou dobu zkoušky zajištěny aerobní podmínky a dokonalá suspenze vloček kalu.

Filtrační přístroj nebo odstředivka

23. Přístroj pro membránovou filtraci s filtry vhodné velikosti pórů (průměr pórů 0,45 μm), které co nejméně adsorbují rozpustné organické chemické látky nebo uvolňují organický uhlík. Pokud použité filtry uvolňují organický uhlík, promyjí se pečlivě horkou vodou, aby byl odstraněn vyluhovatelný organický uhlík. Lze použít rovněž odstředivku, která je schopna dosáhnout odstředivého zrychlení 40 000 m/s^2.

Analytické vybavení

24. Zařízení pro stanovení:

— DOC (rozpuštěného organického uhlíku) a TOC (celkového organického uhlíku), nebo CHSK (chemické spotřeby kyslíku),

— případně pro stanovení určité chemické látky,

— nerozpuštěných tuhých látek, hodnoty pH a koncentrace kyslíku ve vodě,

— teploty, zásaditosti a kyselosti,

— jestliže systém pracuje s nitrifikací, pak vybavení pro stanovení amoniakálního, dusitanového a dusičnanového dusíku.

Voda

25. Vodovodní voda s koncentrací DOC menší než 3 mg/l. Určení zásaditosti, pokud již není známé.

26. Deionizovaná voda s koncentrací DOC menší než 2 mg/l.

Organické médium

27. Jako organické médium je přípustná syntetická odpadní voda, splašková odpadní voda nebo jejich směs. Bylo prokázáno (11), (14), že použití samotné splaškové odpadní vody často vede k většímu procentu odstranění DOC, a dokonce umožňuje odstranění a biologický rozklad některých chemických látek, které se při užití syntetické odpadní vody dle OECD biologicky nerozloží. Kontinuální nebo přerušované přidávání splaškové odpadní vody rovněž často vede ke stabilizaci aktivovaného kalu včetně zásadní schopnosti dobrého usazování. Proto se doporučuje použití splaškové odpadní vody. Koncentrace DOC nebo CHSK se stanovuje v každé nové šarži organického média. Má být známa kyselost nebo zásaditost organického média. Organické médium může vyžadovat přidání vhodného pufru (hydrogenuhličitan sodný nebo dihydrogenfosforečnan draselný) v případě, že má nízkou kyselost nebo zásaditost, s cílem udržet pH v aerační nádobě v průběhu zkoušky na hodnotě přibližně 7,5 ± 0,5. V každém jednotlivém případě je nutné rozhodnout o množství pufru, které má být přidáno, a době jeho přidání. Ať už jsou směsi přidávány kontinuálně nebo přerušovaně, musí být hodnota DOC (nebo CHSK) ve směsi udržována na přibližně konstantní hodnotě, např. zředěním vodou.

▼M4

Syntetická odpadní voda

28. V 1 litru vodovodní vody se rozpustí: pepton: 160 mg; masový extrakt: 110 mg; močovina, 30 mg; bezvodý hydrogenfosforečnan draselný (K_2HPO_4): 28 mg; chlorid sodný (NaCl): 7 mg; dihydrát chloridu vápenatého ($CaCl_2.2H_2O$): 4 mg; heptahydrát síranu hořečnatého ($Mg_2SO_4.7H_20$): 2 mg. Tato syntetická odpadní voda (OECD médium) je modelovým příkladem a vykazuje průměrnou koncentraci DOC v přítoku přibližně 100 mg/l. Další možností je použít jiná složení o přibližně stejné koncentraci DOC, která se více blíží skutečnému složení odpadní vody. Je-li potřeba užít přítok s nižší koncentrací, ředí se syntetická odpadní voda vodovodní vodou například v poměru 1:1 na koncentraci přibližně 50 mg/l. Taková slabší koncentrace přítoku umožní lepší růst nitrifikačních organismů a tato úprava by měla být použita v případě, že je třeba zkoumat simulaci čistíren odpadních vod pracujících s nitrifikací. Tuto syntetickou odpadní vodu lze připravit v destilované vodě v koncentrované podobě a uchovávat při teplotě asi 1 °C po dobu až jednoho týdne. V případě potřeby lze zředit vodovodní vodou. (Toto médium je nevyhovující, např. koncentrace dusíku je velmi vysoká, obsah uhlíku je relativně nízký, avšak nebyla navržena žádná lepší varianta kromě přidání dalšího fosfátu jako pufru a více peptonu).

Splašková odpadní voda

29. Použije se čerstvá odsazená odpadní voda odebíraná každý den z čistírny, která čistí převážně splaškové domovní odpadní vody. Odebírá se před primární sedimentací z přepadu mechanického stupně čistírny nebo z přítoku do čistírny pracující s aktivovaným kalem, a musí z ní být z větší části odstraněny hrubé částice. Odpadní voda může být uchovávána po několik dní (ale zpravidla ne déle než sedm dní) přibližně při 4 °C, pokud se prokáže, že hodnota DOC (nebo CHSK) se během uchovávání výrazně nesníží (tj. o více než 20 %). K zamezení poruchového provozu systému se před použitím adjustuje DOC (nebo CHSK) u každé nové šarže na příslušnou stálou koncentraci, např. zředěním vodovodní vodou.

Aktivovaný kal

30. Pro inokulaci se odebere aktivovaný kal z aerační nádrže dobře pracující čistírny odpadních vod nebo z laboratorního modelu aktivace, který pracuje převážně se splaškovou odpadní vodou.

Zásobní roztoky zkoušené chemické látky

31. U chemikálií s dostatečnou rozpustností se připraví zásobní roztok zkoušené chemické látky vhodné koncentrace (např. 1 až 5 g/l) v deionizované vodě nebo v minerální složce syntetické odpadní vody (u nerozpustných a těkavých látek viz dodatek 5). V zásobním roztoku se stanoví DOC a celkový organický uhlík (TOC) a měření se u každé nové šarže zopakuje. Jestliže je rozdíl mezi DOC a TOC větší než 20 %, ověří se rozpustnost zkoušené chemické látky ve vodě. DOC nebo koncentrace zkoušené chemické látky stanovená v zásobním roztoku specifickou analýzou se porovná se jmenovitou hodnotou, aby se zjistilo, zda je analytická výtěžnost dostatečná (obvykle lze očekávat > 90 %). Zhodnotí se, zvláště u disperzí, zda může být DOC použit jako analytický ukazatel nebo zda lze použít jen analytickou techniku specifickou pro danou zkoušenou chemickou látku. Vzorky s disperzí je nutné odstředit. V každé nové šarži se stanoví hodnoty DOC, CHSK nebo zkoušené chemické látky pomocí specifické analýzy.

▼M4

32. V zásobním roztoku se stanoví hodnota pH. Extrémní hodnoty indikují, že přidání chemické látky může ovlivňovat hodnotu pH aktivovaného kalu ve zkušebním systému. V takovém případě se zásobní roztok neutralizuje na hodnotu pH 7 ± 0,5 malým objemem anorganické kyseliny nebo zásady. Nesmí však dojít k vysrážení zkoušené chemické látky.

POSTUP

33. Tento postup platí pro zařízení s aktivovaným kalem. Pro zkoušku v modelu s porézní nádobou musí být mírně upraven.

Příprava inokula

34. Zkušební zařízení se na počátku zkoušky inokuluje buď aktivovaným kalem, nebo inokulem s nízkou koncentrací mikroorganismů. Inokulum se provzdušňuje při pokojové teplotě až do doby použití a použije se během 24 h. V prvním případě se vzorek aktivovaného kalu odebere z aerační nádrže dobře pracující biologické čistírny odpadních vod nebo z laboratorního modelu aktivace, který pracuje převážně se splaškovou odpadní vodou. Při simulaci nitrifikačních podmínek se odebere kal z čistírny odpadních vod pracující s nitrifikací. Stanoví se koncentrace sušiny, a pokud je to nutné, koncentruje se kal usazováním tak, aby objem kalu přidávaný do zkušebního modelu byl co nejmenší. Počáteční koncentrace sušiny kalu musí být přibližně 2,5 g/l.

35. Ve druhém případě se jako inokulum použijí 2 ml/l až 10 ml/l odtoku z biologické čistírny splaškových odpadních vod. Aby se získalo dostatečné zastoupení různých bakteriálních druhů, je vhodné použít inokula z různých dalších zdrojů, například z povrchové vody. V takovém případě se aktivovaný kal vyvíjí a roste ve zkušebním modelu.

Dávkování organického média

36. Je nutné zajistit důkladné vyčištění sběrných nádob na přítok a na odtok a trubek vedoucích z nádob na přítok a do nádob na odtok, aby se zabránilo růstu mikroorganismů na počátku zkoušky i v celém jejím průběhu. Zkušební zařízení se sestaví v místnosti s kontrolovanou teplotou (obvykle v rozmezí 20–25 °C) nebo se použije zkušební zařízení s vodním pláštěm. Připraví se dostatečný objem požadovaného organického média (odstavce 27–29). Nejprve se aerační a dosazovací nádrž naplní organickým médiem a potom se přidá inokulum (odstavce 34, 35). Intenzita provzdušňování se nastaví tak, aby byl kal udržován ve vznosu a v aerobním stavu. Potom se začne s dávkováním přítoku a recyklací usazeného kalu. Organické médium se dávkuje ze zásobních nádob do aeračních nádrží (odstavce 20, 21) zkušebního a kontrolního modelu a příslušné odtoky se shromažďují v obdobných zásobnících. Aby se dosáhlo obvyklé hydraulické doby zdržení 6 h, dávkuje se 0,5 litru organického média za 1 h. Pro potvrzení této rychlosti je nutno měřit dávkovaný denní objem organického média zjišťováním snížení objemu média v zásobnících. Pro stanovení účinků přerušovaného uvolňování a nárazového dávkování chemických látek by bylo nezbytné použít jiné způsoby dávkování

37. Jestliže je organické médium připraveno k použití po dobu delší než 1 den, je nutné je ochladit přibližně na 4 °C, případně použít jinou vhodnou metodu ochrany proti růstu mikroorganismů a biologickému rozkladu mimo zkušební zařízení (odstavec 29). Jestliže se používá syntetická odpadní voda, je možné připravit a uchovat při teplotě přibližně 4 °C koncentrovaný zásobní roztok (např. odpovídající desetinásobku běžné koncentrace, odstavec 28). Tento zásobní roztok lze před použitím snadno zředit odpovídajícím objemem vodovodní vody; lze jej rovněž čerpat přímo a odpovídající objem vodovodní vody čerpat zvlášť.

▼M4

Dávkování zkoušené chemické látky

38. Příslušný objem zásobního roztoku zkoušené chemické látky (odstavec 31) se buď přidá do zásobní nádoby přítoku, nebo se dávkuje samostatným čerpadlem přímo do aerační nádrže. Obvyklá průměrná zkušební koncentrace v přítoku by se měla pohybovat mezi 10 mg/l až 20 mg/l DOC, nemá však být vyšší než 50 mg/l. Pokud je zkoušená chemická látka málo rozpustná ve vodě nebo se mohou projevit její toxické účinky, lze snížit koncentraci DOC na 5 mg/l nebo i níže, pouze však za předpokladu, že je k dispozici vhodná specifická analytická metoda a že je rovněž provedena (dispergované zkoušené chemické látky s malou rozpustností se mohou dávkovat zvláštními způsoby, viz dodatek 5).

39. Zkoušená chemická látka se začne přidávat až po dosažení ustáleného stavu systému, kdy dochází k účinnému odstraňování DOC z biologického média (účinnost kolem 80 %). Je nutno dbát na to, aby všechny modely před přidáním zkoušené chemické látky pracovaly se stejnou účinností; pokud tomu tak není, doporučuje se smíchat jednotlivé kaly a znovu rozdělit stejné objemy do jednotlivých modelů. Při použití inokula s (přibližně) 2,5 g/l (sušiny) aktivovaného kalu lze přidávat zkoušenou chemickou látku hned od počátku zkoušky vzhledem k tomu, že přímé přídavky rostoucích dávek zkoušené chemické látky od počátku zkoušky mohou mít tu výhodu, že aktivovaný kal se na tuto látku lépe adaptuje. Bez ohledu na způsob přidání zkoušené chemické látky se doporučuje měřit v pravidelných intervalech průtok a/nebo objem v zásobní nádobě.

Nakládání s aktivovaným kalem

40. Koncentrace tuhých látek v aktivovaném kalu se během zkoušky obvykle ustaluje v rozsahu od 1 g/l do 3 g/l (sušiny) nezávisle na použitém inokulu a tato koncentrace závisí na jakosti a koncentraci organického média, na provozních podmínkách, na druhu přítomných mikroorganismů a na vlivu zkoušené chemické látky.

41. Buď se stanovuje koncentrace suspendovaných tuhých látek aktivovaného kalu v aeračních nádobách nejméně jednou týdně a odstraňuje se přebytečný kal tak, aby se koncentrace udržovala v rozsahu od 1 g/l do 3 g/l (sušiny), nebo se udržuje průměrné stáří kalu na konstantní hodnotě zpravidla v rozsahu od 6 dnů do 10 dnů. Pokud se například zvolí doba zdržení kalu 8 dnů, odstraní se denně 1/8 objemu aktivovaného kalu z aerační nádrže a odlije se. To se provádí denně, nebo nejlépe přerušovaným automatickým provozem čerpadla. Udržování koncentrace suspendovaných tuhých látek aktivovaného kalu na konstantní úrovni nebo v úzkém rozmezí neznamená udržování konstantní doby zdržení kalu (SRT), která je provozní proměnnou určující hodnotu koncentrace zkoušené chemické látky v odtoku.

42. Během zkoušky se nejméně jednou denně stírá kal ulpívající na stěnách aerační a dosazovací nádrže tak, aby došlo k jeho resuspenzi. Všechny trubky a potrubí se pravidelně kontrolují a čistí, aby se zabránilo růstu biofilmu. Usazený kal v dosazovací nádrži se vrací do aerační nádrže přednostně občasným čerpáním. V modelu s porézní nádobou neprobíhá recyklace, ale dříve, než objem v nádobě výrazně stoupne, je nutno zajistit vložení čistých vnitřních nádob (odstavec 21).

43. V Husmannově modelu může docházet ke špatnému usazování a ztrátám kalu v důsledku jeho špatné usaditelnosti. Tomu je možné zabránit použitím jednoho nebo více níže uvedených opatření, která se mají provádět paralelně jak ve zkušebním, tak v kontrolním modelu:

— v pravidelných intervalech (např. každý týden) může být přidáván čerstvý kal nebo flokulační činidlo (například 2 ml 50 g $FeCl_3$ v 1 litru na nádobu), avšak je nutno dbát na to, aby $FeCl_3$ nereagoval se zkoušenou chemickou látkou, ani ji nesrážel,

▼M4

— mamutka může být nahrazena peristaltickým čerpadlem a recirkulace kalu upravena tak, aby přibližně odpovídala přítoku, což umožní vytvoření anaerobní zóny v usazeném kalu (geometrie mamutky omezuje minimální rychlost vracení kalu přibližně na dvanáctinásobek rychlosti přítoku),

— kal může být čerpán z dosazovací do aerační nádrže přerušovaně (např. 5 minut během 2,5 hodiny), aby se recirkuloval 1 litr až 1,5 litru kalu za hodinu,

— aby se zabránilo ztrátám kalu pěněním, lze dávkovat co nejmenší koncentrace netoxického odpěňovacího činidla (např. silikonového oleje),

— vzduch může být přerušovaně v krátkých intervalech přiváděn do sedimentujícího kalu v dosazovací nádrži (např. po dobu 10 sekund každou hodinu),

— organické médium může být dávkováno do aerační nádrže přerušovaně (např. 3–10 minut během každé hodiny).

Odběr vzorků a analýza

44. V pravidelných intervalech se měří koncentrace rozpuštěného kyslíku, teplota a hodnota pH aktivovaného kalu v aerační nádrži. Musí se zajistit vždy dostatečná koncentrace kyslíku (> 2 mg/l) a udržovat požadovaný rozsah teploty (obvykle od 20 °C do 25 °C). Hodnota pH se udržuje na 7,5 ± 0,5 dávkováním malých objemů anorganické zásady nebo kyseliny do aerační nádrže nebo do přítoku nebo zvýšením tlumivé kapacity organického média (viz odstavec 27). Při nitrifikaci dochází ke vzniku kyseliny, přičemž při oxidaci 1 mg N vznikne ekvivalent přibližně 7 mg CO_3–. Četnost měření závisí na měřeném ukazateli a na stabilitě systému a může se pohybovat v denních nebo týdenních intervalech.

45. Změří se DOC nebo CHSK v přítocích kontrolní nádrže a zkušební nádrže (modelu). Změří se koncentrace zkoušené chemické látky v přítoku zkušebního modelu specifickou analýzou, případně se stanoví odhadem podle koncentrace zkoušené chemické látky v zásobním roztoku (odstavec 31), z použitého objemu a z množství odpadní vody dávkované do zkušebního zařízení. Aby se snížila variabilita údajů o koncentracích, doporučuje se koncentraci zkoušené chemické látky stanovit výpočtem.

46. Odebírají se vhodné objemy vzorků odtoku (např. 24h směsný vzorek) a filtrují se pomocí membrány o průměru pórů 0,45 μm nebo se odstřeďují při odstředivém zrychlení zhruba 40 000 m/s^2 po dobu přibližně 15 min. Je-li filtrace obtížná, použije se odstřeďování. Pro zjištění úplného biologického rozkladu se stanovuje DOC nebo CHSK v každém vzorku nejméně dvakrát, a pokud je to nutné, zjišťuje se primární biologický rozklad specifickým stanovením zkoušené chemické látky.

47. Při použití CHSK mohou vzniknout analytické problémy při nízkých koncentracích, a proto se doporučuje používat CHSK jen při dostatečně vysokých hodnotách zkušební koncentrace (přibližně 30 mg/l). Jestliže se zkoušená chemická látka značně adsorbuje, doporučuje se, aby se množství adsorbované látky na kalu změřilo analytickou metodou specifickou pro danou zkoušenou chemickou látku.

48. Četnost odběru vzorků závisí na očekávané době trvání zkoušky. Doporučená četnost odběrů jsou tři vzorky za 1 týden. Jakmile modely pracují s dostatečnou účinností, pak po přídavku zkoušené chemické látky bývá adaptace a ustáleného stavu dosaženo po 1 týdnu až 6 týdnech provozu. Pro výpočet výsledku zkoušky se použije nejméně 15 platných hodnot získaných v ustáleném stavu (odstavec 59), která zpravidla trvá 3 týdny. Zkouška může být ukončena, jakmile bylo dosaženo dostatečného stupně odstranění (např. > 90 %) a je k dispozici těchto 15 hodnot, které představují analýzy provedené v jednotlivých pracovních dnech po dobu 3 týdnů. Doba zkoušky po přidání zkoušené chemické látky by obvykle neměla překročit 12 týdnů.

▼M4

49. Jestliže dochází k nitrifikaci kalu a je-li potřeba zkoumat dopady zkoušené chemické látky na nitrifikaci, analyzují se vzorky z odtoku zkušebního i kontrolního modelu nejméně jednou týdně a stanoví se v nich amoniak a/nebo dusitan a dusičnan.

50. Všechny analýzy se provedou co nejdříve, zejména stanovení dusíku. Je-li nutné analýzy odložit, musí být vzorky uchovávány přibližně při 4 °C v temnu ve zcela naplněných a dobře uzavřených lahvičkách. Je-li zapotřebí uchovat vzorky déle než 48 h, konzervují se zmrazením, okyselením (např. přídavkem 10 ml/l roztoku kyseliny sírové koncentrace 400 g/l) popř. vhodnou toxickou látkou (např. přídavkem 20 ml/l roztoku chloridu rtuťnatého koncentrace 10 g/l). Ověří se, zda použitý způsob konzervace neovlivní výsledky analýzy.

Zkouška se spřaženým zařízením

51. Jestliže se používá spřažené zařízení (dodatek 3), vymění se každý den stejné množství aktivovaného kalu (150 ml až 1 500 ml pro aerační nádrž objemu 3 l směsi) mezi aeračními nádržemi zkušebního a kontrolního modelu. Pokud se zkoušená chemická látka silně adsorbuje na kal, vymění se pouze supernatant v dosazovacích nádržích. V obou případech se pro výpočet výsledků zkoušky použije korekční faktor (odstavec 55).

ÚDAJE A JEJICH PŘEDKLÁDÁNÍ

Zpracování výsledků

52. Stupeň odstranění zkoušené chemické látky v procentech DOC nebo CHSK pro každý časový odhad se vypočte podle rovnice:

$$D_t = \frac{C_s - (E - E_o)}{C_s} \times 100$$

kde

D_t = stupeň odstranění DOC nebo CHSK v čase t vyjádřený v procentech

C_s = koncentrace DOC nebo CHSK zkoušené chemické látky v přítoku v mg/l, přednostně stanovená odhadem ze zásobního roztoku

E = změřená koncentrace DOC nebo CHSK v odtoku ze zkušebního modelu v mg/l v čase t

E_o = změřená koncentrace DOC nebo CHSK v odtoku z kontrolního modelu v mg/l v čase t

53. Stupeň odstranění organického média prostřednictvím DOC nebo CHSK v kontrolní jednotce je užitečnou informací k posouzení biodegradační aktivity aktivovaného kalu během zkoušky. Stupeň odstranění organického média se vypočte podle rovnice:

$$D_B = \frac{C_M - E_o}{C_M} \times 100$$

kde

D_B = stupeň odstranění organického média vyjádřený v procentech DOC nebo CHSK v kontrolním modelu v čase t

C_M = koncentrace DOC nebo CHSK organického média v přítoku do kontrolního modelu v mg/l

▼M4

Nepovinně se vypočte procento odstranění DOC nebo CHSK organického média a zkoušené chemické látky ve zkušebním zařízení podle rovnice:

$$D_T = \frac{C_T - E}{C_T} \times 100$$

kde

D_T = stupeň odstranění DOC nebo CHSK v celkovém přítoku do zkušebního modelu vyjádřený v procentech

C_T = DOC nebo CHSK v celkovém přítoku do zkušebního modelu nebo vypočtený na základě zásobních roztoků v mg/l

54. Stupeň odstranění zkoušené chemické látky stanovený specifickou analytickou metodou při každém hodnocení v čase se vypočte podle rovnice:

$$D_{ST} = \frac{S_i - S_e}{S_i} \times 100$$

kde

D_{ST} = stupeň primárního odstranění zkoušené chemické látky v čase t vyjádřený v procentech

S_i = změřená nebo vypočtená koncentrace zkoušené chemické látky v přítoku do zkušebního modelu v mg/l

S_e = změřená koncentrace zkoušené chemické látky v odtoku ze zkušebního modelu v mg/l v čase t

55. Jestliže se používá spřažené zařízení, upraví se ředění zkoušené chemické látky v aerační nádrži o výměnu kalu a použije se korekční faktor (viz dodatek 3). Jestliže je průměrná hydraulická doba zdržení 6 h a vymění se polovina objemu aktivovaného kalu v aeračních nádržích, je pro získání skutečného stupně odstranění zkoušené chemické látky D_{tc} nutné upravit stanovené denní hodnoty odstranění (D_t, odstavec 52) na základě rovnice:

$$D_{tc} = \frac{4D_t - 100}{3}$$

Vyjadřování výsledků zkoušky

56. Do grafu se vynese procento odstranění D_t (nebo D_{tc}) a D_{ST}, pokud je k dispozici, v závislosti na čase (viz dodatek 2). Z tvaru této křivky odstranitelnosti zkoušené chemické látky (samostatně nebo jako DOC) lze vyvodit některé závěry o postupu odstraňování.

Adsorpce

57. Je-li hned na počátku zkoušky pozorován vysoký stupeň odstranění DOC zkoušené chemické látky, je zkoušená chemická látka pravděpodobně odstraňována adsorpcí na sušině aktivovaného kalu. To je možné ověřit stanovením adsorbované zkoušené chemické látky specifickou analýzou. Není obvyklé, aby stupeň odstranění DOC adsorbovatelných chemických látek zůstával vysoký v celém průběhu zkoušky; vysoký stupeň odstranění je zpravidla pozorován na počátku zkoušky a později klesne na rovnovážnou hodnotu. Pokud ale adsorbovatelná zkoušená chemická látka byla schopna tak či onak způsobit aklimatizaci populace mikroorganismů, stupeň odstranění DOC zkoušené chemické látky by následně vzrostl a dosáhl vysoké hodnoty ve fázi prodlevy.

▼M4

Lagová fáze

58. Obdobně jako u statických screeningových zkoušek musí u řady zkoušených látek dříve, než proběhne úplný biologický rozklad, proběhnout lagová fáze. V lagové fázi dochází k aklimatizaci nebo adaptaci rozkládajících se baktérií, přičemž nedochází téměř k žádnému úbytku zkoušené chemické látky; následně dochází k počátečnímu růstu těchto baktérií. Tato fáze končí a má se za to, že začíná fáze rozkladu, po úbytku přibližně 10 % počátečního množství zkoušené chemické látky (po zohlednění adsorpce, pokud k ní dojde). Lagová fáze je často různě dlouhá a špatně reprodukovatelná.

Prodleva

59. Fáze prodlevy křivky odstranitelnosti při kontinuální zkoušce je definována jako fáze, v níž dochází k maximálnímu rozkladu. Fáze prodlevy musí trvat nejméně 3 týdny a musí mít alespoň 15 změřených platných hodnot.

Průměrný stupeň odstranění zkoušené chemické látky

60. Střední hodnota se vypočte z hodnot odstranění (D_t) zkoušené chemické látky ve fázi prodlevy. Po zaokrouhlení na nejbližší celé číslo (1 %) získáme stupeň odstranění zkoušené chemické látky. Doporučuje se rovněž vypočítat 95 % konfidenční interval této střední hodnoty.

Odstranění organického média

61. Do grafu se vynese procento odstranění DOC nebo CHSK organického média v kontrolním zařízení (D_B) v závislosti na čase. Průměrný stupeň odstranění se označí stejně jako u zkoušené chemické látky (odstavec 60).

Indikace biologické rozložitelnosti

62. Jestliže se zkoušená chemická látka výrazně neadsorbuje na aktivovaném kalu a křivka odstranitelnosti vykazuje typický průběh biologického rozkladu s lagovou fází, fází rozkladu a fází prodlevy (odstavce 58, 59), lze změřené odstranění zkoušené chemické látky bezpečně přisoudit jejímu biologickému rozkladu. Dojde-li na počátku zkoušky k velkému odstranění, nemůže tato simulační zkouška rozlišit biologické a abiotické eliminační procesy. V takovém případě a také v jiných případech, kdy jsou pochybnosti o biologické rozložitelnosti (např. jestliže dochází ke stripování), se zjišťuje adsorpce zkoušené chemické látky nebo se provádějí další statické zkoušky biologické rozložitelnosti založené na ukazatelích jednoznačně indikujících biologické procesy. Takovými zkouškami jsou metoda zkoumání spotřeby kyslíku (kapitola C.4 D, E a F této přílohy (6)) nebo metoda stanovení uvolněného oxidu uhličitého (kapitola C.4 C této přílohy (6)) nebo metoda ISO Headspace (18) s využitím adaptovaného inokula ze simulační zkoušky. Pokud byly změřeny procentuální hodnoty jak odstranění DOC, tak odstranění konkrétních chemických látek, a existují-li mezi těmito hodnotami významné rozdíly (u DOC nižší hodnoty, u konkrétních látek vyšší), pak to naznačuje přítomnost organických meziproduktů v odpadních vodách, které mohou být obtížněji rozložitelné než výchozí chemická látka.

Platnost výsledků zkoušky

63. Stanovením stupně biologického rozkladu organického média (odstavec 53) v kontrolním modelu se získají informace o normální biologické rozložitelnosti inokula. Zkouška se považuje za platnou, jestliže je v kontrolním modelu stupeň biologického rozkladu podle DOC nebo CHSK po 2 týdnech větší než 80 % a nebyly pozorovány žádné neobvyklé jevy.

▼M4

64. Pokud byla užita snadno biologicky rozložitelná (referenční) chemická látka, měl by být stupeň biologického rozkladu (D_t, odstavec 52) > 90 %.

65. Jestliže je zkouška provedena za nitrifikačních podmínek, měla by být průměrná odtoková koncentrace < 1 mg/l amoniakálního dusíku a < 2 mg/l dusitanového dusíku.

66. Pokud tato kritéria (odstavce 63–65) nebyla splněna, je třeba zkoušku opakovat s použitím inokula z jiného zdroje, provést zkoušku referenční chemické látky a přezkoumat všechny experimentální postupy.

Protokol o zkoušce

67. V protokolu o zkoušce musí být uvedeny tyto údaje:

Zkoušená chemická látka:

— údaje nutné k identifikaci,

— fyzikální povaha a tam, kde je to podstatné, fyzikálně -chemické vlastnosti.

Zkušební podmínky:

— typ zkušebního zařízení, jakákoli úprava za účelem zkoušek nerozpustných a těkavých látek,

— typ organického média,

— podíl a charakter průmyslového odpadu obsaženého v odpadní vodě, jsou-li známy,

— inokulum, charakter a místo/místa odběru, koncentrace a jakákoli předúprava,

— zásobní roztok zkoušené chemické látky: obsah DOC a TOC, způsob přípravy, jedná-li se o suspenzi, užitá zkušební koncentrace; pokud se tato koncentrace pohybuje mimo rozmezí 10–20 mg/l DOC, důvody, proč tomu tak je, metoda přidávání, datum prvního přidání, jakékoli změny,

— průměrné stáří kalu a průměrná hydraulická doba zdržení, metoda odtahu kalu, metody předcházející bytnění kalu, ztrátě kalu apod.,

— použité analytické metody,

— zkušební teplota,

— vlastnosti kalu, např. bytnění, kalový index (KI), koncentrace aktivovaného kalu,

— údaje o odchylkách od normalizovaného postupu a o dalších okolnostech, které by mohly ovlivnit výsledky.

Výsledky zkoušky:

— všechny změřené údaje (DOC, CHSK, specifické analýzy, hodnota pH, teplota, koncentrace kyslíku, suspendované tuhé látky a sloučeniny dusíky, pokud je to relevantní),

— všechny vypočtené hodnoty D_t (nebo D_{tc}), D_B, D_{ST} v tabelované formě a křivky odstranitelnosti,

— údaje o lagové fázi a fázi prodlevy, doba trvání zkoušky, stupeň odstranění zkoušené chemické látky a stupeň odstranění organického média v kontrolním modelu společně se statistickými informacemi a vyjádřením k biologické rozložitelnosti zkoušené chemické látky a platnosti zkoušky,

— diskuse o výsledcích.

▼**M4**

LITERATURA:

1) Swisher RD (1987). „Surfactant Biodegradation“, 2nd Edn. Marcel Dekker Inc. New York, 1085 pp.

2) German Government (1962). Ordinance of the degradability of detergents in washing and cleaning agents. Bundesgesetzblatt, Pt.1 No.49: 698–706.

3) Painter HA and King EF (1978a). WRc porous-pot method for assessing biodegradability. Technical Report No.70, Water Research Centre, Medmenham, UK.

4) Painter HA and King EF (1978b). The effect of phosphate and temperature on growth of activated sludge and on biodegradation of surfactants. Wat. Res. 12: 909–915.

5) Eckenfelder, W.W (19) US EPA.

6) Kapitola C.4 této přílohy, Stanovení „snadné“ biologické rozložitelnosti.

7) Kapitola C.12 této přílohy, Biologická rozložitelnost – modifikovaná zkouška SCAS.

8) Kapitola C.19 této přílohy, Odhad adsorpčního koeficientu (K_{OU}) pro půdy a čistírenské kaly pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC).

9) Gerike P and Fischer WK (1979). A correlation study of biodegradability determinations with various chemicals in various tests. Ecotox. Env. Saf. 3:157–173.

10) Gerike P and Fischer WK (1981), as (9), II Additional results and conclusions. Ecotox. Env. Saf. 5: 45–55.

11) Painter HA and Bealing D (1989). Experience and data from the OECD activated sludge simulation test. pp 113–138, In: Laboratory tests for simulation of water treatment processes. CEC Water Pollution Report 18. Eds. Jacobsen BN, Muntau H, Angeletti G.

12) ISO 11733 (1995; přepracována v roce 2004). Stanovení odstranitelnosti a biologické rozložitelnosti organických látek ve vodním prostředí - simulační zkouška s aktivovaným kalem.

13) Birch RR (1982). The biodegradability of alcohol ethoxylates. XIII Jornado Com. Espanol. Deterg.: 33–48.

14) Birch RR (1984). Biodegradation of noniomic surfactants. J.A.O.C.S. 61 (2): 340–343.

15) Gerike P, Fischer WK and Holtmann W (1980). Biodegradability determinations in trickling filter units compared with the OECD confirmatory test. Wat.Res. 14: 753–758.

16) Baumann U, Kuhn G and Benz M. (1998). Einfache Versuchsanordnung zur Gewinnung gewässerökologisch relevanter Daten, UWSF - Z. Umweltchem. Ökotox. 10: 214–220.

17) Her Majesty’s Stationery Office (1982). Assessment of biodegradability. Methods for the examination of waters and associated materials. pp. 91–98 ISBN 011 751661 9.

18) ISO 14593 (1998). Jakost vod – Hodnocení úplné aerobní biologické rozložitelnosti organických látek ve vodním prostředí. Metoda stanovení anorganického uhlíku v těsně uzavřených lahvičkách.

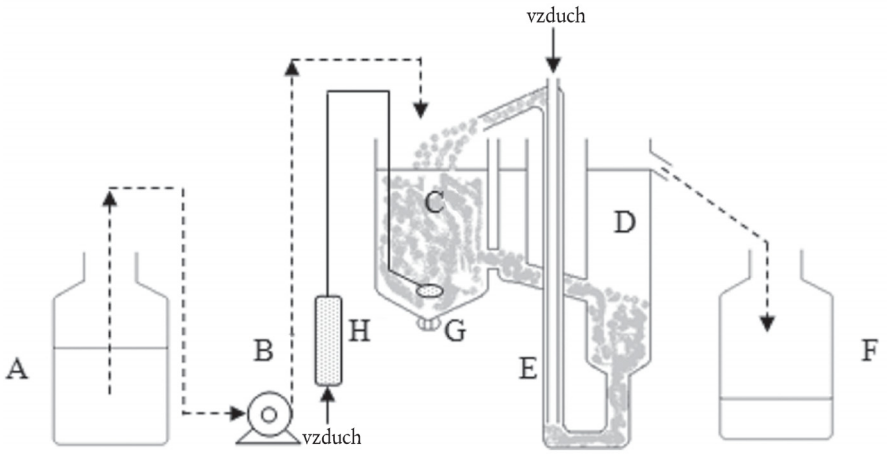
▼M4

Dodatek 1

Obrázek 1

Zařízení použité pro posouzení biologické rozložitelnosti

Husmannův model



A. zásobník

B. dávkovací čerpadlo

C. aerační nádrž (kapacita 3 l)

D. sedimentační nádrž

E. mamutka

F. sběrná nádrž

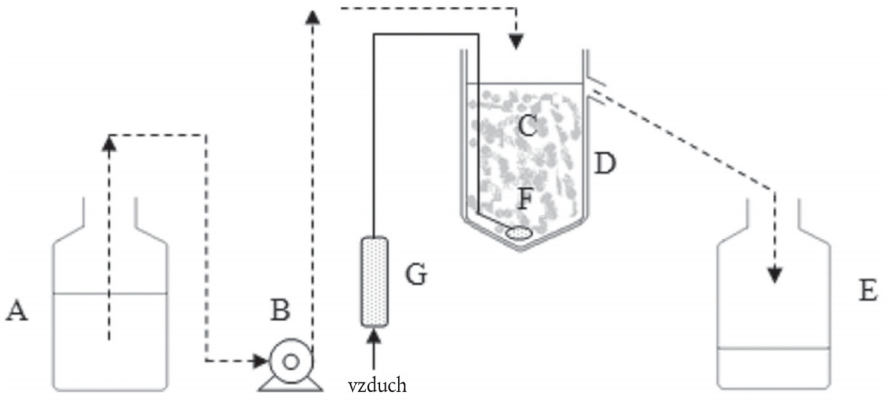
G. provzdušňovací zařízení (frita)

H. průtokoměr vzduchu

Obrázek 2

Zařízení použité pro posouzení biologické rozložitelnosti

Porézní nádoba



A. zásobník

B. dávkovací čerpadlo

C. porézní nádoba aerační nádrže

D. vnější nepropustná nádoba

E. sběrná nádrž

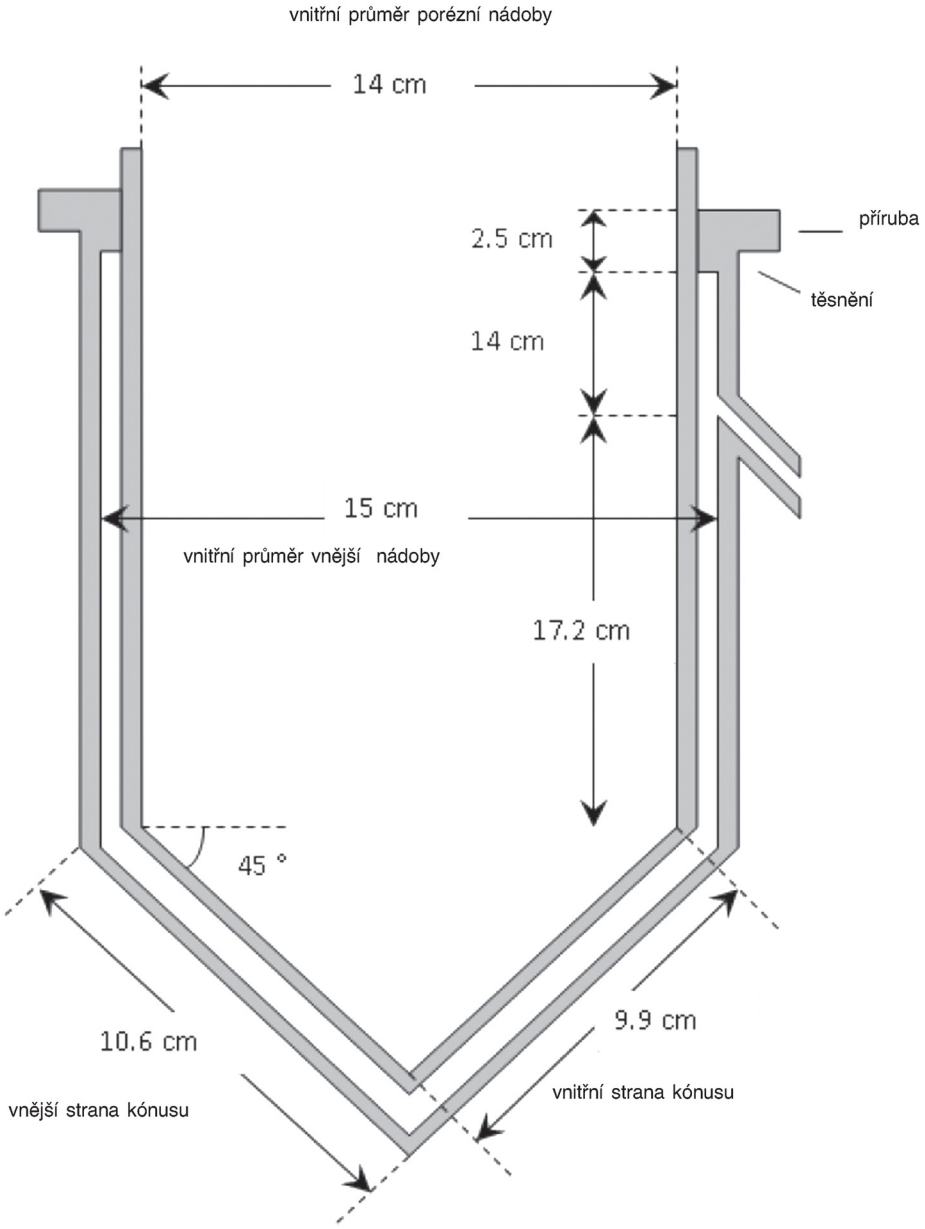
F. difuzér

G. průtokoměr vzduchu

▼**M4**

Obrázek 3

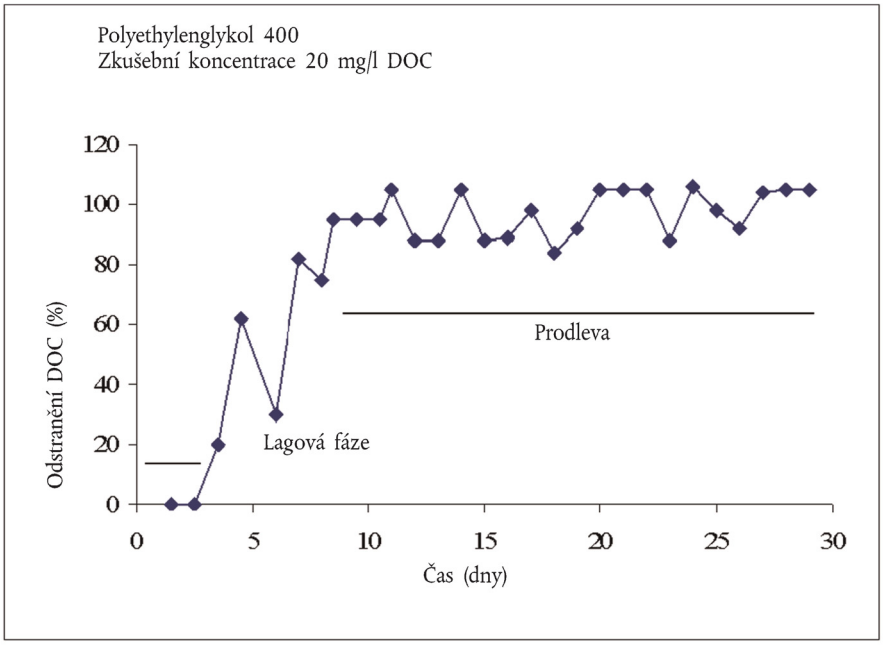
Podrobný popis porézní nádoby třílitrové aerační nádrže



▼**M4**

Dodatek 2

Příklad křivky odstranitelnosti



▼M4

Dodatek 3

[INFORMATIVNÍ]

ZKOUŠKA SE SPŘAŽENÝM ZAŘÍZENÍM

S cílem pokusit se vyrovnat mikrobiální populace v kalech ve zkušebním zařízení, do nějž je vpouštěna odpadní voda a zkoušená chemická látka, a v kontrolním zařízení, do nějž je vpouštěna pouze odpadní voda, byla zavedena denní výměna kalu (1). Tento postup byl nazván spřažením a metoda je známa jako zkouška se spřaženým zařízením. Spřažení bylo původně prováděno pomocí Husmannových modelů aktivovaného kalu, bylo však prováděno i s využitím modelů s porézní nádobou (2)(3). Nebyly zjištěny žádné významné rozdíly ve výsledcích mezi nespřaženými a spřaženými jednotkami bez ohledu na to, zda se jednalo o Husmannův model nebo model s porézní nádobou, takže vynaložení času a energie na spřažení zařízení by nepřineslo žádnou výhodu.

Výměna kalu může být zdánlivě příčinou značně vysokého stupně odstranění, protože část zkoušené chemické látky se přenáší do druhého modelu a koncentrace zkoušené chemické látky v odtoku ze zkušebního a kontrolního modelu se téměř vyrovná. Proto se používají korekční faktory, jejichž hodnota závisí na objemu vyměňované aktivační směsi a na průměrné hydraulické době zdržení. Podrobnosti pro výpočet byly zveřejněny (1).

Korigovaná hodnota stupně odstranění DOC nebo CHSK se vypočte podle obecné rovnice:

$$D_{tc} = (D_t - 100 \cdot a \cdot r/12)/(1 - a \cdot r/12)\ \%$$

kde

D_{tc} = korigovaný stupeň odstranění DOC nebo CHSK v procentech

D_t = stanovený stupeň odstranění DOC nebo CHSK v procentech

a = vyměněný podíl aktivační směsi mezi jednotkami aktivovaného kalu

r = průměrná hydraulická doba zdržení v hodinách

Jestliže se například vymění polovina objemu aeračních nádrží (a = 0,5) a průměrná hydraulická doba zdržení je 6 h, korekční vzorec je následující:

$$D_{tc} = \frac{4D_t - 100}{3}$$

LITERATURA:

1) Fischer W, Gerike P, Holtmann W (1975). Biodegradability Determinations via Unspecific Analyses (Chemical Oxygen Demand, DOC) in Coupled Units of the OECD Confirmatory Test. I The test. Wat. Res. 9: 1131-1135.

2) Painter HA, Bealing DJ (1989). Experience and Data from the OECD Activated Sludge Simulation Test. pp. 113-138. In: Laboratory Tests for Simulation of Water Treatment Processes CEC Water Pollution Report 18. Eds. Jacobsen BN, Muntau H, Angeletti G.

3) Painter HA, King EF (1978). Water Research Centre Porous Pot Method for Assessing Biodegradability. Technical Report TR70, Water Research Centre, Stevenage, UK.

▼M4

Dodatek 4

HODNOCENÍ INHIBICE AKTIVOVANÝM KALEM

Postup podle zkoušených chemických látek

1. Při simulační zkoušce nemusí dojít k rozkladu nebo odstranění chemické látky (nebo odpadní vody), která může mít dokonce inhibiční účinek na mikroorganismy v kalu. Jiné chemické látky se biologicky rozkládají v nízkých koncentracích, ale ve vyšší koncentraci působí inhibičně (hormeze). Inhibiční účinky mohou být zjištěny v dřívější fázi nebo mohou být stanoveny zkouškou toxicity s použitím obdobného nebo totožného inokula jako u simulační zkoušky (1). Jedná se o metodu inhibice spotřeby kyslíku (kapitola C.11 této přílohy (2) a ISO 8192(3)), nebo inhibice růstu organismů v kalu (ISO 15522 (4)).

2. V simulační zkoušce se inhibice projeví rozdílem obsahu rozpuštěného organického uhlíku (DOC) nebo chemické spotřeby kyslíku CHSK mezi odtokem ze zkušební nádoby a odtokem z kontrolní nádoby, který bude větší než v případě DOC přidaného jako zkoušená chemická látka. Vyjádřeno jiným způsobem se procento odstranění DOC (a biochemická spotřeba kyslíku BSK, chemická spotřeba kyslíku CHSK a/nebo NH^{+}_{4}) ve zpracovávaném organickém médiu v důsledku přítomnosti zkoušené chemické látky sníží. Pokud k tomu dojde, měla by být zkouška opakována při postupném snižování koncentrace zkoušené chemické látky, dokud nebude dosaženo úrovně, při které nedojde k inhibici; potenciálně lze dále snižovat koncentraci až do doby, kdy bude zkoušená chemická látka biologicky rozložena. Nicméně pokud má zkoušená chemická látka (nebo odpadní voda) na tento proces negativní vliv ve všech zkoušených koncentracích, nasvědčuje to tomu, že tuto chemickou látku je obtížné až nemožné biologicky odstranit, ale může být vhodné opakovat zkoušku s aktivovaným kalem z jiného zdroje a/nebo vystavení kalu postupnější aklimatizaci.

3. Naopak pokud dojde při simulační zkoušce k bioeliminaci zkoušené chemické látky napoprvé, měla by být její koncentrace zvýšena, je-li cílem zjistit, zda by daná chemická látka mohla působit inhibičně.

4. Při snaze zjistit stupeň inhibice je třeba mít na paměti, že populace v aktivovaném kalu se může změnit, takže se v průběhu času u mikroorganismů může vyvinout tolerance vůči inhibující látce.

5. Výpočet stupně inhibice:

   Celkové procento úbytku R_o, BSK, DOC, CHSK atd., ve zkušebních a kontrolních zařízeních lze vypočítat na základě rovnice:

$$R_o = 100(I - E)/I\%$$

   kde:

   I = koncentrace BSK, DOC, CHSK atd. v přítoku zkušebních nebo kontrolních nádob v mg/l

   E = příslušné koncentrace v odtoku v mg/l.

   I a E musí být korigovány o DOC v důsledku přítomnosti zkoušené chemické látky ve zkušebních zařízeních; v opačném případě budou výpočty procenta inhibice nesprávné.

▼**M4**

Stupeň inhibice způsobené přítomností zkoušené chemické látky lze vypočítat na základě rovnice:

$$\% \text{ inhibice} = 100(R_c - R_t)/R_c$$

kde:

R_c = procento úbytku v kontrolních nádobách

R_t = procento úbytku ve zkušebních nádobách

LITERATURA:

1) Reynolds L *et al*. (1987). Evaluation of the toxicity of substances to be assessed for biodegradability. Chemosphere 16: 2259.

2) Kapitola C.11 této přílohy, Biologická rozložitelnost – Zkouška na inhibici dýchání aktivovaného kalu.

3) ISO 8192 (2007) Jakost vod – Zkouška inhibice spotřeby kyslíku aktivovaným kalem při oxidaci uhlíkatých látek a amoniakálního dusíku.

4) ISO 15522 (1999) Water Quality - Determination of the inhibitory effect of water constituents on activated sludge microorganisms.

▼M4

Dodatek 5

Ve vodě těžko rozpustné zkoušené chemické látky – těkavé chemické látky

Ve vodě těžko rozpustné chemické látky

Evidentně bylo zveřejněno jen málo zpráv o podrobení chemických látek těžko rozpustných a nerozpustných ve vodě zkouškám simulujícím čištění odpadních vod (1), (2), (3).

Neexistuje jednotná metoda dispergace zkoušené chemické látky, kterou by bylo možno použít pro všechny nerozpustné chemické látky. Jako vhodné pro pokus o dispergaci zkoušených látek při simulační zkoušce by se jevily dva ze čtyř typů metod popsaných v normě ISO 10634 (4); jedná se o použití emulgačního činidla a/nebo ultrazvukové energie. Měla by být stanovena stabilita výsledné disperze po dobu alespoň 24 h. Vhodně stabilizované disperze v neustále míchaných nádržích (odstavec 38) pak budou nadávkovány do aerační nádrže odděleně od splaškové (nebo syntetické) odpadní vody.

V případě stabilní disperze je nutno prozkoumat způsob stanovení zkoušené chemické látky v dispergované formě. Metoda DOC nebude pravděpodobně pro tento účel vhodná, takže bude třeba stanovit analytickou metodu specifickou pro zkoušenou chemickou látku, kterou bude možno použít pro odtok, tuhé látky v odtoku a aktivovaný kal. Následně se stanoví osud zkoušené chemické látky v simulaci procesu čištění aktivovaným kalem v pevné a kapalné fázi. To znamená, že bude stanovena „hmotnostní bilance“ za účelem rozhodnutí, zda došlo k biologickému rozkladu zkoušené chemické látky. To by však indikovalo pouze primární biologický rozklad. Pokus o prokázání úplného biologického rozkladu by měl proběhnout na základě respirometrické zkoušky na snadnou biologickou rozložitelnost (viz kapitola C.4 této přílohy (5) C, F nebo D), přičemž se jako inokulum použije kal vystavený zkoušené chemické látce při simulační zkoušce.

Těkavé chemické látky

Uplatnění simulace čištění odpadních vod na těkavé chemické látky je sporné a problematické. Obdobně jako u zkoušených látek špatně rozpustných ve vodě bylo publikováno jen velmi málo zpráv popisujících simulační zkoušky pomocí těkavých látek. Konvenční typ kompletního míchadla se upraví utěsněním aeračních a usazovacích nádrží, měřením a regulací průtoku vzduchu pomocí průtokoměrů a vypouštěním výstupního plynu přes zařízení na zachycování těkavých organických látek. V některých případech se použije k vypouštění výstupního plynu vývěva přes „studené“ zachycovací zařízení nebo přes čisticí zachycovací zařízení obsahující Tenax a silikagel pro analýzu pomocí plynové chromatografie. Přítomnost zkoušené chemické látky v zachycovacím zařízení lze stanovit analyticky.

Zkouška se provádí ve dvou částech. Zařízení jsou nejprve spuštěna bez kalu, přičemž se do aerační nádrže čerpá syntetická odpadní voda a zkoušená chemická látka. Vzorky přítoku, odtoku a výstupního plynu se po dobu několika dnů shromažďují a analyzují na zkoušenou chemickou látku. Ze shromážděných údajů lze vypočítat procentní podíl (R_{vs}) zkoušené chemické látky odstraněné ze systému.

Následně je provedena normální biologická zkouška (s kalem) za stejných provozních podmínek jako ve stripovací studii. Jsou provedena také měření DOC nebo CHSK s cílem zkontrolovat efektivní fungování zařízení. V první části zkoušky jsou prováděny příležitostné analýzy ke stanovení zkoušené chemické látky v přítoku, odtoku a výstupním plynu; po aklimatizaci se analýzy provádějí častěji. Opět platí, že z údajů v ustáleném stavu lze vypočítat procento odstranění zkoušené chemické látky z kapalné fáze všemi procesy (R_T) (fyzikálními i biologickými) i podíl látek (R_V), odstraněných ze systému.

▼**M4**

Výpočet:

a) V nebiologické zkoušce lze procentní podíl (R_{VP}) zkušebního materiálu odstraněného ze systému vypočítat pomocí následující rovnice:

$$R_{VP} = \frac{S_{VP}}{S_{IP}} \cdot 100$$

kde

R_{VP} = odstranění zkoušené chemické látky těkáním (%),

S_{VP} = zkoušená chemická látka shromážděná v zařízení pro zachycování vyjádřená jako ekvivalentní koncentrace v kapalné fázi v mg/l,

S_{IP} = koncentrace zkoušené chemické látky v přítoku (mg/l).

b) V biologické zkoušce lze procentní podíl (R_V) zkušebního materiálu odstraněného ze systému vypočítat pomocí následující rovnice:

$$R_V = \frac{S_V}{S_I} \cdot 100$$

kde

R_V = odstranění zkoušené chemické látky těkáním při biologické zkoušce (v %),

S_V = zkoušená chemická látka shromážděná v zařízení pro zachycování při biologické zkoušce vyjádřená jako ekvivalentní koncentrace v kapalném přítoku v mg/l,

S_I = koncentrace zkoušené chemické látky v přítoku v mg/l.

c) V biologické zkoušce se procento (R_T) zkoušené chemické látky odstraněné všemi procesy vypočte pomocí následující rovnice:

$$R_T = 1 - \frac{S_E}{S_I} \cdot 100$$

kde

S_E = koncentrace zkoušené chemické látky v (kapalném) odtoku v mg/l.

d) Procentní podíl (R_{BA}) odstraněný biologickým rozkladem a adsorpcí lze tedy vypočítat na základě rovnice:

$$R_{BA} = (R_T - R_V)$$

Měly by být provedeny samostatné zkoušky s cílem zjistit, zda je zkoušená chemická látka adsorbována; pokud tomu tak je, lze provést další korekci.

e) Srovnání mezi podílem zkoušené chemické látky odstraněné z biologických (R_v) a nebiologických (R_{vp}) zkoušených systémů naznačuje celkový dopad biologického čištění na emise zkoušené chemické látky do atmosféry.

Příklad: benzen

doba zdržení kalu = 4 dny

syntetická odpadní voda; doba zdržení = 8 h

S_{IP} = S_I = 150 mg/l

S_{VP} = 150 mg/l (S_{EP} = 0)

S_V = 22,5 mg/l

S_E = 50 µg/l

▼**M4**

Platí tedy, že

R_{VP} = 100 %, R_V = 15 %

R_T = 100 % a R_{BA} = 85 %.

Předpokládalo se, že benzen není absorbován na kal.

LITERATURA:

1) Horn JA, Moyer JE, Hale JH (1970). Biological degradation of tertiary butyl alcohol. Proc. 25th Ind. Wastes Conference Purdue Univ.: 939-854.

2) Pitter P, Chudoba J (1990). Biodegradability of organic substances in the aquatic environment. CRC Press. Boston, USA.

3) Stover EL, Kincannon DF (1983). Biological treatability of specific organic compounds found in chemical industry waste waters. J. Wat. Pollut. Control Fed. 55: 97.

4) ISO 10634 (1995) Jakost vod - Pokyny pro přípravu a zpracování ve vodě těžko rozpustných organických látek pro následující hodnocení jejich biologické rozložitelnosti ve vodním prostředí

5) Kapitola C.4 této přílohy, Stanovení „snadné“ biologické rozložitelnosti.

▼M4

Dodatek 6

Vliv doby zdržení kalu (SRT) na odstranitelnost chemických látek

ÚVOD

1. Metoda popsaná v hlavní části textu byla navržena ke zjištění, zda zkoušené chemické látky (zpravidla takové, o nichž je známo, že jsou biologicky rozložitelné, avšak nikoli snadno biologicky rozložitelné) podléhají biologickému rozkladu v mezích vyžadovaných v čistírnách odpadních vod. Výsledky jsou vyjadřovány v procentech úbytku a v procentech biologického rozkladu. Podmínky provozu jednotek aktivovaného kalu a volba přítoku dovolují spíše širší rozpětí koncentrací zkoušené chemické látky v odtoku. Zkoušky jsou prováděny pouze při jedné jmenovité koncentraci suspendovaných látek nebo při jedné jmenovité době zdržení kalu (SRT) a popsané režimy odtahování mohou způsobit při zkoušce značné kolísání doby zdržení kalu jak den ode dne, tak během dne.

2. V této variantě (1), (2) je popsána metoda regulace doby zdržení kalu v mnohem užším rozmezí v průběhu každého 24hodinového období (obdobně jako ve větším měřítku), které může mít za následek ustálenější koncentraci zkoušené chemické látky v odtoku. Doporučuje se použít splaškovou odpadní vodu vzhledem k tomu, že vykazuje konzistentnější a vyšší procenta úbytku. Jsou rovněž zkoumány účinky řady hodnot doby zdržení kalu a v podrobnější studii mohou být stanoveny účinky rozmezí teplot na koncentraci chemické látky v odtoku.

3. Dosud neexistuje obecná shoda ohledně toho, které modely kinetiky působí při biologickém rozkladu chemických látek za podmínek panujících při čištění odpadních vod. Byl zvolen Monodův model růstu baktérií a využití substrátu (1), (2), který bude uplatněn na shromážděné údaje vzhledem k tomu, že tato metoda měla být použita pouze na chemické látky vyráběné ve velkých objemech, což má za následek koncentrace v odpadní vodě nad 1 mg/l. Platnost zjednodušeného modelu a užitých předpokladů byly stanoveny za použití řady alkoholethoxylátů s různým stupněm primární biologické rozložitelnosti (2), (3).

Poznámka: Tato variantní metoda úzce sleduje většinu textu této zkušební metody C.10-A a níže jsou uvedeny pouze podrobnosti, které se od ní liší.

PODSTATA ZKOUŠKY

4. Zařízení s porézní nádobou s aktivovaným kalem, určená k (téměř) kontinuálnímu odtahu aktivační směsi umožňující velmi přesné řízení doby zdržení kalu (SRT nebo θ_s) jsou provozována v nespřaženém režimu pro řadu dob zdržení kalu a volitelně i pro řadu teplot. Obvyklá doba zdržení je 2 až 10 dnů při teplotě 5 až 20 °C. Odpadní voda, nejlépe splašková, a roztok zkoušené chemické látky se do zařízení dávkují odděleně takovou rychlostí, aby se dosáhlo požadované doby zdržení kalu (3–6 hodin) a požadované koncentrace zkoušené chemické látky v přítoku. Kontrolní zařízení se provozují paralelně bez zkoušené chemické látky za účelem srovnání.

5. Lze použít i jiné typy zařízení, ale je nutné věnovat velkou pozornost správné kontrole doby zdržení kalu. Například při použití zařízení obsahujících usazovací nádrže může být nezbytné zohlednit ztrátu tuhých látek odtokem čistírny. Měla by být přijata speciální opatření s cílem zabránit chybám v důsledku kolísání množství kalu v usazovací nádrži.

▼M4

6. Zařízení se provozují při každé zvolené sérii podmínek až do ustáleného stavu a průměrná koncentrace zkoušené chemické látky a případně i DOC se pak stanovuje v odtoku po dobu přibližně tří týdnů. Kromě posouzení procenta úbytku zkoušené chemické látky a případně i DOC se vztah mezi podmínkami provozu čistíren a koncentrací zkoušené chemické látky v odtoku vyjadřuje v grafické formě. Výsledky jsou použitelné pro výpočet předběžných kinetických konstant a předpověď podmínek, za nichž lze zkoušenou chemickou látku čistit.

INFORMACE O ZKOUŠENÉ CHEMICKÉ LÁTCE

7. Použije se se kapitola C.10 A, odstavce 12 až 13.

HODNOTY, PŘI NICHŽ VÝROBEK VYHOVUJE

8. Použije se kapitola C.10 A, odstavce 14 až 15.

REFERENČNÍ ZKOUŠENÁ CHEMICKÁ LÁTKA

9. Použije se kapitola C.10 A, odstavec 16.

REPRODUKOVATELNOST VÝSLEDKŮ zkoušek

10. Použije se kapitola C.10 A, odstavce 17 až 18.

POPIS METODY

Přístroje a pomůcky

11. Vhodným zařízením je modifikovaný systém s porézní nádobou (dodatek 6.1). Skládá se z vnitřní nádoby (nebo vložky) vyrobené z porézního polypropylenu o síle stěn 3,2 mm, velikosti pórů přibližně 90 μm a s natupo svařenými spoji. (Vznikne tak pevnější zařízení, než je uvedeno v bodě 21 této kapitoly C.10 A) Porézní válec je vložen do vnější nádoby z nepropustného polyetylenu skládající se ze dvou částí: z kruhové základny, ve které jsou vyvrtány dva otvory pro přívod vzduchu a jeden pro odběr kalu, a z horního válce, který je přišroubován na základnu a má odtok umístěn tak, aby udržel daný objem (3 l) v porézní nádobě. Na jeden přívod vzduchu je napojena provzdušňovací krychlička a druhý konec přívodu vzduchu je otevřený a nastavený v pravém úhlu k provzdušňovacímu elementu základny. Toto uspořádání umožňuje potřebnou turbulenci, aby obsah nádoby byl dokonale promícháván a aby byla zajištěna koncentrace rozpuštěného kyslíku větší než 2 mg/l.

12. Odpovídající počet zařízení je udržován při kontrolované teplotě v rozmezí od 5 do 20 °C (±1 °C), a to buď ve vodní lázni nebo v místnosti s konstantní teplotou. Čerpadla musí dávkovat do aeračních nádob roztok zkoušené chemické látky požadovanou rychlostí 0–1,0 ml/min a usazené odpadní vody požadovanou rychlostí 0–25 ml/min a třetí čerpadlo musí odstraňovat odpadní kal z aeračních nádrží Potřebného velmi nízkého průtoku odpadního kalu je dosaženo pomocí čerpadla nastaveného na vyšší rychlost a spouštěného přerušovaně pomocí časového spínače, např. tak, že je v chodu po dobu 10 sekund za minutu, rychlost čerpadla je 3 ml/min a rychlost odtahování kalu 0,5 ml/min.

Filtrační přístroj nebo odstředivka

13. Použije se kapitola C.10 A, odstavec 23.

Analytické vybavení

14. Použije se kapitola C.10 A, odstavec 24.

Voda

▼**M4**

15. Použije se kapitola C.10 A, odstavce 25 až 26.

Organické médium

16. Použije se kapitola C.10 A, odstavec 27.

Syntetická odpadní voda

17. Použije se kapitola C.10 A, odstavec 28.

Splašková odpadní voda

18. Použije se kapitola C.10 A, odstavec 29.

Aktivovaný kal

19. Použije se kapitola C.10 A, odstavec 30.

Zásobní roztoky zkoušené chemické látky

20. Použije se kapitola C.10 A, odstavce 31 až 32.

POSTUP

Příprava inokula

21. Použije se pouze kapitola C.10 A, odstavec 34 – užití aktivovaného kalu (přibližně 2,5 g/l).

Počet zkušebních zařízení

22. Pro jednoduchou zkoušku, tzn. k měření procenta úbytku, je zapotřebí pouze jedna hodnota doby zdržení kalu, avšak za účelem získání údajů potřebných pro výpočet předběžných kinetických konstant je potřeba 4 nebo 5 hodnot doby zdržení kalu. Obvykle se volí hodnoty mezi 2 a 10 dny. V praxi je vhodné provádět zkoušku zároveň za stejné teploty při čtyřech nebo pěti různých dobách zdržení kalu; při rozšířených studiích se užijí stejné hodnoty SRT, případně jiný rozsah hodnot, při jiných teplotách v rozsahu 5 až 20 °C. U primárního biologického rozkladu (hlavní využití) je vyžadována zpravidla pouze jedna jednotka na každou sérii podmínek. Pro úplnou biologickou rozložitelnost je však pro každou sérii podmínek zapotřebí kontrolní model, do kterého je vpouštěna odpadní voda, ale nikoli zkoušená chemická látka. Vychází-li se z toho, že v použité odpadní vodě je přítomna zkoušená chemická látka, bylo by při posuzování primárního biologického rozkladu nutné použít kontrolní zařízení a provést nezbytnou korekci výpočtů.

Dávkování organického média a zkoušené chemické látky

23. Použije se kapitola C.10 A, odstavce 36 až 39, ale je nutné upozornit na to, že roztok zkoušené chemické látky je dávkován samostatně a že jsou užívány různé rychlosti odtahování kalu. Průtok přítoku, odtoku a odtah kalu se pravidelně sleduje, např. dvakrát denně, a pokud je to nutné, upravuje se v intervalu ±10 %. Pokud vzniknou u analytických metod problémy při použití splaškové odpadní vody, provede se zkouška se syntetickou odpadní vodou, ale je třeba zajistit, aby z různých médií vycházela srovnatelná kinetická data.

Nakládání s jednotkami na aktivovaný kal

24. Použije se kapitola C.10 A, odstavce 40 až 43, ale doba zdržení kalu v kontrolním modelu pouze z hlediska „nepřetržitého“ odtahu kalu.

Odběr vzorků a analýza

25. Použije se kapitola C.10 A, odstavce 44 až 50 s tou výjimkou, že musí být stanovena koncentrace zkoušené chemické látky, zatímco DOC může být stanoven volitelně; CHSK by se užívat neměl.

▼M4

ÚDAJE A JEJICH PŘEDKLÁDÁNÍ

Zpracování výsledků

26. Použije se kapitola C.10 A, odstavce 52 až 54.

Vyjadřování výsledků zkoušky

27. Použije se kapitola C.10 A, odstavce 56 až 62.

Výpočet kinetických konstant

28. Je realističtější uvádět průměrnou koncentraci zkoušené chemické látky v odtoku získanou po dosažení ustáleného stavu a popsat, jak se mění podle provozních podmínek čistírny, než uvádět procentuální primární biologický rozklad. To lze provést posouzením rovnice (6) v dodatku 6.2, z níž mohou vyplynout hodnoty K_S, μ_m a θ_{SC} – kritická doba zdržení kalu.

(Případně lze získat přibližné hodnoty K_S a μm pomocí jednoduchého počítačového programu v souladu s teoretickou křivkou vypočtenou podle rovnice 2 (dodatek 6.2) na základě získaných experimentálních hodnot. I když žádný daný roztok nebude jedinečný, lze získat přiměřenou aproximaci K_S a μ_m.)

Variabilita výsledků

29. Je obecně známo, že získané hodnoty kinetických parametrů pro jednotlivé chemické látky jsou variabilní. Má se za to, že podmínky, za nichž byl kal vypěstován, jakož i podmínky převládající v použité zkoušce (stejně jako v odstavci 5 a v jiných zkouškách), mají velký vliv na výsledné hodnoty. Jedním aspektem této variability se zabýval Grady se svými spolupracovníky (4), který se domníval, že by se pro dvě extrémní podmínky představující hranice fyziologického stavu, jehož může kultura dosáhnout při kinetickém experimentu, měly užívat pojmy „existující“ a „podstatné“. Pokud se tento stav nesmí v průběhu zkoušky měnit, odrážejí hodnoty kinetických parametrů podmínky v prostředí, ze kterého byly mikroorganismy odebrány; tyto hodnoty se nazývají „existující“ nebo aktuálně existující. Na druhé straně, pokud podmínky zkoušky umožňují plný rozvoj systému syntetizujícího proteiny, který umožňuje maximální možnou míru růstu, nazývají se získané kinetické parametry „podstatnými“ a jsou závislé pouze na povaze substrátu a na druzích bakterií v kultuře. Jako vodítko může posloužit fakt, že existující hodnoty se získají udržováním nízkého poměru koncentrace substrátu a příslušných mikroorganismů (S_o/X_o), např. 0,025, a podstatné hodnoty vznikají, když je tento poměr vysoký, např. alespoň 20. V obou případech by se tedy hodnota S_o měla rovnat příslušné hodnotě K_s, polosaturační konstantě, nebo ji převyšovat.

30. Variabilita a další aspekty kinetiky biologického rozkladu byly projednávány na nedávném workshopu SETAC (5). Z těchto vykazovaných a plánovaných studií by měl vyplynout jasnější pohled na kinetiku působící v čistírnách odpadních vod, který umožní lepší interpretaci stávajících údajů a návrh více relevantních podob budoucích zkušebních metod.

LITERATURA:

1) Birch RR (1982). The biodegradability of alcohol ethoxylates. XIII Jornado Com. Espanol Deterg.: 33–48.

2) Birch RR (1984). Biodegradation of nonionic surfactants. J.A.O.C.S., 61(2): 340–343.

3) Birch RR (1991). Prediction of the fate of detergent chemicals during sewage treatment. J. Chem. Tech. Biotechnol., 50: 411–422.

▼**M4**

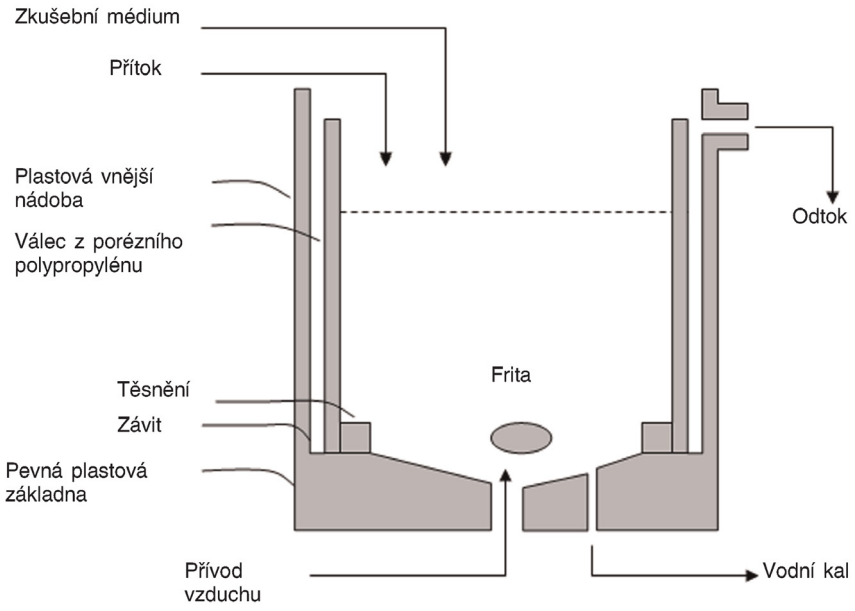
4) Grady CPL, Smets BF and Barbeau DS (1996). Variability in kinetic parameter estimates: A review of possible causes and a proposed terminology. Wat. Res., 30 (3): 742–748.

5) Biodegradation kinetics: Generation and use of data for regulatory decision making (1997). Workshop at Port Sunlight, UK. Eds. Hales SG, Feitjel T, King H, Fox K, Verstraete W. 4–6th Sept. 1996. SETAC- Europe, Brussels.

▼**M4**

Dodatek 6.1

Porézní nádoba s kontrolou doby zdržení kalu



▼M4

Dodatek 6.2

Výpočet kinetických konstant

1. Za předpokladu platnosti kinetiky dle Monoda a s přihlédnutím k hmotnostní bilanci aktivní sušiny kalu a substrátu v aktivačním systému (1) lze vyjádřit ustálený stav následujícími rovnicemi:

$$\frac{1}{\theta_s} = \frac{\mu_m \cdot S_1}{K_s + S_1} - K_d \qquad [1]$$

nebo

$$S_1 = \frac{K_s \cdot (1 + K_d \cdot \theta_s)}{\theta_s \cdot (\mu_m - K_d) - 1} \qquad [2]$$

kde:

S_1 = koncentrace substrátu v odtoku (v mg/l)

K_S = půlrychlostní (saturační) konstanta, koncentrace, při které $\mu = \mu_m/2$ (mg/l)

μ = specifická rychlost růstu (d^{-1})

μ_m = maximální hodnota μ_m (d^{-1})

K_d = specifická rozkladná konstanta aktivní sušiny kalu (d^{-1})

θ_S = střední doba zdržení kalu, SRT (d)

Přezkoumání této rovnice vede k následujícím závěrům:

i) Koncentrace zkoušené chemické látky v odtoku nezávisí na koncentraci zkoušené chemické látky S_0 v přítoku; z tohoto důvodu procento biologického rozkladu kolísá podle koncentrace zkoušené chemické látky S_0 v přítoku.

ii) Jediným technologickým parametrem ovlivňujícím hodnotu S_1 je doba zdržení kalu θ_S.

iii) Pro danou koncentraci zkoušené chemické látky S_0 v přítoku existuje kritická doba zdržení kalu, která je popsána rovnicí:

$$\frac{1}{\theta_{SC}} = \frac{\mu_s \cdot S_0}{K_s + S_0} - K_d \qquad [3]$$

kde:

θ_{SC} = kritická doba zdržení kalu; při nižší době budou příslušné organismy z čistírny vypláchnuty.

iv) Vzhledem k tomu, že ostatní parametry v rovnici 2) jsou spojeny s kinetikou růstu, bude úroveň substrátu v odtoku pravděpodobně příznivě ovlivněna teplotou a kritické stáří biomasy, tj. doba zdržení kalu potřebná k dosažení určitého stupně rozkladu, se bude s poklesem teploty zvyšovat.

2. Z hmotnostní bilance sušiny kalu v modelu s porézní nádobou a za předpokladu nízké koncentrace sušiny kalu X_2 v odtoku z modelu v porovnání ke koncentraci sušiny kalu X_1 v aerační nádrži je doba zdržení kalu

$$\theta_s = \frac{V \cdot X_1}{(Q_0 - Q_1) \cdot X_2 + Q_1 \cdot X_1} \qquad [4]$$

▼**M4**

a

$$\theta_s = \frac{V \cdot X_1}{Q_1 \cdot X_1} = \frac{V}{Q_1}$$

kde:

V = objem aerační nádrže v litrech

X_1 = koncentrace sušiny kalu v aerační nádrži v mg/l

X_2 = koncentrace sušiny kalu v odtoku v mg/l

Q_0 = průtok přítoku v litrech za den

Q_1 = průtok přebytečného kalu v litrech za den.

Takže dobu zdržení kalu je možné řídit přednastaveným průtokem přebytečného kalu Q_1.

Závěry:

3. Hlavním účelem této zkoušky je tedy předpovědět koncentraci zkoušené chemické látky v odtoku, a tudíž i v recipientu.

4. Kritickou dobu zdržení kalu θ_{SC} lze někdy snadno vyhodnotit vynesením S_1 v závislosti na θ_S, například v křivce 3 na obrázku 1. Pokud tento způsob není možný, lze θ_{SC} vypočítat spolu s přibližnými hodnotami μ_m a K_S vynesením S_1 v závislosti na součinu $S_1 \bullet \theta_S$.

Úpravou rovnice (1) se získá rovnice:

$$\frac{S_1 \cdot \theta_s}{1 + \theta_s \cdot K_d} = \frac{K_s}{\mu_m} + \frac{S_1}{\mu_m} \qquad [5]$$

Pokud je hodnota K_d nízká, potom výraz $1 + \theta_s \bullet K_d \sim 1$ a rovnice [5] se zjednoduší na rovnici:

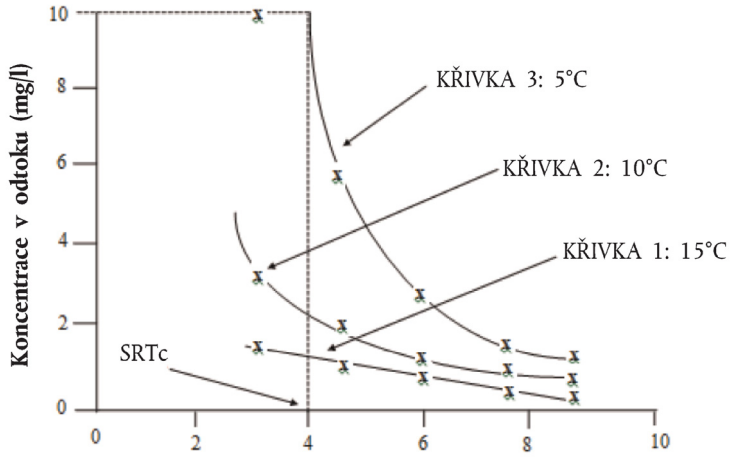
$$S_1 \cdot \theta_s = \frac{K_s}{\mu_m} + \frac{S_1}{\mu_m} \qquad [6]$$

Vynesením do grafu se získá přímka (viz obrázek 2) se směrnicí $1/\mu_m$ a úsekem K_S/μ_m. Přibližně platí rovněž $\theta_S \sim 1/\mu_m$.

▼M4

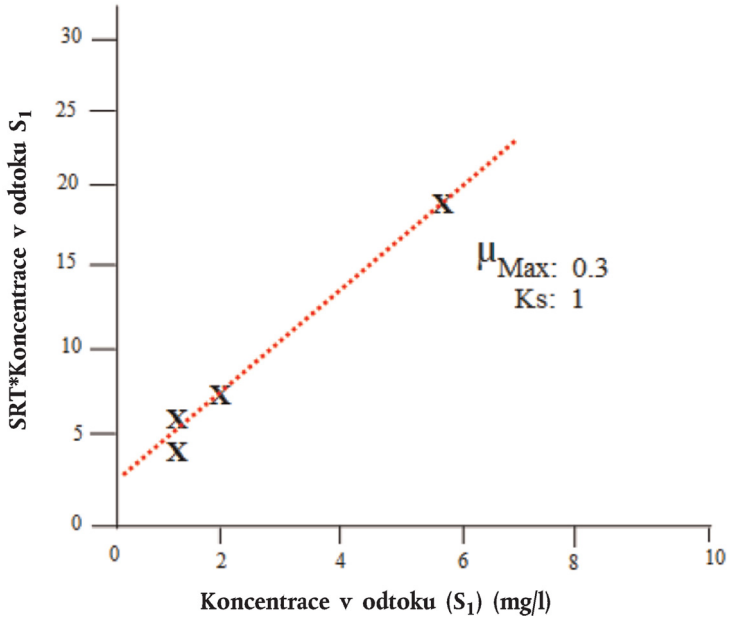
Obrázek 1

Tři teploty; pět dob zdržení kalu



Obrázek 2

Regresní přímka doby zdržení kalu S_1 jako funkce S_1 (T = 5 °C)



Slovníček:

Koncentrace v odtoku:

Křivka:

▼M4

Dodatek 7

ZKOUŠKA PŘI NÍZKÉM ROZMEZÍ KONCENTRACÍ (μg/l)

1. Mnohé chemické látky jsou obvykle přítomny ve vodním prostředí, a to i v odpadních vodách, ve velmi nízkých koncentracích (μg/l). V takových koncentracích pravděpodobně neslouží jako primární substráty zajišťující růst, ale spíše se rozkládají jako „nerůstové“ sekundární substráty souběžně s různými přirozeně se vyskytujícími uhlíkatými látkami. V důsledku toho nelze pro rozklad těchto látek použít model popsaný v dodatku 6. Lze uplatnit celou řadu modelů a za podmínek převažujících v systémech čištění odpadních vod může současně fungovat více těchto modelů. K objasnění tohoto problému bude zapotřebí dalšího rozsáhlého výzkumu.

2. Do té doby se lze řídit postupem uvedeným v hlavním textu (kapitola C.10), avšak pouze pro primární biologickou rozložitelnost pomocí vhodně nízkých koncentrací (< 100 μg/l) a validovaných analytických postupů. Procento biologického rozkladu lze vypočítat (viz odst. 54 zkušební metody) za předpokladu, že jsou zohledněny abiotické procesy (adsorpce, těkavost atd.). Příkladem je studie Nyholma a spolupracovníků (1, 2), která užívá čtyřhodinový cyklus v systému plnění a odběru. Uvedli konstanty pseudoprvního řádu u 5 chemických látek přidávaných do syntetické odpadní vody v koncentraci 5 až 100 0 μg/l. (Pro úplnou biologickou rozložitelnost lze použít zkoušené chemické látky značené izotopem ^{14}C. Popis tohoto postupu přesahuje rámec této zkušební metody, protože dosud neexistují dohodnuté postupy, přestože metoda navrhovaná pro ISO 14592 (3) obsahuje návod na používání látek značených izotopem ^{14}C.

Zkouška SCAS

3. Později byla navržena jednodušší dvoustupňová zkouška; (4, 5, 6); po semikontinuální metodě s aktivovaným kalem (SCAS) jsou provedeny krátkodobé kinetické zkoušky vzorků odebraných z modelů SCAS. Systém SCAS pracuje se známými objemy odtahování kalu (na rozdíl od původní zkušební metody C.12) a přidává se do něj modifikovaná syntetická odpadní voda dle OECD nebo splašková odpadní voda. Syntetická odpadní voda byla upravena (z důvodu změny hodnoty pH a nízké schopnosti usazování kalů) přídavkem fosfátu jako pufru, kvasnicového extraktu, chloridu železitého a solí stopových prvků a její CHSK byla zvýšena přibližně na 750 mg/l zvýšením koncentrace peptonu a masového extraktu. Zařízení byla provozována ve 24hodinovém cyklu: provzdušňování po dobu 23 hodin, odtah kalu, vypuštění supernatantu (z odtoku) s následným přídavkem syntetické odpadní vody a zkoušené chemické látky, a to až do 100 μg/l, (tj. ve zhruba stejné koncentraci jako při krátkodobé zkoušce). Jednou týdně bylo 10 % celkového kalu nahrazeno čerstvým kalem za účelem udržení rovnováhy mikrobiální populace.

4. Změří se koncentrace zkoušené chemické látky na začátku a ke konci provzdušňování a zkouška se provádí až do dosažení konstantního odstranění zkoušené chemické látky, což trvá od jednoho týdne do několika měsíců.

Krátkodobá zkouška

5. Krátkodobá zkouška (např. 8 hodin) se používá k určení kinetické rychlostní konstanty (pseudo) prvního řádu rozkladu zkoušené chemické látky v aktivovaném kalu známého, ale různého původu a historie. Vzorky kalů se v průběhu aklimatizačního experimentu (odstavce 3, 4) odebírají zejména z reaktorů SCAS na konci provzdušňovacího období, kdy je koncentrace organického substrátu nízká. Kal může být pro srovnání odebrán také z paralelního modelu SCAS, který nebyl vystaven zkoušené látce. Směsi kalu

▼M4

a zkoušené chemické látky přidané ve dvou nebo více koncentracích v rozsahu 1–50 μg/l se provzdušní bez přídavku syntetické odpadní vody nebo jiného organického substrátu. Zkoušené chemické látky zbývající v roztoku se stanovují v pravidelných intervalech, např. každou hodinu v závislosti na rozložitelnosti dané chemické látky, ne však déle než po dobu 24 hodin. Vzorky se před provedením příslušné analýzy odstředí.

Výpočty

6. Údaje z modelů SCAS se užívají pro výpočet procenta úbytku zkoušené chemické látky (odstavec 54). Je rovněž možné vypočítat průměrnou rychlostní konstantu K_1 (normalizovanou na koncentraci nerozpuštěných látek) podle vzorce:

$$K_1 = 1/t \cdot \ln \frac{C_e}{C_i} \cdot 1/SS(1/g\ h)$$

kde:

t = doba provzdušňování (23 h),

C_e = koncentrace na konci provzdušňovacího období v μg/l,

C_i = koncentrace na počátku provzdušňování v μg/l,

SS = koncentrace tuhých látek v aktivovaném kalu v g/l).

7. V krátkodobé zkoušce se do grafu vynese zbývající koncentrace log % v závislosti na čase a sklon počáteční části křivky (10–50 % rozklad) odpovídá K_1, konstantě (pseudo) prvního řádu. Tato konstanta se normalizuje s ohledem na koncentraci sušiny kalu tak, že se sklon křivky vydělí koncentrací sušiny kalu. Uvedený výsledek musí rovněž obsahovat podrobnosti o počátečních koncentracích zkoušené chemické látky a nerozpuštěných látek, době zdržení kalu, množství a zdroji zapravovaného kalu a podrobnosti případné adaptace za přítomnosti zkoušené látky.

Variabilita výsledků

8. Variabilita a další aspekty kinetiky biologického rozkladu byly projednávány na nedávném workshopu SETAC (7). Z těchto vykazovaných a plánovaných studií by měl vyplynout jasnější pohled na kinetiku působící v čistírnách odpadních vod, který umožní lepší interpretaci stávajících údajů a navržení více relevantních podob budoucích zkušebních metod.

LITERATURA:

1) Nyholm N, Jacobsen BN, Pedersen BM, Poulsen O, Dambourg A and Schultz B (1992). Removal of micropollutants in laboratory activated sludge reactors. Biodegradability. Wat. Res. 26: 339–353.

2) Jacobsen BN, Nyholm N, Pedersen BM, Poulsen O, and Ostfeldt P (1993). Removal of organic micropollutants in laboratory activated sludge reactors under various operating conditions: Sorption. Wat. Res. 27: 1505–1510.

3) ISO 14592 (ISO/TC 147/SC5/WG4, N264) (1998). Water Quality - Evaluation of the aerobic biodegradability of organic compounds at low concentrations in water.

▼**M4**

4) Nyholm N, Ingerslev F, Berg UT, Pedersen JP and Frimer-Larsen H (1996). Estimation of kinetic rate constants for biodegradation of chemicals in activated sludge waste water treatment plants using short-term batch experiments and µg/l range spiked concentrations Chemosphere 33 (5): 851–864.

5) Berg UT and Nyholm N (1996). Biodegradability simulation Studies in semi-continuous activated sludge reactors with low (µg/l range) and standard (ppm range) chemical concentrations. Chemosphere 33 (4): 711–735.

6) Danish Environmental Protection Agency. (1996). Activated sludge biodegradability simulation test. Environmental Project, No. 337. Nyholm, N. Berg, UT. Ingerslev, F. Min. of Env. and Energy, Copenhagen.

7) Biodegradation kinetics: Generation and use of data for regulatory decision making (1997). Workshop at Port Sunlight, UK. Eds. Hales, SG. Feitjel, T. King, H. Fox, K. and Verstraete, W. 4-6th Sept. 1996. SETAC- Europe, Brussels.

▼M4

C.10-B: Biofilmy

ÚVOD

1. Simulační zkoušky se zpravidla užívají u látek, které nevyhověly screeningové zkoušce na snadnou biologickou rozložitelnost (kapitola C.4 A až F této přílohy (9)), ale vyhověly zkoušce biologické rozložitelnosti. Výjimečně se simulační zkoušky použijí také pro chemické látky, o kterých je potřeba zjistit více informací, zejména pro velkotonážní chemické látky, a zpravidla se použije zkouška s aktivovaným kalem (C.10 A). V některých případech je však nutné získat specifické informace týkající se chování chemické látky při metodách čištění odpadních vod využívajících biofilmy; konkrétně se jedná o biologické perkolační nebo skrápěné filtry, rotační ponořené filtry a reaktory se vznášeným ložem. Pro splnění této potřeby byla vyvinuta různá zařízení.

2. Gerike *a spolupracovníci* (1) používali velké pilotní skrápěné filtry v režimu spřažení. Tyto filtry zabíraly mnoho místa a vyžadovaly relativně velké objemy odpadní vody nebo syntetické odpadní vody. Truesdale *a spolupracovníci* (2) popsali menší filtry (o průměru 6 stop × 6 palců), ve kterých se používala přírodní odpadní voda bez příměsi povrchově aktivních látek, avšak i ty vyžadovaly relativně velké objemy. K vytvoření „zralého“ biofilmu bylo zapotřebí až 14 týdnů a aklimatizace proběhla až po dalších 4–8 týdnech po prvním zavedení zkušební povrchově aktivní látky.

3. Baumann *a spolupracovníci* (3) vyvinuli mnohem menší filtr, který používal polyesterové „rouno“ předem namočené v aktivovaném kalu jako inertní médium na podporu růstu biofilmu. Zkoušená chemická látka byla užita jako jediný zdroj uhlíku a biologická rozložitelnost byla hodnocena na základě měření rozpuštěného organického uhlíku (DOC) v přítoku a odtoku a množství CO_2 ve výstupním plynu.

4. Zcela jiný přístup použili Gloyna *a spolupracovníci* (4) kteří vynalezli rotační trubkový reaktor. Na vnitřním povrchu otáčející se trubky se vytvořil biofilm na známé ploše povrchu působením přítoku zavedeného do horního konce trubky skloněné pod malým úhlem k vodorovné rovině. Tento reaktor byl použit ke studiu biologické rozložitelnosti povrchově aktivních látek (5) i ke zkoumání optimální tloušťky biofilmu a difuze filmem (6). Uvedení posledně jmenovaní autoři tento reaktor dále vyvíjeli, včetně úpravy umožňující stanovit CO_2 ve výstupním plynu.

5. Rotační trubkový reaktor byl přijat stálým výborem analytiků (*Standing Committee of Analysts*) (UK) jako standardní metoda stanovení jak biologické rozložitelnosti chemických látek (7), tak upravitelnosti a toxicity odpadních vod (8). Zde popsaná metoda je výhodná pro svou jednoduchost, kompaktnost, reprodukovatelnost a potřebu relativně malých objemů organického média.

PODSTATA ZKOUŠKY

6. Syntetická odpadní voda nebo splašková odpadní voda a zkoušená chemická látka se ve směsi nebo samostatně aplikují na vnitřní povrch pomalu rotující šikmé trubky. Na tomto vnitřním povrchu se vytvoří vrstva mikroorganismů podobných mikroorganismům, které se vyskytují na médiích biologického filtru. Podmínky pro provoz reaktoru jsou zvoleny tak, aby umožňovaly odpovídající odstranění organických látek a v případě potřeby i oxidaci amonia.

▼M4

7. Odpadní vody z trubky se shromažďují a před analýzou na rozpuštěný organický uhlík (DOC) a/nebo zkoušenou látku prostřednictvím specifické metody se buď usazují, a/nebo filtrují. Paralelně se za stejných podmínek provozují kontrolní zařízení bez zkoušené chemické látky za účelem srovnání. Předpokládá se, že rozdíl mezi koncentrací DOC nebo CHSK v odtoku ze zkušebního a kontrolního modelu pochází ze zkoušené chemické látky nebo jejích organických metabolitů. Tento rozdíl se porovná s koncentrací přidané zkoušené chemické látky (jako DOC) s cílem vypočítat odstranění zkoušené chemické látky.

8. Biologický rozklad lze zpravidla rozpoznat podle biologické adsorpce pečlivým prozkoumáním časové křivky odstranění. Potvrzení lze obvykle získat pomocí zkoušky snadné rozložitelnosti (spotřeba kyslíku nebo produkce oxidu uhličitého) s použitím aklimatizovaného inokula odebraného na konci zkoušky z reaktorů, do nichž je vpouštěna zkoušená chemická látka.

INFORMACE O ZKOUŠENÉ LÁTCE

9. Pro správnou interpretaci výsledků by měla být známa čistota zkoušené chemické látky, její rozpustnost ve vodě, těkavost a adsorpční vlastnosti.

10. U těkavých a těžko rozpustných chemických látek nelze zpravidla zkoušku provést, pokud nebudou přijata zvláštní opatření (viz dodatek 5 ke kapitole C.10 A). Pro výpočet teoretických hodnot a/nebo ověření naměřených hodnot parametrů, např. teoretické spotřeby kyslíku (TSK) nebo (DOC), je rovněž nutno znát chemickou strukturu nebo alespoň empirický vzorec.

11. Pro volbu vhodných zkušebních koncentrací mohou být velmi užitečné informace o toxicitě zkoušené chemické látky vůči mikroorganismům (viz dodatek 4 ke kapitole C.10 A); tyto informace mohou být důležité pro správnou interpretaci nízkých hodnot biologického rozkladu.

HODNOTY, PŘI NICHŽ VÝROBEK VYHOVUJE

12. Původně musel primární biologický rozklad povrchově aktivních látek před uvedením chemické látky na trh dosáhnout 80 % nebo více. Pokud není dosaženo hodnoty 80 %, lze použít tuto simulační (potvrzující) zkoušku a danou povrchově aktivní látku uvést na trh pouze za předpokladu odstranění více než 90 % dané chemické látky. Obecně se chemické látky neposuzují z hlediska vyhověla/nevyhověla a při přibližných výpočtech pravděpodobné koncentrace v životním prostředí, které se užívají při posuzování rizik plynoucích z chemických látek, lze použít získané hodnoty procenta úbytku. V řadě studií čistých chemických látek bylo zjištěno procento úbytku DOC > 90 % u více než tří čtvrtin a > 80 % u více než 90 % chemických látek, které nevykazují žádný významný stupeň biologické rozložitelnosti.

REFERENČNÍ CHEMICKÉ LÁTKY

13. Aby bylo zajištěno správné provedení experimentálního postupu, je vhodné provádět občasné zkoušky látek, jejichž chování je známé. Tyto chemické látky zahrnují kyselinu adipovou, 2-fenyl fenol, 1-naftol, kyselinu difenovou a 1-naftoovou kyselinu.

REPRODUKOVATELNOST VÝSLEDKŮ ZKOUŠKY

14. Laboratoř v UK zjistila, že relativní směrodatná odchylka v rámci zkoušek činí 3,5 % a mezi jednotlivými testy 5 % (7).

▼M4

POPIS METODY

Přístroje a pomůcky

Rotační trubkové reaktory

15. Zařízení (viz obr. 1 a 2 v dodatku 8) se skládá ze svazku akrylových trubek o délce 30,5 cm a vnitřním průměru 5 cm; trubky spočívají na kolech s gumovými pneumatikami zasazených do kovového nosného rámu. Každá trubka má vnější výčnělek o hloubce přibližně 0,5 cm, který ji drží na kolech; její vnitřní povrch je zdrsněn hrubou drátěnkou a na horním (přítočném) konci má 0,5 cm hluboký vnitřní výčnělek, který umožňuje udržení kapaliny. Trubky jsou skloněny pod úhlem přibližně jednoho stupně k vodorovné rovině, aby bylo dosaženo požadované doby kontaktu při aplikaci zkušebního média do čisté trubky. Kola opatřená gumovými pneumatikami se otáčejí pomocí pomalého motoru s proměnnými otáčkami. Teplota trubek je řízena instalací do místnosti s konstantní teplotou.

16. Uzavřením každého trubkového reaktoru do poněkud větší zkrácené trubky a zajištěním plynotěsnosti spojů lze plynný CO_2 na výstupu sbírat do zásaditého roztoku za účelem následného měření (6).

17. V zásobníku o objemu 20 l (A) (viz obrázek 2) je uložena 24hodinová zásoba organického média pro každou trubku, případně s přidáním zkoušené chemické látky. Pokud je to nutné, lze roztok zkoušené chemické látky dávkovat odděleně. V dolní části každého zásobníku je výstup, který je připojen pomocí vhodného potrubí, např. ze silikonového kaučuku, přes peristaltické čerpadlo (B) ke skleněné nebo akrylové výstupní trubici, která v délce 2–4 cm ústí do vyššího (přítočného) konce nakloněné trubky (C). Odtok se nechá odkapat ze spodního konce nakloněné trubky a je shromažďován v jiném zásobníku (D). Odtok se před analýzou usazuje nebo filtruje.

Filtrační zařízení – odstředivka

18. Přístroj pro membránovou filtraci s filtry vhodné velikosti pórů (jmenovitý průměr pórů 0,45 μm), které co nejméně adsorbují organické chemické látky nebo uvolňují organický uhlík. Pokud použité filtry uvolňují organický uhlík, promyjí se pečlivě horkou vodou, aby byl odstraněn vyluhovatelný organický uhlík. Lze použít rovněž odstředivku vhodnou pro odstřeďování při odstředivém zrychlení 40 000 m/s^2.

19. Analyzátor pro stanovení:

— DOC/celkového organického uhlíku (TOC) nebo chemické spotřeby kyslíku (CHSK),

— podle potřeby specifické chemické analýzy (HPLC, GC atd.),

— pH, teploty, kyselosti, zásaditosti,

— jestliže systém pracuje s nitrifikací, pak vybavení pro stanovení amoniakálního, dusitanového a dusičnanového dusíku.

Voda

20. Vodovodní voda s koncentrací DOC menší než 3 mg/l.

21. Destilovaná nebo deionizovaná voda s koncentrací DOC menší než 2 mg/l.

▼M4

Organické médium

22. Jako organické médium je přípustná syntetická odpadní voda, splašková odpadní voda nebo jejich směs. Bylo prokázáno, že použití samotné splaškové odpadní vody často vede k většímu procentu odstranění DOC (v zařízeních s aktivovaným kalem), a dokonce umožňuje odstranění některých chemických látek, které se při užití syntetické odpadní vody dle OECD biologicky nerozloží. Proto se doporučuje použití splaškové odpadní vody. Koncentrace DOC (nebo CHSK) se stanovuje v každé nové šarži organického média. Měla by být známa kyselost nebo zásaditost organického média. Organické médium může vyžadovat přidání vhodného pufru (hydrogenuhličitan sodný nebo dihydrogenfosforečnan draselný) v případě, že má nízkou kyselost nebo zásaditost, s cílem udržet pH v reaktoru v průběhu zkoušky na hodnotě přibližně 7,5 ± 0,5. V každém jednotlivém případě je nutno rozhodnout o množství pufru, které má být přidáno, a době jeho přidání.

Syntetická odpadní voda

23. V 1 litru vodovodní vody se rozpustí 160 mg peptonu, 110 mg masového výtažku, 30 mg močoviny, 28 mg bezvodého hydrogenfosforečnanu draselného (K_2HPO_4), 7 mg chloridu sodného (NaCl), 4 mg dihydrátu chloridu vápenatého ($CaCl_2.2H_2O$) a 2 mg heptahydrátu síranu hořečnatého ($MgSO_4.7H_2O$). Tato syntetická odpadní voda (OECD médium) je modelovým příkladem a vykazuje průměrnou koncentraci DOC v přítoku přibližně 100 mg/l. Další možností je použít jiná složení o přibližně stejné koncentraci DOC, která se více blíží skutečnému složení odpadní vody. Tuto syntetickou odpadní vodu lze připravit v destilované vodě v koncentrované podobě a uchovávat při teplotě asi 1 °C po dobu až jednoho týdne. V případě potřeby lze zředit vodovodní vodou. (Toto médium je nevyhovující, např. koncentrace dusíku je velmi vysoká, obsah uhlíku je relativně nízký, avšak nebyla navržena žádná lepší varianta kromě přidání dalšího fosfátu jako pufru a více peptonu).

Splašková odpadní voda

24. Použije se čerstvá usazená odpadní voda odebíraná každý den z čistírny, která zpracovává převážně splaškové domovní odpadní vody. Odebírá se primární sedimentací z přepadu čistírny nebo z přítoku do čistírny pracující s aktivovaným kalem a musí z ní být z větší části odstraněny hrubé částice. Odpadní voda může být uchovávána po několik dní přibližně při 4 °C, pokud se prokáže, že hodnota DOC (nebo CHSK) se během uchovávání výrazně nesníží (tj. o více než 20 %). K zamezení poruchového provozu systému se před použitím upraví DOC (nebo CHSK) u každé nové šarže na příslušnou stálou koncentraci, např. zředěním vodovodní vodou.

Mazivo

25. Na mazání válečků peristaltických čerpadel lze použít glycerol nebo olivový olej; obojí je vhodné pro použití na potrubí ze silikonové pryže.

Zásobní roztoky zkoušené chemické látky

26. U chemických látek s dostatečnou rozpustností se připraví zásobní roztok zkoušené chemické látky vhodné koncentrace (např. 1 až 5 g/l) v deionizované vodě nebo v minerální složce syntetické odpadní vody. U nerozpustných látek viz dodatek 5 v kapitole C.10-A. Tato metoda není vhodná pro těkavé chemické látky bez úpravy trubkových reaktorů (odstavec 16). V zásobním roztoku se stanoví DOC a TOC a měření se u každé nové šarže zopakuje. Jestliže je rozdíl mezi DOC a TOC větší než 20 %, ověří se rozpustnost zkoušené chemické látky ve vodě. DOC nebo koncentrace zkoušené chemické látky stanovená v zásobním roztoku specifickou analýzou se porovná se jmenovitou hodnotou, aby se zjistilo, zda analytická výtěžnost je dostatečná

▼M4

(obvykle lze očekávat > 90 %). Zhodnotí se, zvláště u disperzí, zda DOC může být použit jako analytický ukazatel nebo zda lze použít jen analytickou techniku specifickou pro danou zkoušenou chemickou látku. Vzorky s disperzí je nutné odstředit. V každé nové šarži se stanoví hodnoty DOC, CHSK nebo zkoušené chemické látky pomocí specifické analýzy.

27. V zásobním roztoku se stanoví hodnota pH. Extrémní hodnoty indikují, že přidání chemické látky může ovlivňovat hodnotu pH aktivovaného kalu ve zkušebním systému. V takovém případě se zásobní roztok neutralizuje na hodnotu pH 7 ± 0,5 malým objemem anorganické kyseliny nebo zásady. Nesmí však dojít k vysrážení zkoušené látky.

POSTUP

Příprava organického média pro dávkování

28. Je nutné zajistit důkladné vyčištění sběrných nádob na přítok a na odtok a trubek vedoucích z nádob na přítok a do nádob na odtok, aby se zabránilo růstu mikroorganismů na počátku zkoušky i v celém jejím průběhu

29. Syntetická odpadní voda (bod 23) se připravuje každý den čerstvá buď ze sušiny kalu, nebo z koncentrovaného zásobního roztoku odpovídajícím zředěním vodovodní vodou. Požadované množství se odměří ve válci a přidá se do čisté nádoby na přítok. V případě potřeby se do syntetické odpadní vody před zředěním rovněž přidá požadované množství zásobního roztoku zkoušené chemické látky nebo referenční chemické látky. Pokud je to výhodnější nebo nutné, aby se zabránilo ztrátám zkoušené chemické látky, připraví se odděleně zředěný roztok zkoušené chemické látky v oddělené nádrži a přidá se do nakloněných trubek prostřednictvím jiného dávkovacího čerpadla.

30. Lze rovněž (a přednostně) použít usazenou splaškovou odpadní vodu (odstavec 24), která je získávána čerstvě, pokud možno každý den.

Provoz rotačních trubkových reaktorů

31. Pro posouzení jedné zkoušené chemické látky jsou zapotřebí dva identické trubkové reaktory, které se sestaví v místnosti s konstantní teplotou, zpravidla 22 ± 2 °C.

32. Peristaltická čerpadla se upraví tak, aby dávkovala do nakloněných trubek, které se otáčejí rychlostí 18 ± 2 ot/min, 250 ± 25 ml/h organického média (bez zkoušené chemické látky). Na trubky čerpadel se na počátku nanese mazivo (bod 25) a v průběhu zkoušky se bude pravidelně nanášet dále s cílem zajistit řádné fungování a delší životnost trubek.

33. Úhel sklonu trubek se nastaví vzhledem k horizontální rovině tak, aby se zajistila doba zdržení 125 ± 12,5 s přívodu v čisté trubce. Retenční čas se odhadne přidáním nebiologického markeru (např. NaCl, inertní barvivo) do přiváděného média; za průměrnou dobu zdržení se považuje čas potřebný k dosažení maximální koncentrace v odtoku (je-li dosaženo maximální tloušťky filmu, může se retenční čas zvýšit až na přibližně 30 min.).

34. Bylo zjištěno, že při tomto průtoku, rychlosti a čase dochází k adekvátnímu odstranění (> 80 %) DOC (nebo CHSK) a vzniku nitrifikovaného odtoku. Pokud je odstranění nedostatečné nebo v případě, že je třeba simulovat výkon konkrétní čistírny odpadních vod, bude zapotřebí průtok změnit. Ve druhém z těchto případů je třeba upravit rychlost dávkování organického média, dokud výkon reaktoru nedosáhne stejného výkonu jako čistírna odpadních vod.

▼M4

Inokulace

35. Při použití syntetické odpadní vody může být pro zahájení růstu mikroorganismů dostatečná inokulace vzdušnou cestou, v jiných případech se však do přiváděného média po dobu 3 dnů přidává 1 ml/l odsazené odpadní vody.

Měření

36. V pravidelných intervalech se kontroluje, zda se rychlost dávkování a rychlost rotace pohybují v požadovaných mezích. Měří se rovněž pH v odtoku, a to zejména tehdy, pokud se předpokládá nitrifikace.

Odběr vzorků a analýza

37. Způsob, vzor a četnost odběru vzorků jsou vybrány tak, aby vyhovovaly účelu zkoušky. Odeberou se například jednorázové (nebo prosté) vzorky přítoku a odtoku, nebo se vzorky shromažďují po delší dobu, např. 3–6 hodin. V prvním období bez zkoušené chemické látky se odběr vzorků provádí dvakrát týdně. Vzorky se filtrují přes membrány nebo pomocí odstředivky při odstředivém zrychlení přibližně 40 000 m/s^2 přibližně 15 min. (odstavec 18). Před membránovou filtrací může být nutné nechat vzorky usadit a/nebo je přefiltrovat přes hrubý filtr. Provedou se nejméně dvě souběžná stanovení DOC (nebo CHSK) a v případě potřeby i BSK, amoniakálního a dusičnanového/dusitanového dusíku.

38. Všechny analýzy by měly být provedeny co nejdříve po odběru a přípravě vzorků. Je-li třeba analýzy odložit, musí být vzorky uchovávány přibližně při 4 °C v temnu, ve zcela naplněných a dobře uzavřených lahvičkách. Je-li zapotřebí uchovat vzorky déle než 48 h, konzervují se zmrazením, okyselením nebo přidáním vhodné toxické chemické látky (např. přídavkem 20 ml/l roztoku chloridu rtuťnatého koncentrace 10 g/l). Ověří se, zda použitý způsob konzervace neovlivní výsledky analýzy.

Rozběhová fáze

39. V této fázi povrchový biofilm roste za účelem dosažení optimální tloušťky; tato fáze trvá obvykle asi 2 týdny, avšak neměla by být delší než šest týdnů. Odstranění (bod 44), DOC (nebo CHSK) se zvyšuje a dosahuje hodnoty fáze prodlevy. Když bylo dosaženo fáze prodlevy při obdobné hodnotě v obou trubkách, jedna z nich se vybere jako kontrolní po celý zbytek zkoušky, v jejímž průběhu by měla být její účinnost konzistentní.

Přidání zkoušené chemické látky

40. V této fázi se zkoušená látka přidá do druhého reaktoru v požadované koncentraci, obvykle 10–20 mg C/l. Do kontrolního reaktoru je i nadále čerpáno pouze organické médium.

Období aklimatizace

41. I nadále se dvakrát týdně provádějí analýzy na DOC (nebo CHSK), a pokud je potřeba posoudit primární biologickou rozložitelnost, změří se také koncentrace zkoušené chemické látky specifickou analýzou. Po prvním přídavku zkoušené chemické látky bývá adaptace dosaženo po 1 týdnu až 6 týdnech provozu (za zvláštních podmínek i po delší době). Když procento úbytku (odstavce 43–45), dosáhne maximální hodnoty, získá se 12–15 platných hodnot ve fázi prodlevy po dobu přibližně 3 týdnů za účelem vyhodnocení průměrného procenta úbytku. Zkouška se považuje za ukončenou, jakmile bylo dosaženo dostatečného stupně odstranění. Doba zkoušky po prvním přidání zkoušené chemické látky by obvykle neměla překročit 12 týdnů.

▼M4

Odlučování filmu

42. Náhlé odstranění velkého množství přebytečného filmu z trubek neboli odlučování probíhá v relativně pravidelných intervalech. Aby bylo zajištěno, že nebude ovlivněna srovnatelnost výsledků, je třeba při zkoušce nechat proběhnout alespoň dva kompletní cykly růstu a odlučování.

ÚDAJE A JEJICH PŘEDKLÁDÁNÍ

Zpracování výsledků

43. Stupeň odstranění DOC (nebo CHSK) zkoušené chemické látky v procentech se pro každý časový odhad vypočte podle rovnice:

$$D_t = 100[C_s - (E - E_o)]/C_s \ \%$$

kde:

D_t = stupeň odstranění DOC (nebo CHSK) v čase t vyjádřený v procentech,

Cs = koncentrace DOC (nebo CHSK) zkoušené chemické látky v přítoku, přednostně odhadnutá z koncentrace zásobního roztoku a přidaného objemu zkoušené chemické látky v mg/l,

E = změřená koncentrace DOC nebo CHSK v odtoku ze zkušebního modelu v mg/l v čase t,

Eo = změřená koncentrace DOC nebo CHSK v odtoku z kontrolního modelu v mg/l v čase t.

Výpočet se opakuje pro referenční chemické látky, pokud jsou předmětem zkoušky.

Výkon kontrolního reaktoru

44. Stupeň (D_B) odstranění DOC (nebo CHSK) organického média v kontrolních reaktorech je užitečnou informací k posouzení biodegradační aktivity biofilmu během zkoušky. Stupeň odstranění organického média se vypočte podle rovnice:

$$D_B = 100(1 - E_o/C_m)\%$$

kde:

Cm = koncentrace DOC nebo CHSK organického média v přítoku do kontrolního modelu v mg/l.

45. Pokud je měřen stupeň odstranění zkoušené chemické látky (D_{ST}) stanovený specifickou analytickou metodou při každém hodnocení v čase, vypočte se podle rovnice:

$$DST = 100(1 - Se/Si)\%$$

kde:

Si = změřená nebo přednostně odhadnutá koncentrace zkoušené chemické látky v přítoku do zkušebního modelu v mg/l,

Se = změřená koncentrace zkoušené chemické látky v odtoku ze zkušebního modelu v mg/l v čase t.

▼M4

Pokud je na základě této analytické metody stanovena pozitivní hodnota neexponované odpadní vody odpovídající S_c v mg/l, vypočte se úbytek v procentech (D_{SC}) podle rovnice:

$$DSC = 100(Si - Se + Sc)/(Si + Sc)\%$$

Vyjadřování výsledků zkoušky

46. Do grafu se vynese stupeň odstranění D_t a D_{ST} (nebo D_{SC}) vyjádřený v procentech, pokud je k dispozici, v závislosti na čase (viz dodatek 2 v kapitole C.10-A). Vypočte se průměrná hodnota (zaokrouhlená na nejbližší celé číslo) a standardní odchylka 12–15 hodnot pro D_T (a pro $D_{ST,}$ jsou-li k dispozici) získaných ve fázi prodlevy a vyjádřených stupněm odstranění zkoušené chemické látky v procentech. Z tvaru křivky odstranitelnosti lze vyvodit některé závěry o procesech odstranění.

Adsorpce

47. Je-li hned na počátku zkoušky pozorován vysoký stupeň odstranění DOC zkoušené chemické látky, je zkoušená látka pravděpodobně odstraňována adsorpcí na biofilmu. To může být ověřitelné určením adsorbované zkoušené chemické látky na sušině odloučené z filmu. Není obvyklé, aby stupeň odstranění DOC zůstával vysoký v celém průběhu zkoušky; vysoký stupeň odstranění je zpravidla pozorován na počátku zkoušky, avšak pak postupně klesá na rovnovážnou hodnotu. Pokud by ale adsorbovaná zkoušená látka byla schopna způsobit aklimatizaci populace mikroorganismů, stupeň odstranění DOC zkoušené chemické látky by následně vzrostl a ve fázi prodlevy dosáhl vysoké hodnoty.

Lagová fáze

48. Obdobně jako u statických metod i při řadě screeningových zkoušek musí u řady zkoušených chemických látek proběhnout lagová fáze dříve, než dojde k biologickému rozkladu. V lagové fázi dochází k aklimatizaci nebo adaptaci rozkládajících se baktérií, přičemž nedochází téměř k žádnému úbytku zkoušené chemické látky; následně dochází k počátečnímu růstu těchto bakterií. Tato fáze končí a fáze rozkladu konvenčně začíná po úbytku přibližně 10 % počátečního množství zkoušené chemické látky (po započítání případné adsorpce). Lagová fáze je často různě dlouhá a špatně reprodukovatelná.

Fáze prodlevy

49. Fáze prodlevy křivky odstranitelnosti při kontinuální zkoušce je definována jako fáze, v níž dochází k maximálnímu rozkladu. Tato fáze musí trvat nejméně 3 týdny a musí z ní vzejít přibližně 12–15 změřených platných hodnot.

Průměrná hodnota stupně odstranění zkoušené chemické látky

50. Průměrná hodnota se vypočte z hodnot odstranění D_t (a D_{st}, pokud je k dispozici) zkoušené chemické látky během fáze prodlevy. Po zaokrouhlení na nejbližší celé číslo (1 %) získáme stupeň odstranění zkoušené chemické látky. Doporučuje se rovněž vypočítat 95 % konfidenční interval této průměrné hodnoty. Podobným způsobem se vypočte průměrná hodnota stupně (D_B) odstranění organického média v kontrolní nádobě.

▼M4

Indikace biologické rozložitelnosti

51. Jestliže se zkoušená látka výrazně neadsorbuje na biofilmu a křivka odstranitelnosti vykazuje typický průběh biologického rozkladu s lagovou fází, fází rozkladu a fází prodlevy (odstavce 48, 49), lze bezpečně přisoudit změřené odstranění zkoušené chemické látky jejímu biologickému rozkladu. Dojde-li na počátku zkoušky k velkému odstranění, nemůže tato simulační zkouška rozlišit biologické a abiotické eliminační procesy. V takovém případě a také v jiných případech, kdy jsou pochybnosti o biologické rozložitelnosti (např. jestliže dochází ke stripování), se zjišťuje adsorpce zkoušené chemické látky na vzorcích filmu nebo se provedou další statické (screeningové) zkoušky biologické rozložitelnosti založené na ukazatelích jednoznačně indikujících biologické procesy, jako je metoda stanovení spotřebou kyslíku (kapitola C.4 této přílohy D, E a F) (9) nebo zkouška, která měří produkci CO_2 (viz kapitola C.4-C této přílohy nebo metoda Headspace) (10); jako inokulum se použije adaptovaný biofilm z příslušného reaktoru.

52. Pokud bylo změřeno odstraňování DOC a odstraňování konkrétní chemické látky, signalizují významné procentuální rozdíly (v případě první hodnoty jsou nižší než druhé) v odstranění látek přítomnost organických meziproduktů v odtoku, které mohou být obtížněji rozložitelné; ty je nutno prozkoumat.

Platnost výsledků zkoušky

53. Zkouška se považuje za platnou, jestliže je v kontrolním modelu stupeň biologického rozkladu (D_B) podle DOC (nebo CHSK) po 2 týdnech větší než 80 % a nebyly pozorovány žádné neobvyklé jevy.

54. Pokud byla předmětem zkoušky snadno biologicky rozložitelná (referenční) látka, měl by být stupeň biologického rozkladu > 90 % a rozdíl mezi duplicitními hodnotami by neměl být větší než 5 %. Pokud nebyla tato dvě kritéria splněna, je třeba přezkoumat experimentální postupy a/nebo získat splaškovou odpadní vodu z jiného zdroje.

55. Obdobně by se rozdíly mezi hodnotami biologického rozkladu z duplicitních modelů (pokud byly použity) pracujících se zkoušenou chemickou látkou neměly lišit o více než 5 %. Pokud není toto kritérium splněno, ale míra úbytku je vysoká, pokračuje se v analýze po dobu dalších tří týdnů. Pokud je míra úbytku nízká, přezkoumají se inhibiční účinky zkoušené chemické látky, pokud nejsou známy, a zkouška se opakuje s nižší koncentrací zkoušené chemické látky, pokud je to možné.

Protokol o zkoušce

56. V protokolu o zkoušce musí být uvedeny tyto údaje:

Zkoušená látka:

— údaje nutné k identifikaci,

— fyzikální povaha a popřípadě fyzikálně-chemické vlastnosti.

Zkušební podmínky:

— jakékoli modifikace zkušebního systému zejména v případě, že jsou zkoušce podrobeny nerozpustné nebo těkavé chemické látky,

— typ organického média,

— podíl a charakter průmyslových odpadů obsažených v odpadní vodě, jsou-li užívány a jsou-li známy,

— metoda inokulace,

▼M4

— obsah – DOC (rozpuštěného organického uhlíku) a TOC (celkového organického uhlíku) v zásobním roztoku zkoušené chemické látky, způsob přípravy, jedná-li se o suspenzi, použitá (použité) zkušební koncentrace, případné odůvodnění, pokud se obsah DOC pohybuje mimo rozmezí 10–20 mg/l, metoda přidání, datum prvního přidání, veškeré změny koncentrace,

— průměrná hydraulická doba zdržení (bez nárůstu), rychlost otáčení trubky; pokud možno přibližný úhel sklonu,

— podrobnosti o odlučování, čas a intenzita,

— zkušební teplota a rozsah,

— použité analytické metody.

Výsledky zkoušky:

— všechny změřené údaje (DOC, CHSK, specifické analýzy, hodnota pH, teplota a dusíkaté látky, pokud je to relevantní),

— všechny vypočtené hodnoty D_t (nebo D_{tc}), D_B, D_s v tabelované formě a křivky odstranitelnosti,

— údaje o lagové fázi a fázi prodlevy, doba trvání zkoušky, stupeň odstranění zkoušené chemické látky, referenční chemické látky (pokud byla předmětem zkoušky) a stupeň odstranění organického média (v kontrolním modelu) společně se statistickými informacemi a vyjádřením k biologické rozložitelnosti zkoušené chemické látky a platnosti zkoušky,

— diskuse o výsledcích.

LITERATURA:

1) Gerike P, Fischer W, Holtmann W (1980). Biodegradability determinations in trickling filter units compared with the OECD Confirmatory Test. Wat. Res. 14: 753-758.

2) Truesdale GA, Jones K, Vandyke KG (1959). Removal of synthetic detergents in sewage treatment processes: Trials of a new biologically attackable material.Wat. Waste Tr. J. 7: 441-444.

3) Baumann U, Kuhn G and Benz M. (1998) Einfache Versuchsanordnung zur Gewinnung gewässerökologisch relevanter Daten, UWSF - Z. Umweltchem. Ökotox. 10: 214–220.

4) Gloyna EF, Comstock RF, Renn CE (1952). Rotary tubes as experimental trickling filters. Sewage ind. Waste 24: 1355-1357.

5) Kumke GW, Renn CE (1966). LAS removal across an institutional trickling filter. JAOCS 43: 92-94.

6) Tomlinson TG, Snaddon DHM, (1966). Biological oxidation of sewage by films of micro-organisms. Int.J. Air Wat. Pollut. 10: 865-881.

7) Her Majesty's Stationery Office (1982). Methods for the examination of waters and associated materials. Assessment of biodegradability, 1981, London.

8) Her Majesty's Stationery Office (1984). Methods for the examination of waters and associated materials. Methods for assessing the treatability of chemicals and industrial waste waters and their toxicity to sewage treatment processes, 1982, London.

9) Kapitola C.4 této přílohy, Stanovení „snadné" biologické rozložitelnosti A–F.

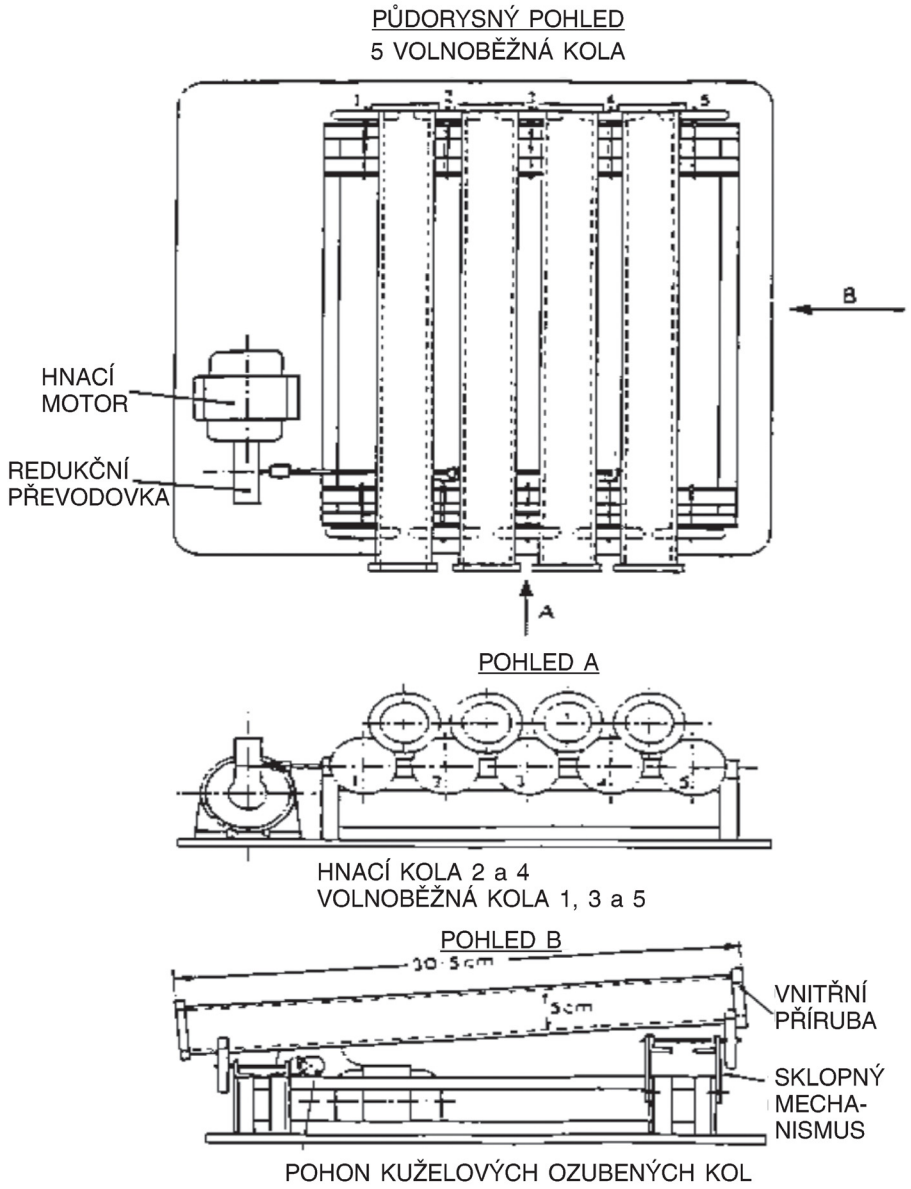
10) ISO 14593 (1998). Jakost vod - Hodnocení úplné aerobní biologické rozložitelnosti organických látek ve vodním prostředí. Metoda stanovení anorganického uhlíku v těsně uzavřených lahvičkách.

▼**M4**

Dodatek 8

Obrázek 1

Rotační trubky



Slovníček

Půdorysný pohled

Pohled A/B

Hnací kola

Volnoběžná kola

Hnací motor

Redukční převodovka

Vnitřní příruba

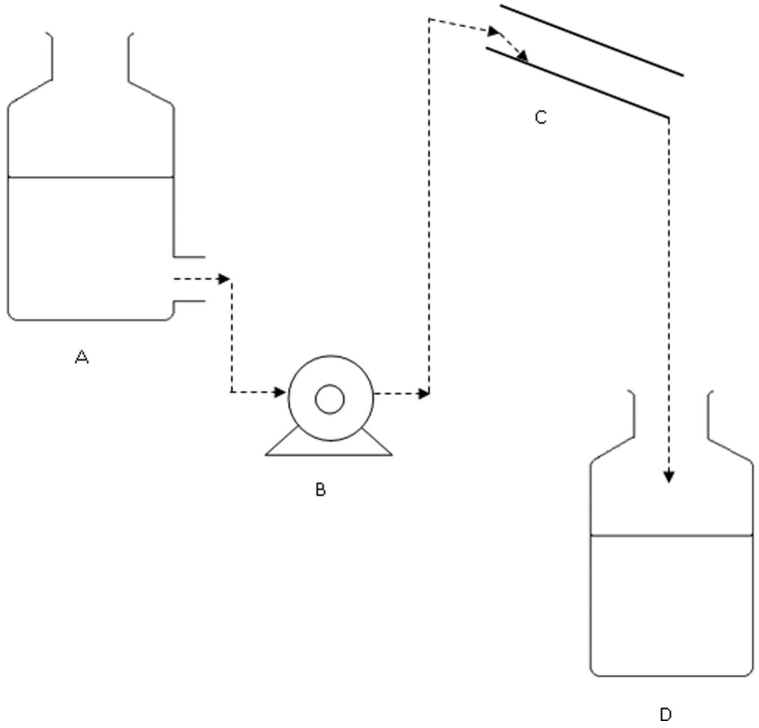
Sklopný mechanismus

Pohon kuželových ozubených kol

▼**M4**

Obrázek 2

Graf toku



A: zásobník

B: peristaltické čerpadlo

C: rotační trubka

D: zásobník na výtok

DEFINICE:

Zkoušená látka: jakákoliv látka nebo směs testovaná pomocí této zkušební metody.

Chemické látky: „Je třeba poznamenat, že pojem ‚chemická látka' je obecně užíván v dohodách UNCED i v navazujících dokumentech a zahrnuje látky, výrobky, směsi, přípravky nebo jakékoliv jiné termíny, které lze použít ve stávajících systémech pro označení pokrytí."

▼M6

C.11. ZKOUŠKA INHIBICE DÝCHÁNÍ AKTIVOVANÉHO KALU (OXIDACE UHLÍKU A AMONIA)

ÚVOD

1. Tato zkušební metoda je rovnocenná Pokynu OECD pro zkoušení 209 (2010). Tato zkušební metoda popisuje postup stanovení účinků chemické látky na mikroorganismy z aktivovaného kalu (většinou bakterie) měřením rychlosti jejich dýchání (oxidace uhlíku a/nebo amonia) za definovaných podmínek v přítomnosti různých koncentrací zkoušené chemické látky. Zkušební metoda vychází ze zkoušky ETAD (Ekologická a toxikologická asociace průmyslových výrobců barviv) (1, 2), z předchozího pokynu OECD pro zkoušení 209 (3) a z přepracované normy ISO 8192 (4). Účelem zkoušky je poskytnout rychlou screeningovou metodu posouzení účinků chemických látek na mikroorganismy aktivovaného kalu v biologickém (aerobním) stupni čistíren odpadních vod. Výsledky zkoušky mohou rovněž sloužit jako indikátor vhodných neinhibujících koncentrací zkoušených chemických látek pro použití ve zkouškách biologické rozložitelnosti (například kapitoly C.4 A-F, C.9, C.10, C12 a C.29 této přílohy, Pokyn OECD pro zkoušení 302C). V tomto případě se zkouška může provádět jako screeningový test, podobně jako orientační nebo limitní zkoušky (viz odstavec 39), přičemž se bere v úvahu pouze celková respirace. Avšak tuto informaci je třeba pečlivě zvážit u zkoušek snadné biologické rozložitelnosti (kapitoly C.4 A-F a C.29 této přílohy), u nichž je koncentrace inokula významně nižší než koncentrace používaná v této zkušební metodě. Absence inhibice v této respirační zkoušce samozřejmě nemá automaticky za následek podmínky nulové inhibice u zkoušek snadné biologické rozložitelnosti – kapitoly C.4 A-F nebo C.29 této přílohy.

2. Obecně se dá říci, že zkouška inhibice dýchání byla od té doby, co byla poprvé publikována, úspěšně aplikována, ovšem za určitých okolností byly uváděny nevěrohodné výsledky, např. (2, 4, 5). Respirační křivky v závislosti na koncentraci jsou někdy dvoufázové, grafy dávka-odezva byly zkreslené a hodnoty EC_{50} byly neočekávaně nízké (5). Zkoumání ukázala, že takové výsledky se získají, když se aktivovaný kal použitý ve zkoušce významně nitrifikuje a zkoušená chemická látka má větší účinek na oxidaci amonia než na obecnou heterotrofní oxidaci. Proto mohou být tyto nevěrohodné výsledky upřesněny provedením dodatečných zkoušek za použití specifického inhibitoru nitrifikace. Měřením rychlostí příjmu kyslíku za přítomnosti takového inhibitoru a ze jeho nepřítomnosti, např. N-allylthiomočoviny (ATU), je možné vypočítat odděleně celkovou, heterotrofní a nitrifikační rychlost příjmu kyslíku (4, 7, 8). Takto lze stanovit inhibiční účinky zkoušené chemické látky ve dvou procesech a je možné obvyklým způsobem vypočítat hodnoty EC_{50} jak pro oxidaci organického uhlíku (heterotrofní), tak pro oxidaci amonia (nitrifikační). Je třeba poznamenat, že v některých vzácných případech může být účinek inhibice N-allylthiomočoviny částečně nebo úplně neutralizován v důsledku komplexace se zkoušenými chemickými látkami nebo s látkami obohacujícími médium, např. ionty Cu^{++} (6). Ionty Cu^{++} jsou nepostradatelné pro bakterie rodu *Nitrosomonas*, ale ve vyšších koncentracích jsou toxické.

3. Potřeba nitrifikace v aerobním čištění odpadních vod jako nezbytného kroku v procesu odstranění dusíkatých sloučenin z odpadních vod cestou denitrifikace na plynné produkty se stala naléhavou zejména v evropských zemích; EU nyní stanovila nižší limity pro koncentrace dusíku ve vyčištěných odpadech vypouštěných do vodních toků ([1]).

([1]) Směrnice Rady 91/271/EHS ze dne 21. května 1991 o čištění městských odpadních vod. Úř. věst. L 135, 30.5.1991, s. 40.

▼M6

4. Ve většině případů je metoda hodnocení účinku pouze na procesy oxidace organicky vázaného uhlíku postačující. Avšak v některých případech jsou zkoumání účinku na samotnou nitrifikaci nebo jak na nitrifikaci, tak na oxidaci organického uhlíku odděleně potřebná pro interpretaci výsledků a pochopení účinků.

PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

5. Respirační rychlosti vzorků aktivovaného kalu vyživovaného syntetickými odpadními vodami se měří v uzavřené nádobě s kyslíkovou elektrodou po kontaktní době 3 hodin. Při uvážení realistického expozičního scénáře mohou být vhodné delší kontaktní časy. Jestliže se zkoušená chemická látka rychle rozkládá, např. abiotickou hydrolýzou, nebo je těkavá a její koncentraci nelze dostatečně udržovat, je možné dodatečně použít kratší expoziční dobu, např. 30 minut. Citlivost každé dávky aktivovaného kalu je třeba prověřit s vhodnou referenční chemickou látkou v den expozice. Zkouška se obvykle používá pro stanovení EC_x (např. EC_{50}) zkoušené chemické látky a/nebo koncentrace bez pozorovaných účinků (NOEC).

6. Inhibice příjmu kyslíku mikroorganismy oxidujícími organický uhlík může být vyjádřena odděleně od inhibice mikroorganismy oxidujícími amonium prostřednictím měření rychlostí příjmu kyslíku za nepřítomnosti a přítomnosti N-allylthiomočoviny, což je specifický inhibitor oxidace amonia na dusitan nitrifikačními bakteriemi v prvním stupni. V tomto případě se procentuální inhibice rychlosti příjmu kyslíku vypočítá porovnáním rychlosti příjmu kyslíku za přítomnosti zkoušené chemické látky se střední hodnotou rychlosti příjmu kyslíku odpovídajících kontrolních vzorků neobsahujících žádnou zkoušenou chemickou látku jak v přítomnosti, tak i v nepřítomnosti specifického inhibitoru N-allylthiomočoviny.

7. Jakýkoli příjem kyslíku pocházející z abiotických procesů se dá detekovat stanovením rychlosti ve směsích zkoušené chemické látky, média syntetických odpadních vod a vody, s vynecháním aktivovaného kalu.

INFORMACE O ZKOUŠENÉ CHEMICKÉ LÁTCE

8. Pro správnou interpretaci výsledků, která má být provedena, by měla být známa identifikace (nejlépe číslo CAS), název (IUPAC), čistota zkoušené chemické látky, její rozpustnost ve vodě, tlak par a adsorpční vlastnosti. Těkavé chemické látky se obvykle nemohou přiměřeně zkoušet, pokud se nepřijmou speciální opatření (viz odstavec 21).

POUŽITELNOST ZKUŠEBNÍ METODY

9. Zkušební metodu je možné použít na chemické látky rozpustné ve vodě, obtížně rozpustné a těkavé chemické látky. Avšak ne vždy je možné získat hodnoty EC_{50} pro chemické látky s omezenou rozpustností a platné výsledky s těkavými chemickými látkami je možné získat pouze za předpokladu, že větší část (řekněme > 80 %) zkoušené chemické látky zůstane v reakční směsi na konci doby expozice. V případě, že existuje jakákoli nejistota ohledně stability zkoušené chemické látky nebo její těkavosti, měly by být předloženy další podpůrné analytické údaje, aby se upřesnila EC_x koncentrace.

▼M6

REFERENČNÍ CHEMICKÉ LÁTKY

10. Referenční chemické látky se musí pravidelně zkoušet, aby se zajistilo, že zkušební metoda a podmínky jsou spolehlivé, a prověřila citlivost každé dávky aktivovaného kalu použité jako mikrobiální inokulum v den expozice. Chemická látka 3,5-dichlorfenol (3,5-DCP) je doporučena jako referenční inhibiční chemická látka, jelikož se jedná o známý inhibitor dýchání a používá se v různích druzích zkoušek inhibice/toxicity (4). Rovněž síran měďnatý pentahydrát se dá použít jako referenční chemická látka pro inhibici celkové respirace (9). N-methylanilin lze použít jako specifický referenční inhibitor nitrifikace (4).

KRITÉRIA PLATNOSTI A REPRODUKOVATELNOST

11. Rychlost příjmu kyslíku u slepých zkoušek (bez zkoušené chemické látky nebo referenční chemické látky) by neměla být nižší než 20 mg kyslíku na 1 g aktivovaného kalu (hmotnost sušiny suspendovaných pevných látek) za hodinu. Je-li rychlost nižší, je třeba zkoušku opakovat s vypraným aktivovaným kalem nebo s kalem z jiného zdroje. Variační koeficient rychlosti příjmu kyslíku v kontrolních opakovaných zkouškách by neměl být vyšší než 30 % na konci hlavní zkoušky.

12. Při mezinárodním okružním testu organizovaném ISO v roce 2004 (4) za použití aktivovaného kalu získaného z domácích odpadních vod bylo zjištěno, že EC_{50} 3,5-DCP leží v rozsahu 2 mg/l až 25 mg/l pro celkovou respiraci, 5 mg/l až 40 mg/l pro heterotrofní respiraci a 0,1 mg/l až 10 mg/l pro nitrifikační respiraci. V případě, že EC_{50} 3,5-DCP neleží v očekávaném rozsahu, je třeba zkoušku opakovat s aktivovaným kalem z jiného zdroje. EC_{50} pentahydrátu síranu měďnatého by měl spadat do rozsahu 53–155 mg/l pro celkovou respiraci (9).

POPIS ZKUŠEBNÍ METODY

Zkušební nádoby a přístroje

13. Použije se běžné laboratorní vybavení a následující pomůcky:

a) zkušební nádoby – například 1 000ml kádinky, které pojmou 500 ml reakční směsi (viz 5 na Obr.1);

b) kyveta a úchyty pro měření koncentrace rozpuštěného kyslíku; vhodná kyslíková elektroda; uzavřená kyveta obsahující vzorek bez volného prostoru pod víčkem a zapisovač (např. 7, 8, 9 na obr. 1 v dodatku 2); další možností je použít BSK láhev s vhodnou redukční objímkou pro utěsnění kyslíkové elektrody v hrdle lahve (viz obr. 2 v dodatku 3). Aby se předešlo ztrátám vytlačené kapaliny po vložení kyslíkové elektrody, doporučuje se nejdříve skrz objímku vložit nálevku nebo skleněnou trubičku nebo použít nádoby s rozšířenými okraji. V obou případech se použije magnetická míchačka nebo jiný způsob míchání, např. samomíchací sonda;

c) magnetické míchačky s míchacími tyčinkami pokrytými inertním materiálem pro použití v měřicí komoře a/nebo ve zkušební nádobě;

d) provzdušňovací zařízení: v případě potřeby je nutné, aby stlačený vzduch procházel skrz vhodný filtr pro odstranění prachu a oleje a skrz promývací lahve obsahující vodu pro zvlhčení vzduchu. Obsah nádob se musí provzdušňovat pomocí Pasteurových pipet nebo jiných

▼M6

provzdušňovacích zařízení, která neadsorbují chemické látky. Rotační třepačka pracující při rychlostech rotace od 150 do 250 ot/min s baňkami o objemu např. 2 000 ml se může použít pro pokrytí spotřeby kyslíku kalem a překonání obtíží s chemickými látkami, které jsou mimořádně pěnivé, těkavé, a proto se ztrácejí, nebo se při provzdušňování proudem vzduchu dají obtížně dispergovat. Zkušební systém se obvykle skládá z řady kádinek nepřetržitě provzdušňovaných a uspořádaných do posloupnosti (např. v cca 10–15minutových intervalech) a poté postupně analyzovaných. Rovněž je možné použít validované přístrojové vybavení, které umožňuje souběžné provzdušňování a měření rychlosti spotřeby kyslíku ve směsích;

e) pH-metr;

f) odstředivka, běžná stolní odstředivka pro kal, která je schopna dosáhnout odstředivého zrychlení 10 000 m/s^2.

Činidla

14. Při zkouškách se musí zásadně používat činidla analytické čistoty.

Voda

15. Musí se použít destilovaná nebo deionizovaná voda obsahující méně než 1 mg/l DOC (rozpuštěný organický uhlík) s výjimkou případů, kdy je předepsána voda z vodovodu bez chlóru.

Syntetická odpadní voda

16. Médium se musí připravit tak, aby obsahovalo následující složky v uvedených množstvích:

— pepton	16 g
— masový extrakt (nebo srovnatelný rostlinný extrakt)	11 g
— močovina	3 g
— chlorid sodný (NaCl)	0,7 g
— chlorid vápenatý dihydrát ($CaC1_2 \cdot 2H_2O$)	0,4 g
— síran hořečnatý heptahydrát ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	0,2 g
— bezvodý hydrogenfosforečnan draselný (K_2HPO_4)	2,8g
— destilovaná nebo deionizovaná voda do 1 litru	

17. pH tohoto roztoku by mělo být 7,5 ± 0,5. Jestliže se připravené médium nepoužije ihned, musí se skladovat v temnu při 0–4 °C po dobu maximálně 1 týdne nebo za podmínek, kdy se nemění jeho složení. Je třeba poznamenat, že tato syntetická odpadní voda má 100násobnou koncentraci oproti vodě popsané v technické zprávě OECD „Návrh metody stanovení biologické rozložitelnosti povrchově aktivních látek používaných v syntetických detergentech“ (11. června 1976), s přídavkem hydrogenfosforečnanu draselného.

▼M6

18. Alternativně se mohou složky média sterilizovat jednotlivě před skladováním nebo se krátce před provedením zkoušky může přidat pepton a masový extrakt. Před použitím se musí médium důkladně promíchat a je-li třeba, pH upravit na 7,5 ± 0,5.

Zkoušená chemická látka

19. Zásobní roztok se musí připravit pro zkoušené látky snadno rozpustné ve vodě až do maximální rozpustnosti ve vodě (nesmí dojít k vysrážení). Látky špatně rozpustné ve vodě, směsi se složkami o rozdílné rozpustnosti ve vodě a adsorbující se látky se musí navážit přímo do zkušebních nádob. V těchto případech je možné použít zásobní roztoky, jestliže koncentrace rozpuštěných zkoušených chemických látek jsou analyticky stanoveny ve zkušebních nádobách (před přidáním aktivovaného kalu). Jestliže se připravují upravené frakce WAF, je rovněž důležité provést analytické stanovení koncentrací rozpuštěných zkoušených chemických látek ve zkušebních nádobách. Použití organických rozpouštědel, dispergátorů/emulgátorů ke zlepšení rozpustnosti je nepřípustné. Zpracování zásobních roztoků ultrazvukem a předmícháním suspenzí, např. přes noc, je možné, jestliže jsou k dispozici adekvátní informace ohledně stability zkoušené chemické látky za takovýchto podmínek.

20. Zkoušená chemická látka může negativně ovlivnit pH zkušebního systému. Hodnota pH zkoušených chemicky zpracovaných směsí se musí stanovit před sestavením zkoušky v předběžném pokusu, aby se zjistilo, zda bude třeba úprava pH před hlavní zkouškou a znovu v den hlavní zkoušky. Před přidáním inokula je třeba roztoky/suspenze zkoušené chemické látky ve vodě podle potřeby neutralizovat. Protože ale neutralizace může pozměnit chemické vlastnosti chemické látky, mohou být v závislosti na účelu studie provedeny další zkoušky, aby se vyhodnotil účinek zkoušené chemické látky na kal bez úpravy pH.

21. Toxické účinky těkavých chemických látek, zejména u zkoušek, při kterých vzduch probublává skrz systém, mohou vyústit do různých úrovní působení v důsledku ztrát látky během expozice. Při práci s takovými látkami je třeba postupovat obezřetně a provádět látkově specifickou analýzu kontrolních směsí obsahujících danou látku a měnit režim provzdušňování.

Referenční chemické látky

22. Je-li 3,5-dichlorfenol použit jako referenční chemická látka, je třeba připravit roztok 1,00 g 3,5-dichlorfenolu v 1 000 ml vody (15). Pro urychlení rozpouštění je třeba použít teplou vodu a/nebo tzv. ultrazvukovou lázeň. Po ochlazení na laboratorní teplotu se roztok doplní na daný objem. Je však třeba zajistit, aby referenční chemická látka nedoznala strukturních změn. pH roztoku se musí kontrolovat a podle potřeby upravit použitím NaOH nebo H_2SO_4 na pH 7–8.

23. Jestliže se jako referenční chemická látka použije síran měďnatý pentahydrát, použijí se koncentrace 58 mg/l, 100 mg/l a 180 mg/l (faktor 1,8). Látka se naváží přímo do zkušebních nádob (29 – 50 – 90 mg na celkový objem 500 ml). Pak se rozpustí v 234 ml vody z vodovodu upravené v autoklávu. Síran měďnatý pentahydrát je snadno rozpustný. Na začátku zkoušky se přidá 16 ml syntetické odpadní vody a 250 ml aktivovaného kalu.

▼M6

Specifický inhibitor nitrifikace

24. Připraví se zásobní roztok 2,32 g/l N-allylthiomočoviny (ATU). 2,5 ml tohoto zásobního roztoku se přidá do inkubační směsi o konečném objemu 500 ml, čímž se dosáhne konečné koncentrace 11,6 mg ATU/l (10^{-4} mol/l), která je, jak známo (4), dostatečná, aby způsobila 100 % inhibici nitrifikace v nitrifikujícím aktivovaném kalu, který obsahuje 1,5 g/l suspendovaných pevných látek.

Abiotický kontrolní vzorek

25. Za určitých vzácných podmínek může zkoušená chemická látka se silnými redukčními vlastnostmi způsobit měřitelnou spotřebu kyslíku při abiotickém rozkladu. V takových případech jsou nezbytné abiotické kontroly, aby se dalo rozlišit mezi příjmem kyslíku zkoušenou chemickou látkou způsobeným abiotickým rozkladem a mikrobiálním dýcháním. Abiotický kontrolní vzorek je možné připravit vynecháním inokula ze zkušebních směsí. Podobně je možné zařadit abiotické kontroly bez inokula, když se provedou podpůrná analytická měření pro stanovení dosažené koncentrace během expoziční fáze zkoušky, např. když se použijí zásobní roztoky chemických látek špatně rozpustných ve vodě se složkami o rozdílné rozpustnosti ve vodě. Ve speciálních případech může být zapotřebí připravit abiotickou kontrolu se sterilizovaným inokulem (např. v autoklávu nebo přidáním sterilizačních toxických látek). Některé chemické látky mohou produkovat nebo spotřebovávat kyslík, pouze je-li povrch dostatečně velký pro reakci, i když obvykle k tomu potřebují daleko vyšší teplotu nebo tlak. V tomto ohledu je třeba věnovat speciální pozornost látkám s peroxy skupinou. Sterilizované inokulum poskytuje veliký povrch.

Inokulum

26. Pro obecné použití je třeba shromáždit aktivovaný kal na výstupu z provzdušňovací nádrže nebo v blízkosti výstupu z nádrže dobře provozované čistírny odpadních vod, do které přicházejí především odpadní vody z domácností. V závislosti na účelu zkoušky lze rovněž použít jiné postačující druhy nebo zdroje aktivovaného kalu, např. kal vypěstovaný v laboratoři, a to s vhodnými koncentracemi suspendovaných pevných látek ve výši 2 g/l až 4 g/l. Avšak kaly z rozdílných čistíren odpadních vod často vykazují rozdílné charakteristiky a citlivosti.

27. Kal se dá použít tak, jak je sebrán, ale hrubé částice se musí odstranit usazením po krátkou dobu, např. 5 až 15 minut, a dekantací horní vrstvy jemnějších pevných částic nebo prosetím (např. přes síto s otvory o ploše 1 mm^2). Alternativně je možné kal homogenizovat mísením po dobu cca 15 s nebo delší, ale pozornost je třeba věnovat třecím silám a teplotním změnám, které se mohou vyskytnout při dlouhodobém mísení.

28. Často je nezbytné kal promýt, např. je-li rychlost endogenní respirace nízká. Kal je nejdříve třeba odstřeďovat po určitou dobu, aby se získal čirý supernatant a granule pevných částic odpadních vod, např. 10 minut při odstředivém zrychlení cca 10 000 m/s^2. Kapalný supernatant se slije a kal se resuspenduje v nechlórované vodě z vodovodu, protřepe a promývací voda se pak odstraní opětovným odstředěním a slitím. Proces promývání a odstřeďování se musí podle potřeby opakovat. Stanoví se hmotnost sušiny o známém objemu resuspendovaného kalu a kal se zkoncentruje odstraněním kapaliny nebo dále zředí v bezchlórové vodě z vodovodu, aby se získal kal s požadovanou koncentrací pevných částic 3 g/l. Aktivovaný kal se musí nepřetržitě provzdušňovat (např. 2 l/min) při zkušební teplotě, a je-li to možné, použít v den odebrání. Není-li to možné, musí se do kalu denně

▼M6

přidávat syntetická odpadní voda (přívod 50 ml syntetické odpadní vody na litr aktivovaného kalu) po dva další dny. Kal se pak použije ve zkoušce a výsledky jsou přijaty jako platné za předpokladu, že se nevyskytnou žádné významné změny v jeho aktivitě, zjištěné stanovením jeho rychlosti endogenní heterotrofní respirace a nitrifikační respirace.

29. Potíže mohou nastat, jestliže se během inkubace vyskytne pěnění takového rozsahu, že jsou pěna a na ní zachycené pevné částice kalu vypuzovány z provzdušňovacích nádob. Občas může být pěnění jednoduše následkem přítomnosti syntetické odpadní vody, ale pěnění se dá očekávat, je-li zkoušená chemická látka surfaktant nebo ho obsahuje. Ztráta pevných částic kalu ze zkušebních směsí bude mít za následek uměle sníženou respirační rychlost, která může být chybně interpretována jako důsledek inhibice. Kromě toho se provzdušňováním roztoku surfaktantu surfaktant zkoncentruje ve vrstvě pěny; ztrátou pěny ze zkušebního systému se sníží expoziční koncentrace. Pěnění se dá regulovat jednoduchými mechanickými metodami (např. občasným ručním zamícháním za použití skleněné tyčinky) nebo přidáním silikonového emulgačního odpěňovacího činidla neobsahujícího surfaktant a/nebo použitím metody provzdušňování v třepací lahvi. Je-li problém spojen s přítomností syntetické odpadní vody, je třeba složení odpadní vody upravit přidáním odpěňovacího činidla rychlostí např. 50 µl/l. Je-li pěnění způsobeno zkoušenou chemickou látkou, musí se množství potřebné k potlačení stanovit při maximální zkoušené koncentraci a pak je třeba stejným způsobem ošetřit všechny jednotlivé provzdušňovací nádoby (včetně např. nádob se slepými a referenčními vzorky, ve kterých se pěna nevyskytuje). Jestliže se používají odpěňovací činidla, nesmí dojít k žádné interakci s inokulem a/nebo zkoušenou chemickou látkou.

POSTUP ZKOUŠKY

30. Je možné stanovit inhibici tří rozdílných příjmů kyslíku, celkového, pouze heterotrofního a pocházejícího z nitrifikace. Obvykle by mělo stačit měření celkové inhibice příjmu kyslíku. Stanovení účinků na heterotrofní příjem kyslíku spojený s oxidací organického uhlíku a v důsledku oxidace amonia je nutné tehdy, jsou-li požadovány konkrétně tyto dva oddělené koncové ukazatele pro příslušnou chemickou látku nebo (volitelně) za účelem vysvětlení atypických křivek dávka-odezva z inhibice celkového příjmu kyslíku.

Zkušební podmínky

31. Zkoušku je třeba provádět při teplotě v rozsahu 20 ± 2 °C.

Zkoušené směsi

32. Zkoušené směsi (F_T jako v tabulce 1) obsahující vodu, syntetickou odpadní vodu a zkoušenou chemickou látku se připraví tak, aby se získaly rozdílné nominální koncentrace zkoušené chemické látky (viz tabulka 1 – příklad objemů složek). pH se podle potřeby nastaví na 7,5 ± 0,5; směsi se zředí vodou a přidá se inokulum, čímž se dosáhne stejných konečných objemů v nádobách a začne provzdušňování.

Referenční směsi

33. Referenční směsi (F_R) se připraví stejným způsobem jako zkoušené směsi, přičemž se referenční chemická látka, např. 3,5-dichlorfenol, použije namísto zkoušené chemické látky.

▼M6

Slepé vzorky

34. Slepé směsi (F_B) se připraví na začátku a na konci doby expozice při zkouškách, ve kterých jsou zkušební kádinky uspořádány postupně v intervalech. Ve zkouškách prováděných s vybavením, které umožňuje simultánní měření spotřeby kyslíku, je třeba zahrnout do každé dávky pro simultánní analýzu alespoň dva slepé vzorky. Slepé vzorky obsahují stejné objemy aktivovaného kalu a syntetického média, ale žádnou zkušební chemickou látku nebo referenční chemickou látku. Tyto vzorky se zředí vodou na stejný objem jako zkoušené a referenční směsi.

Abiotický kontrolní vzorek

35. Je-li to nezbytné, například je-li o zkoušené chemické látce známo nebo u ní existuje podezření, že má silné redukční vlastnosti, je třeba připravit směs F_A pro měření abiotické spotřeby kyslíku. Směs musí obsahovat stejné množství zkoušené chemické látky i syntetické odpadní vody a musí mít stejný objem jako zkoušené směsi, ale neobsahuje aktivovaný kal.

Obecný postup a měření

36. Zkoušené směsi, referenční směsi a slepé vzorky a abiotické kontrolní vzorky se inkubují při zkušební teplotě za podmínek nuceného provzdušňování (0,5 až 1 l/min), aby se koncentrace rozpuštěného kyslíku udržovala nad hranicí 60–70 % saturace a aby se vločky kalu udržely v suspenzi. Rovněž je nezbytné kultury míchat, aby se vločky kalu udržely v suspenzi. Za začátek inkubace se považuje počáteční kontakt inokula aktivovaného kalu s ostatními složkami konečné směsi. Na konci inkubace, po dané expoziční době obvykle 3 hodin, se vzorky vyjmou pro změření rychlosti poklesu koncentrace rozpuštěného kyslíku v kyvetě konstruované pro tento účel (obr. 2 v dodatku 3) nebo ve zcela naplněné BSK láhvi. Způsob zahájení inkubací rovněž závisí na možnostech zařízení použitého k měření rychlostí spotřeby kyslíku. Například jestliže zařízení obsahuje jedinou kyslíkovou sondu, provádějí se měření jednotlivě. V tomto případě se musí připravit různé směsi potřebné pro zkoušku se syntetickou odpadní vodou, ale inokulum se nepoužije a předepsané dávky kalu se přidají do každé nádoby série. Jednotlivé inkubace je třeba zahájit postupně, ve vhodných časových intervalech, např. 10 až 15 minut. Alternativně může měřicí systém zahrnovat řadu sond, které umožňují mnohočetná simultánní měření; v tomto případě se může inokulum přidat současně do příslušných skupin nádob.

37. Koncentrace aktivovaného kalu ve všech zkoušených, referenčních a slepých (ale ne abiotických kontrolních) směsích je nominálně 1,5 g/l suspendovaných pevných látek. Spotřeba kyslíku se měří po 3 hodinách expozice. Další měření expozice po 30 minutách se provádí podle potřeby postupem dříve popsaným v odstavci 5.

Nitrifikační potenciál kalu

38. Aby se rozhodlo, zda kal nitrifikuje, a jestliže ano, tak jakou rychlostí, připraví se směsi (F_B) jako ve slepých a dalších „kontrolních“ směsích (F_N), které však rovněž obsahují N-allylthiomočovinu v koncentraci 11,6 mg/l. Směsi je třeba

▼M6

provzdušňovat a inkubovat při 20° ± 2 °C po dobu 3 hodin. Pak se změří rychlosti příjmu kyslíku a vypočítá se rychlost příjmu kyslíku v důsledku nitrifikace.

Uspořádání zkoušky

Orientační zkouška

39. Podle potřeby se používá předběžná zkouška pro odhad rozsahu koncentrací zkoušené chemické látky potřebného v hlavní zkoušce stanovení inhibice spotřeby kyslíku. Alternativně může absence inhibice spotřeby kyslíku zkoušenou chemickou látkou v předběžné zkoušce ukazovat, že hlavní zkouška není nezbytná, ale je třeba zařadit trojmo opakovanou zkoušku při nejvyšší zkoušené koncentraci v předběžné zkoušce (obvykle 1 000 mg/l, ale v závislosti na požadavcích na data).

Tabulka 1

Příklady směsí pro předběžnou zkoušku

Činidlo	Původní koncentrace				
Zásobní roztok zkoušené chemické látky	10 g/l				
Zásobní roztok syntetického média	viz odstavec 16				
Zásobní suspenze aktivovaného kalu	3 g/l suspendovaných pevných látek				
Složky směsí	Dávkování do zkušebních nádob [a]				
	F_{T1}	F_{T2}	F_{T3-5}	F_{B1-2}	F_A
Zásobní roztok zkoušené chemické látky (ml) (odstavce 19 až 21)	0,5	5	50	0	50
Zásobní roztok syntetické odpadní vody (ml) (odstavec 16)	16	16	16	16	16
Suspenze aktivovaného kalu (ml) (odstavce 26 až 29)	250	250	250	250	0
Voda (odstavec 15)	233,5	229	184	234	434
Celkový objem směsí (ml)	500	500	500	500	500
Koncentrace ve směsi					
Zkušební suspenze (mg/l) Aktivovaný kal	10	10	1 000	0	1 000
(suspendované pevné látky) (mg/l)	1 500	1 500	1 500	1 500	0

[a] Stejný postup se dodržuje u referenční chemické látky, do baněk F_{R1-3}

40. Zkouška se provádí použitím alespoň tří koncentrací zkoušené chemické látky, například 10 mg/l, 100 mg/l a 1 000 mg/l, se slepým vzorkem a podle potřeby alespoň se třemi abiotickými kontrolními vzorky s nejvyššími koncentracemi zkoušené chemické látky (viz jako příklad tabulku 1). V ideálním případě by nejnižší koncentrace neměla mít žádný vliv na

▼M6

spotřebu kyslíku. Je-li to náležité, vypočítá se rychlost příjmu kyslíku a rychlost nitrifikace; pak se vypočítá procentuální inhibice. V závislosti na účelu zkoušky je rovněž možné jednoduše stanovit toxicitu koncentračního limitu, např. 1 000 mg/l. Jestliže se při této koncentraci neprojeví žádný statisticky významný toxický účinek, není další zkoušení při vyšších nebo nižších koncentracích nezbytné. Nutno poznamenat, že látky obtížně rozpustné ve vodě, směsi se složkami o rozdílné rozpustnosti ve vodě a adsorbenty je třeba navážit přímo do zkušebních nádob. V tomto případě se objem rezervovaný pro zásobní roztok zkoušené látky nahradí zřeďovací vodou.

Hlavní zkouška

Inhibice celkového příjmu kyslíku

41. Zkouška se provádí použitím rozsahu koncentrací zjištěných předběžnou zkouškou. Aby se získaly hodnoty jak NOEC tak EC_x (např. EC_{50}), doporučuje se ve většině případů šest kontrolních a pět exponovaných koncentrací v geometrické posloupnosti s pěti opakovanými vzorky. Zkouška s abiotickým kontrolním vzorkem se nemusí opakovat, jestliže v předběžné zkoušce nebyl zjištěn žádný příjem kyslíku. Jestliže se však významný příjem vyskytne, je třeba abiotické kontroly provést pro každou koncentraci zkoušené chemické látky. Citlivost kalu se musí prověřovat použitím referenční chemické látky, 3,5-dichlorfenolu. Citlivost kalu se musí prověřovat pro každou sérii zkoušek, neboť o citlivosti je známo, že kolísá. Ve všech případech se pro měření rychlosti příjmu kyslíku v kyvetě s kyslíkovou elektrodou vzorky odeberou ze zkušebních nádob po 3 hodinách a podle potřeby po dalších 30 minutách. Ze shromážděných údajů se vypočítají specifické respirační rychlosti kontrolních a zkoušených směsí; procentuální inhibice se pak vypočítá z rovnice 7 níže.

Rozlišení mezi inhibicí heterotrofní respirace a nitrifikace

42. Použití specifického inhibitoru nitrifikace ATU umožňuje přímé hodnocení inhibičních účinků zkoušené chemické látky na heterotrofní oxidaci; odečtením rychlosti příjmu kyslíku v přítomnosti ATU od celkové rychlosti příjmu (bez ATU) se dá vypočítat vliv na rychlost nitrifikace. Připraví se dva soubory reakčních směsí podle upořádání zkoušky pro EC_x nebo NOEC podle popisu v odstavci 41, ale navíc se ATU přidá do každé směsi jednoho souboru v konečné koncentraci 11,6 mg/l, která jak známo úplně inhibuje nitrifikaci v kalu s koncentracemi suspendovaných pevných látek do 3 000 mg/l (4). Rychlosti příjmu kyslíku se měří po expoziční době; tyto přímé hodnoty představují pouze heterotrofní respiraci a rozdíly mezi nimi a odpovídajícími rychlostmi celkové respirace představují nitrifikaci. Pak se vypočítají různé stupně inhibice.

Měření

43. Po dané době expozice se vzorek z první provzdušňovací nádoby přemístí do kyvety s kyslíkovou elektrodou (obr. 1 v dodatku 2) a ihned se změří koncentrace rozpuštěného kyslíku. Jestliže je k dispozici systém s více elektrodami, pak se měření může provádět simultánně. Míchání (použitím magnetu s krytem) je zásadní při stejné rychlosti, jaká se použila při kalibraci elektrody, aby se zajistilo, že sonda bude reagovat s minimálním zpožděním na měnící se koncentrace kyslíku a že bude umožněno pravidelné a reprodukovatelné měření kyslíku v měřicí nádobě. Obvykle postačí systém se samomíchací sondou užívaný s některými kyslíkovými elektrodami. Mezi měřeními se kyveta vypláchne vodou. Alternativně se může vzorek použít pro naplnění BSK lahve (obr. 2 v dodatku 3) vybavené magnetickou míchačkou. Do hrdla lahve se pak vloží kyslíková sonda

▼M6

s redukční objímkou a spustí se magnetická míchačka. V obou případech se koncentrace rozpuštěného kyslíku kontinuálně měří a zaznamenává v určitých intervalech, obvykle 5 až 10 minut, nebo dokud koncentrace kyslíku neklesne pod 2 mg/l. Elektroda se vyjme, směs se vrátí do provzdušňovací nádoby a provzdušňování a míchání pokračuje, jestliže je měření po delší expozici nezbytné.

Ověření koncentrace zkoušené chemické látky

44. Pro některé účely se může ukázat nezbytné měřit koncentraci zkoušené chemické látky ve zkušebních nádobách. Je třeba vzít na vědomí, že používají-li se zásobní roztoky:

— látek obtížně rozpustných ve vodě,

— směsí se složkami s rozdílnou rozpustností ve vodě, nebo

— látek s dobrou rozpustností ve vodě, ale o koncentraci zásobního roztoku blízké maximální rozpustnosti ve vodě,

není rozpuštěná frakce známá, a tudíž není známá skutečná koncentrace zkoušené chemické látky převáděné do zkušebních nádob. Pro charakterizaci expozice je nezbytné analyticky odhadnout koncentrace zkoušené chemické látky ve zkušebních nádobách. Situace se zjednoduší, když se analytický odhad provede před přidáním inokula. Vzhledem ke skutečnosti, že do zkušebních nádob budou převedeny pouze rozpuštěné frakce, mohou být měřené koncentrace velmi nízké.

45. Aby se předešlo časově a finančně náročným analýzám, doporučuje se jednoduše navážit zkoušenou chemickou látku přímo do zkušebních nádob a následné výpočty vztahovat k počáteční navážené nominální koncentraci. Rozlišení mezi rozpuštěnou, nerozpuštěnou nebo adsorbovanou frakcí zkoušené chemické látky není nutné, protože všechny tyto frakce se stejně v reálných podmínkách vyskytují v čistírnách odpadních vod a tyto frakce se mohou měnit v závislosti na složení odpadních vod. Cílem zkušební metody je odhadnout neinhibiční koncentraci reálně a není účelné zkoumat detailně, které frakce přispívají k inhibici organismů aktivovaného kalu. Také adsorptivní látky by se měly navážit přímo do zkušebních nádob a nádoby by se měly silanizovat, aby se minimalizovaly ztráty v důsledku adsorpce.

ÚDAJE A PŘEDKLÁDÁNÍ ZPRÁV

Výpočet rychlostí příjmu kyslíku

46. Rychlosti příjmu kyslíku se vypočítají ze středních hodnot naměřených hodnot, např. z lineární části grafů závislosti koncentrace kyslíku na čase, které omezují výpočty na koncentrace kyslíku mezi 2,0 mg/l a 7,0 mg/l, jelikož vyšší a nižší koncentrace mohou samy o sobě ovlivnit rychlosti spotřeby. Práce s koncentracemi v pásmu pod nebo nad těmito hodnotami jsou občas nevyhnutelné a nezbytné, například jestliže je respirace silně potlačena a v důsledku toho velmi pomalá nebo jestliže respirace příslušného aktivovaného kalu velmi rychlá. To je akceptovatelné za předpokladu, že i tato rozšíření příjmového grafu jsou lineární a jejich směrnice se

▼**M6**

nemění při přechodu přes hranici 2,0 mg/l nebo 7,0 mg/l O_2. Jakékoli zakřivené sekce grafu naznačují, že se měřicí systém stabilizuje nebo že se rychlost příjmu mění, a neměly by se používat pro výpočet respiračních rychlostí. Rychlost příjmu kyslíku se vyjádří v miligramech na litr a hodinu (mg/l.h) nebo v miligramech na gram suchého kalu a hodinu (mg/g.h). Rychlost spotřeby kyslíku R v mg/l.h lze vypočítat nebo interpolovat z přímkové části zaznamenaného grafu poklesu kyslíku podle rovnice 1:

$$R = (Q_1 - Q_2)/\Delta_t \times 60 \qquad (1)$$

kde:

Q_1 je koncentrace kyslíku na začátku zvoleného intervalu lineární fáze (mg/l);

Q_2 je koncentrace kyslíku na konci zvoleného intervalu lineární fáze (mg/l);

Δ_t je časový interval mezi těmito dvěma měřeními (min.).

47. Specifická respirační rychlost (R_s) se vyjadřuje jako množství spotřebovaného kyslíku na gram sušiny kalu za hodinu (mg/g.h) podle rovnice 2:

$$R_s = R/SS \qquad (2)$$

kde SS je koncentrace suspendovaných pevných látek ve zkoušené směsi (g/l).

48. Rozdílné indexy R, které se mohou kombinovat, jsou:

S specifická rychlost

T celková respirační rychlost

N rychlost v důsledku nitrifikační respirace

H rychlost v důsledku heterotrofní respirace

A rychlost v důsledku abiotických procesů

B rychlost na základě analýzy slepých zkoušek (střední hodnota)

Výpočet rychlosti příjmu kyslíku v důsledku nitrifikace

49. Vztah mezi celkovou respirací (R_T), nitrifikační respirací (R_N) a heterotrofní respirací (R_H) je dán rovnicí 3:

$$R_N = R_T - R_H \qquad (3)$$

kde:

R_N je rychlost příjmu kyslíku v důsledku nitrifikace (mg/l.h);

R_T je měřená rychlost příjmu kyslíku při slepé zkoušce (bez ATU; F_B) (mg/l.h).

R_H je měřená rychlost příjmu kyslíku při slepé zkoušce s přídavkem ATU (F_N) (mg/l.h).

▼M6

50. Tento vztah je platný pro hodnoty slepých zkoušek (R_{NB}, R_{TB}, R_{HB}), abiotické kontrolní vzorky (R_{NA}, R_{TA}, R_{HA}) a zkoušky se zkoušenou chemickou látkou (R_{NS}, R_{TS}, R_{HS}) (mg/g.h). Specifické respirační rychlosti se vypočítají z:

$$R_{NS} = R_N/SS \quad (4)$$

$$R_{TS} = R_T/SS \quad (5)$$

$$R_{HS} = R_H/SS \quad (6)$$

51. Jestliže R_N je nevýznamné (např. < 5 % R_T ve slepých zkouškách) v předběžné zkoušce, dá se předpokládat, že heterotrofní příjem kyslíku bude roven celkovému příjmu a že nedochází k žádné nitrifikaci. Alternativní zdroj aktivovaného kalu by byl potřebný, jestliže by se při zkouškách braly v úvahu účinky na heterotrofní a nitrifikační mikroorganismy. Hlavní zkouška se provádí, jestliže existuje důkaz o potlačených rychlostech příjmu kyslíku s rozdílnými koncentracemi zkoušené chemické látky.

Výpočet procentuální inhibice

52. Procentuální inhibice I_T celkové spotřeby kyslíku při každé koncentraci zkoušené chemické látky je dána rovnicí 7:

$$I_T = [1 - (R_T - R_{TA})/R_{TB}] \times 100\ \% \quad (7)$$

53. Podobně je procentuální inhibice heterotrofního příjmu kyslíku I_H při každé koncentraci zkoušené chemické látky dána rovnicí 8:

$$I_H = [1 - (R_H - R_{HA})/R_{HB}] \times 100\ \% \quad (8)$$

54. A konečně inhibice příjmu kyslíku způsobená nitrifikací I_N při každé koncentraci je dána rovnicí 9:

$$I_N = [1 - (R_T - R_H)/(R_{TB} - R_{HB})] \times 100\ \% \quad (9)$$

55. Procentuální inhibice příjmu kyslíku se vynese proti logaritmu koncentrace zkoušené chemické látky (inhibiční křivka, viz obr. 3 v dodatku 4). Inhibiční křivky se vynesou pro každý tříhodinový interval provzdušňování nebo navíc po 30 min. Koncentrace zkoušené chemické látky, která inhibuje příjem kyslíku z 50 % (EC_{50}), se vypočítá nebo interpoluje z grafu. Jestliže jsou k dispozici vhodná data, mohou se vypočítat nebo interpolovat 95 % meze spolehlivosti $EC_{50,}$ směrnice křivky, vhodné hodnoty označující začátek inhibice (například EC_{10} nebo EC_{20}) a konec rozsahu inhibice (například EC_{80} nebo EC_{90}).

56. Je třeba poznamenat, že s ohledem na variabilitu často pozorovanou ve výsledcích může být v mnoha případech postačující vyjádřit výsledky dodatečně v řádech, například:

EC_{50} < 1 mg/l

EC_{50} 1 mg/l až 10 mg/l

EC_{50} 10 mg/l až 100 mg/l

EC_{50} > 100mg/l

Interpretace výsledků

EC_x

▼M6

57. Hodnoty EC_x, včetně s nimi spojené dolní a horní 95 % meze spolehlivosti pro parametr, se vypočítají použitím vhodných statistických metod (např. probit analýzou, logistickou nebo Weibullovou funkcí, upravenou Spearman-Karberovou metodou nebo jednoduchou interpolací (11)). EC_x se získá zadáním hodnoty odpovídající x % střední hodnoty kontroly do zjištěné rovnice. Při výpočtu EC_{50} nebo jakékoli další EC_x se střední hodnoty pro danou expozici (x) podrobí regresní analýze.

Odhad NOEC

58. Jestliže se ke stanovení NOEC má použít statistická analýza, je třeba mít statistické hodnoty pro každou nádobu (jednotlivé nádoby se považují za opakované pokusy). Poté se použijí vhodné statistické metody podle dokumentu OECD „Současné přístupy ke statistické analýze dat týkajících se ekotoxicity: pokyny pro aplikaci“ (11). Obecně se nepříznivé účinky zkoušené chemické látky ve srovnání s kontrolou zkoumají použitím jednostranného (menšího) testu statistické hypotézy na $p \leq 0{,}05$.

Závěrečná zpráva

59. Závěrečná zpráva musí obsahovat následující informace:

Zkoušená chemická látka

— obecný název, chemický název, číslo CAS, čistota,

— fyzikálně-chemické vlastnosti zkoušené chemické látky (např. log K_{ow}, rozpustnost ve vodě, tlak par, Henryho konstanta (H) a případné informace o osudu zkoušené chemické látky, např. adsorpce na aktivovaném kalu).

Zkušební systém

— zdroj, podmínky provozu čistírny odpadních vod a vstupujících přítoky, koncentrace, předběžné zpracování a uchovávání aktivovaného kalu.

Zkušební podmínky

— zkušební teplota, pH během zkoušky a trvání fáze(í) expozice.

Výsledky

— specifická spotřeba kyslíku v kontrolách (mg O_2/(g kalu × h),

— všechna naměřená data, inhibiční křivka(y) a metoda výpočtu, EC_{50},

— EC_{50} a pokud možno 95 % meze spolehlivosti, případně EC_{20}, EC_{80}, případně NOEC a použité statistické metody, jestliže EC_{50} nemůže být stanoveno,

— výsledky pro celkovou a v případě potřeby i heterotrofní a nitrifikační inhibici,

— abiotický příjem kyslíku ve fyzikálně-chemické kontrole (je-li použita),

— název referenční chemické látky a výsledky s touto látkou,

— veškerá pozorování a odchylky od standardního postupu, které mohly ovlivnit výsledek.

LITERATURA

1) Brown, D., Hitz, H.R. and Schäfer, L. (1981). The assessment of the possible inhibitory effect of dyestuffs on aerobic waste-water bacteria, Experience with a screening test. *Chemosphere* 10 (3): 245-261.

▼M6

2) King, E. F. and Painter H. A. (1986). Inhibition of respiration of activated sludge; variability and reproducibility of results. *Toxicity Assessment* 1(1): 27-39.

3) OECD (1984), Activated sludge, Respiration inhibition test, Test Guideline No. 209, Guidelines for the testing of chemicals, OECD, Paris.

4) ISO (2007). ISO 8192 Water Quality- Test for inhibition of oxygen consumption by activated sludge for carbonaceous and ammonium oxidation, International Organization for Standardization.

5) Bealing, D. J. (2003). Document ISO/TC147/WGI/N.183, International Organization for Standardization.

6) Painter, H A, Jones K (1963). The use of the wide-bore dropping-mercury electrode for the determination of the rates of oxygen uptake and oxidation of ammonia by micro-orgranisms. *Journal of Applied Bacteriology* 26 (3): 471-483.

7) Painter, H. A. (1986). Testing the toxicity of chemicals by the inhibition of respiration of activated sludge. *Toxicity Assessment* 1:515-524.

8) Robra, B. (1976). Wasser/Abwasser 117, 80.

9) Fiebig S. and Noack, U. (2004). The use of copper(II)sulphate pentahydrate as reference substance in the activated sludge respiration inhibition test – acc. to the OECD guideline 209. *Fresenius Environmental Bulletin* 13 No. 12b: 1556-1557.

10) ISO (1995). ISO 10634 Water Quality – Guidance for the preparation and treatment of poorly water-soluble organic compounds for the subsequent evaluation of their biodegradability in aqueous medium, International Organization for Standardization.

11) OECD (2006). Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: a guidance to application, Series on testing and assessment No. 54, ENV/JM/MONO(2006)18, OECD, Paris.

▼M6

Dodatek 1

Definice

V této zkušební metodě se používají následující definice.

Chemická látka je sloučenina nebo směs.

ECx (účinná koncentrace vyvolávající x % účinek) je koncentrace, která vyvolá účinek u x % zkušebních organismů během dané expoziční doby ve srovnání s kontrolou. Například EC_{50} je koncentrace, která podle odhadu má účinky na zkoušený ukazatel u 50 % exponované populace během definované expoziční doby.

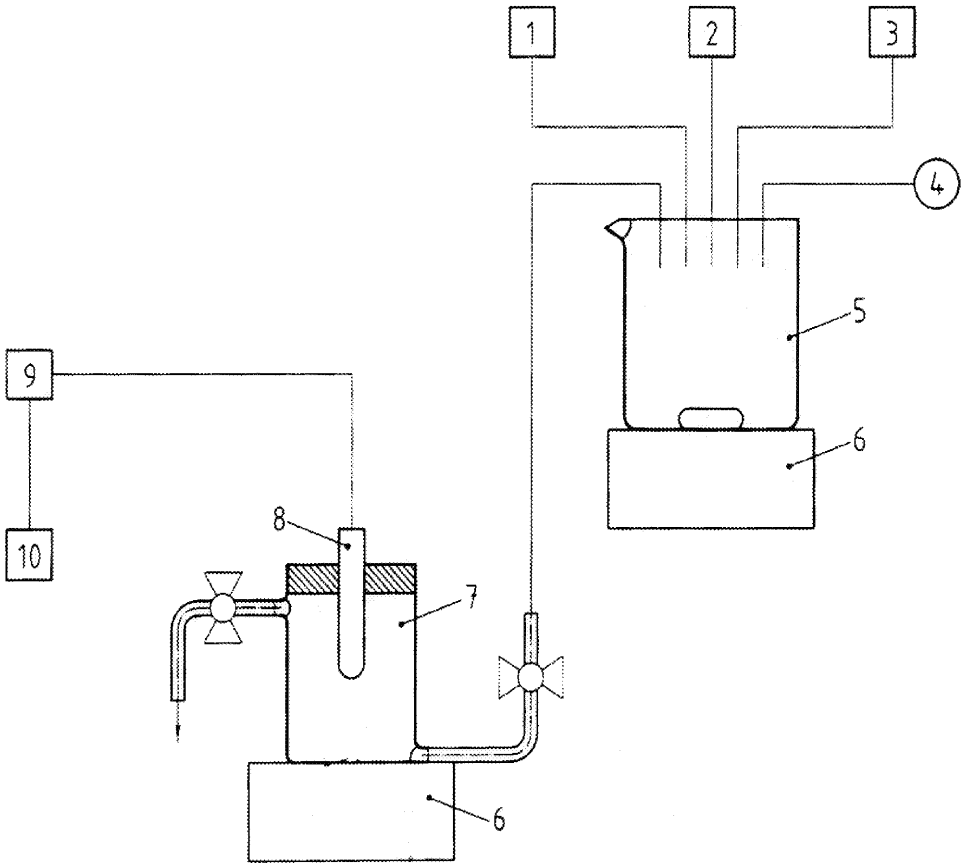
Koncentrace bez pozorovaných účinků (NOEC) je koncentrace zkoušené chemické látky, při níž není pozorován žádný účinek. V této zkoušce koncentrace odpovídající NOEC nemá žádný statisticky významný účinek ($p < 0,05$) během dané expoziční doby ve srovnání s kontrolou.

Zkoušená chemická látka je jakákoli látka nebo směs zkoušená použitím této zkušební metody.

▼**M6**

Dodatek 2

Obr. 1: **Příklady měřicí jednotky**



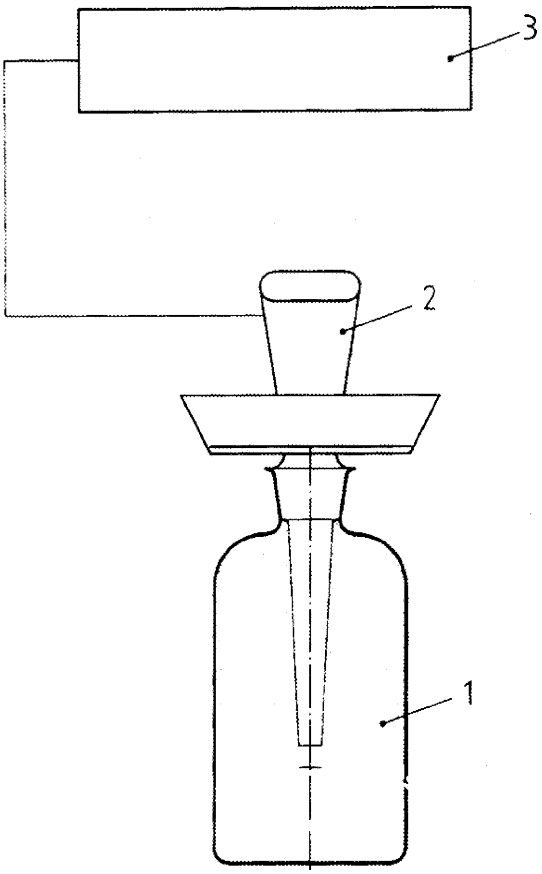
Legenda

1	aktivovaný kal	6	magnetická míchačka
2	syntetické médium	7	kyveta na měření kyslíku
3	zkoušená chemická látka	8	kyslíková elektroda
4	vzduch	9	přístroj na měření kyslíku
5	mísicí nádoba	10	zapisovač

▼**M6**

Dodatek 3

Obr. 2: **Příklad měřicí jednotky s použitím BSK lahve**



Legenda

1 zkušební nádoba

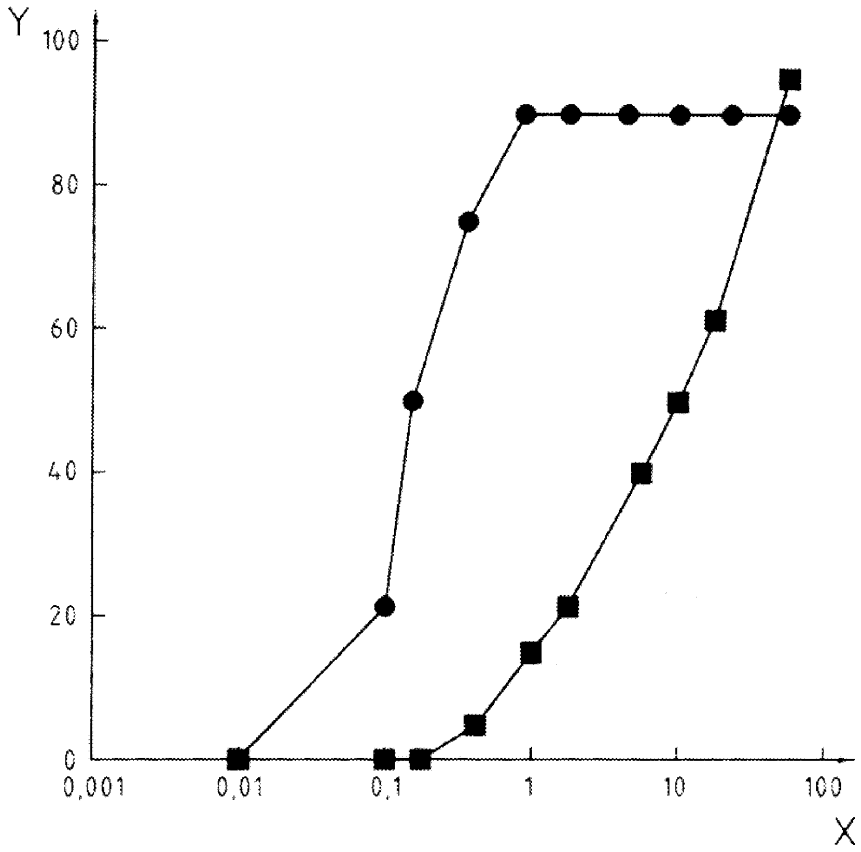
2 kyslíková elektroda

3 přístroj na měření kyslíku

▼**M6**

Dodatek 4

Obr. 3: **Příklad inhibičních křivek**



Legenda

X koncentrace 3,5-dichlorfenolu (mg/l)

Y inhibice (%)

■ inhibice heterotrofní respirace za použití nitrifikačního kalu

● inhibice nitrifikace za použití nitrifikačního kalu.

▼B

C.12. **BIOLOGICKÁ ROZLOŽITELNOST**

MODIFIKOVANÁ ZKOUŠKA SCAS

1. **METODA**

1.1. ÚVOD

Účelem této metody je hodnocení potenciální úplné biologické rozložitelnosti netěkavých organických látek rozpustných ve vodě, jsou-li po dlouhou dobu vystaveny poměrně vysokým koncentracím mikroorganismů. Životaschopnost mikroorganismů se udržuje po tuto dobu denními přídavky živin z usazené odpadní vody. (Pro potřebu během víkendů lze odpadní vodu přechovávat při 4 °C. Lze rovněž použít syntetickou odpadní vodu podle potvrzující zkoušky OECD.)

Při interpretaci výsledků (viz bod 3.2) je třeba vzít v úvahu, že může docházet k fyzikálně-chemické adsorpci na suspendovaných pevných látkách.

V důsledku dlouhé doby zdržení kapalné fáze (36 hodin) a průběžného přidávání živin nesimuluje zkouška podmínky existující v čistírně odpadních vod. Výsledky získané při pokusech s různými zkoušenými látkami ukazují, že zkouška má vysoký potenciál biologického rozkladu.

Podmínky, za nichž probíhá zkouška, jsou vysoce příznivé pro výběr a/nebo adaptaci mikroorganismů schopných rozkládat zkoušenou látku. (Postup je možné použít také k získávání aklimatizovaných inokul, pro použití v jiných zkouškách.)

V této metodě se úplná biologická rozložitelnost zkoušené látky posuzuje podle míry rozpuštěného organického uhlíku. Spíše než z rozdílu $C_{celk} - C_{anorg}$ se doporučuje stanovovat DOC po okyselení a přečistění.

Současným použitím specifické analytické metody může být stanovena také primární biologická rozložitelnost látky (úbytek výchozí chemické látky).

Touto metodou mohou být zkoušeny pouze organické látky, které mají při koncentracích použitých ve zkoušce tyto vlastnosti:

— jsou rozpustné ve vodě (nejméně 20 mg rozpuštěného organického uhlíku na litr),

— mají zanedbatelný tlak par,

— neinhibují bakterie,

— nejsou ve zkušebním systému významně adsorbovány,

— pěněním nedochází ve zkoušeném roztoku ke ztrátám.

Musí být stanoven obsah organického uhlíku ve zkoušené látce.

▼B

Při interpretaci získaných výsledků budou užitečné informace o relativním podílu hlavních složek zkušebního materiálu, zejména pokud jsou stanovené hodnoty biologické rozložitelnosti nízké nebo marginální.

Informace o toxicitě zkoušené látky pro mikroorganismy jsou důležité rovněž pro interpretaci nižších hodnot biologické rozložitelnosti a volbu vhodných koncentrací zkoušené látky.

1.2. DEFINICE A JEDNOTKY

C_T = koncentrace zkoušené látky na začátku provzdušňovacího cyklu, vyjádřená jako množství organického uhlíku přítomného nebo přidaného k usazené odpadní vodě (mg/l),

C_t = koncentrace rozpuštěného organického uhlíku zjištěná v supernatantu zkušebního roztoku na konci provzdušňovacího cyklu (mg/l),

C_c = koncentrace rozpuštěného organického uhlíku zjištěná v supernatantu zkušebního roztoku na konci provzdušňovacího cyklu (mg/l).

Biologický rozklad je v této metodě definován jako úbytek organického uhlíku. Biologický rozklad lze vyjádřit jako:

1. Procentuální úbytek D_{da} množství denně přidávané látky:

$$D_{da} = \frac{C_T - (C_t - C_c)}{C_T} \times 100 \qquad [1]$$

kde

D_{da}= rozklad/denní přídavek.

2. Procentuální úbytek D_{ssd} množství látky přítomné na začátku každého dne:

$$D_{ssd} = \frac{2C_T + C_{ti} - C_{ci} - 3C_{t(i+1)} + 3C_{c(i+1)}}{2C_T + C_{ti} - C_{ci}} \times 100 \qquad [2(a)]$$

$$\approx \frac{2C_T - 2(C_t - C_c)}{2C_T + (C_t - C_c)} \times 100 \qquad [2(b)]$$

kde:

D_{ssd} = rozklad/množství látky na začátku dne,

indexy i a (i + 1) se vztahují ke dni měření.

Rovnice 2(a) se doporučuje, jestliže se DOC ve výtokové vodě ze dne na den mění, zatímco rovnici 2(b) lze použít v případě, že DOC zůstává ve výtokové vodě ze dne na den relativně konstantní.

▼B

1.3. REFERENČNÍ LÁTKY

V některých případech mohou být při posuzování nových látek využity referenční látky; zatím však nelze doporučit žádné specifické referenční látky.

V doplňku 1 jsou uvedeny údaje k několika sloučeninám vyhodnoceným v okružních testech; jsou určeny především pro potřebu občasné kalibrace metody a dále umožní srovnání výsledků získaných jinými metodami.

1.4. PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

Aktivovaný kal z čistírny odpadních vod se vpraví do semikontinuální jednotky pro aktivovaný kal (SCAS, semi-continuous activated sludge unit). Přidá se zkoušená látka a usazená odpadní voda z domácností a směs se 23 hodin provzdušňuje. Provzdušňování se poté ukončí, kal se nechá usadit a supernatant se odstraní.

Zbývající kal v provzdušňovací komoře se pak smísí s další alikvotní části zkoušené látky a odpadní vody a cyklus se opakuje.

Biologický rozklad se určí stanovením obsahu rozpuštěného organického uhlíku v supernatantu. Tato hodnota se porovná s hodnotou zjištěnou pro supernatant z kontrolní nádoby, do které byla přidána pouze usazená odpadní voda.

Při použití specifické analytické metody se měří změny koncentrací původní molekuly látky způsobené biologickým rozkladem (míra primární biologické rozložitelnosti).

1.5. KRITÉRIA JAKOSTI

Reprodukovatelnost této metody založené na úbytku rozpuštěného organického uhlíku dosud nebyla stanovena. (Pokud jde o primární biologický rozklad, dosahuje se velmi přesných hodnot pro látky, které dosahují vysokého stupně rozkladu.)

Citlivost metody je ve velké míře dána kolísáním slepého pokusu a v menší míře přesností stanovení rozpuštěného organického uhlíku a obsahem zkoušené látky v kapalině na začátku každého cyklu.

1.6. POPIS ZKUŠEBNÍHO POSTUPU

1.6.1. *Příprava*

Pro každou zkoušenou látku a pro kontrolní zkoušky se sestaví dostatečný počet čistých provzdušňovacích jednotek, popřípadě je možné použít originální zkušební jednotku SCAS o obsahu 1,5 l, a trubice pro přívod vzduchu (obrázek 1). Stlačený vzduch přiváděný do zkušebních jednotek, přečištěný vatovým filtrem, nesmí obsahovat organický uhlík a musí být předem nasycen vodou, aby se snížily ztráty vypařováním.

Vzorek kapaliny s aktivovaným kalem obsahující 1–4 g suspendovaných pevných látek v 1 litru se získá z čistírny pracující s aktivovaným kalem, čistící převážně odpadní vody z domácností. Pro každou provzdušňovací jednotku je potřeba přibližně 150 ml kapaliny s aktivovaným kalem.

▼B

Zásobní roztoky zkoušené látky se připravují s použitím destilované vody; obvykle se požaduje koncentrace 400 mg organického uhlíku na litr, aby se nastavila na začátku každého cyklu provzdušňování koncentrace zkoušené látky 20 mg uhlíku na litr, nedochází-li k biologickému rozkladu.

Umožňuje-li to toxicita pro mikroorganismy, jsou přípustné vyšší koncentrace.

Změří se obsah organického uhlíku zásobních roztoků.

1.6.2. *Zkušební podmínky*

Zkouška se provádí při 20–25 °C.

Použije se vysoká koncentrace aerobních mikroorganismů (1–4 g na litr suspendovaných látek) a efektivní doba zdržení je 36 hodin. Uhlíkaté látky v přiváděné odpadní vodě se ve velké míře oxidují, obvykle během osmi hodin po začátku každého cyklu provzdušňování. Poté kal po zbytek provzdušňovacího cyklu endogenně dýchá a v této době je jediným dostupným substrátem zkoušená sloučenina, pokud se také rychle nerozloží. Tyto skutečnosti spolu s denním opakovaným očkováním, používá-li se jako médium odpadní voda z domácnosti, vytvářejí vysoce příznivé podmínky jak pro aklimatizaci, tak pro vysoký stupeň rozkladu.

1.6.3. *Provedení zkoušky*

Odebere se vzorek kapaliny s aktivovaným kalem z vhodné čistírny pracující s aktivovaným kalem a čistící převážně odpadní vody z domácností nebo vzorek kapaliny z laboratorní jednotky a udržuje se v aerobních podmínkách až do použití v laboratoři. Každá provzdušňovací i kontrolní jednotka se naplní 150 ml kapaliny s aktivovaným kalem (používá-li se originální jednotka pro zkoušku SCAS, je třeba uvedené objemy násobit 10) a zahájí se provzdušňování. Po 23 hodinách se provzdušňování ukončí a kal se nechá 45 minut usazovat. Postupně se otevřou kohouty všech nádob a odeberou se 100ml podíly supernatantu. Ke zbývajícímu kalu v každé provzdušňovací jednotce se přidá 100 ml usazené odpadní vody z domácností získané bezprostředně před použitím. Opět se zahájí provzdušňování. V této etapě se nepřidávají žádné zkoušené látky a do jednotek se denně přidává pouze odpadní voda z domácnosti do té doby, dokud není voda po usazení čirá. To trvá obvykle až dva týdny, během nichž se obsah rozpuštěného organického uhlíku v supernatantu na konci každého provzdušňovacího cyklu přiblíží konstantní hodnotě.

Na konci této fáze se jednotlivé usazené kaly smísí a do každé jednotky se vpraví 50 ml výsledného směsného kalu.

Do kontrolních jednotek se přidá 95 ml usazené odpadní vody a 5 ml vody a do zkušebních jednotek se přidá 95 ml usazené odpadní vody a 5 ml příslušného zásobního roztoku zkoušené látky (400 mg/l). Znovu se zahájí provzdušňování a pokračuje se v něm 23 hodin. Kal se poté nechá 45 minut usazovat, odebere se supernatant a analyzuje se na obsah rozpuštěného organického uhlíku.

Výše uvedený postup plnění a odběru se opakuje v průběhu zkoušky denně.

▼B

Před usazováním může být nezbytné očistit stěny jednotek, aby se předešlo hromadění pevných látek nad hladinou kapaliny. Pro každou jednotku se použije samostatná stěrka nebo kartáč, aby nedošlo ke vzájemné kontaminaci.

V ideálním případě se rozpuštěný organický uhlík stanoví v supernatantu denně, ale připouštějí se i méně časté analýzy. Před analýzou se kapaliny zfiltrují přes promyté membránové filtry o velikosti pórů 0,45 μm nebo se odstředí. Vhodný membránový filtr nesmí uvolňovat uhlík a při filtraci nesmí adsorbovat zkoušenou látku. Teplota vzorku po dobu, kdy je v odstředivce, nesmí přesáhnout 40 °C.

Délka zkoušky u látek, u nichž dochází k malému biologickému rozkladu nebo se nerozkládají vůbec, není stanovena, ale na základě zkušenosti lze doporučit, aby trvala nejméně 12 týdnů, ne avšak déle než 26 týdnů.

2. ÚDAJE A VYHODNOCENÍ

Hodnoty koncentrace rozpuštěného organického uhlíku v supernatantu ve zkušebních jednotkách a v kontrolních jednotkách se vynesou do grafu proti času.

Po skončení biologického rozkladu by se koncentrace zjištěná ve zkušební jednotce měla blížit hodnotě v kontrolní jednotce. Jakmile se ve třech po sobě následujících měřeních zjistí, že rozdíl mezi oběma hladinami je konstantní, provede se takový počet dalších měření, který je postačující pro statistické vyhodnocení výsledků, a vypočte se procentuální hodnota biologického rozkladu zkoušené látky (D_{da} nebo D_{ssd}, viz bod 1.2).

3. ZPRÁVY

3.1. PROTOKOL O ZKOUŠCE

Protokol o zkoušce musí pokud možno obsahovat tyto údaje:

— veškeré informace o druhu odpadní vody, typu použité jednotky a o experimentálních výsledcích týkajících se zkoušené látky, referenční látky (pokud byla použita) a slepého pokusu,

— teplota,

— křivka úbytku s popisem, způsob výpočtu (viz bod 1.2),

— datum a lokalita, kde byly odebrány aktivovaný kal a odpadní voda, stav adaptace, koncentrace atd.,

— vědecké důvody pro jakékoli změny ve zkušebním postupu,

— podpis a datum.

▼B

3.2. INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

Protože látky, které mají být zkoušené touto metodou, nejsou snadno biologicky rozložitelné, bude obvykle jakýkoli úbytek DOC, ke kterému dojde pouze v důsledku biologického rozkladu, rozložený do dnů nebo týdnů, s výjimkou případů, kdy je aklimatizace náhlá, což se projeví náhlým vymizením zkoušené látky po několika týdnech.

Někdy však může hrát významnou úlohu fyzikálně-chemická adsorpce, která se projeví úplným nebo částečným úbytkem přidaného DOC na začátku. Další vývoj závisí na faktorech, jako jsou míra adsorpce a koncentrace suspendovaných látek v nepoužité výtokové vodě. Obvykle rozdíl mezi koncentrací DOC v supernatantech u kontrol a u zkušebních jednotek postupně vzrůstá z počáteční nízké hodnoty a tento rozdíl poté zůstává na nové hodnotě po zbytek experimentu, pokud nedojde k aklimatizaci.

Má-li se rozlišit biologická rozložitelnost (nebo částečná biologická rozložitelnost) od adsorpce, je třeba provést další zkoušky. To lze provést několika způsoby, nejsprávnější je však použít supernatant nebo kal jako inokulum v některé základní zkoušce (nejlépe ve zkoušce respirometrií).

Zkoušené látky, které vykazují v této zkoušce velký úbytek DOC, lze pokládat za potenciálně biologicky rozložitelné. Částečný, neadsorpční úbytek znamená, že látka je alespoň částečně biologicky rozložitelná.

Nízký nebo nulový úbytek DOC může být způsoben inhibicí mikroorganismů zkoušenou látkou, která se může projevovat rozpuštěním nebo úbytkem kalu nebo zákalem supernatantu. V takových případech se zkouška opakuje s nižšími koncentracemi zkoušené látky.

Vyšší citlivosti může být dosaženo specifickými analytickými metodami nebo použitím látek značených ^{14}C. Při použití zkoušené látky značené ^{14}C bude probíhající rozklad zkoušené látky potvrzen vývinem $^{14}CO_2$.

Pokud se výsledek udává jako primární biologická rozložitelnost, měly by být podle možnosti uvedeny změny v chemické struktuře, které způsobily, že se snížil signál výchozí zkoušené látky.

Musí být popsána vhodnost analytické metody a výsledky stanovení ve slepém živném médiu.

4. **LITERATURA**

1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 302 A, rozhodnutí Rady C(81) 30 v konečném znění.

▼B

Doplněk 1

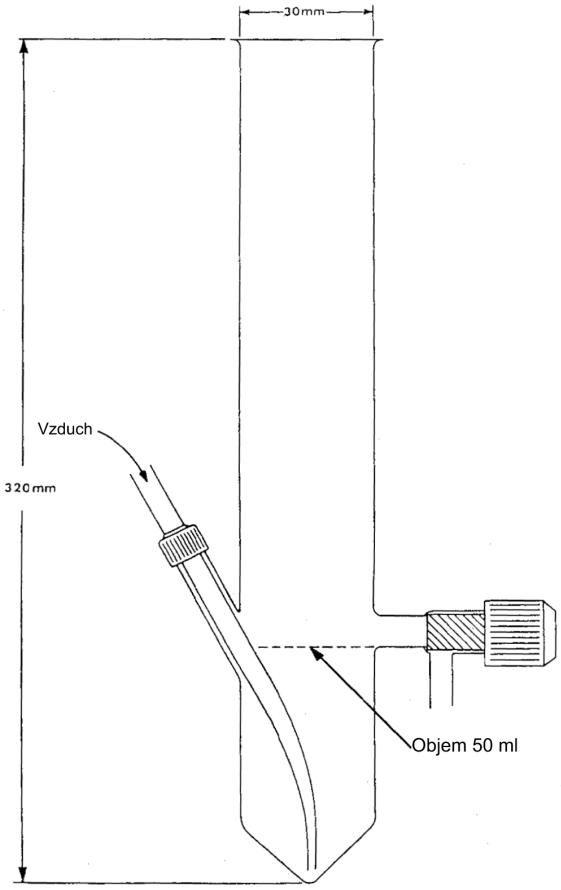
Zkouška SCAS: příklad výsledků

Látka	C_T (mg/l)	C_t–C_c (mg/l)	Procento biologického rozkladu D_{da}	Délka zkoušky (dny)
4-acetamidobenzen-1-sulfonát	17,2	2,0	85	40
4-dodecylbenzen-1-sulfonát	17,3	8,4	51,4	40
4nitrofenol	16,9	0,8	95,3	40
diethylenglykol	16,5	0,2	98,8	40
anilin	16,9	1,7	95,9	40
cyklopentantetrakarboxylát	17,9	3,2	81,1	120

▼B

Doplněk 2

Příklad zkušební aparatury



▼M7

C.13. BIOAKUMULACE V RYBÁCH: EXPOZICE VE VODNÍM PROSTŘEDÍ A V POTRAVĚ

ÚVOD

Tato zkušební metoda je rovnocenná Pokynu OECD pro zkoušení (TG) č. 305 (2012). Revize této zkušební metody sleduje dva hlavní cíle. Za prvé má začlenit zkoušku bioakumulace v potravě ([1]) vhodnou pro stanovení bioakumulačního potenciálu látek s velmi nízkou rozpustností ve vodě. Za druhé má vytvořit zkušební metodu, ve které se ve vhodných případech z důvodu dobrých životních podmínek zvířat používá méně ryb a která je nákladově efektivnější.

V letech po přijetí konsolidované zkušební metody C.13 (1) bylo zkoušeno mnoho látek a laboratoře i regulační orgány získaly značné zkušenosti. To vedlo k přesvědčení, že při splnění určitých kritérií (*srov.* odstavec 88) je možné složitost zkoušky snížit a že lze uplatnit postupný přístup. Zkušenosti také ukázaly, že biologické faktory, např. růst ryb a obsah lipidů v nich, mohou mít značný dopad na výsledky a že je zapotřebí je brát v úvahu. Bylo rovněž zjištěno, že zkoušení látek velmi málo rozpustných ve vodě nemusí být technicky proveditelné. U látek s velmi nízkou rozpustností ve vodě může mít expozice touto cestou omezený význam ve srovnání s expozicí v potravě. To vedlo k vývoji zkušební metody, ve které jsou ryby exponovány prostřednictvím potravy (srov. odstavce 7 až 14 a odstavec 97 a následující). V roce 2010 byla provedena validace (mezilaboratorní porovnávací zkouška) zkoušky expozice v potravě.

Hlavní změny jsou tyto:

— za dostatečné lze považovat zkoušení pouze jedné zkušební koncentrace, je-li pravděpodobné, že biokoncentrační faktor (BCF) je nezávislý na zkušební koncentraci,

— uspořádání minimalizované zkoušky expozice ve vodním prostředí, při které je možný menší počet odběrů vzorků, pokud jsou splněna určitá kritéria,

— měl by být měřen obsah lipidů v rybách, tak aby hodnotu BCF bylo možno vyjádřit na základě 5 % obsahu lipidů,

— větší důraz na odhad kinetického BCF (je-li možný) hned po odhadování BCF v rovnovážném stavu,

— pro některé skupiny látek bude navržena zkouška expozice v potravě, pokud je považována za vhodnější než zkouška expozice ve vodním prostředí,

— měla by být stanovena hmotnost ryb, tak aby hodnotu BCF bylo možno opravit o korekci růstem.

Před provedením zkoušky bioakumulace je třeba získat tyto informace o zkoušené látce:

a) citlivost analytické metody pro měření tkání a koncentrací zkoušené látky a případných metabolitů ve vodním prostředí nebo v potravě (srov. odstavec 65);

b) rozpustnost ve vodě [zkušební metoda A.6; (2)]; pro získání spolehlivé hodnoty by měla být stanovena v souladu s metodou, která je vhodná pro (odhadované) rozpětí rozpustnosti. U hydrofobních látek to zpravidla bude sloupcová eluční metoda;

([1]) Definice a jednotky viz dodatek 1.

▼M7

c) rozdělovací koeficient n-oktanol/voda, K_{OW} ([1]) [zkušební metody A.8 (4), A.24 (5), A.23 (6)]; nebo jiné vhodné informace o chování při rozdělení (např. sorpce na lipidy, K_{OC}); pro získání spolehlivé hodnoty by koeficient měl být stanoven v souladu s metodou, která je vhodná pro (odhadované) rozpětí K_{OW}. U hydrofobních látek to zpravidla bude metoda pomalého míchání (zkušební metoda [A.23 (6)];

d) stabilita látky ve vodě (hydrolýza [zkušební metoda C.7 (7)]);

e) stabilita látky v potravě (zvláště pokud je zvolen zkušební postup expozice v potravě);

f) informace o fototransformaci důležité pro nastavení podmínek ozáření při zkoušce);

g) povrchové napětí (tj. u látek, kde není možné určit log K_{OW}) [zkušební metoda A.5 (9)];

h) tlak par [zkušební metoda A.4 (10)];

i) jakékoli případné informace o biotickém nebo abiotickém rozkladu ve vodě, mimo jiné např. přímá biologická rozložitelnost [zkušební metody C.4 části II až VII (11), C.29 (12)];

j) případné informace o metabolitech: složení, log K_{OW}, tvorba a rozložitelnost;

k) kyselá disociační konstanta (pK_a) u látek, které by mohly ionizovat. V případě potřeby by se měla upravit hodnota pH zkušební vody, aby se zajistilo, že látka je během zkoušky v nedisociovaném stavu, je-li to slučitelné s druhem ryb.

Nezávisle na zvolené metodě expozice nebo schématu odběru vzorků je v této zkušební metodě popsán postup pro charakterizaci potenciálu látek bioakumulovat se v rybách. Ačkoli jsou průtokové zkušební režimy preferovány, připouštějí se i semistatické režimy, jsou-li splněna kritéria validace (*srov.* odstavce 24 a 113). V případě expozice v potravě není průtokový systém nezbytný pro udržení koncentrace zkoušené látky ve vodním prostředí, ale pomůže udržet přiměřené koncentrace rozpuštěného kyslíku a zajistit čistou vodu a také eliminovat vlivy např. výměšků.

Nezávisle na zvolené zkušební metodě jsou ve zkušební metodě dostatečně popsány podrobnosti pro provedení zkoušky, přičemž je poskytnuta dostatečná volnost pro přizpůsobení experimentálního uspořádání podmínkám v jednotlivých laboratořích a různým vlastnostem zkoušených látek. Zkouška expozice ve vodním prostředí je nejvhodnější pro stabilní organické látky s hodnotou log K_{OW} od 1,5 do 6,0 (13), ale může být také použita na silně hydrofobní látky (s hodnotou log K_{OW} > 6,0), pokud lze prokázat stabilní koncentraci plně rozpuštěné zkoušené látky ve vodě. Jestliže nelze prokázat stabilní koncentraci zkoušené látky ve vodě, studie ve vodním prostředí by nebyla vhodná a bylo by nutné pro zkoušení látky na rybách použít postup expozice v potravě (i když interpretace a využití výsledků zkoušky s potravou může záviset na regulačním rámci). Předběžné odhady biokoncentračního faktoru (BCF, někdy označovaného jako K_B) pro organické látky s hodnotou log K_{OW} až asi 9,0 lze získat pomocí rovnice Binteina *et al.* (14). Předběžně odhadnutý biokoncentrační faktor může

([1]) Někdy se označuje jako P_{OW}; stanovuje se metodou třepací láhve popsanou ve zkušební metodě A.8 (4), metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) popsanou ve zkušební metodě A.24 (5) a metodou pomalého míchání popsanou ve zkušební metodě A.23 (6). Ke stanovení hodnoty log K_{OW}.se někdy používá metoda generátorových kolon. K dispozici je jen omezený počet studií, které využívají tuto metodu, a to především pro chlorované bifenyly a dibenzodioxiny (např. Li and Doucette, 1993) (3). V případě látek, které by mohly ionizovat, by se log K_{OW} měl vztahovat na nedisociovanou formu.

▼M7

být pro silně hydrofobní látky vyšší než hodnota biokoncentračního faktoru v rovnovážném stavu (BCF_{SS}), která je očekávána z laboratorních experimentů, zejména pokud je pro předběžný odhad použit jednoduchý lineární model. Mezi parametry, které charakterizují bioakumulační potenciál, patří rychlostní konstanta příjmu (k_1), rychlostní konstanty úbytku včetně rychlostní konstanty vylučování (k_2), biokoncentrační faktor v rovnovážném stavu (BCF_{SS}), kinetický biokoncentrační faktor (BCF_K) a potravní bioobohacovací faktor (BMF) ([1]).

Radioizotopově značené zkoušené látky mohou usnadnit analýzu vody, vzorků potravy a ryb a mohou být použity v případě, že by měla být provedena identifikace a kvantifikace metabolitů. Měří-li se pouze celkový obsah radioaktivního zbytku (např. po spálení nebo solubilizaci tkáně), je hodnota BCF nebo BMF založena na součtu mateřské látky, všech zadržených metabolitů a také asimilovaného uhlíku. Hodnoty BCF nebo BMF založené na celkovém obsahu radioaktivního zbytku tedy nemohou být přímo srovnatelné s hodnotou BCF nebo BMF získanou specifickou chemickou analýzou pouze mateřské látky. V izotopových studiích mohou být pro stanovení BCF nebo BMF mateřské látky před analýzou zařazeny separační postupy, např. TLC, HPLC nebo GC ([2]). Jsou-li použity separační metody a pokud má být hodnota BCF nebo BMF založena na koncentraci mateřské látky v rybách, a nikoli na celkovém obsahu radioizotopově značeného zbytku, měla by se provést identifikace a kvantifikace mateřské látky a příslušných metabolitů ([3]) (srov. odstavec 65). Je možné rovněž kombinovat studii metabolismu ryb nebo distribuce *in vivo* se studií bioakumulace analýzou a identifikací zbytku v tkáních. Možnost metabolismu lze předpovědět vhodnými prostředky (např. souborem nástrojů QSAR OECD (15) a patentovanými programy QSAR).

Rozhodnutí, zda provézt zkoušku expozice ve vodním prostředí nebo v potravě a v jakém uspořádání by mělo vycházet z faktorů uvedených v odstavci 3, které se zváží spolu s příslušným regulačním rámcem. Například pro látky, které mají vysokou hodnotu K_{OW}, ale přesto vykazují značnou rozpustnost ve vodě s ohledem na citlivost dostupných analytických metod, by měla být v první řadě zvážena zkouška expozice ve vodním prostředí. Je však možné, že informace o rozpustnosti těchto hydrofobních druhů látek ve vodě nejsou konečné, takže před přijetím rozhodnutí, kterou zkušební metodu použít, by měla být zkoumána možnost přípravy stabilních, měřitelných koncentrací ve vodním prostředí (stabilní emulze nejsou přípustné) použitelných pro studii expozice ve vodním prostředí. Na základě „hraničních“ kritérií rozpustnosti ve vodě a rozdělovacího koeficientu oktanol/voda není možné vydat přesný normativní pokyn, jaké metody mají být použity, protože zřetelný vliv na použitelnost metody mají z výše uvedených důvodů také jiné faktory (analytické metody, rozklad, adsorpce atd.). Hodnota log K_{OW} vyšší než 5 a rozpustnost vody nižší než ~0,01 až 0,1 mg/l vymezují okruh látek, jejichž zkoušení prostřednictvím expozice ve vodním prostředí může být stále obtížnější.

Měly by se zvážit i jiné faktory, které mohou ovlivnit výběr zkoušky, včetně schopnosti látky adsorbovat na zkušebních nádržích, přístrojích a vybavení, její stability ve vodném roztoku v porovnání s její stabilitou v rybí potravě (17) (18) atd.

Informace o takových praktických aspektech mohou být dostupné z jiných dokončených studií ve vodním prostředí. Další informace týkající se hodnocení aspektů provádění bioakumulačních studií jsou k dispozici v literatuře (např. (19)).

U látek, kde rozpustnost nebo zachování koncentrace ve vodním prostředí, jakož i analýza této koncentrace (koncentrací) nepředstavuje omezení pro uskutečnění

([1]) Definice a jednotky viz dodatek 1.
([2]) TLC: chromatografie na tenké vrstvě; HPLC: vysokotlaká kapalinová chromatografie; GC: plynová chromatografie
([3]) V některých regulačních rámcích může být analýza metabolitů povinná, jsou-li splněny určité podmínky (srov. odstavec 65).

▼M7

metody expozice ve vodním prostředí, se pro stanovení bioakumulačního potenciálu látky upřednostňuje tato metoda. V každém případě by se mělo ověřit, že zkušební koncentrace, které mají být použity ve vodním prostředí, jsou v rozmezí rozpustnosti ve zkušebním médiu ve vodním prostředí. Pro zachování stabilních koncentrací rozpuštěné zkoušené látky lze použít různé metody, jako např. použití zásobních roztoků nebo pasivních dávkovacích systémů (např. sloupcové eluční metody), pokud lze prokazatelně udržet stabilní koncentrace a pokud zkušební média se nezmění z hodnot doporučených v odstavci 27.

U silně hydrofobních látek (log K_{OW} > 5 a rozpustnost menší než ~ 0,01 až 0,1 mg/l) může být zkoušení prostřednictvím expozice ve vodním prostředí stále obtížnější. Důvodem pro omezení může být skutečnost, že není možné zachovat koncentraci ve vodním prostředí v míře, která je považována za dostatečně konstantní (např. v důsledku sorpce na skle expozičních nádob nebo rychlého příjmu rybami), nebo že koncentrace ve vodním prostředí, které mají být použity, jsou tak nízké, že jsou na úrovni analyticky stanovené meze kvantifikace nebo jsou ještě nižší ([1]). Pro tyto vysoce hydrofobní látky se doporučuje zkouška expozice v potravě, pokud je tato zkouška v souladu s příslušným regulačním rámcem a s potřebami posouzení rizik.

U povrchově aktivních látek by se mělo zvážit, zda zkouška biokoncentrace ve vodním prostředí je vzhledem k vlastnostem látky proveditelná; v opačném případě je patrně vhodnější studie expozice v potravě. Povrchově aktivní látky jsou činidla, která působí na povrchu, což snižuje mezifázové napětí mezi dvěma kapalinami. Jejich amfifilní povaha (tj. obsahují jak hydrofilní, tak hydrofobní složku) způsobuje, že se akumulují na povrchu, např. na rozhraní voda-vzduch, na rozhraní voda-potrava a na skleněných stěnách, což narušuje stanovení jejich koncentrace ve vodním prostředí.

Zkouškou expozice v potravě je možné u komplexních směsí se složkami s různými mezemi rozpustnosti ve vodě obejít některé z aspektů expozice, neboť srovnatelná expozice u všech složek směsi je pravděpodobnější než při metodě vodního prostředí (srov. (20))

Nutno poznamenat, že postup expozice v potravě poskytuje potravní biooboha-covací faktor (BMF), a nikoli biokoncentrační faktor (BCF) ([2]). K dispozici jsou metody, jimiž lze odhadnout kinetický biokoncentrační faktor (BCF_K) z údajů získaných při studii potravy (jak se pojednává v dodatku 8), avšak tyto metody je třeba používat s obezřetností. Obecně tyto metody předpokládají kinetiku prvního řádu a jsou použitelné pouze na některé skupiny sloučenin. Použitelnost těchto metod pro povrchově aktivní látky je nepravděpodobná (viz odstavec 12).

Minimalizované nastavení zkoušky expozice ve vodním prostředí s menším počtem odběrů vzorků s cílem snížit počet ryb a/nebo zdrojů (srov. odstavec 83 a dále), by mělo být použito pouze pro látky, při jejichž příjmu a vylučování lze přibližně očekávat kinetiku prvního řádu (tj. obecně nedisociované organické látky, srov. odstavec 88).

C.13 – I **ZKOUŠKA BIOKONCENTRACE V RYBÁCH S EXPOZICÍ VE VODNÍM PROSTŘEDÍ**

PODSTATA ZKOUŠKY

Zkouška má dvě fáze: fázi expozice (příjem) a poexpoziční fázi (vylučování). Během fáze příjmu je skupina ryb stejného druhu vystavena jedné nebo více zvoleným koncentracím zkoušené látky v závislosti na vlastnostech zkoušené látky (srov. odstavec 49). Poté jsou přemístěny do média, které zkoušenou

([1]) Obecně by měřené koncentrace ve vodě během fáze příjmu měly být alespoň o jeden řád větší než mez kvantifikace, aby ve vylučovací fázi bylo možné měřit více než jeden poločas obsahu látky v organismu.

([2]) Definice a jednotky viz dodatek 1.

▼M7

látku neobsahuje, aby začala fáze vylučování. Fáze vylučování je vždy nezbytná, není-li příjem látky během fáze příjmu nevýznamný. Koncentrace zkoušené látky v rybách nebo na nich (nebo v jejich specifikovaných tkáních) se sleduje v průběhu obou fází zkoušky. Vedle zkušební skupiny se za stejných podmínek, s výjimkou přítomnosti zkoušené látky, udržuje kontrolní skupina ryb, aby mohly být na odpovídající kontrolní skupině porovnány možné nepříznivé účinky pozorované při biokoncentračních zkouškách a aby byly získány koncentrace zkoušené látky v pozadí ([1]).

Při zkoušce expozice ve vodním prostředí trvá fáze příjmu obvykle 28 dnů. Její délku lze v případě potřeby prodloužit (srov. odstavec 18) nebo zkrátit, je-li prokázáno, že je rovnovážného stavu dosaženo dříve (viz dodatek 1, definice a jednotky). Délku fáze příjmu a dobu potřebnou k ustavení rovnovážného stavu lze předpovědět pomocí rovnice v dodatku 5. Fáze vylučování poté začne, když ryby již nejsou exponovány zkušební látce, po jejich přemístění do čisté nádrže se stejným médiem, ale bez zkoušené látky. Je-li to možné, vypočítá se biokoncentrační faktor přednostně jednak jako poměr koncentrace v rybách (C_f) a koncentrace ve vodě (C_w) v rovnovážném stavu (BCF_{SS}; viz dodatek 1, definice) a jednak jako kinetický biokoncentrační faktor (BCF_K, viz dodatek 1, definice), který se odhadne jako poměr rychlostních konstant příjmu (k_1) a vylučování (k_2) za předpokladu kinetiky prvního řádu ([2]).

Nedojde-li k rovnovážnému stavu do 28 dnů, pak se buď vypočítá BCF s použitím kinetického přístupu (viz odstavec 38), nebo je možné fázi příjmu prodloužit. Pokud by to mělo vést k tomu, že k dosažení rovnovážného stavu bude zapotřebí neprakticky dlouhá fáze příjmu (srov. odstavce 37 a 38, dodatek 5), upřednostní se kinetický přístup. Alternativně by u vysoce hydrofobních látek měla být zvážena provedení studie s expozicí v potravě ([3]), pokud zkouška expozice v potravě je v souladu s příslušným regulačním rámcem.

Rychlostní konstanta příjmu, rychlostní konstanta (nebo konstanty, jsou-li použity složitější modely) vylučování (úbytku), biokoncentrační faktor (v rovnovážném stavu a/nebo kinetický), a je-li to možné, také intervaly spolehlivosti každého z těchto parametrů se vypočítají z modelu, který nejlépe popisuje naměřené koncentrace zkoušené látky v rybách a ve vodě (srov. dodatek 5).

Růst hmotnosti ryb během zkoušky povede k poklesu koncentrace zkoušené látky v rostoucích rybách (takzvané zředění růstem) a kinetický BCF bude tedy podhodnocen, pokud nebude upraven o růst (srov. odstavce 72 a 73).

Hodnota BCF je založena na celkové koncentraci v rybách (tj. vypočítává se z celkové živé hmotnosti ryby). Pro zvláštní účely však mohou být použity specifikované tkáně nebo orgány (např. svalovina, játra), je-li ryba dostatečně velká nebo je-li možné ji rozdělit na jedlý (vykostěný) podíl a nejedlý podíl (vnitřnosti). Vzhledem k tomu, že u mnoha organických látek existuje zřetelný vztah mezi schopností biokoncentrace a hydrofobií, existuje také odpovídající vztah mezi obsahem tuku v zkušebních rybách a pozorovanou biokoncentrací takových látek. Aby se tedy snížilo kolísání výsledků pro tyto látky s vysokou

([1]) U většiny zkoušených látek by v ideálním případě neměly být ve vodě kontrolní skupiny zaznamenány žádné stopy zkoušené látky. Koncentrace v pozadí by se měly týkat pouze materiálů vyskytujících se v přírodě (např. některých kovů) a látek, které jsou všudypřítomné v životním prostředí.

([2]) Nejedná-li se zjevně o kinetiku prvního řádu, měly by být použity složitější modely (viz odkazy v dodatku 5) a měl by být konzultován biostatistik.

([3]) Ve zkoušce biokoncentrace může být příjem kvůli nízké rozpustnosti ve vodě omezen na nízké expoziční koncentrace, zatímco ve zkoušce expozice v potravě lze dosáhnout mnohem vyšších expozičních koncentrací.

▼M7

lipofilností (tj. s log K_{OW} > 3), měla by biokoncentrace kromě přímého odvození ze studie být také vyjádřena v normalizované podobě, a to pro ryby s 5 % obsahem tuku (na základě hmotnosti celého těla). To je nezbytné pro získání základu, na kterém bude možné vzájemně porovnávat výsledky pro jednotlivé látky a/nebo zkušební druhy. Hodnota 5 % obsahu tuku se široce používá, neboť představuje průměrný obsah tuku v rybách běžně používaných v této zkušební metodě (21).

INFORMACE O ZKOUŠENÉ LÁTCE

Kromě vlastností zkoušené látky uvedených v úvodu (odstavec 3) jsou dalšími požadovanými informacemi toxicita pro druh ryby, který má být při zkoušce použit, nejlépe asymptotická hodnota LC_{50} (tj. časově nezávislá) a/nebo toxicita odhadnutá při dlouhodobých zkouškách na rybách (např. zkušební metody C.47 (22), C.15 (23), C.14 (24)).

K dispozici musí být vhodná analytická metoda o známé přesnosti a citlivosti pro kvantitativní stanovení látky ve zkušebních roztocích a v biologickém materiálu a dále podrobnosti o přípravě a uchovávání vzorků. Měly by být také známy analytické meze pro stanovení obsahu zkoušené látky jak ve vodě, tak v rybích tkáních. Je-li použita radioizotopově značená zkoušená látka, měla by mít nejvyšší čistotu (např. nejlépe > 98 %) a měla by být známa aktivita nečistot vyjádřená v procentech.

VALIDITA ZKOUŠKY

Aby byla zkouška platná, musí být splněny tyto podmínky:

kolísání teploty je menší než ± 2 °C, jelikož větší odchylky mohou ovlivnit biologické parametry důležité pro příjem a vylučování a mohou rovněž vyvolat u ryb stres,

koncentrace rozpuštěného kyslíku neklesne pod 60 % nasycení,

koncentrace zkoušené látky v nádrži je udržována v intervalu ± 20 % kolem střední hodnoty naměřených hodnot během fáze příjmu,

koncentrace zkoušené látky je nižší než mez její rozpustnosti ve vodě, s ohledem účinek, který zkušební voda může mít na efektivní rozpustnost ([1]),

mortalita nebo jiné nepříznivé účinky a choroby jak u kontrolních, tak u exponovaných ryb je na konci zkoušky menší než 10 %; jestliže je zkouška prodloužena na několik týdnů nebo měsíců, měl by být úhyn nebo jiné nepříznivé účinky v obou skupinách ryb menší než 5 % za měsíc nebo by neměl překročit celkem 30 %. Významné rozdíly v průměrném vzrůstu mezi zkušebními a kontrolními skupinami ryb určených pro odběr vzorků by mohly být příznakem toxického účinku zkoušené látky.

REFERENČNÍ LÁTKY

Použití referenčních látek o známém biokoncentračním potenciálu a nízkém metabolismu by mohlo být užitečné pro kontrolu experimentálního postupu, je-li požadována (např. když laboratoř nemá předchozí zkušenosti se zkouškou nebo když se zkušební podmínky změnily).

([1]) U vícesložkových látek, UVCB a směsí by pro stanovení vhodných expozičních koncentrací měla být posouzena rozpustnost každé významné složky ve vodě.

▼M7

POPIS METODY

Přístroje a pomůcky

U všech částí zařízení je třeba se vyhýbat použití materiálů, které se mohou rozpouštět, sorbovat nebo vyluhovat a mají nepříznivý účinek na ryby. Lze použít standardní pravoúhlé nebo válcové nádrže vyrobené z inertního materiálu a mající vhodný objem s ohledem na rychlost nasazování (srov. odstavec 43). Použití měkkých trubek z plastu by mělo být minimalizováno. Měly by být použity trubky z polytetrafluoretylenu (teflon), z korozivzdorné oceli a/nebo ze skla. Zkušenosti ukázaly, že pro zkoušené látky s vysokými absorpčními koeficienty, jako jsou syntetické pyrethroidy, je nutné použít silanizované sklo. V těchto případech musí být zařízení po použití zlikvidováno. Upřednostňuje se vystavit zkušební systémy koncentracím zkoušené látky, která má být ve studii použita, tak dlouho, kolik je zapotřebí k prokázání udržení stabilních expozičních koncentrací, dříve než jsou zavedeny zkušební organismy.

Voda

Ke zkoušce se zpravidla používá přírodní voda, která by měla být získána z nekontaminovaného zdroje stálé kvality. Pro zaručení jednotné kvality po celou dobu však může být vhodnější rekonstituovaná voda (tj. demineralizovaná voda, do které byly přidány specifické živiny ve známých množstvích). Ředicí voda, což je voda použitá ke smísení se zkoušenou látkou před vstupem do zkušební nádrže (viz odstavec 30), by měla mít takovou kvalitu, která umožní přežití zvoleného druhu ryby po dobu aklimatizace a v průběhu fází zkoušky, aniž by vykazoval abnormální vzhled nebo chování. V ideálním případě by mělo být prokázáno, že zkušební druh může v ředicí vodě přežít, růst a rozmnožovat se (např. zkouškou s laboratorní kulturou nebo zkouškou toxicity během životního cyklu). Ředicí voda by měla být charakterizována alespoň hodnotou pH, tvrdostí, celkovým obsahem pevných látek, celkovým obsahem organického uhlíku (TOC ([1])) a podle možnosti také obsahem amoniaku a dusičnanů, alkalitou a v případě mořských druhů salinitou. Všechny parametry, které jsou důležité pro optimální prospívání ryb, nejsou známy; v dodatku 2 jsou přesto uvedeny doporučené maximální koncentrace pro řadu parametrů sladké a mořské vody.

Ředicí voda by měla mít po celou dobu zkoušky stejnou kvalitu. Hodnota pH by na začátku zkoušky měla být v rozmezí 6,0 až 8,5, avšak během zkoušky by se pH nemělo lišit o více než ±0,5. Pro ujištění, že ředicí voda nebude mít přílišný vliv na výsledky zkoušky (například tvorbou komplexů se zkoušenou látkou) nebo nepříznivý vliv na stav obsádky ryb, by měly být odebírány v pravidelných intervalech její vzorky pro analýzu, alespoň na začátku a na konci zkoušky. Je-li kvalita vody relativně konstantní, mělo by být stanovení těžkých kovů (např. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd a Ni), hlavních aniontů a kationtů (např. Ca^{2+}, Mg^{2+}, Na^{+}, K^{+}, Cl^{-}, a SO_4^{2-}), pesticidů (např. celkový obsah organofosforových a organochlorových pesticidů), celkový obsah organického uhlíku a suspendovaných látek provedeno např. každé tři měsíce. Je-li prokázáno, že kvalita ředicí vody je konstantní po dobu alespoň jednoho roku, mohou být stanovení méně častá a intervaly lze prodloužit (např. na šest měsíců).

Celkový přirozený obsah částic a rovněž obsah organického uhlíku (TOC) v ředicí vodě by měl být co nejnižší, aby nedošlo k adsorpci zkoušené látky na organických látkách, což může snížit její biologickou dostupnost, a může tak vést k podhodnocení BCF. Maximální přijatelná hodnota je 5 mg/l pro částice (sušina zachycená filtrem 0,45 μm) a 2 mg/l pro celkový organický uhlík (srov. dodatek 2). Je-li to nezbytné, měla by být ředicí voda před použitím filtrována.

([1]) TOC zahrnuje organický uhlík z částic a rozpuštěný organický uhlík, tj. TOC = POC + DOC.

▼M7

Příspěvek k obsahu organického uhlíku ve zkušební vodě od zkušebních ryb (exkrety) a ze zbytků potravy by měl být udržován na co nejmenší úrovni (srov. odstavec 46).

Zkušební roztoky

Zásobní roztok zkoušené látky se připraví ve vhodné koncentraci. Zásobní roztok by měl být připraven nejlépe jednoduchým mechanickým mícháním nebo protřepáním zkoušené látky s ředicí vodou. Vhodnou alternativou může být v některých případech použití dávkovacího systému s desorpcí tuhé fáze. Použití rozpouštědel nebo dispergátorů (solubilizačních činidel) se zpravidla nedoporučuje (srov. (25)); použití těchto látek však může být přijatelné pro vytvoření zásobního roztoku o vhodné koncentraci, ale je třeba vyvinout maximální úsilí, aby se takové látky používaly v co nejmenší míře a neměla by být překročena jejich kritická koncentrace micel (je-li to relevantní). Rozpouštědly, která mohou být použita, jsou aceton, ethanol, methanol, dimethylformamid a triethylenglykol; dispergátory, které byly použity, jsou Tween 80, 0,01 % methylcelulosa a HCO-40. Koncentrace rozpouštědla v konečném zkušebním médiu by měla být stejná jako při všech expozicích (tj. bez ohledu na koncentraci zkoušené látky) a neměla by být vyšší než příslušné prahové hodnoty toxicity stanovené pro rozpouštědlo za zkušebních podmínek. Maximální koncentrace je 100 mg/l (nebo 0,1 ml/l). Není pravděpodobné, že koncentrace rozpouštědla 100 mg/l významně změní maximální koncentraci rozpuštěné zkoušené látky, které lze v médiu dosáhnout (25). Příspěvek rozpouštědla (společně s příspěvkem zkoušené látky) k celkovému obsahu organického uhlíku ve zkušební vodě by měl být znám. V průběhu zkoušky by neměla koncentrace organického uhlíku ve zkušební nádrži překročit koncentraci organického uhlíku pocházejícího ze zkoušené látky a z rozpouštědla nebo solubilizačního činidla ([1]), je-li použito, o více než 10 mg/l (± 20 %). Obsah organických látek může mít významný účinek na množství volně rozpuštěné zkoušené látky během průtokových zkoušek na rybách, zejména u vysoce lipofilních látek. Důležité informace o poměru mezi vázanými a volně rozpuštěnými sloučeninami, přičemž se předpokládá, že volně rozpustné sloučeniny představují biologicky dostupnou frakci, může poskytnout mikroextrakce tuhé fáze (srov. odstavec 60). Koncentrace zkoušené látky by měla být nižší než je mez rozpustnosti zkoušené látky ve zkušebních médiích, nehledě na použití rozpouštědla nebo solubilizačního činidla. Snadno biologicky odbouratelná rozpouštědla je třeba používat rozvážně, neboť mohou způsobit problémy s růstem bakterií v průtokových zkouškách. Není-li možné připravit zásobní roztok bez použití solubilizačního činidla, měla by se zvážit vhodnost studie expozice ve vodním prostředí v porovnání se studií expozice v potravě.

Při průtokových zkouškách je pro zajištění koncentrací zkoušené látky ve zkušebních nádržích nezbytný systém, který nepřetržitě dávkuje a ředí zásobní roztok zkoušené látky (např. měřicí čerpadlo, proporcionální ředění, saturační systém) nebo dávkovací systém s desorpcí tuhé fáze. Přijatelná je výměna nejlépe pěti objemů v každé zkušební nádrži za den. Upřednostňuje se průtokový režim, není-li to však možné (např. jsou-li zkušební organismy nepříznivě ovlivňovány), může být použita semistatická technika za předpokladu, že jsou splněna kritéria validity (srov. odstavec 24). Rychlosti průtoku zásobního roztoku a ředicí vody by měly být kontrolovány jak 48 hodin před zkouškou, tak poté alespoň jednou denně během zkoušky. Do této kontroly se zahrne stanovení rychlosti průtoku v každé zkušební nádrži a zajistí se, aby se rychlost průtoku neměnila o více než 20 % v rámci jedné nádrže nebo mezi nádržemi.

([1]) Ačkoli se to obecně nedoporučuje, je-li rozpouštědlo nebo solubilizační činidlo použito, měl by být pro zhodnocení koncentrace organického uhlíku ve zkušebních nádržích organický uhlík pocházející z tohoto činidla připočten k organickému uhlíku ze zkoušené látky.

▼M7

Výběr druhů

Důležitými kritérii pro výběr druhu jsou jeho dostupnost, možnost získat jej ve vyhovující velikosti a jeho bezproblémový chov v laboratoři. Dalšími kritérii pro výběr druhu ryb jsou jeho rekreační, komerční a ekologický význam a rovněž srovnatelná citlivost, úspěšné dřívější použití atd. Doporučené druhy jsou uvedeny v dodatku 3. Mohou být použity i jiné druhy, avšak zkušební postup musí být upraven, aby byly vytvořeny vhodné zkušební podmínky. V takovém případě by měly být uvedeny důvody pro výběr druhu a experimentální metoda. Obecně platí, že použití menších druhů ryb obecně zkrátí dobu potřebnou k dosažení rovnovážného stavu, avšak může být zapotřebí většího počtu ryb (vzorků), aby bylo možné dostatečně analyzovat obsah lipidů a koncentrace zkoušené látky v rybách. Navíc je možné, že rozdíly v rychlosti dýchání a metabolismu mezi mladými a staršími rybami mohou narušit porovnání výsledků mezi různými zkouškami a zkušebními druhy. Nutno poznamenat, že druhy ryb zkoušené během (nedospělého) životního stadia s rychlým růstem mohou zkomplikovat interpretaci údajů.

Chov ryb (příslušný expozici ve vodním prostředí a v potravě)

Obsádka ryb by se měla nechat aklimatizovat alespoň dva týdny (srov. odstavec 28) při zkušební teplotě a krmí se odpovídající potravou (srov. odstavec 45). Voda i potrava by měly být stejného druhu jako ty, které se použijí během zkoušky.

Po 48 hodinách aklimatizace se zaznamená mortalita a použijí se tato kritéria:

— úhyn vyšší než 10 % populace za sedm dnů: vyměnit celou obsádku,

— úhyn 5 až 10 % populace za sedm dnů: nechat aklimatizovat dalších sedm dnů – dojde-li během těchto dalších sedmi dnů k úhynu vyššímu než 5 %, celá obsádka se vymění,

— úhyn nižší než 5 % populace za sedm dnů: násada se použije do zkoušky.

Ryby použité pro zkoušku by neměly vykazovat pozorovatelné příznaky nemoci a abnormality. Všechny nemocné ryby se vymění. Dva týdny před zkouškou nebo v průběhu zkoušky nesmí být léčeny u ryb žádné nemoci.

PROVEDENÍ ZKOUŠKY

Předběžná zkouška

V zájmu optimalizace zkušebních podmínek konečné zkoušky nebo stanovení, zda je nutné provést úplnou zkoušku, může být užitečné provést předběžný experiment, např. výběr koncentrace (koncentrací) zkoušené látky, délka fáze příjmu a fáze vylučování. Uspořádání předběžné zkoušky by mělo být takové, aby se získaly nezbytné informace. Lze zvážit, zda by k odvození hodnoty BCF postačila minimalizovaná zkouška nebo zda je nutná úplná studie (o minimalizované zkoušce srov. odstavce 83 až 95).

Podmínky expozice

Délka fáze příjmu

Předpověď délky fáze příjmu lze získat z praktických zkušeností (např. z dřívější studie nebo ze studie akumulace strukturně podobné látky) nebo z určitých empirických vztahů využívajících znalosti buď rozpustnosti ve vodě, nebo rozdělovacího koeficientu *n*-oktanol/voda pro zkoušenou látku (za předpokladu, že se příjem řídí kinetikou prvního řádu, srov. dodatek 5).

▼M7

Fáze příjmu trvá 28 dnů, není-li prokázáno, že je rovnovážného stavu dosaženo dříve (viz dodatek 1, definice a jednotky). Rovnovážného stavu je dosaženo tehdy, je-li při grafickém znázornění křivka časové závislosti koncentrace zkoušené látky v rybách (C_f) rovnoběžná s časovou osou a tři po sobě jdoucí analýzy C_f ve vzorcích odebraných v intervalech alespoň dvou dnů se mezi sebou neliší více než o ± 20 % a nedojde-li v době mezi první a poslední následnou analýzou k výraznému nárůstu hodnoty C_f. Analyzují-li se spojené vzorky, jsou nezbytné alespoň čtyři po sobě jdoucí analýzy. V případě zkoušených látek, jejichž příjem probíhá pomalu, jsou vhodnější sedmidenní intervaly. Nedosáhne-li se rovnovážného stavu do 28 dnů, pak se buď vypočítá hodnota BCF pouze pomocí kinetické metody, která není závislá na dosažení rovnovážného stavu, anebo může být fáze příjmu prodloužena do jeho dosažení, přičemž se provádějí další měření, nebo na 60 dnů, podle toho, co nastane dříve. Koncentrace zkoušené látky v rybách na konci fáze příjmu také musí být dostatečně vysoká, aby byl zajištěn spolehlivý odhad hodnoty k_2 z fáze vylučování. Není-li zjištěn výrazný příjem po 28 dnech, lze zkoušku zastavit.

Délka fáze vylučování

U látek splňujících kinetiku prvního řádu je doba odpovídající polovině délky fáze příjmu obvykle dostatečná, aby se přiměřeně snížil (např. o 95 %) obsah látky v organismu (pro vysvětlení odhadu – srov. dodatek 5). Jestliže doba nezbytná pro dosažení 95 % úbytku je neprakticky dlouhá, překračuje například dvakrát běžnou délku fáze příjmu (tj. více než 56 dnů), může být použita kratší doba (např. dokud není koncentrace zkoušené látky menší než 10 % koncentrace v rovnovážném stavu). V případě látek se složitějším charakterem příjmu a vylučování, než jaký představuje model ryby s jedním kompartmentem řídícím se kinetikou prvního řádu, však mohou být nezbytné delší fáze vylučování. Je-li zaznamenán a/nebo se předpokládá takový složitější charakter, doporučuje se obrátit se o radu k biostatistikovi a/nebo farmakokinetikovi a zajistit vhodné nastavení zkoušky. Pokud se fáze vylučování prodlouží, může být počet ryb pro odběr vzorků omezený a výsledky mohou být ovlivněny rozdíly v růstu mezi rybami. Délka fáze však bude určena také dobou, po kterou zůstává koncentrace zkoušené látky v rybách nad analyticky stanovenou mezí kvantifikace.

Počty zkušebních ryb

Počet ryb na jednu zkušební koncentraci se zvolí tak, aby byly pro každý odběr vzorků k dispozici nejméně čtyři ryby. Ryby by měly být slučovány pouze v případě, že analýza jediné ryby je neproveditelná. Je-li cílem větší přesnost při stanovení křivky (a odvozených parametrů) nebo jsou-li požadovány studie metabolismu (např. za účelem rozlišení mezi metabolity a mateřskou látkou při použití radioizotopově značených zkoušených látek), bude nezbytný větší počet ryb pro každý odběr vzorků. Obsah lipidů by měl být stanoven na stejném biologickém materiálu, jaký je použit ke stanovení koncentrace zkoušené látky. Pokud by to nebylo proveditelné, mohou být zapotřebí další ryby (srov. odstavce 56 a 57).

Použijí-li se dospělé (tj. pohlavně zralé) ryby, neměly by být ve stavu tření nebo vytřené nedávno před zkouškou nebo v jejím průběhu. Mělo by se též uvést, zda byli v experimentu použiti samci, nebo samice, nebo obě pohlaví. Jsou-li použita obě pohlaví, mělo by být před započetím expozice prokázáno, že rozdíl v růstu a v obsahu lipidů mezi oběma pohlavími není významný; zejména pokud se předpokládá, že bude nezbytné sloučení rybích samců a samic, aby byly zajištěny zaznamenatelné koncentrace látky a/nebo zaznamenatelný obsah lipidů.

▼M7

V každé zkoušce se vyberou ryby podobné hmotnosti, tak aby hmotnost nejmenší z nich nebyla nižší než dvě třetiny hmotnosti největší ryby. Všechny by měly být stejného stáří a měly by pocházet ze stejného zdroje. Vzhledem k tomu, že hmotnost a stáří ryby mohou mít významný vliv na hodnoty BCF (12), musí být tyto podrobnosti přesně zaznamenány. Doporučuje se zvážit krátce před zahájením zkoušky dílčí vzorek obsádky s cílem odhadnout střední hodnotu hmotnosti (srov. odstavec 61).

Nasazování

Měl by se zvolit vysoký poměr množství vody k množství ryb, aby se minimalizovalo snížení koncentrace zkoušené sloučeniny ve vodě způsobené přidáním ryb na začátku zkoušky, a také proto, aby nedošlo k poklesu koncentrace rozpuštěného kyslíku. Je důležité, aby rychlost nasazování byla přiměřená použitému druhu. V každém případě se obvykle doporučuje rychlost nasazování 0,1 až 1,0 g ryb (živá hmotnost) na litr vody za den. Vysoká rychlost nasazování může být zvolena, je-li prokázáno, že požadovaná koncentrace zkoušené látky může být udržována v mezích ± 20 % a že koncentrace rozpuštěného kyslíku neklesne pod 60 % nasycení (srov. odstavec 24).

Při volbě vhodného režimu nasazování má být přihlédnuto k obvyklému přirozenému prostředí ryb. Například ryby žijící u dna mohou vyžadovat při stejném objemu vody větší plochu dna v akváriu než pelagické druhy ryb.

Krmení

Během aklimatizace a po dobu zkoušky se ryby krmí vhodnou potravou se známým obsahem tuku a celkových bílkovin podávanou v množství dostatečném pro udržení zdravého stavu a pro udržení tělesné hmotnosti (určitý růst je přípustný). Ryby se krmí denně v průběhu aklimatizace a po dobu zkoušky stanoveným množstvím podle použitého druhu ryb, zkušebních podmínek a kalorické hodnoty potravy (např. u pstruha duhového přibližně 1 až 2 % tělesné hmotnosti za den). Množství potravy by mělo být zvoleno tak, aby se zamezilo rychlému růstu a velkému nárůstu obsahu lipidů. Aby bylo možno zachovat stejné množství potravy, měla by být případně, například jednou týdně, nově přepočítána velikost krmných dávek. Hmotnost ryb v každé nádrži může být pro tento výpočet odhadnuta z hmotnosti ryb naposledy odebraných z dotyčné nádrže. Ryby, které zůstaly v nádrži, se neváží.

Nezkrmená potrava a exkrety by se měly denně odstraňovat ze zkušebních nádrží odsátím krátce po krmení (30 minut až 1 hodina). Nádrže by se měly udržovat v celém průběhu zkoušky v co nejvyšší čistotě, aby byla koncentrace organických látek co nejnižší (srov. odstavec 29), neboť přítomnost organického uhlíku může snižovat biologickou dostupnost zkoušené látky (12).

Poněvadž mnoho krmiv pochází z rybí moučky, mělo by se zajistit, že krmivo nebude ovlivňovat výsledky zkoušky ani vyvolávat nepříznivé účinky, např. kontaminací pesticidy nebo stopami pesticidů, těžkými kovy a/nebo přímo zkušební látkou.

Světlo a teplota

Doporučuje se fotoperioda 12 až 16 hodin a teplota (± 2 °C) by měla odpovídat zkušebnímu druhu (srov. dodatek 3). Druh a charakteristiky osvětlení by měly být známy. Měla by být věnována pozornost možné fototransformaci zkoušené látky za světelných podmínek studie. Mělo by být použito vhodné osvětlení, aby ryby nebyly vystaveny fotoproduktům nevyskytujícím se v přírodě. V některých případech může být vhodné použít filtr pro odfiltrování UV záření s vlnovou délkou kratší než 290 nm.

▼M7

Zkušební koncentrace

Zkouška byla původně určena pro nepolární organické látky. U látek tohoto druhu se očekává, že bude dostatečná expozice ryb jediné koncentraci, jelikož se neočekávají žádné účinky koncentrace, ačkoli příslušný regulační rámec může vyžadovat použití dvou koncentrací. Jsou-li zkoušeny látky, které nepatří do této oblasti, nebo pokud jsou známy jiné známky možné závislosti na koncentraci, měla by být zkouška provedena s dvěma nebo více koncentracemi. Je-li zkoušena pouze jedna koncentrace, mělo by se uvést odůvodnění použití jediné koncentrace (srov. odstavec 79). Zkoušená koncentrace by také měla být co nejnižší, nakolik je to praktické nebo technicky možné (tj. nikoli blízká mezi rozpustnosti),

V některých případech lze předpokládat, že biokoncentrace látky je závislá na koncentraci ve vodě (např. u kovů, kde příjem u ryb je možné alespoň částečně regulovat). V takovém případě je nezbytné, aby byly zkoušeny nejméně dvě, ale nejlépe více koncentrací (srov. odstavec 49), které jsou běžné v životním prostředí. Také v případě látek, u kterých zkoušené koncentrace z praktických důvodů musí být blízké mezi rozpustnosti, se doporučuje zkoušet nejméně dvě koncentrace, protože to může poskytnout informace o spolehlivosti zkušebních koncentrací. Zvolené zkušební koncentrace by měly zahrnovat koncentraci reálnou v životním prostředí i koncentraci, která odpovídá účelu konkrétního posouzení.

Koncentrace zkoušené látky by se měla (měly) vybrat tak, aby byly nižší než úroveň jejích chronických účinků nebo než 1 % její asymptotické hodnoty akutní LC_{50}, v rozpětí běžném pro životní prostředí a aby byla nejméně o jeden řád vyšší než je mez kvantifikace této látky ve vodě při použité analytické metodě. Nejvyšší přípustnou zkušební koncentraci lze také stanovit dělením akutní 96hodinové LC_{50} příslušným poměrem akutní/chronické letální dávky (např. u některých látek může být koeficient přibližně tři, ale u několika je vyšší než 100). Použije-li se druhá koncentrace, měla by být navýšena faktorem 10. Není-li to možné z důvodu kritéria toxicity (které limituje vyšší zkušební koncentraci) a z důvodu meze analytické metody (která limituje nižší zkušební koncentraci), může být použit nižší faktor než 10 nebo by mělo být zváženo použití zkoušené látky (nejvyšší čistoty, např. nejlépe > 98 %) značené radioizotopově. Je třeba dát pozor, aby žádná z použitých koncentrací nebyla vyšší než mez rozpustnosti zkoušené látky ve zkušebním médiu.

Kontroly

Kromě zkušebních sérií by měl být proveden kontrolní experiment s ředicí vodou, která popřípadě obsahuje rozpouštědlo (srov. odstavce 30 a 31).

Četnost měření kvality vody

V průběhu zkoušky by mělo být v každé zkušební a kontrolní nádrži měřeno množství rozpuštěného kyslíku, TOC, pH a teplota. Celková tvrdost a popřípadě salinita by měly být měřeny v kontrolních experimentech a v jedné nádrži. Jsou-li zkoušeny dvě nebo více koncentrací, měří se tyto parametry při vyšší (nebo nejvyšší) koncentraci. Množství rozpuštěného kyslíku a popřípadě salinita by měly být měřeny alespoň třikrát – na začátku, přibližně uprostřed a na konci fáze příjmu – a jednou týdně ve fázi vylučování. Hodnota TOC by měla být měřena na začátku zkoušky (24 hodin a 48 hodin před započetím fáze příjmu) před nasazením ryb a alespoň jednou týdně jak v průběhu fáze příjmu, tak v průběhu fáze vylučování. Teplota by měla být měřena a zaznamenávána denně, pH na začátku a na konci každé fáze a tvrdost vody jednou v průběhu každé zkoušky. Teplota by měla být měřena nejlépe nepřetržitě alespoň v jedné nádrži.

▼M7

Odběr vzorků a analýza ryb a vody

Harmonogram odebírání vzorků ryb a vody

Voda ze zkušebních nádrží by se pro stanovení koncentrace zkoušené látky měla odebírat před nasazením ryb a během fáze příjmu i během fáze vylučování. Vzorky vody by se měly odebírat před krmením, ve stejnou dobu jako vzorky ryb. Častější odběr vzorků může být užitečný pro zajištění stabilních koncentrací po nasazení ryb. Během fáze příjmu by se měly stanovovat koncentrace zkoušené látky, aby se ověřilo, že jsou v souladu s kritérii validity (odstavec 24). Pokud analýzy vzorků vody na počátku fáze vylučování ukážou, že zkoušená látka není detekována, lze to použít jako odůvodnění, že se ve zkušební vodě v kontrolním experimentu nebude provádět stanovení zkoušené látky po zbytek fáze vylučování.

Ryby by se ke stanovení zkoušené látky měly odebírat alespoň pětkrát během fáze příjmu a alespoň čtyřikrát během fáze vylučování. Vzhledem k tomu, že v mnoha případech bude obtížné s tímto počtem vzorků vypočítat rozumně přesný odhad hodnoty BCF, zejména jde-li o jinou než jednoduchou kinetiku prvního řádu, může být účelné odebírat vzorky v obou fázích častěji (srov. dodatek 4).

Obsah lipidů by se měl stanovovat na stejném biologickém materiálu, jako je použit ke stanovení koncentrace zkoušené látky, nejméně na začátku a na konci fáze příjmu a na konci fáze vylučování. Pokud by to nebylo uskutečnitelné, měly by být při každém z týchž tří odběrů nezávisle odebrány alespoň tři ryby pro stanovení obsahu lipidů. Na začátku experimentu by měl být odpovídajícím způsobem upraven počet ryb v každé nádrži ([1]). Alternativně, pokud u kontrolních ryb (tj. u ryb z kmenové populace) nejsou zjištěna žádná významná množství zkoušené látky, je možné u těchto ryb analyzovat pouze obsah lipidů a analýzu zkoušené látky v exponované skupině (skupinách) (a související hodnoty rychlostní konstanty příjmu, rychlostní konstanty vylučování a BCF) lze upravit o změny podle obsahu lipidů u kontrolní skupiny během zkoušky ([2]).

Na mrtvých nebo nemocných rybách se analýza chemické látky ani obsahu lipidů neprovádí.

Příklad přijatelného časového rozvrhu odběru vzorků je uveden v příloze 4. Jiné plány lze snadno odvodit pomocí předpokládané hodnoty K_{OW}, s níž se vypočítá expoziční doba pro 95 % příjem (výpočty viz dodatek 5).

V odběru vzorků by se mělo pokračovat během fáze příjmu do dosažení rovnovážného stavu (srov. dodatek 1, definice a jednotky) nebo se fáze příjmu ukončí jinak (po 28 nebo 60 dnech, viz odstavce 37 a 38). Před začátkem fáze vylučování by se ryby měly přemístit do čistých nádrží.

Odběr vzorků a příprava vzorků

Vzorky vody pro analýzy by se měly odebírat například odsáváním potrubím z inertního materiálu ze středu zkušební nádrže. Biologicky nedostupná frakce zkoušené látky se nedá často oddělit od biologicky dostupné frakce ani filtrací, ani odstředěním. Použije-li se separační metoda, mělo by se v závěrečné zprávě

([1]) Není-li obsah lipidů analyzován u stejných ryb jako zkoušená látka, měly by mít ryby alespoň podobnou hmotnost a (je-li to podstatné) měly by být stejného pohlaví.

([2]) Tato alternativa je platná pouze v případě, že ryby jsou ve všech zkušebních skupinách chovány v podobném počtu, ryby se odebírají stejným způsobem a jsou stejně krmeny. To zajistí, aby růst ryb ve všech zkušebních skupinách byl podobný, pokud je zkoušená koncentrace nižší než rozpětí toxicity. Je-li růst podobný, lze očekávat, že také obsah lipidů bude podobný. Odlišný růst v kontrole by nasvědčoval účinku látky a studii by zneplatnil.

▼M7

vždy uvést odůvodnění nebo validace této separační metody vzhledem k obtížím s biologickou dostupností. Zejména v případě vysoce hydrofobních látek (tj. látek s hodnotou log K_{OW} > 5) (12) (26), kdy by mohlo dojít k adsorpci na filtrovou matrici nebo na odstřeďovací nádoby, by vzorky neměly být takto zpracovávány. Namísto toho je třeba přijmout opatření pro to, aby byly nádrže udržovány co nejčistší (srov. odstavec 46), a obsah organického uhlíku by měl být pravidelně monitorován jak během fáze příjmu, tak během fáze vylučování.(srov. odstavec 53). Aby se zamezilo možným problémům se sníženou biologickou dostupností, mohou být v případě špatně rozpustných a vysoce hydrofobních látek použity pro odběr vzorků metody mikroextrakce pevné fáze.

Ryba určená pro odběr vzorků by se měla okamžitě usmrtit nejvhodnější humánní metodou (při měření celých ryb by neměly být prováděny žádné další postupy než omytí vodou (srov. odstavec 28) a důkladné osušení). Ryba se zváží a změří se celková délka ([1]). U každého jedince by naměřená hmotnost a délka měly být vztaženy ke koncentraci analyzované látky (a případně k obsahu lipidů), například tak, že se každé rybě ve vzorku přidělí jedinečný identifikační kód.

Ryby a voda se pokud možno analyzují ihned po odběru s cílem předejít degradaci nebo jiným ztrátám a vypočítat přibližné rychlostní konstanty příjmu a vylučování ještě v průběhu zkoušky. Okamžitá analýza rovněž zabrání opožděnému stanovení plató (rovnovážného stavu) při jeho dosažení.

Neprovádí-li se analýza okamžitě, měly by se vzorky uchovat vhodným způsobem. Před zahájením studie je třeba zjistit informace o řádné metodě uchovávání s ohledem na danou zkoušenou látku – například hluboké zmrazení, udržování při 4 °C, vyluhování atd. Délka uchovávání by měla být zvolena tak, aby se zajistilo, že látka během uchovávání nedegraduje.

Kvalita analytické metody

Vzhledem k tomu, že celý postup je určen hlavně správností, přesností a citlivostí analytické metody použité pro analýzu zkoušené látky, je třeba experimentálně kontrolovat, že správnost, přesnost a reprodukovatelnost analýzy látky a rovněž výtěžek zkoušené látky jak z vody, tak ze vzorků ryb jsou pro danou analytickou metodu dostatečné. To by mělo být součástí předběžných zkoušek. Kontroluje se také, zda se zkoušená látka nevyskytuje v použité ředicí vodě. Hodnoty koncentrace zkoušené látky ve vodě a v rybách získané ve zkoušce se podle potřeby korigují na výtěžky a hodnoty pozadí v kontrolních experimentech. Vzorky ryb a vody by se měly zpracovávat tak, aby se minimalizovala kontaminace a ztráty (např. v důsledku adsorpce odběrným zařízením).

Analýza vzorků ryb

Je-li ve zkoušce použit materiál značený radioizotopy, je možné provést analýzu na celkovou aktivitu (tj. pro mateřskou látku i s metabolity) nebo lze provést separaci, tak aby mohla být mateřská látka analyzována samostatně. Má-li být hodnota BCF založena na mateřské látce, měly by být charakterizovány hlavní metabolity, a to minimálně na konci fáze příjmu (srov. odstavec 6). Hlavní metabolity jsou ty metabolity, které představují ≥ 10 % celkového množství reziduí v tkáních ryb, metabolity, které představují ≥ 5 % ve dvou po sobě jsoucích odběrech vzorků, metabolity, které vykazují rostoucí úroveň v průběhu celé fáze příjmu a metabolity se známými toxikologickými obavami. Je-li hodnota BCF pro celé ryby vyjádřená celkovou aktivitou reziduí ≥ 500, může

([1]) Kromě hmotnosti by se měla zaznamenat celková délka, protože porovnání míry nárůstu délky během zkoušky je dobrým ukazatelem toho, zda došlo k nepříznivému účinku.

▼M7

být účelné – a pro určité kategorie látek, např. pesticidy, se to důrazně doporučuje – identifikovat a kvantifikovat hlavní metabolity Některé regulační orgány mohou kvantifikaci takových metabolitů vyžadovat. Jsou-li produkty rozkladu představující ≥ 10 % celkových radioizotopově značených reziduí v rybách identifikovány a kvantifikovány, doporučuje se také identifikovat a kvantifikovat produkty rozkladu ve zkušební vodě. Pokud by to nebylo proveditelné, je třeba to ve zprávě odůvodnit.

Koncentrace zkoušené látky by měla být obvykle stanovena pro každou jednotlivou zváženou rybu. Není-li to možné, mohou být vzorky při každém odběru sdružovány, avšak sdružování omezuje statistické postupy, které lze na údaje aplikovat, takže by měl být do zkoušky nasazen dostatečný počet ryb vyhovující požadovanému sdružování, statistickému postupu a statistické váze. Jako úvod k příslušným postupům sdružování je možno použít odkazy (27) a (28) v seznamu literatury.

Hodnota BCF by kromě hodnoty odvozené ze studie (srov. odstavec 21) měla být vyjádřena jako hodnota normalizovaná na ryby s 5 % obsahem lipidů (na základě živé hmotnosti), pokud nelze prokázat, že zkoušená látka se neakumuluje hlavně v lipidech. Je-li to možné, měl by být obsah lipidů v rybách stanoven při každém odběru a pokud možno v extraktu připraveném pro analýzu zkoušené látky, neboť lipidy musí být často před chromatografickou analýzou odstraněny. Analýza zkoušené látky však často vyžaduje zvláštní extrakční postupy, které by mohly být v rozporu se zkušebními metodami ke stanovení lipidů. V tomto případě (dokud nebudou k dispozici vhodné nedestruktivní instrumentální metody) se doporučuje pro stanovení obsahu lipidů v rybách použít jinou strategii (srov. odstavec 56). Pro stanovení obsahu lipidů by měly být použity vhodné metody (20). Jako standardní metodu lze doporučit extrakční metodu za pomoci chloroformu/methanolu (29), ale jako alternativní metoda se doporučuje Smedesova metoda (31). Tato metoda se vyznačuje srovnatelnou účinností extrakce, vysokou přesností, použitím méně toxických organických rozpouštědel a snadným provedením. Lze použít i jiné metody, jejichž přesnost je srovnatelná s doporučenými metodami, je-li to náležitě odůvodněno. Je důležité použitou metodu podrobně popsat.

Měření růstu ryb

Na začátku zkoušky je třeba jednotlivě zvážit pět až deset ryb z kmenové populace a změřit jejich celkovou délku. Mohou to být tytéž ryby, které se použijí na analýzu lipidů (srov. odstavec 56). Před provedením analýzy chemické látky nebo lipidů by měla být stanovena hmotnost a délka ryb použitých pro každý odběr vzorků jak ze zkušební skupiny, tak z kontrolního experimentu. Měření těchto ryb určených pro odběr vzorků lze použít k odhadu hmotnosti a délky ryb, které zůstávají ve zkušební a kontrolní nádrži (srov. odstavec 45).

ÚDAJE A PŘEDKLÁDÁNÍ ZPRÁV

Zpracování výsledků

Křivku příjmu zkoušené látky je třeba sestrojit vynesením koncentrace látky v/na rybách (nebo ve specifikovaných tkáních) v průběhu fáze příjmu proti času v lineárním měřítku. Dosáhla-li křivka plató, tj. pokud začíná být rovnoběžná s časovou osou, vypočítá se hodnota BCF v rovnovážném stavu (BCF_{SS}) z poměru:

$$\frac{C_f rovnov(střední)}{C_w rovnov(střední)}$$

▼M7

Vývoj hodnoty C_f může být ovlivněn růstem ryb (srov. odstavce 72 a 73). Střední hodnotu zkušební koncentrace (C_w) ovlivňuje kolísání v čase. Lze očekávat, že časově vážená průměrná koncentrace je pro studie bioakumulace relevantnější a přesnější, i když je kolísání v rámci příslušného rozpětí platnosti (srov. odstavec 24). Časově váženou průměrnou koncentraci ve vodě lze vypočítat podle oddílu 1 dodatku 5.

Kinetický biokoncentrační faktor (BCF_K) by se měl stanovit jako poměr k_1/k_2, dvou kinetických rychlostních konstant prvního řádu. Rychlostní konstanty k_1 a k_2 a hodnotu BCF_K je možno odvodit tak, že se křivkou současně prokládají údaje jak o fázi příjmu, tak o fázi vylučování. Alternativně lze hodnotu k_1 a k_2 stanovit postupně (popis a porovnání těchto metod – viz dodatek 5). Rychlostní konstantu vylučování (k_2) bude možná nutné upravit o zředění růstem (srov. odstavce 72 a 73). Není-li křivka příjmu a/nebo křivka vylučování zjevně křivkou prvního řádu, měly by být použity složitější modely (viz odkazy v příloze 5) a měl by být konzultován biostatistik a/nebo farmakokinetik.

Údaje o hmotnosti/délce ryb

V tabulce se uvedou živé hmotnosti a celkové délky jednotlivých ryb ve všech intervalech odběru vzorků zvlášť pro zkušební a pro kontrolní skupinu během fáze příjmu (včetně kmenové populace na začátku příjmu) a během fáze vylučování. U každého jedince by naměřená hmotnost a délka měly být vztaženy ke koncentraci analyzované chemické látky, např. tak, že se každé rybě ve vzorku přidělí jedinečný identifikační kód. Preferovaným měřítkem růstu pro účely úpravy hodnot kinetického BCF o zředění růstem je hmotnost (o metodě používané k úpravě údajů o zředění růstem viz odstavec 73 a dodatek 5).

Úprava o zředění růstem a normalizace lipidů

Růst ryb během fáze vylučování může snížit naměřené koncentrace chemické látky v rybách s tím důsledkem, že celková rychlostní konstanta vylučování (k_2) je větší než ta, která by vyplynula pouze z procesů odstranění (např. dýchání, metabolismus, vyplavením). Kinetické biokoncentrační faktory by měly být upraveny o zředění růstem. Také hodnota BCF_{SS} bude ovlivněna růstem, ale pro úpravu BCF_{SS} o růst není k dispozici žádný schválený postup. V případech výrazného růstu by měla být odvozena také hodnota BCF_K upravená o růst (BCF_{Kg}), neboť může být relevantnějším měřítkem biokoncentračního faktoru. Obsah lipidů v zkušebních rybách (který je úzce spojen s bioakumulací hydrofobních látek) může v praxi výrazně kolísat, takže je nezbytná normalizace na stanovený obsah lipidů v rybách (5 % hmot.), aby bylo možné smysluplně vyjádřit jak kinetické biokoncentrační faktory, tak biokoncentrační faktory v rovnovážném stavu, pokud není možné namítnout, že zkoušená látka se neakumuluje především v lipidech (např. některé perfluorované látky se mohou vázat na proteiny). Rovnice a příklady těchto výpočtů lze najít v dodatku 5.

Aby bylo možno upravit kinetický BCF o zředění růstem, je třeba rychlostní konstantu vylučování upravit o růst. Tato rychlostní konstanta vylučování upravená o růst (k_{2g}) se vypočítá tak, že se od celkové rychlostní konstanty vylučování (k_2) odečte rychlostní konstanta růstu (k_g, získaná z naměřených údajů o hmotnosti). Biokoncentrační faktor upravený o růst se pak vypočítá dělením rychlostní konstanty příjmu (k_1) rychlostní konstantou vylučování upravenou o růst (k_{2g}) (srov. dodatek 5). V některých případech lze tento přístup zpochybnit. Například u velmi pomalu se vylučujících látek zkoušených na rychle rostoucích rybách může být odvozená hodnota k_{2g} velmi malá a chyba ve dvou rychlostních konstantách, které se používají pro její odvození, se tak stává kritickou

▼M7

a v některých případech může být odhad hodnoty k_g větší než hodnota k_2. Alternativní přístup, který obchází nutnost úpravy o zředění růstem, zahrnuje použití údajů o hmotnosti vylučování zkoušené látky na každou rybu (základem je celá ryba), a nikoli obvyklých údajů o hmotnosti zkoušené látky na jednotku hmotnosti ryby (koncentraci). Toho lze snadno dosáhnout, neboť zkoušky podle této metody by měly spojovat naměřené koncentrace v tkáních s hmotností jednotlivých ryb. Jednoduchý postup, jak to provést, je uveden v dodatku 5. Upozorňujeme, že hodnota k_2 by přesto měla být ve zprávě uvedena, i když se použije tento alternativní přístup.

Měl by rovněž být uveden kinetický biokoncentrační faktor a biokoncentrační faktor v rovnovážném stavu ve vztahu k standardnímu 5 % hmot. obsahu lipidů v rybách, pokud není možné namítnout, že zkoušená látka se neakumuluje především v lipidech. Údaje o koncentraci v rybách, nebo hodnoty BCF, se normalizují podle poměru mezi 5 % obsahem lipidů a skutečnou (individuální) střední hodnotou obsahu lipidů (v % živé hmotnosti) (srov. dodatek 5).

Jestliže byly analýzy chemické látky a lipidů prováděny na týchž rybách, měly by být normalizované údaje o lipidech jednotlivých ryb použity pro výpočet BCF s normalizovanými lipidy. Alternativně, je-li růst kontrolních a exponovaných ryb podobný, může být pro úpravu o lipidy použít pouze obsah lipidů v rybách z kontrolního experimentu (srov. odstavec 56). Metoda pro výpočet BCF s normalizovanými lipidy je popsána v dodatku 5.

Interpretace výsledků

Pokud se naměřené koncentrace zkoušených roztoků pohybují na úrovních blízkých mezi detekce analytické metody, je nutno výsledky interpretovat s opatrností.

Aby se vyloučily toxické účinky, průměrný růst ve zkušební i v kontrolní skupině by se v zásadě neměl výrazně lišit. Rychlostní konstanty růstu nebo křivky růstu v obou skupinách by se měly porovnávat vhodným postupem ([1]).

Jasně vymezené křivky příjmu a úbytku jsou ukazatelem dobré kvality údajů o biokoncentraci. Pokud jde o rychlostní konstanty, aby je bylo možno považovat za spolehlivé, měl by výsledek testu dobré shody pro model bioakumulace být v souladu s rozdělením χ^2 (tj. nízké procento chyb měření (32)) (srov. dodatek 5). Je-li použito více než jedna zkušební koncentrace, rozdíl konstant příjmu/vylučování mezi těmito zkušebními koncentracemi by měl být nižší než 20 % ([2]). Pokud bude vyšší, měla by být indikována závislost na koncentraci. Pozorované významné rozdíly v rychlostních konstantách příjmu/vylučování mezi použitými zkušebními koncentracemi by měly být zaznamenány a mělo by být uvedeno jejich možné vysvětlení. 95 % interval spolehlivosti hodnot BCF u dobře navržených studií se obecně blíží ± 20 % odvozené hodnoty BCF.

Jsou-li zkoušeny dvě nebo více koncentrací, výsledky obou nebo všech koncentrací se použijí k ověření, zda jsou výsledky konzistentní, a k prokázání, zda

([1]) Je možné provést *t*-test rychlostní konstanty růstu za účelem, aby se prozkoumalo, zda se liší růst mezi kontrolními a zkušebními skupinami, *F*-test v případě analýzy rozptylu. V případě potřeby lze použít *F*-test nebo test poměru pravděpodobnosti jako pomůcku při výběru vhodného růstového modelu (monografie OECD 54 (32)).

([2]) Tyto procentuální hodnoty předpokládají, že analytické metody jsou spolehlivé a že poločas je < 14 dnů. Pokud jsou analytické metody méně spolehlivé nebo pokud se poločas (výrazně) prodloužil, budou tato čísla větší.

▼M7

existuje závislost na koncentraci. Zkouší-li se pouze jedna koncentrace s cílem snížit použití zvířat a/nebo zdrojů, mělo by být uvedeno odůvodnění použití pouze jedné koncentrace.

Výsledná hodnota BCF_{SS} je pochybná, je-li BCF_K je výrazně větší než BCF_{SS}, jelikož to může ukazovat na to, že nebylo dosaženo rovnovážného stavu nebo že nebylo vzato v úvahu zředění růstem a ztrátové procesy. V případech, kdy je BCF_{SS} o mnoho vyšší než BCF_K, mělo by se zkontrolovat, zda při odvození rychlostních konstant příjmu a vylučování nedošlo k chybám a odvození by se mělo přehodnotit. Odhad hodnoty BCF_K by mohlo zlepšit použití odlišný postupu vynášení údajů na křivku (srov. dodatek 5).

Závěrečná zpráva

Kromě informací o zkoušené látce uvedených v odstavci 3 závěrečná zpráva obsahuje tyto informace:

Zkoušená látka:

Fyzikální povaha a tam, kde je to podstatné, fyzikálně-chemické vlastnosti,

— chemické identifikační údaje, např. název IUPAC nebo CAS, číslo CAS, kód SMILES nebo InChI, strukturní vzorec, čistota, případně chemická identita nečistot, je-li to prakticky proveditelné, atd. (včetně obsahu organického uhlíku, je-li to třeba),

— u vícesložkových látek a UCVB (látky s neznámým nebo proměnlivým složením, komplexní reakční produkty a biologické materiály) pokud možno popis chemické identity jednotlivých složek a u každé složky její procentuální podíl na celkové hmotnosti látky. Mělo by být shrnuto, jak analytická metoda použitá ve zkoušce odráží měření koncentrace látky; měly by být popsány všechny analytické postupy včetně přesnosti metody, meze detekce metody a meze kvantifikace,

— v případě značení radioaktivními izotopy přesná poloha značeného atomu (značených atomů) a procentní podíl radioaktivity spojené s nečistotami,

— informace o toxicitě zkoušené látky pro ryby (v ideálním případě pro zkušební druh). Toxicita by měla být uvedena jako hodnota LC_{50} z 96hodinové akutní zkoušky a hodnoty NOEC/LOEC z chronické studie (tj. zkouška v rané fázi života nebo zkouška celého životního cyklu, jsou-li dostupné),

— podmínky skladování zkoušené chemické látky nebo zkoušené látky a stabilita zkoušené chemické látky nebo zkoušené látky za podmínek skladování, jsou-li skladovány před zkouškou.

Zkušební druh:

Vědecký název, kmen, zdroj, případné předběžné ošetření, aklimatizace, stáří, pohlaví (je-li to relevantní), rozmezí velikostí (hmotnost a délka) atd.

Zkušební podmínky:

— použitý zkušební postup (např. průtokový nebo semistatický), úplná studie nebo v minimalizovaném uspořádání (včetně důvodů a odůvodnění),

— druh a charakteristiky použitého osvětlení a fotoperioda (fotoperiody),

— uspořádání zkoušky (např. počet a velikost zkušebních nádrží, rychlost výměny objemu vody, rychlost nasazování, počet opakování, počet ryb v jednom opakování, počet zkušebních koncentrací, délka fází příjmu a vylučování, četnost odběru vzorků ryb a vzorků vody),

▼M7

— metoda přípravy zásobních roztoků a četnost jejich obnovování (je-li použito rozpouštědlo, je třeba uvést jeho koncentraci a jeho příspěvek k obsahu organického uhlíku ve vodě) nebo popis alternativního dávkovacího systému,

— nominální zkušební koncentrace, střední hodnoty naměřených koncentrací ve zkušebních nádobách, jejich směrodatné odchylky, metody, jimiž byly tyto hodnoty získány, a četnost hodnot,

— zdroj ředicí vody, popis jakékoli předchozí úpravy, výsledky jakéhokoli prokazování schopnosti zkušebních ryb žít v této vodě a charakteristiky vody: hodnota pH, tvrdost, teplota, koncentrace rozpuštěného kyslíku, koncentrace zbytkového chloru (je-li měřena), obsah celkového organického uhlíku, obsah suspendovaných látek, popřípadě salinita zkušebního média a výsledky jakýchkoli jiných provedených měření,

— kvalita vody ve zkušebních nádržích, hodnota pH, tvrdost vody, obsah TOC, teplota a koncentrace rozpuštěného kyslíku; použité metody a intervaly měření,

— podrobné informace o krmení, např. druh krmiva (krmiv), zdroj, složení (pokud možno alespoň obsah lipidů a proteinů), zvolené množství potravy, podávané dávky a četnost),

— informace o zpracování vzorků ryb a vody, včetně podrobností o přípravě, uchovávání, o extrakci a analytických postupech (a přesnosti), pokud jde o zkoušenou látku a obsah tuku,

— použité metody randomizace pro expozici a pro přidělení ryb do zkušebních nádrží,

— datum nasazení zkušebních organismů do zkušebních roztoků a délka zkoušky,

— popis zkoušek ke stanovení rozsahu a jejich výsledky, jsou-li k dispozici.

Výsledky:

— výsledky jakýchkoli provedených předběžných studií,

— úhyn kontrolních ryb a ryb v každé expoziční nádrži a jakékoli pozorované neobvyklé chování,

— informace o jakýchkoli pozorovaných nepříznivých účincích,

— úplný popis všech použitých postupů chemické analýzy, včetně mezí detekce a mezí kvantifikace, variability a výtěžku,

— obsah lipidů v rybách, včetně použité metody jeho stanovení, a pokud byl odvozen, faktor normalizace lipidů (L_n, faktor pro vyjádření výsledků při 5 % obsahu lipidů v rybách),

— v tabulce uvedené údaje o hmotnosti (a délce) ryb vztažené ke koncentracím chemické látky (a případně obsahu lipidů) jak pro kontrolní, tak pro zkušební skupiny (například s použitím jedinečných identifikátorů každé ryby ve vzorku) a výpočty odvozené rychlostní konstanty (konstant) růstu,

▼M7

— údaje o koncentraci zkoušené látky v rybách (C_f, vztažená k jednotlivým rybám) a ve vodě (C_w) (se středními hodnotami pro zkušební a kontrolní skupiny, standardními odchylkami a případně rozpětím) pro všechny odběry (C_f vyjádřená v mg/kg živé hmotnosti celého těla nebo jeho specifikovaných tkání, např. lipidů, a C_w v mg/l), hodnoty C_w pro kontrolní série (měly by být uvedeny i hodnoty pozadí),

— křivky (včetně všech naměřených údajů) zobrazující následující údaje (koncentrace mohou být případně vztaženy na celé tělo a obsah lipidů může být normalizován na 5 % hmotnosti zvířete nebo jeho specifikovaných tkání),

  — růst, tj. hmotnost ryb jako funkce času nebo přirozený logaritmus transformované hmotnosti jako funkce času (včetně odvozené rychlostní konstanty růstu k_g),

  — příjem a vylučování zkoušené látky rybami (v jednom grafu),

  — doba potřebná k dosažení rovnovážného stavu (bylo-li ho dosaženo),

  — přirozený logaritmus transformované koncentrace jako funkce doby příjmu (včetně odvozené rychlostní konstanty příjmu k_1),

  — přirozený logaritmus transformované koncentrace (koncentrace ln) jako funkce doby vylučování (včetně odvozené rychlostní konstanty vylučování k_2) a

  — křivky fáze příjmu a fáze vylučování zobrazující údaje i proloženou modelovou křivku.

— jestliže se vizuální kontrolou grafu zjistí zřetelně odlehlé hodnoty, lze použít statisticky validní test odlehlých hodnot k odstranění nevěrohodných datových bodů spolu s podloženým odůvodněním jejich vypuštění,

— biokoncentrační faktor v rovnovážném stavu (BCF_{SS}), pokud bylo rovnovážného stavu dosaženo nebo téměř dosaženo,

— kinetický bioakumulační faktor (BCF_K) a odvozené rychlostní konstanty příjmu k_1 a vylučování k_2, spolu s odchylkami od k_2 (směrnice a úsek), pokud bylo použito postupné stanovení,

— intervaly spolehlivosti, směrodatná odchylka (je-li k dispozici) a metody výpočtu / datové analýzy každého parametru každé použité koncentrace zkoušené látky,

  — veškeré informace týkající se radioizotopově značených metabolitů zkoušené látky a jejich akumulace,

  — Rychlostní konstanta (konstanty) růstu (včetně 95 % intervalu (intervalů) spolehlivosti a vypočtené rychlostní konstanty vylučování upravené o růst (k_{2g}), poločas a hodnoty BCF (BCF_{Kg}),

  — všechny zvláštnosti zkoušky, všechny odchylky od těchto postupů a ostatní podstatné informace,

  — souhrnná tabulka příslušných naměřených a vypočtených údajů, jak je uvedeno dále:

▼M7

Rychlostní konstanty příjmu a vylučování a biokoncentrační faktory (BCF) látek	
k_g (rychlostní konstanta růstu; den^{-1}):	vložit hodnotu (95 % CI) (1)
k_1 (celková rychlostní konstanta příjmu; l kg^{-1} den^{-1})	vložit hodnotu (95 % CI) (1)
k_2 (celková rychlostní konstanta vylučování; den^{-1}):	vložit hodnotu (95 % CI) (1)
k_{2g} (rychlostní konstanta vylučování upravená o růst; den^{-1}):	vložit hodnotu (95 % CI) (1)
C_f (koncentrace chemické látky v rybách v rovnovážném stavu; mg kg^{-1}):	vložit hodnotu ± SD (2)
C_w (koncentrace chemické látky ve vodě; mg l^{-1}):	vložit hodnotu ± SD (2)
L_n (faktor normalizace lipidů):	vložit hodnotu (3)
BCF_{SS} (BCF v rovnovážném stavu; l kg^{-1}):	vložit hodnotu ± SD (2)
BCF_{SSL} (BCF v rovnovážném stavu s normalizovanými lipidy; l kg^{-1}):	vložit hodnotu ± SD (2)
BCF_K (kinetický BCF; l kg^{-1}):	vložit hodnotu (95 % CI) (1)
BCF_{Kg} (kinetický BCF opravený o růst; l kg^{-1}):	vložit hodnotu (95 % CI) (1)
$t_{1/2g}$ (poločas upravený o růst; dny):	vložit hodnotu (95 % CI) (1)
BCF_{KL} (kinetický BCF s normalizovanými lipidy; l kg^{-1}):	vložit hodnotu
BCF_{KLG} (kinetický BCF s normalizovanými lipidy opravený o růst; l kg^{-1}):	vložit hodnotu

(1) CL: interval spolehlivosti (pokud je možné ho odhadnout).
(2) SD: směrodatná odchylka (pokud je možné ji odhadnout).

Výsledky uvedené při předběžném vývoji metody a uspořádání zkoušky jako „nedetekováno/nekvantifikováno při udané mezi detekce/kvantifikace“, by se používat neměly, neboť takové výsledky nelze použít pro výpočet rychlostních konstant.

C.13 – II **MINIMALIZOVANÁ ZKOUŠKA NA RYBÁCH S EXPOZICÍ VE VODNÍM PROSTŘEDÍ**

ÚVOD

Rostoucí zkušenosti, které při provádění a interpretaci úplné zkoušky získaly laboratoře a regulační orgány, ukazují, že – s určitými výjimkami – pro odhad rychlostních konstant příjmu a vylučování platí kinetika prvního řádu. Rychlostní konstanty příjmu a vylučování tak lze odhadnout při minimu odběrů a odvodit hodnotu kinetického BCF.

Původním účelem zkoumání alternativního uspořádání studií BCF bylo vyvinout jednodušší zkoušku, kterou by bylo možné použít jako krok průběžného testování za účelem zamítnutí nebo potvrzení odhadů BCF založených na K_{OW} a QSAR,

▼M7

a vyhnout se tak nutnosti provádět úplnou studii mnoha látek a minimalizovat náklady a použití zvířat tím, že se sníží odběry vzorků a počet prováděných analytických sérií. Při dodržení hlavního uspořádání podle předchozí zkušební metody, aby bylo možné výsledky zkoušky začlenit do existujících údajů BCF a usnadnila se interpretace zkoušek a údajů, bylo cílem poskytnout dostatečně správné a přesné odhady BCF pro přijímání rozhodnutí při posuzování rizik. Platí mnohé stejné úvahy jako v úplné zkoušce, např. kritéria validity (srov. odstavec 24) a zastavení zkoušky, pokud je na konci fáze příjmu zjištěn nevýznamný příjem (srov. odstavce 16 a 38).

Látky, způsobilé pro minimalizované uspořádání zkoušky, by měly patřit do celkové oblasti látek, pro které byla tato zkušební metoda vyvinuta, tj. nepolární organické látky (srov. odstavec 49). Pokud se vyskytne jakýkoli ukazatel, že látka, která má být zkoušena, by se mohla chovat jinak (např. jasná odchylka od kinetiky prvního řádu), měla by se pro účely právních předpisů provést úplná zkouška.

Minimalizovaná zkouška obvykle netrvá kratší dobu než standardní test ke stanovení BCF, ale provádí se při ní méně odběrů ryb. V případě rychle vylučovaných látek však je možné vylučovací fázi zkrátit, aby nedošlo k tomu, že koncentrace v rybách klesnou před ukončením zkoušky na hodnotu nižší, než je mez detekce/kvantifikace. Minimalizovanou zkoušku expozice ryb s jedinou koncentrací lze použít ke stanovení, zda je nutná úplná zkouška a jsou-li výsledné údaje používané pro výpočet rychlostních konstant a BCF robustní (srov. odstavec 93), lze od úplné zkoušky upustit, pokud je výsledná hodnota BCF vzdálená od předmětných hodnot stanovených v právních předpisech.

V některých případech může být výhodné provést zkoušku v minimalizovaném uspořádání s více než jednou zkušební koncentrací jako předběžný test ke stanovení toho, zda odhady BCF určité látky jsou závislé na koncentraci. Pokud odhady BCF z minimalizované zkoušky nasvědčují závislosti na koncentraci, bude nezbytné provést úplnou zkoušku. Jestliže na základě takové minimalizované zkoušky jsou odhady BCF na koncentraci nezávislé, avšak výsledky nejsou považovány za konečné, mohla by se jakákoli následná úplná zkouška provést při jediné koncentraci, což sníží použití zvířat v porovnání s úplnou zkouškou se dvěma (nebo více) koncentracemi.

Látky potenciálně vhodné pro minimalizovanou zkoušku by měly:

— spíše vykazovat kinetiku příjmu a vylučování blížící se kinetice prvního řádu, např. na základě údajů odvozených z analogických látek,

— mít hodnotu log K_{OW} < 6, pokud se neočekává rychlý metabolismus ([1]),

— být dostatečně rozpustné ve vodě s ohledem na analytickou metodu (srov. odstavec 24),

— být jasně kvantifikovatelné (tj. koncentrace by měly být nejméně o jeden řád vyšší než mez kvantifikace), a to jak v rybách, tak ve vodě, doporučuje se radioizotopové značení (srov. odstavec 23),

— mít vylučovací fázi delší, než je jejich předpovězený poločas (výpočet srov. dodatek 5), nebo by délka fáze vylučování měla být odpovídajícím způsobem upravena (srov. odstavec 91). Výjimka z tohoto pravidla je přípustná, pokud se očekává rychlý metabolismus dané látky.

([1]) Minimalizovaná zkouška může být ve skutečnosti použita k prokázání rychlého metabolismu, pokud je známo, že rychlý metabolismus je pravděpodobný.

▼M7

HARMONOGRAM ODBĚRU VZORKŮ PRO STUDIE S MINIMALIZOVANÝM USPOŘÁDÁNÍM

Odběr vzorků ryb

Odběr vzorků ryb je omezen na čtyři odběry:

— uprostřed a na konci fáze příjmu (konec je zároveň začátkem fáze vylučování), např. po 14 a 28 dnech (33),

— uprostřed fáze vylučování a při ukončení studie (pokud je koncentrace látky < 10 % nejvyšší koncentrace nebo pokud byl alespoň zjevně překročen poločas látky), např. po 7 a 14 dnech vylučování (33). Očekává-li se nebo je zjištěno rychlé vylučování, může být nezbytné fázi vylučování zkrátit, aby nedošlo k tomu, že koncentrace v rybách klesnou níže, než je mez kvantifikace,

— měření lipidů jako při úplné studii,

— úprava o růst jako při úplné studii,

— hodnota BCF se vypočítá jako kinetický BCF.

Odběr vzorků vody

Při minimalizovaném uspořádání se vzorky vody odebírají jako při úplné studii (srov. odstavec 54) nebo alespoň pětkrát ve stejných intervalech ve fázi příjmu a každý týden ve fázi vylučování.

Změny v uspořádání

S ohledem na vlastnosti zkoušené látky, platné předpovědi QSAR a konkrétní účel studie je možné zvážit některé změny v uspořádání studie:

— Je-li požadována větší přesnost, mohlo by být ve vzorku na konci fáze příjmu použito více ryb (6 nebo 8 namísto 4).

— Zařazení „doplňkové“ skupiny ryb, která se použije, pokud vylučování po 14 dnech (nebo na předpovězeném konci fáze vylučování) nebylo dostatečné pro dosažení odpovídající hodnoty vylučování (tj. > 50 %). Pokud předpovězené trvání fáze vylučování je kratší nebo delší než 14 dnů, měl by se časový rozvrh odběru vzorků upravit (tj. jedna skupina ryb na konci předpovězeného konce fáze vylučování, a jedna skupina po uplynutí poloviny této doby).

— Použití dvou zkušebních koncentrací s cílem zkoumat možnou závislost na koncentraci. Jestliže výsledky minimalizované zkoušky prováděné se dvěma zkušebními koncentracemi ukážou, že BCF není závislý na koncentraci (např. hodnoty se liší o méně než 20 %), lze v úplné zkoušce, pokud bude provedena, považovat jednu zkušební koncentraci za dostačující.

— Jeví se jako pravděpodobné, že modely bioakumulačních procesů, např. takové, které navrhuje Arnot *et al.* (35), lze použít jako podpůrné při plánování délky fází příjmu a vylučování (viz též dodatek 5)

Výpočty

Argumentem, který svědčí pro použití tohoto přístupu, je skutečnost, že biokoncentrační faktor lze v úplné zkoušce stanovit buď jako biokoncentrační faktor v rovnovážném stavu (BCF_{SS}) tak, že se vypočítá poměr koncentrace zkoušené látky v rybích tkáních a koncentrace zkoušené látky ve vodě, nebo se vypočítá kinetický biokoncentrační faktor (BCF_K) jako poměr rychlostní konstanty příjmu k_1 a rychlostní konstanty vylučování k_2. BCF_K je platný i v případě, kdy nebylo dosaženo rovnovážné koncentrace látky během fáze příjmu, za předpokladu, že příjem i vylučování probíhají přibližně v souladu s kinetickými procesy prvního řádu. Ke stanovení rychlostních konstant příjmu a vylučování jsou jako absolutní

▼M7

minimum požadovány dva odběry vzorků, jeden na konci fáze příjmu (tj. na začátku fáze vylučování) a druhý na konci (nebo po uplynutí podstatné části) fáze vylučování. Pro kontrolu kinetiky příjmu a vylučování se doporučuje zařadit mezi oba výše uvedené odběry vzorků ještě třetí odběr ([1]). Výpočty viz dodatky 5 a 6.

Interpretace výsledků

K posouzení validity a informační hodnoty zkoušky ověřte, že fáze vylučování je delší než poločas. Rovněž hodnota BCF_{Km} (kinetický BCF odvozený z minimalizované zkoušky) by se měl porovnat s hodnotou BCF_{SS} z minimalizované zkoušky (což je BCF_{SS} vypočtený na konci fáze příjmu, za předpokladu, že bylo dosaženo rovnovážného stavu. To lze pouze předpokládat, neboť počet odběrů vzorků není dostatečný, aby to bylo možné prokázat). Je-li $BCF_{Km} < BCF_{SS}$ z minimalizované zkoušky, pak by upřednostněnou hodnotou měl být BCF_{SS} z minimalizované zkoušky. Je-li BCF_{Km} menší než 70 % BCF_{SS} z minimalizované zkoušky, nejsou výsledky validní a měla by se provést úplná zkouška.

Pokud minimalizovaná zkouška vede k BCF_{Km} poblíž jakékoli hodnoty, která je předmětem právní úpravy, měla by se provést úplná zkouška. Je-li výsledek vzdálený od jakékoli hodnoty, která je předmětem právní úpravy, nemusí být úplná zkouška nezbytná nebo lze provést úplnou zkoušku s jedinou koncentrací, pokud to vyžaduje platný právní rámec.

Jestliže se po minimalizované zkoušce s jednou koncentraci zjistí, že úplná zkouška je nezbytná, lze tuto úplnou zkoušku provést při druhé koncentraci. Jsou-li výsledky shodné, lze od další úplné zkoušky při jiné koncentraci upustit, neboť se nepředpokládá, že biokoncentrace látky je závislá na koncentraci. Pokud byla provedena minimalizovaná zkouška při dvou koncentracích a pokud výsledky nevykazují závislost na výsledku, lze provést úplnou zkoušku pouze s jednou koncentrací (srov. odstavec 87).

Závěrečná zpráva

Závěrečná zpráva o minimalizované zkoušce by měla obsahovat všechny informace požadované v případě úplné zkoušky (srov. odstavec 81), s výjimkou těch, které není možné získat (např. křivka vyjadřující dobu potřebnou k dosažení rovnovážného stavu a biokoncentrační faktor v rovnovážném stavu; namísto uvedeného faktoru by měl být uveden BCF_{ss} z minimalizované zkoušky). Měla by rovněž obsahovat zdůvodnění, proč byla použita minimalizovaná zkouška, a výslednou hodnotu BCF_{Km}.

C.13 – III: **ZKOUŠKA BIOAKUMULACE V RYBÁCH S EXPOZICÍ V POTRAVĚ**

ÚVOD

Metoda popsaná v tomto oddíle by se měla používat pro látky, u kterých není možné použít metodiku expozice ve vodním prostředí (například protože není možné udržet stabilní, měřitelnou koncentraci této látky ve vodě nebo není možné za 60 dnů expozice dosáhnout jejího dostatečného obsahu v těle; viz předchozí oddíly věnované metodě expozice ve vodním prostředí). Je však třeba si uvědomit, že koncovým bodem této zkoušky bude potravní bioobohacovací faktor (BMF), a nikoli bioakumulační faktor (BCF) ([2]).

V květnu 2001 byla na konferenci SETAC Europe, která se konala v Madridu, předložena nová metoda pro zkoušení bioakumulace organických látek špatně rozpustných ve vodě. Tato práce navazovala na různé studie bioakumulace uvedené v literatuře, používající metodu dávkování zahrnující obohacená krmiva

([1]) Jsou-li měřeny pouze dva odběry vzorků, lze odhad intervalů spolehlivosti BCF_{Km} provést s použitím pomocí metod postupného výpočtu (bootstrap). Pokud jsou rovněž k dispozici údaje z mezilehlých odběrů, lze intervaly spolehlivosti BCF_{Km} vypočítat stejně jako v úplné zkoušce.

([2]) Definice a jednotky viz dodatek 1.

▼M7

(např. (36)). Na počátku roku 2004 byl na zasedání pracovní skupiny EU PBT předložen návrh protokolu (38) určeného k měření bioakumulačního potenciálu organických látek špatně rozpustných ve vodě, u kterých nebylo možné použít standardní metodu bioakumulace s expozicí ve vodě, spolu s podpůrným podkladovým dokumentem (39). Dalším odůvodněním ve prospěch metody bylo, že k potenciální expozici takovým špatně rozpustným látkám (tj. s hodnotou log K_{OW} >5) v životním prostředí může dojít hlavně prostřednictvím potravy (viz (40) (41) (42) (43) (44)). Z tohoto důvodu se v některých zveřejněných nařízeních o chemických látkách odkazuje na zkoušky expozice v potravě ([1]). Je však třeba si uvědomit, že zde popsaná metoda se pečlivě vyhýbá expozici ve vodné fázi a že hodnotu BMF z této zkušební metody tedy nelze přímo srovnávat s hodnotou BMF ze studie za reálných podmínek (ve které je možné kombinovat expozici ve vodě i potravě).

Tento oddíl této zkušební metody je založen na tomto protokolu (38) a představuje novou metodu, která se v předchozí verzi zkušební metody C.13 neobjevila. Tato alternativní zkouška umožňuje za řízených laboratorních podmínek přímo zkoumat způsob expozice v potravě.

Potenciální výzkumníci se odkazují na odstavce 1 až 14 této zkušební metody, kde najdou informace ohledně toho, kdy je možné zkoušku expozice v potravě upřednostnit před zkouškou expozice ve vodním prostředí. Informace o různých aspektech látek jsou dostupné a měly by být před provedením zkoušky zváženy.

Lze zvážit použití radioizotopově značených zkoušených látek za stejných okolností jako při metodě expozice ve vodním prostředí (srov. odstavce 6 a 65).

Metodu expozice v potravě lze použít ke zkoušení více než jedné látky v rámci jediné zkoušky, pokud jsou splněna určitá kritéria; tato kritéria jsou dále rozvedena v odstavci 112. Kvůli jednoduchosti zde uvedená metodika popisuje zkoušku, ve které je použita pouze jedna zkoušená látka.

Zkouška s expozicí v potravě se v mnohém podobá metodě expozice ve vodním prostředí, vyjma způsobu expozice. Mnohé zde popsané aspekty této metody se proto překrývají s metodou expozice ve vodním prostředí, která byla popsána v předchozím oddíle. Tam, kde je to možné, se odkazuje na odstavce v předchozím oddíle, ale v zájmu srozumitelnosti a pochopení je určitá míra zdvojení nevyhnutelná.

PODSTATA ZKOUŠKY

Lze použít průtokové nebo semistatické podmínky (srov. odstavec 4); průtokové podmínky se doporučují pro omezení potenciální expozice zkoušené látce prostřednictvím vody v důsledku jakékoli desorpce z obohacené potravy nebo výměšků. Zkouška se skládá ze dvou fází: příjmu (s krmivem obohaceným zkoušenou látkou) a vylučování (s čistým, neupraveným krmivem) (srov. odstavec 16). Ve fázi příjmu se „exponované“ skupině denně podává stanovená dávka komerční rybí potravy o známém složení, obohacené zkoušenou látkou. V ideálním případě by ryby měly požít všechnu nabízenou potravu (srov. odstavec 141). Rybám je poté během fáze vylučování podávána čistá, neupravená obchodní rybí potrava. Stejně jako při metodě expozice ve vodním prostředí může být podle potřeby použito více než jedna zkušební skupina s různými koncentracemi přidané zkoušené látky, ale pro většinu vysoce hydrofobních organických zkoušených látek je jedna zkušební skupina dostatečná (srov. odstavce 49 a 107). Jsou-li použity semistatické podmínky, měly by se ryby

([1]) Pro účely nařízení (ES) č. 1907/2006 o registraci, hodnocení, povolování a omezování chemických látek (REACH) (Úř. věst. L 396, 30.12.2006, s. 1) se o této otázce pojednává v „Pokynech ohledně požadavků na informace a posuzování chemické bezpečnosti“, kapitoly R.7c, R.7.10.3.1; R.7.10.4.1 a obrázek R7.10–2.

▼M7

na konci fáze příjmu přemístit do nového média a/nebo do nové zkušební nádrže (pro případ, že médium a/nebo přístroje a pomůcky použité ve fázi příjmu byly kontaminovány zkoušenou látkou prostřednictvím vyplavování). Koncentrace zkoušené látky v rybách se měří v obou fázích zkoušky. Vedle skupiny ryb, kterým se podává obohacená potrava (zkušební skupina) je držena kontrolní skupina ryb za stejných podmínek a krmena stejně až na to, že dávky komerční rybí potravy nejsou obohaceny zkoušenou látkou. Tato kontrolní skupina umožňuje u neexponovaných ryb kvantifikovat hodnoty zkoušené látky v pozadí a slouží ke srovnání s jakýmikoli nepříznivými účinky spojenými s expozicí zjištěnými v zkušební skupině (skupinách) ([1]). Umožňuje rovněž porovnání rychlostních konstant růstu mezi skupinami jako kontrolu, že byla požita podobná množství nabízené potravy (při vysvětlení různých rychlostních konstant růstu by měly být vzaty v úvahu také potenciální rozdíly v chutnosti jednotlivých krmiv; srov. odstavec 138). Je důležité, aby během fáze příjmu i vylučování byla zkušební i kontrolní skupině podávána nutričně rovnocenná potrava.

Na základě zkušeností subjektů, které tuto metodu vyvinuly (38) (39), je fáze příjmu, která trvá 7 až 14 dnů, obvykle dostatečná. Toto rozmezí by mělo minimalizovat náklady na provedení zkoušky, a přitom by u většiny látek mělo přesto zaručovat dostatečnou expozici. V některých případech však je možné fázi příjmu prodloužit (srov. odstavec 127). Během fáze příjmu koncentrace látky v rybách nemusí dosáhnout rovnovážného stavu, takže zpracování údajů a výsledky této metody jsou obvykle založeny na kinetické analýze reziduí ve tkáních. (Poznámka: Zde je možné použít rovnice pro odhadnutí doby potřebné k dosažení rovnovážného stavu stejně jako u zkoušky expozice ve vodním prostředí – viz dodatek 5). Fáze vylučování začíná, když je rybám poprvé podána neobohacená dávka, a obvykle trvá až 28 dnů nebo do doby, kdy zkoušenou látku již není možné v celých rybách kvantifikovat, podle toho, co nastane dříve. Fázi vylučování je možné zkrátit nebo ji prodloužit na více než 28 dnů, v závislosti na tom, jak se s postupem času mění naměřené koncentrace chemické látky a velikost ryb.

Tato metoda umožňuje stanovit pro zkušební látku v rybách látkově specifický poločas ($t_{1/2}$, z rychlostní konstanty vylučování k_2), účinnost vstřebání (absorpce ve střevech; *a*), kinetický potravní bioobohacovací faktor (BMF_K), o růst upravený kinetický potravní bioobohacovací faktor (BMF_{Kg}) a o lipidy upravený ([2]) kinetický potravní bioobohacovací faktor (BMF_{KL}) (a/nebo o růst a lipidy upravený kinetický potravní bioobohacovací faktor (BMF_{KgL}). Stejně jako v metodě expozice ve vodním prostředí, nárůst hmotnosti ryb během zkoušky povede k ředění zkoušené látky v rostoucích rybách, a hodnota (kinetického) BCF bude tedy podhodnocena, nebude-li upravena o růst (srov. odstavce 162 a 163). Jestliže se odhadem stanoví, že ve fázi příjmu bylo dosaženo rovnovážného stavu, je možné rovněž vypočítat orientační hodnotu BMF v rovnovážném stavu. Jsou k dispozici postupy, jež umožňují odhadnout hodnotu kinetického bioobohacovacího faktoru (BCF_K) z údajů získaných ve studii potravy (např. (44) (45) (46) (47) (48)). O silných a slabých stránkách těchto postupů se pojednává v dodatku 8.

([1]) U většiny zkoušených látek by v ideálním případě neměly být ve vodě kontrolní skupiny žádné nálezy. Koncentrace v pozadí by se měly týkat pouze materiálů vyskytujících se v přírodě (např. některých kovů) a látek, které jsou všudypřítomné v životním prostředí.

([2]) Jelikož je BMF definován jako poměr koncentrace látky v organismu a koncentrace látky v potravě podávané tomuto organismu v rovnovážném stavu, berou se v úvahu lipidy provedením úpravy o obsah lipidů v organismu a v potravě, a tento postup se tudíž přesněji označuje jako „úprava“. Tento postup se liší od „normalizace“ na stanovený obsah lipidů v organismu, která se provádí při zkoušce bioakumulace s expozicí ve vodním prostředí.

▼M7

Zkouška byla vyvinuta především pro zkoumání špatně rozpustných nepolárních organických látek, jejichž příjem a vylučování u ryb se přibližně řídí kinetikou prvního řádu. V případě, že se zkouší látka, jejíž příjem a vylučování se ani přibližně neřídí kinetikou prvního řádu, měly by být použity složitější modely (viz odkazy v dodatku 5) a měl by být konzultován biostatistik a/nebo farmakokinetik.

Hodnota BMF se obvykle stanovuje pomocí analýzy zkoušené látky v celých rybách (na základě živé hmotnosti). Je-li to důležité pro účely studie, lze odebrat specifické tkáně (např. svalovinu, játra), pokud se ryba rozdělí na jedlý a nejedlý podíl (srov. odstavec 21). Lze též provést vyjmutí a samostatnou analýzu gastrointestinálního traktu ke stanovení příspěvku ke koncentracím v celých rybách při odběrech vzorků na konci fáze příjmu a u začátku fáze vylučování anebo v rámci metody hmotnostní bilance.

Měl by se měřit obsah lipidů v celých rybách ve vzorku, aby mohly být koncentrace upraveny o lipidy, přičemž je třeba vzít v úvahu obsah lipidů v potravě i v rybách (srov. odstavce 56 a 57 a dodatek 7).

Je nutné měřit a zaznamenávat hmotnost jedinců ve vzorku, a to ve spojitosti s koncentrací analyzované chemické látky u daného jedince (např. lze ji udávat s použitím jedinečného identifikačního kódu pro každou rybu ve vzorku), za účelem vypočítání růstu, ke kterému může dojít během zkoušky. Měřit by se pokud možno měla také celková délka ryb ([1]). Údaje o hmotnosti jsou též nezbytné pro odhadování hodnoty BCF s použitím údajů o vylučování ze zkoušky s expozicí v potravě.

INFORMACE O ZKOUŠENÉ LÁTCE

Měly by být k dispozici informace o zkoušené látce uvedené v odstavcích 3 a 22. Analytická metoda pro zkoumání koncentrací zkoušené látky ve vodě obvykle není nezbytná; požadovány jsou metody s dostatečnou citlivostí pro měření koncentrací v rybí potravě a rybích tkáních.

Metodu je možné použít ke zkoušení více než jedné látky v rámci jediné zkoušky. Zkoušené látky by však měly být navzájem slučitelné, aby vzájemně nereagovaly nebo neměnily svou chemickou identitu po přidání do rybí potravy. Cílem je, aby se naměřené výsledky pro každou společně zkoušenou látku výrazně nelišily od výsledků, které by se získaly, kdyby byly provedeny samostatné zkoušky každé ze zkoušených látek. Předběžnou analytickou studií by mělo být stanoveno, že z vícenásobně obohacené potravy a ze vzorku rybí tkáně lze vytěžit každou z těchto látek s i) vysokým výtěžkem (např. > 85 % nominální hodnoty) a ii) nezbytnou citlivostí pro zkoušení. Celková dávka společně zkoušených látek by měla být nižší než kombinovaná koncentrace, která by mohla vyvolat toxické účinky (srov. odstavec 51). Uspořádání zkoušky by mělo také brát v úvahu možné nepříznivé účinky na ryby a potenciální účinky interakce (např. metabolické účinky) spojené se zkoušením více látek současně. Současného zkoušení ionizovatelných látky je třeba se vyvarovat. Pokud jde o expozici, je tato metoda vhodná i pro složité směsi (srov. odstavec 13, ačkoli budou platit stejná omezení při analýze jako u kterékoli jiné metody).

VALIDITA ZKOUŠKY

Aby byla zkouška platná, musí být splněny tyto podmínky (srov. odstavec 24):

— kolísavost teploty vody je menší než ± 2 °C v experimentálních i kontrolních skupinách,

([1]) Celková délka by se měla zaznamenávat i v průběhu zkoušky, neboť je to dobrý ukazatel toho, zda nenastal nějaký nepříznivý účinek.

▼M7

— koncentrace rozpuštěného kyslíku neklesne pod 60 % hodnoty saturace vzduchu,

— koncentrace zkoušené látky v rybí potravě před fází příjmu a na jejím konci je v rozmezí ± 20 % (na základě alespoň tří vzorků při každém odběru vzorků),

— v předběžné analytické studii obohacené potravy by měl být prokázán vysoký stupeň homogenity látky v potravě; koncentrace látky alespoň ve třech vzorcích odebraných na začátku zkoušky by se neměly lišit o více než ± 15 % od střední hodnoty,

— v neobohacené potravě ani v tkáních ryb z kontrolních skupin nejsou zjištěny koncentrace zkoušené látky nebo jsou přítomny pouze na typických stopových úrovních v porovnání s exponovanými vzorky,

— mortalita nebo jiné nepříznivé účinky / nemoci jak v kontrolní, tak v zkušební skupině ryb by na konci zkoušky měly být ≤ 10 %; je-li zkouška z jakéhokoli důvodu prodloužena, negativní účinky v obou skupinách jsou ≤ 5 % za měsíc a ≤ 30 % v souhrnu. Významné rozdíly v průměrném vzrůstu mezi zkušebními a kontrolními skupinami ryb určených pro odběr vzorků by mohly být příznakem toxického účinku zkoušené látky.

REFERENČNÍ LÁTKY

Pokud laboratoř dříve tuto zkoušku neprováděla nebo došlo k podstatným změnám (např. změna rybího kmene nebo dodavatele, jiný druh ryb, významná změna velikosti ryb, rybí potravy nebo metody jejího obohacení atd.), doporučuje se provedení studie odborné způsobilosti s referenční látkou. Referenční látka se používá především ke stanovení, zda je postup obohacení potravy odpovídající a zda zajistí maximální homogenitu a biologickou dostupnost zkoušených látek. Příkladem, který byl použit v případě nepolárních hydrofobních látek, je hexachlorbenzen (HCB), ale vzhledem k nebezpečnosti HCB by mělo být zváženo použití jiných látek, pro které existují spolehlivé údaje o příjmu a bioobohacení ([1]). Pokud se referenční látka použije, měly by být v závěrečné zprávě o ní uvedeny základní informace včetně názvu, čistoty, čísla CAS, struktury, údajů o toxicitě (pokud jsou k dispozici), stejně jako u zkoušených látek (srov. odstavce 3 a 22).

POPIS METODY

Přístroje a pomůcky

Materiál, přístroje a pomůcky by měly být používány tak, jak je popsáno v metodě expozice ve vodním prostředí (srov. odstavec 26). Měl by být použit průtokový zkušební systém nebo statický systém s obnovováním média, který dodává do zkušebních nádrží dostatečný objem ředicí vody. Rychlost průtoku se zaznamená.

Voda

Zkušební voda by měla být používána tak, jak je popsáno v metodě expozice ve vodním prostředí (srov. odstavce 27 až 29). Zkušební médium by mělo mít charakteristiky, jak bylo popsáno, a mělo by mít v průběhu zkoušky stejnou kvalitu. Přirozený obsah částic a celkový organický uhlík by před začátkem zkoušky měl být co nejnižší (≤ 5 mg/l u částic; ≤ 2 mg/l u celkového organického uhlíku). Hodnotu TOC je nutné měřit pouze před zkouškou v rámci charakterizace zkušební vody (srov. odstavec 53).

([1]) HCB je uveden v přílohách A a C Stockholmské úmluvy a v přílohách I a III nařízení (ES) č. 850/2004 o perzistentních organických znečišťujících látkách (Úř. věst. L 158, 30.4.2004, s. 7).

▼M7

Potrava

Doporučuje se použít komerčně dostupnou rybí potravu (plovoucí a/nebo pomalu klesající vločkové krmivo), u které je udán alespoň obsah proteinů a tuku. Krmivo by mělo obsahovat vločky o stejné velikosti, aby se zvýšila účinnost expozice potravy, tj. ryby požijí více potravy, než kdyby požily větší kousky a menší nechaly bez povšimnutí. Vločky by měly mít vhodnou velikost odpovídající velikosti ryb na začátku zkoušky (např. lze použít vločky o průměru asi 0,6 až 0,85 mm pro ryby o celkové délce 3 až 7 cm a o průměru 0,85 až 1,2 mm pro ryby o celkové délce od 6 do 12 cm). Velikost vloček je možné upravit podle růstu ryb na začátku fáze vylučování. Příklad vhodného složení potravy, dodávané komerčně, je uveden v dodatku 7. Při vývoji této metody byla používána zkušební potrava s celkovým obsahem tuku 15 až 20 % hmot. Rybí potrava s tak vysokou koncentrací lipidů nemusí být v některých regionech dostupná. V takových případech by bylo možné provést studie s nižší koncentrací lipidů v potravě, a je-li to nezbytné, vhodně upravit (na základě předběžného zkoušení) množství potravy, aby se ryby udržely v dobrém zdravotním stavu. Celkový obsah lipidů ve výživě zkušební skupiny a kontrolní skupiny je nutné změřit a zaznamenat před zahájením zkoušky a na konci fáze příjmu. V závěrečné zprávě by měly být předloženy podrobné údaje o analýze živin, vlhkosti, vlákniny a popela a pokud možno reziduí minerálů a pesticidů (např. „standardních“ hlavních znečišťujících látek) poskytnuté dodavatelem komerčního krmiva.

Při obohacování krmiva zkoušenou látkou by se mělo všemožně dbát na to, aby se zajistila homogenita celého množství zkušební potravy. Koncentrace zkušební látky v potravě pro zkušební skupinu by měla být zvolena s ohledem na citlivost analytické metody, toxicitu zkoušené látky (hodnota NOEL, pokud je známa) a příslušné fyzikálně-chemické údaje. Je-li použita referenční látka, měla by být přednostně zavedena v koncentraci odpovídající asi 10 % koncentrace zkoušené látky (nebo v každém případě v co možná nejnižší koncentraci), podrobena analýze citlivosti (např. u hexachlorbenzenu bylo zjištěno, že jeho přijatelná koncentrace v potravě činí 1 až 100 μg/g; více informací o účinnosti asimilace HCB viz (47)).

Obohacení rybí potravy zkoušenou látkou lze provést několika způsoby v závislosti na jejích fyzikálních charakteristikách a na její rozpustnosti (podrobněji o metodách obohacení viz dodatek 7):

— je-li látka rozpustná a stabilní v triglyceridech, měla by být před smísením s rybí potravou rozpuštěna v malém množství rybího tuku nebo potravinářského rostlinného tuku. V tomto případě by se mělo dbát na to, aby získané krmivo nemělo příliš vysoký obsah lipidů s ohledem na přirozený obsah lipidů v obohacené potravě, a to tak, že se přidá minimální známé množství tuku potřebné pro dosažení distribuce a homogenity zkoušené látky v potravě, nebo

— potrava by měla být obohacena s použitím vhodného organického rozpouštědla, pokud se tím nenaruší homogenita a biologická dostupnost (v důsledku vypařování rozpouštědla se v krmení mohou vytvořit (mikro)krystaly zkoušené látky a neexistuje žádný snadný způsob, jak prokázat, že k tomu nedošlo, viz ((49)), nebo

— neviskózní kapaliny by měly být přidány přímo do rybí potravy, ale měly by se s ní dobře promísit, aby se podpořila homogenita a usnadnila dobrá asimilace. Technika mísení by měla zajistit homogenitu obohacené potravy.

▼M7

Někdy, např. u méně hydrofobních zkoušených látek, kde je pravděpodobnější, že budou z potravy desorbovat, může být nezbytné přelít připravené krmivové vločky malým množstvím kukuřičného oleje nebo rybího tuku (viz odstavec 142). V takových případech je třeba podobně upravit i potravu pro kontrolní skupinu a pro měření lipidů použít konečnou připravenou potravu.

Je-li použita referenční látka, výsledky by měly být srovnatelné s údaji ze studií popsaných v literatuře, které byly provedeny za podobných podmínek a při srovnatelném množství potravy (srov. odstavec 45), a parametry referenční látky by měly splňovat příslušná kritéria v odstavci 113 (třetí, čtvrtá a pátá odrážka).

Je-li jako vehikulum pro zkoušenou látku použit olej nebo nosné rozpouštědlo, mělo by se odpovídající množství stejného vehikula (bez zkoušené látky) smísit s krmivem pro kontrolní skupinu, aby byla zachována rovnocennost s obohacenou potravou. Je důležité, aby během fáze příjmu i vylučování byla zkušební i kontrolní skupině podávána nutričně rovnocenná potrava.

Obohacená potrava by se měla uchovávat za podmínek, kdy zůstane zachována stabilita zkoušené látky v krmné směsi (např. v chladničce) a tyto podmínky se uvedou ve zprávě.

Výběr druhu ryby

Použity mohou být druhy ryb stanovené pro expozici ve vodním prostředí (srov. odstavec 32 a dodatek 3). Ve studiích potravní bioakumulace s organickými látkami před zveřejněním této zkušební metody byli běžně používáni pstruh duhový (*Oncorhynchus mykiss*), kapr obecný (*Cyprinus carpio*) a jeleček velkohlavý (*Pimephales promelas*). Zkušební druh by měl mít takové chování při krmení, které vede k rychlému požití podané dávky krmiva, aby se zajistilo, že působení jakéhokoli faktoru ovlivňujícího koncentraci zkoušené látky v potravě (např. vyplavování do vody a možnost expozice ve vodním prostředí) bude omezeno na minimum. Měly by být použity ryby v rámci velikostního/hmotnostního rozpětí (srov. dodatek 3). Ryby by neměly být tak malé, aby to znesnadnilo analýzy na bázi jednotlivých ryb. Druhy testované ve stadiu života s rychlým růstem mohou zkomplikovat interpretaci údajů a vysoká tempa růstu mohou ovlivnit výpočet účinnosti vstřebání ([1]).

Chov ryb

Aklimatizace a kritéria přijatelnosti mortality a nemocí jsou stejné jako pro metodu expozice ve vodním prostředí před provedením zkoušky (srov. odstavce 33–35).

PROVEDENÍ ZKOUŠKY

Práce předcházející studii a zkouška ke stanovení rozsahu

Před studií je nezbytná analytická práce za účelem prokázání výtěžku látky z obohacené potravy / obohacené rybí tkáně. Zkouška ke stanovení rozsahu za účelem výběru vhodné koncentrace v potravě není vždy nezbytná. Pro účely prokázání, že nebyly zjištěny žádné nepříznivé účinky, a hodnocení chutnosti obohacené potravy, citlivosti analytické metody ve vztahu k rybám a potravě a výběru vhodného množství potravy a vhodných intervalů odběru vzorků během fáze vylučování atd. mohou být podniknuty předběžné pokusy s krmením, ale

([1]) V důsledku rychlého růstu během fáze příjmu se sníží skutečné množství potravy pod úroveň původně stanovenou na začátku expozice.

▼M7

nejsou povinné. Předběžná studie může být cenná pro odhadnutí počtu ryb potřebného pro odběry vzorků během fráze vylučování. Může vést k výraznému snížení použitého počtu ryb, zvláště u zkoušených látek, které jsou zvlášť náchylné k metabolismu.

Podmínky expozice

Délka fáze příjmu

Obvykle postačuje fáze příjmu v délce 7 až 14 dnů, během které je jedné skupině ryb denně podávána kontrolní potrava a druhé skupině ryb zkušební potrava v pevně stanovených dávkách v závislosti na zkušebním druhu a na zkušebních podmínkách, např. v případě pstruha duhového je to 1 až 2 % tělesné hmotnosti (živé hmotnosti). Množství potravy by mělo být zvoleno tak, aby se zamezilo rychlému růstu a velkému nárůstu obsahu lipidů. Fázi příjmu je možné v případě potřeby prodloužit na základě praktických zkušeností z předchozích studií nebo na základě znalostí o příjmu/vylučování zkoušené (nebo analogické) látky rybami. Začátek zkoušky je definován jako okamžik prvního podání obohacené potravy. Experimentální den trvá od okamžiku podání krmiva do okamžiku krátce (např. jednu hodinu) před příštím krmením. První experimentální den příjmu trvá od doby prvního podání obohacené potravy a končí krátce před druhým podáním obohacené potravy. V praxi fáze příjmu končí krátce (např. jednu hodinu) před prvním podáním potravy neobohacené zkoušenou látkou, neboť ryby budou v mezidobí 24 hodin pokračovat v trávení obohacené potravy a v absorbování zkoušené látky. Je důležité zajistit, aby bylo dosaženo dostatečně vysoké (netoxické) množství zkoušené látky v těle vzhledem k analytické metodě, takže je možné měřit její pokles alespoň o jeden řád během fáze vylučování. Ve zvláštních případech lze použít prodlouženou fázi příjmu (až do 28 dnů) s dodatečným odběrem vzorků, aby se získaly informace o kinetice příjmu. Během fáze příjmu nemusí koncentrace v rybách dosáhnout rovnovážného stavu. Zde, stejně jako při zkoušce expozice ve vodním prostředí, je možné použít rovnice pro odhadování doby potřebné k dosažení rovnovážného stavu, jako indikaci, jak dlouho pravděpodobně potrvá, než budou dosaženy hodnotitelné koncentrace v rybách (srov. dodatek 5).

V některých případech může být známo, že v důsledku slabé analytické citlivosti nebo nízké účinnosti asimilace nebude příjem látky rybami po dobu 7 až 14 dnů postačovat k tomu, aby použitá koncentrace v potravě dosáhla dostatečně vysoké koncentrace v rybách, a aby tak bylo možné analyzovat pokles alespoň o jeden řád během fáze vylučování. V takových případech může být výhodné prodloužit původní fázi příjmu na více než 14 dnů nebo, zejména u látek s vysokou metabolizací, by měla být zvážena vyšší koncentrace v potravě. Je však třeba dávat pozor, aby množství v těle během fáze příjmu bylo udržováno na úrovni nižší, než je (odhadovaná) stálá koncentrace bez účinků (NOEC) na rybí tkáně (srov. odstavec 138).

Délka fáze vylučování

Vylučování typicky trvá až 28 dnů a začíná, jakmile je rybám v zkušební skupině po fázi příjmu podávána čistá, neexponovaná potrava. Vylučování začíná s prvním podáním „neobohacené“ potravy, a nikoli bezprostředně po posledním podání „obohacené“ potravy, neboť ryby v mezidobí 24 hodin pokračují v trávení potravy a absorpci zkoušené látky, jak je uvedeno v odstavci 126. První vzorek ve fázi vylučování se tedy odebírá krátce před druhým podáním neobohacené potravy. Tato fáze vylučování je určena k zachycení látek s potenciálním poločasem až 14 dnů, což je v souladu s poločasem bioakumulujících látek ([1]), takže

([1]) Ve studii expozice ve vodním prostředí by 14denní poločas odpovídal hodnotě BCF cca 10 000 l/kg při použití ryb o hmotnosti 1 g s odpovídající rychlostní konstantou příjmu asi 500 l/kg/den (podle rovnice Sijma *et al* (46)).

▼M7

28 dnů představuje dva poločasy takových látek. V případě látek s velmi vysokou bioakumulací může být výhodné fázi vylučování prodloužit (pokud to naznačí předběžné zkoušení).

Je-li látka vylučována velmi pomalu, takže nemusí být možné stanovit přesný poločas ve fázi vylučování, může tato informace přesto postačovat pro účely hodnocení jako příznak vysoké úrovně bioakumulace. A naopak, je-li látka vylučována tak rychle, že není možné spolehlivě odvodit koncentraci v čase nula (koncentrace na konci fáze příjmu / začátku fáze vylučování, $C_{0,d}$) ani hodnotu k_2, lze učinit konzervativní odhad hodnoty k_2 (srov. dodatek 7).

Pokud před uplynutím celé 28denní doby analýzy ryb odebraných v dřívějších intervalech (např. 7denním nebo 14denním) ukážou, že látka byla vylučována v menším množství, než jsou meze kvantifikace, pak následný odběr vzorků může být přerušen a zkouška se ukončí.

V nemnohých případech se může stát, že na konci fáze příjmu (nebo při odebrání druhého vzorku ve fázi vylučování) nedojde k žádnému měřitelnému příjmu zkoušené látky. Pokud lze prokázat, že i) byla splněna kritéria platnosti v odstavci 113 a ii) nedostatečný příjem není důsledkem některých jiných nedostatků zkoušky (např. nedostatečná délka fáze příjmu, nesprávný postup obohacení potravy, který vedl ke špatné biologické dostupnosti, nedostatečná citlivost analytické metody, ryby nepojídající potravu atd.), bylo by možné studii ukončit, aniž by bylo nutné ji opakovat s delší fází příjmu. Pokud předběžná práce naznačila, že k tomu může dojít, lze doporučit, je-li to možné, analýzu výměšků na přítomnost nestrávené zkušební látky v rámci metody hmotnostní bilance.

Počty zkušebních ryb

Podobně jako ve zkoušce expozice ve vodním prostředí by měly být vybrány ryby podobné hmotnosti a délky, tak aby hmotnost nejmenší z nich nebyla nižší než dvě třetiny hmotnosti největší ryby (srov. odstavec 42).

Celkový počet ryb pro studii by se měl zvolit na základě harmonogramu odběru vzorků (nejméně jeden vzorek na konci fáze příjmu a čtyři až šest vzorků během fáze vylučování, ale v závislosti na délce fází), s ohledem na citlivost analytické metody, na koncentraci, která bude pravděpodobně dosažena na konci fáze příjmu (na základě předchozích znalostí) a na délku fáze vylučování (pokud předchozí znalosti umožňují ji odhadnout). Při každém odběru by mělo být odebráno pět až deset ryb, přičemž před analýzou chemické látky nebo analýzou lipidů se změří parametry růstu (hmotnost a celková délka).

Kvůli vlastní variabilitě velikosti, rychlosti růstu a fyziologie ryb a pravděpodobnému různému množství podávané potravy, které požije každá z ryb, by v každém intervalu mělo být odebráno alespoň pět ryb ze zkušební skupiny a pět z kontrolní skupiny, aby bylo možné náležitě stanovit průměrnou koncentraci a její kolísání. Kolísání koncentrace u použitých ryb pravděpodobně přispěje k celkové neřízené variabilitě ve zkoušce více, než je variabilita vlastní použitým analytickým metodám, a v některých případech tak opravňuje k použití až deseti ryb na každý odběr. Jestliže však na začátku vylučování nejsou u ryb kontrolní skupiny měřitelné koncentrace zkoušené látky v pozadí, může být dostatečná chemická analýza dvou nebo tří ryb z kontrolní skupiny pouze při konečném odběru vzorků, pokud jsou zbývající ryby z kontrolní skupiny při stejných odběrech přesto odebírány pro stanovení hmotnosti a celkové délky (takže pro stanovení růstu se odebere stejný počet ryb z exponované a kontrolní skupiny). Ryby by měly být uskladněny, jednotlivě zváženy (dokonce, i když se následně ukáže jako nezbytné výsledky získané z vzorků zkombinovat) a změřena jejich celková délka.

▼M7

Při standardní zkoušce například s 28denním vylučováním zahrnující pět odběrů ve fázi vylučování to znamená celkem 59–120 ryb z exponované a 50–110 ryb z kontrolní skupiny, za předpokladu, že metoda analýzy dané látky umožňuje provést analýzu obsahu lipidů na týchž rybách. Pokud analýzu lipidů není možné provést na stejném vzorku jako analýzu chemické látky a pokud není proveditelné ani použití ryb z kontrolní skupiny pouze k analýze lipidů (srov. odstavec 56), bylo by zapotřebí dalších 15 ryb (tři z kmenové populace na začátku zkoušky, po třech z kontrolní a zkušební skupiny na začátku vylučování a po třech z kontrolní a zkušební skupiny na konci pokusu). Příklad harmonogramu odběru vzorků s počty ryb lze najít v dodatku 4.

Nasazování

Měl by být použit podobně vysoký poměr množství vody k množství ryb, jako při metodě expozice ve vodním prostředí (srov. odstavce 43 a 44). Ačkoli vyšší rychlost nasazování množství ryb na množství vody nemá při této zkoušce vliv na zkušební koncentrace, pro zachování odpovídajících koncentrací rozpuštěného kyslíku a pro minimalizaci stresu u zkušebních organismů se doporučuje rychlost nasazování 0,1 až 1,0 g ryb (živé hmotnosti) na litr vody za den.

Zkušební potrava a krmení

Během aklimatizace by rybám měla být podávána vhodná potrava, jak je popsáno výše (odstavec 117). Jestliže se zkouška provádí za průtokových podmínek, měl by být přítok vody na dobu krmení pozastaven.

Potrava pro zkušební skupinu by se během zkoušky měla řídit tím, co je popsáno výše (odstavce 116 až 121). Při zohlednění faktorů specifických pro danou látku, analytické citlivosti, předpokládané koncentrace v potravě za podmínek obvyklých v životním prostředí a úrovní chronické toxicity / obsahu látky v těle by výběr cílové obohacující koncentrace měl brát v úvahu chutnost potravy (aby ryby krmivo neodmítaly). Ve zprávě by měla být zdokumentována nominální koncentrace zkoušené látky při obohacení. Na základě zkušeností poskytuje koncentrace při obohacení v rozmezí 1 až 1 000 μg/g praktické pracovní rozpětí pro zkoušené látky, které nevykazují specifický mechanismus toxicity. Pokud například působí prostřednictvím nespecifického mechanismu, neměla by být úroveň reziduí v tkáních vyšší než 5 μmol/g lipidů, neboť je pravděpodobné, že rezidua nad touto úrovní budou vyvolávat chronické účinky (19) (48) (50) ([1]). U jiných látek by se mělo dbát na to, aby nedošlo k nepříznivým účinkům vyvolaným akumulovanou expozicí (srov. odstavec 127). To platí zejména v případě, že se současně zkouší více než jedna látka (srov. odstavec 112).

Vhodné množství zkoušené látky lze dostat do rybí potravy jedním ze tří způsobů, jak je popsáno v odstavci 119 a v dodatku 7. Metody a postupy obohacování potravy by měly být zdokumentovány ve zprávě. Rybám v kontrolní skupině se podává neupravená potrava obsahující ekvivalentní množství neobohaceného olejového vehikula, pokud bylo použito v obohacené potravě ve fázi příjmu, nebo ošetřená „čistým“ rozpouštědlem, pokud bylo pro přípravu potravy pro zkušební skupinu použito nosné rozpouštědlo. Upravená a neupravená potrava by měla být měřena analyticky nejméně třikrát pro stanovení koncentrace zkoušené látky před začátkem fáze příjmu a na jejím konci. Po expozici v obohacené potravě (ve fázi příjmu) se rybám (v obou skupinách) podává neupravená potrava (ve fázi vylučování).

Rybám se podávají pevně stanovené dávky (závislé na druhu, např. v případě pstruha duhového přibližně 1 až 2 % živé hmotnosti těla za den). Množství potravy by mělo být zvoleno tak, aby se zamezilo rychlému růstu a velkému

([1]) Poněvadž skutečnou vnitřní koncentraci je možné stanovit teprve po provedení zkoušky, je zapotřebí odhad předpokládané vnitřní koncentrace (založený např. na očekávané hodnotě BMF a na koncentraci v potravě; viz rovnice A5.8 v dodatku 5).

▼M7

nárůstu obsahu lipidů. Přesné množství potravy stanovené během experimentu je třeba zaznamenat. Počáteční krmení by mělo vycházet z naplánovaných stanovení hmotnosti u kmenové populace těsně před zahájením zkoušky. Množství krmiva by mělo být upraveno na základě živé hmotnosti ryb určených pro vzorek při každém odběru vzorků, aby bylo možné zohlednit růst během experimentu. Hmotnost a délku těla ryb ve zkušební a kontrolní nádrži je možné odhadnout z hmotností a celkových délek ryb odebraných při každém odběru; ryby zůstávající ve zkušební a kontrolní nádrži se neváží ani neměří. Je důležité zachovat stejné množství potravy v průběhu celého experimentu.

Krmení by se mělo sledovat, aby bylo zajištěno, že ryby očividně požijí všechnu potravu, která jim byla podána, a že tak ve výpočtech budou použity odpovídající hodnoty míry pojídání potravy. Při výběru množství potravy by mělo být přihlédnuto k předběžným experimentům s krmením, což zajistí, že bude spotřebována všechna potrava podaná při krmení, které se provádí jednou denně. Pokud potrava pravidelně zůstává nepožita, lze doporučit rozdělení dávky a část podat v rámci jednoho krmení zařazeného v každém experimentálním dnu navíc (např. nahradit jednorázové denní krmení krmením, při kterém se podá polovina tohoto množství dvakrát denně). Pokud je nezbytné použít tento postup, ke druhému krmení by mělo dojít ve stanovenou dobu a mělo by se načasovat tak, aby proběhla co možná nejdelší doba před odběrem vzorků ryb (např. doba druhého krmení se stanoví v první polovině experimentálního dne).

Ačkoli ryby většinou pojídají potravu rychle, je důležité zajistit, aby látka zůstala v potravě absorbována. Je třeba dbát na to, aby se zamezilo rozpuštění látky z potravy ve vodě, čímž by byly ryby vystaveny koncentracím zkoušené látky ve vodním prostředí, a nejen prostřednictvím potravy. Toho lze dosáhnout odstraněním veškeré nepožité potravy (a výměšků) ze zkušební a kontrolní nádrže do jedné hodiny, ale nejlépe do 30 minut od krmení. Kromě toho lze použít systém, kdy je voda soustavně čištěna přes filtr z aktivního uhlíku s cílem absorbovat jakékoli „rozpuštěné“ znečišťující látky. Rychlému odplavení částic potravy a rozpuštěných látek mohou napomoci průtokové systémy ([1]). V některých případech může pomoci zmírnit tento problém poněkud upravený způsob přípravy obohacené potravy (viz odstavec 119).

Světlo a teplota

Stejně jako při metodě expozice ve vodním prostředí (srov. odstavec 48) se doporučuje fotoperioda 12 až 16 hodin a teplota vhodná pro použitý zkušební druh (± 2 °C) (srov. dodatek 3). Druh a charakteristiky osvětlení by měly být známy a zdokumentovány.

Kontroly

Měla by se použít jedna kontrolní skupina, ve které je rybám podávána stejná potrava jako rybám ve zkušební skupině, ale bez přítomnosti zkoušené látky v krmivu. Pokud byl k obohacení krmiva ve zkušební skupině použit olej nebo nosné rozpouštědlo, mělo by být krmivo pro kontrolní skupinu ošetřeno přesně stejným způsobem, avšak bez zkoušené látky, takže dávky ve zkušební skupině a v kontrolní skupině jsou rovnocenné (srov. odstavce 121 a 139).

([1]) Přítomnosti zkoušené látky ve zkušebním médiu v důsledku vyměšování ryb nebo vyplachování z potravy možná nebude možné zcela zabránit. Jednou z možností je změřit koncentraci látky ve vodě na konci fáze příjmu, zejména pokud je použito semistatické uspořádání, což pomůže stanovit, zda došlo k expozici ve vodním prostředí, či nikoli.

▼M7

Četnost měření kvality vody

Podmínky popsané v metodě expozice ve vodním prostředí platí i zde, s tou výjimkou, že TOC je třeba měřit pouze před zkouškou v rámci charakterizace zkušební vody (srov. odstavec 53).

Odběr vzorků a analýza ryb a potravy

Analýza vzorků potravy

Vzorky zkušební a kontrolní potravy by měly být analyzovány nejméně třikrát pro stanovení zkoušené látky a obsahu lipidů alespoň před začátkem fáze příjmu a na jejím konci. Metody analýzy a postupy pro zajištění homogenity potravy je třeba uvést v závěrečné zprávě.

Vzorky by měly být analyzovány na přítomnost zkoušené látky pomocí zavedené a validované metody. V rámci přípravy studie by měla být stanovena mez kvantifikace, procento výtěžku, interference a analytická variabilita v zamýšlené vzorkovací matici. Pokud se zkouší radioizotopově značený materiál, měly by být vzaty v úvahu podobné okolnosti jako při metodě expozice ve vodním prostředí, přičemž namísto analýzy vody se provádí analýza potravy (srov. odstavec 65).

Analýza ryb

Při každém odběru vzorku ryb bude odebráno po 5 až 10 jedincích z exponované a kontrolní skupiny (v některých případech lze počet kontrolních ryb snížit; viz odstavec 134).

Odběry by se měly uskutečnit ve stejnou dobu každý experimentální den (ve vztahu k době krmení) a měly by být načasovány tak, aby se pravděpodobnost toho, že během fáze příjmu a v rané části fáze vylučování zůstane ve střevech potrava, minimalizovala, a zabránilo se tak nevěrohodným příspěvkům k celkovým koncentracím zkoušené látky (tj. ryby určené pro vzorek by měly být vyjmuty na konci experimentálního dne, přičemž je třeba mít na paměti, že experimentální den začíná v době krmení a končí v době příštího krmení, přibližně po 24 hodinách. Vylučování začíná od prvního podání neobohacené potravy; srov. odstavec 128). První vzorek ve fázi vylučování (odebraný krátce před druhým krmením neobohacenou potravou) je důležitý, neboť extrapolace o jeden den nazpět od tohoto měření se používá k odhadu koncentrace v čase nula ($C_{0,d}$, koncentrace v rybách na konci příjmu / začátku vylučování). Volitelně je možné vyjmout z ryb gastrointestinální trakt a analyzovat ho samostatně na konci příjmu a v den 1 a 3 vylučování.

Při každém odběru by ryby měly být vyjmuty z obou zkušebních nádrží a mělo by s nimi být zacházeno stejným způsobem, jak je popsáno v metodě expozice ve vodním prostředí (srov. odstavce 61–63).

Koncentrace zkoušené látky v celých rybách (živé hmotnosti) se měří alespoň na konci fáze příjmu a během fáze vylučování v kontrolní i ve zkušební skupině. Během fáze vylučování se doporučuje provést čtyři až šest odběrů (např. 1., 3., 7., 14. a 28. den). Volitelně lze zařadit dodatečný odběr po 1 až 3denním příjmu za účelem odhadu účinnosti asimilace z lineární fáze příjmu u ryb, který bude stále blízko začátku doby expozice. Existují dvě hlavní odchylky od harmonogramu: i) jestliže se použije prodloužená fáze příjmu pro účely zkoumání kinetiky příjmu, dojde k dodatečným odběrům vzorků během fáze příjmu, a bude tedy nutné zařadit dodatečné ryby (srov. odstavec 126; ii) jestliže byla studie na konci fáze příjmu ukončena z důvodu neexistence měřitelného příjmu (srov. odstavec 131). Jednotlivé ryby, které se odeberou ve vzorku, by měly být zváženy (a změřena jejich celková délka), aby bylo možné stanovit rychlostní konstanty růstu. Koncentrace látky ve specifické rybí tkáni (jedlé a nejedlé

▼M7

podíly) lze rovněž měřit na konci fáze příjmu a ve vybraných dobách fáze vylučování. Pokud se zkouší radioizotopově značený materiál, měly by být vzaty v úvahu podobné okolnosti jako při metodě expozice ve vodním prostředí, přičemž namísto analýzy vody se provádí analýza potravy (srov. odstavec 65).

Při pravidelném používání referenční látky (srov. odstavec 25) se upřednostňuje měřit koncentrace ve zkušební skupině na konci fáze příjmu a ve všech dobách fáze vylučování stanovených pro danou zkoušenou látku (na celých rybách); v kontrolní skupině je nutné analyzovat koncentrace pouze na konci fáze příjmu (na celých rybách). Za určitých okolností (například pokud metody analýzy přítomnosti zkoušené látky a referenční látky nejsou slučitelné, takže by pro dodržení harmonogramu odběru vzorků bylo nutné použít dodatečné ryby, lze použít jiný přístup s cílem minimalizovat požadovaný počet dodatečných ryb, jak je uvedeno dále. Koncentrace referenční látky se měří pouze během fáze vylučování, a to v den 1, 3 a ve dvou dalších odběrech zvolených tak, aby bylo možné provést spolehlivé odhady koncentrace v čase nula ($C_{0,d}$) a hodnoty k_2 referenční látky.

Obsah lipidů u jednotlivých ryb by měl být stanoven při každém odběru nebo alespoň na začátku a na konci fáze příjmu a na konci fáze vylučování (srov. odstavce 56 a 67). V závislosti na analytické metodě (srov. odstavec 67 a dodatek 4) lze možná použít stejné ryby ke stanovení obsahu lipidů i koncentrací zkoušené látky. To je upřednostňováno z důvodu minimalizace počtu ryb. Pokud by to však nebylo možné, lze použít stejný postup, který je popsán v metodě expozice ve vodním prostředí (možnosti alternativního měření lipidů viz odstavec 56). Metodu, která byla použita ke kvantifikaci obsahu lipidů, je třeba zdokumentovat v závěrečné zprávě.

Kvalita analytické metody

Měly by být prováděny experimentální kontroly s cílem zajistit specifičnost, přesnost a reprodukovatelnost analytické metody pro danou látku a rovněž výtěžky zkoušené látky z potravy a z ryb.

Měření růstu ryb

Na začátku zkoušky je třeba zvážit vzorek ryb z kmenové populace (a změřit jejich celkovou délku). Tyto ryby by měly být odebrány krátce před prvním podáním obohaceného krmiva a přiděleny k experimentálnímu dnu 0. Počet ryb v tomto vzorku by měl být přinejmenším stejný jako počet ryb ve vzorcích během zkoušky. Některé z nich mohou být tytéž ryby, které jsou použity pro analýzu lipidů před začátkem fáze příjmu (srov. odstavec 153). Při každém odběru vzorků se ryby nejprve zváží a změří se jejich délka. U každého jedince by naměřená hmotnost (a délka) měla být vztažena ke koncentraci analyzované chemické látky (a případně k obsahu lipidů), například tak, že se každé rybě ve vzorku přidělí jedinečný identifikační kód. Měření těchto ryb ve vzorku lze použít k odhadu hmotnosti (a délky) ryb, které zůstávají ve zkušební a kontrolní nádrži.

Experimentální hodnocení

Každý den se má sledovat případná mortalita a výsledky se zaznamenají. Měla by být prováděna další pozorování, zda nedochází k nepříznivým účinkům, například k abnormálnímu chování nebo pigmentaci, a výsledky se zaznamenají. Ryby jsou považovány za mrtvé, pokud u nich nedochází k dýchacím pohybům a nelze u nich detekovat žádnou reakci na slabý mechanický podnět. Veškeré mrtvé nebo zjevně umírající ryby musí být odstraněny.

▼M7

ÚDAJE A PŘEDKLÁDÁNÍ ZPRÁV

Zpracování výsledků

Výsledky zkoušky se použijí k odvození rychlostní konstanty vylučování (k_2) jako funkce celkové živé hmotnosti ryb. Vypočítá se rychlostní konstanta růstu, k_g, založená na střední hodnotě nárůstu hmotnosti ryb a případně se použije k získání rychlostní konstanty vylučování upravené o růst, k_{2g}. Ve zprávě by rovněž měla být uvedena účinnost asimilace (a; absorpce ze střev), kinetický bioobohacovací faktor (BMF_K) (v případě potřeby upravený o růst, BMF_{Kg}), jeho hodnota upravená o lipidy (BMF_{KL} nebo BMF_{KgL}, je-li upravená o zředění růstem) a množství potravy. Je-li možné provést odhad doby potřebné k dosažení rovnovážného stavu (např. 95 % rovnovážného stavu neboli $t_{95} = 3{,}0/k_2$), lze rovněž uvést odhad BMF v rovnovážném stavu (BMF_{SS}) (srov. odstavce 105 a 106 a dodatek 5), pokud hodnota t_{95} naznačuje, že mohlo být dosaženo podmínek rovnovážného stavu. U této hodnoty BMF_{SS} by měla být použita stejná úprava o lipidy jako u kineticky odvozeného BMF (BMF_K), čímž se získá hodnota upravená o lipidy, BMF_{SSL} (je nutné upozornit na to, že neexistuje žádný schválený postup pro úpravu BMF v rovnovážném stavu o ředění růstem). Vzorce a příklady výpočtů jsou uvedeny v dodatku 7. Jsou k dispozici postupy, jež umožňují odhadnout hodnotu kinetického biokoncentračního faktoru (BCF_K) z údajů získaných ve studii potravy. O tom se pojednává v dodatku 8.

Údaje o hmotnosti/délce ryb

Živé hmotnosti a délky jednotlivých ryb ve všech časových úsecích se uvedou v tabulkách zvlášť za zkušební a za kontrolní skupinu ve všech dnech odběru vzorků během fáze příjmu (kmenová populace na začátku příjmu; kontrolní skupina a zkušební skupina na konci příjmu, a provádí-li se raná fáze (např. ve dnech 1–3 příjmu)), a během vylučování (např. ve dnech 1, 2, 4, 7, 14, 28 za kontrolní a za zkušební skupinu). Pro účely úpravy o zředění růstem je upřednostňovaným měřítkem hmotnost. Metoda (metody), které se používají k úpravě údajů o zředění růstem, jsou uvedeny dále (odstavce 162 a 163).

Údaje o koncentraci zkoušené látky v rybách

Měření reziduí zkoušené látky v jednotlivých rybách (nebo ve sdružených vzorcích ryb, pokud měření jednotlivých ryb není možné), vyjádřených jako koncentrace v hmotnostních procentech z živé hmotnosti, se uvedou v tabulkách za zkušební a za kontrolní ryby při jednotlivých odběrech vzorků. Pokud byla prováděna analýza lipidů na každé rybě ve vzorku, lze odvodit jednotlivé koncentrace upravené o lipidy, vyjádřené jako koncentrace lipidů (v hmotnostních procentech lipidů z živé hmotnosti) a uvést ve formě tabulky.

— Měření reziduí zkoušené látky v jednotlivých rybách (nebo ve sdružených vzorcích ryb, pokud měření jednotlivých ryb není možné, srov. odstavec 66) ve fázi vylučování se převedou na jejich přirozené logaritmy a vynesou se do grafu oproti času (ve dnech). Jestliže se vizuální kontrolou grafu zjistí zjevné odlehlé hodnoty, lze použít statisticky validní test odlehlých hodnot k odstranění nevěrohodných datových bodů spolu s podloženým odůvodněním jejich vypuštění.

— Vypočítá se lineární korelace nejmenších čtverců pro údaje ln (koncentrace) oproti vylučování (dny). Směrnice a úsek přímky se uvedou jako jako celková rychlostní konstanta vylučování (k_2) a přirozený logaritmus odvozené koncentrace v čase nula ($C_{0,d}$) (podrobněji viz dodatek 5 a dodatek 7). Pokud by to nebylo možné, protože koncentrace klesne na hodnotu nižší, než je mez kvantifikace pro druhý vzorek ve fázi vylučování, lze provést konzervativní odhad hodnoty k_2 (srov. dodatek 7).

— Odchylky od sklonu a úseku přímky se vypočítají pomocí běžných statistických postupů, vyhodnotí se 90 % (nebo 95 %) intervaly spolehlivosti těchto výsledků a uvedou se ve zprávě.

▼M7

— Vypočítá se rovněž střední hodnota naměřené koncentrace v rybách v poslední den fáze příjmu (naměřené koncentrace v čase nula, $C_{0,m}$) a porovná se s odvozenou hodnotou $C_{0,d}$. V případě, že odvozená hodnota je nižší než naměřená hodnota, může tento rozdíl naznačovat přítomnost nestrávené obohacené potravy ve střevech. Je-li odvozená hodnota mnohem vyšší než naměřená hodnota, může to nasvědčovat tomu, že hodnota odvozená z lineární regrese údajů o vylučování je chybná a měla by být přehodnocena (viz dodatek 7).

Rychlost vylučování a bioobohacovací faktor

Aby bylo možné z údajů vypočítat bioobohacovací faktor, je třeba nejprve získat hodnotu účinnosti asimilace (absorpce zkoušené látky ve střevech, α). K tomu by měla být použita rovnice A7.1 z dodatku 7, pro kterou je nutné znát odvozenou koncentraci v rybách v čase nula fáze vylučování ($C_{0,d}$), (celkovou) rychlostní konstantu vylučování (k_2), koncentraci v potravě (C_{food}), rychlostní konstantu pojídání potravy (I) a délku fáze příjmu (t). Směrnice a úsek lineárního vztahu mezi ln (koncentrací) a fází vylučování se uvedou jako celková rychlostní konstanta vylučování (k_2 = směrnice) a koncentrace v čase nula ($C_{0,d} = e^{intercept}$), jak je uvedeno výše. Odvozené hodnoty by měly být zkontrolovány, zda jsou biologicky možné (např. účinnost asimilace jako zlomek není větší než 1). Hodnota (I) se vypočítá vydělením hmotnosti potravy hmotností ryb, kterým byla podána potrava každý den (je-li podáváno množství odpovídající 2 % tělesné hmotnosti, bude hodnota *(I)* 0,02). Množství potravy použité ve výpočtu však možná bude nutné upravit o růst ryb (to lze provést tak, že se známá rychlostní konstanta růstu použije k odhadu hmotnosti ryb při každém odběru vzorků během fáze příjmu; viz dodatek 7). V případech, kdy hodnoty k_2 a $C_{0,d}$ není možné odvodit, protože například koncentrace klesla pod mez detekce pro druhý vzorek ve fázi vylučování, lze provést konzervativní odhad k_2 a „horní odhad“ BMF_k (srov. dodatek 7).

Jakmile je získána účinnost asimilace (α), je možné vypočítat bioobohacovací faktor tak, že se α vynásobí rychlostní konstantou pojídání potravy (I) a výsledek se dělí (celkovou) rychlostní konstantou vylučování (k_2). Bioobohacovací faktor upravený o růst se vypočítá stejně, ale s použitím rychlostní konstanty vylučování upravené o růst (k_{2g}; viz odstavce 162 a 163). Alternativní odhad účinnosti asimilace lze odvodit, jestliže byla provedena analýza tkáně z ryb odebraných v rané, lineární fázi fáze příjmu; srov. odstavec 151 a dodatek 7. Tato hodnota představuje nezávislý odhad účinnosti asimilace pro v podstatě neexponovaný organismus (tj. ryby jsou blízko začátku fáze příjmu). Účinnost asimilace odhadnutá z údajů o vylučování se obvykle používá k odvození BMF.

Úprava o lipidy a úprava o zředění růstem

Růst ryb během fáze vylučování může snížit naměřené koncentrace chemické látky v rybách s tím důsledkem, že celková rychlostní konstanta vylučování, k_2, je větší než ta, která by vyplynula pouze z procesů odstranění (např. metabolismus, vyplavení). Obsah lipidů v zkušebních rybách (který je úzce spojen s bioakumulací hydrofobních látek) a obsah lipidů v potravě může v praxi dosti kolísat, takže je nezbytná jejich úprava, aby bylo možné odvodit bioobohacovací faktory smysluplným způsobem. Bioobohacovací faktor by měl být upraven o zředění růstem (stejně jako se upravuje kinetický BCF v metodě expozice ve vodním prostředí) a upraven o obsah lipidů v potravě v porovnání s obsahem lipidů v rybách (faktor úpravy o lipidy). Rovnice a příklady těchto výpočtů lze najít v dodatku 5 a dodatku 7.

Aby bylo možné provést úpravu o ředění růstem, je třeba vypočítat rychlostní konstantu vylučování upravenou o růst (k_{2g}) (rovnice viz dodatek 5). Tato rychlostní konstanta vylučování upravená o růst (k_{2g}) se poté použije k výpočtu

▼M7

bioobohacovacího faktoru upraveného o růst, jak je uvedeno v odstavci 73. V některých případech není tento postup možný. Alternativní přístup, který obchází nutnost úpravy o zředění růstem, zahrnuje použití údajů o hmotnosti vylučování zkoušené látky na každou rybu (základem je celá ryba), a nikoli obvyklých údajů o hmotnosti zkoušené látky na jednotku hmotnosti ryby (koncentraci). Toho lze snadno dosáhnout, neboť zkoušky podle této metody by měly vztahovat zaznamenané koncentrace v tkáních k hmotnosti jednotlivých ryb. Jednoduchý postup, jak to provést, je uveden v dodatku 5. Upozorňujeme, že hodnota k_2 by přesto měla být odhadnuta a uvedena ve zprávě, i když se použije tento alternativní přístup.

Aby bylo možné provést úpravu o obsah lipidů v potravě a v rybách, jestliže analýza lipidů nebyla provedena u všech ryb ve vzorku, odvodí se střední hodnota frakcí lipidů (v procentech hmotnosti) v rybách a v potravě ([1]). Faktor úpravy o lipidy (L_c) se poté vypočítá tak, že se střední hodnota frakce lipidů v rybách dělí střední hodnotou frakce lipidů v potravě. Bioobohacovací faktor, upravený o růst či nikoli, se vydělí faktorem úpravy o lipidy a vypočítá se bioobohacovací faktor upravený o lipidy.

Jestliže byla analýza chemické látky a analýza lipidů provedena na týchž rybách při každém odběru vzorků, pak údaje o tkáních jednotlivých ryb upravené o lipidy mohou být přímo použity k výpočtu BMF upraveného o lipidy (srov. (37)). Grafickým znázorněním údajů o koncentracích upravených o lipidy se získá hodnota $C_{0,d}$ na základě lipidů a hodnota k_2. Poté může proběhnout matematická analýza za pomoci stejných rovnic jako v dodatku 7, avšak účinnost asimilace (a) se vypočítá s použitím rychlostní konstanty pojídání potravy s normalizovanými lipidy (I_{lipid}) a koncentrace v potravě na základě lipidů ($C_{\text{food-lipid}}$). Parametry upravené o lipidy se poté podobně použijí k výpočtu BMF (povšimněte si, že pro výpočet hodnoty BMF_{KgL} upravené o růst, upravené o lipidy by se také úprava rychlostní konstantou růstu měla použít na frakci lipidů, a nikoli na živou hmotnost ryb).

Interpretace výsledků

Aby se vyloučily toxické účinky, průměrný růst ve zkušební i v kontrolní skupině by se v zásadě neměl výrazně lišit. Rychlostní konstanty růstu nebo křivky růstu v obou skupinách by se měly porovnávat vhodným postupem ([2]).

Závěrečná zpráva

Po ukončení studie se vypracuje závěrečná zpráva obsahující informace o zkoušené látce, zkušebním druhu a zkušebních podmínkách, které jsou uvedeny v odstavci 81 (stejně jako u metody expozice ve vodním prostředí). Navíc jsou požadovány tyto informace:

Zkoušená látka:

— veškeré informace o stabilitě zkoušené látky v připravené potravě.

([1]) Tento postup je specifický pro studii potravy na rozdíl od postupu, kterým se řídí zkouška expozice ve vodním prostředí, a proto byl použit výraz „úprava“, a nikoli „normalizace“, aby se předešlo zmatení pojmů – viz též poznámku pod čarou v odstavci 106.

([2]) Je možné provést *t*-test rychlostní konstanty růstu za účelem zkoumání, zda se liší růst mezi kontrolní a zkušební skupinou, nebo *F*-test v případě analýzy rozptylu. V případě potřeby lze použít *F*-test nebo test poměru pravděpodobnosti jako pomůcku při výběru vhodného růstového modelu (monografie OECD 54 (32)).

▼M7

Zkušební podmínky:

— nominální koncentrace látky v potravě, metoda obohacení, množství vehikula (lipidů) použitého v procesu obohacení potravy (pokud bylo použito), měření koncentrace zkoušené látky v obohaceném krmivu při každé analýze (alespoň třikrát před zahájením studie a na konci fáze příjmu) a střední hodnoty,

— druh a kvalita nosného oleje nebo rozpouštědla (stupeň čistoty, dodavatel atd.) použitého při obohacení potravy (pokud byly použity),

— použitý typ potravy (přibližná analýza [1]), čistota nebo kvalita, dodavatel atd.), množství potravy během fáze příjmu, množství podávané potravy a četnost krmení (včetně jakýchkoli úprav na základě hmotnosti ryb ve vzorku),

— doba, kdy byly ryby odebrány a usmrceny za účelem analýzy chemické látky při každém odběru vzorků (např. jedna hodina před krmením v následující den).

Výsledky:

— výsledky jakýchkoli předběžných studií,

— informace o jakýchkoli nepříznivých účincích, které byly zpozorovány,

— úplný popis všech použitých postupů analýzy chemických látek, včetně mezí detekce a mezí kvantifikace, variability a výtěžku,

— naměřené koncentrace lipidů v potravě (obohacené a kontrolní krmivo), jednotlivé, střední hodnoty a směrodatné odchylky,

— v tabulce uvedené údaje o hmotnosti (a délce) ryb spojené s jednotlivými rybami z kontrolní a zkušební skupiny (například pomocí jedinečných identifikátorů každé ryby) a výpočty, odvozená rychlostní konstanta (konstanty) růstu a 95 % interval (intervaly) spolehlivosti,

— v tabulce uvedené údaje o koncentracích zkoušené látky v rybách, střední hodnoty naměřené koncentrace na konci fáze příjmu ($C_{0,m}$) a odvozená (celková) rychlostní konstanta vylučování (k_2) a koncentrace v rybách na začátku fáze vylučování ($C_{0,d}$) spolu s odchylkami od těchto hodnot (směrnice a úsek),

— v tabulce uvedené údaje o obsahu lipidů (případně vztažené ke konkrétním koncentracím látky), střední hodnoty pro zkušební skupinu a kontrolní skupinu na začátku zkoušky, na konci fáze příjmu a na konci fáze vylučování),

— křivky (včetně všech naměřených údajů) zobrazující následující údaje (koncentrace mohou být případně vztaženy k celému tělu ryb nebo na jeho specifikované tkáně):

  — růst (tj. hmotnost (a délka) ryb oproti času) nebo přirozený logaritmus transformované hmotnosti oproti času,

[1] Ve volné přírodě k největší expozici ve vodním prostředí pravděpodobně dochází prostřednictvím pojídání velmi hydrofobních látek, takže odhadnutý BCF není striktně reprezentativní pro vyjádření bioakumulačního potenciálu takové látky.

▼M7

— vylučování zkoušené látky z ryb a

— přirozený logaritmus transformované koncentrace (ln koncentrace) oproti fázi vylučování (včetně odvozené rychlostní konstanty vylučování k_2 a včetně přirozeného logaritmu odvozené koncentrace v rybách na začátku fáze vylučování, $C_{0,d}$),

— jestliže se vizuální kontrolou grafu zjistí zřetelně odlehlé hodnoty, lze použít statisticky validní test odlehlých hodnot k odstranění nevěrohodných datových bodů spolu s podloženým odůvodněním jejich vypuštění,

— vypočítaná rychlostní konstanta vylučování upravená o růst a vypočítaný poločas upravený o růst,

— vypočítaná účinnost asimilace (α),

— „hrubý“ potravní BMF, kinetický BMF upravený o lipidy a o zředění růstem („hrubý“ a upravený o lipidy na základě živé hmotnosti celých ryb), případně BMF pro jednotlivé tkáně,

— veškeré informace týkající se radioizotopově značených metabolitů zkoušené látky a jejich akumulace,

— všechny zvláštnosti zkoušky, všechny odchylky od těchto postupů a ostatní podstatné informace,

— souhrnná tabulka příslušných naměřených a vypočtených údajů, jak je uvedeno dále:

Rychlostní konstanty vylučování a bioobohacovací faktory (BMF_K) látek	
k_g (rychlostní konstanta růstu; den^{-1}):	vložit hodnotu (95 % CI) (1)
k_2 (celková rychlostní konstanta vylučování; jednotka/den):	vložit hodnotu (95 % CI) (184)
k_{2g} (rychlostní konstanta vylučování upravená o růst; den^{-1}):	vložit hodnotu (95 % CI) (1)
$C_{0,m}$ (naměřená koncentrace v čase nula, koncentrace v rybách na konci příjmu) (µg/g):	vložit hodnotu ± SD (2)
$C_{0,d}$ (odvozená koncentrace v čase nula fáze vylučování; µg/g):	vložit hodnotu ± SD (2)
I (stanovená rychlost pojídání krmiva; g potravy/g ryby/den):	vložit hodnotu
I_g (efektivní množství potravy upravené o růst; g potravy/g ryby/den) (2):	vložit hodnotu ± SD (2)
C_{food} (koncentrace chemické látky v potravě; µg/g):	vložit hodnotu ± SD (2)
α (účinnost asimilace látky):	vložit hodnotu ± SD (2)
BMF_K (kinetický potravní BMF):	vložit hodnotu (95 % CI) (1)
BMF_{Kg} (kinetický potravní BMF upravený o růst):	vložit hodnotu (95 % CI) (1)

▼M7

Rychlostní konstanty vylučování a bioobohacovací faktory (BMF_K) látek	
$t_{1/2g}$ (poločas upravený o růst; dny):	vložit hodnotu ± SD (2)
*L*c (faktor úpravy o lipidy):	vložit hodnotu
BMF_{KgL} (kinetický BMF upravený o růst, upravený o lipidy):	vložit hodnotu
BMF_{SS-L} (orientační BMF v rovnovážném stavu upravený o lipidy) (2):	vložit hodnotu ± SD (2)

(1) CL: interval spolehlivosti (pokud je možné ho odhadnout).
(2) SD: směrodatná odchylka (pokud je možné ji odhadnout).

LITERATURA

1) *Kapitola C.13 této přílohy*, Bioakumulace v rybách: expozice ve vodním prostředí a v potravě.

2) *Kapitola A.6 této přílohy*, Rozpustnost ve vodě

3) Li A, Doucette W.J. (1993), The effect of cosolutes on the aqueous solubilities and octanol/water partition coefficients of selected polychlorinated biphenyl congeners. Environ Toxicol Chem 12: 2031–2035

4) Kapitola A.8 této přílohy, Rozdělovací koeficient (n-oktanol/voda): Metoda třepací láhve.

5) Kapitola A.24 této přílohy, Rozdělovací koeficient (n-oktanol/voda): Metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie.

6) Kapitola A.23 této přílohy, Rozdělovací koeficient (1-oktanol/voda): Metoda pomalého míchání.

7) Kapitola C.7 této přílohy, Hydrolýza jako funkce pH.

8) (OECD (1997), OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment Number 7: Guidance Document on Direct Phototransformation of Chemicals in Water OCDE/GD(97)21. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), Paris, France.

9) Kapitola A.5 této přílohy, Povrchové napětí vodných roztoků.

10) Kapitola A.4 této přílohy, Tlak par.

11) Kapitola C.4 této přílohy, Přímá biologická rozložitelnost.

12) Kapitola C.29 této přílohy, Přímá biologická rozložitelnost – CO_2 v uzavřených nádobách.

13) Connell D.W. (1988), Bioaccumulation behaviour of persistent chemicals with aquatic organisms. Rev. Environ. Contam. Toxicol. 102: 117–156.

14) Bintein S., Devillers J. and Karcher W. (1993), Nonlinear dependence of fish bioconcentration on *n*-octanol/water partition coefficient. SAR QSAR Environ. Res. 1: 29–39.

15) OECD (2011), QSAR Toolbox 2.1. February 2011. Available from: http://www.oecd.org/document/54/0,3746,en_2649_34379_42923638_1_1_1_1,00.html.

▼M7

16) Brown R.S., Akhtar P., Åkerman J., Hampel L., Kozin I.S., Villerius L.A. and Klamer H.J.C. (2001), Partition controlled delivery of hydrophobic substances in toxicity tests using poly(dimethylsiloxane) (PDMS) films. Environ. Sci. Technol. 35: 4097–4102.

17) Fernandez J.D., Denny J.S. and Tietge J.E. (1998), A simple apparatus for administering 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin to commercially available pelletized fish food. Environ. Toxicol. Chem. 17: 2058–2062.

18) Nichols J.W., Fitzsimmons P.N., Whiteman F.W. and Dawson T.D. (2004), A physiologically based toxicokinetic model for dietary uptake of hydrophobic organic compounds by fish: I. Feeding studies with 2,2′, 5,5′-tetrachlorobiphenyl. Toxicol. Sci. 77: 206–218.

19) Parkerton T.F., Arnot J.A., Weisbrod A.V., Russom C., Hoke R.A., Woodburn K., Traas T., Bonnell M., Burkhard L.P. and Lampi M.A. (2008), Guidance for evaluating *in vivo* fish bioaccumulation data. Integr. Environ. Assess. Manag. 4: 139–155.

20) Verbruggen E.M.J., Beek M., Pijnenburg J. and Traas T.P. (2008). Ecotoxicological environmental risk limits for total petroleum hydrocarbons on the basis of internal lipid concentrations. Environ. Toxicol. Chem. 27: 2436–2448.

21) Schlechtriem C., Fliedner A. and Schäfers C. (2012), Determination of lipid content in fish samples from bioaccumulation studies: Contributions to the revision of OECD Test Guideline 305. Environmental Sciences Europe 2012, 24:13. published: 3 April 2012.

22) Kapitola C.47 této přílohy, Zkouška toxicity v raných fázích života ryb.

23) Kapitola C.15 této přílohy, Zkouška krátkodobé toxicity na rybím embryu a váčkovém plůdku.

24) Kapitola C.14 této přílohy, Růstová zkouška na nedospělých rybách.

25) OECD (2000), OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 23: Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures ENV/JM/MONO(2000)6. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), Paris, France.

26) US-EPA (1994), Great Lake water quality initiative technical support document for the procedure to determine bioaccumulation factors 822-R-94-002. US EPA, Office of Water, Office of Science and Technology, Washington, DC, USA.

27) US-FDA (1999), Pesticide analytical manual (PAM). Vol.1. US Food and Drug Administration, Rockville, MD, USA.

28) US-EPA (1974), Section 5, A (1) Analysis of Human or Animal Adipose Tissue, in Analysis of Pesticide Residues in Human and Environmental Samples, Thompson, J.F., Editor. US-EPA, Research Triangle Park, NC, USA

29) Bligh E.G. and Dyer W.J. (1959), A rapid method of total lipid extraction and purification. Can. J. Biochem. Physiol. 37: 911–917.

30) Gardner W.S., Frez W.A., Cichocki E.A. and Parrish C.C. (1985), Micromethod for lipids in aquatic invertebrates. Limnol. Oceanogr. 30: 1099–1105.

31) Smedes F. (1999), Determination of total lipid using non-chlorinated solvents. Analyst. 124: 1711–1718.

32) OECD (2006), OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 54: Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: a guidance to application. ENV/JM/MONO(2006)18. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), Paris, France.

▼M7

33) Springer T.A., Guiney P.D., Krueger H.O. and Jaber M.J. (2008), Assessment of an approach to estimating aquatic bioconcentration factors using reduced sampling. Environ. Toxicol. Chem. 27: 2271–2280.

34) Springer T.A. (2009), Statistical Research Related to Update of OECD Guideline 305. Wildlife International, Ltd, Easton, MD, USA.

35) Arnot J.A., Meylan W., Tunkel J., Howard P.H., Mackay D., Bonnell M. and Boethling R.S. (2009), A quantitative structure-activity relationship for predicting metabolic biotransformation rates for organic chemicals in fish. Environ. Toxicol. Chem. 28: 1168–1177.

36) Parkerton T., Letinski D., Febbo E., Davi R., Dzambia C., Connelly M., Christensen K. and Peterson D. (2001), A practical testing approach for assessing bioaccumulation potential of poorly water soluble organic chemicals (presentation). in SETAC Europe 12th Annual Meeting: Madrid, Spain.

37) Fisk A.T., Cymbalisty C.D., Bergman Ã. and Muir D.C.G. (1996), Dietary accumulation of C_{12}- and C_{16}-chlorinated alkanes by juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Environ. Toxicol. Chem. 15: 1775–1782.

38) Anonymous (2004), Fish, dietary bioaccumulation study – Basic protocol, document submitted to the TC-NES WG on PBT.

39) Anonymous (2004), Background document to the fish dietary study protocol, document submitted to the TC-NES WG on PBT.

40) Bruggeman W.A., Opperhuizen A., Wijbenga A. and Hutzinger O. (1984), Bioaccumulation of super-lipophilic chemicals in fish, Toxicol. Environ. Chem. 7: 173-189.

41) Muir D.C.G., Marshall W.K. and Webster G.R.B. (1985), Bioconcentration of PCDDs by fish: effects of molecular structure and water chemistry. Chemosphere. 14: 829–833.

42) Thomann R.V. (1989), Bioaccumulation model of organic chemical distribution in aquatic food chains. Environ. Sci. Technol. 23: 699–707.

43) Nichols J.W., Fitzsimmons P.N. and Whiteman F.W. (2004), A physiologically based toxicokinetic model for dietary uptake of hydrophobic organic compounds by fish: II. Stimulation of chronic exposure scenarios. Toxicol. Sci. 77: 219–229.

44) Gobas F.A.P.C., de Wolf W., Burkhard L.P., Verbruggen E. and Plotzke K. (2009), Revisiting bioaccumulation criteria for POPs and PBT assessments. Integr. Environ. Assess. Manag. 5: 624–637.

45) Sijm D.T.H.M. and van der Linde A. (1995), Size-dependent bioconcentration kinetics of hydrophobic organic chemicals in fish based on diffusive mass transfer and allometric relationships. Environ. Sci. Technol. 29: 2769–2777.

46) Sijm D.T.H.M., Verberne M.E., de Jonge W.J., Pärt P. and Opperhuizen A. (1995), Allometry in the uptake of hydrophobic chemicals determined *in vivo* and in isolated perfused gills. Toxicol. Appl. Pharmacol. 131: 130–135.

47) Fisk A.T., Norstrom R.J., Cymbalisty C.D. and Muir D.G.G. (1998), Dietary accumulation and depuration of hydrophobic organochlorines: Bioaccumulation parameters and their relationship with the octanol/water partition coefficient. Environ. Toxicol. Chem. 17: 951–961.

48) McGrath J.A., Parkerton T.F. and Di Toro D.M. (2004), Application of the narcosis target lipid model to algal toxicity and deriving predicted-no-effect concentrations. Environ. Toxicol. Chem. 23: 2503–2517.

49) Poppendieck D.G. (2002), Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Desorption Mechanisms from Manufactured Gas Plant Site Samples. Dissertation. Department of Civil, Architectural and Environmental Engineering, University of Texas, Austin, TX, USA.

▼**M7**

50) McCarty L.S. and Mackay D. (1993), Enhancing ecotoxicological modelling and assessment: body residues and modes of toxic action. Environ. Sci. Technol. 27: 1718–1728.

51) OECD (2012), OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 175: Part I – Validation Report of a ring test for the OECD TG 305 dietary exposure bioaccumulation fish test. Part II – Additional Report including comparative analysis of trout and carp results ENV/JM/MONO(2012)20. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), Paris, France.

▼M7

Dodatek 1

DEFINICE A JEDNOTKY

Účinnost asimilace (α) je míra poměrného množství látky absorbované ze střev do organismu (α je bezrozměrná veličina, ale často se vyjadřuje spíše v procentech než jako zlomek).

Bioakumulací se obvykle označuje proces, při kterém koncentrace látky v organismu dosáhne úrovně, jež převyšuje úroveň koncentrace v respiratorním médiu (např. vody u ryb nebo vzduchu u savců), v potravě nebo v obojím (1).

Biokoncentrace je nárůst koncentrace zkoušené látky v organismu (nebo v jeho specifikované tkáni) nebo na něm vzhledem ke koncentraci zkoušené látky v okolním médiu.

Biokoncentrační faktor (BCF nebo KB) je koncentrace zkoušené chemické látky v rybách nebo na nich nebo v jejich specifikovaných tkáních (Cf jako mg/kg) dělená koncentrací chemické látky v okolním médiu (Cw jako mg/l), a to kdykoliv ve fázi příjmu při této zkoušce. BCF se vyjadřuje v l/kg. Poznámka: Úpravy o růst a/nebo o standardní obsah lipidů se nezohledňují.

Bioobohacování je nárůst koncentrace zkoušené látky v organismu (nebo v jeho specifikované tkáni) nebo na něm vzhledem ke koncentraci zkoušené látky v potravě.

Bioobohacovací faktor (BMF) je koncentrace látky v predátorovi vzhledem k její koncentrací v predátorově kořisti (nebo potravě) v rovnovážném stavu. V metodě popsané v této zkušební metodě se pečlivě zabraňuje expozici prostřednictvím vodné fáze, a hodnotu BMF z této zkušební metody tedy nelze přímo srovnávat s hodnotou BMF ze studie za reálných podmínek (ve které může být kombinována expozice prostřednictvím vody i potravy).

Potravní bioobohacovací faktor (potravní BMF) je výraz používaný v této zkušební metodě k popisu výsledku zkoušky expozice v potravě, ve které se pečlivě zabraňuje expozici prostřednictvím vodné fáze, a tedy hodnotu potravního BMF z této zkušební metody nelze přímo srovnávat s hodnotou BMF ze studie za reálných podmínek (ve které může být kombinována expozice prostřednictvím vody i potravy).

Poexpoziční nebo vylučovací fáze je časový úsek po přemístění zkušebních ryb z média obsahujícího zkoušenou látku do média, které tuto látku neobsahuje, během něhož se studuje vylučování látky ze zkušebních ryb (nebo její čistý úbytek v nich).

Rychlostní konstanta vylučování (k2) je číselná hodnota definující rychlost poklesu koncentrace zkoušené látky v zkušebních rybách (nebo v jejich specifikovaných tkáních) po jejich přemístění z média obsahujícího zkoušenou látku do média, které tuto látku neobsahuje (k2 se vyjadřuje jako číselná hodnota za den (tj. den-1).

Rozpuštěný organický uhlík (DOC) je mírou koncentrace uhlíku pocházejícího z rozpuštěných organických zdrojů ve zkušebním médiu.

Expozice nebo fáze příjmu je časový úsek, během něhož jsou ryby vystaveny působení zkoušené chemické látky.

Rychlost pojídání potravy (I) je průměrné množství potravy, kterou každá ryba požije každý den, vzhledem k odhadované průměrné hmotnosti celého těla ryb (vyjadřuje se v g potravy na g ryby za den).

▼M7

Kinetický biokoncentrační faktor (BCFK) je poměr rychlostní konstanty příjmu, k1, a rychlostní konstanty vylučování, k2 (tj. k1/k2 – viz příslušné definice v tomto dodatku). Jeho hodnota by v zásadě měla být srovnatelná s hodnotou BCFSS (viz definice výše) ale může dojít k odchylkám, pokud rovnovážný stav byl nejistý nebo pokud byly v kinetickém BCF provedeny úpravy o růst.

Kinetický biokoncentrační faktor s normalizovanými lipidy (BCFKL) je normalizován na ryby s 5 % obsahem lipidů.

Kinetický biokoncentrační faktor s normalizovanými lipidy, upravený o růst (BCFKgL) je normalizován na ryby s 5 % obsahem lipidů a upraven o růst během doby zkoušky, jak je popsáno v dodatku 5).

Kinetický biokoncentrační faktor v rovnovážném stavu s normalizovanými lipidy (BCFSSL) je normalizován na ryby s 5 % obsahem lipidů.

Vícesložková chemická látka je pro účely nařízení REACH definována jako látka, v níž je přítomno více než jedna hlavní složka v koncentraci od 10 % do 80 % hmot.

Rozdělovací koeficient n-oktanol/voda (KOW) je rovnovážný poměr mezi rozpustností chemické látky v n-oktanolu a ve vodě (zkušební metody A.8 (2), A.24 (3), A.23 (4)); označuje se také jako POW. Logaritmus hodnoty KOW se používá jako ukazatel schopnosti chemické látky bioakumulovat se ve vodních organismech.

Částicový organický uhlík (POC) je míra koncentrace uhlíku pocházejícího ze suspendovaných organických zdrojů ve zkušebním médiu.

Mikroextrakce pevnou fází (SPME) je analytická metoda za nepřítomnosti rozpouštědla vyvinutá pro zředěné systémy. Při této metodě se vlákno pokryté polymerem vystaví působnosti plynné nebo kapalné fáze obsahující analyt, který je předmětem zájmu. Zpravidla se stanoví minimální doba analýzy, takže se nastolí podmínky rovnováhy mezi tuhou a kapalnou fází, s ohledem na měřené druhy ryb. Následně lze koncentraci analytu, který je předmětem zájmu, stanovit přímo z vlákna nebo po jeho extrakci z vlákna do rozpouštědla, v závislosti na metodě stanovení.

Rovnovážného stavu je dosaženo tehdy, je-li v grafickém znázornění křivka časové závislosti koncentrace zkoušené látky v rybách (Cf) rovnoběžná s časovou osou a tři po sobě jdoucí analýzy Cf vzorků odebraných v intervalech alespoň dvou dnů se neliší více než o ± 20 % a nedojde-li v době mezi první a po ní jdoucí poslední analýzou k žádnému výraznému nárůstu Cf. Analyzují-li se spojené vzorky, požadují se alespoň čtyři po sobě jdoucí analýzy. V případě zkoušených látek, jejichž příjem probíhá pomalu, jsou vhodnější sedmidenní intervaly.

Biokoncentrační faktor v rovnovážném stavu (BCFSS) se po dlouhou dobu výrazně nemění; koncentrace zkoušené látky v okolním médiu je po tuto dobu konstantní (srov. definice rovnovážného stavu).

Celkový organický uhlík (TOC) je mírou koncentrace uhlíku pocházejícího ze všech organických zdrojů ve zkušebním médiu, zahrnuje uhlík z částic a z rozpuštěných zdrojů.

Rychlostní konstanta příjmu (k1) je číselná hodnota definující rychlost nárůstu koncentrace zkoušené látky v zkušebních rybách nebo na nich (nebo v jejich specifikovaných tkáních), jsou-li ryby této látce vystaveny (k1 se vyjadřuje v jednotkách na kg za den).

Látky s neznámým nebo proměnlivým složením, komplexní reakční produkty a biologický materiál jsou známy jako UVCB.

▼**M7**

Chemická látka je chemická subtance nebo směs.

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

LITERATURA

1) Gobas F.A.P.C., de Wolf W., Burkhard L.P., Verbruggen E. and Plotzke K. (2009), Revisiting bioaccumulation criteria for POPs and PBT assessments. Integr. Environ. Assess. Manag. 5: 624–637.

2) *Kapitola A.8 této přílohy*, Rozdělovací koeficient (n-oktanol/voda): Metoda třepací lahve.

3) *Kapitola A.24 této přílohy*, Rozdělovací koeficient (n-oktanol/voda), Metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie.

4) *Kapitola A.23 této přílohy*, Rozdělovací koeficient (1-oktanol/voda): Metoda pomalého míchání.

▼M7

Dodatek 2

NĚKTERÉ CHEMICKÉ CHARAKTERISTIKY PŘIJATELNÉ ŘEDICÍ VODY

Složka	Koncentrační limit
Částice	5 mg/l
Celkový organický uhlík	2 mg/l
Neionizovaný amoniak	1 µg/l
Zbytkový chlor	10 µg/l
Celkové organofosforové pesticidy	50 ng/l
Celkové organochlorové pesticidy, polychlorované bifenyly	50 ng/l
Celkový organický chlor	25 ng/l
Hliník	1 µg/l
Arsen	1 µg/l
Chrom	1 µg/l
Kobalt	1 µg/l
Měď	1 µg/l
Železo	1 µg/l
Olovo	1 µg/l
Nikl	1 µg/l
Zinek	1 µg/l
Kadmium	100 ng/l
Rtuť	100 ng/l
Stříbro	100 ng/l

▼M7

Dodatek 3

DRUHY RYB DOPORUČENÉ PRO ZKOUŠKU

Doporučené druhy	Doporučené rozpětí teploty při zkoušce (°C)	Doporučená celková délka těla zkušebních jedinců (cm) (2)
Danio rerio (1) (Teleostei, Cyprinidae) (Hamilton-Buchanan) dánio pruhované	20–25	3,0 ± 0,5
Pimephales promelas (Teleostei, Cyprinidae) (Rafinesque) jeleček velkohlavý	20–25	5,0 ± 2,0
Cyprinus carpio (Teleostei, Cyprinidae) (Linnaeus) kapr obecný	20–25	8,0 ± 4,0 (3)
Oryzias latipes (Teleostei, Poecilliidae) (Temminck and Schlegel) halančík japonský (jinak též medaka japonská)	20–25	4,0 ± 1,0
Poecilia reticulata (Teleostei, Poeciliidae) živorodka duhová	20–25	3,0 ± 1,0
Lepomis macrochirus (Teleostei, Centrarchidae) slunečnice obecná (jinak též velkoploutvá)	20–25	5,0 ± 2,0
Oncorhynchus mykiss (Teleostei, Salmonidae) (Walbaum) pstruh duhový	13–17	8,0 ± 4,0
Gasterosteus aculeatus (Teleostei, Gasterosteidae) (Linnaeus) koljuška tříostná	18–20	3,0 ± 1,0

(1) Meyer et al. (1)

(2) Je třeba poznamenat, že v samotné zkoušce se upřednostňuje hmotnost jako měřítko změn rychlostních konstant velikosti a růstu. Uznává se však, že praktičtější je poměřovat ryby délkou, pokud mají být na začátku pokusu vybírány vizuálně (tj. z kmenové populace).

(3) Toto délkové rozpětí je uvedeno v Metodách zkoušení nových chemických látek atd., které vycházejí z japonského zákona o kontrole chemických látek.

Různé estuarinní nebo mořské druhy byly používány méně často, například:

smuha žlutavá	(*Leiostomus xanthurus*)
halančíkovec diamantový	(*Cyprinodon variegatus*)
menidie pobřežní	(*Menidia beryllina*)
příbojovka (čeleď *Embiotocidae*)	(*Cymatogaster aggregata*)
mořský jazyk	(*Parophrys vetulus*)
vranka (čeleď *Cottidae*)	(*Leptocottus armatus*)
koljuška tříostná	(*Gasterosteus aculeatus*)
mořčák evropský	(*Dicentracus labrax*)
ouklej obecná	(*Alburnus alburnus*)

▼**M7**

Sladkovodní ryby uvedené v tabulce se snadno chovají a/nebo jsou dobře dostupné po celý rok, zatímco dostupnost mořských nebo estuarinních ryb je částečně omezena na určité země. Lze je množit a chovat buď v rybích farmách, nebo v laboratoři za kontrolovaných zdravotních a parazitologických podmínek tak, aby pokusné ryby byly zdravé a byly známého původu. Tyto ryby jsou dostupné v mnoha částech světa.

LITERATURA

1) Meyer A., Biermann C.H. and Orti G. (1993), The phylogenetic position of the zebrafish (*Danio rerio*), a model system in developmental biology: An invitation to the comparative method Proc. R. Soc. Lond. B. 252: 231–236.

▼M7

Dodatek 4

HARMONOGRAMY ODBĚRU VZORKŮ PRO ZKOUŠKY EXPOZICE VE VODNÍM PROSTŘEDÍ A V POTRAVĚ

1. **Teoretický příklad harmonogramu odběru vzorků pro úplnou zkoušku biokoncentrace látky s log KOW = 4 s expozicí ve vodním prostředí.**

Odběr vzorků ryb	Časový rozvrh odběru vzorků		Počet vzorků vody (1)	Počet ryb ve vzorku (1)
	Minimální požadovaná četnost (dny) (2)	Dodatečný odběr vzorků (dny) (2)		
Fáze příjmu				
1	– 1		2 (3)	4 (4)
	0		(2)	(3 (6))
2	0,3		2	4
		0,4	(2)	(4)
3	0,6		2	4
		0,9	(2)	(4)
4	1,2		2	4
		1,7	(2)	(4)
5	2,4		2	4
		3,3	(2)	(4)
6	4,7		2	4–8 (5)
				(3 (6))
Fáze vylučování				Přemístění ryb do vody neobsahující zkoušenou látku
7	5,0		2	4
		5,3		(4)
8	5,9		2	4
		7,0		(4)
9	9,3		2	4
		11,2		(4)
10	14,0		2	4–8 (5)
		17,5		(4 + 3 (6))
CELKEM				40–72 48 ± 80 (5)

(1) Hodnoty v závorkách jsou počty vzorků (vody, ryb), které mají být odebrány, je-li prováděn dodatečný odběr.
(2) Předběžný odhad k2 pro log KOW = 4,0 je 0,652/den. Celková délka experimentu je stanovena na $3 \times t_{SS} = 3 \times 4{,}6$ dnů, tj. 14 dnů. Odhad hodnoty tSS viz dodatek 5.
(3) Odběr vzorku vody po dodání alespoň tří „objemů nádrže“.
(4) Tyto ryby se odebírají z kmenové populace.
(5) Je-li nutná větší přesnost nebo studie metabolismu, jež vyžadují více ryb, měly by se tyto ryby (odebírat zejména na konci fáze příjmu a fáze vylučování (srov. odstavec 40).
(6) Pro analýzu obsahu lipidů mohou být zapotřebí přinejmenším další 3 ryby, není-li možné použít tytéž ryby odebrané za účelem měření koncentrací látky na začátku zkoušky, na konci fáze příjmu a na konci fáze vylučování. Poznámka: V mnoha případech by mělo být možné použít pouze 3 ryby z kontrolní skupiny (srov. odstavec 56).

▼M7

2. **Teoretický příklad harmonogramu odběru vzorků pro zkoušku bioakumulace látky v potravě po 10denní fázi příjmu a 42denní fázi vylučování.**

Odběr	Časový rozvrh odběru vzorků		Počet vzorků potravy	Počet ryb ve vzorku	
	Den fáze	Dodatečné vzorky ryb?		Zkušební skupina	Kontrolní skupina
Fáze příjmu					
1	0	Možné ([1]) ([2])	3 – exponovaná skupina	0	5–10
			3 – kontrolní skupina		8 ± 13 ([2])
1A ([3])	1–3			5–10	5–10
2	10	Ano ([4])	3 – exponovaná skupina	10–15 ([4])	5–10
			3 – kontrolní skupina	13 ± 18 ([5])	8 ± 13 ([5])
Fáze vylučování					
3	1	Ano ([4])		10–15 ([4])	5–10
4	2			5–10	5–10
5	4			5–10	5–10
6	7	Ano ([4])		10–15 ([4])	5–10
7	14			5–10	5–10
8	28			5–10	5–10
9	42	Ano ([4])		10–15 ([4]) 13 ± 18 ([5])	5–10 8 ± 13 ([5])
CELKEM				59–120 63 ± 126 ([4]) ([5])	50–110 56 ± 116 ([4]) ([5])

([1]) Po 3 vzorcích potravy z kontrolní a exponovaní skupiny, na kterých se analyzují koncentrace zkoušené látky a obsah lipidů.
([2]) Ryby se odebírají z kmenové populace co nejblíže k zahájení studie; alespoň 3 ryby z kmenové populace by na začátku zkoušky měly být odebrány za účelem analýzy obsahu lipidů.
([3]) (Nepovinný) odběr vzorků v rané fázi příjmu poskytne údaje k výpočtu asimilace zkoušené látky podávané v potravě, které lze porovnat s účinností asimilace vypočtenou z údajů o fázi vylučování.
([4]) 5 ryb navíc může být odebráno k analýze jednotlivých tkání.
([5]) Pro analýzu obsahu lipidů mohou být zapotřebí přinejmenším další 3 ryby, není-li možné použít tytéž ryby odebrané za účelem měření koncentrací látky na začátku zkoušky, na konci fáze příjmu a na konci fáze vylučování. Poznámka: V mnoha případech by mělo být možné použít pouze 3 kontrolní ryby (srov. odstavce 56 a 153).

Poznámka k načasování fází a odběrů vzorků: Fáze příjmu začíná prvním podáním obohacené potravy. Experimentální den trvá od jednoho krmení do doby krátce před příštím krmením o 24 hodin později. První odběr vzorků (č. 1 v tabulce) by se měl uskutečnit krátce před prvním krmením. Odběr vzorků během studie by v ideálním případě měl být proveden krátce před krmením následujícího dne (tj. asi 23 hodin po krmení v den odběru vzorků). Fáze příjmu končí krátce před prvním podáním neobohacené potravy, kdy začíná fáze vylučování (ryby v zkušební skupině budou v mezidobí 24 hodin po posledním podání obohacené potravy pravděpodobně ještě trávit obohacené krmivo). To znamená, že vzorek na konci fáze příjmu by měl být odebrán krátce před prvním podáním neobohacené potravy a první vzorek ve fázi vylučování by měl být odebrán asi 23 hodin po prvním podání neobohaceného krmiva.

▼M7

Dodatek 5

VŠEOBECNÉ VÝPOČTY

1. Úvod

2. Předpověď délky fáze příjmu

3. Předpověď délky fáze vylučování

4 Metoda postupného stanovení: stanovení rychlostní konstanty vylučování (úbytku) k2

5. Metoda postupného stanovení: stanovení rychlostní konstanty příjmu k1 (pouze pro metodu expozice ve vodním prostředí)

6. Metoda současného stanovení pro výpočet rychlostních konstant příjmu a vylučování (úbytku) (pouze pro metodu expozice ve vodním prostředí)

7. Úprava kinetického BCF a BMF o zředění růstem

8. Normalizace lipidů na 5 % obsah lipidů (pouze pro metodu expozice ve vodním prostředí)

1. ÚVOD

Obecný model bioakumulace v rybách ve vodním prostředí lze popsat z hlediska procesů příjmu a úbytku, nehledě na příjem potravy. Diferenciální rovnice (dCf/dt) popisující rychlost změny koncentrace v rybách (mg/kg/den) je dána rovnicí (1):

$$\frac{dC_f}{dt} = k_1 \times C_w - (k_2 + k_g + k_m + k_e) \times C_f \qquad \text{[Rovnice A5.1]}$$

kde

k1 = rychlostní konstanta příjmu u ryb s kinetikou prvního řádu (jednotka/kg/den),

k2 = rychlostní konstanta vylučování z ryb s kinetikou prvního řádu (jednotka/kg/den),

kg = rychlostní konstanta růstu ryb s kinetikou prvního řádu („ředění růstem“) (jednotka/den),

km = rychlostní konstanta látkové přeměny s kinetikou prvního řádu (jednotka/den),

kg = rychlostní konstanta vypuzení výměšků s kinetikou prvního řádu (jednotka/den),

Cw = koncentrace ve vodě (mg/l),

Cf = koncentrace v rybách (mg/kg živé hmotnosti).

U bioakumulujících látek lze očekávat, že nejpodstatnější hodnotou zkušební koncentrace ve vodě (Cw) v rámci přípustného rozpětí kolísání (srov. odstavec 24) je časově vážená průměrná hodnota (TWA). TWA koncentrace ve vodě se doporučuje vypočítat postupem uvedeným v dodatku 6 zkušební metody C.20 (2). Je třeba poznamenat, že pokud se očekává exponenciální rozpad mezi obnoveními, např. při semistatickém uspořádání zkoušky, je vhodná logaritmická transformace koncentrace ve vodě. Při průtokovém systému logaritmická transformace zkušebních koncentrací možná nebude nutná. Jsou-li odvozeny TWA koncentrace ve vodě, měly by být uvedeny ve zprávě a použity v následných výpočtech.

Při standardní zkoušce BCF na rybách je možné příjem a vylučování popsat jako dva procesy s kinetickou prvního řádu.

▼M7

Rychlost příjmu = $k_1 \times C_w$ [Rovnice A5.2]

Celková rychlost úbytku = $(k_2 + k_g + k_m + k_e) \times C_f$ [Rovnice A5.3]

V rovnovážném stavu, předpokládáme-li, že růst a metabolismus jsou zanedbatelné (tj. hodnoty kg a km není možné odlišit od nuly), se rychlost příjmu rovná rychlosti vylučování, a kombinací rovnice A5.2 a rovnice A5.3 tedy získáme tento vztah:

$$BCF = \frac{C_{f\ -SS}}{C_{w\ -SS}} = \frac{k_1}{k_2}$$ [Rovnice A5.4]

kde

$C_{f\text{-}SS}$ = koncentrace v rybách v rovnovážném stavu (mg/kg živé hmotnosti),

$C_{w\text{-}SS}$ = koncentrace ve vodě v rovnovážném stavu (mg/l).

Poměr k1/k2 se označuje jako kinetický BCF (BCFK) a měl by se rovnat BCF v rovnovážném stavu (BCFSS) získanému z poměru koncentrace v rybách v rovnovážném stavu ke koncentraci ve vodě v rovnovážném stavu, avšak může dojít k odchylkám, pokud rovnovážný stav nebyl jasně stanoven nebo pokud byly u kinetického BCF provedeny úpravy o růst. Jelikož však k1 a k2 jsou konstanty, k odvození hodnoty BCFK není nutné dosáhnout rovnovážného stavu.

Na základě těchto prvních rovnic prvního řádu jsou v tomto dodatku 5 uvedeny všeobecné výpočty nezbytné pro bioakumulační metody expozice jak ve vodním prostředí, tak v potravě. Oddíly 5, 6 a 8 se ovšem týkají pouze metody expozice ve vodním prostředí, ale jsou zde uvedeny, neboť se jedná o „všeobecné“ postupy. Použití metod postupného (oddíly 4 a 5) a současného (oddíl 6) stanovení umožňuje výpočet konstant příjmu a vylučování, které se používají k odvození kinetických BCF. Metoda postupného stanovení hodnoty k2 (oddíl 4) je důležitá pro zkoušku expozice v potravě, neboť je nutná jak pro výpočet účinnosti asimilace, tak pro výpočet BMF. Výpočty, které jsou specifické pro studii potravy, jsou podrobně popsány v dodatku 7.

2. PŘEDPOVĚĎ DÉLKY FÁZE PŘÍJMU

Před provedením zkoušky lze získat odhad hodnoty k_2 a odtud lze získat dobu nezbytnou pro dosažení rovnovážného stavu z empirických vztahů mezi k_2 a rozdělovacím koeficientem n-oktanol/voda (KOW) nebo mezi k_1 a BCF. Je však třeba si uvědomit, že rovnice v tomto oddíle platí pouze v případě, že se příjem a vylučování řídí kinetikou prvního řádu. Pokud tomu tak zjevně není a je-li žádoucí mít předpovědi fáze příjmu, doporučuje se konzultovat biostatistika a/nebo farmakokinetika.

Odhad hodnoty k_2 (jednotka/den) lze získat několikerým způsobem. Mohly by být například nejprve použity tyto empirické vztahy ([1]):

$\log k_2 = 1{,}47 - 0{,}414 \log K_{OW}$ ($r^2 = 0{,}95$) [(3); Rovnice A5.5]

nebo

$$k_2 = \frac{k_1}{BCF}$$ [Rovnice A5.6]

kde $k_1 = 520 \times W^{-0{,}32}$ (u látek s hodnotou log $K_{OW} > 3$) ($r^2 = 0{,}85$) [(4); Rovnice A5.7]

([1]) Jako u každého empirického vztahu i zde by se mělo ověřit, zda zkoušená látka spadá do oblasti použitelnosti daného vztahu.

▼M7

a $BCF = 10^{(0{,}910 \cdot logK_{OW} - 1{,}975 \cdot \log(6{,}8 \cdot 10^{-7} K_{OW} + 1) - 0{,}786)}$ (r^2 = 0,90) [(5); Rovnice A5.8]

W = střední hodnota hmotnosti exponovaných ryb (v gramech živé hmotnosti) na konci fáze příjmu / začátku fáze vylučování ([1])

Jiné související vztahy viz (6). Při odhadu hodnoty k_2 může být výhodné použít složitější modely, například pokud je pravděpodobné, že může dojít k výraznému metabolismu (7) (8). Čím je však model složitější, tím obezřetněji je třeba přistupovat k interpretaci předpovědí. Například, přítomnost nitroskupin by mohla indikovat rychlý metabolismus, ale není tomu tak vždy. Uživatel by proto při plánování studie měl zvážit výsledky prediktivní metody s ohledem na chemickou strukturu a na jakékoli jiné důležité informace (například předběžné studie).

Dobu potřebnou pro dosažení určitého procenta rovnovážného stavu lze s použitím odhadu k2 získat z obecné kinetické rovnice popisující příjem a vylučování (s kinetikou prvního řádu), za předpokladu, že růst a metabolismus jsou zanedbatelné. Dojde-li během studie k výraznému růstu, nebudou níže popsané odhady spolehlivé. V takových případech je lepší použít hodnotu upravenou o růst, k_2 g, jak je popsáno dále (viz oddíl 7 tohoto dodatku).

$$\frac{dC_f}{dt} = k_1 C_W - k_2 C_f \qquad \text{[Rovnice A5.9]}$$

nebo, je-li Cw konstantní:

$$C_f = \frac{k_1}{k_2} \cdot C_W (1 - e^{-k_2 t}) \qquad \text{[Rovnice A5.10]}$$

Jestliže se blíží dosažení rovnovážného stavu ($t \rightarrow \infty$), lze rovnici A5.10 zjednodušit (srov. (9) (10)) a získáme:

$$C_f = \frac{k_1}{k_2} \cdot C_W \qquad \text{[Rovnice A5.11]}$$

nebo

$$\frac{C_f}{C_w} = \frac{k_1}{k_2} = BCF \qquad \text{[Rovnice A5.12]}$$

BCF × C_w se pak blíží koncentraci v rybách v rovnovážném stavu ($C_{f\text{-}SS}$). [Poznámka: stejný postup lze použít při odhadování BMF v rovnovážném stavu v rámci zkoušky expozice v potravě. V tomto případě se hodnota BCF ve shora uvedené rovnici nahradí BMF a hodnota C_w se nahradí C_{food}, koncentrací v potravě.]

Rovnice A5.10 může být přepsána na rovnici:

$$C_f = C_{f\ -SS}(1 - e^{-k_2 t}) \qquad \text{[Rovnice A5.13]}$$

nebo

$$\frac{C_f}{C_{f\ -SS}} = 1 - e^{-k_2 t} \qquad \text{[Rovnice A5.14]}$$

Pomocí rovnice A5.14 je možné předpovědět dobu potřebnou pro dosažení určitého procenta rovnovážného stavu, když hodnota k_2 je předem odhadnuta za použití rovnice A5.5 nebo rovnice A5.6.

Je pravidlem, že statisticky optimální délka fáze příjmu pro získání statisticky přijatelných údajů (BCFK) je doba potřebná k tomu, aby křivka sestrojená vynesením logaritmu koncentrace zkoušené látky v rybách proti času v lineárním

([1]) Hmotnost ryb na konci fáze příjmu lze odhadnout z údajů v dřívějších studiích nebo na základě znalosti pravděpodobného růstu daného zkušebního druhu z typické hmotnosti při zahájení zkoušky během typické délky fáze příjmu (např. 28 dnů).

▼M7

měřítku dosáhla alespoň 50 % rovnovážného stavu (tj. 0,69/k_2), ale ne více než 95 % rovnovážného stavu (tj. 3,0/k_2) (11). V případě, že akumulace překročí hodnotu 95 % rovnovážného stavu, je proveditelný výpočet BCF_{SS}.

Doba potřebná pro dosažení 80 % rovnovážného stavu činí (za použití rovnice A5.14):

$$0{,}80 = 1 - e^{-k_2 t} \qquad \text{[Rovnice A5.15]}$$

nebo

$$t_{80} = \frac{-\ln(0{,}20)}{k_2} = \frac{1{,}6}{k_2} \qquad \text{[Rovnice A5.16]}$$

Podobně doba potřebná pro dosažení 95 % rovnovážného stavu je:

$$t_{95} = \frac{-ln(0{,}05)}{k_2} = \frac{3{,}0}{k_2} \qquad \text{[Rovnice A5.17]}$$

Například délka fáze příjmu (tj. doba potřebná pro dosažení určitého procenta rovnovážného stavu, např. t_{80} nebo t_{95}) u látky s hodnotou log K_{OW} = 4 by byla (při použití rovnice A5.5, rovnice A5.16 a rovnice A5.17):

$$logk_2 = 1{,}47 - 0{,}414\ 4$$

$$k_2 = 0{,}652\ \text{den}^{-1}$$

$$t_{80} = \frac{1{,}6}{0{,}652} = 2{,}45 \text{ dní } (59 \text{ h})$$

$$\text{nebo } t_{95} = \frac{3{,}0}{0{,}652} = 4{,}60 \text{ dní } (110 \text{ h})$$

Alternativně výraz:

$$t_{eSS} = 6{,}54 \cdot 10^{-3} \cdot K_{OW} + 55{,}31\ (h) \qquad \text{[Rovnice A5.18]}$$

může být eventuálně použit pro výpočet doby potřebné k dosažení efektivního rovnovážného stavu (t_{eSS}) (12). V případě zkoušené látky s hodnotou log KOW = 4 to vede k výsledku:

$$t_{eSS} = 6{,}54 \cdot 10^{-3} \cdot 10^4 + 55{,}31 = 121\ hours$$

3. PŘEDPOVĚĎ DÉLKY FÁZE VYLUČOVÁNÍ

Předpověď doby potřebné ke snížení obsahu určitého procenta původní koncentrace v těle lze rovněž získat z obecné rovnice vyjadřující příjem a vylučování (za předpokladu kinetiky prvního řádu, viz rovnice A5.9 (1) (13).

Ve fázi vylučování se má za to, že hodnota Cw (nebo C_{food} v případě studie potravy) je nulová. Rovnice může pak být zjednodušena na rovnici:

$$\frac{dC_f}{dt} = k_2 C_f \qquad \text{[Rovnice A5.19]}$$

nebo

$$C_f = C_{f,0} \cdot e^{-k_2 t} \qquad \text{[Rovnice A5.20]}$$

kde $C_{f,0}$ je koncentrace na počátku fáze vylučování.

50 % vyloučení bude dosaženo v čase t50:

▼M7

$$\frac{C_f}{C_{f,0}} = \frac{1}{2} = e^{-k_2 t_{50}}$$

nebo

$$t_{50} = \frac{-ln\,(0{,}50)}{k_2} = \frac{0{,}693}{k_2}$$

Podobně 95 % vyloučení bude dosaženo v čase:

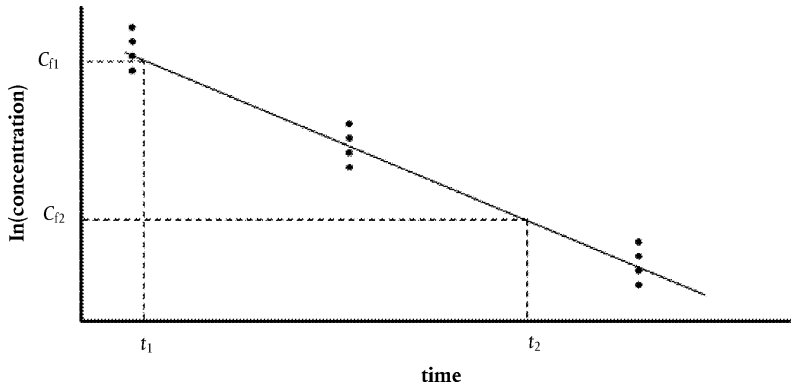
$$t_{95} = \frac{-ln\,(0{,}05)}{k_2} = \frac{3{,}0}{k_2}$$

Je-li pro první fázi zvoleno dosažení 80 % příjmu (1,6/ k_2) a pro fázi vylučování je zvoleno dosažení 95 % úbytku (3,0/ k_2), pak je délka fáze vylučování přibližně dvojnásobkem délky fáze příjmu.

Nelze ztrácet ze zřetele, že odhady jsou založeny na předpokladu, že procesy příjmu a vylučování se budou řídit kinetikou prvního řádu. Nejedná-li se zjevně o kinetiku prvního řádu, nejsou tyto odhady platné.

4. METODA POSTUPNÉHO STANOVENÍ: STANOVENÍ RYCHLOSTNÍ KONSTANTY VYLUČOVÁNÍ (ÚBYTKU) K_2

U většiny údajů týkajících se biokoncentrace se předpokládá, že jsou „dostatečně“ dobře popsány jednoduchým dvoukompartmentovým nebo dvouparametrovým modelem, jak je patrné z přímky, která je aproximací bodů pro koncentrace v rybách (na logaritmické škále) během fáze vylučování.



Je třeba si povšimnout, že odchylky od přímky mohou znamenat složitější model vylučování, než je kinetika prvního řádu. Pro analýzu typů vylučování, které se odchylují od kinetiky prvního řádu, mohou být použity grafické metody.

Pro výpočet k_2 pro více odběrů vzorků se provede lineární regrese ln (koncentrace) v čase. Směrnice regresní přímky je odhadovaná hodnota rychlostní konstanty vylučování k_2 ([1]). Z úseku lze snadno vypočítat průměrnou koncentraci v rybách na začátku fáze vylučování ($C_{0,d}$; která se rovná průměrné koncentraci v rybách na konci fáze příjmu) (včetně rozpětí chyby) ([1]):

([1]) Ve většině programů, které umožňují provádět lineární regresi, jsou uváděny také směrodatné chyby a interval spolehlivosti (CI) odhadů, např. v programu Microsoft Excel s použitím souboru nástrojů Data Analysis.

▼M7

$C_{0,\ d} = e^{intercept}$ [Rovnice A5.21]

Pro výpočet hodnoty k_2, jsou-li k dispozici pouze dva odběry vzorků (jako při minimalizovaném uspořádání), nahraďte průměrné koncentrace v této rovnici

$$k_2 = \frac{\ln\ (C_{fl})\ -\ \ln\ (C_{f2})}{t_{\ 2}\ -t_1}$$ [Rovnice A5.22]

kde ln (C_{f1}) a ln (C_{f2}) jsou přirozené logaritmy koncentrací v čase t_1 resp. v čase t_2, přičemž t_2 a t_1 jsou časy, kdy byly tyto dva vzorky odebrány, vzhledem k začátku vylučování ([1]).

5. METODA POSTUPNÉHO STANOVENÍ: STANOVENÍ RYCHLOSTNÍ KONSTANTY PŘÍJMU K_1 (POUZE PRO METODU EXPOZICE VE VODNÍM PROSTŘEDÍ)

K nalezení hodnoty k_1 založené na souboru po sobě jdoucích údajů o koncentracích ve fázi příjmu použijte počítačový program pro vyjádření tohoto modelu:

$$C_f(t) = C_w(t) \cdot \frac{k_1}{k_2} \cdot (1 - e^{\ -k_2 t})$$ [Rovnice A5.23]

kde hodnota k2 je dána předchozím výpočtem, Cf(t) je koncentrace v rybách v čase t a Cw(t) koncentrace ve vodě v čase t.

Pro výpočet hodnoty k_1, jsou-li k dispozici pouze dva odběry vzorků (jako při minimalizovaném uspořádání), se použije tento vzorec:

$$k_1 = \frac{C_{\ f}\ \cdot k_2}{C_w(1\ -\ e^{-k_2 t})}$$ [Rovnice A5.24]

kde k_2 je dána předchozím výpočtem, C_f je koncentrace v rybách na začátku fáze vylučování a C_w je průměrná koncentrace ve vodě během fáze příjmu ([2]).

Posouzení dobré shody je možné provést vizuální kontrolou směrnic k_1 a k_2 vynesených do grafu proti naměřeným údajům při odběrech. Jestliže se ukáže, že metodou postupného stanovení byl získán špatný odhad hodnoty k_1, měla by se pro výpočet k_1 a k_2 použít metoda současného stanovení (viz následující oddíl 6). Výsledné směrnice by opět měly být při vizuální kontrole dobré shody porovnány s naměřenými údaji vynesenými do grafu. Je-li shoda stále špatná, může to znamenat, že se nejedná o kinetiku prvního řádu a měly by se použít jiné, složitější modely.

6. METODA SOUČASNÉHO STANOVENÍ PRO VÝPOČET RYCHLOSTNÍCH KONSTANT PŘÍJMU A VYLUČOVÁNÍ (ÚBYTKU) (POUZE PRO METODU EXPOZICE VE VODNÍM PROSTŘEDÍ)

Pomocí počítačových programů lze nalézt hodnoty k1 a k2 založené na souboru po sobě jdoucích údajů o koncentracích a na modelu:

$$C_f = C_{\ w}\ \cdot \frac{k_1}{k_2} \cdot (1 - e^{\ -k_2 t}) \qquad 0 < t < t_c$$ [Rovnice A5.25]

$$C_f = C_{\ w}\ \cdot \frac{k_1}{k_2} \cdot (e^{\ -k_2(t\ -t_c)}\ - e^{\ -k_2 t}) \qquad t > t_c$$ [Rovnice A5.26]

kde

tc = čas na konci fáze příjmu.

Tímto postupem se přímo získají směrodatné chyby pro odhady hodnot k_1 a k_{12}. Když se k_1 / k_2 v rovnici A5.25 a v rovnici A5.26 nahradí hodnotou

([1]) Na rozdíl od metody lineární regrese se pomocí tohoto vzorce nezíská směrodatná chyba hodnoty k_2.

([2]) Na rozdíl od postupu linearizace se pomocí této metody obvykle nezíská směrodatná chyba nebo interval spolehlivosti odhadované hodnoty k_1.

▼M7

BCF (srov. rovnice A5.4), je také možné odhadnout směrodatnou chybu a 95 % interval spolehlivosti BCF. To je užitečné zvláště při porovnávání různých odhadů v důsledku transformace dat. Závislou proměnnou (koncentrace v rybách) je možné proložit křivkou s ln transformací nebo bez ní a lze vyhodnotit výslednou nejistotu BCF.

Jelikož mezi oběma parametry k_1 a k_2, jsou-li odhadovány současně, existuje silná korelace, lze doporučit nejprve vypočítat k_2 pouze z údajů o vylučování (viz výše); hodnotu k_2 je ve většině případů možné s poměrně vysokou přesností odhadnout z křivky vylučování. Hodnotu k1 lze poté vypočítat z údajů o příjmu pomocí nelineární regrese ([1]). Při postupném stanovení se doporučuje použít stejnou transformaci dat.

Posouzení dobré shody lze provést vizuální kontrolou výsledných směrnic vynesených do grafu proti naměřeným údajům při odběrech. Jestliže se ukáže, že touto metodou byl získán špatný odhad hodnoty k_1, měl by se pro výpočet k_1 a k_2 použít postup současného stanovení. Proložený model by opět měl být vizuální kontrolou dobré shody porovnán s naměřenými údaji vynesenými do grafu a výsledné odhady parametrů k_1 a k k_2 a výsledný BCF a jejich směrodatné chyby a/nebo intervaly nejistoty by měly být porovnány z hlediska různých druhů shody.

Je-li shoda malá, může to znamenat, že se nejedná o kinetiku prvního řádu a měly by se použít jiné, složitější modely. Jednou z nejběžnějších komplikací je růst ryb během zkoušky.

7. ÚPRAVA KINETICKÉHO BCF A BMF O ZŘEDĚNÍ RŮSTEM

V tomto oddíle se popisuje standardní postup úpravy o růst ryb během zkoušky (tzv. „ředění růstem“), která je platná pouze tehdy, jedná-li se o kinetiku prvního řádu. Pokud existují příznaky, že se nejedná o kinetiku prvního řádu, doporučuje se obrátit se konzultovat biostatistika, aby úprava o ředění růstem byla provedena správně, nebo použít postup založený na celkové hmotnosti, který je popsán níže.

V některých případech tato metoda úpravy o ředění růstem není dostatečně přesná nebo nefunguje (například u velmi pomalu vylučovaných látek zkoušených na rychle rostoucích rybách může být odvozená rychlostní konstanta vylučování upravená ředění růstem, k_{2g}, velmi nízká, a chyba ve dvou rychlostních konstantách používaných k jejímu odvození se tak stává zásadně důležitou, a v některých případech mohou být odhadované hodnoty k_g větší než k_2). V takových případech lze použít alternativní postup (tj. hmotnostní přístup), který funguje i tehdy, pokud nebyla dodržena kinetika prvního řádu, a při kterém není nutné tuto úpravu provádět. Tento postup je nastíněn na konci tohoto oddílu.

Postup úpravy o růst odečtením rychlostní konstanty růstu

Při standardní metodě jsou všechny údaje o individuální hmotnosti a délce převáděny na přirozené logaritmy a ln (hmotnost) nebo ln (1/hmotnost) se vynese do grafu proti času (den), zvlášť pro exponovanou a pro kontrolní skupinu. Stejný postup se provádí zvlášť pro údaje z fáze příjmu a z fáze vylučování. Při úpravě o ředění růstem je obecně vhodnější pro odvození rychlostní konstanty růstu (k_g) použít údaje o hmotnosti z celé studie, ale

([1]) Je třeba si uvědomit, že nejistota při odhadu hodnoty k_2 není v bioakumulačním modelu používána správně, je-li tento model při stanovení k1 v rámci metody postupného stanovení v podstatě považován za konstantní. Výsledná nejistota BCF při uplatnění metod současného a postupného stanovení bude proto různá.

▼M7

statisticky významné rozdíly mezi rychlostními konstantami růstu odvozenými pro fázi příjmu a pro fázi vylučování mohou znamenat, že by měla být použita rychlostní konstanta vylučovací fáze. Celkové rychlosti růstu pro exponovanou a kontrolní skupinu získané ze studií ve vodním prostředí lze použít pro kontrolu jakýchkoli účinků spojených s expozicí.

Běžnými statistickými postupy se pomocí metody nejmenších čtverců vypočítá lineární závislost ln (hmotnost ryb) na čase (den)a ln (1/hmotnost) na čase (den) pro každou skupinu (exponované a kontrolní skupiny a jednotlivé údaje, nikoli denní střední hodnoty) za celou dobu studie a za fáze příjmu a vylučování. Vypočítají se odchylky ve směrnicích přímek a použijí se pro hodnocení statistické významnosti (p = 0,05) rozdílů směrnic (rychlostní konstanty růstu) s použitím Studentova t-testu (nebo analýzy ANOVA, pokud je zkoušena více než jedna koncentrace). Pro účely úpravy o růst se zpravidla upřednostňují údaje o hmotnosti. Údaje o délce, které se zpracovávají stejným způsobem, mohou být užitečné pro porovnání účinků spojených s expozicí mezi kontrolní a zkušební skupinou. Pokud analýza údajů o hmotnosti nevykáže statisticky významný rozdíl, lze údaje z exponované a kontrolní skupiny sloučit a vypočítat celkovou rychlostní konstantu růstu ryb (k_g) ve studii jako celkovou směrnici lineární korelace. Jsou-li zjištěny statisticky významné rozdíly, uvedou se rychlostní konstanty růstu pro každou skupinu ryb a/nebo pro každou fázi studie zvlášť. Rychlostní konstanta pro každou zkušební skupinu by poté měla být použita pro účely úpravy o ředění růstem za tuto skupinu. Pokud byly zjištěny statistické rozdíly mezi rychlostními konstantami ve fázi příjmu a ve fázi vylučování, měly by být použity odvozené rychlostní konstanty ve fázi vylučování.

Vypočítanou rychlostní konstantu růstu (k_g, vyjádřenou jako den^{-1}) lze odečíst od celkové rychlostní konstanty vylučování (k_2) a získá se rychlostní konstanta vylučování upravená o růst k_{2g}:

$$k_{2\ g} = k_2 - k_g \qquad \text{[Rovnice A5.27]}$$

Rychlostní konstanta příjmu se vydělí rychlostní konstantou vylučování upravenou o růst a získá se kinetický kinetický BCF upravený o růst označovaný jako BCF_{Kg} (nebo BMFKg).

$$BCF_{Kg} = \frac{k_1}{k_{2g}} \qquad \text{[Rovnice A5.28]}$$

Rychlostní konstanta růstu odvozená pro studii potravy se použije v rovnici A7.5 k výpočtu BMFKg upraveného o růst (srov. dodatek 7).

Metoda úpravy o růst založená na hmotnosti

Alternativu k výše uvedené „metodě odečtení rychlostní konstanty růstu“, při které není nutné provádět úpravu o růst, je možné použít následujícím způsobem. Zásada spočívá v tom, že se použijí údaje o vylučování na základě hmotnosti celých ryb, a nikoli na základě koncentrace.

Koncentrace v tkáních ve fázi vylučování (hmotnost zkoušené látky/jednotková hmotnost ryb) se převede na hmotnost zkoušené látky/ryba: koncentrace a hmotnosti jednotlivých ryb se porovnají ve formě tabulky (např. pomocí počítačové tabulky) a každá koncentrace se vynásobí celkovou hmotností ryb při daném měření, čímž se získá soubor hmotnost zkoušené látky/ryba pro všechny vzorky z fáze vylučování.

Výsledné údaje přirozeného logaritmu hmotnosti látky se vynesou do grafu proti délce experimentu (fáze vylučování), jak by se to provedlo obvykle.

▼M7

Pro metodu expozice ve vodním prostředí se běžným způsobem odvodí rychlostní konstanta vylučování (viz oddíly 4 a 6; za povšimnutí stojí, že „normální“ hodnota k_2 by měla být použita v rovnicích vynesení křivky pro hodnotu k_1), a odvodí se rychlostní konstantu růstu z výše uvedených údajů. Jelikož výsledná hodnota rychlostní konstanty vylučování je nezávislá na růstu, neboť byla odvozena na základě hmotnosti na celou rybu, měla by být označena jako k_{2g}, a nikoli jako k_2.

8. NORMALIZACE LIPIDŮ NA 5 % OBSAH LIPIDŮ (POUZE PRO METODU EXPOZICE VE VODNÍM PROSTŘEDÍ)

Měly by rovněž být uvedeny výsledky stanovení BCF (kinetického a v rovnovážném stavu) ve vztahu k standardnímu obsahu lipidů ve výši 5 % živé hmotnosti, pokud není možné namítnout, že zkoušená látka se neakumuluje především v lipidech (např. některé perfluorované látky se mohou vázat na proteiny). Údaje o koncentraci v rybách, neboli BCF, je nutné převést na 5 % obsah lipidů vztažený k živé hmotnosti. Pokud byly k měření koncentrací látky a obsahu lipidů při všech odběrech použity tytéž ryby, musí se každá naměřená koncentrace v jednotlivých rybách upravit o obsah lipidů dané ryby.

$$C_{f,L} = \frac{0{,}05}{L} \cdot C_f \qquad \text{[Rovnice A5.29]}$$

kde

$C_{f,L}$ = koncentrace v rybách s normalizovanými lipidy (mg/kg živé hmotnosti)

L = frakce lipidů (na základě živé hmotnosti)

C_f = koncentrace zkoušené látky v rybách (mg/kg živé hmotnosti)

Pokud analýza lipidů nebyla provedena u všech ryb ve vzorku, použije se k normalizaci BCF střední hodnota obsahu lipidů. Pro úpravu BCF v rovnovážném stavu by měla být použita střední hodnota zaznamenaná na konci fáze příjmu ve zkušební skupině. Pokud jde o normalizaci kinetického BCF, existují některé případy, kdy se vyžaduje jiný postup, například pokud se obsah lipidů během fáze příjmu nebo vylučování zřetelně změnil. Každopádně by se však mělo rutinně používat množství potravy, které minimalizuje dramatické změny obsahu lipidů.

$$BCF_{KL} = \frac{0.05}{L_n} \cdot BCF_K \qquad \text{[Rovnice A5.30]}$$

kde

BCF_{KL} = (kinetický BCF s normalizovanými lipidy (l/kg)

Ln = střední hodnota frakce lipidů (na základě živé hmotnosti)

BCF_K = kinetický BCF (l/kg)

LITERATURA

1) Arnot J.A. and Gobas F.A.P.C. (2004), A food web bioaccumulation model for organic chemicals in aquatic ecosystems, Environ. Toxicol. Chem. 23: 2343-2355.

2) Chapter C.20 of this Annex, Daphnia magna Reproduction Test.

3) Spacie A. and Hamelink J.L. (1982), Alternative models for describing the bioconcentration of organics in fish. Environ. Toxicol. Chem. 1: 309-320.

▼**M7**

4) Sijm D.T.H.M., Verberne M.E., de Jonge W.J., Pärt P. and Opperhuizen A. (1995), Allometry in the uptake of hydrophobic chemicals determined in vivo and in isolated perfused gills. Toxicol. Appl. Pharmacol. 131: 130-135.

5) Bintein S., Devillers J. and Karcher W. (1993), Nonlinear dependence of fish bioconcentration on n-octanol/water partition coefficient. SAR QSAR Environ. Res. 1: 29-39.

6) Kristensen P. (1991), Bioconcentration in fish: comparison of BCF's derived from OECD and ASTM testing methods; influence of particulate matter to the bioavailability of chemicals. Danish Water Quality Institute, Hørsholm, Denmark.

7) Arnot J.A., Meylan W., Tunkel J., Howard P.H., Mackay D., Bonnell M. and Boethling R.S. (2009), A quantitative structure-activity relationship for predicting metabolic biotransformation rates for organic chemicals in fish. Environ. Toxicol. Chem. 28: 1168-1177.

8) OECD (2011), QSAR Toolbox 2.1. February 2011. Available from: http://www.oecd.org/document/54/0,3746,en_2649_34379_42923638_1_1_1_1,00.html.

9) Branson D.R., Blau G.E., Alexander H.C. and Neely W.B. (1975). Bioconcentration of 2,2',4,4' tetrachlorobiphenyl in rainbow trout as measured by an accelerated test. T. Am. Fish. Soc. 104: 785-792.

10) Ernst W. (1985), Accumulation in aquatic organisms, in Appraisal of tests to predict the environmental behaviour of chemicals, Sheeman, P., et al., Editors. John Wiley & Sons Ltd, New York, NY, USA: 243-255.

11) Reilly P.M., Bajramovic R., Blau G.E., Branson D.R. and Sauerhoff M.W. (1977), Guidelines for the optimal design of experiments to estimate parameters in first order kinetic models. Can. J. Chem. Eng. 55: 614-622.

12) Hawker D.W. and Connell D.W. (1988), Influence of partition coefficient of lipophilic compounds on bioconcentration kinetics with fish. Wat. Res. 22: 701-707.

13) Konemann H. and van Leeuwen K. (1980), Toxicokinetics in fish: Accumulation and elimination of six chlorobenzenes by guppies. Chemosphere. 9: 3-19.

▼M7

Dodatek 6

ODDÍL ROVNIC PRO ZKOUŠKU EXPOZICE VE VODNÍM PROSTŘEDÍ: MINIMALIZOVANÉ USPOŘÁDÁNÍ ZKOUŠKY

Argumentem, který svědčí pro použití tohoto přístupu, je skutečnost, že biokoncentrační faktor lze v úplné zkoušce stanovit buď jako biokoncentrační faktor v rovnovážném stavu (BCF_{SS}) tak, že se vypočítá poměr koncentrace zkoušené látky v rybích tkáních a koncentrace zkoušené látky ve vodě, nebo se vypočítá kinetický biokoncentrační faktor (BC_{FK}) jako poměr rychlostní konstanty příjmu k_1 a rychlostní konstanty vylučování k_2. BC_{FK} je platný i v případě, kdy nebylo dosaženo rovnovážné koncentrace látky během fáze příjmu, za předpokladu, že příjem i vylučování probíhají přibližně v souladu s kinetickými procesy prvního řádu.

Je-li měření koncentrace látky v tkáních (C_{f1}) prováděno v době, kdy expozice končí (t_1), a koncentrace v tkáni (C_{f2}) se změří znovu po uplynutí doby (t_2), lze odhadnout rychlostní konstantu vylučování (k_2) pomocí rovnice A5.22 z dodatku 5.

Rychlostní konstantu příjmu, k_1, je pak možné stanovit algebraicky pomocí rovnice A5.23 z dodatku 5 (kde C_f je rovno C_{f1} a t je rovno t_1) (1). Kinetický biokoncentrační faktor pro minimalizované uspořádání (označený jako BCF_{Km} pro odlišení od kinetických biokoncentračních faktorů stanovených jinými metodami) tedy je:

$$BCF_{Km} = \frac{k_1}{k_2} \qquad \text{[Rovnice A6.1]}$$

Koncentrace nebo výsledky by měly být upraveny o ředění růstem a normalizovány na 5 % obsah lipidů v rybách, jak je popsáno v dodatku 5.

Hodnota BCF_{SS} při minimalizovaném uspořádání je rovna BCF vypočtenému na konci fáze příjmu za předpokladu, že bylo dosaženo rovnovážného stavu. To však lze pouze předpokládat, neboť počet odběrů vzorků není dostatečný, aby bylo možno rovnost prokázat.

$$\text{minimisedBCF}_{SS} = \frac{C_{f\ -minSS}}{C_{w\ -minSS}} \qquad \text{[Rovnice A6.2]}$$

kde

$C_{f\text{-}minSS}$ = koncentrace v rybách v předpokládaném rovnovážném stavu na konci fáze příjmu (mg/kg živé hmotnosti)

$C_{w\text{-}minSS}$ = koncentrace ve vodě v předpokládaném rovnovážném stavu na konci fáze příjmu (mg/l).

LITERATURA

(1) Springer T.A., Guiney P.D., Krueger H.O. and Jaber M.J. (2008), Assessment of an approach to estimating aquatic bioconcentration factors using reduced sampling. Environ. Toxicol. Chem. 27: 2271–2280.

▼M7

Dodatek 7

ODDÍL ROVNIC PRO ZKOUŠKU EXPOZICE V POTRAVĚ

1. Příklad poměru složek ve vhodné rybí komerční potravě

2. Příklad způsobu obohacování potravy

3. Výpočet účinnosti asimilace a obohacovacího faktoru

4. Úprava o lipidy

5. Hodnocení rozdílů mezi naměřenou koncentrací v čase nula $(C_{0,m})$ a odvozenou koncentrací v čase nula $(C_{0,d})$

6. Pokyny pro velmi rychle se vylučující zkoušené látky

1. PŘÍKLAD POMĚRU SLOŽEK VE VHODNÉ KOMERČNÍ RYBÍ POTRAVĚ

Hlavní složka	rybí moučka
hrubý protein (dusíkaté látky)	≤ 55,0 %
hrubý tuk	≤ 15,0 % ([1])
hrubá vláknina	≥ 2,0 %
Vlhkost	≥ 12 %
Popel	≥ 8 %

([1]) V některých regionech může být k dostání pouze rybí potrava s koncentrací lipidů, která je mnohem menší než tato horní mez. V takových případech by bylo možné provést studie s nižší koncentrací lipidů v potravě, tak jak je dodávána, a vhodně upravit množství potravy, aby se ryby udržely v dobrém zdravotním stavu. Lipidy v potravě by se neměly uměle zvyšovat přidáním nadbytečného oleje.

2. PŘÍKLADY ZPŮSOBŮ OBOHACOVÁNÍ POTRAVY

Všeobecně

Potrava pro kontrolní skupinu by se měla připravovat přesně stejným způsobem jako obohacená potrava, ale bez zkoušené látky.

S cílem zkontrolovat koncentraci obohacené potravy by měly být za pomoci vhodné extrakční metody extrahovány tři vzorky dávkované potravy a v těchto extraktech změřena koncentrace nebo radioaktivita zkoušené látky. Měly by být prokázány vysoké analytické výtěžky (> 85 %) s nízkým kolísáním mezi vzorky (tři vzorky koncentrací látky odebrané na začátku zkoušky by se neměly lišit o více než ± 15 % od střední hodnoty).

Během zkoušky potravy by se měly odebrat k analýze tři vzorky potravy v den 0 a na konci fáze příjmu za účelem stanovení obsahu zkoušené látky v potravě.

Příprava rybí potravy s kapalnou zkoušenou látkou (v čistém stavu)

Stanoví se cílová, nominální zkušební koncentrace v exponované rybí potravě, např. 500 μg zkoušené látky/g potravy. Přiměřené množství (podle molární hmotnosti nebo podle specifické radioaktivity) čisté chemické látky se přidá do známé hmotnosti rybí potravy ve skleněné nádobě nebo v baňce rotační odparky. Hmotnost rybí potravy by měla být dostatečná s ohledem na délku fáze příjmu (přičemž se vezme v úvahu potřeba zvýšit množství při každém krmení v důsledku růstu ryb). Rybí krmivo/zkoušená látka by se měly přes

▼M7

noc promísit pomalým převracením (např. pomocí RRM nebo rotací, použijeli se baňka rotační odparky). Obohacená potrava by se až do použití měla uchovávat za podmínek, kdy zůstane zachována stabilita zkoušené látky v krmném mixu (např. v chladničce).

Příprava rybí potravy s kukuřičným olejem nebo s rybím tukem jako vehikulem

Pevné zkoušené látky by se měly rozmělnit v hmoždíři na jemný prášek. Kapalné zkoušené látky lze přidat přímo do kukuřičného oleje nebo rybího tuku. Zkoušená látka se rozpustí ve známém množství kukuřičného oleje nebo rybího tuku (např. 5 až 15 ml). Dávkovaný olej se kvantitativně přenese do rotační odparky vhodné velikosti. Baňka použitá pro přípravu dávkovaného oleje by se měla propláchnout dvěma malými díly oleje a ty se přidají do baňky rotační odparky, aby se zajistilo, že bude přenesena veškerá rozpuštěná zkoušená látka. Aby se zajistilo úplné rozpuštění/disperze v oleji (nebo pokud se ve studii používá více než jedna zkoušená látka), přidá se mikromíchačka, baňka se uzavře zátkou a směs se nechá přes noc rychle míchat. Přiměřené množství rybího krmiva (obvykle ve formě vloček) pro zkoušku se přidá do baňky a obsah baňky se homogenně míchá stálým otáčením skleněné baňky alespoň po domu 30 minut, ale nejlépe přes noc. Obohacená potrava se poté vhodně uskladní (např. v chladničce), aby se zajistila stabilita zkoušené látky v potravě až do použití.

Příprava rybí potravy s organickým rozpouštědlem

Vhodné množství zkoušené látky (podle molární hmotnosti nebo podle specifické radioaktivity) dostatečné pro dosažení cílové dávky se rozpustí ve vhodném organickém rozpouštědle (např. cyklohexan nebo aceton; 10 až 40 ml, ale v případě potřeby i větší objem, podle množství potravy, které se má obohatit). Poměrný díl nebo všechen tento roztok (přidávaný po částech) se smíchá s přiměřeným množstvím rybí potravy dostatečným k tomu, aby bylo ve zkoušce dosaženo požadované nominální úrovně dávky. Potravu a zkoušenou látka je možné smísit v nádobě mixéru z nerezové oceli a čerstvě připravené dávky rybí potravy dva dny ponechat v nádobě v laboratorních podmínkách (za občasného míchání), aby se umožnilo odpaření přebytečného rozpouštědla, nebo smísit v baňce rotační odparky se stálou rotací. Přebytečné rozpouštědlo lze v případě potřeby „odfouknout“ proudem vzduchu nebo dusíku. Je třeba dát pozor, aby zkoušená látka při odstraňování rozpouštědla nekrystalizovala. Obohacená potrava by se až do použití měla uchovávat za podmínek, kdy zůstane zachována stabilita zkoušené látky v krmném mixu (např. v chladničce).

3. VÝPOČET ÚČINNOSTI ASIMILACE A BIOOBOHACOVACÍHO FAKTORU

Aby bylo možné vypočítat účinnost asimilace, měla by se nejprve odhadnout celková rychlostní konstanta vylučování podle oddílu 4 dodatku 5 („metodou postupného stanovení“, tj. standardní lineární regresí) s použitím střední hodnoty koncentrace vzorků z fáze vylučování. Rychlostní konstanta pojídání potravy, I, a délka fáze příjmu, t, jsou známými parametry studie. C_{food}, střední hodnota naměřené koncentrace zkoušené látky v potravě, je měřená proměnná ve studii. C0,d, koncentrace zkoušené látky v rybách na konci fáze příjmu, je obvykle odvozena z úseku grafického znázornění závislosti hodnoty ln (koncentrace) na dnu vylučování.

Účinnost asimilace látky (a, absorpce zkoušené látky ve střevech) se vypočítá jako:

$$\alpha = \frac{C_{0,d} \cdot k_2}{I \cdot C_{food}} \cdot \frac{1}{1 - e^{-k_2 t}} \qquad \text{[Rovnice A7.1]}$$

kde:

$C_{0,d}$ = odvozená koncentrace v rybách v čase nula fáze vylučování (mg/kg)

▼M7

k_2 = celková (neupravená o růst) rychlostní konstanta vylučování (den^{-1}) vypočítaná podle rovnic v oddílu 3 dodatku 5

I = rychlostní konstanta pojídání potravy (g potravy/g ryby/den)

C_{food} = koncentrace v potravě (mg/kg potravy)

t = délka krmení (dny)

Avšak má-li být získána přesná účinnost asimilace, *a*, bude možná nutné rychlostní konstantu pojídání potravy, *I*, která se používá ve výpočtu, upravit o růst ryb. Při zkoušce, kdy ryby během fáze příjmu (ve které se neprovádí žádná úprava množství krmiva, aby bylo zachováno stanovené množství potravy) vykazují výrazný růst, bude s postupem fáze příjmu efektivní množství potravy nižší než původně stanovené, což vede k vyšší „skutečné“ účinnosti asimilace. (Pro výpočet celkového BMF to ovšem není důležité, neboť členy I v rovnici A7.1 a v rovnici A7.4 se ve skutečnosti vyruší). Střední hodnotu rychlostní konstanty pojídání potravy upravenou o zředění růstem, Ig, lze odvodit několika způsoby, ale přímým a přesným způsobem je použít známou rychlostní konstantu růstu (k_g) k odhadu hmotností zkušebních ryb při odběrech vzorků během fáze příjmu, tj.:

$$W_f(t) = W_{f,0} \times e^{k_g \cdot t} \qquad \text{[Rovnice A7.2]}$$

kde

W_f (t) = střední hodnota hmotnosti ryb v den t fáze příjmu

$W_{f,0}$ = střední hodnota hmotnosti ryb na začátku experimentu

Tímto způsobem lze odhadnout (alespoň) střední hodnotu hmotnosti ryb v poslední den expozice ($W_{f,end\text{-}of\text{-}uptake}$). Jelikož množství potravy bylo stanoveno na základě $W_{f,0}$, je možné pomocí těchto dvou hodnot hmotnosti vypočítat efektivní množství potravy pro každý den fáze příjmu. Rychlostní konstantu pojídání potravy upravenou o růst, I_g (g potravy/g ryby/den), která se v případech rychlého růstu během fáze příjmu použije místo I, je pak možné vypočítat jako

$$I_g = \frac{I \times W_{f,0}}{W_{f,\,end\text{-}of\text{-}uptake}} \qquad \text{[Rovnice A7.3]}$$

Jakmile byla získána účinnost asimilace, lze vypočítat BMF tak, že účinnost vynásobíme rychlostní konstantou pojídání potravy *I* (nebo I_g, používá-li se k výpočtu α) a výsledek dělíme celkovou rychlostní konstantou vylučování k_2:

$$BMF = \frac{I \times \alpha}{k_2} \qquad \text{[Rovnice A7.4]}$$

Také bioobohacovací faktor upravený o růst by se měl vypočítat stejným způsobem, s použitím rychlostní konstanty vylučování upravené o růst (odvozené podle dodatku 5 oddílu 7). A opět, pokud byla k výpočtu α použita hodnota Ig, měla by být použita i zde namísto I:

$$BMF = \frac{I \times \alpha}{k_{2g}} \qquad \text{[Rovnice A7.5]}$$

kde:

α = účinnost asimilace (absorpce zkoušené látky ve střevech)

k_2 = celková (neupravená o růst) rychlostní konstanta vylučování (den-1) vypočítaná podle rovnic v oddílu 3 dodatku 5

▼M7

k_{2g} = rychlostní konstanta vylučování upravená o růst (jednotka/den)

I = rychlostní konstanta pojídání potravy (g potravy/g ryby/den)

Poločas upravený o růst ($t_{1/2}$) se vypočítá takto:

$$t_{1/2} = \frac{0{,}693}{k_{2g}} \qquad \text{[Rovnice A7.6]}$$

Účinnost asimilace potravy lze odhadnout také v případě, že byla stanovena rezidua v tkáních během lineární fáze příjmu (mezi dny 1 a 3). V tomto případě lze účinnost asimilace (α) látky stanovit takto:

$$\alpha = \frac{C_{fish}(t)}{I \times C_{food} \times t} \qquad \text{[Rovnice A7.7]}$$

kde

$C_{fish}(t)$ = koncentrace zkoušené látky v rybách v čase t (mg/kg živé hmotnosti).

4. ÚPRAVA O LIPIDY

Jestliže byl obsah lipidů měřen u týchž ryb, na kterých byla prováděna analýza chemické látky při všech odběrech, pak by měly jednotlivé koncentrace být upraveny na základě lipidů a hodnoty ln (koncentrace upravená o lipidy) zaneseny do grafu v závislosti na vylučování (vyjádřené ve dnech), čímž se získají hodnoty $C_{0,d}$ a k_2. Účinnost asimilace (rovnice A7.1) pak lze vypočítat na základě lipidů s použitím hodnoty C_{food} na základě lipidů (tj. C_{food} se vynásobí střední hodnotou frakce lipidů v potravě). Následným výpočtem podle rovnice A7.4 a rovnice A7.5 se přímo získá hodnota BMF upravená o lipidy (a upravená o zředění růstem).

Jinak se střední hodnotu frakce lipidů (v hmotnostním vyjádření) v rybách a v potravě odvodí pro exponovanou a kontrolní skupinu (u potravy a ryb kontrolní skupiny je to obvykle z údajů naměřených na začátku a na konci expozice; u ryb ze zkušební skupiny je to obvykle pouze z údajů naměřených na konci expozice). V některých studiích se může obsah lipidů znatelně zvýšit; v takových případech je vhodnější použít střední hodnotu koncentrace lipidů v rybách vypočítanou z naměřených hodnot na konci fáze expozice a na konci fáze vylučování. Obecně by údaje získané od zkušební skupiny měly být používány pouze k odvození obou frakcí lipidů.

Faktor úpravy o lipidy (Lc) se vypočítá jako:

$$L_C = \frac{L_{fish}}{L_{food}} \qquad \text{[Rovnice A7.8]}$$

kde L_{fish} je střední hodnota frakce lipidů v rybách a L_{food} je střední hodnota frakce lipidů v potravě.

Faktor úpravy o lipidy se používá k výpočtu bioobohacovacího faktoru upraveného o lipidy (BMFL):

$$BMF_L = \frac{BMF}{L_C} \qquad \text{[Rovnice A7.9]}$$

5. HODNOCENÍ ROZDÍLŮ MEZI NAMĚŘENOU KONCENTRACÍ V ČASE NULA ($C_{0,m}$) A ODVOZENOU KONCENTRACÍ V ČASE NULA ($C_{0,d}$)

Měla by se porovnat naměřená koncentrace v čase nula ($C_{0,m}$) a odvozená koncentrace v čase nula ($C_{0,d}$). Pokud jsou si velmi blízké, podporuje to model prvního řádu, který se používá k odvození parametrů vylučování.

▼M7

V některých studiích může být mezi odvozenou hodnotou v čase nula $C_{0,d}$ a střední hodnotou naměřené koncentrace v čase nula zřetelný rozdíl. $C_{0,m}$ (viz poslední odrážku odstavce 159 této zkušební metody). Je-li $C_{0,d}$ mnohem nižší než $C_{0,m}$ ($C_{0,d}$ << C0,m), může tento rozdíl nasvědčovat přítomnosti nestrávené obohacené potravy ve střevech. To lze experimentálně zjistit provedením samostatné analýzy vyříznutých střev, pokud byly na konci fáze příjmu odebrány dodatečné vzorky (celých ryb) a uskladněny. Pokud však statisticky validní test odlehlých hodnot lineární regrese fáze vylučování ukáže, že výsledky z prvního odběru vzorků ve fázi vylučování jsou nepřiměřené vysoké, může být vhodné provést lineární regresi za účelem odvození hodnoty k_2, ale vypustit první koncentraci ve fázi vylučování. V takových případech, pokud se nejistota v lineární regresi značně sníží a pokud je jasné, že kinetika vylučování byla přibližně kinetikou prvního řádu, může být vhodné použít výsledné hodnoty $C_{0,d}$ a k_2 ve výpočtu účinnosti asimilace. Ve zprávě by to mělo být podrobně zdůvodněno. Je také možné, že ve fázi vylučování působila jiná kinetika než kinetika prvního řádu. Je-li to pravděpodobné (tj. pokud se jeví, že přirozený logaritmus transformovaných dat tvoří křivku v porovnání s přímkou na grafu lineární regrese), pak není pravděpodobné, že výpočty hodnot k_2 a $C_{0,d}$ jsou platné a měl by být konzultován biostatistik.

Je-li $C_{0,d}$ mnohem vyšší než naměřená hodnota ($C_{0,d}$ >> $C_{0,m}$), může to znamenat, že látka byla vyloučena velmi rychle (tj. odběry se přiblížily mezi kvantifikace analytické metody ve velmi rané části fáze vylučování, viz oddíl 6 níže; že při vylučování došlo k odchylce od kinetiky prvního řádu; že v lineární regresi pro odvození k_2 a $C_{0,d}$ došlo k chybě; nebo že při některých odběrech vzorků se vyskytl problém s naměřenými koncentracemi ve studii. V takových případech by měl být zkontrolován graf lineární regrese z hlediska vzorků na hranici nebo poblíž meze kvantifikace, z hlediska odlehlých hodnot a očividného zakřivení (jež naznačují, že se nejedná o kinetiku prvního řádu), a toto by mělo být zaznamenáno ve zprávě. Jakékoli následné přehodnocení lineární regrese s cílem zlepšit odhadované hodnoty by mělo být popsáno a odůvodněno. Jsou-li zjištěny zřetelné odchylky od kinetiky prvního řádu, pak není pravděpodobné, že výpočty k_2 a $C_{0,d}$ jsou platné, a měl by být konzultován biostatistik.

6. POKYNY PRO VELMI RYCHLE SE VYLUČUJÍCÍ ZKOUŠENÉ LÁTKY

Jak bylo již poukázáno v odstavci 129 zkušební metody, některé látky se mohou vylučovat tak rychle, že není možné spolehlivě odvodit koncentraci v čase nula, $C_{0,d}$, a hodnotu k_2, protože ve vzorcích odebraných ve velmi rané části fáze vylučování (tj. počínaje druhým odběrem ve fázi vylučování) nelze látku již prakticky změřit (koncentrace uvedené při mezi kvantifikace). Tato situace byla zjištěna při mezilaboratorní porovnávací zkoušce provedené na podporu této zkušební metody s benzo[a]pyrenem a byla zdokumentována ve validační zprávě této metody. V takových případech není možné spolehlivě provést lineární regresi a je pravděpodobné, že z ní vyplyne nereálně vysoký odhad $C_{0,d}$, který povede k účinnosti asimilace zjevně mnohem vyšší než 1. V těchto případech je možné vypočítat konzervativní odhad k_2a „horní odhad“ BMF.

S použitím těch odběrů ve fázi vylučování, kdy byla měřena koncentrace, až do první „nedetekované“ koncentrace (koncentrace stanovené na mezi kvantifikace) včetně, se lineární regresí získá odhad hodnoty k_2 (pomocí přirozeného logaritmu transformovaných údajů o koncentraci proti času). V případech tohoto druhu je pravděpodobné, že zahrnují pouze dva odběry vzorků (např. dny odběru 1 a 2 fáze vylučování), a k_2 pak lze odhadnout pomocí rovnice A5.22 v dodatku 5. Tento odhad k_2 může být použit k odhadnutí účinnosti asimilace podle rovnice A7.1, přičemž v případech, kdy odhadovaná hodnota $C_{0,d}$ by zjevně byla mnohem vyšší, než jaké by mohlo být

▼**M7**

dosaženo při zkoušce, se hodnota $C_{0,d}$ v rovnici se nahradí naměřenou koncentrací v čase nula ($C_{0,m}$). Pokud $C_{0,m}$ nebylo možné změřit, měla by být použita mez detekce v rybí tkáni. Jestliže se takto v některých případech získá hodnota $\alpha > 1$, má se za to, že účinnost asimilace je „v nejhorším případě“ 1.

Maximální BMFK pak lze odhadnout pomocí rovnice A7.4 a měl by být označen jako hodnota „mnohem menší než“ (<<). Například při studii prováděné s množstvím krmiva 3 % a poločasem vyloučení kratším než 3 dny a s α, které je „v nejhorším případě“ 1, bude hodnota BMF_K pravděpodobně nižší než asi 0,13. Vzhledem k účelu tohoto odhadu a k tomu, že hodnoty budou ve své povaze konzervativní, není nezbytné je upravovat o zředění růstem nebo o obsah lipidů v rybách a v potravě.

▼M7

Dodatek 8

POSTUPY PRO ODHAD PŘEDBĚŽNÝCH BCF Z ÚDAJŮ ZÍSKANÝCH VE STUDII EXPOZICE V POTRAVĚ

Studie potravy je do této zkušební metody zahrnuta pro zkoušení bioakumulace látek, které v praxi není možné zkoušet metodou expozice ve vodním prostředí. Metodou expozice ve vodním prostředí se získá biokoncentrační faktor, zatímco metoda expozice v potravě vede přímo k informacím o potenciálu bioobohacení prostřednictvím krmení. Informace o biokoncentraci ve vodním prostředí jsou požadovány při mnohých režimech chemické bezpečnosti (např. při posuzování rizik a v rámci globálně harmonizovaného systému klasifikace). Existuje tudíž potřeba používat údaje získané ve zkoušce potravy k odhadu biokoncentračního faktoru, který je srovnatelný s výsledkem zkoušek prováděných podle metody expozice ve vodním prostředí ([1]). V tomto oddíle se zkoumají postupy, kterými je možné se přitom řídit, přičemž se však uznávají nedostatky, se kterými jsou tyto odhady nutně spojeny.

Studie potravy měří vylučování s cílem získat rychlostní konstantu vylučování, k2. Je-li možné odhadnout rychlostní konstantu příjmu na základě dostupných údajů v situaci, kdy byly ryby exponovány zkoušené látce prostřednictvím vody, pak by bylo možné odhadnout kinetický BSF.

Odhad rychlostní konstanty příjmu pro expozici ve vodě závisí na množství předpokladů, z nichž všechny budou přispívat k nejistotě odhadu. Tento přístup k odhadování BCF předpokládá, že celková rychlost vylučování (včetně přispívajících faktorů jako distribuce v těle a jednotlivé procesy vylučování) je nezávislá na způsobu expozice, který se použije k získání obsahu zkoušené látky v těle.

Hlavní předpoklady, na kterých je založen tento postup odhadování, lze shrnout takto:

vylučování, jež následuje po příjmu potravy, je stejné jako vylučování po expozici dané látce ve vodním prostředí,

příjem z vody by se řídil kinetikou prvního řádu,

podle metody použité pro odhad příjmu:

— příjem je možné porovnávat pouze s hmotností ryb,

— příjem je možné porovnávat pouze s rozdělovacím koeficientem n-oktanol/voda,

— příjem je možné porovnávat s kombinací hmotnosti ryb a rozdělovacího koeficientu n-oktanol/voda dané látky,

— faktory, které mohou příjem ve studii expozice ve vodním prostředí fakticky ovlivňovat, např. biologická dostupnost látky, adsorpce k laboratorním přístrojům a zařízení, velikost molekul atd. mají jen malý vliv,

— a co je mimořádně důležité:

databáze („školicí sada“) použitá při vývoji metody odhadování příjmu je reprezentativní pro látku, která se posuzuje.

V některých veřejně dostupných publikacích jsou odvozeny rovnice, které příjem ryb z vody prostřednictvím žaber vztahují k rozdělovacímu koeficientu n-oktanol/voda látky, k hmotnosti ryb (1) (2) (3) (4), k objemu a/nebo obsahu lipidů, k propustnosti membrány / difusi (5) (6), k objemu provzdušňování ryb (7) a vycházejí z přístupu prchavosti / hmotnostní bilance (8) (9) (10). Podrobné

([1]) Ve volné přírodě k největší expozici ve vodním prostředí pravděpodobně dochází prostřednictvím pojídání velmi hydrofobních látek, takže odhadnutý BCF není striktně reprezentativní pro vyjádření bioakumulačního potenciálu takové látky.

▼M7

praktické hodnocení těchto metod podávají Crookes & Brooke (11). V této souvislosti je užitečná také Barberova publikace (12) zaměřená na modelování bioakumulace prostřednictvím příjmu potravy, neboť obsahuje příspěvky z modelů rychlosti příjmu žábrami. Tomuto aspektu byl věnován také jeden z oddílů podkladového dokumentu k protokolu zkoušky potravy z roku 2004 (13).

Většina z těchto modelů zřejmě byla odvozena s použitím omezených databází. U modelů, pro něž jsou k dispozici podrobnosti o databázi použité pro vybudování těchto modelů, se zdá, že použité druhy látek mají často podobnou strukturu nebo třídu (z hlediska funkčnosti, např. chlorované organické látky). To jen zvyšuje nejistotu, zda je možné použít nějaký model k předpovídání rychlostní konstanty příjmu různých druhů látek, spolu s dalšími problémy specifickými pro tuto zkoušku, jako je druh zvířat, teplota atd.

Z přezkumu metod, které jsou k dispozici (11), vyplynulo, že žádná z těchto metod není „korektnější“ než ostatní. Proto by mělo být podáno jednoznačné odůvodnění použitého modelu. Tam, kde je k dispozici několik metod, jejichž použití lze odůvodnit, bylo by vhodné předložit několik odhadů hodnoty k1 (a tedy BCF) nebo rozpětí hodnot k1 (a BCF) podle několika metod odhadu příjmu. Vhledem k rozdílným druhům modelů a souborů dat použitých při jejich vývoji by však nebylo vhodné stanovovat střední hodnotu z odhadů odvozených různými způsoby.

Někteří výzkumníci tvrdí, že odhady BCF tohoto druhu je nezbytné upravit o biologickou dostupnost, aby bylo možné zohlednit adsorpci látky k rozpuštěnému organickému uhlíku (DOC) za podmínek expozice ve vodním prostředí, a uvést tak odhad do souladu s výsledky studií expozice ve vodním prostředí (např. (13) (14)). Tato úprava však nemusí být vhodná vzhledem k nízkým úrovním DOC požadovaným ve studii expozice ve vodním prostředí pro vypracování odhadu „pro nejhorší případ“ (tj. poměr biologicky dostupné látky a látky měřené v roztoku). U vysoce hydrofobních látek může být příjem na žábrách omezený mírou pasivní difuse poblíž povrchu žaber; v tom případě je možné, že úprava zohledňuje spíše tento účinek, než ten, pro který byla určena.

Doporučuje se zaměřit se na metody, jež vyžadují vstupy se snadno dostupnými údaji o látkách, které se zkoušejí podle zde uvedené studie potravy (tj. log KOW, hmotnost ryb). Použít lze i jiné metody, které vyžadují složitější vstupy, avšak kde budou možná nutná další měření při zkoušce nebo důkladné znalosti o dané zkoušené látce nebo o druhu ryb, které nemusí být široce dostupné. Výběr modelu může být navíc ovlivněn úrovní validace a oblastí použitelnosti (přehled různých metod a jejich srovnání, viz (11)).

Je třeba mít na paměti, že výsledný odhad k1 a odhadnutá hodnota BCF jsou nejisté a pro získání celkového obrazu o bioakumulačním potenciálu látky je, stejně jako odvozený BMF a parametry látky (např. velikost molekul), možná bude nutné přezkoumat analýzou průkaznosti výsledků. Interpretace a použití těchto parametrů může záviset na regulačním rámci.

LITERATURA

1) Sijm D.T.H.M., Pärt P. and Opperhuizen A. (1993), The influence of temperature on the uptake rate constants of hydrophobic compounds determined by the isolated perfused gills of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquat. Toxicol. 25: 1-14.

2) Sijm D.T.H.M., Verberne M.E., Part P. and Opperhuizen A. (1994), Experimentally determined blood and water flow limitations for uptake of hydrophobic compounds using perfused gills of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Allometric applications. Aquat. Toxicol. 30: 325-341.

3) Sijm D.T.H.M., Verberne M.E., de Jonge W.J., Pärt P. and Opperhuizen A. (1995), Allometry in the uptake of hydrophobic chemicals determined in vivo and in isolated perfused gills. Toxicol. Appl. Pharmacol. 131: 130-135.

▼M7

4) Barber M.C. (2003), A review and comparison of models for predicting dynamic chemical bioconcentration in fish. Environ. Toxicol. Chem. 22: 1963-1992.

5) Opperhuizen A. (1986), Bioconcentration of hydrophobic chemicals in fish, in Aquatic Toxicology and Environmental Fate, STP 921, Poston, T.M. and Purdy, R., Editors. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA, USA: 304-315.

6) Arnot J.A. and Gobas F.A.P.C. (2004), A food web bioaccumulation model for organic chemicals in aquatic ecosystems. Environ. Toxicol. Chem. 23: 2343-2355.

7) Thomann R.V. (1989), Bioaccumulation model of organic chemical distribution in aquatic food chains. Environ. Sci. Technol. 23: 699-707.

8) Hendriks A.J., van der Linde A., Cornelissen G. and Sijm D.T.H.M. (2001). The power of size. 1. Rate constants and equilibrium ratios for accumulation of organic substances related to octanol-water partition ratio and species weight. Environ. Toxicol. Chem. 20: 1399-1420.

9) Campfens J. and Mackay D. (1997), Fugacity-based model of PCB bioaccumulation in complex aquatic food webs. Environ. Sci. Technol. 31: 577-583.

10) Arnot J.A. and Gobas F.A.P.C. (2003), A generic QSAR for assessing the bioaccumulation potential of organic chemicals in aquatic food webs. QSAR Comb. Sci. 22: 337-345.

11) Crookes M. and Brooke D. (2010), Estimation of fish bioconcentration factor (BCF) from depuration data. Draft Report. Environmental Agency, Bristol, UK.

12) Barber M.C. (2008), Dietary uptake models used for modelling the bioaccumulation of organic contaminants in fish. Environ. Toxicol. Chem. 27: 755-777

13) Anonymous (2004), Background document to the fish dietary study protocol, document submitted to the TC-NES WG on PBT.

14) Gobas F. and Morrison H. (2000), Bioconcentration and biomagnification in the aquatic environment, in Handbook of property estimation methods for chemicals, Boethling, R.S. and Mackay, D., Editors. Lewis Publishers, Boca Racton, FL, USA: 189-231.

▼B

C.14. RŮSTOVÁ ZKOUŠKA NA NEDOSPĚLÝCH RYBÁCH

1. METODA

Tato metoda růstové zkoušky pro stanovení toxicity je replikou metody OECD TG 215 (2000).

1.1. ÚVOD

Tato zkouška je určena k posouzení účinků dlouhodobé expozice chemickým látkám na růst nedospělých ryb. Je založena na metodě pro posouzení účinků chemických látek na růst nedospělého pstruha duhového (*Oncorynchus mykiss*) při průtokových podmínkách, která byla vyvinuta v Evropské unii a testována v okružních testech (1, 3). Mohou být použity také jiné dobře popsané druhy. Byly například získány zkušenosti z růstových zkoušek s daniem pruhovaným (*Danio rerio*) ([1]) (2, 4, 5) a halančíkem japonským (*Oryzias latipes*) (6, 7, 8).

Viz také Obecný úvod, část C.

1.2. DEFINICE

Nejnižší koncentrace s pozorovanými účinky (**Lowest Observed Effect Concentration, LOEC**): nejnižší zkušební koncentrace zkoušené látky, při níž jsou u látky pozorovány významné účinky ve srovnání s kontrolou (na hladině spolehlivosti $p < 0,05$). Všechny zkušební koncentrace vyšší než LOEC musí mít škodlivé účinky stejné nebo větší, než účinky pozorované při LOEC.

Koncentrace bez pozorovaných účinků (**No Observed Effect Concentration, NOEC**): zkušební koncentrace bezprostředně nižší než LOEC.

$\mathbf{EC_x}$: pro tuto metodu koncentrace zkoušené látky, která vyvolává x % změnu rychlosti růstu ryb ve srovnání s kontrolami.

Velikost násady: živá hmotnost ryb v jednotce objemu vody.

Hustota obsádky: počet ryb v jednotce objemu vody.

Individuální specifická rychlost růstu ryby: vyjadřuje rychlost růstu jedince vycházející z jeho výchozí hmotnosti.

Průměrná specifická rychlost růstu pro nádrž: vyjadřuje střední rychlost růstu populace v nádrži při určité koncentraci.

Pseudospecifická rychlost růstu: vyjadřuje rychlost růstu jednotlivce vycházející ze střední počáteční hmotnosti populace v nádrži.

([1]) Meyer, A., Bierman, C.H. and Orti, G. (1993). The phylogenetic position of the zebrafish (*Danio rerio*), a model system in developmental biology: an invitation to the comparative method. Proc. R. Soc. Lond. B. 252, 231–236.

▼B

1.3. PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

Nedospělé ryby v exponenciální fázi růstu se po zvážení umístí do zkušebních nádrží a vystaví se řadě subletálních koncentrací zkoušené látky přednostně za průtokových podmínek, nebo pokud to není možné, za vhodných semistatických podmínek (statické podmínky s obnovováním média). Zkouška trvá 28 dnů. Ryby se krmí denně. Přísun potravy se řídí počáteční hmotností ryb a může být po 14 dnech nově vypočten. Na konci zkoušky se ryby opět zváží. Účinky na rychlost růstu se analyzují pomocí regresního modelu s cílem odhadnout koncentraci, která vyvolává x % změnu rychlosti růstu, tj. EC_x (např. EC_{10}, EC_{20}, nebo EC_{30}). Údaje mohou být popřípadě porovnány s hodnotami pro kontrolní skupiny s cílem stanovit nejnižší koncentraci s pozorovanými účinky (LOEC), a tím i koncentraci bez pozorovaných účinků (NOEC).

1.4. INFORMACE O ZKOUŠENÉ LÁTCE

Musí být předloženy výsledky zkoušky akutní toxicity (viz zkušební metoda C.1) provedené přednostně na druhu zvoleném pro tuto zkoušku. To znamená, že jsou známy rozpustnost zkoušené látky ve vodě a tlak jejích par a je k dispozici vhodná analytická metoda pro kvantitativní stanovení látky ve zkušebních roztocích, a to se známou a doloženou správností a známou mezí stanovitelnosti.

Užitečnými informacemi jsou strukturní vzorec, čistota látky, její stálost ve vodě a na světle, pK_a, P_{ov} a výsledky zkoušky snadné biologické rozložitelnosti (viz zkušební metoda C.4).

1.5. VALIDITA ZKOUŠKY

Má-li být zkouška platná, musí být splněny tyto podmínky:

— mortalita v kontrolních skupinách nesmí být na konci zkoušky větší než 10 %,

— nárůst střední hodnoty hmotnosti ryb v kontrolní skupině (kontrolních skupinách) musí být dostatečný na to, aby umožnil rozeznat minimální významnou změnu rychlosti růstu. Okružní test (3) ukázal, že u pstruha duhového musí střední hmotnost ryb v kontrolních skupinách vzrůst alespoň o polovinu (tj. o 50 %) jejich počáteční hmotnosti za 28 dnů; např. počáteční hmotnost: 1 g/rybu (= 100 %), konečná hmotnost po 28 dnech: ≥ 1,5 g/rybu (≥ 150 %);

— koncentrace rozpuštěného kyslíku musí dosahovat alespoň 60 % hodnoty nasycení vzduchem (ASV) po celou dobu zkoušky,

— teplota vody se po celou dobu zkoušky nesmí mezi zkušebními nádržemi lišit o více než ± 1 °C a měla by být udržována v rozpětí 2 °C v rozsahu teplot stanovených pro testovací druh (doplněk 1).

1.6. POPIS ZKUŠEBNÍ METODY

1.6.1. **Přístroje a pomůcky**

Normální laboratorní vybavení a zejména:

— přístroj pro stanovení kyslíku a pH-metr,

▼B

— vybavení pro stanovení tvrdosti vody a alkality,

— vhodné zařízení pro regulaci teploty a pro její pokud možno nepřetržité sledování,

— nádrže z chemicky inertního materiálu o vhodném objemu vzhledem k doporučenému nasazování a obsádce (viz bod 1.8.5 a doplněk 1),

— dostatečně přesné váhy (tj. vážící s přesností na ± 0,5 %).

1.6.2. **Voda**

Jako zkušební voda může být použita jakákoli voda, v níž testovací druh dlouhodobě přežívá a roste. Měla by mít po celou dobu zkoušky stejnou kvalitu. Hodnota pH by měla být v rozmezí 6,5 až 8,5, avšak během zkoušky by se pH nemělo lišit o více než ± 0,5. Doporučuje se tvrdost nad 140 mg/l (jako $CaCO_3$). S cílem zajistit, aby ředicí voda neměla nadměrný vliv na výsledek zkoušky (například v důsledku tvorby komplexů zkoušené látky), by měly být v určitých intervalech odebírány vzorky k analýze. Je-li kvalita ředicí vody relativně konstantní, mělo by být stanovení těžkých kovů (např. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd a Ni), hlavních aniontů a kationtů (např. Ca, Mg, Na, K, Cl, SO_4), pesticidů (např. celkový obsah organických fosforových a chlorových pesticidů), celkový obsah organického uhlíku a suspendovaných látek provedeno např. každé tři měsíce. Je-li prokázáno, že kvalita vody je konstantní po dobu alespoň jednoho roku, mohou být stanovení méně častá a intervaly lze prodloužit (např. každých šest měsíců). Některé chemické charakteristiky přijatelné ředicí vody jsou uvedeny v doplňku 2.

1.6.3. **Zkušební roztoky**

Zkušební roztoky o zvolených koncentracích se připraví ředěním zásobního roztoku.

Zásobní roztok by měl být připraven přednostně jednoduchým mechanickým mícháním nebo protřepáváním zkoušené látky v ředicí vodě (např. mechanickým mícháním nebo pomocí ultrazvuku). Pro dosažení vhodné koncentrace zásobního roztoku mohou být použity sycení kolony.

Použití rozpouštědel nebo dispergátorů (solubilizačních činidel) může být v některých případech pro vytvoření zásobního roztoku o vhodné koncentraci nezbytné. Ke vhodným rozpouštědlům patří aceton, ethanol, methanol, dimethylsulfoxid, dimethylformamid a triethylenglykol. Ke vhodným dispergátorům patří Cremophor RH40, Tween 80, 0,01 % methylcelulosa a HCO-40. Snadno biologicky rozložitelná činidla (např. aceton) nebo vysoce těkavé sloučeniny je třeba používat s rozvahou, neboť mohou způsobit problémy s růstem bakterií v průtokových zkouškách. Je-li použito solubilizační činidlo, nesmí mít významné účinky na růst ryb ani viditelné nepříznivé účinky na nedospělé ryby, což musí být prokázáno na kontrolní skupině vystavené pouze působení rozpouštědla.

▼B

Při průtokových zkouškách je pro zajištění řady koncentrací nezbytný systém, který nepřetržitě dávkuje a ředí zásobní roztok zkoušené látky (např. dávkovací čerpadlo, zařízení pro proporcionální ředění, sytící systém). Průtok zásobních roztoků a ředicí vody by měl být v průběhu zkoušky kontrolován v určitých intervalech, nejlépe denně, a neměl by se v průběhu zkoušky měnit o více než 10 %. Okružní test (3) ukázal, že u pstruha duhového je výměna vody 6 litrů na gram ryb za den přijatelná (viz bod 1.8.2.2).

U semistatických zkoušek (s obnovováním média) bude četnost obnovování média záviset na stálosti zkoušené látky, avšak doporučuje se obnovovat vodu denně. Není-li podle předběžných zkoušek stálosti (viz bod 1.4) koncentrace zkoušené látky mezi obnoveními média stálá, (tj. nepohybuje-li se v intervalu 80–120 % nominální koncentrace nebo klesá-li pod 80 % naměřené počáteční koncentrace), měla by být zváženo použití průtokové zkoušky.

1.6.4. **Výběr druhů**

Doporučeným druhem pro tuto zkoušku je pstruh duhový (*Oncorhynchus mykiss*), neboť u něj bylo v okružních testech získáno nejvíce zkušeností (1, 3). Mohou však být použity jiné dobře popsané druhy, může však být nutné v tomto případě zkušební postup upravit, aby byly vytvořeny vhodné zkušební podmínky. Zkušenosti jsou například s daniem pruhovaným (*Danio rerio*) (4, 5) a halančíkem japonským (*Oryzias latipes*) (6, 7, 8). V takovém případě by měly být uvedeny důvody pro výběr druhu a experimentální podmínky.

1.6.5. **Chov ryb**

Testovací ryby by měly pocházet z jednoho chovu (přednostně ze stejného tření), který se alespoň dva týdny před zkouškou udržuje v podmínkách kvality vody a osvětlení, které jsou podobné podmínkám použitým ve zkoušce. V průběhu chovu a v průběhu zkoušky by měly být krmeny množstvím potravy odpovídajícím minimálně 2 % tělesné hmotnosti za den a nejlépe 4 % tělesné hmotnosti za den.

Po 48hodinové aklimatizaci se zaznamená mortalita a použijí se tato kritéria:

— mortalita vyšší než 10 % populace za sedm dnů: vyměnit celou obsádku,

— mortalita od 5 do 10 % populace za sedm dnů: aklimatizace dalších sedm dnů; je-li mortalita během následujících sedmi dnů vyšší než 5 %, vymění se celá obsádka,

— mortalita nižší než 5 % populace za sedm dnů: obsádka se přijme.

Dva týdny před zkouškou nebo v průběhu zkoušky nesmí být léčeny u ryb žádné nemoci.

▼B

1.7. USPOŘÁDÁNÍ ZKOUŠKY

„Uspořádáním zkoušky“ se rozumí výběr počtu zkušebních koncentrací a jejich odstupňování, počet nádrží pro každou koncentraci a počet ryb v nádrži. Uspořádání by mělo být v ideálním případě zvoleno s ohledem na:

— cíl studie,

— metodu statistické analýzy, která bude použita,

— dostupnost a cenu prostředků pro experiment.

S cílem studie by měly být specifikovány pokud možno statistická významnost, s jakou má být daná velikost změny (např. změny rychlosti růstu) rozeznána, nebo přesnost, s jakou má být odhadnuta hodnota EC_x (např. při x = 10, 20 nebo 30, pokud možno ne méně než 10). Bez těchto údajů nelze stanovit přesně rozsah studie.

Je důležité vzít na vědomí, že uspořádání, které je optimální (nejlépe využívá prostředky) při použití jedné metody statistické analýzy, není nezbytně optimální pro jinou metodu. Doporučené uspořádání pro odhad LOEC/NOEC tedy nebývá stejné jako uspořádání pro analýzu regresí.

V mnoha případech se regresní analýze dává přednost před analýzou rozptylu, a to z důvodů diskutovaných Stephanem a Rogersem (9). Není-li však nalezen vhodný regresní modelfound ($r^2 < 0,9$), měla by být použito stanovení NOEC/LOEC.

1.7.1. **Uspořádání pro regresní analýzu**

Pro uspořádání zkoušky, která má být analyzována regresí, jsou důležitá tato hlediska:

— koncentrace použité ve zkoušce musí v každém případě pokrývat koncentraci vyvolávající účinek (např. $EC_{10,20,30}$) a rozsah koncentrací, při nichž dochází k účinku, který je předmětem zájmu. Přesnost, s jakou mohou být odhadnuty koncentrace vyvolávající účinek, bude nejlepší, bude-li koncentrace vyvolávající účinek ležet uprostřed rozsahu zkušebních koncentrací. Předběžné orientační zkoušky mohou být užitečné při výběru vhodných zkušebních koncentrací,

— aby mohl být vytvořen uspokojivý statistický model, měla by zkouška zahrnovat alespoň jednu kontrolní nádrž a pět dalších nádrží o různých koncentracích. Popřípadě by při použití solubilizačního činidla měla být vedle zkušebních skupin nasazena jedna kontrolní skupina vystavená koncentraci solubilizačního činidla použité při nejvyšší zkušební koncentraci (viz body 1.8.3 a 1.8.4),

— může být použita vhodná geometrická nebo logaritmická řada koncentrací (10) (viz doplněk 3). Upřednostňuje se logaritmické stupňování koncentrací,

▼B

— je-li k dispozici více než šest nádrží, měly by být další nádrže použity buď pro duplicitní stanovení, nebo by měly být použity pro koncentrace rozložené v rozsahu koncentrací tak, aby se zmenšily rozestupy mezi koncentracemi. Obě použití lze doporučit stejnou měrou.

1.7.2. **Uspořádání pro odhad NOEC/LOEC analýzou rozptylu (ANOVA)**

Pro každou koncentraci by měly být nejlépe k dispozici nádrže pro duplicitní stanovení a statistická analýza by měla být provedena na úrovni nádrže (11). Bez duplicitních nádrží není možné zohlednit jinou variabilitu mezi nádržemi, než jaká je důsledkem rozdílů mezi jednotlivými rybami. Ve vyšetřovaném případě (12) se však ukázalo, že variabilita mezi nádržemi byla velmi malá ve srovnání s variabilitou v rámci nádrže (tj. mezi rybami). Relativně přijatelnou alternativou je tedy provedení statistické analýzy pro jednotlivé ryby.

Zpravidla se použije alespoň pět zkušebních koncentrací tvořících geometrickou řadu s faktorem nepřekračujícím 3,2.

Provádí-li se zkouška s duplicitními nádržemi, měl by být počet duplicitních kontrolních nádrží, a tedy i počet ryb, dvojnásobkem počtu použitého pro každou zkušební koncentraci, jenž by měl být pro všechny koncentrace stejný (13, 14, 15). Nejsou-li naproti tomu duplicitní nádrže použity, měl by být v kontrolní skupině stejný počet ryb jako ve skupině pro každou zkušební koncentraci.

Je-li ANOVA založena na nádržích namísto na jednotlivých rybách (což by znamenalo buď ryby jednotlivě označit, nebo použít „pseudospecifickou“ rychlost růstu (viz bod 2.1.2)), je nezbytné počet nádrží dostatečně znásobit, aby bylo možné stanovit směrodatnou odchylku pro nádrže použité v rámci jednotlivé koncentrace. To znamená, že by měl být počet stupňů volnosti pro chybu v analýze rozptylu alespoň 5 (11). Je-li znásoben pouze počet kontrolních skupin, existuje nebezpečí, že bude zjištěná proměnlivost ovlivněna, neboť může narůstat se střední hodnotou sledované rychlosti růstu. Vzhledem k tomu, že rychlost růstu s největší pravděpodobností klesá s rostoucí koncentrací, povede to k nadhodnocení variability.

1.8. POSTUP

1.8.1. **Výběr a vážení testovacích ryb**

Je důležité minimalizovat rozdíly v hmotnostech ryb na začátku zkoušky. Vhodná rozpětí velikostí ryb různých druhů doporučených pro tuto zkoušku jsou uvedena v dodatku 1. Rozpětí individuálních hmotností na začátku zkoušky by mělo být pro celou násadu ryb použitých ve zkoušce nejlépe ± 10 % aritmetického průměru hmotností a v žádném případě by nemělo překročit 25 %. Doporučuje se zvážit před zkouškou menší vzorek ryb s cílem odhadnout střední hodnotu hmotnosti.

▼B

24 hodin před zahájením zkoušky se obsádka ryb přestane krmit. Poté se provede náhodný výběr ryb. Za použití běžného anestetika (např. vodný roztok trikain-methan-sulfonátu (MS 222) o koncentraci 100 mg/l neutralizovaný přídavkem dvou dílů hydrogenuhličitanu sodného na jeden díl MS 222) se ryby jednotlivě s přesností uvedenou v doplňku 1 zváží za účelem stanovení živé hmotnosti (po osušení do sucha). Ryby s hmotností v požadovaném rozsahu se náhodně rozdělí do nádrží. Zaznamená se celková živá hmotnost ryb v každé zkušební nádrži. Při manipulaci s rybami za použití anestetik (včetně osušení a zvážení) může u nedospělých ryb, a zejména u druhů o malé velikosti, dojít ke stresu a poranění. S nedospělými rybami se tedy musí manipulovat s nejvyšší opatrností, aby nedošlo u testovacích ryb ke stresu a poranění.

Ryby se opět zváží po 28 dnech zkoušky (viz bod 1.8.6). Považuje-li se však za nezbytné nově vypočítat přísun potravy, mohou být ryby opět zváženy po 14 dnech zkoušky (viz bod 1.8.2.3). Ke stanovení změn velikosti ryb, na jejichž základě se upravuje přísun potravy, může být použita jiná metoda, např. fotografická metoda.

1.8.2. **Podmínky expozice**

1.8.2.1. *Délka expozice*

Zkouška trvá 28 dnů nebo déle.

1.8.2.2. *Velikost násady a hustota obsádky*

Je důležité, aby velikost násady a hustota obsádky vyhovovaly použitému testovacímu druhu (viz doplněk 1). Je-li hustota obsádky příliš vysoká, dojde ke stresu vedoucímu ke snížené rychlosti růstu a popřípadě k nemocem. Je-li příliš nízká, může vyvolat teritoriální chování, což by mohlo rovněž ovlivnit růst. V každém případě by měla být velikost násady tak nízká, aby bylo možné udržet koncentraci rozpuštěného kyslíku na alespoň 60 % ASV bez provzdušňování. Okružní test (3) ukázal, že u pstruha duhového je přijatelná velikost násady 16 ryb o hmotnosti 3–5 g do objemu 40 litrů. Doporučené obnovování vody během zkoušky je 6 litrů na gram ryb za den.

1.8.2.3. *Krmení*

Ryby by měly být krmeny dostatečným množstvím vhodného krmiva (dodatek 1), aby byla umožněna přijatelná rychlost růstu. Je třeba dbát na to, aby nedošlo k růstu mikroorganismů a k zakalení vody. U pstruha duhového by mělo těmto požadavkům vyhovovat množství odpovídající 4 % jejich tělesné hmotnosti za den (3, 16, 17, 18). Denní množství může být rozděleno na dva stejné díly a podáno rybám dvakrát za den s odstupem alespoň pěti hodin. Množství se řídí celkovou počáteční hmotností ryb v každé zkušební nádrži. Pokud se ryby opět zváží 14. den, množství se nově vypočte. 24 hodin před vážením se ryby přestanou krmit.

▼B

Nespotřebovaná potrava a výkaly se ze zkušebních nádrží každý den odstraní důkladným odsátím ze dna každé nádrže.

1.8.2.4. *Světlo a teplota*

Fotoperioda a teplota vody by měly vyhovovat testovacím druhům (doplněk 1).

1.8.3. **Zkušební koncentrace**

Obvykle je nutných pět koncentrací zkoušené látky, a to bez ohledu na uspořádání zkoušky (viz bod 1.7.2). Předchozí znalost toxicity zkoušené látky (např. ze zkoušek akutní toxicity nebo z orientačních studií) by měla pomoci při volbě vhodných zkušebních koncentrací. Použije-li se méně než pět koncentrací, mělo by to být zdůvodněno. Nejvyšší zkušební koncentrace by neměla překročit rozpustnost látky ve vodě.

Použije-li se k usnadnění přípravy zásobního roztoku solubilizační činidlo, neměla by být jeho konečná koncentrace vyšší než 0,1 ml/l a měla by být ve všech zkušebních nádržích stejná (viz bod 1.6.3). Měla by však být vynaložena maximální snaha takové látky nepoužívat.

1.8.4. **Kontrolní skupiny**

Počet kontrolních skupin v ředicí vodě závisí na uspořádání zkoušky (viz body 1.7 až 1.7.2). Použije-li se solubilizační činidlo, měl by být nasazen stejný počet kontrolních skupin se solubilizačním činidlem jako s ředicí vodou.

1.8.5. **Četnost analytických stanovení a měření**

Během zkoušky se koncentrace zkoušené látky stanoví v pravidelných intervalech (viz níže).

Při průtokových zkouškách se průtok zásobních roztoků toxické látky a ředicí vody kontroluje v určitých intervalech, přednostně denně, a neměl by se v průběhu zkoušky měnit o více než 10 %. Mají-li se koncentrace zkoušené látky pohybovat v rozmezí ± 20 % nominálních hodnot (tj. 80–120 %, viz body 1.6.2 a 1.6.3), doporučuje se, aby byly nejnižší a nejvyšší koncentrace analyzovány alespoň na začátku zkoušky a poté v týdenních intervalech. U zkoušek, u nichž se (na základě údajů o stálosti látky) nepředpokládá, že se bude koncentrace zkoušené látky pohybovat v rozmezí ± 20 % nominální hodnoty, je nezbytné analyzovat všechny zkušební koncentrace, a to stejně často jako u stálých látek.

U semistatických zkoušek (s obnovováním média), u nichž se má zkušební koncentrace pohybovat v rozmezí ± 20 % nominálních hodnot, se doporučuje analyzovat alespoň nejvyšší a nejnižší zkušební koncentrace alespoň na začátku studie ihned po jejich přípravě a bezprostředně před obnovením a poté v týdenních intervalech. U zkoušek, u nichž se nepředpokládá, že se bude zkušební koncentrace pohybovat v rozmezí ± 20 % nominální hodnoty, musí být analyzovány všechny koncentrace stejně často jako u stálejších látek.

▼B

Doporučuje se zakládat výsledky na naměřených koncentracích. Lze-li však prokázat, že po celou dobu zkoušky byla koncentrace zkoušené látky v roztoku uspokojivě udržována v rozmezí ± 20 % nominální hodnoty nebo měřené počáteční koncentrace, mohou být výsledky založeny na nominálních nebo naměřených hodnotách.

Může být nezbytné vzorky filtrovat (např. přes filtr s průměrem pórů 0,45 μm nebo odstředit. Doporučuje se odstřeďování. Neadsorbuje-li se zkoušená látka na filtry, je filtrace přijatelná.

V průběhu zkoušky se měří v každé zkušební nádrži množství rozpuštěného kyslíku, pH a teplota. Celková tvrdost, alkalita a popřípadě salinita se měří v kontrolních nádržích a v jedné nádrži s nejvyšší koncentrací. Množství rozpuštěného kyslíku a salinita (podle potřeby) se měří alespoň třikrát (na začátku, uprostřed a na konci zkoušky). U semistatických zkoušek se doporučuje měřit množství rozpuštěného kyslíku častěji, přednostně před každým obnovením média a po něm, nebo alespoň jednou týdně. pH se měří na začátku a na konci každé výměny vody u statických zkoušek a alespoň týdně u průtokových zkoušek. Tvrdost vody a alkalita se měří v každé zkoušce jednou. Teplota se měří přednostně nepřetržitě alespoň v jedné zkušební nádrži.

1.8.6. **Pozorování**

Hmotnost: na konci každé zkoušky se musí ryby, které přežily, zvážit za účelem stanovení živé hmotnosti (po osušení do sucha), a to buď jako skupina pro každou zkušební nádrž, nebo jednotlivě. Vážení ryb jako skupin se upřednostňuje před vážením jednotlivých ryb, které vyžaduje, aby byly ryby jednotlivě označeny. V případě vážení jednotlivých ryb pro stanovení individuální specifické rychlosti růstu by neměla zvolená technika označení vyvolávat u ryb stres (alternativou ke značení ryb vymražením může být popřípadě použití barevného jemného rybářského vlasce).

Ryby se v průběhu zkoušky vyšetřují denně a jakékoli vnější abnormality (hemoragie, odbarvení) a neobvyklé chování se zaznamená. Každý úhyn se zaznamená a uhynulé ryby se co nejdříve odstraní. Uhynulé ryby se nenahrazují, neboť velikost násady a hustota obsádky by měly být dostatečné na to, aby nedošlo k ovlivnění růstu v důsledku změn počtu ryb v nádrži. Bude však nutné upravit množství krmiva.

2. ÚDAJE A JEJICH PŘEDKLÁDÁNÍ

2.1. ZPRACOVÁNÍ VÝSLEDKŮ

Doporučuje se, aby se navrhování i analýzy zkoušky účastnil statistik, neboť tato zkušební metoda umožňuje značné variace v experimentálním uspořádání, například v počtu zkušebních nádrží, v počtu zkušebních koncentrací, v počtu ryb atd. S ohledem na možnosti uspořádání zkoušky zde nejsou uvedeny specifické pokyny pro postup statistického zpracování.

▼B

Rychlost růstu se nevypočítává pro zkušební nádrže, v nichž mortalita překročila 10 %. Velikost mortality se však uvede pro všechny zkušební koncentrace.

Bez ohledu na použitou metodu analýzy údajů je hlavním ukazatelem specifická rychlost růstu r od okamžiku t_1 do t_2. Může být definována několika způsoby v závislosti na tom, zda jsou, či nejsou ryby individuálně značeny nebo zda se požaduje průměrná hodnota pro nádrž.

$$r_1 = \frac{\log_e W_2 - \log_e W_1}{t_2 - t_1} \times 100$$

$$r_2 = \frac{\log_e W_2 - \log_e W_1}{t_2 - t_1} \times 100$$

$$r_3 = \frac{\log_e W_2 - \log_e W_1}{t_2 - t_1} \times 100$$

kde,

r_1 = individuální specifická rychlost růstu ryby,

r_2 = průměrná specifická rychlost růstu pro nádrž,

r_3 = „pseudospecifická“ rychlost růstu,

w_1, w_2 = hmotnosti určité ryby v čase t_1 a t_2,

$\log_e w_1$ = logaritmus hmotnosti jednotlivé ryby na začátku vyšetřovacího intervalu,

$\log_e w_2$ = logaritmus hmotnosti jednotlivé ryby na konci vyšetřovacího intervalu,

$\log_e W_1$ = průměr logaritmů hodnot w_1 pro ryby v nádrži na začátku vyšetřovacího intervalu,

$\log_e W_2$ = průměr logaritmů hodnot w_2 pro ryby v nádrži na konci vyšetřovacího intervalu,

t_1, t_2 = čas (ve dnech) začátku a konce vyšetřovacího intervalu.

r_1, r_2, r_3 mohou být vypočteny pro interval 0–28 dnů a popřípadě (bylo-li provedeno měření 14. den) pro intervaly 0–14 a 14–28 dnů.

2.1.1. **Analýza výsledků regrese (modelování závislosti koncentrace-odezva)**

V této metodě analýzy se závislostí mezi specifickou rychlostí růstu a koncentrací proloží vhodná matematická funkce, a to umožní odhadnout „EC_x“, tj. jakoukoli požadovanou hodnotu EC. U této metody není nutný výpočet r pro jednotlivou rybu (r_1) a namísto toho se analýza může založit na průměrné hodnotě r (r_2) pro nádrž. Dává se přednost posledně uvedené metodě. Je také vhodnější při použití velmi malých druhů.

Průměrné specifické rychlosti růstu pro nádrž (r_2) se graficky vynesou proti koncentraci, aby bylo možno zkontrolovat závislost odezvy na koncentraci.

▼B

K vyjádření závislosti r_2 na koncentraci se zvolí vhodný model; jeho volba musí být řádně zdůvodněna.

Liší-li se pro jednotlivé nádrže počty ryb, které přežily, je nutno prokládání každé závislosti, ať již jednoduché nebo nelineární, vážit s ohledem na různé velikosti skupin.

Metoda proložení modelu musí umožnit odhadnout například hodnotu EC_{20} a stanovit její rozptyl (buď směrodatnou odchylku, nebo interval spolehlivosti). Graf proložené závislosti se vynese spolu s údaji, aby byla zřejmá vhodnost použitého modelu (9, 19, 20, 21).

2.1.2. **Analýza výsledků pro odhad LOEC**

Bylo-li ve zkoušce použito pro každou koncentraci více nádrží, může být odhad LOEC založen na analýze rozptylu (ANOVA) průměrné specifické rychlosti růstu pro nádrž (viz bod 2.1) a poté na vhodném srovnání průměrné hodnoty r pro každou koncentraci s průměrnou hodnotou r pro kontrolní skupiny (např. Dunnettovým nebo Williamsovým testem (13, 14, 15, 22)) s cílem zjistit nejmenší koncentraci, u níž je na hladině spolehlivosti 0,05 tento rozdíl významný. Nejsou-li předpoklady pro použití parametrických metod splněny, kvůli jinému než normálnímu rozdělení (např. se použije Shapiro-Wilkův test) nebo kvůli heterogennímu rozptylu (Bartlettův test), měla by být před provedením ANOVA zvážena transformace údajů za účelem homogenizace rozptylů nebo by měla být provedena vážená ANOVA.

Nebylo-li pro každou koncentraci použito více nádrží, není použití ANOVA u jednotlivé nádrže dostatečně citlivé nebo je nemožné. v takovém případě je přijatelným kompromisem založit ANOVA na „pseudospecifické“ rychlosti růstu r_3 pro jednotlivé ryby.

Průměrná hodnota r_3 pro každou koncentraci může být poté porovnána s průměrnou hodnotou r_3 pro kontrolní skupiny. Hodnotu LOEC lze poté nalézt výše uvedeným způsobem. The LOEC can then be identified as before. Je třeba vzít na vědomí, že tato metoda neumožňuje zohlednit variabilitu mezi nádržemi ve větší míře, než s jakou se počítá v důsledku variability mezi rybami, a ani před ní nechrání. Ukázalo se však (9), že variabilita mezi nádržemi byla velmi malá ve srovnání s variabilitou v rámci nádrže (tj. mezi rybami). Nejsou-li v analýze zahrnuty jednotlivé ryby, musí být uvedena metoda zjištění odlehlých hodnot a její použití musí být zdůvodněno.

2.2. INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

Výsledky je třeba interpretovat opatrně, leží-li naměřené hodnoty koncentrací toxické látky v roztocích blízko meze stanovitelnosti analytické metody nebo klesá-li u semistatických zkoušek koncentrace zkoušené látky od okamžiku přípravy roztoku do jeho obnovení.

2.3. PROTOKOL O ZKOUŠCE

Protokol o zkoušce musí obsahovat tyto informace:

▼B

2.3.1. **Zkoušená látka:**

— fyzikální povaha, fyzikálně-chemické vlastnosti,

— údaje o chemické identifikaci včetně údajů o čistotě a podle potřeby o metodě kvantitativního stanovení zkoušené látky.

2.3.2. **Testovací druh:**

— vědecký název, podle možnosti,

— kmen, velikost, původ, jakákoli příprava atd.

2.3.3. **Zkušební podmínky:**

— použitý zkušební postup (např. semistatický/s obnovováním, průtokový, nasazování, hustota obsádky atd.),

— uspořádání zkoušky (např. počet zkušebních nádrží, zkušební koncentrace a znásobení počtu nádrží, počet ryb v nádrži),

— metoda přípravy zásobních roztoků a četnost obnovování (je-li použito, uvede se solubilizační činidlo a jeho koncentrace),

— nominální zkušební koncentrace, průměry naměřených hodnot v jednotlivých nádržích, jejich směrodatné odchylky a metody jejich stanovení a důkazy toho, že naměřené hodnoty odpovídají koncentracím zkoušené látky v pravém roztoku,

— charakteristiky ředicí vody: pH, alkalita, tvrdost, teplota, koncentrace rozpuštěného kyslíku, koncentrace zbytkového chloru (je-li měřena), obsah celkového organického uhlíku, obsah suspendovaných pevných látek, popřípadě salinita zkušebního média a výsledky jakýchkoli jiných provedených měření,

— kvalita vody ve zkušebních nádržích: pH, tvrdost, teplota a koncentrace rozpuštěného kyslíku,

— podrobné informace o krmení (např. druh krmiva (krmiv), původ, podávané množství a frekvence krmení).

2.3.4. **Výsledky:**

— doklady o tom, že kontrolní skupiny vyhověly kriteriu přežití, a údaje o mortalitě pro každou zkušební koncentraci,

— použité metody statistické analýzy, statistiky založené na znásobeném počtu nádrží nebo na jednotlivých rybách, zpracování údajů a zdůvodnění použitých metod,

— údaje ve formě tabulky o individuálních a středních hodnotách hmotností ryb v den 0, 14 (bylo-li prováděno vážení) a 28, hodnoty průměrných rychlostí růstu pro nádrž nebo popřípadě pseudospecifických rychlostí růstu pro intervaly 0–28 dnů nebo popřípadě 0–14 a 14–28 dnů,

— výsledky statistické analýzy (tj. regresní analýzy nebo ANOVA) přednostně ve formě tabulky nebo v grafické formě a hodnota LOEC ($p = 0,05$) a NOEC nebo ECx, popřípadě se směrodatnými odchylkami,

▼B

— výskyt jakýchkoli neobvyklých reakcí ryb a viditelné účinky vyvolané zkoušenou látkou.

3. LITERATURA

1) Solbe J.F. de LG (1987). Environmental Effects of Chemicals (CFM 9350 SLD). Report on a UK Ring Test of a Method for Studying the Effects of Chemicals on the Growth rate of Fish. WRc Report No. PRD 1388-M/2.

2) Meyer, A., Bierman, C. H., Orti, G. (1993). The phylogenetic position of the zebrafish (Danio rerio), a model system in developmental biology: an invitation to the comparative method. Proc. R. Soc. Lond. B. 252, 231–236.

3) Ashley S., Mallett M.J. and Grandy N.J. (1990). EEC Ring Test of a Method for Determining the Effects of Chemicals on the Growth Rate of Fish. Final Report to the Commission of the European Communities. WRc Report No EEC 2600-M.

4) Crossland N.O. (1985). A method to evaluate effects of toxic chemicals on fish growth. Chemosphere, 14, str. 1855–1870.

5) Nagel R., Bresh H., Caspers N., Hansen P.D., Market M., Munk R., Scholz N. and Höfte B.B. (1991). Effect of 3,4-dichloroaniline on the early life stages of the Zebrafish (*Brachydanio rerio*): results of a comparative laboratory study. Ecotox. Environ. Safety, 21, str. 157–164.

6) Yamamoto, Tokio. (1975). Series of stock cultures in biological field. Medaka (killifish) biology and strains. Keigaku Publish. Tokio, Japan.

7) Holcombe, G.W., Benoit D.A., Hammermeister, D.E., Leonard, E.N. and Johnson, R.D. (1995). Acute and long-term effects of nine chemicals on the Japanese medaka (*Oryzias latipes*).Arch. Environ. Conta. Toxicol. 28, str. 287–297.

8) Benoit, D.A., Holcombe, G.W. and Spehar, R.L. (1991). Guidelines for conducting early life toxicity tests with Japanese medaka (*Oryzias latipes*). Ecological Research Series EPA-600/3-91-063. U. S. Environmental Protection Agency, Duluth, Minesota.

9) Stephan C.E. and Rogers J.W. (1985). Advantages of using regression analysis to calculate results of chronic toxicity tests. Aquatic Toxicology and Hazard Assessment: Eighth Symposium, ASTM STP 891, R C Bahner and D J Hansen, Eds., American Society for Testing and Materials, Philadelphia, str. 328–338.

10) Environment Canada (1992). Biological test method: toxicity tests using early life stages of salmonid fish (rainbow trout, coho salmon, or atlantic salmon). Conservation and Protection, Ontario, Report EPS 1/RM/28, str. 81.

11) Cox D.R. (1958). Planning of experiments. Wiley Edt.

12) Pack S. (1991). Statistical issues concerning the design of tests for determining the effects of chemicals on the growth rate of fish. Room Document 4, OECD Ad Hoc Meeting of Experts on Aquatic Toxicology, WRc Medmenham, UK, 10–12 December 1991.

13) Dunnett C.W. (1955). A Multiple Comparisons Procedure for Comparing Several Treatments with a Control, J. Amer. Statist. Assoc., 50, str. 1096–1121.

▼B

14) Dunnett C.W. (1964). New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics, 20, str. 482–491.

15) Williams D.A. (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics 27, str. 103–117.

16) Johnston, W.L., Atkinson, J.L., Glanville N.T. (1994). A technique using sequential feedings of different coloured food to determine food intake by individual rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*: effect of feeding level. Aquaculture 120, 123–133.

17) Quinton, J. C. and Blake, R.W. (1990). The effect of feed cycling and ration level on the compensatory growth response in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Journal of Fish Biology, 37, 33–41.

18) Post, G. (1987). Nutrition and Nutritional Diseases of Fish. Chapter IX in Testbook of Fish Health. T.F.H. Publications, Inc. Neptune City, New Jersey, USA. 288 str.

19) Bruce, R.D. and Versteeg D.J. (1992). A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. Environ. Toxicol. Chem. 11, 1485–1494.

20) DeGraeve, G.M., Cooney, J.M., Pollock, T.L., Reichenbach, J.H., Dean, Marcus, M.D. and McIntyre, D.O. (1989). Precision of EPA seven-day fathead minnow larval survival and growth test; intra and interlaboratory study. report EA-6189 (American Petroleum Institute Publication, n. 4468). Electric Power Research Institute, Palo alto, CA.

21) Norbert-King T.J. (1988). An interpolation estimate for chronic toxicity: the ICp approach. US Environmental Protection Agency. Environmental Research Lab., Duluth, Minesota. Tech. Rep. No 05-88 of National Effluent Toxicity Assesment Center. Sept. 1988. 12 str. 12.

22) Williams D.A. (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics 28, str. 510–531.

▼B

Doplněk 1

DRUHY RYB DOPORUČNÉ KE ZKOUŠENÍ A VHODNÉ ZKUŠEBNÍ PODMÍNKY

Druhy	Doporučený rozsah zkušební teploty (°C)	Fotoperioda (h)	Doporučené rozpětí počáteční hmotnosti ryb (g)	Doporučená přesnost měření	Velikost násady (g/l)	Hustota obsádky (l^{-1})	Krmivo	Délka zkoušky (d)
Doporučené druhy:								
Oncorhynchus mykiss pstruh duhový	12,5–16,0	12–16	1–5	na 100 mg	1,2–2,0	4	značkové sušené krmivo pro mladé lososovité	≥ 28
Jiné dobře popsané druhy:								
Danio rerio danio pruhované	21–25	12–16	0,050–0,100	na 1 mg	0,2–1,0	5–10	živé krmivo (*Brachionus Artemia*)	≥ 28
Oryzias latipes halančík japonský	21–25	12–16	0,050–0,100	na 1 mg	0,2–1,0	5–20	živé krmivo (*Brachionus Artemia*)	≥ 28

▼B

DOPLNĚK 2

NĚKTERÉ CHEMICKÉ CHARAKTERISTIKY PŘIJATELNÉ ŘEDICÍ VODY

LÁTKA	KONCENTRACE
Nerozpuštěné látky	< 20 mg/l
Celkový organický uhlík	< 2 mg/l
Volný amoniak	< 1 µg/l
Zbytkový chlor	< 10 µg/l
Celkové organofosforové pesticidy	< 50 ng/l
Celkové organochlorové pesticidy a polychlorované bifenyl	< 50 ng/l
Celkový organický chlor	< 25 ng/l

▼B

DOPLNĚK 3

Logaritmické řady koncentrací vhodných pro zkoušku toxicity (9)

Sloupec (počet koncentrací mezi 100 a 10, nebo mezi 10 a 1) (*)						
1	2	3	4	5	6	7
100	100	100	100	100	100	100
32	46	56	63	68	72	75
10	22	32	40	46	52	56
3,2	10	18	25	32	37	42
1,0	4,6	10	16	22	27	32
	2,2	5,6	10	15	19	24
	1,0	3,2	6,3	10	14	18
		1,8	4,0	6,8	10	13
		1,0	2,5	4,6	7,2	10
			1,6	3,2	5,2	7,5
			1,0	2,2	3,7	5,6
				1,5	2,7	4,2
				1,0	1,9	3,2
					1,4	2,4
					1,0	1,8
						1,3
						1,0

(*) Ze sloupců může být zvolena řada pěti (nebo více) po sobě jdoucích koncentrací. Mezilehlé body pro koncentrace ve sloupci (x) jsou uvedeny ve sloupci (2x + 1). Uvedené hodnoty mohou být koncentracemi vyjádřenými v objemových nebo hmotnostních procentech (mg/l nebo µg/l). Hodnoty mohou být podle potřeby násobeny nebo děleny jakoukoli mocninou 10. Sloupec 1 by se měl použít, pokud je úroveň toxicity značně neurčitá.

▼B

C.15. ZKOUŠKA KRÁTKODOBÉ TOXICITY NA RYBÍM EMBRYU A VÁČKOVÉM PLŮDKU

1. METODA

Tato zkouška krátkodobé toxicity je replikou metody OECD TG 212 (1998).

1.1. ÚVOD

Tato zkouška krátkodobé toxicity na rybím embryu a váčkovém plůdku je krátkodobou zkouškou, při níž jsou exponována životní stadia od čerstvě oplodněných jiker do stadia váčkových plůdků. Při zkoušce na embryu a na váčkovém plůdku se nekrmí, a zkouška by tedy měla být ukončena, dokud je váčkový plůdek stále vyživován ze žloutkového váčku.

Zkouška je určena k zjištění letálních a v omezené míře subletálních účinků chemických látek na specifická stadia a testovací druhy. Tato zkouška by měla poskytnout užitečné informace, neboť by a) mohla být přechodem mezi letálními a subletálními zkouškami, b) mohla být použita jako screeningová zkouška pro úplnou zkoušku toxicity na raných životních stadiích nebo pro zkoušky chronické toxicity a c) mohla být použita pro zkoušení na druzích, u nichž nejsou dostatečně rozvinuty chovné techniky, aby pokryly období od endogenní výživy k exogenní.

Je třeba mít na paměti, že pouze zkoušky pokrývající celý životní cyklus ryb obecně umožňují odhadnout chronickou toxicitu chemické látky pro ryby a že jakékoli omezení expozice nějakého životního stadia může snížit citlivost, a tím podhodnotit chronickou toxicitu. Očekává se tedy, že zkouška na embryu a váčkovém plůdku je méně citlivá než úplná zkouška na raných životních stadiích, zejména pokud jde o vysoce lipofilní chemické látky (log P_{ov} > 4) a chemické látky se specifickým mechanismem toxického účinku. v citlivostech těchto dvou zkoušek se však očekávají menší rozdíly v případě chemických látek s nespecifickým, narkotickým mechanismem účinku (1).

Před publikováním této zkoušky bylo nejvíce zkušeností s touto zkouškou na embryu a váčkovém plůdku získáno u sladkovodní ryby *Danio rerio* Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae – obecný název danio pruhované). Podrobnější pokyny pro zkoušku s tímto druhem jsou tedy uvedeny v doplňku 1. To nevylučuje použití jiného druhu, pro něhož jsou zkušenosti rovněž k dispozici (tabulky IA a IB).

1.2. DEFINICE

Nejnižší koncentrace s pozorovanými účinkyLowest Observed Effect Concentration (LOEC): je nejnižší zkušební koncentrace zkoušené látky, při níž jsou u látky pozorovány významné účinky ve srovnání s kontrolou (na hladině spolehlivosti $p < 0,05$). Všechny zkušební koncentrace vyšší než LOEC musí mít škodlivé účinky stejné nebo větší, než účinky pozorované při LOEC.

Koncentrace bez pozorovaných účinků No Observed Effect Concentration (NOEC): je zkušební koncentrace bezprostředně nižší než LOEC.

▼B

1.3. PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

Rybí embrya a váčkové plůdky se vystaví rozsahu koncentrací zkoušené látky rozpuštěné ve vodě. Zkouška umožňuje volit mezi semistatickým a průtokovým uspořádáním. Volba závisí na povaze zkoušené látky. Zkouška se zahájí umístěním oplodněných jiker do zkušebních nádrží a ukončí se těsně před tím, než dojde k úplné absorpci žloutkového váčku čerstvých plůdků v některé ze zkušebních nádrží, nebo než začne v kontrolních skupinách docházet k úhynu v důsledku hladovění. Posoudí se letální a subletální účinky a porovnají se s hodnotami kontrolních skupin s cílem stanovit nejnižší koncentraci s pozorovanými účinky, a tedy koncentraci bez pozorovaných účinků. Mohou být popřípadě analyzovány za použití regresního modelu s cílem odhadnout koncentraci, která způsobuje určitý procentuálně vyjádřený účinek (tj. LC/ECx, kde x je definovaný procentuální účinek).

1.4. INFORMACE O ZKOUŠENÉ LÁTCE

Měly by být dostupné výsledky zkoušky akutní toxicity (viz metoda C.1) provedené přednostně na druhu zvoleném pro tuto zkoušku. Výsledky mohou být užitečné při výběru vhodného rozsahu zkušebních koncentrací ve zkoušce na raných životních stadiích. Měly by být známy rozpustnost látky ve vodě (včetně rozpustnosti ve zkušební vodě) a tlak par látky. Měla by být k dispozici vhodná analytická metoda pro kvantitativní stanovení látky ve zkoušených roztocích, a to se známou a doloženou správností a známou mezí stanovitelnosti.

Užitečnými informacemi o zkoušené látce pro účely stanovení zkušebních podmínek jsou strukturní vzorec, čistota látky, stálost na světle, pKa, P_{ov} a výsledky zkoušky snadné biologické rozložitelnosti (viz metoda C.4).

1.5. VALIDITA ZKOUŠKY

Má-li být zkouška platná, musí být splněny tyto podmínky:

— celková míra přežití oplodněných jiker v kontrolních skupinách a podle potřeby v nádržích, do nichž bylo přidáno pouze rozpouštědlo, musí být rovna limitům stanoveným v dodatcích 2 a 3 nebo vyšší,

— koncentrace rozpuštěného kyslíku musí ležet mezi 60 a 100 % hodnoty nasycení vzduchem (ASV) po celou dobu zkoušky,

— teplota vody se po celou dobu zkoušky nesmí mezi zkušebními nádržemi nebo mezi dny, které po sobě následují, lišit o více než ± 1,5°C a měla by být udržována v rozpětí teplot stanoveném pro testovací druh (dodatky 2 a 3).

▼B

1.6. POPIS ZKUŠEBNÍ METODY

1.6.1. **Zkušební nádrže**

Mohou být použity jakékoli nádrže ze skla nebo z jiného inertního materiálu. Rozměry zkušebních nádrží by měly být dostatečné k tomu, aby vyhovovaly velikosti násady (viz bod 1.7.1.2). Doporučuje se, aby byly nádrže umístěny ve zkušebním prostoru náhodně. Uspořádání do náhodných bloků se zastoupením všech variant expozice v každém bloku se upřednostňuje před zcela náhodným uspořádáním, kdy existují systémové účinky v laboratoři, které mohou být blokovým uspořádáním kontrolovány. Je-li použito blokové uspořádání, mělo by být zohledněno při následné analýze údajů. Nádrže by měly být chráněny před nežádoucími rušivými vlivy.

1.6.2. **Výběr druhů ryb**

Doporučené druhy ryb jsou uvedeny v tabulce 1A. To nevylučuje použití jiného druhu (příklady jsou uvedeny v tabulce 1B), avšak zkušební postup musí být upraven tak, aby byly vytvořeny vhodné zkušební podmínky. V takovém případě by měly být uvedeny důvody pro výběr druhu a experimentální podmínky.

1.6.3. **Chov matečných ryb**

Podrobnosti o chovu matečných ryb v uspokojivých podmínkách jsou uvedeny v metodě OECD TG 210 ([1]) a v odkazech (2, 3, 4, 5, 6).

1.6.4. **Chov embryí a plůdků**

Embrya a plůdky mohou být exponovány v hlavní nádrži v menších nádobách s pletivovými stěnami nebo konci, aby jimi mohl proudit zkušební roztok. Nevířivého průtoku nádobami lze dosáhnout jejich zavěšením do ramen, pomocí nichž lze pohybovat nádobami nahoru a dolů, přičemž organismy zůstanou stále ponořeny; lze rovněž použít systém sifonového průtoku. Oplodněné jikry lososovitých ryb mohou ležet na podložce nebo pletivu s dostatečně velkými oky, aby jimi mohly plůdky po vylíhnutí propadnout. K přemístění embryí a plůdků v semistatické zkoušce s každodenní úplnou výměnou média je vhodné použít odsávačky (viz bod 1.6.6).

Jsou-li k udržení jiker v hlavní nádrži použity nádoby, mřížky nebo pletiva, měly by být po vylíhnutí plůdků odstraněny ([1]), pokud ovšem nemají být ponechány k zamezení úniku ryb. Je-li třeba přemístit plůdky, neměly by být vystaveny vzduchu a neměly by se k jejich vytažení z nádob používat síťky (taková opatrnost není nutná u méně křehkých druhů, např. u kapra). Okamžik přemístění se liší podle druhu a přemístění nemusí být vždy nutné. U semistatických technik mohou být použity kádinky nebo mělké nádobky a podle potřeby mohou být opatřeny sítem umístěným nepatrně nad dnem kádinky. Je-li objem těchto nádob dostatečný, aby vyhovoval požadavkům na nasazování (viz bod 1.7.1.2), nemusí být přemístění embryí nebo plůdků nutné.

([1]) OECD, Paris, 1992, Test Guideline 210, „Fish, Early-life Stage Toxicity Test“.

▼B

1.6.5. **Voda**

Pro tuto zkoušku je vhodná jakákoli voda, která vyhovuje chemickým charakteristikám přijatelné ředicí vody, jak jsou uvedeny v dodatku 4, a v níž testovací druhy kontrolních skupin přežívají alespoň tak, jak je uvedeno v dodatcích 2 a 3. Měla by mít po celou dobu zkoušky stejnou kvalitu. Hodnota pH by se neměla měnit o více než ± 0,5. Pro ujištění, že voda nebude mít přílišný vliv na výsledky zkoušky (například tvorbou komplexů se zkoušenou látkou) nebo nepříznivý vliv na stav matečných ryb, by měly být odebírány v pravidelných intervalech její vzorky pro analýzu. Je-li kvalita ředicí vody relativně konstantní, mělo by být stanovení těžkých kovů (např. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd a Ni), hlavních aniontů a kationtů (např. Ca, Mg, Na, K, Cl, SO_4), pesticidů (např. celkový obsah organických fosforových a chlorových pesticidů), celkový obsah organického uhlíku a suspendovaných látek provedeno např. každé tři měsíce. Je-li prokázáno, že kvalita vody je konstantní po dobu alespoň jednoho roku, mohou být stanovení méně častá a intervaly lze prodloužit (např. každých šest měsíců).

1.6.6. **Zkušební roztoky**

Zkušební roztoky o zvolených koncentracích se připraví ředěním zásobního roztoku.

Zásobní roztok by měl být připraven přednostně jednoduchým mechanickým mícháním nebo protřepáváním zkoušené látky v ředicí vodě (např. mechanickým mícháním nebo pomocí ultrazvuku). Pro dosažení vhodné koncentrace zásobního roztoku mohou být použity sytící kolony. Neměla by být používána rozpouštědla nebo dispergátory (solubilizační činidla), v některých případech však může být použití takových látek pro vytvoření zásobního roztoku o vhodné koncentraci nezbytné. Ke vhodným rozpouštědlům patří aceton, ethanol, methanol, dimethylsulfoxid, dimethylformamid a triethylenglykol. Ke vhodným dispergátorům patří Cremophor RH40, Tween 80, 0,01 % methylcelulosa a HCO-40. Snadno biologicky odbouratelná činidla (např. aceton) nebo vysoce těkavé sloučeniny je třeba používat rozvážně, neboť mohou způsobit problémy s růstem bakterií v průtokových zkouškách. Je-li použito solubilizační činidlo, nesmí mít významné účinky na přežití ani viditelné nepříznivé účinky na raná životní stadia, což musí být prokázáno na kontrolní skupině vystavené pouze rozpouštědlu. Měla by však být vynaložena maximální snaha takové látky nepoužívat.

U semistatických technik mohou být použity dva různé postupy obměny; buď i) se do čistých nádob připraví nové zkušební roztoky a přežívající jikry a plůdky se s malým objemem starého roztoku opatrně přemístí do nových nádob, aniž by se vystavily vzduchu, nebo ii) se testovací organismy ponechají v nádobě a vymění se určitý podíl (alespoň tři čtvrtiny) zkušební vody. Četnost obnovování média bude záviset na stálosti zkoušené látky, avšak doporučuje se obnovovat médium denně. Není-li podle předběžných zkoušek stálosti (viz bod 1.4) koncentrace zkoušené látky mezi obnoveními média stálá, (tj. nepohybuje-li se v intervalu 80–120 % nominální koncentrace nebo klesá-li pod 80 % naměřené počáteční koncentrace), měla by být zváženo použití průtokové zkoušky. V každém případě je třeba dbát na to, aby plůdky nebyly při obnovování vody vystaveny stresu.

▼B

Při průtokových zkouškách je pro zajištění řady koncentrací nezbytný systém, který nepřetržitě dávkuje a ředí zásobní roztok zkoušené látky (např. dávkovací čerpadlo, zařízení pro proporcionální ředění, sytící systém). Průtok zásobních roztoků a ředicí vody by měl být kontrolován v určitých intervalech, nejlépe denně, a neměl by se v průběhu zkoušky měnit o více než 10 %. Jako vhodný byl shledán průtok odpovídající výměně alespoň pětinásobku objemu nádrže za 24 hodin (2).

1.7. POSTUP

Užitečné informace o provádění zkoušek toxicity na rybím embryu a váčkovém plůdku jsou dostupné v literatuře, přičemž některé literární zdroje jsou uvedeny v tomto textu v oddílu s literaturou (7, 8, 9).

1.7.1. **Podmínky expozice**

1.7.1.1. *Délka expozice*

Zkouška se zahájí přednostně do 30 minut po oplodnění jiker. Embrya se ponoří do zkušebního roztoku před započetím rýhování blastuly nebo co nejdříve po něm, a v každém případě před počátkem stadia gastruly. U jiker získaných od komerčního dodavatele nemusí být možné zahájit zkoušku ihned po oplodnění. Vzhledem k tomu, že citlivost zkoušky může být vážně ovlivněna zpožděním začátku zkoušky, měla by být zkouška zahájena do osmi hodin po oplodnění. Vzhledem k tomu, že se plůdky v průběhu expozice nekrmí, ukončí se zkouška těsně před tím, než dojde k úplné absorpci žloutkového váčku u některého plůdku v některé ze zkušebních nádrží, nebo než začne v kontrolních skupinách docházet k úhynu v důsledku hladovění. Délka zkoušky bude záviset na použitém druhu. Některé doporučené délky zkoušky jsou uvedeny v dodatcích 2 a 3.

1.7.1.2. *Nasazování*

Počet oplodněných jiker na začátku zkoušky by měl dostatečný ke splnění statistických požadavků. Měly by být náhodně rozděleny mezi varianty expozice a na jednu koncentraci by mělo být rozděleno alespoň 30 jiker rovným dílem (nebo alespoň tak, jak je to možné s ohledem na to, že u některých druhů může být obtížné získat stejně velké podíly) mezi alespoň tři zkušební nádrže. Velikost násady (biomasa v jednotce objemu) by měla být tak nízká, aby bylo možné udržet koncentraci rozpuštěného kyslíku na alespoň 60 % hodnoty ASV bez provzdušňování. U průtokových zkoušek se doporučuje nasazování nepřekračující 0,5 g/l za 24 hodin a v žádném okamžiku nepřekračující 5 g/l roztoku (2).

1.7.1.3. *Světlo a teplota*

Fotoperioda a teplota zkušební vody by měly vyhovovat testovacím druhům (dodatky 2 a 3). Pro účely sledování teploty může sloužit další zkušební nádrž.

▼B

1.7.2. **Zkušební koncentrace**

Obvykle je nezbytných pět koncentrací zkoušené látky lišících se od sebe konstatním faktorem nepřekračujícím 3,2. Při výběru rozsahu zkušebních koncentrací by měla být zohledněna křivka závislosti hodnoty LC_{50} na délce expozice ve studii akutní toxicity. Za určitých okolností může být oprávněné použít méně než pět koncentrací, např. v limitní zkoušce, a užší rozsah koncentrací. Použití méně než pěti koncentrací by mělo být zdůvodněno. Koncentrace látky, které jsou vyšší než 96hodinová LC_{50} nebo vyšší než 100 mg/l, podle toho, co je nižší, nemusí být zkoušeny. Látky by neměly být zkoušeny pro koncentrace vyšší, než je jejich rozpustnost ve zkušební vodě.

Použije-li se k usnadnění přípravy zásobního roztoku solubilizační činidlo (viz bod 1.6.6), neměla by být jeho konečná koncentrace ve zkušební nádrži vyšší než 0,1 ml/l a měla by být ve všech zkušebních nádržích stejná.

1.7.3. **Kontrolní skupiny**

Jako další zkušební sady by měly být nasazeny kontrolní skupina v ředicí vodě (příslušným způsoben znásobená) a podle potřeby také jedna kontrolní skupina se solubilizačním činidlem (příslušným způsoben znásobená).

1.7.4. **Četnost analytických stanovení a měření**

Během zkoušky se koncentrace zkoušené látky stanovují v pravidelných intervalech.

U semistatických zkoušek, u nichž se má zkušební koncentrace pohybovat v rozmezí ± 20 % nominálních hodnot (tj. 80–120 %, viz bod 1.4 a 1.6.6), se doporučuje analyzovat nejvyšší a nejnižší zkušební koncentrace na začátku studie, ihned po jejich přípravě, a bezprostředně před obnovením, a to alespoň třikrát ve stejných intervalech v průběhu celé doby zkoušky (tj. analýzy se provedou na vzorku z téhož roztoku – ihned po jeho přípravě a při jeho obnovení).

U zkoušek, u nichž se (na základě údajů o stálosti látky) nepředpokládá, že se bude koncentrace zkoušené látky pohybovat v rozmezí ± 20 % nominální hodnoty, je nezbytné analyzovat všechny zkušební koncentrace ihned po jejich přípravě a před jejich výměnou, a to stejně často (tj. alespoň ve třech okamžicích rovnoměrně rozložených na celou dobu zkoušky). Stanovení koncentrací zkoušené látky před obnovením je třeba provést pro každou koncentraci pouze u jedné paralelní nádrže. Stanovení se provádějí v odstupu ne více než 7 dnů. Doporučuje se, aby výsledky byly založeny na naměřených koncentracích. Lze-li však prokázat, že po celou dobu zkoušky byla koncentrace uspokojivě udržována v rozmezí ± 20 % nominální hodnoty, mohou být výsledky založeny na nominálních nebo naměřených počátečních hodnotách.

Pro průtokové zkoušky je vhodný podobný vzorkovací režim, jaký je popsán u semistatických zkoušek (v tomto případě se však neprovádí měření „starých“ roztoků). Je-li však zkouška delší než sedm dnů, doporučuje se zvýšit počet odběrů v prvním týdnu (např. tři sady měření) pro ujištění, že jsou zkušební koncentrace stálé.

▼B

Může být nezbytné vzorky odstředit nebo filtrovat (např. přes filtr s průměrem pórů 0,45 μm). Vzhledem k tomu, že však odstředění ani filtrace vždy neoddělí od sebe biologicky dostupný a biologicky nedostupný podíl zkoušené látky, nemusí být vzorky takto zpracovány.

V průběhu zkoušky se měří v každé zkušební nádrži množství rozpuštěného kyslíku, pH a teplota. Celková tvrdost a salinita se měří v kontrolních nádržích a v jedné nádrži s nejvyšší koncentrací. Množství rozpuštěného kyslíku a salinita (podle potřeby) se měří alespoň třikrát (na začátku, uprostřed a na konci zkoušky). U semistatických zkoušek se doporučuje měřit množství rozpuštěného kyslíku častěji, přednostně před každým obnovením média a po něm, nebo alespoň jednou týdně. pH se měří na začátku a na konci každého období mezi výměnami vody u semistatických zkoušek a alespoň jednou týdně u průtokových zkoušek. Tvrdost vody se měří v každé zkoušce jednou. Teplota se měří denně a přednostně nepřetržitě alespoň v jedné zkušební nádrži.

1.7.5. **Pozorování**

1.7.5.1. *Stadia vývoje embrya*

Embryonální stadium (tj. stadium gastruly) na začátku expozice zkoušené látce by mělo být identifikováno co nejpřesněji. Lze to provést za použití reprezentativního vzorku vhodně uchovávaných a očištěných jiker. Popis a vyobrazení embryonálních stadií lze také nalézt v literatuře (2, 5, 10, 11).

1.7.5.2. *Líhnutí a přežívání*

Líhnutí a přežívání se pozoruje alespoň jednou denně a zaznamenávají se počty. Může být žádoucí provádět na začátku zkoušky častější pozorování (např. každých 30 minut během prvních tří hodin), neboť v některých případech mohou být důležitější doby přežití než pouhé počty úhynů (např. dochází-li k akutním toxickým účinkům). Uhynulá embrya a plůdky se odstraní ihned po nalezení, neboť se mohou rychle rozkládat. Při odstraňování uhynulých jedinců se postupuje s mimořádnou opatrností, aby se nenarazilo do sousedních jiker/plůdků nebo aby se fyzicky nepoškodily, neboť jsou mimořádně křehké a citlivé. Kritéria uhynutí se u životních stadií liší:

— u jiker: zejména v raných stadiích zřetelná ztráta průsvitnosti a změna ve zbarvení vyvolaná koagulací a/nebo sražením bílkovin, které vedou k bílému zakalení,

— u embryí: absence pohybu nebo tepu srdce nebo neprůsvitné zbarvení u druhů, jejichž embrya jsou za normálních okolností průsvitná,

— u plůdků: nepohyblivost nebo absence dýchacích pohybů nebo tepu srdce nebo bílé neprůsvitné zbarvení centrálního nervového systému a nedostatečná reakce na mechanické podněty.

▼B

1.7.5.3. *Neobvyklý vzhled*

Počet plůdků vykazujících neobvyklý tělesný vzhled nebo pigmentaci a stav absorpce žloutkového váčku se zaznamenávají v přiměřených intervalech závisejících na délce zkoušky a na povaze popisované abnormality. Je třeba si uvědomit, že se neobvyklá embrya a plůdky přirozeně vyskytují a u některých druhů jich může být v kontrolních skupinách řádově několik procent. Neobvyklí jedinci by měli být ze zkušební nádrže odstraněni pouze v případě uhynutí.

1.7.5.4. *Neobvyklé chování*

Abnormality, např. hyperventilace, nekoordinované plavání a netypická nečinnost, se zaznamenávají v přiměřených intervalech závisejících na délce zkoušky. Tyto účinky, přestože je obtížné je kvantifikovat, mohou – jsou-li pozorovány – napomoci interpretovat údaje o mortalitě, tj. mohou poskytnout informace o mechanismu toxického působení látky.

1.7.5.5. *Tělesná délka*

Doporučuje se změřit na konci zkoušky individuální délky; může být použita standardní délka, délka k vidlici nebo celková délka. Došlo-li však k uhnití ocasní ploutve nebo k erozi ploutví, použijí se standardní délky. Obecně by měl být v dobře provedených zkouškách variační koeficient pro délku mezi jednotlivými kontrolními skupinami ≤ 20 %.

1.7.5.6. *Hmotnost*

Na konci zkoušky lze stanovit hmotnosti jedinců; hmotnost po vysušení (24 hodin při 60 ^{o}C) se upřednostňuje před živou váhou (po osušení do sucha).Obecně by měl být v dobře provedených zkouškách variační koeficient pro hmotnost mezi jednotlivými kontrolními skupinami ≤ 20 %.

Tato pozorování poskytnou některé nebo všechny následující údaje, které budou k dispozici pro statistickou analýzu:

— kumulativní mortalita,

— počty zdravých plůdků na konci zkoušky,

— čas začátku líhnutí a konce líhnutí (tj. 90 % vylíhnutí v každé paralelní skupině),

— počty plůdků vylíhnutých každý den,

— délka (a hmotnost) ryb, které přežily do konce zkoušky,

— počty plůdků, které jsou deformované nebo mají neobvyklý vzhled,

— počty plůdků vykazujících neobvyklé chování.

▼B

2. **ÚDAJE A JEJICH PŘEDKLÁDÁNÍ**

2.1. ZPRACOVÁNÍ VÝSLEDKŮ

Doporučuje se, aby se navrhování i analýzy zkoušky účastnil statistik, neboť tato zkušební metoda umožňuje značné variace v experimentálním uspořádání, například v počtu zkušebních nádrží, v počtu zkušebních koncentrací, ve výchozím počtu oplodněných jiker a v měřených parametrech. S ohledem na možnosti uspořádání zkoušky zde nejsou uvedeny specifické pokyny pro postup statistického zpracování.

Mají-li být odhadnuty hodnoty LOEC/NOEC, bude nezbytné analyzovat rozdíly v rámci každé sady paralelních skupin pomocí analýzy rozptylu (ANOVA) nebo pomocí kontingenční tabulky. k vícenásobnému porovnání výsledků pro jednotlivé koncentrace a pro kontrolní skupiny může být užitečný Dunnettův test (12, 13). K dispozici jsou další užitečné příklady (14, 15). Vypočte se a uvede velikost účinku, zjištěná pomocí analýzy ANOVA nebo jiných metod (tj. vypovídací schopnost zkoušky). Je třeba si uvědomit, že ne všechna pozorování uvedená v bodu 1.7.5.6 jsou vhodná pro statistickou analýzu pomocí ANOVA. Například kumulativní mortalita a počet zdravých plůdků na konci zkoušky by mohly být analyzovány probitovými metodami.

Mají-li být odhadnuty LC nebo EC_x, proloží se údaji vhodná křivka (vhodné křivky), jako např. logistická křivka, a to statistickou metodou, např. metodou nejmenších čtverců nebo nelineární metodou nejmenších čtverců. Křivka nebo křivky by měly být popsány parametry tak, aby bylo možné přímo odhadnout požadované hodnoty LC nebo EC_x a jejich směrodatné odchylky. To značně usnadní výpočet intervalů spolehlivosti pro hodnoty LC nebo EC_x. Pokud nejsou dobré důvody pro upřednostnění jiných intervalů spolehlivosti, uvede se oboustranný 95 % interval spolehlivosti. Metoda proložení by měla pokud možno umožnit posouzení závažnosti nedostatků proložení. Proložení lze provést graficky. Regresní analýza je vhodná pro všechna pozorování uvedená v bodu 1.7.5.6.

2.2. INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

Výsledky by měly být interpretovány opatrně v případě, že se naměřené koncentrace toxické látky ve zkušebních roztocích pohybují na úrovních blízkých mezi stanovení analytické metody. Interpretace výsledků pro koncentrace vyšší, než je rozpustnost látky ve vodě, by měla být rovněž opatrná.

2.3. PROTOKOL O ZKOUŠCE

Protokol o zkoušce musí obsahovat tyto informace:

2.3.1. **Zkoušená látka:**

— fyzikální povaha, fyzikálně-chemické vlastnosti,

— údaje o chemické identifikaci včetně údajů o čistotě a podle potřeby o metodě kvantitativního stanovení zkoušené látky.

▼B

2.3.2. **Testovací druh:**

— vědecký název, kmen, počet matečných ryb (tj. kolik samiček bylo ve zkoušce použito pro získání požadovaného počtu jiker), zdroj a metoda sběru oplodněných jiker a následné zpracování.

2.3.3. **Zkušební podmínky:**

— použitá zkušební metoda (např. semistatická nebo průtoková metoda, doba od oplodnění do začátku zkoušky, nasazování atd.),

— fotoperioda (fotoperiody),

— uspořádání zkoušky (např. počet zkušebních nádrží a jejich znásobení, počet embryí v nádrži),

— metoda přípravy zásobních roztoků a četnost obnovování (je-li použito, uvede se solubilizační činidlo a jeho koncentrace),

— nominální zkušební koncentrace, naměřené hodnoty ve zkušebních nádržích, jejich střední hodnoty a směrodatné odchylky a metody jejich stanovení, a je-li zkoušená látka rozpustná ve vodě v koncentracích nižších, než jsou vyšetřované koncentrace, uvede se důkaz toho, že naměřené koncentrace odpovídají koncentraci zkoušené látky v roztoku,

— charakteristiky ředicí vody: hodnota pH, tvrdost, teplota, koncentrace rozpuštěného kyslíku, koncentrace zbytkového chloru (je-li měřena), obsah celkového organického uhlíku, obsah suspendovaných látek, popřípadě salinita zkušebního média a výsledky jakýchkoli jiných provedených měření,

— kvalita vody ve zkušebních nádržích: pH, tvrdost, teplota a koncentrace rozpuštěného kyslíku.

2.3.4. **Výsledky**

— výsledky případných předběžných studií stálosti zkoušené látky,

— doklady o tom, že kontrolní skupiny splnily obecné požadavky na přijatelnou míru přežití pro testovací druh (dodatky 2 a 3),

— údaje o mortalitě nebo přežití v embryonálním stadiu a ve stadiu plůdku a údaje o celkové mortalitě nebo přežití,

— doba do vylíhnutí, počty vylíhnutých jedinců,

— údaje o délce (a hmotnosti),

— výskyt a popis morfologických odchylek, vyskytly-li se,

— výskyt a popis účinků na chování, vyskytly-li se,

— statistická analýza a zpracování údajů,

— u zkoušek analyzovaných pomocí ANOVA nejnižší koncentrace s pozorovanými účinky (LOEC) na hladině spolehlivosti $p = 0,05$ a koncentrace bez pozorovaných účinků (NOEC) pro každou posuzovanou odezvu, včetně popisu použité statistické metody a údaje o tom, jak velký účinek bylo možné zjistit,

▼B

— u zkoušek analyzovaných pomocí regresních metod, hodnoty LC a ECx a intervaly spolehlivosti a graf proložené závislosti použité pro jejich výpočet,

— vysvětlení jakékoli odchylky od této zkušební metody.

3. **LITERATURA**

1) Kristensen P. (1990) Evaluation of the Sensitivity of Short Term Fish Early Life Stage Tests in Relation to other FELS Test Methods. Final report to the Commission of the European Communities, str. 60. June 1990.

2) ASTM (1988). Standard Guide for Conducting Early Life-Stage Toxicity Tests with Fishes. American Society for Testing and Materials. E 1241-88. 26 str.

3) Brauhn J.L. and Schoettger R.A. (1975). Acquisition and Culture of Research Fish: Rainbow trout, Fathead minnows, Channel Catfish and Bluegills. p.54, Ecological Research Series, EPA-660/3-75-011, Duluth, Minnesota.

4) Brungs W.A. and Jones B.R. (1977) Temperature Criteria for Freshwater Fish: Protocol and Procedures p. 128, Ecological Research Series EPA-600/3-77-061, Duluth, Minnesota.

5) Laale H.W. (1977) The Biology and Use of the Zebrafish (*Brachydanio rerio*) in Fisheries Research. A Literature Review. J. Biol. 10, 121–173.

6) Legault R. (1958) A Technique for Controlling the Time of Daily Spawning and Collecting Eggs of the Zebrafish, *Brachydanio rerio* (Hamilton-Buchanan) Copeia, 4, str. 328–330.

7) Dave G., Damgaard B., Grande M., Martelin J.E., Rosander B. and Viktor T. (1987). Ring Test of an Embryo-larval Toxicity Test with Zebrafish (*Brachydanio rerio*) Using Chromium and Zinc as Toxicants. Environmental Toxicology and Chemistry, 6, str. 61–71.

8) Birge J.W., Black J.A. and Westerman A.G. (1985). Short-term Fish and Amphibian Embryo-larval Tests for Determining the Effects of Toxicant Stress on Early Life Stages and Estimating Chronic Values for Single Compounds and Complex Effluents. Environmental Toxicology and Chemistry 4, str. 807–821.

9) Van Leeuwen C.J., Espeldoorn A. and Mol F. (1986) Aquatic Toxicological Aspects of Dithiocarbamates and Related Compounds. III. Embryolarval Studies with Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*). J. Aquatic Toxicology, 9, 129–145.

10) Kirchen R.V. and W. R. West (1969). Teleostean Development. Carolina Tips 32(4): 1-4. Carolina Biological Supply Company.

11) Kirchen R.V. and W. R. West (1976). The Japanese Medaka. Its care and Development. Carolina Biological Supply Company, North Carolina. 36 str.

12) Dunnett C.W. (1955) A Multiple Comparisons Procedure for Comparing Several Treatments with Control. J. Amer. Statist. Assoc., 50, str. 1096–1121.

13) Dunnett C.W. (1964). New Tables for Multiple Comparisons with a Control. Biometrics, 20, 482–491.

14) Mc Clave J.T., Sullivan J.H. and Pearson J.G. (1980). Statistical Analysis of Fish Chronic Toxicity Test Data. Proceedings of 4th Aquatic Toxicology Symposium, ASTM, Philadelphia.

▼B

15) Van Leeuwen C.J., Adema D.M.M. and Hermes J. (1990). Quantitative Structure-Activity Relationships for Fish Early Life Stage Toxicity. Aquatic Toxicology, 16, str. 321–334.

16) Environment Canada. (1992). Toxicity Tests Using Early Life Stages of Salmonid Fish (Rainbow Trout, Coho Salmon or Atlantic Salmon). Biological Test Method Series. Report EPS 1/RM/28, December 1992, str. 81.

17) Dave G. and Xiu R. (1991). Toxicity of Mercury, Nickel, Lead and Cobalt to Embryos and Larvae of Zebrafish, *Brachydanio rerio*. Arch. of Environmental Contamination and Toxicology, 21, 126–134.

18) Meyer A., Bierman C.H. and Orti G. (1993). The phylogenetic position of the Zebrafish (*Danio rerio*), a model system in developmental biology – an invitation to the comperative methods. Proc. Royal Society of London, Series B, 252; 231-236.

19) Ghillebaert F., Chaillou C., Deschamps F. and Roubaud P. (1995). Toxic Effects, at Three pH Levels, of Two Reference Molecules on Common Carp Embryo. Ecotoxicology and Environmental Safety 32, 19–28.

20) US EPA, (1991). Guidelines for Culturing the Japanese Medaka, *Oryzias latipes*. EPA report EPA/600/3-91/064, Dec. 1991, EPA, Duluth.

21) US EPA, (1991). Guidelines for Conducting Early Life Stage Toxicity Tests with Japanese Medaka, (*Oryzias latipes*). EPA report EPA/600/3-91/063, Dec. 1991, EPA, Duluth.

22) De Graeve G.M., Cooney J.D., McIntyre D.O., Poccocic T.L., Reichenbach N.G., Dean J.H. and Marcus M.D. (1991). Validity in the performance of the seven-day Fathead minnow (*Pimephales promelas*) larval survival and growth test: an intra- and interlaboratory study. Environ. Tox. Chem. 10, 1189–1203.

23) Calow P. (1993). Handbook of Ecotoxicology, Blackwells, Oxford. Vol. 1, chapter 10: Methods for spawning, culturing and conducting toxicity tests with Early Life stages of Estuarine and Marine fish.

24) Balon E.K. (1985). Early life history of fishes: New developmental, ecological and evolutionary perspectives, Junk Publ., Dordrecht, 280 str.

25) Blaxter J.H.S. (1988). Pattern and variety in development, In: W.S. Hoar and D.J. Randall Eds., Fish Physiology, vol. XIA, Academic press, str. 1–58.

Tabulka 1A

Druhy ryb doporučené pro zkoušku

SLADKOVODNÍ
Oncorhynchus mykiss pstruh duhový (9, 16)
Danio rerio danio pruhované (7, 17, 18)
Cyprinus caprio kapr obecný (8, 19)
Oryzias latipes halančík japonský (20, 21)
Pimephales promelas střevle (8, 22)

▼B

Tabulka 1B

Příklady dalších dobře popsaných druhů, které byly rovněž použity

SLADKOVODNÍ	MOŘSKÉ
Carassius auratus karas zlatý (8)	*Menidia peninsulae* (23, 24, 25)
Lepomis macrochirus slunečnice modrá (8)	*Clupea harengus* (24, 25)
	Gadus morhua (24, 25)
	Cyprinodon variegatus (23, 24, 25)

▼B

DODATEK 1

NÁVOD K PROVEDENÍ ZKOUŠKY TOXICITY NA EMBRYÍCH A VÁČKOVÝCH PLŮDCÍCH DANIA PRUHOVANÉHO *(BRACHYDANIO RERIO)*

ÚVOD

Danio pruhované pochází z indického pobřeží Coromandel, kde žije v bystřinách. Je běžnou akvarijní rybou z čeledi kaprovitých a informace o péči o něj a o jeho chovu jsou uvedeny v standardních příručkách o tropických rybách. Přehled jeho biologie a použití ve výzkumu ryb podává Laale (1).

Ryba zřídka dorůstá délky více než 45 mm. Má válcové tělo se 7–9 horizontálními tmavě modrými stříbřitými pruhy. Pruhy pokračují přes ocasní a řitní ploutve. Hřbet má olivově zelený. Samečci jsou štíhlejší než samičky. Samičky jsou stříbrnější a mají rozšířené břicho, zejména před třením.

Dospělé ryby dokážou snášet velké kolísání teploty, pH a tvrdosti vody. Mají-li se však získat zdravé ryby poskytující jikry dobré kvality, měly by být zajištěny optimální podmínky.

Při tření sameček sleduje samičku a doráží na ni a při vypuzení jiker je oplodní. Jikry, které jsou průsvitné a nejsou přilnavé, dopadají na dno, kde mohou být pozřeny rodiči. Na tření má vliv světlo. Při odpovídajícím ranním světle se ryby třou v prvních hodinách po rozednění.

Samička může klást v odstupu jednoho týdne dávky o několika stech jiker.

PODMÍNKY PRO MATEČNÉ RYBY, REPRODUKCE A RANÁ ŽIVOTNÍ STADIA

Vybere se vhodný počet zdravých ryb, které se alespoň dva týdny před předpokládaným třením udržují ve vhodné vodě (např. dodatek 4). Skupina ryb by měla mít možnost se před kladením jiker pro zkoušku alespoň jednou vytřít. Hustota obsádky ryb by v tomto období neměla přesáhnout 1 gram ryb na litr. Pravidelná výměna vody nebo použití přečišťovacího systému umožní hustotu zvýšit. Teplota v chovných nádržích se má udržovat na 25 ± 2 °C. Ryby by měly dostávat rozmanitou potravu, která může obsahovat například komerční suché krmivo, čerstvě vylíhnuté žábronožky (Arthemia), chironomidy, dafnie, bílé červy roupice (Enchytraeids).

Dále jsou uvedeny dvě metody, které v praxi vedly k dostatečnému množství zdravých oplodněných jiker pro provedení zkoušky:

i) Osm samiček a 16 samečků se umístí do nádrže obsahující 50 litrů ředicí vody a chráněné před přímým světlem a ponechá se alespoň 48 hodin co nejvíce v klidu. Na dno nádrže se odpoledne v den před započetím zkoušky umístí vytírací rošt. Vytírací rošt se skládá z 5–7 cm vysokého rámu (z plexiskla nebo jiného vhodného materiálu) s 2–5 cm hrubým roštem nahoře a s 10–30 μm jemným roštem vespod. Na hrubém roštu je připevněna řada vytíracích střapců pro kladení jiker z nekrouceného silonového vlákna. Poté, co byly ryby drženy 12 hodin v temnu, se slabě nasvítí, čímž se vyvolá tření. Dvě až čtyři hodiny po vytření se vytírací rošt vyjme a jikry se seberou. Vytírací rošt zabrání rybám v požírání jiker a zároveň umožní snadný sběr jiker. Skupina ryb by se měla před třením určeným k produkci jiker pro zkoušku vytřít alespoň jednou.

▼B

ii) Pět až deset samečků a samiček se alespoň dva týdny před zamýšleným třením chová odděleně. Po 5 až 10 dnech se břicha samiček rozšíří a zviditelní se jejich genitální papily. Samečci papily nemají. Tření se provede v nádržích pro tření opatřených falešným dnem z pletiva (jako výše). Nádrž se naplní ředicí vodou tak, aby voda sahala 5–10 cm nad dno. Jedna samička a dva samečci se umístí do nádrže den před zamýšleným třením. Teplota vody se postupně zvýší jeden stupeň nad aklimatizační teplotu. Vypne se osvětlení a nádrž se ponechá co nejvíce v klidu. Ráno se slabě nasvítí, čímž se vyvolá tření. Po 2–4 hodinách se ryby vyjmou a jikry se seberou. Je-li potřeba více dávek jiker, než lze získat od jedné samičky, nasadí se paralelně dostatečný počet nádrží pro tření. Zaznamenáním úspěšnosti (množství a kvality) reprodukce jednotlivých samiček před zkouškou lze vybrat pro chov samičky s nejvyšší úspěšností.

Jikry se přenesou do zkušební nádrže skleněnou trubičkou (o vnitřním průměru ne menším než 4 mm) opatřenou pružným nasávacím balónkem. Množství vody, které se přenáší s jikrami, by mělo být co nejmenší. Jikry jsou těžší než voda a z trubičky vypadnou. Je třeba zabránit tomu, aby jikry (a plůdky) přišly do kontaktu se vzduchem. Provede se mikroskopické vyšetření vzorku (vzorků) jiker, aby se ověřilo, že v prvních stadiích vývoje nedošlo k nepravidelnostem. Dezinfekce jiker není přípustná.

Mortalita jiker je nejvyšší během prvních 24 hodin po oplodnění. V této době je často pozorována mortalita 5–40 %. Jikry degenerují v důsledku neúspěšného oplodnění nebo vývojových vad. Zdá se, že kvalita jiker závisí na samičce, neboť některé samičky soustavně kladou jikry dobré kvality, jakou jiné samičky neposkytují. Rovněž rychlost vývoje a líhnutí se mezi jednotlivými soubory liší. Úspěšně oplodněné jikry a plůdky se žloutkovým váčkem přežívají dobře, obvykle jich přežívá více než 90 %. Při 25 °C se z jiker líhnou jedinci po 3–5 dnech po oplodnění a žloutkový váček je absorbován přibližně po 13 dnech po oplodnění.

Embryonální vývoj byl dobře definován Hisaokou a Battlem (2). Díky průsvitnosti jiker a plůdků čerstvě po vylíhnutí lze vývoj ryb dobře sledovat a lze pozorovat malformace. Přibližně čtyři hodiny po vytření lze rozlišit neoplodněné jikry od oplodněných (3). K tomuto vyšetření se jikry a plůdky umístí do nádobky o malém objemu a prohlížejí se pod mikroskopem.

Zkušební podmínky požadované pro raná životní stadia jsou uvedeny v dodatku 2. Optimální hodnoty pH a tvrdosti vody jsou 7,8 a 250 mg/l, vyjádřeno jako $CaCO_3$.

VÝPOČTY A STATISTIKA

Navrhuje se dvoufázový postup. V první fázi se statisticky analyzují údaje o mortalitě, nenormálním vývoji a době líhnutí. Poté se pro ty koncentrace, při nichž nebyly pozorovány žádné nepříznivé účinky na tyto parametry, statisticky vyhodnotí tělesná délka. Tento postup se doporučuje, neboť toxická látka může selektivně usmrcovat menší ryby, prodlužovat dobu líhnutí a indukovat viditelné malformace, a tedy zkreslovat výsledky měření délky. Kromě toho tak bude pro každou expozici měřen zhruba stejný počet ryb, čímž se zajistí validita statistiky zkoušky.

▼B

STANOVENÍ LC_{50} A EC_{50}

Procento přežití jiker a plůdků se vypočte a zkoriguje na mortalitu v kontrolních skupinách podle Abbottovy rovnice (4):

$$P = 100 - \left(\frac{C - P'}{C} \times 100\right)$$

kde,

P = korigované procento přežití,

P' = procento přežití pozorované ve zkoušené koncentraci,

C = procento přežití v kontrolní skupině.

Podle možnosti se vhodnou metodou stanoví hodnota LC_{50} na konci zkoušky.

Požaduje-li se, aby byly do statistiky pro EC_{50} zahrnuty morfologické odchylky, lze k tomu nalézt návod v práci Stephana (5).

ODHAD LOEC A NOEC

Cílem zkoušky na jikrách a váčkových plůdcích je porovnat koncentrace, u nichž nebyl účinek nulový, s kontrolními skupinami, tj. stanovit LOEC. Použijí se tedy metody vícenásobného srovnání (6, 7, 8, 9, 10).

LITERATURA

1) Laale H.W. (1977) The Biology and Use of the Zebrafish (*Brachydanio rerio*) in Fisheries Research. A Literature Review. J. Fish Biol. 10, 121–173.

2) Hisaoka K.K. and Battle H.I. (1958). The Normal Development Stages of the Zebrafish *Brachydanio rerio* (Hamilton-Buchanan) J. Morph., 102, str. 311.

3) Nagel R. (1986). Untersuchungen zur Eiproduktion beim Zebrabärbling (*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan). Journal of Applied Ichthyology, 2, str. 173–181.

4) Finney D.J. (1971). Probit Analysis, 3rd ed., Cambridge University Press, Great Britain, str. 1–333.

5) Stephan C.E. (1982). Increasing the Usefulness of Acute Toxicity Tests. Aquatic Toxicology and Hazard Assessment: Fifth Conference, ASTM STP 766, J.G. Pearson, R.B. Foster and W.E. Bishop, Eds., American Society for Testing and Materials, str. 69–81.

6) Dunnett C.W. (1955). A Multiple Comparisons Procedure for Comparing Several Treatments with a Control. J. Amer. Statist. Assoc., 50, str. 1096–1121.

7) Dunnett C.W. (1964) New Tables for Multiple Comparisons with a Control. Biometrics, 20, 482–491.

8) Williams D.A. (1971). A Test for Differences Between Treatment Means when Several Dose Levels are Compared with a Zero Dose Control. Biometrics, 27, str. 103–117.

9) Williams D.A. (1972). The Comparison of Several Dose Levels with a Zero Dose Control. Biometrics 28, str. 519–531.

10) Sokal R.R. and Rohlf F.J. (1981). Biometry, the Principles and Practice of Statistics in Biological Research, W.H. Freeman and Co., San Francisco.

▼B

DODATEK 2

ZKUŠEBNÍ PODMÍNKY, DÉLKA ZKOUŠKY A KRITÉRIA PŘEŽITÍ PRO DOPORUČENÉ DRUHY

Druh	Teplota (°C)	Salinita (‰)	Fotoperioda (H)	Délka stadií (D)		Typická délka zkoušky	Přežití v kontrolních skupinách (minimální hodnota v %)	
				Embryo	Váčkový plůdek		Úspěšnost líhnutí	Po vylíhnutí
Sladkovodní								
Brachydanio rerio Danio pruhovaný	25 ± 1	—	12–16	3–5	8–10	Pokud možno ihned od oplodnění (od raného stadia gastruly) do 5 dnů po vylíhnutí (8–10 dnů)	80	90
Oncorhynchus mykiss pstruh duhový	10 ± 1 (1) 12 ± 1 (2)	—	0 (a)	30–35	25–30	Pokud možno ihned po oplodnění (od raného stadia gastruly) do 20 dnů po vylíhnutí (50–55 dnů)	66	70
Cyprinus carpio kapr obecný	21–25	—	12–16	5	> 4	Pokud možno ihned po oplodnění (od raného stadia gastruly) do 4 dnů po vylíhnutí (8–9 dnů)	80	75
Oryzias latipes halančík japonský	24 ± 1 (1) 23 ± 1 (2)	—	12–16	8–11	4–8	Pokud možno ihned po oplodnění (od raného stadia gastruly) do 5 dnů po vylíhnutí (13–16 dnů)	80	80
Pimephales promelas střevle	25 ± 2	—	16	4–5	5	Pokud možno ihned po oplodnění (od raného stadia gastruly) do 4 dnů po vylíhnutí (8–9 dnů)	60	70

(1) Pro embrya.
(2) Pro plůdky.
(a) Temno pro embrya a plůdky do jednoho týdne po vylíhnutí, s výjimkou doby prohlídky. Poté po dobu zkoušky tlumené světlo.

▼B

DODATEK 3

Zkušební podmínky, délka zkoušky a kritéria přežití pro jiné dobře popsané druhy

Druh	Teplota (°C)	Salinita (‰)	Fotoperioda (H)	Délka stadií (D)		Typická délka zkoušky	Přežití v kontrolních skupinách (minimální hodnota v %	
				Embryo	Váčkový plůdek		Úspěšnost líhnutí	Po vylíhnutí
Sladkovodní								
Carassius auratus karas zlatý	24 ± 1	—	—	3 — 4	> 4	Pokud možno ihned po oplodnění (od raného stadia gastruly) do 4 dnů po vylíhnutí (7 dnů)	—	80
Leopomis macrochirus slunečnice modrá	21 ± 1	—	16	3	> 4	Pokud možno ihned po oplodnění (od raného stadia gastruly) do 4 dnů po vylíhnutí (7 dnů)	—	75
Mořský								
Menidia peninsulae	22 – 25	15 – 22	12	1,5	10	Pokud možno ihned po oplodnění (od raného stadia gastruly) do 5 dnů po vylíhnutí (6–7 dnů)	80	60
Clupea harengus Sleď obecný	10 ± 1	8 – 15	12	20 – 25	3 – 5	Pokud možno ihned po oplodnění (od raného stadia gastruly) do 3 dnů po vylíhnutí (23–27 dnů)	60	80
Gadus morhua Treska obecná	5 ± 1	5 – 30	12	14 – 16	3 – 5	Pokud možno ihned po oplodnění (od raného stadia gastruly) do 3 dnů po vylíhnutí (18 dnů)	60	80
Cyprinodon variegatus	25 ± 1	15 – 30	12	–	—	Pokud možno ihned po oplodnění (od raného stadia gastruly) do 4/7 dnů po vylíhnutí (28 dnů)	> 75	80

▼B

DODATEK 4

NĚKTERÉ CHEMICKÉ CHARAKTERISTIKY PŘIJATELNÉ ŘEDICÍ VODY

Látka	Koncentrace
Nerozpuštěné látky	< 20 mg/l
Celkový organický uhlík	< 2 mg/l
Volný amoniak	< 1 µg/l
Zbytkový chlor	< 10 µg/l
Celkové organofosforové pesticidy	< 50 ng/l
Celkové organochlorové pesticidy a polychlorované bifenyly	< 50 ng/l
Celkový organický chlor	< 25 ng/l

▼B

C.16. ZKOUŠKA AKUTNÍ ORÁLNÍ TOXICITY PRO VČELU MEDONOSNOU

1. METODA

Tato metoda zkoušky akutní toxicity je replikou metody OECD TG 213 (1998).

1.1. ÚVOD

Tato zkouška toxicity je laboratorní metodou určenou k posouzení orální akutní toxicity přípravků na ochranu rostlin a jiných chemických látek pro dělnice včely medonosné (dospělce).

Při posuzování a hodnocení toxických charakteristik látek může být nezbytné stanovení akutní orální toxicity pro včelu medonosnou, např. je-li expozice včel dané chemické látce pravděpodobná. Zkouška akutní orální toxicity se provádí s cílem stanovit vlastní toxicitu pesticidů a jiných chemických látek pro včely. Výsledky této zkoušky by měly být použity pro definování potřeby dalšího hodnocení. The results of this test should be used to define the need for further evaluation. Tato metoda může být použita zejména ve stupňovaných programech hodnocení nebezpečnosti pesticidů pro včely založených na postupném přechodu od laboratorních zkoušek k semi-polním a polním experimentům (1). Pesticidy mohou být zkoušeny ve formě účinné látky (ú. l.) nebo ve formě finálně upravených přípravků.

K ověření citlivosti včel a přesnosti zkušebního postupu se použije standard toxicity.

1.2. DEFINICE

Akutní orální toxicita: jsou nepříznivé účinky, ke kterým dojde nejpozději do 96 hodin od orálního podání jediné dávky zkoušené látky.

Dávka: je množství požité zkoušené látky. Dávka se vyjadřuje v hmotnosti (μg) zkoušené látky na jednoho testovacího živočicha (v μg na včelu). Skutečnou dávku u každé včely nelze vypočítat, neboť se včely krmí vzájemně, lze však odhadnout průměrnou dávku (celkově odebrané množství zkoušené látky dělené počtem včel v jedné klícce).

LD_{50} (střední letální dávka) orálně je statisticky vypočtená jednotlivá dávka látky, která může po orálním podání způsobit úhyn 50 % jedinců. Hodnota LD_{50} se vyjadřuje v μg zkoušené látky na jednu včelu. U pesticidů muže být zkoušenou látkou buď účinná látka (ú. l.), nebo finálně upravený přípravek obsahující jednu nebo více účinných látek.

Mortalita: jedinec se považuje za uhynulého, je-li zcela nepohyblivý.

1.3. PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

Dělnice včely medonosné (*Apis mellifera*) (dospělci) se exponují řadě dávek zkoušené látky rozptýlené v cukerném roztoku. Včely jsou poté krmeny stejným roztokem neobsahujícím zkoušenou látku. Mortalita se zaznamenává denně během alespoň 48 hodin a porovnává se s kontrolními hodnotami. Jestliže se mortalita mezi 24 a 48 hodinami zvyšuje, zatímco mortalita v kontrolních skupinách zůstává na přijatelné úrovni, tj. $\leq$ 10 %, je vhodné zkoušku prodloužit maximálně na 96 hodin. Výsledky zkoušky se analyzují s cílem vypočítat LD_{50} pro 24 hodin a 48 hodin a v případě prodloužené studie pro 72 hodin a 96 hodin.

▼B

1.4. VALIDITA ZKOUŠKY

Má-li být zkouška platná, musí být splněny tyto podmínky:

— průměrná mortalita ve všech kontrolních skupinách nesmí na konci zkoušky překročit 10 %,

— LD_{50} pro standard toxicity odpovídá specifikovanému rozsahu.

1.5. POPIS ZKUŠEBNÍ METODY

1.5.1. **Sběr včel**

Použijí se mladušky téhož plemena, tj. včely stejného stáří, téže funkce vzhledem ke krmení plodu atd. Včely by měly být získány z dobře potravou zásobených zdravých, pokud možno chorob prostých včelstev, s kladoucí matkou, se známým původem, chovem a fyziologickým stavem. Měly by být sesbírány ráno v den zkoušky nebo by měly být sesbírány večer před zkouškou a drženy v podmínkách zkoušky do příštího dne. Vhodné jsou včely sesbírané z rámků bez plodů. Včely by neměly být sbírány brzy na jaře nebo pozdě na podzim, neboť během těchto období mají změněnou fyziologii. Musí-li být zkoušky provedeny brzy na jaře nebo pozdě na podzim, mohou se včely vylíhnout v inkubátoru a chovat s „včelím chlebem“ (na plástovém pylu) a s cukerným roztokem. Včely ošetřené chemickými látkami, jako jsou antibiotika, prostředky proti varroatóze atd., by neměly být použity pro zkoušky toxicity po čtyři týdny od konce posledního ošetření.

1.5.2. **Podmínky chovu a krmení**

Použijí se snadno čistitelné a dobře větrané klícky. Lze použít jakýkoli vhodný materiál, např. klícky z korozivzdorné oceli, drátěného pletiva, plastu nebo jednorázově použitelné dřevěné klícky atd. Dává se přednost skupinám po 10 včelách. Velikost zkušebních klícek by měla vyhovovat počtu včel, tj. měla by poskytovat dostatek prostoru.

Včely by měly být přechovávány ve tmě v experimentální místnosti při teplotě 25 ± 2 °C. Po dobu zkoušky se zaznamenává relativní vlhkost, která je obvykle 50–70 %. Zacházení se včelami, včetně ošetřování a pozorování, může být prováděno za (denního) světla. Jako potrava se používá vodný cukerný roztok o konečné koncentraci 500 g/l (50 % m/V). Po podání zkušebních dávek se podává potrava *ad libitum*. Systém krmení by měl umožňovat zaznamenání příjmu potravy pro každou klícku (viz bod 1.6.3.1). Lze použít skleněnou trubičku (přibližně 50 mm dlouhou, s průměrem 10 mm, zúženou na otevřeném konci na průměr asi 2 mm).

1.5.3. **Příprava včel**

Sesbírané včely se náhodně umístí do klícek, které se náhodně rozmístí v experimentální místnosti.

▼B

Před začátkem zkoušky mohou včely až 2 hodiny hladovět. Doporučuje se, aby nebyla včelám před expozicí podávána potrava, aby byly na začátku zkoušky rovnocenné, pokud jde o obsah zažívacího ústrojí. Hynoucí včely se před zahájením zkoušky odstraní a nahradí zdravými včelami.

1.5.4. **Příprava dávek**

Je-li zkoušená látka mísitelná s vodou, může být rozptýlena přímo v 50 % cukerném roztoku. U technických přípravků a látek s nízkou rozpustností ve vodě mohou být použity nosiče, jako jsou organická rozpouštědla, emulgátory nebo dispergátory s nízkou toxicitou pro včely (např. aceton, dimethylformamid, dimethylsulfoxid). Koncentrace nosiče závisí na rozpustnosti zkoušené látky a měla by být stejná pro všechny zkušební koncentrace. Obecně je vhodná 1 % koncentrace nosiče a neměla by být překračována.

Připraví se vhodné kontrolní roztoky, tzn. použijí-li se k rozpuštění zkoušené látky rozpouštědlo nebo dispergátor, použijí se dvě samostatné kontrolní skupiny: roztok ve vodě a cukerný roztok s rozpouštědlem/nosičem v koncentraci použité v dávkování.

1.6. POSTUP

1.6.1. **Zkušební a kontrolní skupiny**

Počet zkoušených dávek a jejich opakování by měl splňovat statistické požadavky na stanovení LD_{50} na hladině spolehlivosti 95 %. Zpravidla se pro zkoušku požaduje alespoň pět dávek tvořících geometrickou řadu s faktorem nepřekračujícím 2,2 a pokrývajících rozsah pro LD_{50}. Faktor ředění a počet koncentrací pro dávkování se však stanoví s ohledem na směrnici křivky toxicity (dávka versus mortalita) a s ohledem na statistickou metodu zvolenou pro analýzu výsledků. Vhodné koncentrace pro dávkování je možné zvolit pomocí orientační zkoušky.

Každá zkušební koncentrace se podá alespoň třem souběžným zkušební skupinám o 10 včelách. Vedle zkušebních skupin se nasadí alespoň tři kontrolní skupiny, každá o 10 včelách. Nasadí se také zkušební skupiny pro použitá rozpouštědla nebo nosiče (viz bod 1.5.4).

1.6.2. **Standard toxicity**

Do sérií zkoušení se zařadí standard toxicity. Zvolí se alespoň tři dávky pokrývající očekávanou hodnotu LD_{50}. Pro každou zkoušenou dávku se použijí alespoň tři klícky po deseti včelách, tj. tři opakování. Přednostním standardem toxicity je dimethoát, pro nějž se uvádí LD_{50} 24 hodin, orálně v rozmezí 0,10–0,35 µg účinné látky na včelu (2). Jsou však přijatelné i jiné standardy toxicity, pokud lze předložit dostatek údajů pro ověření očekávané reakce na dávku (např. parathion).

▼B

1.6.3. **Expozice**

1.6.3.1. *Podávání dávek*

Každé zkušební skupině včel se musí poskytnout 100–200 μl 50 % vodného cukerného roztoku obsahujícího zkoušenou látku ve vhodné koncentraci. Větší objem je nezbytný u látek s nízkou rozpustností, nízkou toxicitou nebo nízkou koncentrací ve formulaci, neboť v cukerném roztoku musí být použit větší podíl. Sleduje se množství potravy se zkoušenou látkou odebrané zkušební skupinou. Po spotřebování potravy (obvykle do 3–4 hodin) se z klícky odebere krmítko a nahradí se krmítkem obsahujícím pouze cukerný roztok. Cukerný roztok se poté poskytne *ad libitum*. Vysoké koncentrace některých sloučenin mohou působit odpudivě. To má za následek, že je přijímámo málo potravy, nebo že se žádná potrava neodebere. Po maximálně 6 hodinách se nespotřebovaná potrava se zkoušenou látkou nahradí samotným cukerným roztokem. Stanoví se množství spotřebované potravy se zkoušenou látkou (např. měřením objemu nebo zvážením neodebrané potravy).

1.6.3.2. *Délka trvání zkoušky*

Upřednostňuje se délka trvání zkoušky 48 hodin od okamžiku, kdy byl zkušební roztok nahrazen samotným cukerným roztokem. Jestliže se mortalita po prvních 24 hodinách zvyšuje o více než 10 %, zkouška se prodlouží maximálně na 96 hodin, pokud mortalita v kontrolních skupinách nepřekročí 10 %.

1.6.4. **Pozorování**

Mortalita se zaznamená po 4 hodinách od zahájení zkoušky a poté po 24 hodinách a 48 hodinách (rozumí se po podání dávky). Je-li nezbytné pozorování prodloužit, provedou se další vyhodnocení v 24hodinových intervalech maximálně do 96 hodin, pokud mortalita v kontrolních skupinách nepřekračuje 10 %.

Odhadne se množství spotřebované potravy na jednu skupinu. Porovnáním rychlostí spotřebování potravy se zkoušenou látkou a bez ní lze získat informaci o chutnosti potravy se zkoušenou látkou.

Zaznamená se neobvyklé chování pozorované během doby zkoušky.

1.6.5. **Limitní zkouška**

V některých případech (např. očekává-li se u látky nízká toxicita) může být provedena limitní zkouška za použití 100 μg účinné látky na včelu s cílem prokázat, že LD_{50} je vyšší než tato hodnota. Při ní se postupuje stejným způsobem, tj. nasadí se tři souběžné zkušební skupiny pro každou zkušební dávku, odpovídající kontrolní skupiny, stanoví se množství spotřebované potravy s účinnou látkou a použije se standard toxicity. Dojde-li k úhynům, měla by se provést úplná studie. Jsou-li pozorovány subletální účinky (viz bod 1.6.4), zaznamenají se.

▼B

2. **ÚDAJE A JEJICH PŘEDKLÁDÁNÍ**

2.1. ÚDAJE

Údaje se shrnou do tabulky, přičemž se pro každou zkušební skupinu, kontrolní skupiny a skupiny se standardem toxicity uvede počet použitých včel, mortalita v každé době pozorování a počet včel s nepříznivě ovlivněným chováním. Údaje o mortalitě se analyzují vhodnými statistickými metodami (např. probitovou analýzou, klouzavým průměrem, proložením binomického rozdělení) (3, 4). Sestrojí se křivky závislosti dávka-reakce pro každou dobu pozorování a vypočtou se směrnice křivek a střední letální dávky (LD_{50}) s 95 % intervalem spolehlivosti. Korekce na mortalitu v kontrolních skupinách lze provést Abbottovou korekcí (4, 5). Pokud nebyla potrava se zkoušenou látkou zcela odebrána, stanoví se spotřebovaná dávka zkoušené látky na skupinu. LD_{50} se vyjádří v μg zkoušené látky na včelu.

2.2. PROTOKOL O ZKOUŠCE

Protokol o zkoušce musí obsahovat tyto informace:

2.2.1. **Zkoušená látka:**

— fyzikální stav a příslušné fyzikálně-chemické vlastnosti (např. stálost ve vodě, tlak par),

— údaje o chemické identifikaci včetně strukturního vzorce, čistota, (tj. u pesticidů identifikace a koncentrace účinné látky (účinných látek)).

2.2.2. **Testovací druh:**

— vědecký název, plemeno, přibližné stáří (v týdnech), metoda sběru včel, datum sběru,

— informace o včelstvech použitých pro sběr testovacích včel, včetně informací o zdravotním stavu, nemocech dospělců, o všech ošetřeních před pokusem atd.,

2.2.3. **Zkušební podmínky:**

— teplota a relativní vlhkost v experimentální místnosti,

— podmínky chovu včetně typu, velikosti a materiálu klícek,

— metody přípravy zásobních a zkušebních roztoků (je-li použito, uvede se rozpouštědlo a jeho koncentrace),

— metoda přípravy zásobních roztoků a četnost obnovování (je-li použito rozpouštědlo, musí být uvedeno, včetně koncentrace), uspořádání zkoušky, např. použité zkušební koncentrace a jejich počet, počet kontrolních skupin, pro každou koncentraci a kontrolu počet paralelních klícek a počet včel na klícku,

— datum zkoušky.

▼B

2.2.4. **Výsledky:**

— výsledky předběžné orientační zkoušky, byla-li provedena,

— nekorigované údaje: mortalita pro každou zkoušenou dávku v každé době pozorování,

— graf křivek závislosti dávka-reakce na konci zkoušky,

— hodnoty LD_{50} intervaly spolehlivosti pro každý doporučený čas pozorování, a to pro zkoušenou látku a standard toxicity,

— statistické metody použité pro stanovení LD_{50},

— mortalita v kontrolních skupinách,

— jiné pozorované nebo naměřené biologické účinky, např. neobvyklé chování včel (včetně odmítnutí zkušební dávky), rychlost odebírání potravy v exponovaných a neexponovaných skupinách,

— jakákoli odchylka od zde popsaného zkušebního postupu a jiné důležité informace.

3. **LITERATURA**

1) EPPO/Council of Europe (1993). Decision-Making Scheme for the Environmental Risk Assessment of Plant Protection Products – Honeybees. EPPO bulletin, vol. 23, N.1, 151–165. March 1993.

2) Gough, H. J., McIndoe, E.C., Lewis, G.B. (1994). The use of dimethoate as a reference compound in laboratory acute toxicity tests on honeybees (*Apis mellifera* L.) 1981-1992. Journal of Apicultural Research, 22, 119–125.

3) Litchfield, J.T. and Wilcoxon, F. (1949). A simplified method of evaluating dose-effect experiments. Jour. Pharmacol. and Exper. Ther., 96, 99–113.

4) Finney, D.J. (1971). Probit Analysis. 3rd ed., Cambridge, London and New York.

5) Abbott, W.S. (1925). A method for computing the effectiveness of an insecticide. Jour. Econ. Entomol.,18, 265–267.

▼B

C.17. VČELA MEDONOSNÁ – ZKOUŠKA AKUTNÍ KONTAKTNÍ TOXICITY

1. METODA

Tato metoda zkoušky akutní toxicity je replikou metody OECD TG 214 (1998).

1.1. ÚVOD

Tato zkouška toxicity je laboratorní metodou určenou k posouzení akutní kontaktní toxicity přípravků na ochranu rostlin a jiných chemických látek pro dělnice včely medonosné (dospělce).

Při posuzování a hodnocení toxických charakteristik látek může být nezbytné stanovení akutní kontaktní toxicity pro včelu medonosnou, např. je-li expozice včel dané chemické látce pravděpodobná. Zkouška akutní kontaktní toxicity se provádí s cílem stanovit vlastní toxicitu pesticidů a jiných chemických látek pro včely. Výsledky této zkoušky by měly být použity pro definování potřeby dalšího hodnocení. Tato metoda může být použita zejména ve stupňovaných programech hodnocení nebezpečnosti pesticidů pro včely založených na postupném přechodu od laboratorních zkoušek k semi-polním a polním experimentům (1). Pesticidy mohou být zkoušeny ve formě účinné látky (ú. l.) nebo ve formě finálně upravených přípravků.

K ověření citlivosti včel a přesnosti zkušebního postupu se použije standard toxicity.

1.2. DEFINICE

Akutní kontaktní toxicita: je nepříznivý účinek, ke kterému dojde nejpozději do 96 hodin od topikální aplikace jedné dávky zkoušené látky.

Dávka: je množství aplikované zkoušené látky. Dávka se vyjadřuje v hmotnosti (μg) zkoušené látky na jednoho testovacího živočicha (v μg na včelu).

LD_{50} (střední letální dávka) kontaktně: je statisticky vypočtená jednotlivá dávka látky, která může po kontaktní aplikaci způsobit úhyn 50 % jedinců. Hodnota LD_{50} se vyjadřuje v μg zkoušené látky na jednu včelu. U pesticidů muže být zkoušenou látkou buď účinná látka (ú. l.), nebo finálně upravený přípravek obsahující jednu nebo více účinných látek.

Mortalita: jedinec se považuje za uhynulého, je-li zcela nepohyblivý.

1.3. PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

Dělnice včely medonosné (*Apis mellifera*) (dospělci) se exponují řadě dávek zkoušené látky rozpuštěné ve vhodném nosiči přímou aplikací na torax (jako kapičky). Zkouška trvá 48 hodin. Jestliže se mortalita mezi 24 a 48 hodinami zvyšuje, zatímco mortalita v kontrolních skupinách zůstává na přijatelné úrovni, tj. < 10 %, je vhodné zkoušku prodloužit maximálně na 96 hodin. Mortalita se zaznamenává denně a porovnává se s kontrolními hodnotami. Výsledky zkoušky se analyzují s cílem vypočítat LD_{50} pro 24 hodin a 48 hodin a v případě prodloužené studie pro 72 hodin a 96 hodin.

▼B

1.4. VALIDITA ZKOUŠKY

Má-li být zkouška platná, musí být splněny tyto podmínky:

— průměrná mortalita ve všech kontrolních skupinách nesmí na konci zkoušky překročit 10 %,

— LD_{50} pro standard toxicity odpovídá specifikovanému rozsahu.

1.5. POPIS ZKUŠEBNÍ METODY

1.5.1. **Sběr včel**

Použijí se mladušky téhož plemena, tj. včely stejného stáří, téže funkce vzhledem ke krmení plodu atd. Včely by měly být získány z dobře potravou zásobených zdravých, pokud možno chorob prostých včelstev, s kladoucí matkou, se známým původem, chovem a fyziologickým stavem. Měly by být sesbírány ráno v den zkoušky nebo by měly být sesbírány večer před zkouškou a drženy v podmínkách zkoušky do příštího dne. Vhodné jsou včely sesbírané z rámků bez plodů. Včely by neměly být sbírány brzy na jaře nebo pozdě na podzim, neboť během těchto období mají změněnou fyziologii. Musí-li být zkoušky provedeny brzy na jaře nebo pozdě na podzim, mohou se včely vylíhnout v inkubátoru a chovat s „včelím chlebem“ (na plástovém pylu) a s cukerným roztokem. Včely ošetřené chemickými látkami, jako jsou antibiotika, prostředky proti varroatóze atd., by neměly být použity pro zkoušky toxicity po čtyři týdny od konce posledního ošetření.

1.5.2. **Podmínky chovu a krmení**

Použijí se snadno čistitelné a dobře větrané klícky. Lze použít jakýkoli vhodný materiál, např. klícky z korozivzdorné oceli, drátěného pletiva, plastu nebo dřevěné klícky na jednorázové použití atd. Velikost zkušebních klícek by měla vyhovovat počtu včel, tj. klícky by měly poskytovat dostatek prostoru. Dává se přednost skupinám po 10 včelách.

Včely by měly být přechovávány ve tmě v experimentální místnosti při teplotě 25 ± 2 °C. Po dobu zkoušky se zaznamenává relativní vlhkost, která je obvykle 50–70 %. Zacházení se včelami, včetně ošetřování a pozorování, může být prováděno za (denního) světla. Jako potrava se používá vodný cukerný roztok o konečné koncentraci 500 g/l (50 % m/V) a podává se za použití krmítka včel po dobu zkoušky *ad libitum*. Lze použít skleněnou trubičku (přibližně 50 mm dlouhou, s průměrem 10 mm, zúženou na otevřeném konci na průměr asi 2 mm).

1.5.3. **Příprava včel**

Sesbírané včely mohou být za účelem aplikace zkoušené látky narkotizovány oxidem uhličitým nebo dusíkem. Množství anestetika v době expozice by mělo být minimalizováno. Hynoucí včely se před zahájením zkoušky odstraní a nahradí zdravými včelami.

1.5.4. **Příprava dávek**

Zkoušená látka se aplikuje jako roztok v nosiči, tj. v organickém rozpouštědle nebo jako vodný roztok se smáčedlem. Jako organické rozpouštědlo se upřednostňuje aceton, mohou však být použita i jiná rozpouštědla s nízkou toxicitou pro včely (např. dimethylformamid, dimethylsulfoxid). U finálně upravených přípravků dispergovaných ve vodě a u silně polárních organických látek nerozpustných v organických nosičových rozpouštědlech lze aplikaci usnadnit jejich rozpuštěním ve slabém roztoku komerčního smáčedla (např. smáčedla Agral, Cittowett, Lubrol, Triton, Tween).

▼B

Připraví se vhodné kontrolní roztoky, tzn. použijí-li se k rozpuštění zkoušené látky rozpouštědlo nebo dispergátor, použijí se dvě samostatné kontrolní skupiny: jedna ošetřená vodou a jedna rozpouštědlem/dispergátorem.

1.6. POSTUP

1.6.1. **Zkušební a kontrolní skupiny**

Počet zkoušených dávek a jejich opakování by měl splňovat statistické požadavky na stanovení LD_{50} na hladině spolehlivosti 95 %. Zpravidla se pro zkoušku požaduje alespoň pět dávek tvořících geometrickou řadu s faktorem nepřekračujícím 2,2 a pokrývajících rozsah pro LD_{50}. Počet dávek se však musí stanovit s ohledem na směrnici křivky toxicity (dávka versus mortalita) a s ohledem na statistickou metodu zvolenou pro analýzu výsledků. Vhodné dávky je možné zvolit pomocí orientační zkoušky.

Každá zkušební koncentrace se podá alespoň třem souběžným zkušební skupinám o 10 včelách.

Vedle zkušebních skupin se nasadí alespoň tři kontrolní skupiny, každá o 10 včelách. Je-li použito organické rozpouštědlo nebo smáčedlo, musí se zařadit další tři kontrolní skupiny po 10 včelách pro rozpouštědlo a smáčedlo.

1.6.2. **Standard toxicity**

V rámci zkušebních skupin musí být použit standard toxicity. Zvolí se alespoň tři dávky pokrývající očekávanou hodnotu LD_{50}. Pro každou zkoušenou dávku se použijí alespoň tři klícky po deseti včelách, tj. tři opakování. Upřednostňovaným standardem toxicity je dimethoát, pro nějž se uvádí LD_{50} 24 hodin, kontaktně v rozmezí 0,10–0,30 μg účinné látky na včelu (2). Jsou však přijatelné i jiné standardy toxicity, pokud lze předložit dostatek údajů pro ověření očekávané reakce na dávku (např. parathion).

1.6.3. **Expozice**

1.6.3.1. *Podávání dávek*

U narkotizovaných včel se jednotlivě provede topikální aplikace. Včely se náhodně rozdělí do různých zkušebních a kontrolních skupin. Objem 1 μl roztoku obsahujícího zkoušenou látku ve vhodné koncentraci se aplikuje mikroaplikátorem na dorsální stranu thoraxu každé včely. Mohou být použity i jiné objemy, je-li to opodstatněné. Po aplikaci se včely umístí do zkušebních klícek a zásobí se cukerným roztokem.

1.6.3.2. *Délka doby trvání zkoušky*

Upřednostňuje se délka doby trvání zkoušky 48 hodin. Jestliže se mortalita mezi 24 a 48 hodinami zvyšuje o více než 10 %, je vhodné zkoušku prodloužit maximálně na 96 hodin, pokud mortalita v kontrolních skupinách nepřekračuje $\leq$ 10 %.

▼B

1.6.4. **Pozorování**

Mortalita se zaznamená po 4 hodinách od aplikace a poté po 24 hodinách a 48 hodinách. Je-li nezbytné dobu pozorování prodloužit, provedou se další vyhodnocení v 24hodinových intervalech maximálně do 96 hodin, pokud mortalita v kontrolních skupinách nepřekračuje 10 %.

Zaznamená se neobvyklé chování pozorované během doby zkoušky.

1.6.5. **Limitní zkouška**

V některých případech (např. očekává-li se u látky nízká toxicita) může být provedena limitní zkouška za použití 100 μg účinné látky na včelu s cílem prokázat, že LD_{50} je vyšší než tato hodnota. Postupuje se stejným způsobem, včetně nasazení tří souběžných zkušebních skupin pro každou zkušební dávku, tj. tří opakování, odpovídajících kontrolních skupin a použití standardu toxicity. Dojde-li k úhynům, měla by se provést úplná studie. Jsou-li pozorovány subletální účinky (viz bod 1.6.4), zaznamenají se.

2. **ÚDAJE A JEJICH PŘEDKLÁDÁNÍ**

2.1. ÚDAJE

Údaje se shrnou do tabulky, přičemž se pro každou zkušební skupinu, kontrolní skupiny a skupiny se standardem toxicity uvede počet použitých včel, mortalita v každé době pozorování a počet včel s nepříznivě ovlivněným chováním. Údaje o mortalitě se analyzují vhodnými statistickými metodami (např. probitovou analýzou, klouzavým průměrem, proložením binomického rozdělení) (3, 4). Sestrojí se křivky závislosti dávka-reakce pro každou dobu pozorování (tj. 24 hodin, 48 hodin a podle potřeby 72 hodin, 96 hodin) a vypočtou se směrnice křivek a střední letální dávky (LD_{50}) s 95 % intervalem spolehlivosti. Korekce na mortalitu v kontrolních skupinách lze provést Abbottovou korekcí (4, 5). LD_{50} se vyjádří v μg zkoušené látky na včelu.

2.2. PROTOKOL O ZKOUŠCE

Protokol o zkoušce musí obsahovat tyto informace:

2.2.1. **Zkoušená látka:**

— fyzikální stav a fyzikálně-chemické vlastnosti (např. stálost ve vodě, tlak par),

— údaje o chemické identifikaci včetně strukturního vzorce, čistota, (tj. u pesticidů identifikace a koncentrace účinné látky (účinných látek)).

2.2.2. **Testovací druh:**

— vědecký název, plemeno, přibližné stáří (v týdnech), metoda sběru včel, datum sběru,

— informace o včelstvech použitých pro sběr testovacích včel, včetně informací o zdravotním stavu, nemocech dospělců, o všech ošetřeních před pokusem atd.,

▼B

2.2.3. **Zkušební podmínky:**

— teplota a relativní vlhkost v experimentální místnosti,

— podmínky chovu včetně typu, velikosti a materiálu klícek,

— metody aplikace zkoušené látky, např. použité nosičové rozpouštědlo, aplikovaný objem zkušebního roztoku, použitý narkotizační prostředek,

— uspořádání zkoušky, např. použité zkoušené dávky a jejich počet, počet kontrolních skupin, pro každou dávku a kontrolu počet paralelních klícek, tj. opakování, a počet včel na klícku,

— datum zkoušky.

2.2.4. **Výsledky:**

— výsledky předběžné orientační zkoušky, byla-li provedena,

— primární údaje: mortalita pro každou zkoušenou dávku v každém čase pozorování,

— graf křivek závislosti dávkareakce na konci zkoušky,

— hodnoty LD_{50} s 95 % intervaly spolehlivosti pro každou doporučenou dobu pozorování, a to pro zkoušenou látku a standard toxicity,

— statistické metody použité pro stanovení LD_{50},

— mortalita v kontrolních skupinách,

— jiné pozorované nebo změřené biologické účinky a jakékoli neobvyklé reakce včel,

— jakákoli odchylka od zde popsaného zkušebního postupu metody a jiné důležité informace.

3. **LITERATURA**

1) EPPO/Council of Europe (1993). Decision-Making Scheme for the Environmental Risk Assessment of Plant Protection Products – Honeybees. EPPO bulletin, vol. 23, N.1, 151–165. March, 1993.

2) Gough, H. J., McIndoe, E.C., Lewis, G.B. (1994). The use of dimethoate as a reference compound in laboratory acute toxicity tests on honeybees (*Apis mellifera* L.), 1981–1992. Journal of Apicultural Research 22, 119–125.

3) Litchfield, J.T. and Wilcoxon, F. (1949). A simplified method of evaluating dose-effect experiments. Jour. Pharmacol. and Exper. Ther., 96, 99–113.

4) Finney, D.J. (1971). Probit Analysis. 3rd ed., Cambridge, London and New York.

5) Abbott, W.S. (1925). A method for computing the effectiveness of an insecticide. Jour. Econ. Entomol. 18, 265–267.

▼B

C.18. STANOVENÍ ADSORPCE/DESORPCE ŠARŽOVITOU ROVNOVÁŽNOU METODOU

1. METODA

Tato metoda je replikou metody OECD TG 106 pro stanovení půdní adsorpce/desorpce šaržovitou rovnovážnou metodou (2000).

1.1. ÚVOD

Tato metoda se opírá o okružní testy a seminář o výběru půd pro vývoj zkoušky adsorpce (1, 2, 3, 4) a rovněž o existující metodiky na vnitrostátní úrovni (5, 6, 7, 8, 9, 10, 11).

Studie adsorpce/desorpce jsou užitečné pro získávání důležitých informací o mobilitě a distribuci chemických látek v půdních, vodních a vzdušných složkách biosféry (12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21). Informace lze použít k předpovědi nebo odhadu například dostupnosti chemické látky pro odbourávání (22, 23), transformaci a příjem organismy (24), vymývání půdním profilem (16, 18, 19, 21, 25, 26, 27, 28), vytěkávání z půdy (21, 29, 30) a odtékání z půdního povrchu do vod (18, 31, 32). Údaje o adsorpci lze použít pro účely porovnání a modelování (19, 33, 34, 35).

Distribuce chemické látky mezi půdu a vodnou fázi je složitý proces, který závisí na řadě různých faktorů: na chemické povaze látky (12, 36, 37, 38, 39, 40), na charakteristikách půdy (4, 12, 13, 14, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49) a na klimatických faktorech, jako jsou dešťové srážky, teplota, sluneční svit a vítr. Četné jevy a mechanismy při adsorpci chemické látky v půdě tedy nelze v celém rozsahu definovat zjednodušeným laboratorním modelem, jakým je tato metoda. Přestože nelze tímto pokusem zahrnout všechny možné případy z životního prostředí, poskytuje hodnotné informace o významnosti adsorpce chemické látky z hlediska životního prostředí.

Viz také Obecný úvod.

1.2. ROZSAH

Tato metoda je zaměřena na odhad adsorpčního/desorpčního chování látky v půdách. Cílem je získat sorpční hodnoty, které lze použít pro předpověď distribuce za mnoha podmínek v životním prostředí; k tomuto účelu se pro chemickou látku stanovují rovnovážné adsorpční koeficienty v různých půdách jako funkce půdních charakteristik (např. obsahu organického uhlíku, obsahu jílu, půdní struktury a pH). Pro co nejširší podchycení interakcí dané látky s půdami vyskytujícími se v přírodě musí být použity různé druhy půd.

Při této metodě vyjadřuje adsorpce proces vázání chemické látky na půdní povrch; nerozlišuje se mezi různými adsorpčními procesy (fyzikální a chemickou adsorpcí) a procesy, jako jsou povrchově katalyzované odbourávání, adsorpce hmotou nebo chemická reakce. Adsorpce na koloidních částicích (průměr < 0,2 μm) vznikajících v půdě se nebere v úvahu.

▼B

Půdními parametry, které jsou považovány za nejdůležitější, jsou: obsah organického uhlíku (3, 4, 12, 13, 14, 41, 43, 44, 45, 46, 47, 48), obsah jílu a půdní struktura (3, 4, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48) a pro ionizovatelné sloučeniny také pH (3, 4, 42). Dalšími půdními parametry, které mohou mít vliv na adsorpci/desorpci určité látky jsou efektivní kationtová výměnná kapacita (ECEC), obsah amorfních oxidů železa a hliníku, zejména u vulkanických a tropických půd (4) a rovněž specifický povrch (49).

Zkouška je navržena pro vyhodnocení adsorpce chemické látky na různých druzích půd s proměnlivým obsahem organického uhlíku, jílu, proměnlivou půdní strukturou a proměnlivým pH. Je trojstupňová:

Stupeň 1:. Předběžná studie pro stanovení:

— poměru půda/roztok,

— rovnovážné adsorpční doby a množství zkoušené látky adsorbované při rovnováze,

— adsorpce zkoušené látky na povrchu zkušební nádobky a stálosti zkoušené látky po dobu zkoušky.

Stupeň 2:. Screeningová zkouška: adsorpce je studována v pěti různých typech půd měřením adsorpční kinetiky při jedné koncentraci zkoušené látky a stanovením distribučních koeficientů K_d a K_{ou}.

Stupeň 3: Stanovení Freundlichových adsorpčních isotherm za účelem zjištění vlivu koncentrace na rozsah adsorpce v půdách.

Studie desorpce měřením desorpční kinetiky/Freundlichových desorpčních isotherm (dodatek 1).

1.3. DEFINICE A JEDNOTKY

Symbol	Definice	Jednotky
A_{t_i}	procento adsorpce v čase t_i	%
A_{eq}	procento adsorpce při adsorpční rovnováze	%
$m_p^{ads}(t_i)$	hmotnost zkoušené látky adsorbované v půdě v čase t_i	µg
$m_p^{ads}(\Delta t_i)$	hmotnost zkoušené látky adsorbované v půdě v časovém intervalu Δt_i	µg
$m_p^{ads}(eq)$	hmotnost zkoušené látky adsorbované v půdě při adsorpční rovnováze	µg
m_0	hmotnost zkoušené látky ve zkušební nádobce na začátku adsorpční zkoušky	µg
$m_m^{ads}(t_i)$	hmotnost zkoušené látky naměřené v podílu (v_a^A)	µg
$m_{vod}^{ads}(eq)$	hmotnost zkoušené látky v roztoku při adsorpční rovnováze	µg
$m_{půda}$	množství půdní fáze vyjádřené v suché hmotnosti půdy	g

▼B

Symbol	Definice	Jednotky
$C_{zás}$	hmotnostní koncentrace zásobního roztoku látky	μg/cm^3
C_0	počáteční hmotnostní koncentrace zkušebního roztoku v kontaktu s půdou	μg/cm^3
$C_{vod}^{ads}(t_i)$	hmotnostní koncentrace látky ve vodné fázi v čase t_i, kdy je prováděna analýza	μg/cm^3
$C_p^{ads}(eq)$	množství látky adsorbované v půdě při adsorpční rovnováze	μg/g
$C_{vod}^{ads}(eq)$	hmotnostní koncentrace látky ve vodné fázi při adsorpční rovnováze	μg/cm^3
V_0	počáteční objem vodné fáze v kontaktu s půdou během adsorpční zkoušky	cm^3
v_a^A	objem podílu, ve kterém je látka stanovovánad	cm^3
K_d	distribuční koeficient pro adsorpci	cm^3/g
K_{ou}	adsorpční koeficient normalizovaný na organický uhlík	cm^3/g
K_{om}	distribuční koeficient normalizovaný na obsah organických látek	cm^3/g
K_F^{ads}	Freundlichův adsorpční koeficient	$\mu g^{1-1/n}$ (cm^3) $^{1/n}$ g^{-1}
1/n	Freundlichův exponent	
D_{t_i}	procento desorpce v čase t_i	%
$D_{\Delta t_i}$	procento desorpce v časovém intervalu Δt_i	%
K_{des}	zdánlivý desorpční koeficient	cm^3/g
K_F^{des}	Freundlichův desorpční koeficient	$\mu g^{1-1/n}$ (cm^3) $^{1/n}$ g^{-1}
$m_{vod}^{des}(t_i)$	hmotnost zkoušené látky desorbované z půdy v čase t_i	μg
$m_p^{des}(\Delta t_i)$	hmotnost látky, která zůstává adsorbovaná v půdě po uplynutí časového intervalu Δt_i	μg
$m_m^{des}(eq)$	analyticky stanovená hmotnost látky ve vodné fázi při desorpční rovnováze	μg
$m_{vod}^{des}(eq)$	hmotnostní koncentrace látky ve vodné fázi při desorpční rovnováze	μg
$m_p^{des}(\Delta t_i)$	hmotnost látky, která zůstává adsorbovaná v půdě po uplynutí časového intervalu	μg
m_{vod}^A	hmotnost látky zbylé z adsorpční rovnováhy v důsledku neúplné výměny objemu vodné fáze	μg
$C_p^{des}(eq)$	množství zkoušené látky, které zůstalo adsorbované v půdě při desorpční rovnováze	μg/g

▼B

Symbol	Definice	Jednotky
$C_{vod}^{des}(eq)$	hmotnostní koncentrace látky ve vodné fázi při desorpční rovnováze	μg/cm^3
V_T	celkový objem vodné fáze v kontaktu s půdou při měření desorpční kinetiky sériovou metodou	cm^3
V_R	objem supernatantu odebraného ze zkušební nádobky po dosažení adsorpční rovnováhy a nahrazeného stejným objemem 0,01 M roztoku $CaCl_2$	cm^3
v_a^D	objem podílu odebraného k analýze od okamžiku t_i při měření desorpční kinetiky provedeného sériovou metodou	cm^3
V_r^i	objem roztoku odebraného ze zkušební nádobky (*i*) ke stanovení zkoušené látky při měření desorpční kinetiky (paralelní metoda)	cm^3
V_r^F	objem roztoku odebraného ze zkušební nádobky ke stanovení zkoušené látky při desorpční rovnováze	cm^3
MB	hmotnostní bilance	%
m_E	celková hmotnost zkoušené látky extrahované z půdy a ze stěn zkušební nádobky ve dvou stupních	μg
V_{rec}	objem supernatantu získaný po dosažení adsorpční rovnováhy	cm^3
P_{ov}	rozdělovací koeficient oktanol/voda	
pK_a	disociační konstanta	
S_v	rozpustnost ve vodě	g/l

1.4. PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

Známé objemy roztoků zkoušené látky isotopově značené nebo neznačené, o známé koncentraci, se v 0,01 M $CaCl_2$ přidají k půdním vzorkům o známé suché hmotnosti, které byly předem uvedeny do rovnováhy s 0,01 M $CaCl_2$. Směs se přiměřenou dobu míchá. Půdní suspense se poté oddělí centrifugací a popřípadě zfiltruje a vodná se fáze se analyzuje. Množství zkoušené látky adsorbované v půdním vzorku se vypočte z rozdílu mezi počátečním množstvím zkoušené látky v roztoku a množstvím, které v něm zbylo na konci experimentu (nepřímá metoda).

Alternativně lze adsorbované množství zkoušené látky stanovit také přímo analýzou půdy (přímá metoda). Tato metoda, která zahrnuje postupnou extrakci vhodným rozpouštědlem, se doporučuje v případech, kdy nelze přesně stanovit rozdíl koncentrací látky v roztocích. Jde například o tyto případy: adsorpce zkoušené látky na stěnách zkušebních nádobek, nestálost zkoušené látky vzhledem k délce experimentu, nízká adsorpce s malou změnou koncentrace v roztoku a vysoká adsorpce, jejímž důsledkem je nízká koncentrace, kterou nelze přesně stanovit. Použije-li se látka isotopově značená, lze se extrakci půdy vyhnout analýzou půdní fáze spálením a počítáním scintilací v roztoku. To je však nespecifická technika, která nerozlišuje mezi výchozími a transformačními produkty; měla by tedy být použita pouze tehdy, je-li zkoušená chemická látka po dobu studie stálá.

▼B

1.5. INFORMACE O ZKOUŠENÉ LÁTCE

Chemická činidla musí mít analytickou čistotu. Doporučuje se použití radioisotopově neznačených zkoušených látek se známým složením a alespoň 95 % čistotou, nebo značených zkoušených látek, které mají známé složení a jsou isotopově čisté. U značených atomů s krátkým poločasem musí být provedena korekce na rozpad.

Před prováděním zkoušek adsorpcedesorpce by měly být o zkoušené látce známy tyto informace:

a) rozpustnost ve vodě (A.6);

b) tlak par (A.4) a/nebo Henryho konstanta;

c) abiotický rozklad: hydrolýza jako funkce pH (C.7);

d) rozdělovací koeficient (A.8);

e) snadná biologická rozložitelnost (C.4) nebo aerobní a anaerobní transformace v půdě;

f) pKa ionizovatelných látek;

g) přímá fotolýza ve vodě (tj. UV-Vis absorpční spektrum ve vodě, kvantový výtěžek) a fotodegradace v půdě.

1.6. POUŽITELNOST ZKOUŠKY

Zkouška je použitelná u látek, pro něž existuje analytická metoda s dostatečnou správností. Důležitým parametrem, který může ovlivnit spolehlivost výsledku, zejména při nepřímé metodě, je stálost zkoušené látky po celou dobu zkoušky. Je tedy předpokladem ověřit stálost v předběžné studii; je-li v průběhu zkoušky pozorována přeměna látky, doporučuje se, aby byla v hlavní studii analyzována jak půdní, tak vodná fáze.

Obtíže mohou nastat při provádění této zkoušky u látek s nízkou rozpustností ve vodě ($S_v < 10^{-4}$ g/l) a rovněž u látek s vyšším nábojem v důsledku toho, že koncentraci ve vodné fázi nelze změřit s dostatečnou správností. V těchto případech musí být podniknuty další kroky. Pokyny pro řešení těchto problémů jsou uvedeny v příslušných částech této metody.

Při zkoušení těkavých látek je třeba dbát na to, aby se v průběhu studie předešlo ztrátám.

1.7. POPIS METODY

1.7.1. **Přístroje a pomůcky, chemická činidla**

Standardní laboratorní vybavení, zejména:

a) Zkumavky nebo nádobky pro provedení experimentů. Je důležité, aby tyto zkumavky nebo nádobky:

— odpovídaly odstředivce, aby se minimalizovaly nepřesnosti v důsledku manipulace a přenášení,

— byly z inertního materiálu, který minimalizuje adsorpci zkoušené látky na jejich stěnách.

▼B

b) Třepací zařízení: třepačka s rotačním pohybem nebo rovnocenné zařízení; třepačka musí v průběhu třepání udržovat půdu v suspensi;

c) Odstředivka: přednostně vysokootáčková, např. s odstředivým zrychlením > 3 000 g, s řízenou teplotou, schopná odstředit z vodného roztoku částice o průměru větším než 0,2 μm. Kyvety by měly být během třepání a centrifugace opatřeny víčky, aby nedošlo ke ztrátám těkavých látek a vody; aby se minimalizovala adsorpce na víčkách, použijí se deaktivovaná víčka, např. šroubová víčka potažená teflonem.

d) Volitelné: filtrační zařízení; filtry s průměrem pórů 0,2 μm, sterilní, na jedno použití. Zvláštní péče by měla být věnována volbě materiálu filtru, aby se předešlo ztrátám zkoušené látky; u špatně rozpustných zkoušených látek se organický materiál filtru nedoporučuje.

e) Analytické přístroje vhodné pro měření koncentrace zkoušené látky.

f) Laboratorní sušárna umožňující udržovat teplotu od 103 °C do 110 °C.

1.7.2. **Charakterizace a výběr půd**

Půdy by měly být charakterizovány třemi parametry, které jsou hlavně odpovědné za adsorpční kapacitu: obsahem organického uhlíku, obsahem jílu a půdní strukturou a hodnotou pH. Jak již bylo uvedeno, (viz oddíl Rozsah), mohou mít další fyzikálně-chemické charakteristiky půdy vliv na adsorpci/desorpci určité látky a měly by být v takových případech zohledněny.

Metody použité pro charakterizaci půdy jsou velmi důležité a mohou významně ovlivnit výsledky. Doporučuje se tedy, aby pH bylo odpovídající metodou ISO (ISO-10390-1) měřeno v 0,01 M $CaCl_2$ (jde o roztok použitý při zkoušení adsorpce/desorpce). Doporučuje se rovněž, aby byly ostatní důležité půdní charakteristiky stanoveny standardními metodami (např. ISO „Handbook of Soil Analysis“); to umožní, aby byla analýza sorpčních údajů založena na světově standardizovaných půdních parametrech. Informace o existujících standardních metodách analýzy a charakterizace půdy jsou uvedeny v literatuře (50–52). Ke kalibraci metod zkoušení půd se doporučují referenční půdy.

Návod pro výběr půd pro adsorpční/desorpční experimenty je uveden v tabulce 1. Sedm vybraných druhů půd pokrývá půdní druhy vyskytující se v mírném zeměpisném pásu. V případě ionizovatelných zkoušených látek by měly vybrané půdy pokrývat široký rozsah pH, aby bylo možné hodnotit adsorpci látky v její ionizované a neionizované formě. Návod k volbě počtu různých půd, které mají být použity v jednotlivých stadiích zkoušky, je uveden v bodu 1.9 Provedení zkoušky.

Upřednostňují-li se jiné druhy půd, měly by být charakterizovány stejnými parametry a měly by mít podobný rozsah vlastností jako v tabulce 1, třebaže kritériím neodpovídají přesně.

▼B

Tabulka 1

Návod pro výběr půdních vzorků pro adsorpci/desorpci

Druh půdy	Rozsah pH (v 0,01 M $CaCl_2$)	Obsah organického uhlíku (%)	Obsah jílu (%)	Struktura půdy ([1])
1	4,5–5,5	1,0–2,0	65–80	jílovitá
2	> 7,5	3,5–5,0	20–40	jílovitohlinitá
3	5,5–7,0	1,5–3,0	15–25	prachovitohlinitá
4	4,0–5,5	3,0–4,0	15–30	hlinitá
5	< 4,0–6,0 ([2])	< 0,5–1,5 ([2]) ([3])	< 10–15 ([2])	hlinitopísčitá
6	> 7,0	< 0,5–1,0 ([2]) ([3])	40–65	jílovitohlinitá/jíl
7	< 4,5	> 10	< 10	písek/hlinitopísčitá

([1]) Podle FAO a amerického systému (85).
([2]) Příslušné hodnoty parametrů by měly přednostně ležet v uvedeném rozmezí. Vyskytnouli se však při hledání vhodného půdního materiálu obtíže, jsou přijatelné i hodnoty ležící pod uvedeným minimem.
([3]) U půd s obsahem organického uhlíku nižším než 0,3 % může být porušena korelace mezi obsahem organických látek a adsorpcí. Doporučuje se tedy používat půdy s minimálním obsahem organického uhlíku 0,3 %.

1.7.3. **Sběr a uchovávání půdních vzorků**

1.7.3.1. *Sběr*

Není doporučena žádná specifická technika odběru vzorků; technika odběru závisí na účelu studie (53, 54, 55, 56, 57, 58).

Je třeba zvážit tyto hlediska:

a) informace o historii lokality jsou nezbytné; zahrnují informace o lokalitě, vegetaci, použití pesticidů nebo hnojiv, o biologických nánosech nebo náhodné kontaminaci. Pokud jde o popis místa odběru, měla by být dodržena doporučení normy ISO o vzorkování půd (ISO 10381-6);

b) místo odběru musí být definováno souřadnicemi UTM (Universal Transversal Mercator-Projection/European Horizontal Datum) nebo zeměpisnými souřadnicemi; to by mohlo umožnit opakovaný odběr dané půdy v budoucnu nebo pomoci při určení půdy podle různých klasifikačních systémů používaných v různých zemích. Kromě toho by měl být vzorkován pouze horizont A do maximální hloubky 20 cm. Zvláště je-li u půdního druhu č. 7 součástí půdy horizont O_h, měl by být zahrnut do vzorkování.

Půdní vzorky by měly být přepravovány v kontejnerech a za teploty, jež zaručí, že nedojde k výrazné změně původních charakteristik půdy.

▼B

1.7.3.2. *Uchovávání*

Upřednostňuje se použití čerstvě odebraných půd. Pouze není-li to možné, mohou být půdy uchovávány při teplotě okolí a suzšeny na vzduchu. Pro dobu uchovávání neexistuje žádný doporučený limit, ale půdy uchovávané déle než tři roky by měly být před použitím znovu analyzovány na obsah organického uhlíku, pH a CEC (kationtovou výměnnou kapacitu).

1.7.3.3. *Zpracování půdních vzorků a jejich příprava ke zkoušce*

Půdy se vysuší na vzduchu při teplotě okolí (přednostně při 20–25 °C). Rozrušení půd se provede minimální silou, aby se původní struktura půdy změnila co nejméně. Půdy se prosejí na sítu, aby se získaly částice o velikosti ≤ 2 mm; při prosévání by měla být dodržována doporučení normy ISO o vzorkování půdy (ISO 10381-6). Doporučuje se opatrná homogenizace, neboť tím se zvyšuje reprodukovatelnost výsledků. Vlhkost každé půdy se stanoví v třech alikvotech zahříváním při 105 °C, dokud se významně mění hmotnost (přibližně 12 hodin). Ve všech výpočtech se hmotností půdy rozumí hmotnost po sušení v sušárně, tj. hmotnost půdy korigovaná na obsah vlhkosti.

1.7.4. **Příprava zkoušené látky pro aplikaci na půdu**

Zkoušená látka se rozpustí v 0,01 M roztoku $CaCl_2$ v destilované nebo deionizované vodě; roztok $CaCl_2$ se použije jako vodná rozpouštědlová fáze, aby se zlepšila centrifugace a minimalizovala kationtová výměna. Koncentrace zásobního roztoku by měla být přednostně o tři řády vyšší než mez stanovitelnosti použité analytické metody. Tento práh zabezpečuje přesnost měření s ohledem na metodiku použitou při tomto postupu; kromě toho by měla být koncentrace zásobního roztoku nižší než rozpustnost zkoušené látky ve vodě.

Zásobní roztok by se měl připravovat nejlépe těsně před aplikací na půdní vzorky a uchovávat uzavřený v temnu při 4 °C. Doba uchovávání závisí na stálosti zkoušené látky a na její koncentraci v roztoku.

Pouze u špatně rozpustných látek ($S_v < 10^{-4}$ g/l) může být nezbytné použití solubilizačního činidla, je-li obtížné zkoušenou látku rozpustit. Solubilizační činidlo: a) by mělo být mísitelné s vodou, např. methanol nebo acetonitril, b) jeho koncentrace by neměla překročit 1 % celkového objemu zásobního roztoku a jeho podíl by měl být nižší v roztoku zkoušené látky přicházejícím do kontaktu s půdou (přednostně v koncentraci nižší než 0,1 %) a c) nemělo by být povrchově aktivní a nemělo by podléhat solvolytickým reakcím se zkoušenou chemickou látkou. Použití solubilizačního činidla by mělo být uvedeno a odůvodněno při uvádění údajů.

Jinou možností u špatně rozpustných látek je jejich vmíchání do systému: zkoušená látka se rozpustí v organickém rozpouštědle a alikvot se přidá ke směsi půdy a 0,01 M roztoku $CaCl_2$ v destilované nebo deionizované vodě. Obsah organického rozpouštědla ve vodné fázi by měl být co nejnižší a obvykle by neměl překročit 0,1 %. Nedostatkem vmíchání v organickém rozpouštědle je nereprodukovatelnost objemu. To může znamenat vnesení další chyby, neboť koncentrace zkoušené látky a kosolventu nebývají ve všech zkouškách stejné.

▼B

1.8. PŘEDPOKLADY PRO PROVEDENÍ ADSORPČNÍ/DESORPČNÍ ZKOUŠKY

1.8.1. **Analytická metoda**

Klíčovými parametry, které mohou mít vliv na správnost měření sorpce, jsou správnost metody analýzy jak roztoku, tak adsorbované fáze, stálost a čistota zkoušené látky, dosažení sorpční rovnováhy, velikost změny koncentrace roztoku, poměr půda/roztok a změny v půdní struktuře během ustavování rovnováhy (35, 59–62). Některé příklady týkající se problematiky správnosti jsou uvedeny v dodatku 2.

Spolehlivost použité analytické metody musí být ověřována v rozmezí koncentrací, které se mohou vyskytnout v průběhu zkoušky. Je na experimentátorovi, aby vyvinul vhodnou metodu s náležitou správností, přesností, reprodukovatelností, mezí stanovitelnosti a výtěžkem. Návodem k provedení takové zkoušky je níže uvedený experiment.

Vhodný objem 0,01 M $CaCl_2$, např. 100 cm^3, se protřepává 4 hodiny např. s 20 g půdy o vysoké adsorpční schopnosti, tj. s vysokým obsahem organického uhlíku a jílu; tato hmotnost a objem se mohou měnit podle požadavků analýzy, avšak poměr půda/roztok 1:5 je vhodnou výchozí hodnotou. Směs se odstředí a vodná fáze se může zfiltrovat. K vodné fázi se přidá určitý objem zásobního roztoku zkoušené látky, aby bylo dosaženo nominální hodnoty v koncentračním rozsahu, který se může vyskytnou v průběhu zkoušky. Tento objem by neměl překročit 10 % konečného objemu vodné fáze, aby byl charakter roztoku před ustavením rovnováhy změněn co nejméně. Roztok se analyzuje.

Založí se jeden slepý pokus s půdou a roztokem $CaCl_2$ (bez zkoušené látky) a podrobí se kontrole, pokud jde o nahodilé chyby analytické metody a vlivy matrice způsobené půdou.

Mezi analytické metody, které mohou být použity k sorpčním měřením, patří plynová chromatografie s kapalnou stacionární fází, (GLC), vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC), spektrometrie (např. GC/hmotová spektrometrie, HPLC/hmotová spektrometrie) a počítání scintilací v roztoku (pro isotopově značené látky). Bez ohledu na použitou analytickou metodu se za přiměřené považují výtěžky od 90 % do 110 % nominální hodnoty. Má-li se provést detekce a vyhodnocení poté, co došlo k rozdělení, musí být meze stanovitelnosti analytické metody alespoň o dva řády nižší než nominální koncentrace.

Charakteristiky a meze stanovitelnosti analytické metody použitelné pro provedení studií adsorpce hrají významnou roli při určení zkušebních podmínek a při celém experimentálním provedení zkoušky. Tato metoda sleduje obecný experimentální postup a obsahuje doporučení a pokyny pro alternativní řešení, pokud analytická metoda a laboratorní vybavení přinášejí omezení.

▼B

1.8.2. **Výběr optimálních poměrů půda/roztok**

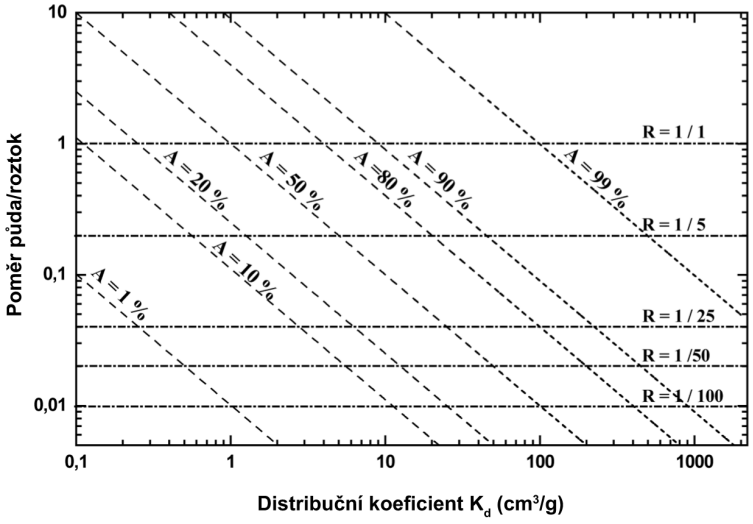
Výběr vhodných poměrů půda/roztok pro sorpční studie závisí na distribučním koeficientu K_d a na požadovaném relativním stupni adsorpce. Změna koncentrace látky v roztoku je určující pro statistickou správnost měření v důsledku formy adsorpční rovnice a omezení analytické metodiky při stanovování koncentrace chemické látky v roztoku. V obecné praxi je tedy užitečné určit několik fixních poměrů, pro něž je adsorbovaný podíl vyšší než 20 %, a přednostně > 50 % (62), a dbát na to, aby byla koncentrace zkoušené látky ve vodné fázi dostatečně vysoká pro její přesné změření. To je zvláště důležité u vysokých adsorbovaných podílů.

Vyhovující přístup k výběru vhodných poměrů půda/voda je založen na odhadu hodnoty K_d buď předběžnými studiemi, nebo zavedenými metodami odhadu (dodatek 3). Vhodný poměr lze poté vybrat na základě grafického znázornění závislosti poměru půda/roztok na K_d pro pevné hodnoty adsorpce (obrázek 1). V tomto grafickém vyjádření se předpokládá, že je adsorpční rovnice lineární ([1]). Použitelný poměr se získá upravením rovnice pro K_d (4) do tvaru rovnice (1):

$$\frac{V_0}{m_{\text{půda}}} = \left(\frac{m_0}{m_p^{ads}(eq)} - 1\right) K_d \qquad (1)$$

nebo do její logaritmické formy za předpokladu, že $R = m_{\text{půda}}/V_0$ a $A_{eq}\,\%/100 = \dfrac{m_p^{ads}(eq)}{m_0}$

$$\log R = -\log K_d + \log\left[\frac{A_{eq}\%/100}{1 - A_{eq}\%/100}\right] \qquad (2)$$



Obrázek 1 Vztah mezi poměry půda/roztok a hodnotou K_d při různých podílech adsorbované zkoušené látky

([1]) $C_s^{ads}(eq) = K_d \cdot C_{aq}^{ads}(eq)$

▼B

Na obrázku 1 jsou uvedeny požadované poměry půda/roztok jako funkce K_d pro různé úrovně adsorpce. Například při poměru půda/roztok 1:5 a při K_d 20 by došlo přibližně k 80 % adsorpci. Má-li dojít při téže hodnotě K_d k 50 % adsorpci, musí být použit poměr 1:25. Tento přístup k výběru vhodných poměrů půda/roztok umožňuje pružně vyhovět experimentálním potřebám.

Obtížněji se řeší oblasti, kde se chemická látka adsorbuje silně nebo velmi slabě. Je-li adsorpce nízká, doporučuje se poměr půda/roztok 1:1, třebaže u některých vysloveně organických druhů půdy může být k získání suspense nezbytný nižší poměr. Musí být přitom věnována péče analytické metodice měření malých změn koncentrace roztoku, jinak bude adsorpční měření nepřesné. Na druhé straně se může při velmi vysokých distribučních koeficientech $K_d$dospět až k poměru půda/roztok 1:100, má-li v roztoku zůstat významné množství chemické látky. Je však třeba dbát na dobré promíchání a musí být ponechána dostatečná doba k tomu, aby systém dosáhl rovnováhy. Jiným přístupem k řešení těchto extrémních případů, kdy chybí vhodná anylytická metodika, je předpověď hodnoty K_d za použití techniky odhadu založené například na hodnotách P_{ov} (dodatek 3). Může být užitečný zvláště u slabě adsorbovaných nebo polárních chemických látek s $P_{ov} < 20$ a u lipofilních/silně adsorbovaných chemických látek $P_{ov} > 10^4$.

1.9. PROVEDENÍ ZKOUŠKY

1.9.1. **Zkušební podmínky**

Všechny experimenty se provádějí při teplotě okolí a pokud možno při konstantní teplotě od 20 °C do 25 °C.

Podmínky odstřeďování by měly umožnit odstranit z roztoku částice větší než 0,2 μm. Tato velikost patří nejmenším částicím považovaným za pevné částice a je hranicí mezi pevnými a koloidními částicemi. Návod ke stanovení podmínek odstřeďování je uveden v dodatku 4.

Nezaručuje-li odstředivka, že částice větší než 0,2 μm, budou odstraněny, může být použita kombinace odstřeďování a filtrace přes 0,2 μm filtry. Tyto filtry musí být z vhodného inertního materiálu, aby na nich nedošlo k žádným ztrátám zkoušené látky. V každém případě by mělo být ověřeno, že při filtraci nedochází k žádným ztrátám zkoušené látky.

1.9.2. **Stupeň 1 – předběžná studie**

Účel provedení předběžné studie byl již uveden v oddíle Rozsah. Návodem pro provedení takové studie je dále navržený experiment.

1.9.2.1. *Výběr optimálních poměrů půda/roztok*

Použijí se dva půdní druhy a tři poměry půda/roztok (šest experimentů). Jeden půdní druh s vysokým obsahem organického uhlíku a nízkým obsahem jílu a druhý půdní druh s nízkým obsahem organického uhlíku a vysokým obsahem jílu. Jsou navrženy tyto poměry půda/roztok:

— 50 g půdy a 50 cm^3 vodného roztoku zkoušené látky (poměr 1/1),

▼B

— 10 g půdy a 50 cm^3 vodného roztoku zkoušené látky (poměr 1/5),

— 2 g půdy a 50 cm^3 vodného roztoku zkoušené látky (poměr 1/25).

Minimální množství půdy, se kterým lze experiment provést, závisí na laboratorním vybavení a na účinnostních charakteristikách použitých analytických metod. Doporučuje se však použít alespoň 1 g, a přednostně 2 g, aby zkouška poskytla spolehlivé výsledky.

Jeden kontrolní vzorek obsahující pouze zkoušenou látku v 0,01 M $CaCl_2$ (bez půdy) se podrobí naprosto stejnému postupu jako zkušební systémy, a to s cílem ověřit stálost zkoušené látky v roztoku $CaCl_2$ a její eventuální adsorpci na povrchu zkušebních nádob.

Se stejným množstvím půdy a celkem 50 cm^3 0,01 M $CaCl_2$ (bez zkoušené látky) se provede slepý pokus stejným postupem. Účelem je kontrola hodnot pozadí během analýzy s cílem najít rušící látky nebo rozeznat kontaminované půdy.

Všechny experimenty včetně kontrolních a slepých pokusů se provedou alespoň dvojmo. Celkový počet vzorků, které by měly být pro studii připraveny, lze vypočítat s ohledem na metodiku, podle které bude postupováno.

Metody pro předběžnou studii a hlavní studii jsou obecně stejné, případné výjimky jsou uvedeny.

Vzorky vysušené na vzduchu se den před experimentem uvedou přes noc (12 hodin) do rovnováhy protřepáváním s 45 cm^3 0,01 M $CaCl_2$. Poté se určitým objemem zásobního roztoku zkoušené látky upraví konečný objem na 50 cm^3. Tento objem přidaného zásobního roztoku: a) by neměl být vyšší než 10 % konečného objemu 50 cm^3 vodné fáze, aby byl charakter roztoku před ustavením rovnováhy změněn co nejméně; a b) měl by vést k počáteční koncentraci zkoušené látky v kontaktu s půdou (C_0) alespoň o dva řády vyšší než je mez stanovitelnosti analytické metody; tento práh zabezpečuje možnost provést přesné měření i při vysoké adsorpci (> 90 %) a později stanovit adsorpční izotermy. Doporučuje se rovněž, aby počáteční koncentrace látky (C_0) pokud možno nepřekračovala polovinu hodnoty rozpustnosti látky.

Příklad výpočtu koncentrace zásobního roztoku látky ($C_{zás}$) je uveden níže. Předpokládá se mez stanovitelnosti 0,01 μg/cm^3 a 90 % adsorpce; počáteční koncentrace zkoušené látky v kontaktu s půdou by tedy měla být přednostně 1 μg/cm^3 (o dva řády vyšší, než je mez stanovitelnosti). Za předpokladu, že bude přidán maximální doporučený objem zásobního roztoku, tj. 5 k 45 cm^3 0,01 M $CaCl_2$ pro ustavení rovnováhy, (tj. 10 % přídavek zásobního roztoku v celkovém objemu vodné fáze 50 cm^3) by měla být koncentrace zásobního roztoku 10 μg/cm; tj. o tři řády vyšší než mez stanovitelnosti analytické metody.

pH vodné fáze se měří před kontaktem s půdou a po něm, neboť hraje významnou roli v celém adsorpčním procesu, zvláště u ionizovatelných látek.

▼B

Směs se protřepává, dokud se neustaví adsorpční rovnováha. Doba nezbytná k dosažení rovnováhy v půdě silně kolísá v závislosti na chemické látce a půdě; zpravidla stačí 24 hodin (77). V předběžné studii lze vzorky odebírat postupně v průběhu 48hodinového míchání (například 4, 8, 24, 48 hodin). Čas analýzy by však měl být volen pružně s ohledem na pracovní plán laboratoře.

Existují dvě možnosti analýzy zkoušené látky ve vodném roztoku: a) paralelní metoda a b) sériová metoda. Je třeba zdůraznit, že ačkoli je paralelní metoda experimentálně pracnější, je matematické zpracování jejích výsledků jednodušší (dodatek 5). Volba metodiky, podle které se bude postupovat, se však ponechává na experimentátorovi, který bude muset zvážit dostupné laboratorní vybavení a zdroji.

a) Paralelní metoda: připraví se tolik vzorků s se stejným poměrem půda/roztok, kolik je časových intervalů, v nichž se má provést studium adsorpční kinetiky. Po centrifugaci a popřípadě po filtraci se z první zkušební nádobky odebere pokud možno úplně vodná fáze a měří se např. po 4 hodinách; vodná fáze druhé zkušební nádobky se změří po 8 hodinách, vodná z fáze třetí zkušební nádobky po 24 hodinách atd.

b) Sériová metoda: pro každý poměr půda/roztok se připraví pouze dva vzorky. V definovaných časových intervalech se směs zcentrifuguje a fáze se oddělí. Malý podíl vodné fáze se ihned analyzuje na zkoušenou látku; v experimentu se poté pokračuje s původní směsí. Následuje-li po centrifugaci filtrace, měla by mít laboratoř zařízení pro filtraci malých podílů vodné fáze. Doporučuje se, aby celkový objem odebraného podílu nepřesahoval 1 % celkového objemu roztoku, aby se významně nezměnil poměr půda/roztok a aby se během zkoušky nesnížilo množství rozpuštěné látky, které je k dispozici pro adsorpci.

Procento adsorpce A_{t_i} se pro každý čas (t_i) vypočte z nominální počáteční koncentrace a naměřené koncentrace v čase odebrání vzorku (t_i), po korekci na hodnoty slepého pokusu. Sestrojí se závislosti A_{t_i} na čase (obrázek 1 v dodatku 5), aby se určilo dosažení rovnovážného plató ([1]). Rovněž se vypočte hodnota K_d při rovnováze. Na základě této hodnoty K_d se z obrázku 1 vyberou vhodné poměry půda/roztok tak, aby adsorpce dosahovala více než 20 % a přednostně více než 50 % (61). Všechny použitelné rovnice a zásady pro sestrojování závislostí jsou uvedeny v oddíle Údaje a jejich předkládání a v dodatku 5.

1.9.2.2. *Stanovení rovnovážné adsorpční doby a množství zkoušené látky adsorbované při rovnováze*

Jak již bylo uvedeno, závislosti A_{t_i} nebo C_{aq}^{ads} na čase umožňují odhadnout určit dosažení adsorpční rovnováhy a množství zkoušené látky adsorbované při rovnováze. Příklady těchto závislostí jsou na obrázcích 1 a 2 v dodatku 5. Rovnovážná doba je doba nezbytná k tomu, aby bylo v systému dosaženo plató.

([1]) Závislosti koncentrace zkušební látky ve vodné fázi C_{aq}^{ads} na čase by mohly být rovněž použity k určení dosažení rovnovážného plató (viz obrázek 2 v dodatku 5).

▼B

Nevyskytuje-li se u určité půdy plató, nýbrž je pozorován stálý nárůst, může to být způsobeno komplikujícími faktory, jako jsou biologický rozklad a pomalá difuse. Biologický rozklad lze prokázat opakováním experimentu se sterilizovaným vzorkem půdy. Není-li ani v tomto případě dosaženo plató, měl by experimentátor pátrat po jiných jevech, ke kterým by mohlo při studiích docházet; může tak učinit vhodnou změnou experimentálních podmínek (teploty, doby protřepávání, poměrů půda/roztok). Ponechává se na rozhodnutí experimentátora, zda bude pokračovat ve zkušebním postupu i přesto, že rovnováhy případně nebude dosaženo.

1.9.2.3. *Adsorpce na stěnách zkušební nádobky a stálost zkoušené látky*

Některé informace o adsorpci zkoušené látky na povrchu zkušební nádobky a rovněž o stálosti zkoušené látky lze odvodit z analýzy kontrolních vzorků. Pozoruje-li se úbytek větší, než odpovídá obvyklé chybě analytické metody, může docházet k abiotickému rozkladu a/nebo adsorpci na povrchu zkušební nádobky. Tyto dva jevy lze rozlišit důkladným omytím stěn nádobky známým objemem vhodného rozpouštědla a analýzou výplachu na zkoušenou látku. Není-li zjištěna adsorpce na povrchu zkušební nádobky, ukazuje úbytek na abiotickou nestálost zkoušené látky. Je-li zjištěna adsorpce, je nezbytné změnit materiál zkušebních nádobek. Údaje o adsorpci na povrchu zkušebních nádobek získaná v tomto experimentu však nelze přímo extrapolovat na experimenty půdou a roztoky. Přítomnost půdy bude mít na tuto adsorpci vliv.

Další informace o stálosti zkoušené látky lze odvodit z hmotnostní bilance výchozí látky provedené v průběhu času. To znamená, že se na zkoušenou látku analyzují vodná fáze, extrakty půdy a stěny zkušební nádobky. Rozdíl mezi hmotností přidané zkoušené látky a součtem hmotností zkoušené látky ve vodné fázi, v extraktech půdy a na povrchu zkušební nádobky je roven hmotnosti, které se rozložila, vytěkala nebo se neextrahovala. Má-li být provedena hmotnostní bilance, mělo by být v době experimentu dosaženo adsorpční rovnováhy.

Hmotnostní bilance se provede u obou druhů půd a pro jeden poměr půda/roztok u každé půdy, u něhož je úbytek při rovnováze větší než 20 % a nejlépe větší něž 50 %. Je-li experiment ukončen analýzou posledního vzorku po 48 hodinách, fáze se oddělí centrifugací a popřípadně i filtrací. Oddělí se pokud možno veškerá vodná fáze a k půdě se přidá vhodné extrakční rozpouštědlo (extrakční koeficient alespoň 95 %) pro extrakci zkoušené látky. Doporučují se alespoň dvě extrakce za sebou. Stanoví se množství zkoušené látky v půdě a v extraktech ze zkušební nádobky a vypočítá se hmotnostní bilance (rovnice 10, Údaje a jejich předkládání). Je-li nižší než 90 %, považuje se zkoušená látka za nestálou v časovém měřítku zkoušky. Studie však může pokračovat, zohlední-li se nestálost zkoušené látky; v takovém případě se doporučuje, aby byly v hlavní studii analyzovány obě fáze.

▼B

1.9.2.4. *Stupeň 2 – adsorpční kinetika při jedné koncentraci zkoušené látky*

Použije se pět druhů půd vybraných z tabulky 1. Je výhodné zahrnout přitom některé nebo všechny půdy z předběžné studie. V tomto případě nemusí být stupeň 2 opakován pro půdy použité v předběžné studii.

Rovnovážná doba, poměr půda/roztok, hmotnost půdního vzorku, objem vodné fáze v kontaktu s půdou a koncentrace zkoušené látky v roztoku se volí na základě výsledků předběžné studie. Analýzy se provádějí přednostně po 2, 4, 6, 8 (eventuálně také po 10) a 24 hodinách kontaktu s půdou; protřepávání může být prodlouženo maximálně na 48 hodin u chemických látek, u nichž je pro dosažení rovnováhy podle výsledků předběžných studií nezbytný delší čas. Doby lze však volit pružně.

Každý experiment (s jednou půdou a s jedním roztokem) se provede alespoň dvakrát, aby bylo možné odhadnout rozptyl výsledků. S každým experimentem se provede jeden slepý pokus. Provede se s půdou a s 0,01 M roztokem $CaCl_2$ bez zkoušené látky a se stejnou hmotností a objemem jako v experimentu. Stejnému zkušebnímu postupu se podrobí kontrolní vzorek zkoušené látky v 0,01 M roztoku $CaCl_2$ (bez půdy), který slouží jako pojistka proti nečekaným výsledkům.

Procento absorpce se vypočte pro každý čas A_{t_i} a pro každý interval $A_{\Delta t_i}$ (podle potřeby) a vynese se proti času. Rovněž se vypočtou distribuční koeficient K_d při rovnováze a adsorpční koeficient normalizovaný na obsah organického uhlíku K_{ou} (pro nepolární organické chemické látky).

Výsledky zkoušky adsorpční kinetiky

Lineární model K_d vyjadřující vlastní pohyblivost chemických látek v půdě je obecně dostatečně přesný (35, 78). Například chemické látky s $K_d \leq 1\ cm^3/g$ jsou obecně považovány za kvalitativně mobilní. Podobně bylo MacCallem et al. (16) vyvinuto klasifikační schéma mobility založené na hodnotách K_{ou}. Kromě toho existují klasifikační schémata vymývatelnosti založená na vztahu mezi K_{ou} a DT-50 ([1]) (32, 79).

Podle analýzy chyb (61) nelze z poklesu koncentrace ve vodné fázi přesně určit hodnoty K_d nižší než $0,3\ cm^3/g$, a to ani při nejpříznivějším (z hlediska správnosti) poměru půda/roztok, tj. při poměru 1:1. V takovém případě se doporučuje analýza obou fází – půdy i roztoku.

([1]) DT-50: doba rozkladu 50 % zkoušené látky.

▼B

S ohledem na výše uvedené poznámky se doporučuje pokračovat ve studii adsorpčního chování chemické látky v půdě a její případné mobility stanovením Freundlichových adsorpčních isotherm pro tyto systémy, u nichž je přesné stanovení K_d možné provést způsobem, kterým se postupuje v této zkušební metodě. Přesné stanovení je možné, je-li součin hodnoty K_d a poměru půda/roztok > 0,3 při měření založeném na poklesu koncentrace ve vodné fázi (nepřímá metoda), nebo je-li součin > 0,1 při analýze obou fází (přímá metoda) (61).

1.9.2.5. *Stupeň 3 – adsorpční isothermy a desorpční kinetika/desorpční isothermy*

1.9.2.5.1. Adsorpční isothermy

Použije se pět koncentrací zkoušené látky, přednostně v rozsahu dvou řádů; při volbě koncentrací se zohlední rozpustnost ve vodě a výsledná rovnovážná koncentrace ve vodné fázi. Při studii se u každé půdy použije tentýž poměr půda/roztok. Adsorpční zkouška se provede výše uvedenou metodou pouze s tím rozdílem, že se vodná fáze analyzuje pouze jednou po uplynutí doby, která je nezbytná pro dosažení rovnováhy a která byla stanovena dříve ve stupni 2. Stanoví se rovnovážné koncentrace v roztoku a adsorbované množství se vypočte z úbytku zkoušené látky v roztoku nebo přímou metodou. Adsorbovaná hmotnost na jednotku hmotnosti půdy se vynese jako funkce rovnovážné koncentrace zkoušené látky (viz oddíl Údaje a jejich předkládání)

Výsledky experimentu pro stanovení adsorpčních isotherm

Z dosud navržených matematických modelů adsorpčních isotherm se k popisu adsorpčních procesů používá Freundlichova isotherma nejčastěji. Podrobnější informace o interpretaci a významu adsorpčních modelů jsou uvedeny v literatuře (41, 45, 80, 81, 82).

Poznámka: Je třeba poznamenat, že hodnoty K_F (Freundlichovy adsorpční koeficienty) lze pro různé látky porovnávat pouze tehdy, jsou-li tyto hodnoty vyjádřeny ve stejných jednotkách (83).

1.9.2.5.2. Desorpční kinetika

Účelem tohoto experimentu je vyšetřit, zda je chemická látka adsorbována v půdě vratně nebo nevratně. Tato informace je důležitá, neboť desorpční proces hraje také důležitou roli v chování chemické látky v půdě. Desorpční údaje jsou kromě toho užitečným vstupem pro počítačové modelování vyluhování a pro simulaci vyplavování rozpuštěných látek. Je-li studie desorpce žádoucí, doporučuje se, aby byla níže popsaná studie provedena na každém systému, na kterém bylo v předchozí studii adsorpční kinetiky možné provést přesné stanovení K_d.

Podobně jako u studie adsorpční kinetiky existují dvě volby, jak postupovat při studium desorpční kinetiky: a) paralelní metoda a b) sériová metoda. Volba metodiky, podle které se bude postupovat, se ponechává na experimentátorovi, který bude muset zvážit laboratorní vybavení a zdroje, které jsou k dispozici.

▼B

a) Paralelní metoda: pro každou půdu zahrnutou do studie desorpce se připraví tolik vzorků se stejným poměrem půda/roztok, kolik bude časových intervalů, v nichž se má studovat desorpční kinetika. Zvolí se přednostně stejné časové intervaly jako v experimentu při studium adsorpční kinetiky; celkový čas se však může prodloužit podle potřeby, aby bylo v systému dosaženo desorpční rovnováhy. S každým experimentem (s jednou půdou a s jedním roztokem) se provede slepý pokus s půdou a s 0,01 M roztokem $CaCl_2$ bez zkoušené látky a se stejnou hmotností a objemem jako v experimentu. Stejnému zkušebnímu postupu se podrobí kontrolní vzorek zkoušené látky v 0,01 M roztoku $CaCl_2$ (bez půdy). Všechny směsi půdy s roztokem se protřepávají do ustavení adsorpční rovnováhy (jak byla určena dříve ve stupni 2). Poté se fáze oddělí centrifugací a vodná fáze se co nejúplněji odebere. Objem odebraného roztoku se nahradí stejným objemem 0,01 M $CaCl_2$ bez zkoušené látky a nová směs se opět protřepává. Vodná fáze první zkušební nádobky se co nejúplněji odebere a změří například po 2 hodinách, vodná fáze druhé zkušební nádobky se změří po 4 hodinách, vodná fáze třetí zkušební nádobky se změří po 6 hodinách atd., až do dosažení desorpční rovnováhy.

b) Sériová metoda: po experimentu pro stanovení adsorpční kinetiky se směs zcentrifuguje a vodná fáze se co nejúplněji odebere. Objem odebraného roztoku se nahradí stejným objemem 0,01 M $CaCl_2$ bez zkoušené látky. Nová směs se protřepává až do ustavení desorpční rovnováhy. Během této doby se ve stanovených časových intervalech směs centrifuguje, aby se oddělily fáze. Malý podíl vodné fáze se ihned analyzuje na zkoušenou látku; v experimentu se poté pokračuje s původní směsí. Objem každého jednotlivého podílu by měl být menší než 1 % celkového objemu. Ke směsi se přidá stejné množství čerstvého 0,01 M roztoku $CaCl_2$, aby se zachoval poměr půda/roztok, a v protřepávání se pokračuje až do dalšího časového intervalu.

Procento desorpce se vypočte pro každý čas (D_{t_i}) a pro každý interval ($D_{\Delta t_i}$) (podle potřeb studie) a vynese se do grafu proti času. Rovněž se vypočte hodnota desorpčního koeficientu K_{des} při rovnováze. Všechny použité rovnice jsou uvedeny v oddíle Údaje a jejich předkládání a v dodatku 5.

Výsledky studia desorpční kinetiky

Společný graf závislostí procenta desorpce D_{t_i} a adsorpce A_{t_i} na čase umožní odhadnout vratnost adsorpčního procesu. Je-li desorpční rovnováhy dosaženo v čase menším než dvojnásobek doby potřebné pro dosažení adsorpční rovnováhy a je-li celková desorpce vyšší než 75 % adsorbovaného množství, považuje se adsorpce za vratnou.

1.9.2.5.3. Desorpční isothermy

Freundlichovy desorpční isothermy se určují v půdách použitých ke stanovení adsorpčních isotherm. Zkouška desorpce se provede způsobem popsaným v oddíle Desorpční kinetika, pouze s tím rozdílem, že se vodná fáze analyzuje pouze jednou, a to při desorpční rovnováze. Vypočte se množství desorbované zkoušené látky. Množství zkoušené látky, která zůstala adsorbovaná v půdě po dosažení desorpční rovnováhy se vynese do grafu jako funkce rovnovážné koncentrace zkoušené látky v roztoku (viz oddíl Údaje a jejich předkládání a dodatek 5).

▼B

2. **ÚDAJE A JEJICH PŘEDKLÁDÁNÍ**

Analytické údaje se uvedou ve formě tabulky (viz dodatek 6). Uvedou se jednotlivá měření a vypočtené průměrné hodnoty. Předloží se grafy adsorpčních isotherm. Výpočty se provedou níže uvedeným způsobem.

Pro účely zkoušky se předpokládá, že hmotnost 1 cm^3 vodného roztoku je 1 g. Poměr půda/roztok může být vyjádřen stejným číslem pro rozměr hmotnost/hmotnost i pro rozměr hmotnost/objem.

2.1. ADSORPCE

Adsorpce A_{t_i} je definována jako procentuální podíl látky z množství látky na začátku zkoušky, která se za zkušebních podmínek adsorbovala v půdě. Je-li zkoušená látka stálá a neadsorbuje se významně na stěnách nádobky, vypočte se A_{t_i} pro každý čas z rovnice:

$$A_{t_i} = \frac{m_p^{ads}(t_i) \cdot 100}{m_0} \ (\%) \qquad (3)$$

kde:

A_{t_i} = procento adsorpce v čase t_i (%);

$m_p^{ads}(t_i)$ = hmotnost zkoušené látky adsorbované v půdě v čase t_i (μg);

m_0 = hmotnost zkoušené látky v nádobce na začátku zkoušky (μg).

Podrobné informace o způsobu výpočtu procenta adsorpce A_{t_i} pro paralelní a sériovou metodu jsou uvedeny v dodatku 5.

Distribuční koeficient K_d je poměr mezi množstvím látky v půdě a hmotnostní koncentrací látky ve vodném roztoku za zkušebních podmínek a při dosažení adsorpční rovnováhy.

$$K_d = \frac{C_p^{ads}(eq)}{C_{vod}^{ads}(eq)} = \frac{m_p^{ads}(eq)}{m_{vod}^{ads}(eq)} \cdot \frac{V_0}{m_{půda}} \ (cm^3 \cdot g^{-1}) \qquad (4)$$

kde:

$C_p^{ads}(eq)$ = množství látky adsorbované v půdě při adsorpční rovnováze (μg/g),

$C_{vod}^{ads}(eq)$ = hmotnostní koncentrace látky ve vodné fázi při adsorpční rovnováze (μg/cm). Tato koncentrace se stanoví analyticky a zohlední se hodnoty ze slepých pokusů,

$m_p^{ads}(eq)$ = hmotnost zkoušené látky adsorbované v půdě při adsorpční rovnováze (μg),

$m_{vod}^{ads}(eq)$ = hmotnost zkoušené látky v roztoku při adsorpční rovnováze (μg),

$m_{půda}$ = množství půdní fáze vyjádřené v suché hmotnosti půdy (g),

V_0 = počáteční objem vodné fáze v kontaktu s půdou (cm^3).

Vztah mezi A_{eq} a K_d je dán rovnicí:

$$K_d = \frac{A_{eq}}{100 - A_{eq}} \cdot \frac{V_0}{m_{půda}} \ (cm^3 \cdot g^{-1}) \qquad (5)$$

▼B

kde:

A_{eq} = procento adsorpce při adsorpční rovnováze, %.

Vztah adsorpčního koeficientu normalizovaného na obsah organického uhlíku K_{ou}, distribučního koeficientu K_d a obsahu organického uhlíku v půdním vzorku je tento:

$$K_{ou} = K_d \cdot \frac{100}{\%ou} \ (cm^3 \cdot g^{-1}) \qquad (6)$$

kde:

%ou = procentuální obsah organického uhlíku v půdním vzorku (g/g).

Koeficient K_{ou} je jedinou veličinou, která charakterizuje rozdělení hlavně anorganických nepolárních látek mezi organický uhlík v půdě nebo sediment a vodu. Adsorpce těchto chemických látek koreluje s obsahem organických látek v pevném sorbujícím materiálu (7); hodnoty K_{ou} závisí na specifických charakteristikách huminových podílů, jejichž sorpční kapacita se značně liší podle původu, vzniku atd.

2.1.1. **Adsorpční isothermy**

Rovnice Freundlichových adsorpčních isotherm vyjadřují vztah mezi množstvím adsorbované zkoušené látky a koncentrací zkoušené látky v roztoku při rovnováze (rovnice 8).

Údaje se zpracovávají jako v oddíle Adsorpce a pro každou zkušební nádobku se vypočte množství zkoušené látky adsorbované v půdě po adsorpční zkoušce ($C_p^{ads}(eq)$, jinde označeno jako x/m). Předpokládá se, že rovnováhy bylo dosaženo a že $C_p^{ads}(eq)$ představuje rovnovážnou hodnotu:

$$C_s^{ads}(eq) = \frac{m_p^{ads}(eq)}{m_{půda}} = \frac{[C_0 - C_{vod}^{ads}(eq)] \cdot V_0}{m_{půda}} \ (\mu g \cdot g^{-1}) \qquad (7)$$

Freundlichova adsorpční rovnice má tento tvar (8):

$$C_p^{ads}(eq) = K_F^{ads} \cdot C_{vod}^{ads}(eq)^{1/n} \ (\mu g \cdot g^{-1}) \qquad (8)$$

nebo v lineární formě:

$$\log C_p^{ads}(eq) = \log K_F^{ads} + 1/n \cdot \log C_{vod}^{ads}(eq) \qquad (9)$$

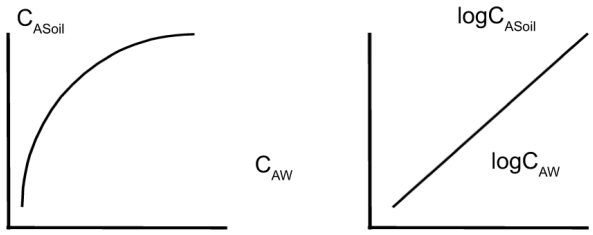
kde:

K_F^{ads} = Freundlichův adsorpční koeficient; jeho rozměr je cm^3/g pouze tehdy, je-li 1/n = 1; ve všech ostatních případech se směrnice 1/n zavádí do rozměru K_F^{ads} $(\mu g^{1-1/n} \ (cm^3)^{1/n}/g)$;

n = regresní konstanta; 1/n se zpravidla pohybuje v rozmezí od 0,7 do 1,0, což znamená, že jsou sorpční údaje často nelineární.

Rovnice (8) a (9) se znázorní graficky a hodnoty K_F^{ads} a 1/n se vypočítají regresní analýzou podle rovnice 9. Vypočte se rovněž korelační koeficient r^2 této logaritmické rovnice. Příklady takových znázornění jsou uvedeny na obrázku 2.

▼B



Obrázek 2 Freundlichovy adsorpční závislosti, normální a linearizovaná

2.1.2. **Hmotnostní bilance**

Hmotnostní bilance (MB) je definována jako procentuální podíl látky z nominálního množství látky na začátku zkoušky, který lze znovu analyticky stanovit po adsorpční zkoušce.

Zpracování údajů se bude lišit podle toho, zda je rozpouštědlo neomezeně mísitelné s vodou. U rozpouštědel mísitelných s vodou mohou být údaje ke stanovení množství látky získané extrakcí rozpouštědlem zpracována stejným způsobem jako v oddíle Desorpce. Je-li rozpouštědlo mísitelné s vodou omezeně, musí být stanoveno množství znovu získané látky.

Hmotnostní bilance pro adsorpci se vypočte takto; předpokládá se, že (m_E) se odpovídá součtu množství zkoušených látek extrahovaných organickým rozpouštědlem z půdy a z povrchu zkušební nádobky:

$$MB = \frac{(V_{rec} \cdot C_{vod}^{ads}(eq) + m_E) \cdot 100}{V_0 \cdot C_0}(\%) \qquad (10)$$

kde:

MB = hmotnostní bilance (%),

m_E = celková hmotnost zkoušené látky extrahované z půdy a ze stěn zkušební nádobky ve dvou stupních (μg),

C_0 = počáteční hmotnostní koncentrace zkušebního roztoku v kontaktu s půdou (μg/cm),

V_{rec} = objem supernatantu vyzískaný po dosažení adsorpční rovnováhy (cm^{-3}).

2.2. DESORPCE

Desorpce (D) je definována jako procentuální podíl z dříve adsorbovaného množství zkoušené látky, který se za zkušebních podmínek desorbuje:

$$D_{t_i} = \frac{m_{vod}^{des}(t_i)}{m_p^{ads}(eq)} \cdot 100(\%) \qquad (11)$$

kde:

D_{t_i} = procento desorpce v čase t_i (%),

▼B

$m_{vod}^{des}(t_i)$ = hmotnost zkoušené látky desorbované z půdy v čase t_i (μg),

$m_{půda}^{ads}(eq)$ = hmotnost zkoušené látky adsorbované v půdě při adsorpční rovnováze (μg).

Podrobné informace o způsobu výpočtu procenta adsorpce $D_{t'}$ pro paralelní a sériovou metodu jsou uvedeny v dodatku 5.

Zdánlivý desorpční koeficient (K_{des}) je za zkušebních podmínek poměr mezi množstvím zkoušené látky, která zůstala v půdě, a hmotnostní koncentrací desorbované látky ve vodném roztoku po dosažení desorpční rovnováhy:

$$K_{des} = \frac{m_p^{ads}(eq) - m_{vod}^{des}(eq)}{m_{vod}^{des}(eq)} \frac{V_T}{m_{půda}} (cm^3 \cdot g^{-1}) \quad (12)$$

kde:

K_{des} = desorpční koeficient (cm^3/g),

$m_{vod}^{des}(eq)$ = celková hmotnost zkoušené látky desorbované z půdy při desorpční rovnováze (μg),

V_T = celkový objem vodné fáze v kontaktu s půdou během zkoušky desorpční kinetiky (cm^3).

Návod pro výpočet hodnoty $m_{vod}^{des}(eq)$ je uveden v dodatku 5 v oddíle Desorpce.

Poznámka:

Provede-li se předcházející adsorpční zkouška paralelní metodou, je objem V_T v rovnici 12 roven V_0.

2.2.1. **Desorpční isothermy**

Freundlichovy desorpční isothermy vyjadřují vztah mezi množstvím zkoušené látky, která zůstala adsorbovaná v půdě a koncentrací zkoušené látky v roztoku při desorpční rovnováze (rovnice 16).

Pro každou zkušební nádobku se množství zkoušené látky, které zůstalo při desorpční rovnováze adsorbované v půdě, vypočte takto:

$$C_p^{des}(eq) = \frac{m_p^{ads}(eq) - m_{vod}^{des}(eq)}{m_{půda}} (\mu g \cdot g^{-1}) \quad (13)$$

$m_{vod}^{des}(eq)$ je definována takto:

$$m_{vod}^{des}(eq) = m_m^{des}(eq) \cdot \frac{V_0}{V_r^F} - m_{vod}^{A}(\mu g) \quad (14)$$

kde:

$C_p^{des}(eq)$ = množství zkoušené látky, která zůstala adsorbovaná v půdě při desorpční rovnováze (μg/g),

$m_m^{des}(eq)$ = analyticky stanovená hmotnost látky ve vodné fázi při desorpční rovnováze (μg),

▼B

m^{A}_{vod} = hmotnost látky zbylé z adsorpční rovnováhy v důsledku neúplné výměny objemu vodné fáze (μg),

$m^{des}_{vod}(eq)$ = hmotnost zkoušené látky v roztoku při adsorpční rovnováze (μg);

$$m^{A}_{vod} = m^{ads}_{vod}(eq) \cdot \left(\frac{V_0 - V_R}{V_0}\right) \quad (15)$$

V^{F}_{r} = objem roztoku odebraného ze zkušební nádobky ke stanovení zkušební látky při desorpční rovnováze (cm^3),

V_R = objem supernatantu odebraného ze zkušební nádobky po dosažení adsorpční rovnováhy a nahrazeného stejným objemem 0,01 M roztoku $CaCl_2$ (cm^3).

Freundlichova desorpční rovnice je (16):

$$C^{des}_{p}(eq) = K^{des}_{F} \cdot C^{des}_{vod}(eq)^{1/n} (\mu g \cdot g^{-1}) \quad (16)$$

nebo v lineární formě:

$$\log C^{des}_{p}(eq) = \log K^{des}_{F} + 1/n \cdot \log C^{des}_{vod}(eq) \quad (17)$$

kde:

K^{des}_{F} = Freundlichův desorpční koeficient,

n = regresní konstanta,

$C^{des}_{vod}(eq)$ = hmotnostní koncentrace látky ve vodné fázi při desorpční rovnováze (μg/cm).

Rovnice 16 a 17 se znázorní graficky a hodnoty K^{des}_{F} a 1/n se vypočítají regresní analýzou z rovnice 17.

Poznámka:

Je-li Freundlichův adsorpční nebo desorpční exponent 1/n roven 1, bude Freundlichova adsorpční nebo desorpční konstanta (K^{ads}_{F} a K^{des}_{F}) rovna adsorpční resp. desorpční rovnovážné konstantě (K_d a K_{des}) a závislosti C_p na C_{vod} budou lineární. Nejsou-li exponenty rovny 1, závislosti C_p na C_{vod} budou nelineární a adsorpční a desorpční konstanty se budou podél isotherm lišit.

2.2.2. **Protokol o zkoušce**

Protokol o zkoušce by měl obsahovat tyto informace:

— úplná identifikace použitých půdních vzorků včetně:

— zeměpisných parametrů lokality (zeměpisné šířky, zeměpisné délky),

— údaje odběru vzorku,

▼B

— využití půdy (např. zemědělská půda, lesní půda atd.),

— hloubky odběru vzorků,

— obsahu písku/prachových částic/jílu,

— pH (v 0,01 M $CaCl_2$),

— obsahu organického uhlíku,

— obsahu organického materiálu,

— obsahu dusíku,

— poměru C/N,

— kationtové výměnné kapacity (mmol/kg),

— všech informací týkajících se sběru a uchovávání vzorků,

— všech významných informací pro interpretaci adsorpce/desorpce zkoušené látky,

— odkazu na metody reference použité pro stanovení jednotlivých parametrů,

— podle potřeby informace o zkoušené látce,

— teplota při experimentu,

— podmínky centrifugace,

— analytický postup použitý při analýze zkoušené látky,

— odůvodnění jakéhokoli použití solubilizačního činidla při přípravě zásobního roztoku zkoušené látky,

— vysvětlení korekcí provedených ve výpočtech, je-li to důležité,

— údaje podle formuláře (dodatek 6) a grafická znázornění,

— všechny informace a pozorování užitečné pro interpretaci výsledků zkoušky.

3. **LITERATURA**

1) Kukowski H. and Brümmer G., (1987). Investigations on the Adsorption and Desorption of Selected Chemicals in Soils. UBA Report 106 02045, Part II.

2) Fränzle O., Kuhnt G. and Vetter L., (1987). Selection of Representative Soils in the EC-Territory. UBA Report 106 02045, Part I.

3) Kuhnt G. and Muntau H. (Eds.) EURO-Soils: Identification, Collection, Treatment, Characterisation. Special Publication no. 1.94.60, Joint Research Centre. European Commission, ISPRA, December 1994.

4) OECD Test Guidelines Programme, Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments, Belgirate, Italy, 18–20 January 1995 (June 1995).

5) US-Environment Protection Agency: Pesticide Assessment Guidelines, Subdivision N, Chemistry: Environmental Fate, Series 163-1, Leaching and Adsorption/Desorption Studies, Addendum 6 on Data Reporting, 540/09-88-096, Date: 1/1988.

▼B

6) US-Environment Protection Agency: Prevention, Pesticides and Toxic Substances, OPPTS Harmonized Test Guidelines, Series 835-Fate, Transport and Transformation Test Guidelines, 0PPTS No: 835.1220 Sediment and Soil Adsorption/Desorption Isotherm. EPA No: 712-C-96-048, April 1996.

7) ASTM Standards, E 1195-85, Standard Test Method for Determining a Sorption Constant (K_{oc}) for an Organic Chemical in Soil and Sediments.

8) Agriculture Canada: Environmental Chemistry and Fate. Guidelines for registration of pesticides in Canada, 15 July 1987.

9) Netherlands Commission Registration Pesticides (1995): Application for registration of a pesticide. Section G. Behaviour of the product and its metabolites in soil, water and air.

10) Danish National Agency of Environmental Protection (October 1988): Criteria for registration of pesticides as especially dangerous to health or especially harmful to the environment.

11) BBA (1990), Guidelines for the Official Testing of Plant Protection Products, Biological Research Centre for Agriculture and Forestry, Braunschweig, Germany.

12) Calvet R., (1989), „Evaluation of adsorption coefficients and the prediction of the mobilities of pesticides in soils“, in Methodological Aspects of the Study of Pesticide Behaviour in Soil (ed. P. Jamet), INRA, Paris, (Review).

13) Calvet R., (1980) „Adsorption-Desorption Phenomena“ in Interactions between herbicides and the soil. (R.J. Hance ed.), Academic Press, London, str. 83–122.

14) Hasset J.J., and Banwart W.L., (1989), „The sorption of nonpolar organics by soils and sediments“ in Reactions and Movement of Organic Chemicals in Soils. Soil Science Society of America (S.S.S.A), Special Publication no. 22, str. 31–44.

15) van Genuchten M. Th., Davidson J.M., and Wierenga P.J., (1974), „An evaluation of kinetic and equilibrium equations for the prediction of pesticide movement through porous media“. Soil Sci. Soc. Am. Proc., Vol. 38(1), 29–35.

16) McCall P.J., Laskowski D.A., Swann R.L., and Dishburger H.J., (1981), „Measurement of sorption coefficients of organic chemicals and their use, in environmental fate analysis“, in Test Protocols for Environmental Fate and Movement of Toxicants. Proceedings of AOAC Symposium, AOAC, Washington DC.

17) Lambert S.M., Porter P.E., and Schieferrstein R.H., (1965), „Movement and sorption of chemicals applied to the soil“. Weeds, 13, 185–190.

18) Rhodes R.C., Belasco I.J., and Pease H.L., (1970) „Determination of mobility and adsorption of agrochemicals in soils“. J.Agric.Food Chem., 18, 524–528.

19) Russell M.H., (1995), „Recommended approaches to assess pesticide mobility in soil“ in Environmental Behavior of Agrochemicals (ed. T.R. Roberts and P.C. Kearney). John Wiley & Sons Ltd.

20) Esser H.O., Hemingway R.J., Klein W., Sharp D.B., Vonk J.W. and Holland P.T., (1988), „Recommended approach to the evaluation of the environmental behavior of pesticides“, IUPAC Reports on Pesticides (24). Pure Appl. Chem., 60, 901–932.

▼B

21) Guth J.A., Burkhard N., and D.O. Eberle, (1976), „Experimental models for studying the persistence of pesticides in soils“. Proc. BCPC Symposium: Persistence of Insecticides and Herbicides, str. 137-157, BCPC, Surrey, UK.

22) Furminge C.G.L., and Osgerby J.M., (1967), „Persistence of herbicides in soil“. J. Sci. Fd Agric., 18, 269–273.

23) Burkhard N., and Guth J.A., (1981), „Chemical hydrolysis of 2-Chloro-4,6-bis(alkylamino)-1,3,5-triazine herbicides and their breakdown in soil under the influence of adsorption“. Pestic. Sci. 12, 45–52.

24) Guth J.A., Gerber H.R., and Schlaepfer T., (1977). „Effect of adsorption, movement and persistence on the biological availability of soil-applied pesticides“. Proc. Br. Crop Prot. Conf., 3, 961–971.

25) Osgerby J.M., (1973), „Process affecting herbicide action in soil“. Pestic. Sci., 4, 247–258.

26) Guth J.A., (1972), „Adsorptions- und Einwascheverhalten von Pflanzenschutzmitteln in Böden“. Schr. Reihe Ver. Wass. -Boden-Lufthyg. Berlin-Dahlem, Heft 37, 143–154.

27) Hamaker J.W., (1975), „The interpretation of soil leaching experiments“, in Environmental Dynamics of Pesticides (eds R. Haque and V.H. freed), str. 135-172, Plenum Press, NY.

28) Helling C.S., (1971), „Pesticide mobility in soils“. Soil Sci. Soc. Amer. Proc., 35, 732–210.

29) Hamaker J.W., (1972), „Diffusion and volatilization“ in Organic chemicals in the soil environment (C.A.I. Goring and J.W. Hamaker eds), Vol. I, 49–143.

30) Burkhard N. and Guth J.A., (1981), „Rate of volatilisation of pesticides from soil surfaces; Comparison of calculated results with those determined in a laboratory model system“. Pestic. Sci. 12, 37–44.

31) Cohen S.Z., Creeger S.M., Carsel R.F., and Enfield C.G., (1984), „Potential pesticide contamination of groundwater from agricultural uses“, in Treatment and Disposal of Pesticide Wastes, str. 297–325, Acs Symp. Ser. 259, American Chemical Society, Washington, DC.

32) Gustafson D.I., (1989), „Groundwater ubiquity score: a simple method for assessing pesticide leachability“. J. Environ. Toxic. Chem., 8(4), 339–357.

33) Leistra M., and Dekkers W.A., (1976). „Computed effects of adsorption kinetics on pesticide movement in soils“. J. of Soil Sci., 28, 340–350.

34) Bromilov R.H., and Leistra M., (1980), „Measured and simulated behavior of aldicarb and its oxydation products in fallow soils“. Pest. Sci., 11, 389–395.

35) Green R.E., and Karickoff S.W., (1990), „Sorption estimates for modeling“, in Pesticides in the Soil Environment: Process, Impacts and Modeling (ed. H.H. Cheng). Soil Sci. Soc. Am., Book Series no. 2, str. 80–101,

36) Lambert S.M., (1967), „Functional relationship between sorption in soil and chemical structure“. J. Agri. Food Chem., 15, 572–576.

▼B

37) Hance R.J., (1969), „An empirical relationship between chemical structure and the sorption of some herbicides by soils“. J. Agri. Food Chem., 17, 667–668.

38) Briggs G.G. (1969), „Molecular structure of herbicides and their sorption by soils“. Nature, 223, 1288.

39) Briggs G.G. (1981). „Theoretical and experimental relationships between soil adsorption, octanol-water partition coefficients, water solubilities, bioconcentration factors, and the parachor“. J. Agric. Food Chem., 29, 1050–1059.

40) Sabljic A., (1984), „Predictions of the nature and strength of soil sorption of organic polutance by molecular topology“. J. Agric. Food Chem., 32, 243–246.

41) Bailey G.W., and White J.L., (1970), „Factors influencing the adsorption, desorption, and movement of pesticides in soil“. Residue Rev., 32, 29–92.

42) Bailey G.W., J.L. White and Y. Rothberg., (1968), „Adsorption of organic herbicides by montomorillonite: Role of pH and chemical character of adsorbate“. Soil Sci. Soc. Amer. Proc. 32: 222–234.

43) Karickhoff S.W., (1981) „Semi-empirical estimation of sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments and soils“. Chemosphere 10, 833–846.

44) Paya-Perez A., Riaz M. and Larsen B., (1989), „Soil Sorption of 6 Chlorobenzenes and 20 PCB Congeners“. Environ. Toxicol. Safety 21, 1–17.

45) Hamaker J.W., and Thompson J.M., (1972). „Adsorption in organic chemicals“ in Organic Chemicals in the Soil Environment (Goring C.A.I. and Hamaker J.W., eds), Vol I and II, Marcel Dekker, Inc., New York, NY, 1972, str. 49–143.

46) Deli J., and Warren G.F., 1971, „Adsorption, desorption and leaching of diphenamid in soils“. Weed Sci. 19: 67–69.

47) Chu-Huang Wu, Buehring N., Davinson J.M. and Santelmann, (1975), „Napropamide Adsorption, desorption and Movement in soils“. Weed Science, Vol. 23, 454–457.

48) Haues M.H.B., Stacey M., and Thompson J.M., (1968) „Adsorption of s-triazine herbicides by soil organic preparations“ in Isotopes and Radiation in Soil Organic Studies, p.75, International. Atomic Energy Agency, Vienna.

49) Pionke H.B., and Deangelis R.J., (1980), „Methods for distributing pesticide loss in field run-off between the solution and adsorbed phase“, CREAMS, in A Field Scale Model for Chemicals, Run-off and Erosion from Agricultural Management Systems, Chapter 19, Vol. III: Supporting Documentation, USDA Conservation Research report.

50) ISO Standard Compendium Environment: Soil Quality – General aspects; chemical and physical methods of analysis; biological methods of analysis. First Edition (1994).

51) Scheffer F., and Schachtschabel, Lehrbuch der Bodenkunde, F. Enke Verlag, Stuttgart (1982), 11th edition.

52) Black, Evans D.D., White J.L., Ensminger L.E., and Clark F.E., eds. „Methods of Soil Analysis“, Vol 1 and 2, American Society of Agronomy, Madison, WI, 1982.

▼B

53) ISO/DIS 10381-1 Soil Quality – Sampling – Part 1: Guidance on the design of sampling programmes.

54) ISO/DIS 10381-2 Soil Quality – Sampling – Part 2: Guidance on sampling techniques.

55) ISO/DIS 10381-3 Soil Quality – Sampling – Part 3: Guidance on safety of sampling.

56) ISO/DIS 10381-4 Soil Quality – Sampling – Part 4: Guidance on the investigation of natural and cultivated soils.

57) ISO/DIS 10381-5 Soil Quality – Sampling – Part 5: Guidance on the investigation of soil contamination of urban and industrial sites.

58) ISO 10381-6, 1993: Soil Quality – Sampling – Part 6: Guidance on the collection, handling and storage of soil for the assessment of aerobic microbial processes in the laboratory.

59) Green R.E., and Yamane V.K., (1970) „Precision in pesticide adsorption measurements“. Soil Sci. Am. Proc., 34, 353–354.

60) Grover R., and Hance R.J. (1970), „Effect of ratio of soil to water on adsorption of linuron and atrazine“. Soil Sci., 109–138.

61) Boesten, J.J.T.I, „Influence of soil/liquid ratio on the experimental error of sorption coefficients in pesticide/soil system“. Pest. Sci. 1990, 30, 31–41.

62) Boesten, J.J.T.I. „Influence of soil/liquid ratio on the experimental error of sorption coefficients in relation to OECD guideline 106“ Proceedings of 5th international workshop on environmental behaviour of pesticides and regulatory aspects, Brussels, 26–29 April 1994.

63) Bastide J., Cantier J.M., et Coste C., (1980), „Comportement de substances herbicides dans le sol en fonction de leur structure chimique“. Weed Res. 21, 227–231.

64) Brown D.S., and Flagg E.W., (1981), „Empirical prediction of organic pollutants sorption in natural sediments“. J. Environ.Qual., 10(3), 382–386.

65) Chiou C.T., Porter P.E., and Schmedding D.W., (1983), „Partition equilibria of non-ionic organic compounds between soil organic matter and water“. Environ. Sci. Technol., 17(4), 227–231.

66) Gerstl Z., and Mingelgrin U., (1984), „Sorption of organic substances by soils and sediments“. J. Environm. Sci. Health, B19 (3), 297–312.

67) Vowles P.D., and Mantoura R.F.C., (1987), „Sediment-water partition coefficient and HPLC retention factors of aromatic hydrocarbons“. Chemosphere, 16(1), 109–116.

68) Lyman W.J., Reehl W.F.and Rosenblatt D.H. (1990). Handbook of Chemical Property Estimation Methods. Environmental Behaviour of Organic Compounds. American Chemical Society, Washington DC.

69) Keniga E.E., and Goring, C.A.I. (1980). „Relationship between water solubility, soil sorption, octanol-water partitioning and concentration of chemicals in the biota“ in Aquatic Toxicology (eds J.G. Eaton, et al.), str.78-115, ASTM STP 707, Philadelphia.

▼B

70) Chiou C.T., Peters L.J., and Freed V.H., (1979), „A physical concept of soil-water equilibria for non-ionic organic compounds“. Science, Vol. 206, 831–832.

71) Hassett J.J., Banwart W.I., Wood S.G., and Means J.C., (1981), „Sorption of/-Naphtol: implications concerning the limits of hydrophobic sorption“. Soil Sci. Soc. Am. J. 45, 38–42.

72) Karickhoff S.W., (1981), „Semi-empirical estimation of sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments and soils“. Chemosphere, Vol. 10(8), 833–846.

73) Moreale A., van Bladel R., (1981), „Adsorption de 13 herbicides et insecticides par le sol. Relation solubilité – reactivité. Revue de l'Agric.“, 34 (4), 319–322.

74) Müller M., Kördel W. (1996), „Comparison of screening methods for the determination/estimation of adsorption coefficients on soil“. Chemosphere, 32(12), 2493–2504.

75) Kördel W., Kotthoff G., Müller M. (1995), „HPLC – screening method for the determination of the adsorption coefficient on soil – results of a ring test“. Chemosphere 30 (7), 1373–1384.

76) Kördel W., Stutte J., Kotthoff G. (1993), „HPLC – screening method for the determination of the adsorption coefficient on soil – comparison of different stationary phases“. Chemosphere 27 (12), 2341–2352.

77) Hance, R.J., (1967), „The speed of Attainment of Sorption Equilibria in Some Systems Involving Herbicides“. Weed Research, Vol. 7, str. 29–36.

78) Koskinen W.C., and Harper S.S., (1990), „The retention processes: mechanisms“ in Pesticides in the Soil Environment: Processes, Impacts and Modelling (ed. H.H. Cheng). Soil Sci. Soc. Am. Book Series, No. 2, Madison, Wisconsin.

79) Cohen S.Z., Creeger S.M., Carsel R.F., and Enfield C.G. (1984), „Potential pesticide contamination of groundwater from agricultural uses“, in Treatment and Disposal of Pesticide Wastes, str. 297–325, ACS Symp. Ser. 259, American Chemical Society, Washington, DC.

80) Giles C.H., (1970), „Interpretation and use of sorption isotherms“ in Sorption and Transport Processes in Soils. S.C.I. Monograph No. 37, 14–32.

81) Giles, C.H.; McEwan J.H.; Nakhwa, S.N. and Smith, D, (1960), „Studies in adsorption: XI. A system of classification of solution adsorption isotherms and its use in the diagnosis of adsorption mechanisms and in measurements of pesticides surface areas of soils“. J. Chem. Soc., 3973–93.

82) Calvet R., Tercé M., and Arvien J.C., (1980), „Adsorption des pesticides par les sols et leurs constituants: 3. Caractéristiques générales de l'adsorption“. Ann. Agron. 31: 239–251.

83) Bedbur E., (1996), „Anomalies in the Freundlich equation“, Proc. COST 66 Workshop, Pesticides in soil and the environment, 13–15 May 1996, Stratford-upon-Avon, U.K.

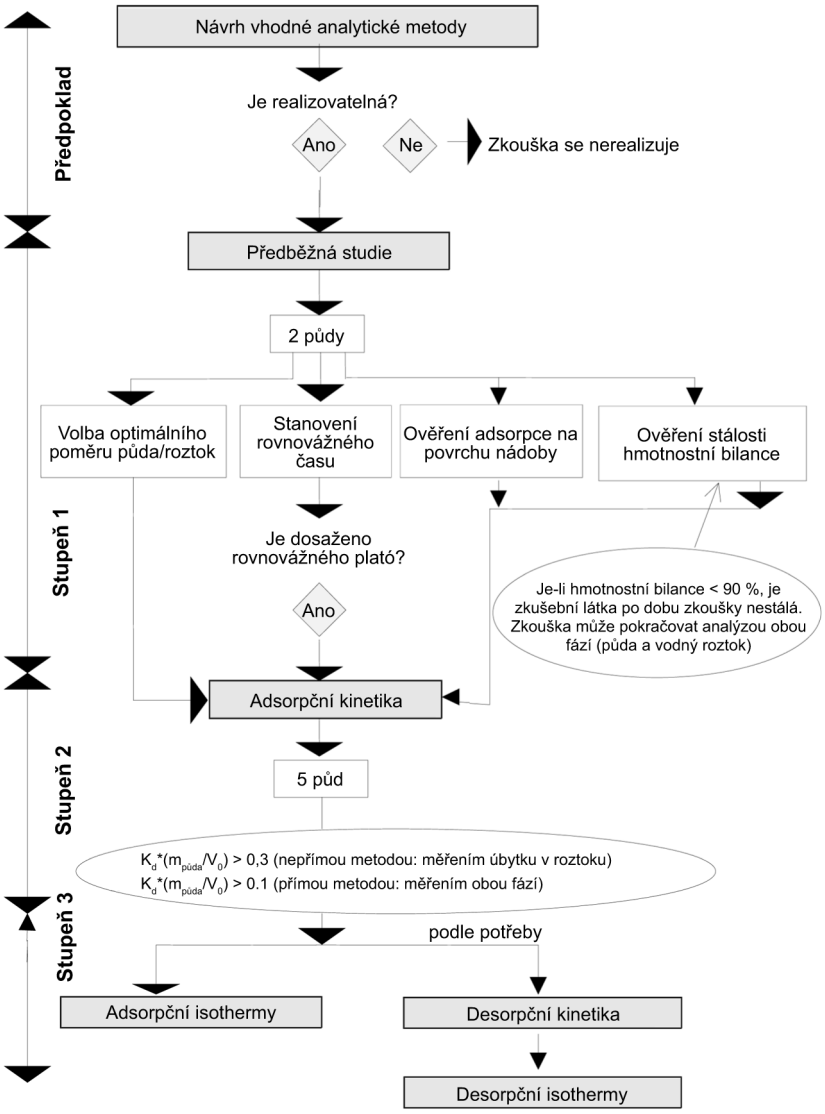
84) Guth, J.A., (1985), „Adsorption/desorption“, in Joint International Symposium, Physicochemical Properties and their Role in Environmental Hazard Assessment, July 1–3, Canterbury, UK.

85) Soil Texture Classification (US and FAO systems): Weed Science, 33, Suppl. 1 (1985) and Soil Sci. Soc. Amer. Proc. 26: 305 (1962).

▼B

DODATEK 1

Schéma zkoušky



▼B

DODATEK 2

VLIV SPRÁVNOSTI ANALYTICKÉ METODY A ZMĚNY KONCENTRACE NA SPRÁVNOST VÝSLEDKŮ ADSORPČNÍ STUDIE

Z následující tabulky (84) je zřejmé, že je-li rozdíl mezi počáteční hmotností zkoušené látky (m_0 = 110 µg) a její rovnovážnou hmotností v roztoku ($m_{aq}^{ads}(eq)$-=100 µg) velmi malý, je důsledkem 5 % chyby měření rovnovážné koncentrace 50 % chyba ve výpočtu hmotnosti zkoušené látky adsorbované v půdě ($m_p^{ads}(eq)$) a 52,4 % chyba ve výpočtu K_d.

Hmotnost půdy $m_{půda}$ = 10 g

Objem roztoku V_0 = 100 cm^3

	$m_{aq}^{ads}(eq)$ (µg)	$C_{aq}^{ads}(eq)$ (µg cm^{-3})	R	$m_s^{ads}(eq)$* (µg)	$C_s^{ads}(eq)$* (µg g^{-1})	R‡	K_d*	R‡
	PRO A = 9 %							
m_0 = 110 µg nebo C_0 = 1,100 µg/cm^3	100	1,000	skutečná hodnota	10	1,00	skutečná hodnota	1	
	101	1,010	1 %	9	0,90	10 %	0,891	10,9 %
	105	1,050	5 %	5	0,50	50 %	0,476	52,4 %
	109	1,090	9 %	1	0,10	90 %	0,092	90,8 %
	PRO A = 55 %							
m_0= 110 µg nebo C_0 = 1,100 µg/cm^3	50,0	0,500	skutečná hodnota	60,0	6,00	skutečná hodnota	12,00	
	50,5	0,505	1 %	59,5	5,95	0,8 %	11,78	1,8 %
	52,5	0,525	5 %	57,5	5,75	4,0 %	10,95	8,8 %
	55,0	0,550	10 %	55,0	5,50	8,3 %	10,00	16,7 %
	PRO A = 99 %							
m_0 = 110 µg nebo C_0 = 1,100 µg/cm^3	1,100	0,011	skutečná hodnota	108,9	10,89	skutečná hodnota	990	
	1,111	0,01111	1 %	108,889	10,8889	0,01 %	980	1,0 %
	1,155	0,01155	5 %	108,845	10,8845	0,05 %	942	4,8 %
	1,21	0,0121	10 %	108,790	10,8790	0,10 %	899	9,2 %

$$^{*}m_p^{ads}(eq) = m_0 - m_{vod}^{ads}(eq), C_p^{ads}(eq) = \frac{\left[C_0 - C_{vod}^{ads}(eq)\right]V_0}{m_{půda}},\ Kd = \frac{m_p^{ads}(eq)}{m_{vod}^{ads}(eq)}\frac{V_0}{m_{půda}}$$

$m_p^{ads}(eq)$ = hmotnost zkoušené látky v půdě při rovnováze, µg;

$m_v^{ads}(eq)$ = hmotnost zkoušené látky ve vodné fázi při rovnováze, µg;

$C_p^{ads}(eq)$ = množství zkoušené látky v půdě při rovnováze, µg g^{-1};

$C_v^{ads}(eq)$ = množství zkoušené látky ve vodné fázi při rovnováze, µg cm^{-3};

R = analytická chyba stanovení $m_{aq}^{ads}(eq)$;

R‡ = vypočtená chyba způsobená analytickou chybou R.

▼B

DODATEK 3

METODY ODHADU K_D

1. Metody odhadu umožňují předpovědět K_d na základě korelací například s hodnotami P_{ow} (12, 39, 63–68), s údaji o rozpustnosti ve vodě (12, 19, 21, 39, 68–73) nebo s údaji o polaritě získanými při použití HPLC s obrácenou fází (74–76). Jak je ukázáno v tabulkách 1 a 2, vypočtou se z takových rovnic hodnoty K_{ou} nebo K_{om} a poté nepřímo hodnoty $K_{d\ z}$ rovnic:

$$K_{ou} = K_d \cdot \frac{100}{\%ou}\ (cm^3 g^{-1}) \qquad K_{om} = \frac{K_d}{1{,}724} \cdot \frac{100}{\%ou}\ (cm^3 g^{-1})$$

2. Koncepce těchto korelací je založena na dvou předpokladech: 1) adsorpci látky nejvíce ovlivňuje organický materiál v půdě a 2) interakce jsou převážně nepolární. V důsledku toho tyto korelace: 1) nejsou použitelné pro polární látky (nebo jsou použitelné jen do určité míry) a 2) nejsou použitelné v případech, kdy je obsah organického materiálu v půdě velmi malý (12). Kromě toho, ačkoli byla zjištěna uspokojivá korelace mezi P_{ov} a a adsorpcí (19), nelze totéž říci o vztahu mezi rozpustností ve vodě a rozsahem adsorpce (19, 21); dosud si tyto studie protiřečí.

3. Některé příklady korelace mezi adsorpčním koeficientem a rozdělovacím koeficientem mezi oktanol a vodu a rovněž rozpustností ve vodě jsou uvedeny v tabulkách 1 a 2.

Tabulka 1

Příklady korelací mezi adsorpčním distribučním koeficientem a rozdělovacím koeficientem mezi oktanol a vodu; další příklady jsou uvedeny v literatuře (12, 68)

Látky	Korelace	Autoři
Substituované močoviny	$\log K_{om} = 0{,}69 + 0{,}52 \log P_{o/v}$	Briggs (1981) (39)
Chlorované aromatické	$\log K_{ou} = -\ 0{,}779 + 0{,}904 \log P_{o/v}$	Chiou *et al*. (1983) (65)
Různé pesticidy	$\log K_{om} = 4{,}4 + 0{,}72 \log P_{o/v}$	Gerstl and Mingelgrin (1984) (66)
Aromatické uhlovodíky	$\log K_{ou} = -\ 2{,}53 + 1{,}15 \log P_{o/v}$	Vowles and Mantoura (1987) (67)

Tabulka 2

Příklady korelací mezi adsorpčním distribučním koeficientem a rozpustností ve vodě; další příklady jsou uvedeny v literatuře (68, 69)

Sloučeniny	Korelace	Autoři
Různé pesticidy	$\log K_{om} = 3{,}8 - 0{,}561 \log S_v$	Gerstl and Mingelgrin (1984) (66)
Chlorované alifatické a aromatické látky	$\log K_{om} = (4{,}040 \pm 0{,}038) - (0{,}557 \pm 0{,}012) \log S_v$	Chiou *et al*. (1979) (70)
1-Naftol	$\log K_{ou} = 4{,}273 - 0{,}686 \log S_v \log S_w$	Hasset et al. (1981) (71)
Cyklické, alifaticko-aromatické látky	$\log K_{ou} = -\ 1{,}405 - 0{,}921 \log S_v - 0{,}00953$ (mp-25)	Karickhoff (1981) (72)
Různé sloučeniny	$\log K_{om} = 2{,}75 - 0{,}45 \log S_v$	Moreale van Blade (1982) (73)

▼B

DODATEK 4

VÝPOČTY PRO URČENÍ PODMÍNEK CENTRIFUGACE

1. Centrifugační doba se za předpokladu, že jsou částice kulové, vypočte podle této rovnice:

$$t = \frac{9}{2}\left[\frac{\eta}{\omega^2 r p^2 (\rho_p - \rho_{vod})}\right] \ln(R_b/R_t) \qquad (1)$$

Pro zjednodušení nejsou parametry uvedeny v základních jednotkách SI (ale v jednotkách soustavy CGS).

kde:

ω = úhlová rychlost (= 2 π·(rpm)/60), rad/s,

rpm = počet otáček za minutu,

η = viskozita roztoku, $g \cdot s^{-1}$/cm,

r_p = poloměr částic, cm,

ρ_p = hustota půdy, g/cm^3,

ρ_{vod} = hustota roztoku, g/cm^3,

R_t = vzdálenost od středu rotoru odstředivky k hladině roztoku v centrifugační kyvetě, cm,

R_b = vzdálenost od středu rotoru odstředivky ke dnu kyvety, cm,

$R_b - R_t$ = výška sloupce směsi půda/roztok v kyvetě, cm.

Všeobecně se v praxi k zajištění úplného oddělení volí dvojnásobek vypočteného času.

2. Rovnici (1) lze dále zjednodušit, jestliže se považují viskozita (η) a hustota (ρ_{vod}) roztoku rovny viskozitě a hustotě vody při 25 °C; tedy, η = 8,95 × 10–3g s^{-1}/cm a ρ_{vod} = 1,0 g/cm^{-3}.

Centrifugační doba je tedy dána rovnicí (2):

$$t = \frac{3.7}{(rpm)^2 . r_p{}^2 (\rho_s - 1)} \ln\frac{Rb}{Rt} \qquad (2)$$

3. Z rovnice 2 je zřejmé, že při určení podmínek centrifugace k dosažení separace částic o určité velikosti (v našem případě o poloměru 0,1 μm), doby (t) počtu otáček za minutu (rpm), jsou důležité: 1) hustota půdy a 2) výška sloupce směsi v centrifugační kyvetě ($R_b - R_t$), tj. vzdálenost, kterou částice půdy urazí mezi hladinou v kyvetě a jejím dnem; výška sloupce směsi v kyvetě bude při fixním stanoveném objemu samozřejmě záviset na druhé mocnině poloměru kyvety.

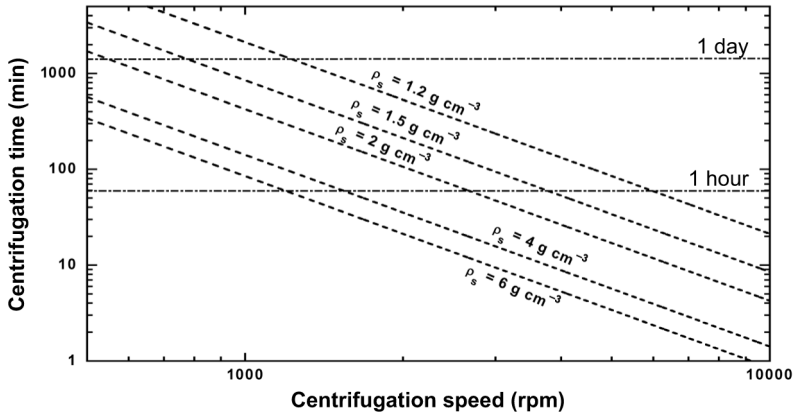
4. Na obrázku 1 jsou znázorněny změny centrifugační doby (t) v závislosti na centrifugační rychlosti (rpm) pro různé hustoty půdy (ρ_s) (obrázek 1a) a pro různé výšky sloupce směsi v centrifugačních kyvetách (obrázek 1b). Z obrázku 1a je zřejmý vliv hustoty půdy; např. při obvyklých 3 000 ot/min. je centrifugační doba přibližně 240 minut pro hustotu půdy 1,2 g/cm3, ale pouze 50 minut pro 2,0 g/cm3.Podobně je podle obrázku 1b při obvyklých 3 000 ot/min. centrifugační doba přibližně 50 minut pro výšku sloupce směsi 10 cm a pouze 7 minut pro výšku sloupce 1 cm. Je však důležité nalézt optimální poměr mezi centrifugací, která vyžaduje co nejmenší výšku sloupce, a snadnou manipulaci experimentátora při oddělování fází po centrifugaci.

▼B

5. Kromě toho je při určování experimentálních podmínek při separaci fází půda/roztok důležité zvažovat možnou přítomností třetí „pseudofáze“, koloidu. Koloidní částice s velikostí menší než 0,2 μm, mohou mít značný vliv na celý mechanismus adsorpce látky v půdní suspensi. Při centrifugaci, jak je popsána výše, zůstanou koloidní částice ve vodné fázi a analyzují se společně s vodnou fází. Informace o jejich vlivu se tedy ztratí.

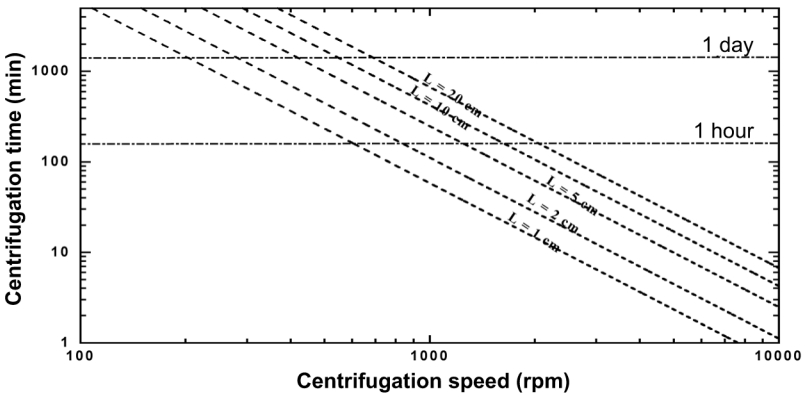
Má-li laboratoř, která studii provádí, zařízení pro ultracentrifugaci nebo ultrafiltraci, mohly by být adsorpce/desorpce látky v půdě studovány hlouběji včetně informací o adsorpci látky na koloidních částicích. v takovém případě by k oddělení tří fází – půdy, koloidních částic a roztoku měla být použita ultracentrifugace při 60 000 ot/min. nebo ultrafiltrace na filtru o porositě 100 000 Da. Protokol o zkoušce by měl být také odpovídajícím způsobem pozměněn, mají-li být analyzovány všechny tři fáze.

Obrázek 1a



Změny centrifugační doby (t) v závislosti na centrifugační rychlosti (ot/min.) pro různé hustoty půdy (ρ_p). R_t = 10 cm, $R_b - R_t$ = 10 cm, η = 8,95 × 10^{-3} g·s^{-1}/cm a ρ_{vod} = 1,0 g/cm^3 při 25 °C.

Obrázek 1b



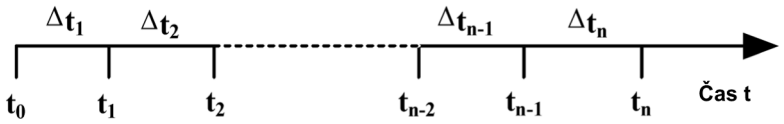
Změna centrifugační doby (t) v závislosti na centrifugační rychlosti (ot/min) pro různé výšky sloupce směsi v centrifugační kyvetě ($R_b - R_t$) = L; R_t = 10 cm, η = 8,95 × 10–3 gs^{-1}/cm, ρ_{vod} = 1,0 g/cm^3 při 25 °C a ρ_p = 2,0 g/cm^3.

▼B

DODATEK 5

VÝPOČET ADSORPCE A (%) A DESORPCE D (%)

Časové schéma postupu je toto:



U všech výpočtů se předpokládá, že zkoušená látka je stálá a že se významně neadsorbuje na stěnách nádobky.

ADSORPCE A (%)

a) *Paralelní metoda*

Procento adsorpce se vypočte pro každou zkušební nádobku (i) pro každý čas (t_i), podle této rovnice:

$$A_{t_i} = \frac{m_p^{ads}(t_i) \cdot 100}{m_0} \ (\%) \qquad (1)$$

Veličiny v této rovnici lze vypočítat takto:

$$m_0 = C_0 \cdot V_0 \ (\mu g) \qquad (2)$$

$$m_p^{ads}(t_i) = m_0 - C_{vod}^{ads}(t_i) \cdot V_0 \ (\mu g) \qquad (3)$$

kde:

A_{ti} = procento adsorpce (%) v čase t_i,

$m_p^{ads}(t_i)$ = hmotnost zkoušené látky v půdě v čase t_i, kdy je prováděna analýza (μg)

m_0 = hmotnost zkoušené látky v nádobce na začátku zkoušky (μg),

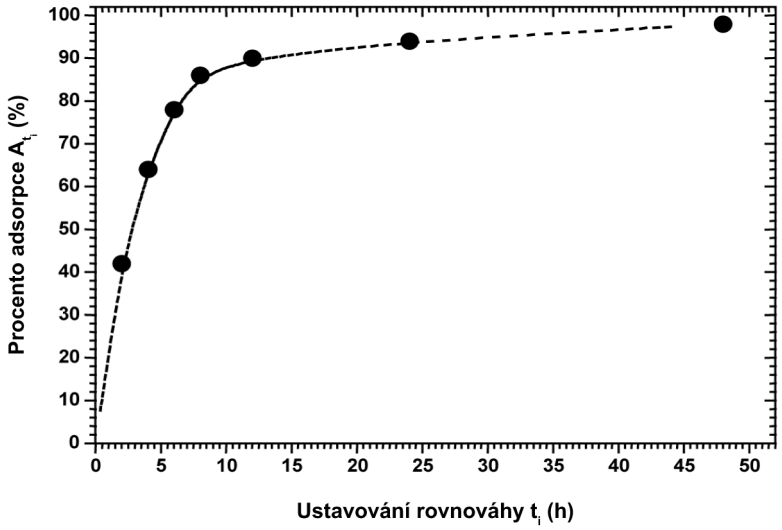
C_0 = počáteční hmotnostní koncentrace zkušebního roztoku v kontaktu s půdou (μg/cm),

▼B

$C_{vod}^{ads}(t_i)$ = hmotnostní koncentrace látky ve vodné fázi v čase$_i$, kdy je prováděna analýza (μg/cm); tato koncentrace se stanoví analyticky, přičemž se vezmou v úvahu hodnoty ze slepých pokusů,

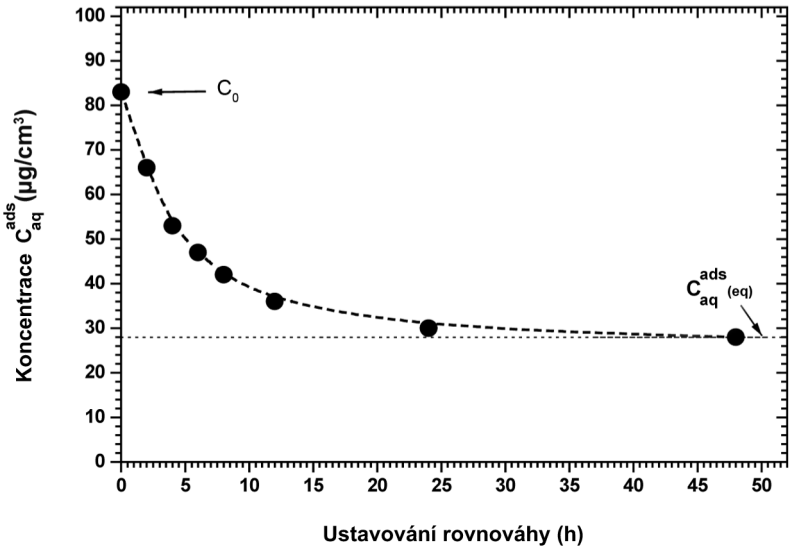
V_0 = počáteční objem zkušebního roztoku v kontaktu s půdou (cm^3).

Hodnoty procenta adsorpce A_{t_i} nebo $C_{vod}^{ads}(t_i)$ se vynesou do grafu proti času a zjistí se doba potřebná k ustavení sorpční rovnováhy. Příklady takových výnosů jsou uvedeny na obrázcích 1 a 2.



Obrázek 1

Ustavování adsorpční rovnováhy



Obrázek 2

Závislost hmotnostní koncentrace látky ve vodné fázi (C_{aq}) na čase

▼B

b) *Sériová metoda*

V následujících rovnicích je zohledněno, že se při studii adsorpce provádějí měření zkoušené látky v malých podílech vodné fáze v určitých časových intervalech.

— Pro každý časový interval se hmotnost látky adsorbované v půdě vypočte takto:

— pro první časový interval $\Delta t_1 = t_1 - t_0$

$$m_p^{ads}(\Delta t_1) = m_0 - m_m^{ads}(t_1) \cdot \left(\frac{V_0}{v_a^A}\right) \quad (4)$$

— pro druhý časový interval $\Delta t2 = t2 - t1$

$$m_p^{ads}(\Delta t_2) = m_m^{ads}(t_1) \cdot \left(\frac{V_0}{v_a^A}\right) - m_m^{ads}(t_2) \cdot \left(\frac{V_0 - v_a^A}{v_a^A}\right) \quad (5)$$

— pro třetí časový interval $\Delta t3 = t3 - t2$

$$m_p^{ads}(\Delta t_3) = m_m^{ads}(t_2) \cdot \left(\frac{V_0 - v_a^A}{v_a^A}\right) - m_m^{ads}(t_3) \cdot \left(\frac{V_0 - 2 \cdot v_a^A}{v_a^A}\right) \quad (6)$$

— pro ntý časový interval $\Delta t_n = t_n - t_n - 1$

$$m_p^{ads}(\Delta t_n) = m_m^{ads}(t_{n-1}) \cdot \left(\frac{V_0 - (n-2) \cdot v_a^A}{v_a^A}\right) - m_m^{ads}(t_n) \cdot \left(\frac{(V_0 - (n-1) \cdot v_a^A)}{v_a^A}\right) \quad (7)$$

— Procento adsorpce v každém časové intervalu $A_{\Delta t_i}$ se vypočte za použití rovnice:

$$A_{\Delta t_i} = \frac{m_p^{ads}(\Delta t_i)}{m_0} \cdot 100\ (\%) \quad (8)$$

zatímco procento adsorpce A_{t_i} v čase t_i je dáno rovnicí:

$$A_{t_i} = \frac{\sum_{j=\Delta t_i}^{\Delta t_i} m_s^{ads}(j)}{m_0} \cdot 100(\%) \quad (9)$$

Hodnoty procenta adsorpce A_{t_i} nebo $A_{\Delta t_i}$ (podle potřeb studie) se vynesou do grafu proti času a určí se čas, kdy se ustavila sorpční rovnováha.

— V čase ustavení rovnováhy t_{eq}:

— je hmotnost zkoušené látky adsorbované v půdě:

$$m_p^{ads}(eq) = \sum_{\Delta t_{i=1}}^{n} m_p^{ads}(\Delta t_i) \quad (10)$$

▼B

— hmotnost zkoušené látky v roztoku:

$$m_{vod}^{ads}(eq) = m_0 - \sum_{\Delta t_i=1}^{n} m_p^{ads}(\Delta t_i) \quad (11)$$

— a procento adsorpce při rovnováze:

$$A_{eq} = \frac{m_p^{ads}(eq)}{m_0} \cdot 100\ (\%) \quad (12)$$

Výše uvedené parametry jsou definovány takto:

$m_p^{ads}(\Delta t_1), m_p^{ads}(\Delta t_2), ..., m_p^{ads}(\Delta t_n)$ = hmotnost látky adsorbované v půdě v časovém intervalu Δ_{t1}, Δ_{t2},..., Δ_{tn} respectively (μg);

$m_m^{ads}(t_1), m_m^{ads}(t_2), ..., m_n^{ads}(t_n)$ = hmotnost látky naměřené v podílu v_a^A v okamžiku t_1, t_2,t_n respectively (μg);

$m_p^{ads}(eq)$ = hmotnost zkoušené látky adsorbované v půdě při adsorpční rovnováze (μg),

$m_{vod}^{ads}(eq)$ = hmotnost zkoušené látky v roztoku při adsorpční rovnováze (μg),

v_a^A = objem podílu, ve kterém je látka stanovována (cm^3)

$A_{\Delta t_i}$ = procento adsorpce odpovídající časovému intervalu Δt_i (%),

A_{eq} = procento adsorpce při adsorpční rovnováze (%).

DESORPCE D (%)

Časem t_0 v němž začíná experiment pro studium desorpční kinetiky, je okamžik, kdy je co největší objem roztoku zkoušené látky (po dosažení adsorpční rovnováhy) nahrazen stejným objemem 0,01 M roztoku $CaCl_2$.

a) *Paralelní metoda*

V čase t_i se změří hmotnost zkoušené látky ve vodné fázi odebrané ze zkušební nádobky i (V_r^i) a desorbovaná hmotnost se vypočte z rovnice:

$$m_{vod}^{des}(t_i) = m_m^{des}(t_i) \cdot \left(\frac{V_0}{V_r^i}\right) - m_{vod}^{A} \quad (13)$$

Při desorpční rovnováze platí, že $t_i = t_{eq}$, a tedy $m_{vod}^{des}(t_i) = m_{vod}^{des}(eq)$.

Hmotnost zkoušené látky desorbované v časovém intervalu (Δt_i) je dána rovnicí:

$$m_{vod}^{des}(\Delta t_i) = m_{vod}^{des}(t_i) - \sum_{j=1}^{i=1} m_{vod}^{des}(j) \quad (14)$$

Procento desorpce se vypočte takto:

včase t_i z rovnice:

▼B

$$D_{t_i} = \frac{m_{vod}^{des}(t_i)}{m_p^{ads}(eq)} \cdot 100\ (\%) \quad (15)$$

a v časovém intervalu (Δt_i) z rovnice:

$$D_{\Delta t_i} = \frac{m_{vod}^{des}(\Delta t_i)}{m_p^{ads}(eq)} \cdot 100\ (\%) \quad (16)$$

kde:

D_{ti} = procento desorpce v čase t_i (%);

$D_{\Delta ti}$ = procento desorpce v časovém intervalu Δt_i (%);

$m_{vod}^{des}(t_1)$ = hmotnost zkoušené látky desorbované během časového intervalu Δt_i (μg);

$m_{vod}^{des}(\Delta t_1)$ = hmotnost zkoušené látky desorbované během časového intervalu Δt_i (μg);

$m_m^{des}(t_i)$ = hmotnost zkoušené látky analyticky stanovená v čase t_i v roztoku o objemu V_r^i, který byl odebrán k analýze (μg);

$m_{vod}{}^{A}$ = hmotnost látky zbylé z adsorpční rovnováhy v důsledku neúplné výměny objemu vodné fáze (μg);

$$m_{vod}^{A} = m_{vod}^{ads}(eq) \cdot \left(\frac{V_0 - V_R}{V_0}\right) \quad (17)$$

$m_{vod}^{ads}(eq)$ = hmotnost zkoušené látky v roztoku při adsorpční rovnováze (μg);

V_R = objem supernatantu odebraného ze zkušební nádobky po dosažení adsorpční rovnováhy a nahrazeného stejným objemem 0,01 M roztoku $CaCl_2$ (cm^3);

V_r^i = objem roztoku odebraného ze zkušební nádobky (i) ke stanovení zkoušené látky v experimentu pro studium desorpční kinetiky (cm^3).

Hodnoty procenta desorpce D_{ti} nebo $D_{\Delta t_i}$ (podle potřeb studie) se vynesou proti času a stanoví se doba, po níž se ustavila desorpční rovnováha.

b) **Sériová metoda**

V následujících rovnicích je zohledněno, že adsorpce, která předcházela, byla prováděna měřením zkoušené látky v malých podílech (v_a^A) vodné fáze (sériová metoda v bodu 1.9 Provedení zkoušky). Předpokládá se, že a) objem supernatantu odebraného ze zkušební nádobky po experimentu pro studium adsorpční kinetiky byl nahrazen stejným objemem 0,01 M roztoku $CaCl_2$ (V_R) a b) celkový objem vodné fáze v kontaktu s půdou (V_T) zůstává konstantní během pokusu na získání desorpční kinetiky a je vyjádřená rovnicí:

$$V_T = V_0 - \sum_{i=1}^{n} v_a^A(i) \quad (18)$$

▼B

V čase t_i:

— Hmotnost zkoušené látky se změří v malých podílech (v_a^D) a desorbovaná hmotnost se vypočte z této rovnice:

$$m_{vod}^{des}(t_i) = m_m^{des}(t_i) \cdot \left(\frac{V_T}{v_a^D}\right) - m_{vod}^A \cdot \left(\frac{(V_T - (i-1) \cdot v_a^D)}{V_T}\right) \quad (19)$$

— Při desorpční rovnováze platí, že $t_i = t_{eq}$ a tedy $m_{vod}^{des}(t_i) = m_{vod}^{des}(eq)$.

— Procento desorpce D_{t_i} se vypočte z této rovnice:

$$D_{t_i} = \frac{m_{vod}^{des}(t_i)}{m_p^{ads}(eq)} \cdot 100\ (\%) \quad (20)$$

V časovém intervalu (Δt_i):

Pro každý časový interval se desorbované množství látky vypočte takto:

— pro první časový interval $\Delta t_1 = t_1 - t_0$

$$m_{vod}^{des}(\Delta t_1) = m_m^{des}(t_1) \cdot \left(\frac{V_T}{v_a^D}\right) - m_{vod}^A \text{ and } m_p^{des}(t_1) = m_p^{vod}(eq) - m_{vod}^{des}(\Delta t_1) \quad (21)$$

— pro druhý časový interval $\Delta t_2 = t_2 - t_1$

$$m_{vod}^{des}(\Delta t_2) = m_m^{des}(t_2) \cdot \left(\frac{V_T}{v_a^D}\right) - m_{vod}^{des}(\Delta t_1) \cdot \left(\frac{\left(V_T - v_a^D\right)}{V_T}\right) - m_{vod}^A \cdot \left(\frac{\left(V_T - v_a^D\right)}{V_T}\right)$$

a (22)

$$m_p^{des}(t_2) = m_p^{ads}(eq) - \left[m_{vod}^{des}(\Delta t_1) + m_{vod}^{des}(\Delta t_2)\right]$$

— pro n-tý časový interval $\Delta t_n = t_n - t_{n-1}$

$$m_{vod}^{des}(\Delta t_n) = \left[m_m^{des}(t_n) \cdot \left(\frac{V_T}{v_a^D}\right) - m_{vod}^A \cdot \left(\frac{\left(V_T - (n-1) \cdot v_a^D\right)}{V_T}\right) - \sum_{i=1,n\neq 1}^{n-1} \left(\frac{(V_T - (n-i) \cdot v_a^D)}{V_T} \cdot m_{vod}^{des}(\Delta t_i)\right)\right]$$

a (23)

$$m_p^{des}(t_n) = m_p^{ads}(eq) - \sum_{i=1,n\neq 1}^{n} m_{vod}^{des}(\Delta t_i)$$

Procento desorpce v každém časovém intervalu $D_{\Delta t_i}$ se nakonec vypočte z této rovnice:

$$D_{\Delta t_i} = \frac{m_{vod}^{des}(\Delta t_i)}{m_p^{ads}(eq)} \cdot 100(\%) \quad (24)$$

zatímco procento desorpce D_{t_i} v čase t_i je dáno rovnicí:

$$D_{t_i} = \frac{\sum_{j=\Delta t_1}^{\Delta t_i} m_{vod}^{des}(j)}{m_p^{ads}(eq)} \cdot 100 = \frac{m_{vod}^{des}(t_i)}{m_p^{ads}(eq)} \cdot 100(\%) \quad (25)$$

▼B

přičemž jsou použité veličiny definovány takto:

$m^{des}{}_p(\Delta t_1)$, $m^{des}{}_p(\Delta t_2)$,... , $m^{des}{}_p(\Delta t_n)$ = hmotnost látky, která zůstala adsorbovaná v půdě po časových intervalech Δt_1, Δt_2, ..., Δt_n (μg);

$m^{des}{}_p(\Delta t_1)$, $m^{des}{}_p(\Delta t_2)$,... , $m^{des}{}_p(\Delta t_n)$ = hmotnost látky desorbované v časových intervalech Δt_1, Δt_2, ..., Δt_n resp. (μg);

$m^{des}{}_p(t_1)$, $m^{des}{}_p(t_2)$,... , $m^{des}{}_p(t_n)$ = hmotnost látky naměřená v podílu ($v^D{}_a$) v časových intervalech t_1, t_2,..., t_n, resp. (μg);

V_T = celkový objem vodné fáze v kontaktu s půdou během experimentu pro studium desorpční kinetiky provedeného sériovou metodou (cm^3);

$m^A{}_{vod}$ = hmotnost látky zbylé z adsorpční rovnováhy v důsledku neúplné výměny objemu vodné fáze (μg);

$$m^A_{vod} = \left(\frac{\left(V_0 - \sum_{i=1}^{n} v^A_a(i) \right) - V_R}{\left(V_0 - \sum_{i=1}^{n} v^A_a(i) \right)} \right) \cdot m^{ads}_{vod}(eq) \qquad (26)$$

V_R = objem supernatantu odebraného ze zkušební nádobky po dosažení adsorpční rovnováhy a nahrazeného stejným objemem 0,01 M roztoku $CaCl_2$ (cm^3);

v^D_a = objem alikvotu odebraného k analýze ze zkušební nádobky (i) během experimentu pro studium desorpční kinetiky provedeného sériovou metodou (cm^3);

$$v^D_a \leq 0{,}02 \cdot V_T \qquad (27)$$

▼B

DODATEK 6

ADSORPCE – DESORPCE V PŮDÁCH: FORMULÁŘE PRO PŘEDLOŽENÍ ÚDAJŮ

Zkoušená látka:

Zkušební půda:

Obsah sušiny v půdě (105 °C, 12 hodin): .....%

Teplota: .....°C

Použitelnost analytické metody

Navážka půdy	g	
Půda: suchá hmotnost	g	
Objem roztoku $CaCl_2$	cm^3	
Nominální koncentrace konečného roztoku	$\mu g/cm^3$	
Analytická koncentrace konečného roztoku	$\mu g/cm^3$	

Podstata použité analytické metody:

Kalibrace analytické metody:

Zkoušená látka:

Zkušební půda:

Obsah sušiny v půdě (105 °C, 12 hodin): .....%

Teplota: .....°C

Použitá metodika analýzy: Nepřímá ☐ Paralelní ☐ Sériová ☐

Přímá ☐

Adsorpční zkouška: zkušební vzorky

	Symbol	Jednotky	Doba ustavování rovnováhy		Doba ustavování rovnováhy		Doba ustavování rovnováhy		Doba ustavování rovnováhy	
Zkušební nádobka č.										
Navážka půdy	—	g								
Půda: suchá hmotnost	$m_{půda}$	g								
Objem vody v navážce půdy (vypočtený)	V_{vp}	cm^3								
Objem 0,01 M roztoku $CaCl_2$ použitého k uvedení do rovnováhy s půdou		cm^3								
Objem zásobního roztoku		cm^3								
Celkový objem vodné fáze v kontaktu s půdou	V_0	cm^3								
Počáteční koncentrace zkušebního roztoku	C_0	$\mu g/cm^3$								
Hmotnost zkoušené látky na začátku zkoušky	m_0	µg								

▼B

	Symbol	Jednotky	Doba ustavování rovnováhy		Doba ustavování rovnováhy		Doba ustavování rovnováhy		Doba ustavování rovnováhy	
Po protřepávání a centrifugaci										
NEPŘÍMÁ METODA										
Paralelní metoda										
Koncentrace zkoušené látky ve vodné fázi, po korekci na slepý pokus	$C_{vod}^{ads}(t_i)$	µg/cm^3								
Sériová metoda										
Naměřená hmotnost zkoušené látky v podílu	$m_m^{ads}(t_i)$	µg								
PŘÍMÁ METODA										
Hmotnost zkoušené látky adsorbované v půdě	$m_p^{ads}(t_i)$	µg								
Výpočet adsorpce										
Adsorpce	A_{t_i}	%								
	$A_{\Delta t_i}$	%								
Střední hodnota										
Adsorpční koeficient	K_d	cm^3/g								
Střední hodnota										
Adsorpční koeficient	K_{ou}	cm^3/g								
Střední hodnota										

Zkoušená látka:

Zkušební půda:

Obsah sušiny v půdě (105 °C, 12 hodin): .....%

Teplota: .....°C

Adsorpční zkouška: slepý pokus a kontrolní vzorky

	Symbol	Jednotky	Slepý pokus		Slepý pokus		Kontrolní vzorek	
Zkušební nádobka č.								
Navážka půdy		g					0	0
Množství vody v navážce půdy (vypočtené)		cm^3					—	—
Přidaný objem 0,01 M roztoku $CaCl_2$		cm^3						
Přidaný objem zásobního roztoku zkoušené látky		cm^3	0	0				
Celkový objem vodné fáze (vypočtený		cm^3					—	—

▼B

	Symbol	Jednotky	Slepý pokus		Slepý pokus		Kontrolní vzorek	
Počáteční koncentrace zkoušené látky ve vodné fázi		$\mu g/cm^3$						
Po protřepávání a centrifugaci								
Koncentrace ve vodné fázi		$\mu g/cm^3$						

Poznámka: Podle potřeby lze přidat sloupce.

Zkoušená látka:

Zkušební půda:

Obsah sušiny v půdě (105 °C, 12 hodin): .....%

Teplota: .....°C

Hmotnostní bilance

	Symbol	Jednotky				
Zkušební nádobka č.						
Navážka půdy	—	g				
Půda: suchá hmotnost	$m_{půda}$	g				
Objem vody v navážce půdy (vypočtený)	V_{vp}	ml				
Objem 0,01 M roztoku $CaCl_2$ použitého k uvedení do rovnováhy s půdou		ml				
Objem zásobního roztoku		cm^3				
Celkový objem vodné fáze v kontaktu s půdou	V_0	cm^3				
Počáteční koncentrace zkušebního roztoku	C_0	$\mu g/cm^3$				
Doba ustavování rovnováhy	—	h				
Po protřepávání a centrifugaci						
Koncentrace zkoušené látky ve vodné fázi při adsorpční rovnováze, po korekci na slepý pokus	$C_{aq}^{ads}(eq)$	$\mu g/cm^3$				
Rovnovážná doba	t_{eq}	h				
První zředění rozpouštědlem						
Odebraný objem vodné fáze	V_{rec}	cm^3				
Přidaný objem rozpouštědla	ΔV	cm^3				
První extrakce rozpouštědlem						
Signál při analýze rozpouštědla	S_{E1}	var.				
Koncentrace zkoušené látky v rozpouštědle	C_{E1}	$\mu g/cm^3$				

▼B

	Symbol	Jednotky				
Hmotnost látky extrahované z půdy a stěn nádobky	m_{E1}	µg				
Druhé zředění rozpouštědlem						
Odebraný objem rozpouštědla	V_{rozp}	cm^3				
Přidaný objem rozpouštědla	V'	cm^3				
Druhá extrakce rozpouštědlem						
Signál při analýze rozpouštědlové fáze	S_{E2}	var.				
Koncentrace zkoušené látky v rozpouštědle	C_{E2}	µg/cm^3				
Hmotnost látky extrahované z půdy a stěn nádobky	m_{E2}	µg				
Celková hmotnost zkoušené látky extrahované ve dvou stupních	m_E	µg				
Hmotnostní bilance	MB	%				

Zkoušená látka:

Zkušební půda:

Obsah sušiny v půdě (105 °C, 12 hodin): .....%

Teplota: .....°C

Adsorpční isothermy

	Symbol	Jednotky								
Zkušební nádobka č.										
Navážka půdy	—	g								
Půda: suchá hmotnost	E	g								
Objem vody v navážce půdy (vypočtený)	V_{vp}	cm^3								
Objem 0,01 M roztoku $CaCl_2$ použitého k uvedení do rovnováhy s půdou		cm^3								
Přidaný objem zásobního roztoku		cm^3								
Celkový objem vodné fáze v kontaktu s půdou (vypočtený)	V_0	cm^3								
Koncentrace roztoku	C_0	µg/cm^3								
Doba ustavování rovnováhy	—	h								

▼B

	Symbol	Jednotky								
Po protřepávání a centrifugaci										
Koncentrace látky ve vodné fázi, po korekci na slepý pokus	$C_{vod}^{ads}(eq)$	µg/cm^3								
Teplota		°C								
Adsorbovaná hmotnost na jednotku množství půdy	$C_p^{ads}(eq)$	µg/g								

Regresní analýza:

hodnota:

hodnota l/n:

regresní koeficient r^2:

Zkoušená látka:

Zkušební půda:

Obsah sušiny v půdě (105 °C, 12 hodin): .....%

Teplota: .....°C

Použitá metodika analýzy: Nepřímá ☐ Paralelní ☐ Sériová ☐

Desorpční zkouška

		Symbol	Jednotky	Časový interval	Časový interval	Časový interval	Časový interval
Číslo zkušební nádobky z adsorpčního experimentu							
Hmotnost látky adsorbované v půdě při adsorpční rovnováze		$m_p^{ads}(eq)$	µg				
Odebraný objem vodné fáze nahrazený 0,01 M $CaCl_2$		V_R	cm^3				
Celkový objem vodné fáze v kontaktu s půdou	PM	V_0	cm^3				
	SM	V_T	cm^3				
Hmotnost látky zbylé z rovnováhy v důsledku neúplné výměny objemu vodné fáze		m_{vod}^A	µg				
Desorpční kinetika							
Naměřená hmotnost látky desorbované z půdy v čase t_i		$m_m^{des}(t_i)$	µg				
Objem roztoku odebraný ze zkušební nádobky (i) pro měření zkoušené látky	PM	V_f^i	cm^3				
	SM	v_a^D	cm^3				
Hmotnost látky desorbované z půdy v čase t_i (vypočtená)		$m_{vod}^{des}(t_i)$	µg				
Hmotnost látky desorbované z půdy během časového intervalu (vypočtená)		$m_{vod}^{des}(\Delta t_i)$	µg				

▼B

	Symbol	Jednotky	Časový interval	Časový interval	Časový interval	Časový interval
Procento desorpce						
Desorpce v čase t_i	D_{t_i}	%				
Desorpce v časovém intervalu	$D_{\Delta t_i}$	%				
Zdánlivý desorpční koeficient	K_{des}					

PM: paralelní metoda

SM: sériová metoda

▼B

C.19. ODHAD ADSORPČNÍHO KOEFICIENTU (K_{OU}) PRO PŮDY A ČISTÍRENSKÉ KALY POMOCÍ VYSOKOÚČINNÉ KAPALINOVÉ CHROMATOGRAFIE (HPLC)

1. METODA

Tato metoda je replikou metody OECD TG121 (2000).

1.1. ÚVOD

Sorpční chování látek v půdách a v čistírenských kalech může být popsáno parametry experimentálně stanovenými zkušební metodou C.18. Důležitým parametrem je adsorpční koeficient, který je definován jako poměr koncentrace látky v půdě nebo kalu a koncentrace látky ve vodné fázi při rovnováze. Adsorpční koeficient normalizovaný na obsah organického uhlíku v půdě K_{ou} je užitečným ukazatelem schopnosti chemické látky vázat se na organické látky v půdě a v čistírenském kalu a umožňuje porovnat různé chemické látky. Tento parametr lze odhadnout z korelace s rozpustností ve vodě a s rozdělovacím koeficientem oktanol/voda (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7).

Experimentální metoda popsaná v této zkoušce používá k odhadu adsorpčního koeficientu K_{ou} v půdě a v čistírenských kalech vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii (8). Tyto odhady jsou spolehlivější než odhady z výpočtů metodikou QSAR (9). Jako metoda odhadu nemůže plně nahradit šaržovitou rovnovážnou metodu použitou v metodě C.18. Odhady K_{ou} však mohou být užitečné pro volbu vhodných parametrů pro adsorpční/desorpční studie podle zkušební metody C.18, a to výpočtem K_d (distribučního koeficientu) nebo K_f (Freundlichova adsorpčního koeficientu) z rovnice 3 (viz bod 1.2).

1.2. DEFINICE

K_d: Distribuční koeficient je definován jako poměr rovnovážných koncentrací C rozpuštěné látky ve dvoufázovém systému skládajícím se ze sorbentu (půda nebo čistírenský kal) a vodné fáze; je bezrozměrný, jsou-li koncentrace v obou fázích vyjádřeny na hmotnostním základě. Je-li koncentrace ve vodné fázi vyjádřena na základě hmotnost/objem, je jednotkou ml/g. K_d se může měnit s vlastnostmi sorbentu a může záviset na koncentraci.

$$K_d = \frac{C_{půda}}{C_{vod}} \text{ nebo } \frac{C_{kal}}{C_{vod}} \quad (1)$$

kde:

$C_{půda}$ = koncentrace zkoušené látky v půdě při rovnováze (μg/g);

C_{kal} = koncentrace zkoušené látky v kalu při rovnováze (μg/g);

C_{vod} = koncentrace zkoušené látky ve vodné fázi při rovnováze (μg/g, μg/ml).

▼B

K_f: Freundlichův adsorpční koeficient je definován jako koncentrace zkoušené látky v půdě nebo v čistírenském kalu (x/m), je-li rovnovážná koncentrace C_{vod} ve vodné fázi rovna jedné; vyjadřuje se v μg/g sorbentu. Hodnota se může měnit s vlastnostmi sorbentu.

$$\log \frac{x}{m} = \log K_f + \frac{1}{n} \cdot \log C_{vod} \quad (2)$$

kde:

x/m = množství zkoušené látky x (μg) adsorbované při rovnováze na určitém množství sorbentu m (g);

1/n = směrnice Freundlichovy adsorpční isothermy;

C_{vod} = koncentrace zkoušené látky ve vodné fázi při rovnováze (μg/ml).

Při $C_{vod} = 1;\ \log K_f = \log \frac{x}{m}$

K_{ou}: Distribuční koeficient (K_d) nebo Freundlichův adsorpční koeficient (K_f) normalizovaný na obsah organického uhlíku (f_{ou}) v sorbentu; zejména u neionizovatelných chemických látek je přibližným ukazatelem míry adsorpce látky na sorbentu a umožňuje provést porovnání různých chemických látek. V závislosti na rozměru K_d a K_f, K_{ou} může být bezrozměrný nebo může být jeho jednotkou ml/g nebo μg/g organického materiálu.

$$Kou = \frac{Kd}{fou}\ ((\text{bezrozměrný nebo v ml/g})) \text{ nebo } \frac{Kf}{fou}\ (\mu g/g) \quad (3)$$

Vztah mezi K_{ou} a K_d není vždy lineární a hodnoty K_{ou} se mohou pro jednotlivé půdy měnit, avšak jejich změny jsou značně omezeny ve srovnání s hodnotami K_d nebo K_f.

Adsorpční koeficient (K_{ou}) lze odečíst pomocí kapacitního faktoru (k') z kalibrační křivky log k' versus log K_{ou} pro vybrané referenční sloučeniny.

$$k' = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad (4)$$

kde:

t_R = retenční časy zkoušené a referenční látky v HPLC (min)

t_0 = mrtvý čas HPLC (min) (viz bod 1.8.2).

P_{OV}: Rozdělovací koeficient oktanol/voda je definován jako poměr koncentrací rozpuštěné látky v oktan-1-olu a ve vodě; je bezrozměrný.

$$P_{o/v} = \frac{C_{oktanol}}{C_{voda}}\ (= K_{o/v}) \quad (5)$$

1.3. REFERENČNÍ LÁTKY

Před použitím metody by měly být známy strukturní vzorec, čistota a disociační konstanta (pokud existuje). Užitečné jsou informace o rozpustnosti ve vodě a v organických rozpouštědlech, o rozdělovacím koeficientu oktanol-voda a o hydrolýze.

▼B

Mají-li se korelovat naměřené retenční údaje z HPLC pro zkoušenou látku s jejím adsorpčním koeficientem, musí být sestrojen kalibrační graf log K_{ou}, K_{ou} versus log k'. Použije se minimálně šest referenčních bodů, alespoň po jednom nad a pod očekávanou hodnotou pro zkoušenou látku. Správnost metody se významně zlepší, budou-li použity referenční látky, které mají podobnou strukturu jako zkoušená látka. Nejsou-li takové údaje k dispozici, ponechává se na uživateli, aby vybral vhodné kalibrační látky. V takovém případě by měla být vybrán obecnější soubor strukturně heterogenních látek. Látky a jejich hodnoty K_{ou}, které mohou být použity, jsou uvedeny v dodatku, a to v tabulce 1 pro čistírenský kal a v tabulce 3 pro půdu. Volba jiných kalibračních látek by měla být zdůvodněna.

1.4. PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

HPLC se provádí na analytických kolonách plněných komerčně dostupnou kyanopropylovou stacionární fází obsahující lipofilní a polární skupiny. Použije se mírně polární stacionární fáze na silikagelové matrici:

— O – Si	— CH_2 – CH_2 – CH_2	— CN
silikagel	nepolární spojka	polární skupina

Podstata zkušební metody je obdobná jako ve zkušební metodě A.8 (rozdělovací koeficient, metoda HPLC). Při průchodu kolonou s mobilní fázi zkoušená látka interaguje se stacionární fází. V důsledku distribuce mezi mobilní a stacionární fází se postup zkoušené látky zpomaluje. Dvojí složení stacionární fáze s polárními a nepolárními místy umožňuje interakci polárních a nepolárních skupin molekuly podobně jako v organickém materiálu v půdě nebo v matrici čistírenského kalu. To umožňuje stanovit vztah mezi retenčním časem v koloně a adsorpčním koeficientem na organickém materiálu.

pH má významný vliv na sorpční chování zejména u polárních látek. U zemědělských půd nebo nádrží s čistírenskými kaly se pH normálně pohybuje od pH 5,5 do 7,5. U ionizovatelných látek se ve vhodném pufru provedou dvě zkoušky, a to jak s ionizovanou formou, tak s neionizovanou formou, avšak pouze v případě, že v rozmezí pH 5,5 až 7,5 je ionizováno alespoň 10 % zkoušené sloučeniny.

Vzhledem k tomu, že se k hodnocení použije pouze vztah mezi retencí na koloně HPLC a adsorpčním koeficientem, není nutná žádná kvantitativní metoda, nýbrž pouze stanovení retenčního času. Je-li k dispozici vhodný soubor referenčních látek a lze-li užít standardní experimentální podmínky, poskytuje metoda rychlý a účinný způsob odhadu adsorpčního koeficientuK_{ou}.

1.5. POUŽITELNOST ZKOUŠKY

Metoda HPLC je použitelná pro chemické látky (isotopově značené i neznačené), pro něž je k dispozici vhodný detekční systém (např. spektrofotometr, detektor radioaktivity) a jež jsou po dobu experimentu dostatečně stálé. Může být zvláště užitečná pro chemické látky, jejichž studium je v jiných experimentálních systémech obtížné (pro těkavé látky, látky, které nejsou rozpustné ve vodě v koncentraci, kterou lze analyticky měřit, pro látky s vysokou afinitou k povrchu inkubačních systémů). Metoda může být použita pro směsi, které dávají nerozlišitelné eluční pásy. v takovém případě se stanoví horní a dolní meze hodnot log K_{ou} pro sloučeniny přítomné ve směsi.

▼B

Nečistoty mohou někdy působit problémy při interpretaci výsledků HPLC, ale ty nejsou příliš důležité, neboť zkoušené látky lze jasně analyticky identifikovat a oddělit od nečistot.

Metoda je validována pro látky uvedené v tabulce 1 v dodatku a byla rovněž použita u řady jiných chemických látek z těchto chemických tříd:

— aromatické aminy (např. trifluralin, 4-chloranilin, 3,5-dinitroanilin, 4-methylanilin, N-methylanilin, 1-naftylamin),

— estery aromatických karoxylových kyselin (např. methyl-benzoát, ethyl-3,5-dinitrobenzoát),

— aromatické uhlovodíky a deriváty (např. toluen, xylen, ethylbenzen, nitrobenzen),

— estery aryloxyfenoxypropanové kyseliny (např. diklofop-methyl, fenoxaprop-ethyl, fenoxaprop-P-ethyl),

— benzimidazolové a imidazolové fungicidy (např. karbendazim, fuberidazol, triazoxid),

— amidy karboxylových kyselin (např. 2-chlorbenzamid, N,N-dimethylbenzamid, 3,5-dinitrobenzamid, N-methylbenzamid, 2-nitrobenzamid, 3-nitrobenzamid),

— chlorované uhlovodíky (např. endosulfan, DDT, hexachlorbenzen, kvintozen, 1,2,3-trichlorbenzen),

— organofosforové insekticidy (např. azinfosmethyl, disulfoton, fenamifos, isofenfos, pyrazofos, sulprofos, triazofos),

— fenoly (např. fenol, 2-nitrofenol, 4-nitrofenol, pentachlorfenol, 2,4,6-trichlorfenol, 1-naftol),

— deriváty fenylmočoviny (např. isoproturon, monolinuron, pencykuron),

— pigmentová barviva (např. Acid Yellow 219, Basic Blue 41, Direct Red 81),

— polyaromatické uhlovodíky (např. acenaften, naftalen),

— 1,3,5-triazinové herbicidy (např. prometryn, propazin, simazin, terbutryn),

— triazolové deriváty (např. tebukonazol, triadimefon, tradimenol, triapenthenol).

Metoda není použitelná pro látky, které reagují s eluentem nebo stacionární fází. Rovněž není použitelná pro látky, které interagují specifickým způsobem s anorganickými složkami (např. tvoří klastrové komplexy s minerály jílu). Metoda nemusí fungovat pro povrchově aktivní látky, anorganické sloučeniny a pro středně silné nebo silné organické kyseliny a zásady. Lze stanovit hodnotu log K_{ou} od 1,5 do 5,0. Ionizovatelné látky musí být měřeny s pufrovanou mobilní fází, avšak je třeba dbát na to, aby se předešlo srážení složek pufru nebo zkoušené látky.

▼B

1.6. KRITÉRIA JAKOSTI

1.6.1. **Správnost**

Obvykle lze adsorpční koeficient zkoušené látky stanovit v rozmezí +/- 0,5 řádu hodnoty stanovené šaržovitou rovnovážnou metodou (viz tabulka 1 v dodatku). Vyšší správnosti lze dosáhnout, pokud jsou použité referenční látky strukturně příbuzné se zkoušenou látkou.

1.6.2. **Opakovatelnost**

Stanovení se provedou alespoň dvakrát. Hodnoty log K_{ou} získané z jednotlivých měření by měly ležet v rozmezí ± 0,1.

1.6.3. **Reprodukovatelnost**

Dosud získané zkušenosti s použitím metody potvrzují její validitu. Ověřování metody HPLC za použití 48 látek (převážně pesticidů), u nichž byly k dispozici spolehlivé údaje o K_{ou} v půdě, vedlo ke korelačnímu koeficientu R = 0,95 (10, 11).

Pro zlepšení a validaci metody bylo proveden mezilaboratorní srovnávací test za účasti 11 laboratoří (12). Výsledky jsou uvedeny v tabulce 2 v dodatku.

1.7. POPIS ZKUŠEBNÍ METODY

1.7.1. **Předběžný odhad adsorpčního koeficientu**

Rozdělovací poměr oktanolvoda P_{ov} (= K_{ov}) a do určité míry i rozpustnost ve vodě lze použít jako indikátory rozsahu adsorpce zejména u neionizovaných látek, a mohou tedy být použity pro jeho předběžné určení. Pro různé skupiny chemických látek byla publikována řada užitečných korelací (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7).

1.7.2. **Přístroje a pomůcky**

Nezbytným vybavením je kapalinový chromatograf vybavený bezpulzním čerpadlem a vhodným detekčním zařízením. Doporučuje se používat nástřikový ventil se vstřikovací smyčkou. Použije se komerční fáze s vázanými kyanopropylovými skupinami na silikagelu (např. Hypersil a Zorbax CN). Mezi nástřikem a analytickou kolonou může být umístěna předkolona ze stejného materiálu. Kolony od různých dodavatelů se mohou podstatně lišit, pokud jde o účinnost. Jako vodítko by měly být dosaženy následující kapacitní faktory: log k' > 0,0 pro log K_{ou} = 3,0 a log k' > – 0,4 pro log K_{ou} = 2,0 při použití směsi methanol/voda 55/45 % jako mobilní fáze.

1.7.3. **Mobiní fáze**

Bylo testováno několik mobilních fází a doporučují se tyto dvě mobilní fáze:

— methanol/voda (55/45 % obj.),

— methanol/0,01 M citrátový pufr pH 6,0 (55/45 % obj.).

▼B

K přípravě elučního rozpouštědla se použije methanol a voda nebo citrátový pufr, vše čistoty pro HPLC. Směs se před použitím odplyní. Měla by být provedena isokratická eluce. Nevyhovuje-li směs methanol/voda, lze vyzkoušet směsi jiných organických rozpouštědel s vodou, např. směsi ethanol/voda nebo acetonitril/voda. U ionizovatelných sloučenin se doporučuje použití pufru ke stabilizaci pH. Je nezbytné dbát na to, aby se zamezilo srážení solí a narušení kolony, ke kterému dochází u některých směsí organické fáze s pufrem.

Nesmí být použity žádné přísady, jako jsou iontově párová činidla, neboť mohou ovlivnit sorpční vlastnosti stacionární fáze. Takové změny mohou být nevratné. Z tohoto důvodu musí být experimenty s použitím přísad prováděny na zvláštních kolonách.

1.7.4. **Rozpuštěné látky**

Zkoušené a referenční látky se rozpustí v mobilní fázi.

1.8. PROVEDENÍ ZKOUŠKY

1.8.1. **Zkušební podmínky**

Teplota během měření se zaznamenává. Pro zajištění konstantních podmínek během kalibrace a předběžných měření a během měření zkoušené látky se velmi doporučuje použití kolony s regulací teploty.

1.8.2. **Stanovení mrtvého času t0**

Pro stanovení mrtvého času lze použít dvě různé metody (viz také bod 1.2).

1.8.2.1. *Stanovení mrtvého času t_0 pomocí homologické řady*

Je ověřeno, že tato metoda poskytuje spolehlivé a standardizované hodnoty t_0. Podrobnosti viz zkušební metoda A.8 Rozdělovací koeficient (oktanol/voda) metodou HPLC.

1.8.2.2. *Stanovení mrtvého času t_0 pomocí inertních látek, které nejsou v koloně zadržovány*

Tato technika je založena na nástřiku roztoků formamidu, močoviny nebo dusičnanu sodného. Měření se provedou alespoň dvakrát.

1.8.3. **Stanovení retenčních časů tR**

Referenční látky se vyberou tak, jak je uvedeno v bodu 1.3. Pro stanovení jejich retenčních časů mohou být nastříknuty jako směsný standard, pokud je potvrzeno, že retenční čas žádného referenčního standardu není ovlivňován přítomností ostatních referenčních standardů. Kalibrace by měla být prováděna pravidelně, alespoň dvakrát denně, aby se objasnily neočekané změny účinnosti kolony. Nástřiky pro kalibraci by měly být prováděny přednostně před nástřikem zkoušené látky a po něm, aby se potvrdilo, že nedošlo ke změně retenčních časů. Zkoušené látky se nastříknou odděleně v co nejmenších množstvích (aby se kolona nepřetížila) a stanoví se jejich retenční časy.

▼B

S cílem zvýšit důvěryhodnost měření musí být provedena alespoň dvě stanovení. Hodnoty log K_{ou} získané z jednotlivých měření by měly ležet v rozmezí ± 0,25.

1.8.4. **Hodnocení**

Kapacitní faktory k' se vypočtou z mrtvého času t_0 a retenčních časů t_R vybraných referenčních látek podle rovnice 4 (viz bod 1.2). Hodnoty log k' referenčních látek se poté vynesou proti jejich hodnotám log K_{ou} z experimentů šaržovitou rovnovážnou metodou uvedeným v tabulkách 1 a 3 v dodatku. Z tohoto grafu se poté s použitím hodnoty log k' zkoušené látky určí její hodnota log K_{ou}. Je-li z vlastních výsledků zřejmé, že hodnota log K_{ou} leží mimo obor kalibrační křivky, zkouška se opakuje s vhodnějšími referenčními látkami.

2. ÚDAJE A JEJICH PŘEDKLÁDÁNÍ

Zpráva musí obsahovat tyto informace:

— identifikace zkoušené látky a referenčních látek, jejich čistota a podle potřeby hodnoty pK_a,

— popis zařízení a pracovních podmínek, např. typ a rozměry analytické kolony a předkolony, detekční zařízení, mobilní fáze (poměr složek a pH), rozmezí teploty během měření,

— mrtvý čas a použitá metoda jeho stanovení,

— množství zkoušené látky a referenčních látek zavedených do kolony,

— retenční časy referenčních sloučenin použitých ke kalibraci,

— charakteristiky proložené regresní křivky (log k' versus log K_{ou}) a graf regresní křivky,

— průměrné retenční údaje a odhad hodnoty log Kou zkoušené sloučeniny,

— chromatogramy.

3. LITERATURA

1) W.J. Lyman, W.F. Reehl, D.H. Rosenblatt (ed). (1990). Handbook of *c*hemical property estimation methods, chapt. 4, McGraw-Hill, New York.

2) J. Hodson, N.A. Williams (1988). The estimation of the adsorption coefficient (K_{oc}) for soils by HPLC. Chemosphere, 17, 167.

3) G.G. Briggs (1981). Theoretical and experimental relationships between soil adsorption, octanol-water partition coefficients, water solubilities, bioconcentration factors, and the parachor. J. Agric. Food Chem., 29, 1050–1059.

4) C.T. Chiou, P.E. Porter, D.W. Schmedding (1983). Partition equilibria of nonionic organic compounds between soil organic matter and water. Environ. Sci. Technol., 17, 227–231.

5) Z. Gerstl, U. Mingelgrin (1984). Sorption of organic substances by soils and sediment. J. Environm. Sci. Health, B19, 297–312.

▼B

6) C.T. Chiou, L.J. Peters, V. H. Freed (1979). A physical concept of soil water equilibria for nonionic organic compounds, Science, 106, 831–832.

7) S.W. Karickhoff (1981). Semi-empirical estimation of sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments and soils. Chemosphere, 10, 833–846.

8) W. Kördel, D. Hennecke, M. Herrmann (1997). Application of the HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient on sewage sludges. Chemosphere, 35(1/2), 121–128.

9) M. Mueller, W. Kördel (1996). Comparison of screening methods for the estimation of adsorption coefficients on soil. Chemosphere, 32(12), 2493–2504.

10) W. Kördel, J. Stutte, G. Kotthoff (1993). HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient in soil-comparison of different stationary phases, Chemosphere, 27(12), 2341–2352.

11) B. von Oepen, W. Kördel, W. Klein (1991). Sorption of nonpolar and polar compounds to soils: Processes, measurements and experience with the applicability of the modified OECD Guideline 106, Chemosphere, 22, 285–304.

12) W. Kördel, G. Kotthoff, J. Müller (1995). HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient on soil-results of a ring test. Chemosphere, 30(7), 1373–1384.

▼B

DODATEK

Tabulka 1

Srovnání hodnot K_{ou} pro půdy a čistírenské kaly a hodnot vypočtených screeningovou metodou s HPLC ([1]), ([2])

Látka	Číslo CAS	log K_{ou} pro čistírenské kaly	log K_{ou} pomocí HPLC		log K_{ou} pro půdy	log K_{ou} pomocí HPLC	
Atrazin	1912-24-9	1,66	2,14	0,48	1,81	2,20	0,39
Linuron	330-55-2	2,43	2,96	0,53	2,59	2,89	0,30
Fenthion	55-38-9	3,75	3,58	0,17	3,31	3,40	0,09
Monuron	150-68-5	1,46	2,21	0,75	1,99	2,26	0,27
Fenanthren	85-01-8	4,35	3,72	0,63	4,09	3,52	0,57
Fenylbenzoát	93-99-2	3,26	3,03	0,23	2,87	2,94	0,07
Benzamid	55-21-0	1,60	1,00	0,60	1,26	1,25	0,01
4-Nitrobenzamid	619-80-7	1,52	1,49	0,03	1,93	1,66	0,27
Acetanilid	103-84-4	1,52	1,53	0,01	1,26	1,69	0,08
Anilin	62-53-3	1,74	1,47	0,27	2,07	1,64	0,43
2,5-Dichloranilin	95-82-9	2,45	2,59	0,14	2,55	2,58	0,03

([1]) W. Kördel, D. Hennecke, M. Herrmann (1997). Application of the HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient on sewage sludges. Chemosphere, 35(1/2), 121–128.
([2]) W. Kördel, D. Hennecke, C. Franke (1997). Determination of the adsorption-coefficients of organic substances on sewage sludges. Chemosphere, 35 (1/2), 107–119.

Tabulka 2

Výsledky mezilaboratorního srovnávacího testu provedeného za účelem zlepšení a validace metody HPLC (11 zúčastněných laboratoří) ([1])

Látka	Číslo CAS	log K_{ou}	K_{ou}	log K_{ou}
		(OECD 106)	HPLC	
Atrazin	1912-24-9	1,81	78 ± 16	1,89
Monuron	150-68-5	1,99	100 ± 8	2,00
Triapenthenol	77608-88-3	2,37	292 ± 58	2,47
Linuron	330-55-2	2,59	465 ± 62	2,67
Fenthion	55-38-9	3,31	2062 ± 648	3,31

([1]) W. Kördel, G. Kotthoff, J. Müller (1995). HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient on soil-results of a ring test. Chemosphere, 30(7), 1373—1384.

▼B

Tabulka 3

Referenční látky doporučené pro screeningovou metodu s HPLC na základě adsorpčních údajů pro půdu

Referenční látka	Číslo CAS	Logaritmy středních hodnot K_{ou} z šaržovité rovnovážné metody	Počet hodnot K_{ou}	Logaritmus směrodatné odchylky	Zdroj
Acetanilid	103-84-4	1,25	4	0,48	[a]
Fenol	108-95-2	1,32	4	0,70	[a]
2-Nitrobenzamid	610-15-1	1,45	3	0,90	[b]
N,N-Dimethylbenzamid	611-74-5	1,52	2	0,45	[a]
4-Methylbenzamid	619-55-6	1,78	3	1,76	[a]
Methyl-benzoát	93-58-3	1,80	4	1,08	[a]
Atrazin	1912-24-9	1,81	3	1,08	[c]
Isoproturon	34123-59-6	1,86	5	1,53	[c]
3-Nitrobenzamid	645-09-0	1,95	3	1,31	[b]
Anilin	62-53-3	2,07	4	1,73	[a]
3,5-Dinitrobenzamid	121-81-3	2,31	3	1,27	[b]
Karbendazim	10605-21-7	2,35	3	1,37	[c]
Triadimenol	55219-65-3	2,40	3	1,85	[c]
Triazoxide	72459-58-6	2,44	3	1,66	[c]
Triazofos	24017-47-8	2,55	3	1,78	[c]
Linuron	330-55-2	2,59	3	1,97	[c]
Naftalen	91-20-3	2,75	4	2,20	[a]
Endosulfan-diol	2157-19-9	3,02	5	2,29	[c]
Methiokarb	2032-65-7	3,10	4	2,39	[c]
Acid Yellow 219	63405-85-6	3,16	4	2,83	[a]
1,2,3-Trichlorbenzen	87-61-6	3,16	4	1,40	[a]
γ-HCH (lindan)	58-89-9	3,23	5	2,94	[a]
Fenthion	55-38-9	3,31	3	2,49	[c]
Direct Red 81	2610-11-9	3,43	4	2,68	[a]
Pyrazofos	13457-18-6	3,65	3	2,70	[c]
alfa-Endosulfan	959-98-8	4,09	5	3,74	[c]
Diklofop-methyl	51338-27-3	4,20	3	3,77	[c]
Fenanthren	85-01-8	4,09	4	3,83	[a]
Basic Blue 41 (směs)	26850-47-5 12270-13-2	4,89	4	4,46	[a]
DDT	50-29-3	5,63	1	—	[b]

[a] W. Kördel, J. Müller (1994). Bestimmung des Adsorptionskoeffizienten organischer Chemikalien mit der HPLC. UBA R & D Report No. 106 01044 (1994).
[b] B.V. Oepen, W. Kördel, W. Klein. (1991). Chemosphere, 22, 285–304
[c] Údaje poskytnuté průmyslem.

▼M7

C.20. **ZKOUŠKA TOXICITY PRO REPRODUKCI U *DAPHNIA MAGNA***

ÚVOD

Tato zkušební metoda je rovnocenná Pokynu OECD pro zkoušení (TG) č. 211 (2012). Pokyny OECD pro zkoušení se pravidelně přezkoumávají a aktualizují s ohledem na vědecký pokrok. Pokyn č. 211 ke zkoušce toxicity pro reprodukci vychází z Pokynu pro zkoušení č. 202, část II, Zkouška toxicity pro reprodukci u rodu *Daphnia* (1984). Všeobecně se uznávalo, že údaje ze zkoušek prováděných podle Pokynu pro zkoušení č. 202 mohou být proměnlivé. Vzhledem k tomu bylo vyvinuto značné úsilí ke zjištění příčin této proměnlivosti s cílem získat lepší zkušební metodu. Pokyn pro zkoušení č. 211 je založen na výsledku těchto výzkumných činností, mezilaboratorních porovnávacích zkoušek a validačních studií provedených v letech 1992 (1), 1994 (2) a 2008 (3).

Hlavní rozdíly mezi původní verzí (TG 202, 1984) a druhou verzí (TG 211, 1998) Pokynu pro zkoušku toxicity pro reprodukci byly tyto:

— doporučeným druhem, který má být použit, je *Daphnia magna*,

— zkouška trvá 21 dnů,

— pro semistatické zkoušky byl počet organismů, které mají být použity při každé zkušební koncentraci, snížen z alespoň 40, nejlépe rozdělených do čtyř skupin po 10 organismech, na alespoň 10 organismů nasazených jednotlivě (ačkoli při průtokových zkouškách je možné použít odlišná uspořádání),

— byla vydána konkrétnější doporučení, pokud jde o zkušební médium a podmínky krmení.

— hlavní rozdíly mezi druhou verzí pokynů pro zkoušku toxicity pro reprodukci (TG 211, 1998) a touto verzí jsou tyto:

— byl přidán dodatek 7 s cílem popsat postupy pro zjištění pohlaví novorozenců, je-li požadováno. V souladu s předchozími verzemi této zkušební metody je volitelným koncovým bodem poměr pohlaví,

— počet živých potomků pocházejících z jednoho přeživšího rodičovského organismu jako proměnná odezvy byla nahrazena jinou proměnnou odezvy pro reprodukci dafnií, tj. celkovým počtem živých potomků na konci zkoušky pocházejících z jedné rodičovské dafnie na začátku zkoušky, čímž se vyloučí z analýzy náhodná a/nebo bezděčná mortalita rodičovských organismů. Cílem přidání této proměnné odezvy je uvést tuto proměnnou odezvy do souladu s jinými zkouškami toxicity pro reprodukci na bezobratlých. V souvislosti s touto proměnnou odezvy je dále možné odstranit zdrojovou chybu v této zkušební metodě, a sice účinek bezděčné a/nebo náhodné mortality rodičovských organismů, pokud by k ní došlo během expoziční doby,

— byly zařazeny další statistické pokyny pro uspořádání zkoušky a zpracování výsledků jak pro přístup se stanovením ECx (např. EC10 nebo EC50), tak pro přístup se stanovením NOEC/LOEC,

— zavádí se limitní zkouška.

Použité definice jsou uvedeny v dodatku 1.

PODSTATA ZKOUŠKY

Hlavním cílem zkoušky je posoudit účinky chemických látek na reprodukční schopnost druhu *Daphnia magna*. Za tímto účelem se mladé samičí dafnie (rodičovské organismy) na začátku zkoušky mladší než 24 hodin exponují zkoušené látce přidané do vody v určitém rozsahu koncentrací. Zkouška trvá 21 dní. Na konci zkoušky se odhadne celkový počet vylíhnutých živých potomků. Reprodukční schopnost rodičovských organismů lze vyjádřit jiným způsobem (např. jako počet živých potomků pocházejících z jednoho rodičovského organismu za den, a to od prvního dne, kdy bylo potomstvo pozorováno), který se však uvede doplňkově vedle celkového počtu vylíhnutých živých potomků na

▼M7

konci zkoušky. Vzhledem ke zvláštnímu uspořádání semistatické zkoušky ve srovnání s jinými metodami zkoušení toxicity pro reprodukci bezobratlých je také možné spočítat živé potomky pocházející z každého jednotlivého rodičovského organismu. To na rozdíl od jiných metod zkoušení toxicity pro reprodukci bezobratlých umožňuje v případě, že rodičovský organismus v době zkoušky náhodně a/nebo bezděčně uhyne, vyloučit jeho potomstvo z hodnocení údajů. A tedy, dojde-li k mortalitě rodičovských organismů v exponovaných paralelních skupinách, mělo by být posouzeno, zda tato mortalita odpovídá vztahu koncentrace a účinku, či nikoli, např. zda existuje významný pokles účinku v závislosti na koncentraci zkoušené chemické látky s kladnou směrnicí (k tomu lze použít statistický test, například Cochranovu-Armitageovu zkoušku trendu). Jestliže mortalita neodpovídá vztahu koncentrace a účinku, měly by být tyto paralelní skupiny s mortalitou rodičovských organismů z analýzy výsledků zkoušky vyloučeny. Pokud mortalita odpovídá vztahu koncentrace a účinku, měla by být mortalita rodičovských organismů označena za účinek zkoušené chemické látky a paralelní skupiny by neměly být z analýzy vyloučeny. Uhyne-li rodičovský organismus během zkoušky, tj. náhodně v důsledku nesprávné manipulace nebo nehody nebo bezděčně z nevysvětlitelného důvodu nesouvisejícího s účinkem zkoušené chemické látky, nebo se ukáže, že šlo o samčí organismus, je paralelní skupina z analýzy vyloučena (podrobněji viz odstavec 51). Toxický účinek zkoušené chemické látky na reprodukční schopnost se vyjadřuje jako LCx a ECx, přičemž údaje se zanášejí do vhodného modelu nelineární regresí s cílem odhadnout koncentraci, která by způsobila mortalitu nebo snížení reprodukční schopnosti ve výši x %, nebo alternativně jako hodnota NOEC/LOEC (4). Zkoušené koncentrace by měly přednostně zahrnovat nejnižší z použitých koncentrací s pozorovatelnými účinky (např. EC10), což znamená, že tato hodnota je vypočtena interpolací, a nikoli extrapolací.

Musí být rovněž uvedeno přežití rodičovských organismů a okamžik vylíhnutí prvních potomků. Zkoumány mohou být i jiné účinky na parametry, jako je růst (např. délka), a možná i vnitřní míra růstu populace (viz odstavec 44).

INFORMACE O ZKOUŠENÉ LÁTCE

Výsledky zkoušky akutní toxicity (viz kapitola C.2 této přílohy: Zkouška akutní imobilizace dafnií (*Daphnia sp.*)) provedené u *Daphnia magna* mohou být užitečné pro volbu vhodného rozsahu zkušebních koncentrací ve zkouškách toxicity pro reprodukci. Měly by být známy rozpustnost zkoušené chemické látky ve vodě a tlak jejích par a měla by být k dispozici spolehlivá analytická metoda kvantitativního stanovení chemické látky ve zkušebních roztocích, a to s doloženým výtěžkem a mezí stanovitelnosti.

Užitečnými informacemi o zkoušené chemické látce pro účely stanovení zkušebních podmínek mohou být strukturní vzorec, čistota chemické látky, stabilita na světle, stabilita v podmínkách zkoušky pKa, Pow a výsledky zkoušky snadné biologické rozložitelnosti (viz kapitoly C.4 (Stanovení „snadné“ biologické rozložitelnosti) a C.29 (hodnocení snadné biologické rozložitelnosti – uvolňování CO2 v těsně uzavřených lahvičkách) této přílohy).

VALIDITA ZKOUŠKY

Má-li být zkouška platná, musí být u kontrolní skupiny (kontrolních skupin) splněna tato kritéria reprodukční schopnosti:

— mortalita rodičovských organismů (dafnií samičího pohlaví) nesmí na konci zkoušky překročit 20 %,

— střední hodnota počtu živých potomků pocházejících z jednoho rodičovského organismu živého na konci zkoušky je ≥ 60.

Poznámka: Stejné kritérium validity (20 %) lze použít pro náhodnou a bezděčnou mortalitu rodičovských organismů v kontrolních skupinách a také pro každou ze zkušebních koncentrací.

▼M7

POPIS METODY

Přístroje a pomůcky

Zkušební nádoby nebo jiné pomůcky a přístroje, které přijdou do styku se zkušebními roztoky, by měly být skleněné nebo z jiného chemicky inertního materiálu. Zkušebními nádobami jsou obvykle skleněné kádinky.

Kromě toho bude nezbytné některé nebo veškeré toto zařízení:

— přístroj pro měření koncentrace kyslíku (s mikroelektrodou nebo jiným vhodným vybavením na měření koncentrace rozpuštěného kyslíku ve vzorcích malého objemu),

— vhodný přístroj pro regulaci teploty,

— pH-metr,

— vybavení pro stanovení tvrdosti vody,

— zařízení pro stanovení celkového organického uhlíku (TOC) ve vodě nebo zařízení pro stanovení chemické spotřeby kyslíku (COD),

— vhodné zařízení pro ovládání režimu osvětlení a pro měření intenzity světla.

Zkušební organismy

Ke zkoušce se použije druh *Daphnia magna Straus* ([1]).

Klon by měl být identifikován přednostně uvedením genotypu. Výzkum (1) ukázal, že reprodukční schopnost klonu A (který pochází z institutu IRCHA ve Francii) (5) stabilně splňuje kritérium validity, jímž je 60 potomků na přeživší rodičovský organismus při kultivaci za podmínek popsaných v této metodě. Jiné klony jsou však přijatelné, splňuje-li kultura dafnií prokazatelně kritéria validity pro tuto zkoušku.

Na začátku zkoušky by měly být dafnie nejvýše 24 hodin staré a neměly by pocházet z první generace potomků. Měly by pocházet ze zdravé kultury (tj. neměly by vykazovat známky stresu, např. zvýšenou mortalitu, přítomnost jedinců samčího pohlaví a efipií, zpoždění produkce prvních potomků, přítomnost jinak zbarvených jedinců atd.). Organismy z kmenové kultury by měly být chovány v podmínkách podobných těm, které mají být použity při zkoušce (osvětlení, teplota, médium, krmení a počet dafnií na jednotku objemu). Liší-li se kultivační médium pro dafnie, které má být použito při zkoušce, od média používaného k rutinní kultivaci dafnií, doporučuje se zařadit před zkouškou obvykle třítýdenní aklimatizační období (tj. v délce odpovídající jedné generaci), aby nedošlo u rodičovských organismů ke stresu.

Zkušební médium

Doporučuje se, aby bylo v této zkoušce použito přesně definované médium. Tím se lze vyhnout použití přísad (např. mořských řas, extraktu z půdy), které je obtížné charakterizovat, a zvýšit tak vyhlídky mezilaboratorní standardizace. Elendtova média M4 (6) a M7 (viz odstavec 2) byla shledána pro tento účel jako vyhovující. Jiná média (např. (7, 8)) jsou však přijatelná, splňuje-li reprodukční schopnost kultury dafnií prokazatelně kritéria validity pro tuto zkoušku.

([1]) Jiné dafnie mohou být použity, pokud splňují příslušná kritéria validity (kritérium validity týkající se reprodukční schopnosti kontrolních skupin by mělo být relevantní pro všechny druhy). Použijí-li se jiné druhy dafnií, musí být jasně identifikovány a jejich použití musí být zdůvodněno.

▼M7

Použije-li se médium, které obsahuje nestanovené přísady, měly by být tyto přísady jasně specifikovány a v závěrečné zprávě se uvedou informace o složení, a to zejména o obsahu organického uhlíku, neboť může přispívat k dodávané potravě. Doporučuje se, aby byl stanoven celkový organický uhlík (TOC) a/nebo chemická spotřeba kyslíku (COD) výchozího preparátu organické přísady a aby byl odhadnut výsledný příspěvek k TOC nebo COD ve zkušebním médiu. Dále se doporučuje, aby byly úrovně TOC v médiu (tj. před přidáním řas) nižší než 2 mg/l (9).

Při zkoušení chemických látek obsahujících kovy je důležité si uvědomit, že vlastnosti zkušebního média (např. tvrdost, chelatační schopnosti) mohou mít vliv na toxicitu chemické látky. Z tohoto důvodu je žádoucí, aby bylo médium přesně definováno. V současnosti jsou však jedinými přesně definovanými médii, o nichž je známo, že jsou vhodná pro dlouhodobou kultivaci kultury druhu *Daphnia magna*, Elendtova média M4 a M7. Obě média obsahují chelatační činidlo EDTA. Práce (2) ukázaly, že provádí-li se zkouška v médiích M4 a M7, je „zdánlivá toxicita“ kadmia zpravidla nižší než v médiu, které neobsahuje EDTA. Média M4 a M7 se tedy nedoporučují pro zkoušení chemických látek obsahujících kovy a neměla by se používat ani jiná média obsahující činidla známá svou chelatační schopností. V případě chemických látek obsahujících kovy se doporučuje používat jiné médium, například rekonstituovanou tvrdou sladkou vodu podle ASTM (9), která neobsahuje EDTA. Tato kombinace rekonstituované tvrdé sladké vody podle ASTM a extraktu z řas (10) je vhodná pro dlouhodobou kultivaci druhu *Daphnia magna* (2).

Na začátku zkoušky a v jejím průběhu by měla být koncentrace rozpuštěného kyslíku vyšší než 3 mg/l. Hodnota pH by měla být v rozmezí 6 až 9 a zpravidla by se neměla v žádné zkoušce měnit o více než 1,5. Doporučuje se tvrdost nad 140 mg/l (jako $CaCO_3$). Ve zkouškách při této a vyšší tvrdosti reprodukční schopnost prokazatelně vyhovovala kritériím validity (11, 12).

Zkušební roztoky

Zkušební roztoky o zvolených koncentracích se obvykle připraví ředěním zásobního roztoku. Zásobní roztoky se připraví, pokud možno bez použití rozpouštědel nebo dispergátorů, nejlépe mechanickým mícháním nebo protřepáváním zkoušené chemické látky ve zkušebním médiu, např. protřepáváním, mícháním, pomocí ultrazvuku nebo jinými vhodnými metodami. Upřednostňuje se exponovat zkušební systémy koncentracím zkoušené chemické látky, která má být ve studii použita, tak dlouho, jak je zapotřebí k prokázání udržení stabilních zkušebních koncentrací, dříve než jsou zavedeny zkušební organismy. Je-li zkoušená chemická látka obtížně rozpustná ve vodě, měl by se použít postup popsaný v Pokynu OECD pro manipulaci se složitými látkami (13). Rozpouštědla nebo dispergátory by se používat neměly, ale v některých případech mohou být pro vytvoření zásobního roztoku o vhodné koncentraci nezbytné.

Kromě zkušebních koncentrací by měla být nasazena kontrolní skupina v ředicí vodě s odpovídajícím počtem paralelních skupin a, je-li to nevyhnutelné, kontrolní skupina s rozpouštědlem s odpovídajícím počtem paralelních skupin. Při zkoušce by měla být užita pouze rozpouštědla nebo dispergátory, u nichž bylo šetřením prokázáno, že nemají žádné významné nebo mají jen minimální účinky na proměnné odezvy. Příklady vhodných rozpouštědel (např. aceton, ethanol, methanol, dimethylformamid a triethylenglykol) a dispergátorů (např. Cremophor RH_{40}, 0,01 % methylcelulosa a HCO-40) jsou uvedeny v (13). Použije-li se rozpouštědlo nebo dispergátor, neměla by jeho konečná

▼M7

koncentrace být větší než 0,1 ml/l (13) a ve všech zkušebních nádobách s výjimkou kontrolní skupiny s ředicí vodou by měla být stejná koncentrace. Mělo by však být vynaloženo maximální úsilí k tomu, aby bylo rozpouštědlo udržováno v co nejnižší koncentraci.

POSTUP

Podmínky expozice

Délka expozice

Zkouška trvá 21 dní.

Nasazování

Rodičovské organismy se umístí po jednom do zkušebních nádob s 50 až 100 ml média (u druhu *Daphnia magna*; menší objemy lze použít zejména pro menší dafnie, např. druh *Ceriodaphnia dubia*) v každé nádobě, pokud není pro zkoušení nezbytné průtokové uspořádání zkoušky.

V některých případech může být nezbytné použít větší objemy, aby bylo možné splnit požadavky analytické metody použité pro stanovení koncentrace zkoušené chemické látky, třebaže je sdružování paralelních vzorků k chemické analýze rovněž přípustné. Jsou-li použity objemy větší než 100 ml, může být nezbytné zvýšit dávky podávané dafniím, aby se zajistila odpovídající dostupnost potravy a splnila kritéria validity.

Zkušební organismy

U semistatických zkoušek se nasadí jednotlivě alespoň 10 organismů pro každou zkušební koncentraci a alespoň 10 organismů jednotlivě do kontrolních skupin.

U průtokových zkoušek se ukázalo vhodným rozdělit pro každou koncentraci 40 organismů do čtyř skupin po 10 organismech (1). Může být použit menší počet zkušebních organismů, přičemž se doporučuje na jednu koncentraci rozdělit minimálně 20 organismů do dvou nebo více paralelních skupin o stejném počtu organismů (např. čtyři paralelní skupiny po pěti dafniích). Je třeba poznamenat, že u zkoušek, při nichž se organismy nasazují jako skupiny, nebude možné ze statistické analýzy vyloučit žádné potomky, pokud dojde po zahájení reprodukce k bezděčné/náhodné mortalitě rodičovských organismů, a v takovém případě se proto reprodukční schopnost vyjádří jako celkový počet živých potomků pocházejících z jednoho rodičovského organismu přítomného na začátku zkoušky.

Expozice se rozvrhne pro jednotlivé zkušební nádoby a veškerá další manipulace se zkušebními nádobami se provádí náhodně. Nedodržení této zásady může vést k jednostrannému vychýlení, které může být považováno za účinek koncentrace. Je-li například s experimentálními jednotkami manipulováno v pořadí varianty nebo v pořadí koncentrací, mohl nějaký časově podmíněný efekt, např. únava obsluhy nebo jiné pochybení, vést k vyšším účinkům při vyšších koncentracích. Mohou-li být výsledky ovlivněny počátečními podmínkami zkoušky nebo okolními podmínkami, jako je např. umístění v laboratoři, mělo by být dále zváženo blokové uspořádání zkoušky.

Krmení

U semistatických zkoušek se dafnie krmí přednostně denně, nejméně však třikrát týdně (tj. s výměnou média). Mělo by být vzato v úvahu možné zředění zkušební koncentrace v důsledku přidání potravy, čemuž by mělo být v co největší míře zabráněno suspensí řas v náležité koncentraci. Odchylky od této praxe (např. u průtokových zkoušek) se uvedou ve zprávě.

Potrava rodičovských organismů během zkoušky by měla sestávat přednostně z živých jednobuněčných řas jednoho nebo více těchto druhů: *Chlorella* sp., *Pseudokirchneriella subcapitata* (dříve *Selenastrum capricornutum*) a *Desmodesmus subspicatus* (dříve *Scenedesmus subspicatus*). Dodávaná potrava by měla vycházet z množství organického uhlíku (C) dodávaného na jeden rodičovský organismus. Výzkum (14) ukázal, že u druhu *Daphnia magna* je množství potravy obsahující od 0,1 do 0,2 mg C na dafnii za den dostatečné na to, aby bylo dosaženo požadovaného živého potomstva nezbytného pro splnění kritérií validity. Potrava může být dodávána buď v konstantních dávkách po celou dobu

▼M7

zkoušky, nebo podle požadavku v nižších dávkách na začátku zkoušky a poté ve zvyšujících se dávkách s ohledem na růst rodičovských organismů. V takovém případě by mělo množství potravy po celou dobu obsahovat doporučené množství 0,1 až 0,2 mg C na dafnii za den.

Použije-li se k určení požadovaného množství potravy zástupný ukazatel, jako je počet jednobuněčných řas nebo absorbance ve viditelném světle (z praktických důvodů, neboť měření obsahu uhlíku je časově náročné), měla by každá laboratoř vytvořit vlastní nomogram vztahu zástupného ukazatele a obsahu uhlíku v kultuře řas (viz dodatek 3 s návodem na vytvoření nomogramu). Nomogramy by měly být ověřovány jednou ročně a častěji v případě, že se změní podmínky kultivace řas. Absorbance ve viditelném světle byla shledána lepším zástupným ukazatelem celkového obsahu uhlíku než počet buněk (15).

Dafniím by měla být dodávána koncentrovaná suspense řas, aby se minimalizoval objem kultivačního média řas uváděný do zkušební nádoby. Zkoncentrování řas lze dosáhnout centrifugací a následnou resuspenzí v kultivačním médiu dafnií.

Osvětlení

16 hodin světla při intenzitě nepřekračující 15 až 20 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ naměřené na hladině vody v nádobě. Měří-li se intenzita osvětlení luxmetry, ekvivalentní rozpětí 1 000 až 1 500 lx pro chladné bílé světlo odpovídá přibližně doporučené světelné intenzitě 15–20 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$).

Teplota

Teplota zkušebního média by měla být v rozmezí 18–22 °C. V žádné zkoušce by však teplota neměla v těchto mezích kolísat o více než 2 °C (např. 18 až 20, 19 až 21 nebo 20 až 22 °C). Pro účely sledování teploty může být vhodné použít další zkušební nádobu.

Provzdušňování

Zkušební nádoby by neměly být během zkoušky provzdušňovány.

Uspořádání zkoušky

Zkouška ke stanovení rozsahu

Je-li to nezbytné, provede se zkouška ke stanovení rozsahu například s pěti koncentracemi zkoušené chemické látky a s dvěma paralelními skupinami pro každou expozici a s kontrolní skupinou. Při rozhodování o rozsahu koncentrací, které ve zkoušce ke stanovení rozsahu mají být použity, mohou být užitečné i další informace o akutní toxicitě pro druh *Daphnia magna* a/nebo pro jiné vodní organismy, získané při zkouškách s obdobnými chemickými látkami nebo z literatury.

Zkoušky pro stanovení rozsahu trvají 21 dní nebo tak dlouho, aby bylo možné spolehlivě předpovědět úrovně účinků. Na konci zkoušky se vyhodnotí reprodukce dafnií. Počet rodičovských organismů a výskyt potomstva by měl být zaznamenán.

Hlavní zkouška

Zpravidla se použije alespoň pět zkušebních koncentrací zahrnujících účinnou koncentraci (např. EC_x a tvořících geometrickou řadu s faktorem nepřekračujícím 3,2. Měl by se použít přiměřený počet paralelních zkušebních skupin v rámci každé zkušební koncentrace (viz odstavce 24–25). Použití méně než pěti koncentrací by mělo být zdůvodněno. Chemické látky by neměly být zkoušeny při

▼M7

koncentracích vyšších, než je jejich rozpustnost ve zkušebním médiu. Před provedením experimentu se doporučuje posoudit statistickou sílu uspořádání zkoušek a použití vhodných statistických metod (4). Při volbě rozsahu koncentrací by měly být zohledněny tyto zásady:

i) má-li být pro účinky na reprodukci odhadnuta ECx, doporučuje se, aby byl použit dostatečný počet koncentrací s cílem zjistit ECx s přijatelným intervalem spolehlivosti. Odhadovaná hodnota ECx by se měla nacházet mezi použitými zkušebními koncentracemi, aby byla získána spíše interpolací než extrapolací. Pro účely následné statistické analýzy je výhodné mít více zkušebních koncentrací (např. 10) a méně paralelních skupin pro každou koncentraci (např. 5, čímž celkový počet nádob zůstane stejný) a s 10 kontrolními skupinami;

ii) má-li být odhadnuta LOEC a/nebo NOEC, měla by být nejnižší zkušební koncentrace dostatečně nízká, aby nebyla reprodukční schopnost při této koncentraci významně nižší, než je reprodukční schopnost v kontrolní skupině. V opačném případě by měla být zkouška opakována se sníženou nejnižší koncentrací;

iii) má-li být odhadnuta LOEC a/nebo NOEC, měla by být nejvyšší zkušební koncentrace dostatečně vysoká, aby byla reprodukční schopnost při této koncentraci významně nižší, než je reprodukční schopnost v kontrolní skupině. V opačném případě by měla být zkouška opakována se zvýšenou nejvyšší koncentrací, pokud jako nejvyšší zkušební koncentrace v počáteční zkoušce nebyla použita maximální požadovaná zkušební koncentrace pro zkoušení chronických účinků (tj. 10 mg/l).

Nejsou-li při nejvyšší koncentraci v rámci zkoušky ke stanovení rozsahu (např. při 10 mg/l) zjištěny žádné účinky nebo pokud je zkoušená chemická látka na základě nezaznamenané toxicity pro jiné organismy a/nebo na základě nízkého/žádného příjmu je s vysokou pravděpodobností málo toxická nebo netoxická, je možné provést zkoušku toxicity pro reprodukci jako limitní zkoušku s použitím zkušební koncentrace např. 10 mg/l a kontrolní skupiny. K exponované i ke kontrolní skupině by mělo být použito deset paralelních skupin. Pokud by bylo nutné provést limitní zkoušku v průtokovém systému, bude stačit méně paralelních skupin. Limitní zkouška umožní prokázat, že při mezní koncentraci není žádný statisticky významný účinek, ale jsou-li účinky zaznamenány, bude zpravidla nutné provést úplnou zkoušku.

Kontroly

Kromě zkušební série se nasadí jedna série kontrolních skupin pro kontrolu zkušebního média a podle potřeby jedna série kontrolních skupin obsahujících rozpouštědlo nebo dispergátor. Použije-li se rozpouštědlo nebo dispergátor, měla by být jejich koncentrace stejná jako koncentrace v nádobách se zkoušenou chemickou látkou. Použije se vhodný počet paralelních skupin (viz odstavce 23–24).

V dobře vedených zkouškách by měl být variační koeficient středního počtu živých potomků připadajících na rodičovský organismus v kontrolní skupině (kontrolních skupinách) zpravidla ≤ 25 % a měl být uveden v návrzích zkoušek s oddělenými jedinci.

Obnovování zkušebního média

Četnost obnovování média bude záviset na stabilitě zkoušené chemické látky, médium se však obnovuje alespoň třikrát týdně. Není-li podle předběžných zkoušek stability (viz odstavec 7) koncentrace zkoušené látky po maximální dobu mezi obnoveními média (tj. po tři dny) stálá (tj. nepohybuje-li se v intervalu 80–120 % nominální koncentrace nebo klesá-li pod 80 % naměřené počáteční koncentrace), mělo by být zváženo častější obnovování média nebo průtoková zkouška.

▼M7

Při obnovování média v semistatických zkouškách se připraví druhá série zkušebních nádob a rodičovské organismy se do nich přenesou např. skleněnou pipetou o vhodném průměru. Objem média přeneseného s dafniemi by měl být co nejmenší.

Pozorování

Výsledky pozorování prováděných během zkoušky se zaznamenávají do přehledu údajů (viz příklady v dodatcích 4 a 5). Jsou-li požadována další měření (viz odstavec 44), může být nezbytné provádět další pozorování.

Potomstvo

Potomstvo pocházející z každého rodičovského organismu se od jeho prvního výskytu nejlépe denně vybírá a počítá, aby nespotřebovávalo potravu určenou pro rodičovský organismus. Pro účely této zkušební metody je třeba počítat pouze živé potomstvo, avšak přítomnost nevylíhnutých vajíček nebo mrtvého potomstva se zaznamená.

Mortalita

Mortalita rodičovských organismů se zaznamenává přednostně denně, nebo by měla být stanovována alespoň při počítání potomstva.

Další parametry

Třebaže je tato zkušební metoda navržena hlavně k posouzení účinků na reprodukční schopnost, mohou však být i jiné účinky kvantifikovány v míře dostatečné pro statistickou analýzu. Může být zaznamenána reprodukční schopnost na jeden přeživší rodičovský organismus, tj. počet žijících potomků vylíhnutých během zkoušky na jeden přeživší rodičovský organismus To je možné porovnat s hlavní proměnnou odezvy (reprodukční schopnost na jeden rodičovský organismus na začátku zkoušky, který během zkoušky bezděčně nebo náhodně neuhynul). Dojde-li k mortalitě rodičovských organismů v exponovaných paralelních skupinách, mělo by být posouzeno, zda tato mortalita odpovídá vztahu koncentrace a odezvy, či nikoli, např. zda existuje významný pokles odezvy v závislosti na koncentraci zkoušené chemické látky s pozitivní směrnicí (k tomu lze použít statistický test, například Cochranovu-Armitageovu zkoušku trendu). Jestliže mortalita neodpovídá vztahu koncentrace a odezvy, měly by být tyto paralelní skupiny s mortalitou rodičovských organismů z analýzy výsledků zkoušky vyloučeny. Odpovídá-li mortalita vztahu koncentrace a odezvy, měla by být mortalita rodičovských organismů označena za účinek zkoušené chemické látky a paralelní skupiny by neměly být z analýzy výsledků zkoušky vyloučeny. Zvláště měření růstu jsou žádoucí, neboť poskytují informace o možných subletálních účincích, které mohou být užitečné vedle samotných měření reprodukce; doporučuje se na konci zkoušky změřit délku rodičovských organismů (tj. délku těla bez zadečkového hrotu). Mezi další parametry, které lze měřit nebo vypočítávat, patří doba do vylíhnutí prvních plůdků (a následně dalších potomků), počet a velikost potomků na jeden organismus, počet nevylíhnutých plůdků, přítomnost novorozenců samčího pohlaví (OECD, 2008) nebo efipií a možná i vnitřní míra růstu populace (viz dodatek 1 s definicemi a dodatek 7 ke zjištění pohlaví novorozenců).

Četnost analytických stanovení a měření

Koncentrace kyslíku, teplota, tvrdost a pH se měří alespoň jednou týdně před obnovením média a po něm, v kontrolních nádobách a u nejvyšší zkušební koncentrace chemické látky.

Během zkoušky se koncentrace zkoušené chemické látky stanovují v pravidelných intervalech.

U semistatických zkoušek (s obnovováním média), u nichž se má koncentrace zkoušené chemické látky pohybovat v rozmezí ±20 % nominálních hodnot (tj. od 80 do 120 % – viz odstavce 6, 7 a 39), se doporučuje analyzovat alespoň

▼M7

nejvyšší a nejnižší zkušební koncentrace ihned po jejich přípravě a při obnovování, a to jednou během prvního týdne zkoušky (tj. analýzy se provedou na vzorku z téhož roztoku – při jeho přípravě a při obnovování). Tato stanovení se poté opakují alespoň v týdenních intervalech.

U zkoušek, u nichž se nepředpokládá, že se bude koncentrace zkoušené chemické látky pohybovat v rozmezí ± 20 % nominální hodnoty, je nezbytné analyzovat všechny zkušební koncentrace, a to ihned po jejich přípravě a při obnovování. U zkoušek, u nichž není naměřená počáteční koncentrace zkoušené chemické látky v rozsahu ± 20 % nominální koncentrace, avšak u nichž lze dostatečně prokázat, že počáteční koncentrace jsou reprodukovatelné a stálé (tj. od 80 do 120 % počátečních koncentrací), by mohla být stanovení ve 2. a 3. týdnu zkoušky omezena na nejvyšší a nejnižší zkušební koncentrace. Ve všech případech je stanovení koncentrací zkoušené chemické látky před obnovením třeba provést pro každou koncentraci pouze u jedné paralelní nádoby.

U průtokových zkoušek je vhodný podobný vzorkovací režim, jaký je popsán u semistatických zkoušek (v tomto případě se však neprovádí měření „starých“ roztoků). Doporučuje se však zvýšit počet odběrů v prvním týdnu (např. tři sady měření) pro ujištění, že jsou zkušební koncentrace stálé. V těchto typech zkoušky se průtok ředicí vody a zkoušené chemické látky kontroluje denně.

Lze-li prokázat, že byla po celou dobu zkoušky koncentrace zkoušené látky uspokojivě udržována v rozmezí ± 20 % nominální hodnoty nebo naměřené počáteční koncentrace, mohou být výsledky založeny na nominálních nebo naměřených počátečních hodnotách. Je-li odchylka od nominální nebo naměřené počáteční koncentrace větší než ± 20 %, vyjádří se výsledky jako časově vážené střední hodnoty (pro pokyny k výpočtu viz dodatek 6).

ÚDAJE A PŘEDKLÁDÁNÍ ZPRÁV

Zpracování výsledků

Účelem této zkoušky je stanovit účinky zkoušené chemické látky na reprodukční schopnost. Celkový počet potomků na rodičovský organismus se vypočte pro každou zkušební nádobu (tj. pro každou paralelní nádobu). Reprodukci je také možné vypočítat na základě produkce živých potomků přeživším rodičovským organismem. Ekologicky nejvýznamnější proměnnou účinku však je celkový počet živých potomků pocházejících z jednoho rodičovského organismu, který neuhyne náhodně ([1]) nebo bezděčně ([2]) během zkoušky. Jestliže rodičovský organismus během zkoušky náhodně nebo bezděčně uhyne nebo se zjistí, že jde o samečka, vyloučí se nádoba z experimentu. Analýza se poté provede se zmenšeným počtem paralelních nádob. Dojde-li k mortalitě rodičovských organismů v exponovaných paralelních skupinách, mělo by být posouzeno, zda tato mortalita odpovídá vztahu koncentrace a účinku, či nikoli, např. zda existuje významný pokles účinku v závislosti na koncentraci zkoušené chemické látky se sklonem k pozitivnímu účinku (k tomu lze použít statistický test, například Cochranovu-Armitageovu zkoušku trendu). Jestliže mortalita neodpovídá vztahu koncentrace a účinku, měly by být tyto paralelní skupiny s mortalitou rodičovských organismů z analýzy výsledků zkoušky vyloučeny. Odpovídá-li mortalita vztahu koncentrace a účinku, měla by být mortalita rodičovských organismů označena za účinek zkoušené chemické látky a paralelní skupiny by neměly být z analýzy výsledků zkoušky vyloučeny.

Souhrnně vyjádřeno, jsou-li pro vyjádření účinků použity LOEC a NOEC nebo ECx, doporučuje se vypočítat účinek na reprodukci s použitím obou proměnných odezvy uvedených výše, tj.

([1]) Náhodná mortalita: mortalita, která nesouvisí s chemickou látkou a je vyvolaná nahodilými okolnostmi (tj. známou příčinou).

([2]) Bezděčná mortalita: mortalita, která nesouvisí s chemickou látkou a nemá známou příčinu.

▼M7

— jako celkový počet živých potomků pocházejících z jednoho rodičovského organismu, který během zkoušky náhodně nebo bezděčně neuhynul, a

— jako počet živých potomků pocházejících z jednoho přeživšího rodičovského organismu;

a poté jako konečný výsledek použít nejnižší hodnotu NOEC a LOEC nebo ECx vypočítanou pomocí jednoho z těchto dvou proměnných účinků.

Před provedením statistické analýzy, např. postupů ANOVA, porovnání zkušební skupiny s kontrolními skupinami pomocí Studentova t-testu, Dunnettova testu, Williamsova testu nebo Jonckheerova-Terpstrova testu sestupného trendu se doporučuje zvážit transformaci údajů, je-li to nezbytné pro splnění požadavků daného statistického testu. Jako neparametrické alternativy lze zvážit Dunnův nebo Mannův-Whitneyův test. Pro střední hodnoty jednotlivých koncentrací se vypočtou 95 % intervaly spolehlivosti.

Počet přeživších rodičovských organismů v neexponovaných kontrolních skupinách je kritériem validity zkoušky a je třeba jej zdokumentovat. V závěrečné zprávě by měly být zdokumentovány také všechny ostatní škodlivé účinky, např. nenormální chování a významné toxikologické nálezy.

EC_x

Hodnoty ECx, včetně s nimi souvisejících nižších a vyšších hladin intervalu spolehlivosti, se vypočítají vhodnou statistickou metodou (např. pomocí logistické neboli Weibullovy funkce, zkrácenou Spearmanovou-Karberovou metodou nebo prostou interpolací). Pro výpočet EC_{10}, EC_{50} nebo kterékoli jiné hodnoty EC se úplný soubor údajů podrobí regresní analýze.

NOEC/LOEC

Jestliže se při statistické analýze očekává stanovení NOEC/LOEC, je třeba použít vhodné statistické metody podle dokumentu OECD č. 54 – Současné přístupy ve statistické analýze údajů o ekotoxicitě: Pokyny pro aplikaci (4). Nepříznivé účinky zkoušené chemické látky v porovnání s kontrolou se zpravidla zkoumají jednostranným testováním hypotéz při $p \leq 0,05$.

Normalitu rozdělení a homogenitu rozptylu lze prověřit vhodným statistickým testem, např. Shapirovým-Wilkovým testem, případně Leveneovým testem ($p \leq 0,05$). Je možné provést jednocestnou analýzu ANOVA a následné mnohonásobné srovnávací testy. Pro výpočet, zda existují významné rozdíly ($p \leq 0,05$) mezi kontrolními skupinami a různými koncentracemi zkoušené chemické látky, je možné použít mnohonásobné srovnávání (např. Dunnettův test) nebo testy sestupného trendu (např. Williamsův test nebo Jonckheerův-Terpstrův test sestupného trendu) (výběr doporučeného testu se provede podle dokumentu OECD č. 54 (4)). Nebo lze k určení NOEC a LOEC použít neparametrické metody (např. Bonferroniho U-test podle Holma nebo Jonckheerovu-Terpstrovu zkoušku trendu).

Limitní zkouška

Byla-li provedena limitní zkouška (porovnání kontrolní skupiny a pouze jedné exponované skupiny) a jsou-li splněny podmínky pro parametrické zkušební postupy (normalita rozdělení, homogenita rozptylu), je možné hodnotit spojité proměnné pomocí Studentova testu (t-testu). Pokud tyto požadavky nejsou splněny, lze použít t-test nestejných rozptylů (např. Welchův test) nebo neparametrický test, např. Mannův-Whitneyův U-test.

Pro určení významných rozdílů mezi kontrolními skupinami (kontrolní a kontrolní s rozpouštědlem nebo dispergátorem) je možné každou kontrolní skupinu podrobit opakovaným zkouškám, jak bylo popsáno u limitní zkoušky. Pokud tyto zkoušky neodhalí významné rozdíly, údaje ze všech opakování s kontrolou a kontrolou s rozpouštědlem je možné sloučit. V opačném případě by všechny expozice měly být porovnány s kontrolou s rozpouštědlem.

▼M7

Závěrečná zpráva

Závěrečná zpráva obsahuje následující informace:

Zkoušená chemická látka:

— fyzikální povaha a podstatné fyzikálně-chemické vlastnosti,

— údaje o chemické identifikaci včetně údaje o čistotě.

Zkušební druh:

— klon (byl-li geneticky popsán), dodavatel nebo zdroj (je-li znám) a použité kultivační podmínky. Byl-li použit jiný druh než Daphnia magna, musí to být uvedeno a zdůvodněno.

Zkušební podmínky:

— použitý zkušební postup (např. semistatická nebo průtoková metoda, objem, velikost obsádky v počtu dafnií na litr),

— fotoperioda a intenzita světla,

— uspořádání zkoušky (např. počet opakování, počet rodičovských organismů na jedno opakování (paralelní nádobu)),

— podrobnosti o použitém kultivačním médiu,

— přidané organické materiály, byly-li použity, včetně složení, zdroje, metody přípravy, TOC/COD výchozích preparátů, odhad výsledného TOC/COD ve zkušebním médiu,

— podrobné informace o krmení, zejména množství (v mg C na dafnii za den) a harmonogram (např. typ krmiva, včetně specifického názvu (druhu) u řas a kmene, je-li znám, a kultivační podmínky),

— metoda přípravy zásobních roztoků a četnost obnovování (jsou-li použity, uvedou se rozpouštědlo nebo dispergátor a jejich koncentrace).

Výsledky:

— výsledky případných předběžných studií stability zkoušené chemické látky,

— nominální zkušební koncentrace a výsledky všech analýz pro stanovení koncentrace zkoušené chemické látky ve zkušebních nádobách (viz příklady formulářů pro přehled údajů v dodatku 5); uvede se také výtěžek metody a mez stanovitelnosti,

— kvalita vody ve zkušebních nádobách (tj. pH, teplota, koncentrace rozpuštěného kyslíku a TOC a/nebo COD a tvrdost podle potřeby) (viz příklad formuláře pro přehled údajů v dodatku 4),

— úplný záznam o produkci živých potomků během zkoušky na každý rodičovský organismus (viz příklad formuláře pro přehled údajů v dodatku 3),

— počet uhynulých rodičovských organismů a den, kdy k úhynu došlo (viz příklad formuláře pro přehled údajů v dodatku 4),

— variační koeficient reprodukční schopnosti kontrolních skupin (založený na celkovém počtu živých potomků na rodičovský organismus, přeživší do konce zkoušky),

— křivka závislosti celkového počtu živých potomků pocházejících z jednoho rodičovského organismu v každé paralelní nádobě, kromě rodičovských organismů, které případně náhodně nebo bezděčně uhynuly během zkoušky, na koncentraci zkoušené chemické látky,

▼M7

— případně křivka závislosti celkového počtu živých potomků pocházejících z jednoho přeživšího rodičovského organismu v každé paralelní nádobě na koncentraci zkoušené chemické látky,

— je-li k dispozici, nejnižší koncentrace s pozorovanými účinky (LOEC) na reprodukci, včetně popisu použitých statistických metod a údaje o velikosti účinku, jehož detekci lze předpokládat (k získání tohoto údaje je možné před začátkem experimentu provést analýzu výkonu), a koncentrace bez pozorovaných účinků (NOEC) na reprodukci; informace o tom, která proměnná odezvy byla použita pro výpočet hodnot LOEC a NOEC (buď jako celkový počet živých potomků na rodičovský organismus, který během zkoušky náhodně nebo bezděčně neuhynul, anebo jako celkový počet živých potomků na přeživší rodičovský organismus), a je-li k dispozici, uvede se LOEC/NOEC pro mortalitu rodičovských organismů,

— je-li k dispozici, ECx pro reprodukci a interval spolehlivosti (např. 90 % nebo 95 %), dále graf křivky modelu použitého pro její výpočet, směrnice křivky závislosti koncentrace-reakce a její směrodatná odchylka,

— jiné pozorované biologické účinky a jiná měření: uvedou se jakékoli jiné biologické účinky, které byly pozorovány nebo změřeny (např. růst rodičovských organismů), včetně přiměřeného zdůvodnění,

— zdůvodnění jakékoli odchylky od této zkušební metody.

LITERATURA

1) OECD Test Guidelines Programme. Report of the Workshop on the Daphnia magna Pilot Ring Test, Sheffield University, U.K., 20-21 March 1993.

2) OECD (1997). Report of the Final Ring Test of the Daphnia magna Reproduction Test. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No.6. OECD, Paris.

3) OECD (2008). Validation report for an enhancement of OECD TG 211 Daphnia magna reproduction test. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, No.88. OECD, Paris.

4) OECD (2006). Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: a guidance to application. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment Number 54. OECD, Paris.

5) Baird, D.J., et al. (1991). A comparative study of genotype sensitivity to acute toxic stress using clones of Daphnia magna Straus. Ecotox. and Environ. Safety, 21, 257-265.

6) Elendt, B.-P. (1990). Selenium deficiency in Crustacea; An ultrastructural approach to antennal damage in Daphnia magna Straus. Protoplasma, 154, 25–33.

7) EPA (2002). Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms. Fifth Edition. EPA/821/R-02/012. U.S. Environmental Protection Agency, Office of Water, Washington, DC. www.epa.gov/waterscience/methods

8) Vigano, L. (1991). Suitability of commercially available spring waters as standard medium for culturing Daphnia magna. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 47, 775-782.

9) ASTM. (2008) Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians. V: Annual Book of ASTM Standards; Water and Environmental Technology, vol. 11.04; ASTM E729 – 96 (2007) American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA

10) Baird, D.J., et al. (1989). The long term maintenance of Daphnia magna Straus for use in ecotoxicological tests; problems and prospects. V: Proceedings of the 1st European Conference on Ecotoxicology. Copenhagen 1988. (H. Løkke, H. Tyle aF. Bro-Rasmussen. Eds.) s. 144-148.

▼**M7**

11) Parkhurst, B.R., J.L Forte. And G.P. and Wright (1981) Reproducibility of a life-cycle toxicity test with Daphnia magna. Bull. Environ. Contam. and Toxicol., 26: 1-8.

12) Cowgill, U.M. andMilazzo, D.P. (1990). The sensitivity of two cladocerans to water quality variables: salinity and hardness. Arch. Hydrobiol., 120(2): 185-196.

13) OECD (2000), Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures, Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 23. OECD, Paris.

14) Sims, I.R., S. Watson. and D. Holmes (1993) Toward a standard Daphnia juvenile production test. Environ. Toxicol. and Chem., 12, 2053-2058.

15) Sims, I. (1993). Measuring the growth of phytoplankton: the relationship between total organic carbon with three commonly used parameters of algal growth. Arch. Hydrobiol., 128, 459-466.

▼M7

Dodatek 1

DEFINICE

Pro účely této zkušební metody se použijí tyto definice:

Náhodná mortalita: mortalita, která nesouvisí s chemickou látkou a je vyvolána nahodilými okolnostmi (tj. známou příčinou).

Chemická látka: chemická substance nebo směs.

EC_x: koncentrace zkoušené chemické látky rozpuštěné ve vodě, která pro danou expoziční dobu vede k x % snížení reprodukce dafnií.

Bezděčná mortalita: mortalita, která nesouvisí s chemickou látkou a nemá známou příčinu.

Vnitřní míra růstu populace: míra růstu populace, v níž je zahrnuta reprodukční schopnost a mortalita související s věkem (1) (2) (3). V rovnovážném stavu bude nulový. Pro rostoucí populaci bude kladná a pro snižující se populaci bude záporná. Je zřejmé, že při záporném růstu nelze druh zachovat a nakonec dojde k jeho vyhynutí.

Mez detekovatelnosti: nejnižší koncentrace, v níž lze látku detekovat, nikoli však stanovit.

Mez stanovitelnosti: nejnižší koncentrace, v níž lze látku kvantitativně naměřit.

Nejnižší koncentrace s pozorovanými účinky (lowest observed effect concentration, LOEC): nejnižší zkušební koncentrace, při níž je pro danou expoziční dobu pozorován statisticky významný účinek chemické látky na reprodukci a na mortalitu rodičovských organismů (při $p < 0,05$) ve srovnání s kontrolou. Všechny zkušební koncentrace vyšší než LOEC by měly mít škodlivé účinky stejné nebo větší, než jsou účinky pozorované při LOEC. Nelze-li tyto dvě podmínky splnit, mělo by být podrobně vysvětleno, jak byla LOEC (a tedy i NOEC) zvolena.

Mortalita: organismus se zaznamená jako mrtvý, je-li nepohyblivý, tj. není-li schopen plavat nebo není-li u končetin nebo zadečku pozorován pohyb do 15 sekund po lehkém zatřepání zkušební nádobou. (Použije-li se jiná definice, měla by být uvedena společně s odkazem na literaturu.)

Koncentrace bez pozorovaných účinků (no observed effect concentration, NOEC): zkušební koncentrace bezprostředně nižší než LOEC, která při srovnání s kontrolní skupinou nemá pro danou expoziční dobu statisticky významný účinek (při $p < 0,05$).

Potomstvo: mladé dafnie pocházející z rodičovských organismů v průběhu zkoušky.

Rodičovské organismy: dafnie samičího pohlaví, které jsou přítomné na začátku zkoušky, a jejich reprodukční schopnost je předmětem studie

Reprodukční schopnost: počet živých potomků pocházejících z rodičovských organismů za dobu zkoušky.

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

LITERATURA

1) Wilson, E.O. a Bossert, W.H. (1971). A Primer of Population Biology. Sinauer Associates Inc. Publishers.

▼**M7**

2) Poole, R.W. (1974). An Introduction to quantitative Ecology. Mc Graw Hill Series in Population Biology, New York, s. 532.

3) Meyer, J. S., Ingersoll, C. G., McDonald, L.L. and Boyce, M.S. (1986). Estimating uncertainty in population growth rates: Jackknife vs bootstrap techniques. Ecology, 67, 1156–1166.

▼M7

Dodatek 2

PŘÍPRAVA PŘESNĚ DEFINOVANÝCH ELENDTOVÝCH MÉDIÍ M7 A M4

Aklimatizace na Elendtova média M7 a M4

Některé laboratoře narazily na obtíže při přímém přenosu dafnií do médií M4 (1) a M7. Určitého úspěchu však bylo dosaženo postupnou aklimatizací, tj. s přenesením z vlastního média do 30 % Elendtova média, poté do 60 % Elendtova média a nakonec do 100 % Elendtova média. Délky dob aklimatizace mohou být až jeden měsíc.

Příprava

Stopové prvky

Ve vodě vhodné čistoty, např. v deionizované nebo destilované vodě nebo ve vodě přečištěné reverzní osmózou, se nejprve připraví samostatné zásobní roztoky (I) jednotlivých stopových prvků. Z těchto oddělených zásobních roztoků (I) se připraví jeden zásobní roztok (II) obsahující všechny stopové prvky (směsný roztok), tj.:

Zásobní roztok (roztoky) I (jednotlivá látka)	Množství přidané do vody	Koncentrace (vzhledem k médiu M4)	Kombinovaný zásobní roztok II se připraví přidáním následujícího množství zásobního roztoku I do vody	
	mg/l		ml/l	
			M 4	M 7
H_3BO_3	57 190	20 000násobek	1,0	0,25
$MnCl_2 \cdot 4\ H_2O$	7 210	20 000násobek	1,0	0,25
LiCl	6 120	20 000násobek	1,0	0,25
RbCl	1 420	20 000násobek	1,0	0,25
$SrCl_2 \cdot 6\ H_2O$	3 040	20 000násobek	1,0	0,25
NaBr	320	20 000násobek	1,0	0,25
$Na_2MoO_4 \cdot 2\ H_2O$	1 260	20 000násobek	1,0	0,25
$CuCl_2 \cdot 2\ H_2O$	335	20 000násobek	1,0	0,25
$ZnCl_2$	260	20 000násobek	1,0	1,0
$CoCl_2 \cdot 6\ H_2O$	200	20 000násobek	1,0	1,0
KI	65	20 000násobek	1,0	1,0
Na_2SeO_3	43,8	20 000násobek	1,0	1,0
NH_4VO_3	11,5	20 000násobek	1,0	1,0
$Na_2EDTA \cdot 2\ H_2O$	5 000	2 000násobek	—	—
$FeSO_4 \cdot 7\ H_2O$	1 991	2 000násobek	—	—
Jak roztok Na_2EDTA, tak roztok $FeSO_4$ se připraví samostatně, spojí se a ihned se autoklávují. Získají se:				
Roztok Fe-EDTA.		1 000násobek	20,0	5,0

▼**M7**

Média M4 a M7

Média M4 a M7 se připraví ze zásobního roztoku II, makroživin a vitaminů tímto způsobem:

	Množství přidané do vody	Koncentrace (vzhledem k médiu M4)	Množství zásobního roztoku přidané za účelem přípravy média	
	mg/l		ml/l	
			M 4	M 7
Zásobní roztok II (obsahující kombinaci stopových prvků)		2 000násobek	50	50
Zásobní roztok makroživin (jednotlivá látka)				
$CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$	293 800	1 000násobek	1,0	1,0
$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$	246 600	2 000násobek	0,5	0,5
KCl	58 000	10 000násobek	0,1	0,1
$NaHCO_3$	64 800	1 000násobek	1,0	1,0
$Na_2SiO_3 \cdot 9\ H_2O$	50 000	5 000násobek	0,2	0,2
$NaNO_3$	2 740	10 000násobek	0,1	0,1
KH_2PO_4	1 430	10 000násobek	0,1	0,1
KH_2PO_4	1 840	10 000násobek	0,1	0,1
Kombinovaný vitaminový zásobní roztok	—	10 000násobek	0,1	0,1

Kombinovaný vitaminový zásobní roztok se připraví přidáním 3 vitaminů do 1 litru vody takto:

	mg/l			
Thiaminhydrochlorid	750	10 000násobek		
Kyanokobalamin (B_{12})	10	10 000násobek		
Biotin	7,5	10 000násobek		

Kombinovaný vitaminový zásobní roztok se uskladňuje zmrazený v malých stejnoměrných dílech. Vitaminy se do média přidávají krátce před použitím.

Poznámky: Aby nedošlo při přípravě kompletního média k vysrážení solí, přidají se díly zásobních roztoků do asi 500–800 ml deionizované vody a objem se poté doplní na 1 litr.

Poznámky: Poprvé byly informace o médiu M4 uvedeny v práci Elendt, B. P. (1990). Selenium deficiency in crustacea; an ultrastructural approach to antennal damage in Daphnia magna Straus. Protoplasma, 154, 25–33.

▼M7

Dodatek 3

ANALÝZA CELKOVÉHO ORGANICKÉHO UHLÍKU (TOC) A VYTVOŘENÍ NOMOGRAMU PRO OBSAH TOC V KRMIVU NA BÁZI ŘAS

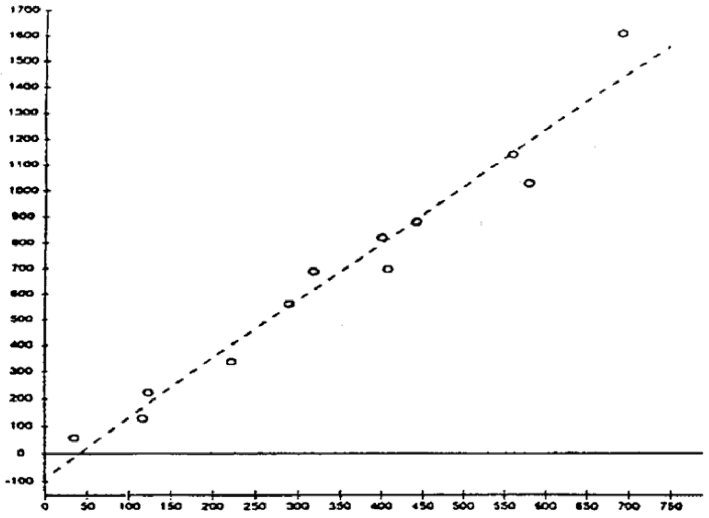
Je známo, že obsah uhlíku v krmivu na bázi řas se obvykle neměří přímo, ale stanoví se z korelací (tj. z nomogramů) se zástupnými ukazateli, jako jsou počet buněk řas nebo absorbance ve viditelném světle.

TOC by měl být stanoven spíše vysokoteplotní oxidací než pomocí UV nebo persíranovou metodou. (Návod viz: The Instrumental Determination of Total Organic Carbon, Total Oxygen Demand and Related Determinands 1979, HMSO 1980; 49 High Holborn, London WC1V 6HB.)

Pro účely vytvoření nomogramu se řasy oddělí od růstového média odstředěním a poté se resuspendují v destilované vodě. Zástupný ukazatel a koncentrace TOC se měří v každém vzorku třikrát. Provede se analýza slepého pokusu s destilovanou vodou a jeho koncentrace TOC se odečte od koncentrace TOC ve vzorku s řasami.

Nomogram by měl být lineární v požadovaném rozsahu koncentrací uhlíku. Příklady jsou uvedeny níže.

Poznámka: Tyto příklady nelze pro účely přepočtu použít; je důležité, aby si laboratoře připravily vlastní nomogramy.



Chlorella vulgaris var. viridis (CCAP 211/12).

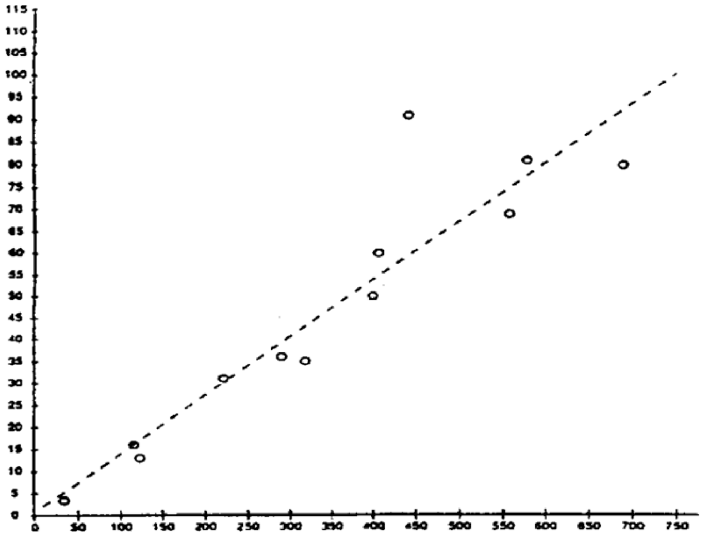
Regresní křivka vztahu koncentrace v mg suché hmotnosti na litr a množství uhlíku v mg C na litr. Údaje z koncentrovaných suspenzí buněk semikontinuálně dávkově kultivovaných buněk, resuspendovaných v destilované vodě.

osa x: mg C na litr koncentrovaného krmiva na bázi řas

osa y: mg suché hmotnosti koncentrovaného krmiva na bázi řas na litr

Korelační koeficient: -0,980

▼**M7**



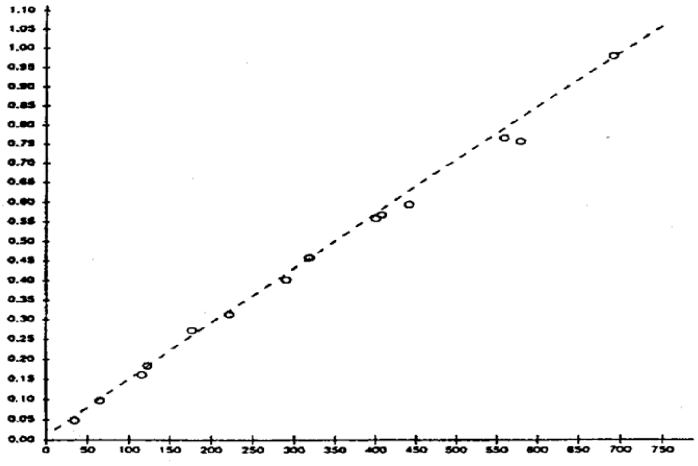
Chlorella vulgaris var. viridis (CCAP 211/12).

Regresní křivka vztahu počtu buněk a množství uhlíku v mg C na litr. Údaje z koncentrovaných suspenzí buněk semikontinuálně dávkově kultivovaných buněk, resuspendovaných v destilované vodě.

osa x: mg C na litr koncentrovaného krmiva na bázi řas

osa y: počet buněk koncentrovaného krmiva na bázi řas na litr (x 108)

Korelační koeficient: -0,926



Chlorella vulgaris var. viridis (CCAP 211/12).

Regresní křivka vztahu absorbance a množství uhlíku v mg C na litr (optická dráha 1 cm). Údaje z koncentrovaných suspenzí buněk semikontinuálně dávkově kultivovaných buněk, resuspendovaných v destilované vodě.

osa x: mg C na litr koncentrovaného krmiva na bázi řas

osa y: absorbance koncentrovaného krmiva na bázi řas zředěného v poměru 1/10 při 440 nm

Korelační koeficient: – 0,998

▼M7

Dodatek 4

PŘÍKLAD FORMULÁŘE PŘEHLEDU ÚDAJŮ PRO ZAZNAMENÁNÍ OBNOVY MÉDIA, SLEDOVANÝCH FYZIKÁLNĚ-CHEMICKÝCH ÚDAJŮ, KRMENÍ, REPRODUKČNÍ SCHOPNOSTI DAFNIÍ A MORTALITY RODIČOVSKÝCH ORGANISMŮ

Experiment č:	Den zahájení:						Klon:			Médium:				Typ krmiva:				Zkoušená chemická látka:					Nominální konc:	
Den	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21		
Obnovení média (zaškrtněte)																								
pH (*)																							nové	
																							staré	
O_2 (mg/l) (*)																							nové	
																							staré	
Teplota (°C) (*)																							nové	
																							staré	
Podání krmiva (zaškrtněte)																								
Počet živých potomků (**)																								Celkem
Nádoba 1																								
2																								
3																								
4																								
5																								

▼M7

Experiment č:	Den zahájení:						Klon:			Médium:				Typ krmiva:				Zkoušená chemická látka:					Nominální konc:	
Den	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21		
6																								
7																								
8																								
9																								
10																								
																							Celkem	
Kumulativní mortalita rodičovských organismů (***)																								

(*) Uvede se, ve které nádobě bylo měření provedeno.
(**) Do příslušné buňky se zaznamenají nevylíhnuté plůdky jako „AB“ (aborted broods).
(***) Do příslušné buňky se zaznamená mortalita rodičovských organismů jako „M“.

▼**M7**

Dodatek 5

PŘÍKLAD FORMULÁŘE PŘEHLEDU ÚDAJŮ PRO ZAZNAMENÁNÍ VÝSLEDKŮ CHEMICKÉ ANALÝZY

a) **Naměřené koncentrace**

Nominální koncentrace	Vzorek z týdne 1		Vzorek z týdne 2		Vzorek z týdne 3	
	Čerstvé médium	Staré médium	Čerstvé médium	Staré médium	Čerstvé médium	Staré médium

b) **Naměřené koncentrace vyjádřené v procentech nominální koncentrace**

Nominální koncentrace	Vzorek z týdne 1		Vzorek z týdne 2		Vzorek z týdne 3	
	Čerstvé médium	Staré médium	Čerstvé médium	Staré médium	Čerstvé médium	Staré médium

▼M7

Dodatek 6

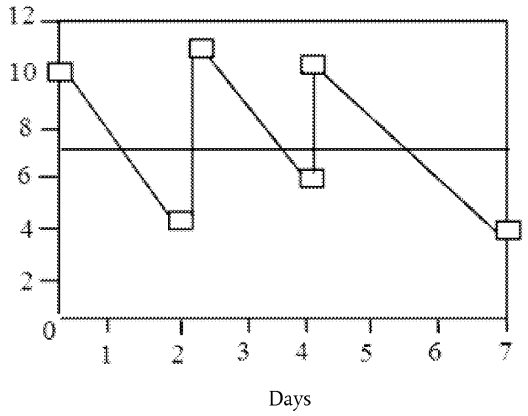
VÝPOČET ČASOVĚ VÁŽENÉ STŘEDNÍ HODNOTY

Časově vážená střední hodnota

Vzhledem k tomu, že mezi výměnami média může koncentrace zkoušené chemické látky klesat, je nezbytné zvážit, jaká koncentrace bude považována za reprezentativní pro rozsah koncentrací, jimž byly rodičovské organismy dafnií vystaveny. Výběr by měl být založen na biologických i statistických úvahách. Vychází-li se například z toho, že reprodukce je ovlivňována hlavně maximální koncentrací, jíž byl organismus vystaven, měla by být použita maximální koncentrace. Považuje-li se však za významnější akumulované nebo dlouhodobé působení toxické chemické látky, má větší opodstatnění průměrná koncentrace. V takovém případě je vhodným průměrem časově vážená střední koncentrace, neboť zohledňuje časové změny okamžité koncentrace.

Obrázek 1

Příklad časově vážené střední hodnoty



Na obrázku 1 je znázorněn příklad (zjednodušené) zkoušky trvající sedm dní s obnovou média v den 0, 2 a 4.

— Tenká klikatá čára znázorňuje koncentraci v kterémkoli okamžiku. Má se za to, že pokles koncentrace sleduje proces exponenciálního rozkladu buněk.

— Šest vyznačených bodů představuje koncentrace naměřené na začátku a na konci období mezi obnoveními média.

— Silná plná čára vyznačuje hodnotu časově vážené střední hodnoty.

Časově vážená střední hodnota je vypočtena tak, aby se plocha pod čarou pro časově váženou střední hodnotu rovnala ploše pod čarou průběhu koncentrace. Výpočet pro výše uvedený příklad je ilustrován v tabulce 1.

Tabulka 1

Výpočet časově vážené střední hodnoty

Obnovení média č.	Dny	Konc 0	Konc 1	Ln (konc 0)	Ln (konc 1)	Plocha
1	2	10,000	4,493	2,303	1,503	13,767
2	2	11,000	6,037	2,398	1,798	16,544
3	3	10,000	4,066	2,303	1,403	19,781

▼M7

Obnovení média č.	Dny	Konc 0	Konc 1	Ln (konc 0)	Ln (konc 1)	Plocha
Celkový počet dnů:	7				Celková plocha:	50,092
					ČV střední hodnota:	7,156

Dny se rozumí počet dnů mezi obnoveními média.

Konc0 je naměřená koncentrace na začátku období mezi obnoveními média.

Konc1 je naměřená koncentrace na konci období mezi obnoveními média.

Ln (konc0) je přirozený logaritmus konc 0.

Ln (konc1) je přirozený logaritmus konc 1.

Plocha je plocha pod exponenciální křivkou pro každé období mezi obnoveními média. Vypočte se z rovnice:

$$Plocha = \frac{konc\ 0 - konc\ 1}{ln(konc\ 0) - ln(konc\ 1)} \times Den$$

Časově vážená střední hodnota (*ČV střední hodnota*) se vypočte jako podíl *celkové plochy* a *celkového počtu dnů*.

Pro zkoušku toxicity pro reprodukci na dafniích se tabulka pochopitelně rozšíří tak, aby pokrývala 21 dnů.

Je zřejmé, že provádí-li se měření pouze na začátku a na konci období mezi obnoveními média, není možné potvrdit, že je proces rozkladu skutečně exponenciální Jiná křivka by vedla k jinému způsobu výpočtu „*plochy*“. Exponenciální rozklad však není nepřijatelný a jemu odpovídající křivka je pravděpodobně optimální, chybí-li jiné informace.

Je však nezbytné postupovat opatrně, není-li v médiu na konci období mezi jeho obnoveními zjištěno žádné množství zkoušené chemické látky. Není-li možné odhadnout, jak rychle chemická látka z roztoku zmizela, není možné získat realistickou plochu pod křivkou, a není tedy možné získat rozumnou časově váženou střední hodnotu.

▼M7

Dodatek 7

POKYNY KE ZJIŠTĚNÍ POHLAVÍ NOVOROZENCŮ

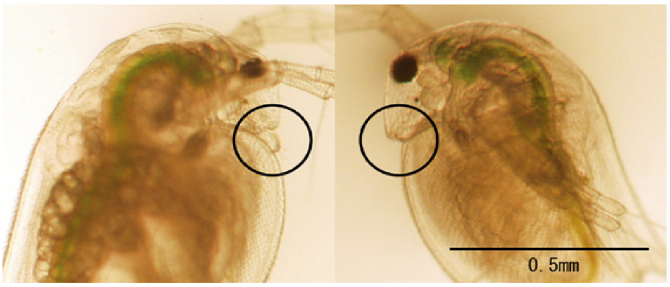
K produkci novorozenců samčího pohlaví může dojít za měnících se podmínek životního prostředí, např. zkracující se fotoperiody, teploty, klesající koncentrace potravy a rostoucí hustoty populace (Hobaek and Larson, 1990; Kleiven et al., 1992). Produkce samečků je také známou reakcí na činitele regulující růst určitých druhů hmyzu (Oda et al., 2005). Za podmínek, kdy chemické stresory vyvolávají pokles reprodukce potomstva u partenogenetických samiček, lze očekávat zvýšený počet samečků (IECD, 2008). Na základě dostupných informací není možné předpovědět, jaký poměr pohlaví nebo který koncový ukazatel reprodukční schopnosti bude citlivější; existují však známky toho (viz validační zpráva, část 1), že zmíněné zvýšení počtu samečků by mohlo být méně citlivé než snížení potomstva. Poněvadž hlavním účelem této zkušební metody je posoudit počet vylíhnutých potomků, je pozorování výskytu samečků jen volitelné. Je-li tento volitelný ukazatel ve studii hodnocen, mělo by být použito další kritérium validity zkoušky, a to, že počet samečků v kontrolních skupinách není větší než 5 %.

Nejpraktičtějším a nejjednodušším způsobem, jak rozlišit pohlaví u dafnií, je použít jejich fenotypové charakteristiky, neboť samečkové a samičky jsou geneticky identičtí a jejich pohlaví je určováno životním prostředím. Samečci a samičky se liší délkou a morfologií prvních tykadel, které jsou u samečků delší než u samiček (obrázek 1). Tento rozdíl je patrný ihned po narození, ačkoli s růstem se vyvíjejí i jiné druhotné pohlavní znaky (viz např. obrázek 2, Olmstead and LeBlanc, 2000).

Za účelem pozorování morfologického pohlaví by novorozenci pocházející od každého zkušebního organismu měli být pipetou přeneseni do Petriho misky se zkušebním médiem. Médium je udržováno na minimu s cílem omezit pohyb organismů. Pozorování prvních tykadel je možné provádět pod stereomikroskopem (× 10–60).

Obrázek 1

Sameček (vlevo) a samička (vpravo) D. magna ve stáří 24 hodin. Samečky lze od samiček odlišit podle délky a morfologie prvních tykadel, jak je vyznačeno v kroužcích (Tatarazako et al., 2004).



ODKAZY

Hobaek A and Larson P. 1990. Sex determination in *Daphnia magna*. Ecology 71: 2255-2268.

Kleiven O.T., Larsson P., Hobaek A. 1992. Sexual reproduction in *Daphnia magna* requires three stimuli. Oikos 65, 197-206.

Oda S., Tatarazako N, Watanabe H., Morita M., and Iguchi T. 2005. Production of male neonates in *Daphnia magna* (Cladocera, Crustacea) exposed to juvenile hormones and their analogs. Chemosphere 61:1168-1174.

▼**M7**

OECD, 2008. Validation report for an enhancement of OECD TG 211 *Daphnia magna* reproduction test. OECD Series on Testing and Assessment, Number 88. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.

Olmstead, A.W., LeBlanc, G.A., 2000. Effects of endocrine-active chemicals on the development characteristics of *Daphnia magna*. Environmental Toxicology and Chemistry 19:2107-2113.

Tatarazako, N., Oda, S., Abe, R., Morita M. and Iguchi T., 2004. Development of a screening method for endocrine disruptors in crustaceans using *Daphnia magna* (Cladocera, Crustacea). Environmental Science 17, 439-449.

▼B

C.21. **PŮDNÍ MIKROORGANISMY: ZKOUŠKA NA TRANSFORMACI DUSÍKU**

1. **METODA**

Tato zkušební metoda je replikou metody OECD TG 216 (2000).

1.1. ÚVOD

Tato zkušební metoda popisuje laboratorní postup pro vyšetřování dlouhodobých účinků chemických látek po jednorázové expozici na aktivitu půdních mikroorganismů při transformaci dusíku. Tato zkouška je v zásadě založena na doporučení Evropské a středozemní organizace ochrany rostlin (European and Mediterranean Plant Protection Organization, EPPO) (1). Bylo však přihlédnuto i k jiným doporučením, např. doporučením německého ústavu Biologische Bundesanstalt (2), agentury US Environmental Protection Agency (3), společnosti SETAC (4) a Mezinárodní organizace pro normalizaci (5). O počtu a druzích půd, které mají být použity ve zkoušce, byla učiněna dohoha na semináři OECD o výběru půd a sedimentů v Belgirate v Itálii v roce 1995 (6). Doporučení pro odběr, zpracování a skladování půdních vzorků vychází ze směrnice ISO (7) a z doporučení semináře v Belgirate. Při posuzování a hodnocení toxických vlastností zkoušených látek bude zřejmě nezbytné stanovit účinky na aktivitu půdních mikroorganismů, např. jsou-li požadovány údaje o vedlejších účincích přípravků na ochranu rostlin na půdní mikroflóru nebo očekává-li se expozice půdních mikroorganismů chemickým látkám jiným než přípravkům na ochranu rostlin. Cílem zkoušky na transformaci dusíku je zjistit účinky takových chemických látek na půdní mikroflóru. Pokud se zkoušejí agrochemikálie (např. přípravky na ochranu rostlin, hnojiva, chemické přípravky pro lesnictví), provádí se jak zkouška na transformaci dusíku, tak zkouška na transformaci uhlíku. Pokud se zkoušejí jiné chemické látky než agrochemikálie, postačuje zkouška na transformaci dusíku. Nacházejí-li se však u těchto chemických látek hodnoty EC_{50} pro transformaci dusíku v rozpětí hodnot pro komerčně dostupné inhibitory nitrifikace (např. nitrapyrin), lze pro získání dalších informací provést zkoušku na transformaci uhlíku.

Půdy se skládají z živých a neživých složek, které se vyskytují ve formě složitých a heterogenních směsí. Mikroorganismy hrají důležitou roli v rozkladu a transformaci organických látek v úrodných půdách, přičemž různé druhy přispívají k různým aspektům úrodnosti půdy. Jakékoli dlouhodobé narušení těchto biochemických procesů může porušit koloběh živin a tak mít vliv na úrodnost půdy. K transformaci uhlíku a dusíku dochází u všech úrodných půd. Ačkoliv se populace mikroorganismů odpovědných za tyto procesy u jednotlivých půd liší, jedná se v podstatě o totéž schéma transformace.

Popsaná zkušební metoda slouží ke zjištění dlouhodobých nepříznivých účinků látky na proces transformace dusíku v aerobních povrchových půdách. Tato metoda rovněž umožňuje odhadnout účinky látek na transformaci uhlíku půdní mikroflórou. K tvorbě dusičnanů dochází po rozpadu vazeb uhlík-dusík. Pokud je tedy u zkušebních a kontrolních půd zjištěna stejná rychlost tvorby dusičnanů, je vysoce pravděpodobné, že hlavní schéma odbourávání uhlíku je neporušené a funkční. Substrát zvolený pro zkoušku (prášková vojtěšková moučka) má příznivý poměr uhlíku a dusíku (obvykle od 12/1 do 16/1). Je tedy snížen nedostatek uhlíku v průběhu zkoušky, a dojde-li k poškození populace mikroorganismů chemickou látkou, může k jejich obnově dojít opět do 100 dnů.

▼B

Zkouška, z níž vychází tato zkušební metoda, byla zprvu vyvinuta pro látky, u nichž lze předvídat množství, které pronikne do půdy. Příkladem jsou přípravky na ochranu rostlin, u nichž je polní aplikační dávka známá. U agrochemikálií postačuje provést zkoušku se dvěma úrovněmi dávky, které odpovídají předpokládané nebo odhadované aplikační dávce. U agrochemikálií lze zkoušet účinné složky nebo přípravky v komerční úpravě. Použití zkoušky však není omezeno pouze na agrochemikálie. Změnou množství zkoušené látky aplikované na půdu a způsobu vyhodnocení údajů lze zkoušku využít také pro chemické látky, u nichž není známo, v jakém množství proniknou do půdy. U jiných chemických látek než agrochemikálií se tedy stanovuje účinek řady koncentrací na transformaci dusíku. Data z těchto zkoušek se použijí k sestrojení křivky závislosti odezvy na dávce a k výpočtu hodnot EC_x, kde x je procentuální účinek.

1.2. DEFINICE

Transformace dusíku: konečný rozklad dusíkaté organické látky mikroorganismy cestou amonifikace a nitrifikace na příslušný konečný anorganický produkt – dusičnan.

EC_x (Účinná koncentrace): koncentrace zkoušené látky v půdě, která vede k x-procentní inhibici transformace dusíku na dusičnan.

EC_{50} (Medián účinné koncentrace): koncentrace zkoušené látky v půdě, která vede k 50 % inhibici transformace dusíku na dusičnan.

1.3. REFERENČNÍ LÁTKY

Nejsou uvedenay.

1.4. PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

Do proseté půdy se vpraví prášková rostlinná moučka a na půdu se poté aplikuje zkoušená látka, nebo se půda ponechá nedotčená (jako kontrola). Při zkoušení agrochemikálií se doporučuje provést zkoušku s nejméně dvěma koncentracemi zvolenými tak, aby byly v určitém vztahu k nejvyšší předpokládané koncentrací na poli. Po 0, 7, 14 a 28 dnech inkubace se vzorky exponované a kontrolní půdy vyluhují vhodným rozpouštědlem a stanoví se obsah dusičnanů. Rychlost tvorby dusičnanů v exponovaných vzorcích se porovnává s rychlostí v kontrolních vzorcích a vypočte se procentuální odchylka hodnot experimentálních vzorků od kontrolních vzorků. Všechny zkoušky musí probíhat alespoň 28 dnů. Jsou-li 28. den rozdíly mezi experimentální a kontrolní půdou 25 % nebo větší, v měření se pokračuje až do 100 dnů. Při zkoušení jiných látek než agrochemikálií se do vzorků půdy přidá řada koncentrací zkoušené látky a množství vzniklých dusičnanů v experimentálních a kontrolních vzorcích se měří po 28denní inkubaci. Výsledky zkoušek s více koncentracemi se analyzují za použití regresního modelu a vypočtou se hodnoty EC_x (tj. EC_{50}, EC_{25} a/nebo EC_{10}). Viz definice.

1.5. VALIDITA ZKOUŠKY

Vyhodnocení výsledků zkoušek u agrochemikálií se provádí s relativně malými rozdíly (tj. průměrná hodnota ± 25 %) mezi koncentracemi dusičnanů v kontrolní a exponovaných vzorcích, takže velké kolísání u kontrolních vzorků může vést k nesprávným výsledkům. Rozdíly mezi jednotlivými kontrolními vzorky by proto měly být menší než ± 15 %.

▼B

1.6. POPIS ZKUŠEBNÍ METODY

1.6.1. **Zkušební zařízení**

Při zkoušce se použijí nádoby z chemicky inertního materiálu. Měly by mít vhodný objem, ktery bude odpovídat postupu použitému pro inkubaci půdy, tzn. buď inkubace celého množství půdy, nebo inkubace jednotlivých vzorků půdy (viz oddíl 1.7.1.2). Je třeba, aby během zkoušky došlo k co nejmenším ztrátám vody a aby byla umožněna výměna plynů (např. tím, že se nádoby zakryjí perforovanou polyethylenovou fólií). Při zkoušení těkavých látek se použijí hermeticky uzavíratelné nádoby. Měly by být tak velké, aby přibližně jedna čtvrtina jejich objemu byla zaplněna vzorkem půdy.

Použije se standardní laboratorní vybavení, které zahrnuje:

— třepačku: mechanickou třepačku nebo rovnocenné vybavení,

— odstředivku (3 000 g) nebo filtrační zařízení (za použití filtračního papíru bez dusičnanů),

— měřicí zařízení pro stanovení dusičnanů s vhodnou citlivostí a reprodukovatelností.

1.6.2. **Výběr a počet půd**

Použije se jedna půda. Půda by měla mít tyto charakteristiky:

— obsah písku: nejméně 50 % a nejvýše 75 %,

— pH: 5,5–7,5,

— obsah organického uhlíku: 0,5–1,5 %,

— stanoví se mikrobiální biomasa (8, 9) a její uhlík by měl tvořit nejméně 1 % celkového organického uhlíku v půdě.

Ve většině případů představuje půda s těmito charakteristikami nejhorší případ, neboť adsorpce zkoušené chemické látky je minimální a její dostupnost pro mikroorganismy je maximální. V důsledku toho je zpravidla zkoušení s dalšími půdami zbytečné. Za určitých okolností však může být použití další půdy nezbytné, např. při zamýšleném hlavním použití zkoušené látky na určité druhy půd, jako jsou kyselé lesní půdy nebo elektrostaticky nabité půdy.

▼B

1.6.3. **Odběr a skladování vzorků půd**

1.6.3.1. *Odběr*

K dispozici by měly být podrobné informace o historii místa, ze kterého je půda odebírána. Mezi těmito informacemi musí být přesná poloha, vegetace, údaje o ošetřování přípravky na ochranu rostlin, použití organických a minerálních hnojiv, přídavky biologického materiálu nebo náhodná kontaminace. Pro odběr půdy by mělo být zvoleno místo, které umožňuje dlouhodobé používání. Vhodnými místy jsou trvalé pastviny, pole s jednoletými obilovinami (kromě kukuřice) nebo hustě oseté plochy zeleného hnojení. Místa vybraná pro odběr vzorků by neměla být minimálně jeden rok před odběrem ošetřována přípravky na ochranu rostlin. Rovněž by neměla být alespoň šest měsíců použita organická hnojiva. Použití minerálních hnojiv je přípustné pouze tehdy, je-li to nezbytné pro plodiny, a vzorky půdy by neměly být odebírány dříve než po třech měsících po aplikaci. Neměly by být používány půdy s hnojivy, o nichž je známo, že mají biocidní účinky (např. kyanamid vápenatý).

Vzorky by neměly být odebírány při dlouhých obdobích sucha nebo podmáčení (delších než 30 dnů) nebo po nich. Vzorky orných půd se odebírají z hloubky 0 až 20 cm. U luk (pastvin) nebo jiných půd, u nichž po delší dobu (alespoň po jedno vegetační období) nebyla prováděna orba, může maximální hloubka odběru nepatrně překračovat 20 cm (např. až 25 cm).

Vzorky půd by měly být přepravovány v takových nádobách a za takové teploty, aby bylo zaručeno, že se původní vlastnosti půdy významně nezmění.

1.6.3.2. *Skladování*

Upřednostňuje se použití čerstvě odebrané půdy. Pokud je skladování půdy v laboratoři nevyhnutelné, je možné ji skladovat v temnu při 4 ± 2 °C maximálně po dobu tří měsíců. Během skladování půd musí být zajištěny aerobní podmínky. Pokud jsou půdy odebírány z oblastí, v nichž jsou po dobu alespoň tří měsíců v roce zmrzlé, lze zvážit šestiměsíční skladování při –18 °C až –22 °C. Před každým experimentem se stanoví mikrobiální biomasa skladovaných půd a uhlík pocházející z biomasy by měl tvořit nejméně 1 % celkového organického uhlíku v půdě (viz oddíl 1.6.2).

1.6.4. **Zacházení s půdou a její příprava pro zkoušku**

1.6.4.1. *Předběžná inkubace*

Pokud byla půda skladována (viz oddíl 1.6.3.2), doporučuje se provést předběžnou inkubaci v délce 2 až 28 dnů. Teplota a vlhkost půdy během předběžné inkubace by měly být podobné podmínkám při zkoušce (viz oddíly 1.6.4.2 a 1.7.1.3).

▼B

1.6.4.2. *Fyzikálně-chemické charakteristiky*

Z půdy se ručně odstraní velké kusy (např. kameny, části rostlin atd.) a poté se za vlhka, aniž je půda nadměrně vysoušena, prosejí částice o velikosti 2 mm a menší. Vlhkost vzorku půdy se upraví destilovanou nebo deionizovanou vodou na hodnotu 40 % až 60 % maximální vodní kapacity.

1.6.4.3. *Obohacení organickým substrátem*

Půda by měla být obohacena vhodným organickým substrátem, např. zelenou travní moučkou s vojtěškou (hlavní složka: *Medicago sativa) s* poměrem C/N od 12/1 do 16/1. Doporučená dávka vojtěškové moučky je 5 g vojtěšky na kilogram půdy (vztaženo na sušinu).

1.6.5. **Příprava zkoušené látky pro aplikaci na půdu**

Zkoušená látka se obvykle aplikuje pomocí nosiče. Nosičem může být voda (u látek rozpustných ve vodě) nebo inertní tuhá látka, např. jemný křemičitý písek (velikost zrna: 0,1–0,5 mm). Jiné kapalné nosiče než voda (např. organická rozpouštědla jako aceton, chloroform) by neměly být používány, neboť mohou zničit mikroflóru. Použije-li se jako nosič písek, může být obalen zkoušenou látkou rozpuštěnou nebo rozptýlenou ve vhodném rozpouštědle. V takovém případě se rozpouštědlo před smísením s půdou odstraní odpařením. Pro optimální rozptýlení zkoušené látky v půdě se doporučuje použít 10 g písku na kilogram půdy (vztaženo na sušinu). Do kontrolních vzorků se aplikuje pouze odpovídající množství vody a/nebo písku.

Při zkoušení těkavých chemických látek je třeba pokud možno zabránit ztrátám při aplikaci a pokusit se o homogenní rozptýlení látky v půdě (látka se např. nastříkne do půdy na více místech).

1.6.6. **Zkušební koncentrace**

Při zkoušení agrochemikálií se použijí alespoň dvě koncentrace. Nižší koncentrace by měla odpovídat přinejmenším maximálnímu očekávanému množství látky, které se v reálných podmínkách dostane do půdy, zatímco vyšší koncentrace by měla být násobkem nižší koncentrace. Výpočet koncentrace zkoušené látky přidávané do půdy se provede za předpokladu rovnoměrného zapravení do hloubky 5 cm a pro sypnou hustotu půdy 1,5. U agrochemikálií, které se aplikují přímo do půdy, nebo u chemikálií, u nichž lze množství, které se dostane do půdy, předpovědět, jsou doporučenými zkušebními koncentracemi maximální předpokládané koncentrace v životním prostředí (Predicted Environmental Concentration, PEC) a jejich pětinásobky. U látek, které se zpravidla aplikují do půdy několikrát za sezónu, se zkušební koncentrace odvodí ze součinu PEC a očekávaného maximálního počtu aplikací. Horní koncentrace by však neměla překročit desetinásobek maximální jednorázově aplikované dávky. U jiných látek než agrochemikálií se použije geometrická řada nejméně pěti koncentrací. v rozpětí těchto zkušebních koncentrací by se měly nacházet stanovované hodnoty EC_x values.

▼B

1.7. PROVEDENÍ ZKOUŠKY

1.7.1. **Podmínky expozice**

1.7.1.1. *Expozice a kontrola*

Při zkoušení agrochemikálií se půda rozdělí na tři díly o stejné hmotnosti. Dva díly se smísí s nosičem obsahujícím látku a třetí díl se smísí pouze s nosičem (kontrola). Doporučuje se, aby byla zkouška provedena s minimálně třemi duplikátními vzorky exponovaných i neexponovaných půd. Při zkoušení jiných látek než agrochemikálií se půda rozdělí na šest dílů o stejné hmotnosti. Pět vzorků se smísí s nosičem obsahujícím zkoušenou látku a šestý vzorek se smísí pouze s nosičem bez chemické látky. Doporučuje se použít tři duplikátní vzorky exponované i neexponované půdy. Je třeba věnovat pozornost homogennímu rozptýlení zkoušené látky v exponovaných vzorcích půdy. Při mísení by nemělo docházet k hutnění nebo shlukování půdy.

1.7.1.2. *Inkubace vzorků půd*

Inkubaci vzorků půd lze provést dvěma způsoby: se souhrnným vzorkem exponované půdy a souhrnným vzorkem neexponované půdy, nebo se sériemi jednotlivých stejně velkých dílčích vzorků jak exponované, tak neexponované půdy. U těkavých látek se však zkouška provádí pouze se sériemi jednotlivých dílčích vzorků. Pokud se inkubují souhrnné vzorky, připraví se velká množství exponované a neexponované půdy a během zkoušky se podle potřeby odebírají dílčí vzorky k analýze. Výchozí množství připravené pro exponované vzorky a kontrolní vzorky závisí na velikosti dílčích vzorků, počtu duplikátních vzorků použitých pro analýzu a na předpokládaném počtu intervalů, v nichž se odeberou vzorky. Půdy inkubované jako souhrnný vzorek se před odběrem dílčích vzorků důkladně promísí. Pokud se inkubují série jednotlivých vzorků půd, rozdělí se souhrnný vzorek exponované půdy a souhrnný vzorek neexponované půdy na požadovaný počet dílčích vzorků a ty se použijí podle potřeby. U experimentů, kdy lze předpokládat více než dva intervaly odběru, by měl být připraven dostatečný počet dílčích vzorků s ohledem na všechny duplikátní vzorky a všechny intervaly odběru. Alespoň tři duplikátní vzorky zkušební půdy měly být inkubovány za aerobních podmínek (viz oddíl 1.7.1.1). U všech zkoušek by měly být použity vhodné nádoby s dostatečným prostorem pod víkem, aby nenastaly anaerobní podmínky. U těkavých látek se však zkouška provádí pouze se sériemi jednotlivých dílčích vzorků.

1.7.1.3. *Podmínky zkoušky a její trvání*

Test probíhá v temnu při pokojové teplotě 20 ± 2 °C. Vlhkost vzorku půdy se udržuje po dobu zkoušky v rozmezí 40 % až 60 % (± 5 %) maximální vodní kapacity půdy (viz oddíl 1.6.4.2). Podle potřeby se přidává destilovaná nebo deionizovaná voda.

Zkoušky trvají nejméně 28 dnů. Při zkouškách agrochemikálií se porovnávají rychlosti tvorby dusičnanů v exponovaných a kontrolních vzorcích. Pokud se 28. dne tyto rychlosti liší o více než 25 %, pokračuje se ve zkoušce do doby, než rozdíl klesne na 25 % a méně, nebo do 100 dnů, podle toho, co nastane dříve. U jiných látek než agrochemikálií se zkouška ukončí po 28 dnech. 28. den se stanoví množství dusičnanů v exponovaných a kontrolních vzorcích a vypočítají se hodnoty EC_x.

▼B

1.7.2. **Odběry vzorků a analýzy půd**

1.7.2.1. *Intervaly odběru vzorků*

Při zkoušení agrochemikálií se obsah dusičnanů ve vzorcích analyzuje v 0., 7., 14. a 28. den. Pokud se zkouška prodlužuje, provede se další měření ve 14denních intervalech po 28. dni.

Při zkoušení jiných látek než agrochemikálií se použije alespoň pět zkušebních koncentrací a obsah dusičnanů se ve vzorcích půd analyzuje na začátku expoziční doby (den 0) a na jeho konci (po 28 dnech). Je-li to považováno za nutné, lze provést další průběžné měření, např. v 7. den. Data získaná 28. den se použijí pro stanovení hodnoty EC_x chemické látky. Podle potřeby lze data ze dne 0 u kontrolních vzorků použít ve zprávě jako výchozí koncentraci dusičnanů v půdě.

1.7.2.2. *Analýza vzorků půd*

Pro každý čas odběru vzorků se v exponovaných i kontrolních vzorcích stanoví obsah dusičnanů. Dusičnany se extrahují ze vzorků třepáním s vhodným extrakčním roztokem, např. s 0,1 M roztokem chloridu draselného. Doporučuje se použít 5 ml roztoku KCl na gram sušiny půdy. Při optimální extrakci by měly být nádoby s půdou a extrakčním roztokem naplněny nejvýše z jedné poloviny. Směsi se extrahují třepáním při 150 ot./min. po dobu 60 minut. Směsi se odstředí nebo zfiltrují a kapalná fáze se analyzuje na dusičnany. Kapalný extrakt zbavený pevných částic lze před analýzou skladovat při 20 ± 5 °C) po dobu šesti měsíců.

2. **ÚDAJE**

2.1. ZPRACOVÁNÍ VÝSLEDKŮ

Při zkoušení agrochemikálií se zaznamená množství vytvořených dusičnanů v každém duplikátním vzorku a průměrné hodnoty se zaznamenají do tabulky. Rychlost přeměny dusíku se vyhodnotí vhodnými všeobecně uznávanými statistickými metodami (např. F-testem při 5 % hladině významnosti). Množství vzniklých dusičnanů se vyjádří v mg dusičnanů na kg sušiny půdy za den. Rychlost tvorby dusičnanů se pro každou expozici porovná s rychlostí získanou pro kontrolní vzorky a vypočte se odchylka od kontrolních vzorků v procentech.

Při zkoušení jiných látek než agrochemikálií se stanoví množství dusičnanů v každém duplikátním vzorku a pro účely odhadu hodnot EC_x se sestrojí křivka závislosti odezvy na dávce. Množství dusičnanů (tj. množství dusičnanů v mg na kg sušiny půdy) zjištěná v exponovaných vzorcích po 28 dnech se porovnají s hodnotami zjištěnými u kontrolních vzorků. Z těchto údajů se pro každou zkušební koncentraci vypočte velikost inhibice v procentech. Tyto hodnoty v procentech se zanesou do grafu proti koncentraci a poté se statistickými metodami vypočítají hodnoty EC_x. Standardními metodami (10, 11, 12) se rovněž vypočítají intervaly spolehlivosti ($p = 0,95$) pro vypočtené hodnoty EC_x.

Zkoušené látky s vysokým obsahem dusičnanů mohou přispívat k množství dusičnanu vytvořeného při zkoušce. Pokud se zkouší vysoké koncentrace těchto látek (např. chemikálie, u nichž se očekává opakované použití), musí být součástí zkoušky vhodné kontrolní vzorky (tj. půda a zkoušená látka bez rostlinné moučky). Data z těchto kontrol musí být zohledněna při výpočtech EC_x.

▼B

2.2. INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

Pokud je při hodnocení výsledků zkoušek s agrochemikáliemi při jakémkoli odběru po 28 dnech rozdíl rychlosti tvorby dusičnanů při nižší expozici (tj. při maximální očekávané koncentraci) a rychlosti tvorby v kontrolách roven 25 % nebo nižší, lze konstatovat, že zkoušená látka nemá dlouhodobý vliv na transformaci dusíku v půdách. Pro hodnocení výsledků zkoušek jiných látek než agrochemikálií se použijí hodnoty EC_{50}, EC_{25} a/nebo EC_{10}.

3. **ZPRÁVY**

Protokol o zkoušce musí obsahovat následující informace:

Úplnou identifikaci použité půdy zahrnující tyto údaje:

— zeměpisná poloha místa (zeměpisná šířka a délka),

— informace a historii místa (tj. vegetační kryt, ošetření přípravky na ochranu rostlin, použití hnojiv, náhodná kontaminace atd.),

— způsob využití (např. zemědělská půda, les atd.),

— hloubka odběru vzorků (cm),

— obsah písku/prachu/jílu (v % sušiny),

— pH (ve vodě),

— obsah organického uhlíku (v % sušiny),

— obsah dusíku (v % sušiny),

— výchozí koncentrace dusičnanů (mg dusičnanů na kg sušiny),

— kapacita výměny kationů (mmol/kg),

— mikrobiální biomasa v procentech celkového organického uhlíku,

— odkaz na metody použité pro stanovení jednotlivých parametrů,

— všechny informace týkající se odběru a skladování vzorků půd,

— podrobné údaje o případné předběžné inkubaci půdy.

Zkoušená látka:

— fyzikální povaha a popřípadě fyzikálně-chemické vlastnosti,

— případně údaje o chemické identifikaci, včetně strukturního vzorce, čistoty (tj. procentuální obsah účinné složky u přípravků na ochranu rostlin), obsahu dusíku.

Substrát:

— zdroj substrátu,

— složení (tj. vojtěšková moučka, zelená travní moučka s vojtěškou),

— obsah uhlíku, dusíku (v % sušiny),

— velikost síta (mm).

▼B

Zkušební podmínky:

— podrobné údaje o obohacení půdy organickým substrátem,

— počet použitých koncentrací zkoušené látky, popřípadě zdůvodnění volby koncentrací,

— podrobné údaje o aplikaci zkoušené látky do půdy,

— inkubační teplota,

— vlhkost půdy na začátku zkoušky a v jejím průběhu,

— použitá metoda inkubace půdy (tj. inkubace souhrnného vzorku, nebo inkubace jednotlivých dílčích vzorků půdy),

— počet duplikátních vzorků,

— doby odběrů vzorků,

— metoda použitá pro extrakci dusičnanů z půdy.

Výsledky:

— postup analýzy a zařízení použité pro stanovení dusičnanů,

— jednotlivé naměřené hodnoty obsahu dusičnanů a jejich průměrné hodnoty ve formě tabulky,

— rozdíly mezi duplikátními vzorky u exponovaných a kontrolních vzorků půd,

— podle potřeby vysvětlení oprav provedených při výpočtech,

— procentuální odchylka v rychlosti tvorby dusičnanů pro každou dobu odběru vzorků, popřípadě hodnota EC_{50} s 95 % intervalem spolehlivosti, jiné hodnoty EC_x (tj. EC_{25} nebo EC_{10}) s intervaly spolehlivost a graf křivky závislosti odpovědi na dávce,

— statistické zpracování výsledků.

— všechny informace a pozorování užitečné pro interpretaci výsledků.

4. **LITERATURA**

1) EPPO (1994). Decision-Making Scheme for the Environmental Risk Assessment of Plant Protection Chemicals. Chapter 7: Soil Microflora. EPPO Bulletin 24: 1–16, 1994.

2) BBA (1990). Effects on the Activity of the Soil Microflora. BBA Guidelines for the Official Testing of Plant Protection Products, VI, 1–1 (2nd eds., 1990).

3) EPA (1987). Soil Microbial Community Toxicity Test. EPA 40 CFR Part 797.3700. Toxic Substances Control Act Test Guidelines; Proposed rule. September 28, 1987.

4) SETAC-Europe (1995). Procedures for assessing the environmental fate and ecotoxicity of pesticides, Ed. M.R. Lynch, Pub. SETAC-Europe, Brussels.

5) ISO/DIS 14238 (1995). Soil Quality – Determination of Nitrogen Mineralisation and Nitrification in Soils and the Influence of Chemicals on these Processes. Technical Committee ISO/TC 190/SC 4: *Soil Quality – Biological Methods*.

▼B

6) OECD (1995). Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments, Belgirate, Italy, 18–20 January 1995.

7) ISO 10381-6 (1993). Soil quality – Sampling. Guidance on the collection, handling and storage of soil for the assessment of aerobic microbial processes in the laboratory.

8) ISO 14240-1 (1997). Soil quality – Determination of soil microbial biomass – Part 1: Substrate-induced respiration method.

9) ISO 14240-2 (1997). Soil quality – Determination of soil microbial biomass – Part 2: Fumigation-extraction method.

10) Litchfield, J.T. and Wilcoxon F. (1949). A simplified method of evaluating dose-effect experiments. Jour. Pharmacol. and Exper. Ther., 96, 99–113.

11) Finney, D.J. (1971). Probit Analysis. 3rd ed., Cambridge, London and New York.

12) Finney, D.J. (1978). Statistical Methods in biological Assay. Griffin, Weycombe, UK.

▼B

C.22. PŮDNÍ MIKROORGANISMY: ZKOUŠKA NA TRANSFORMACI UHLÍKU

1. METODA

Tato metoda je replikou metody OECD TG 217 (2000).

1.1. ÚVOD

Tato zkušební metoda popisuje laboratorní postup pro vyšetřování možných dlouhodobých účinků jednorázové expozice přípravkům na ochranu rostlin a popřípadě jiným chemický látkam na aktivitu půdních mikroorganismů při transformaci uhlíku. Tato zkouška je v zásadě založena na doporučení Evropské a středozemní organizace ochrany rostlin (European and Mediterranean Plant Protection Organization, EPPO) (1). Bylo však přihlédnuto k jiným doporučením, např. doporučením německého ústavu Biologische Bundesanstalt (2), agentury US Environmental Protection Agency (3) a společnosti SETAC (4). O počtu a druzích půd, které mají být použity ve zkoušce, byla učiněna dohoha na semináři OECD o výběru půd a sedimentů v Belgirate v Itálii v roce 1995 (5). Doporučení pro odběr, zpracování a skladování půdních vzorků je založeno na směrnici ISO (6) a na doporučeních ze semináře v Belgirate.

Při posuzování a hodnocení toxických vlastností zkoušených látek bude zřejmě nezbytné stanovit účinky na aktivitu půdních mikroorganismů, např. jsou-li požadovány údaje o vedlejších účincích přípravků na ochranu rostlin na půdní mikroflóru nebo očekává-li se expozice půdních mikroorganismů chemickým látkám jiným než přípravkům na ochranu rostlin. Cílem zkoušky na transformaci uhlíku je zjistit účinky takových chemických látek na půdní mikroflóru. Pokud se zkoušejí agrochemikálie (např. přípravky na ochranu rostlin, hnojiva, chemické přípravky pro lesnictví), provádí se jak zkouška na transformaci uhlíku, tak zkouška na transformaci dusíku. Pokud se zkoušejí jiné chemické látky než agrochemikálie, postačuje zkouška na transformaci dusíku. Nacházejí-li se však u těchto chemických látek hodnoty EC_{50} pro transformaci dusíku v rozpětí hodnot pro komerčně dostupné inhibitory nitrifikace (např. nitrapyrin), lze pro získání dalších informací provést zkoušku na transformaci uhlíku.

Půdy se skládají z živých a neživých složek, které se vyskytují ve formě složitých a heterogenních směsí. Mikroorganismy hrají důležitou roli v rozkladu a transformaci organických látek v úrodných půdách, přičemž různé druhy přispívají k různým aspektům úrodnosti půdy. Jakékoli dlouhodobé narušení těchto biochemických procesů může porušit koloběh živin a tak mít vliv na úrodnost půdy. K transformaci uhlíku a dusíku dochází u všech úrodných půd. Ačkoliv se populace mikroorganismů odpovědných za tyto procesy u jednotlivých půd liší, jedná se v podstatě o totéž schéma transformace.

▼B

Popsaná zkušební metoda slouží ke zjištění dlouhodobých nepříznivých účinků látky na proces transformace uhlíku v aerobních povrchových půdách. Zkouška je citlivá na změny ve velikosti a aktivitě mikrobiální populace, která je odpovědná za transformaci uhlíku, neboť tyto populace budou vystaveny jak chemickému stresu, tak nedostatku uhlíku. Použijí se písčité půdy s nízkým obsahem organického materiálu. Tyto půdy se exponují zkoušené látce a inkubují za podmínek, které umožňují rychlý mikrobiální metabolismus. Za těchto podmínek se zdroje snadno dostupného uhlíku rychle vyčerpají. To způsobí nedostatek uhlíku, který vede nejen k odumření mikrobiálních buněk, ale také indukuje klidové stadium a/nebo tvorbu sporů. Pokud se zkouška provádí déle než 28 dnů, lze souhrn těchto reakcí měřit v kontrolních vzorcích (neexponovaná půda) jako postupnou ztrátu metabolicky aktivní mikrobiální biomasy (7). Pokud je biomasa v půdě s nedostatkem uhlíku za podmínek zkoušky ovlivněna přítomností chemické látky, pravděpodobně se nevrátí do téhož stavu jako kontrolní vzorek. Porušení stavu způsobené zkoušenou látkou kdykoliv během zkoušky tedy často přetrvává až do konce zkoušky.

Zkouška, z níž vychází tato zkušební metoda, byla zprvu vyvinuta pro látky, u nichž lze předvídat množství, které pronikne do půdy. Příkladem jsou přípravky na ochranu rostlin, u nichž je polní aplikační dávka známá. U agrochemikálií postačuje provést zkoušku se dvěma úrovněmi dávky, které odpovídají předpokládané nebo odhadované aplikační dávce. U agrochemikálií lze zkoušet účinné složky nebo přípravky v komerční úpravě. Zkouška však není omezena na chemické látky, jejichž koncentraci v životním prostředí lze předpovědět. Změnou množství zkoušené látky aplikované na půdu a způsobu vyhodnocení údajů lze zkoušku využít také pro chemické látky, u nichž není známo, v jakém množství proniknou do půdy. U jiných chemických látek než agrochemikálií se proto stanovuje účinek řady koncentrací na transformaci uhlíku. Údaje z těchto zkoušek se použijí k sestrojení křivky závislosti odezvy na dávce a k výpočtu hodnot EC_x, kde x je procentuální účinek.

1.2. DEFINICE

Transformace uhlíku: rozklad organického materiálu působením mikroorganismů, jehož výsledkem je konečný produkt – anorganický oxid uhličitý.

EC_x (Účinná koncentrace): koncentrace zkoušené látky v půdě, která vede k x % inhibici transformace uhlíku na oxid uhličitý.

EC_{50} (Medián účinné koncentrace): koncentrace zkoušené látky v půdě, která vede k 50 % inhibici transformace uhlíku na oxid uhličitý.

1.3. REFERENČNÍ LÁTKY

Žádné.

▼B

1.4. PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

Prosetá půda se buď exponuje zkušební látce, nebo se ponechá neexponovaná (kontrola). Při zkoušení agrochemikálií se doporučuje provést zkoušku s nejméně dvěma koncentracemi zvolenými tak, aby byly v určitém vztahu k nejvyšší předpokládané koncentrací na poli. Po 0, 7, 14 a 28 dnech inkubace se vzorky exponované a kontrolní půdy smísí s glukosou a po následujících 12 hodinách se měří respirační rychlost vyvolaná glukosou. Respirační rychlost se vyjádří jako uvolněný oxid uhličitý (v mg oxidu uhličitého na kg sušiny za hodinu) nebo jako spotřebovaný kyslík (v mg kyslíku na kg půdy za hodinu). Průměrná respirační rychlost u exponovaných vzorků půd se porovná s rychlostí u kontrolních vzorků a vypočte se procentuální odchylka exponovaných vzorků od kontrolních vzorků. Všechny zkoušky musí probíhat alespoň 28 dnů. Jsou-li 28. den rozdíly mezi experimentální a kontrolní půdou rovné 25 % nebo větší, v měření se pokračuje ve 14denních intervalech nejdéle do 100 dnů. Při zkoušení jiných chemických látek než agrochemikálií se do vzorků půdy přidá řada koncentrací zkoušené látky a respirační rychlost vyvolaná glukosou (tj. průměrné množství uvolněného oxidu uhličitého nebo spotřebovaného kyslíku) se změří po 28 dnech. Výsledky zkoušek s řadou koncentrací se analyzují za použití regresního modelu a vypočtou se hodnoty EC_x (tj. EC_{50}, EC_{25} a/nebo EC_{10}). Viz definice.

1.5. VALIDITA ZKOUŠKY

Vyhodnocení výsledků zkoušek u agrochemikálií se provádí s relativně malými rozdíly (tj. průměrná hodnota ± 25 %) mezi uvolněným oxidem uhličitým nebo spotřebovaným kyslíkem u kontrolních a exponovaných vzorků, takže velké kolísání u kontrolních vzorků může vést k nesprávným výsledkům. Rozdíly mezi jednotlivými kontrolními vzorky by proto měly být menší než ± 15 %.

1.6. POPIS METODY

1.6.1. **Zkušební zařízení**

Při zkoušce se použijí nádoby z chemicky inertního materiálu. Měly by mít vhodný objem, ktery bude odpovídat postupu použitému pro inkubaci půdy, tzn. buď inkubace celého množství půdy, nebo inkubace jednotlivých vzorků půdy (viz oddíl 1.7.1.2). Je třeba, aby během zkoušky došlo k co nejmenším ztrátám vody a aby byla umožněna výměna plynů (např. tím, že se nádoby zakryjí perforovanou polyethylenovou fólií). Při zkoušení těkavých látek se použijí hermeticky uzavíratelné nádoby. Měly by být tak velké, aby přibližně jedna čtvrtina jejich objemu byla zaplněna vzorkem půdy.

Pro stanovení respirace vyvolané glukosou jsou nezbytné inkubační systémy a přístroje pro měření uvolňovaného oxidu uhličitého nebo spotřeby kyslíku. Příklady takových systémů lze nalézt v literatuře (8, 9, 10, 11).

1.6.2. **Výběr a počet půd**

Použije se jedna půda. Půda by měla mít tyto charakteristiky:

— obsah písku: nejméně 50 % a nejvýše 75 %,

▼B

— pH: 5,5–7,5,

— obsah organického uhlíku: 0,5–1,5 %,

— stanoví se mikrobiální biomasa (12, 13) a její obsah uhlíku by měl tvořit nejméně 1 % celkového organického uhlíku v půdě.

Ve většině případů představuje půda s těmito charakteristikami nejhorší případ, neboť adsorpce zkoušené chemické látky je minimální a její dostupnost pro mikroorganismy je maximální. v důsledku toho je zpravidla zkoušení s dalšími půdami zbytečné. Za určitých okolností však může být použití další půdy nezbytné, např. při zamýšleném hlavním použití zkoušené látky na určité druhy půd, jako jsou kyselé lesní půdy nebo elektrostaticky nabité půdy.

1.6.3. **Odběr a skladování vzorků půd**

1.6.3.1. *Odběr*

K dispozici by měly být podrobné informace o historii místa, ze kterého je půda odebírána. Mezi těmito informacemi musí být přesná poloha, vegetace, údaje o ošetřování přípravky na ochranu rostlin, použití organických a minerálních hnojiv, přídavky biologického materiálu nebo náhodná kontaminace. Pro odběr půdy by mělo být zvoleno místo, které umožňuje dlouhodobé používání. Vhodnými místy jsou trvalé pastviny, pole s jednoletými obilovinami (kromě kukuřice) nebo hustě oseté plochy zeleného hnojení. Místa vybraná pro odběr vzorků by neměla být minimálně jeden rok před odběrem ošetřována přípravky na ochranu rostlin. Rovněž by neměla být alespoň šest měsíců použita organická hnojiva. Použití minerálních hnojiv je přípustné pouze tehdy, je-li to nezbytné pro plodiny, a vzorky půdy by neměly být odebírány dříve než po třech měsících po aplikaci. Neměly by být používány půdy s hnojivy, o nichž je známo, že mají biocidní účinky (např. kyanamid vápenatý).

Vzorky by neměly být odebírány při dlouhých obdobích sucha nebo podmáčení (delších než 30 dnů) nebo po nich. Vzorky orných půd se odebírají z hloubky 0 až 20 cm. U luk (pastvin) nebo jiných půd, u nichž po delší dobu (alespoň po jedno vegetační období) nebyla prováděna orba, může maximální hloubka odběru nepatrně překračovat 20 cm (např. až 25 cm). Vzorky půd by měly být přepravovány v takových nádobách a za takové teploty, aby bylo zaručeno, že se původní vlastnosti půdy významně nezmění.

1.6.3.2. *Skladování*

Upřednostňuje se použití čerstvě odebrané půdy. Pokud je skladování půdy v laboratoři nevyhnutelné, je možné ji skladovat v temnu při 4 ± 2 °C maximálně po dobu tří měsíců. Během skladování půd musí být zajištěny aerobní podmínky. Pokud jsou půdy odebírány z oblastí, v nichž jsou po dobu alespoň tří měsíců v roce zmrzlé, lze zvážit šestiměsíční skladování při –18 °C. Před každým experimentem se stanoví mikrobiální biomasa skladovaných půd a uhlík pocházející z biomasy by měl tvořit nejméně 1 % celkového organického uhlíku v půdě (viz oddíl 1.6.2).

▼B

1.6.4. **Zacházení s půdou a její příprava pro zkoušku**

1.6.4.1. *Předběžná inkubace*

Pokud byla půda skladována (viz oddíly 1.6.4.2 a 1.7.1.3), doporučuje se provést předběžnou inkubaci v délce 2 až 28 dnů. Teplota a vlhkost půdy během předběžné inkubace by měly být podobné podmínkám při zkoušce (viz oddíly 1.6.4.2 a 1.7.1.3).

1.6.4.2. *Fyzikálně-chemické charakteristiky*

Z půdy se ručně odstraní velké kusy (např. kameny, části rostlin atd.) a poté se za vlhka, aniž je půda nadměrně vysoušena, prosejí částice o velikosti 2 mm a menší. Vlhkost vzorku půdy se upraví destilovanou nebo deionizovanou vodou na hodnotu 40 % až 60 % maximální vodní kapacity.

1.6.5. **Příprava zkoušené látky pro aplikaci na půdu**

Zkoušená látka se obvykle aplikuje pomocí nosiče. Nosičem může být voda (u látek rozpustných ve vodě) nebo inertní tuhá látka, např. jemný křemičitý písek (velikost zrna: 0,1–0,5 mm). Jiné kapalné nosiče než voda (např. organická rozpouštědla jako aceton, chloroform) by neměly být používány, neboť mohou zničit mikroflóru. Použije-li se jako nosič písek, může být obalen zkoušenou látkou rozpuštěnou nebo rozptýlenou ve vhodném rozpouštědle. V takovém případě se rozpouštědlo před smísením s půdou odstraní odpařením. Pro optimální rozptýlení zkoušené látky v půdě se doporučuje použít 10 g písku na kilogram půdy (vztaženo na sušinu). Do kontrolních vzorků se aplikuje pouze odpovídající množství vody a/nebo písku.

Při zkoušení těkavých chemických látek je třeba zabránit ztrátám při aplikaci a pokusit se o homogenní rozptýlení látky v půdě (látka se např. nastříkne do půdy na více místech).

1.6.6. **Zkušební koncentrace**

Při zkoušení přípravků na ochranu rostlin nebo jiných chemických látek, u nichž lze předpovědět koncentraci v životním prostředí, se použijí alespoň dvě koncentrace. Nižší koncentrace by měla odpovídat přinejmenším maximálnímu očekávanému množství látky, které se v reálných podmínkách dostane do půdy, zatímco vyšší koncentrace by měla být násobkem nižší koncentrace. Výpočet koncentrace zkoušené látky přidávané do půdy se provede za předpokladu rovnoměrného zapravení do hloubky 5 cm a pro sypnou hustotu půdy 1,5. U agrochemikálií, které se aplikují přímo do půdy, nebo u chemikálií, u nichž lze množství, které se dostane do půdy, předpovědět, jsou doporučenými zkušebními koncentracemi maximální předpokládané koncentrace v životním prostředí (Predictable Environmental Concentration, PEC) a jejich pětinásobky. U látek, které se zpravidla aplikují do půdy několikrát za sezónu, se zkušební koncentrace odvodí ze součinu PEC a očekávaného maximálního počtu aplikací. Horní koncentrace by však neměla překročit desetinásobek maximální jednorázově aplikované dávky.

U jiných látek než agrochemikálií se použije geometrická řada nejméně pěti koncentrací. v rozpětí těchto zkušebních koncentrací by se měly nacházet stanovované hodnoty EC_x.

▼B

1.7. PROVEDENÍ ZKOUŠKY

1.7.1. **Podmínky expozice**

1.7.1.1. *Expozice a kontrola*

Při zkoušení agrochemikálií se půda rozdělí na tři díly o stejné hmotnosti. Dva díly se smísí s nosičem obsahujícím látku a třetí díl se smísí pouze s nosičem (kontrola). Doporučuje se, aby byla zkouška provedena s minimálně třemi duplikátními vzorky exponovaných i neexponovaných půd. Při zkoušení jiných látek než agrochemikálií se půda rozdělí na šest dílů o stejné hmotnosti. Pět vzorků se smísí s nosičem obsahujícím zkoušenou látku a šestý vzorek se smísí pouze s nosičem bez chemické látky. Doporučuje se použít tři duplikátní vzorky exponované i neexponované půdy. Je třeba věnovat pozornost homogennímu rozptýlení zkoušené látky v exponovaných vzorcích půdy. Při mísení by nemělo docházet k hutnění nebo shlukování půdy.

1.7.1.2. *Inkubace vzorků půd*

Inkubaci vzorků půd lze provést dvěma způsoby: se souhrnným vzorkem exponované půdy a souhrnným vzorkem neexponované půdy, nebo se sériemi jednotlivých stejně velkých dílčích vzorků jak exponované, tak neexponované půdy. U těkavých látek se však zkouška provádí pouze se sériemi jednotlivých dílčích vzorků. Pokud se inkubují souhrnné vzorky, připraví se velká množství exponované a neexponované půdy a během zkoušky se podle potřeby odebírají dílčí vzorky k analýze. Výchozí množství připravené pro exponované vzorky a kontrolní vzorky závisí na velikosti dílčích vzorků, počtu duplikátních vzorků použitých pro analýzu a na předpokládaném počtu intervalů, v nichž se odeberou vzorky. Půdy inkubované jako souhrnný vzorek se před odběrem dílčích vzorků důkladně promísí. Pokud se inkubují série jednotlivých vzorků půd, rozdělí se souhrnný vzorek exponované půdy a souhrnný vzorek neexponované půdy na požadovaný počet dílčích vzorků a ty se použijí podle potřeby. U experimentů, kdy lze předpokládat více než dva intervaly odběru, by měl být připraven dostatečný počet dílčích vzorků s ohledem na všechny duplikátní vzorky a všechny intervaly odběru. Alespoň tři duplikátní vzorky zkušební půdy měly být inkubovány za aerobních podmínek (viz oddíl 1.7.1.1). U všech zkoušek by měly být použity vhodné nádoby s dostatečným prostorem pod víkem, aby nenastaly anaerobní podmínky. U těkavých látek se však zkouška provádí pouze se sériemi jednotlivých dílčích vzorků.

1.7.1.3. *Podmínky zkoušky a její trvání*

Test probíhá v temnu při pokojové teplotě 20 ± 2 °C. Vlhkost vzorku půdy se udržuje po dobu zkoušky v rozmezí 40 % až 60 % (± 5 %) maximální vodní kapacity půdy (viz oddíl 1.6.4.2). Podle potřeby se přidává destilovaná nebo deionizovaná voda.

Zkoušky trvají nejméně 28 dnů. Při zkouškách agrochemikálií se porovná množství uvolněného oxidu uhličitého nebo množství spotřebovaného kyslíku v exponovaných a kontrolních vzorcích. Pokud se 28. dne tyto rychlosti liší o více než 25 %, pokračuje se ve zkoušce do doby, než rozdíl klesne na 25 % a méně, nebo do 100 dnů, podle toho, co nastane dříve. U jiných látek než agrochemikálií se zkouška ukončí po 28 dnech. 28. den se stanoví množství uvolněného oxidu uhličitého nebo množství spotřebovaného kyslíku u exponovaných a kontrolních vzorků a vypočítají se hodnoty EC_x.

▼B

1.7.2. **Odběry vzorků a analýzy půd**

1.7.2.1. *Intervaly odběru vzorků*

Při zkoušení agrochemikálií se rychlost respirace vyvolané glukosou ve vzorcích analyzuje 0., 7., 14. a 28. den. Pokud se zkouška prodlužuje, provede se další měření ve 14denních intervalech po 28. dni.

Při zkoušení jiných látek než agrochemikálií se použije alespoň pět zkušebních koncentrací a obsah respirace vyvolané glukosou se ve vzorcích půd analyzuje na začátku expoziční doby (den 0) a na jejím konci (po 28 dnech). Je-li to považováno za nutné, lze provést další průběžné měření, např. 7. den. Data získaná 28. den se použijí pro stanovení hodnoty EC_x chemické látky. v případě potřeby lze data ze dne 0 u kontrolních vzorků použít k odhadu výchozího množství metabolicky aktivní mikrobiální biomasy v půdě.

1.7.2.2. *Měření rychlostí respirace vyvolané glukosou*

Pro každý okamžik odběru vzorků se v exponovaných i kontrolních vzorcích stanoví rychlost respirace vyvolané glukosou. Vzorky půd se smísí s dostatečným množstvím glukosy, aby se ihned vyvolala maximální respirační odezva. Množství glukosy potřebné pro vyvolání maximální respirační odezvy u dané půdy lze stanovit v orientační zkoušce se sérií koncentrací glukosy (14). U písčitých půd s obsahem organického uhlíku od 0,5 do 1,5 % obvykle stačí 2 000 mg až 4 000 mg glukosy na kg sušiny. Glukosu lze rozmělnit na prášek s čistým křemenným pískem (10 g písku na kg sušiny) a homogenně smísit s půdou.

Vzorky půdy obohacené glukosou se inkubují ve vhodné aparatuře, která umožňuje měřit respirační rychlosti při 20 ± 2 °C kontinuálně, každou hodinu, nebo každé dvě hodiny (viz oddíl 1.6.1). Měření uvolněného oxidu uhličitého nebo spotřebovaného kyslíku se provádí nepřetržitě po dobu 12 hodin a měření se zahájí co nejdříve, tj. do 1 až 2 hodin po přidání glukosy. Změří se celkové množství uvolněného oxidu uhličitého nebo celkové množství spotřebovaného kyslíku za 12 hodin a stanoví se průměrná respirační rychlost.

2. **ÚDAJE**

2.1. ZPRACOVÁNÍ VÝSLEDKŮ

Při zkoušení agrochemikálií se zaznamená množství uvolněného oxidu uhličitého nebo množství spotřebovaného kyslíku u každého duplikátního vzorku a průměrné hodnoty se zaznamenají do tabulky. Výsledky se vyhodnotí vhodnými všeobecně uznávanými statistickými metodami (např. F-testem při 5 % hladině významnosti). Rychlosti respirace vyvolané glukosou se vyjádří v mg oxidu uhličitého na kg sušiny za hodinu nebo v mg kyslíku na kg sušiny za hodinu. Průměrná rychlost uvolňování oxidu uhličitého nebo průměrná rychlost spotřeby kyslíku u každé expozice se porovná s odpovídajícími hodnotami u kontrolních vzorků a vypočte se procentuální odchylka exponovaných vzorků od kontrolních vzorků.

▼B

Při zkoušení jiných látek než agrochemikálií se stanoví množství uvolněného oxidu uhličitého nebo množství spotřebovaného kyslíku v každém duplikátním vzorku a pro účely odhadu hodnot EC_x se sestrojí křivka závislosti odezvy na dávce. Rychlosti respirace vyvolané glukosou (tj. mg oxidu uhličitého na kg sušiny za hodinu nebo mg kyslíku na kg sušiny za hodinu) zjištěné v exponovaných vzorcích po 28 dnech se porovnají s hodnotami zjištěnými u kontrolních vzorků. z těchto údajů se pro každou zkušební koncentraci vypočte velikost inhibice v procentech. Tyto hodnoty v procentech se zanesou do grafu proti koncentraci a poté se statistickými metodami vypočítají hodnoty EC_x. Standardními metodami (15, 16, 17) se rovněž vypočítají intervaly spolehlivosti (p = 0,95) pro vypočtené hodnoty EC_x.

2.2. INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

Pokud je při hodnocení výsledků zkoušek s agrochemikáliemi při kterémkoli odběru po 28 dnech rozdíl respiračních rychlostí při nižší expozici (tj. při maximální očekávané koncentraci) a rychlosti u kontroly roven 25 % nebo nižší, lze konstatovat, že zkoušená látka nemá dlouhodobý vliv na transformaci uhlíku v půdách. Pro hodnocení výsledků zkoušek jiných látek než agrochemikálií se použijí hodnoty EC_{50}, EC_{25} a/nebo EC_{10}.

3. **ZPRÁVY**

PROTOKOL O ZKOUŠCE

Protokol o zkoušce musí obsahovat tyto informace:

Úplnou identifikaci použité půdy zahrnující tyto údaje:

— zeměpisná poloha místa (zeměpisná šířka a délka),

— informace a historii místa (tj. vegetační kryt, ošetření přípravky na ochranu rostlin, použití hnojiv, náhodná kontaminace atd.),

— využití půdy (např. zemědělská půda, les atd.),

— hloubka odběru vzorků (cm),

— obsah písku/prachu/jílu (v % sušiny),

— pH (ve vodě),

— obsah organického uhlíku (v % sušiny),

— obsah dusíku (v % sušiny),

— kapacita výměny kationů (mmol/kg),

— výchozí mikrobiální biomasa v procentech celkového organického uhlíku,

— odkaz na metody použité pro stanovení jednotlivých parametrů,

— všechny informace týkající se odběru a skladování vzorků půd,

— podrobné údaje o případné předběžné inkubaci půdy.

▼B

Zkoušená látka:

— fyzikální povaha a popřípadě fyzikálně-chemické vlastnosti,

— případně údaje o chemické identifikaci, včetně strukturního vzorce, čistoty (tj. procentuální obsah účinné složky u přípravků na ochranu rostlin), obsahu dusíku.

Zkušební podmínky:

— podrobné údaje o obohacení půdy organickým substrátem,

— počet použitých koncentrací zkoušené látky, popřípadě zdůvodnění volby koncentrací,

— podrobné údaje o aplikaci zkoušené látky do půdy,

— inkubační teplota,

— vlhkost půdy na začátku zkoušky a v jejím průběhu,

— použitá metoda inkubace půdy (tj. inkubace souhrnného vzorku, nebo inkubace jednotlivých dílčích vzorků půdy),

— počet duplikátních vzorků,

— doby odběru vzorků.

Výsledky:

— metoda a zařízení použité pro měření respiračních rychlostí,

— údaje včetně jednotlivých hodnot a průměrných hodnot množství oxidu uhličitého nebo kyslíku zpracované/ve formě tabulky,

— rozdíly mezi duplikátními vzorky u exponovaných a kontrolních vzorků půd,

— v případě potřeby vysvětlení oprav provedených při výpočtech,

— procentuální odchylka v rychlostech respirace vyvolané glukosou pro každou dobu odběru vzorků, popřípadě hodnota EC_{50} s 95 % intervalem spolehlivosti, jiné hodnoty EC_x (tj. EC_{25} nebo EC_{10}) s intervaly spolehlivost a graf křivky závislosti odpovědi na dávce,

— v případě potřeby vysvětlení oprav provedených při výpočtech,

— všechny informace a pozorování užitečné pro interpretaci výsledků.

4. **LITERATURA**

1) EPPO (1994). Decision-Making Scheme for the Environmental Risk Assessment of Plant Protection Chemicals. Chapter 7: Soil Microflora. EPPO Bulletin 24: 1–16, 1994.

2) BBA (1990). Effects on the Activity of the Soil Microflora. BBA Guidelines for the Official Testing of Plant Protection Products, VI, 1–1 (2nd eds., 1990).

3) EPA (1987). Soil Microbial Community Toxicity Test. EPA 40 CFR Part 797.3700. Toxic Substances Control Act Test Guidelines; Proposed rule. September 28, 1987.

▼B

4) SETAC-Europe (1995). Procedures for assessing the environmental fate and ecotoxicity of pesticides, Ed. M.R. Lynch, Pub. SETAC-Europe, Brussels.

5) OECD (1995). Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments, Belgirate, Italy, 18–20 January 1995.

6) ISO 10381-6 (1993). Soil quality – Sampling. Guidance on the collection, handling and storage of soil for the assessment of aerobic microbial processes in the laboratory.

7) Anderson, J.P.E. (1987). Handling and Storage of Soils for Pesticide Experiments, in „Pesticide Effects on Soil Microflora". Eds. L. Somerville and M.P. Greaves, Chap. 3: 45–60.

8) Anderson, J.P.E. (1982). Soil Respiration, in „Methods of Soil Analysis – Part 2: Chemical and Microbiological Properties". Agronomy Monograph N° 9. Eds. A.L. Page, R.H. Miller and D.R. Keeney. 41: 831–871.

9) ISO 11266-1. (1993). Soil Quality – Guidance on Laboratory Tests for Biodegradation in Soil: Part 1. Aerobic Conditions.

10) ISO 14239 (1997E). Soil Quality – Laboratory incubation systems for measuring the mineralization of organic chemicals in soil under aerobic conditions.

11) Heinemeye, r O., Insam, H., Kaiser, E.A, and Walenzik, G. (1989). Soil microbial biomass and respiration measurements; an automated technique based on infrared gas analyses. Plant and Soil, 116: 77–81.

12) ISO 14240-1 (1997). Soil quality – Determination of soil microbial biomass – Part 1: Substrate-induced respiration method.

13) ISO 14240-2 (1997). Soil quality – Determination of soil microbial biomass – Part 2: Fumigation-extraction method.

14) Malkomes, H.-P. (1986). Einfluß von Glukosemenge auf die Reaktion der Kurzzeit-Atmung im Boden Gegenüber Pflanzenschutzmitteln, Dargestellt am Beispiel eines Herbizide. (Influence of the Amount of Glucose Added to the Soil on the Effect of Pesticides in Short-Term Respiration, using a Herbicide as an Example). Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd., Braunschweig, 38: 113–120.

15) Litchfield, J.T. and Wilcoxon, F. (1949). A simplified method of evaluating dose-effect experiments. Jour. Pharmacol. and Exper. Ther., 96, 99–113.

16) Finney, D.J. (1971). Probit Analysis. 3rd ed., Cambridge, London and New York.

17) Finney D.J. (1978). Statistical Methods in biological Assay. Griffin, Weycombe, UK.

▼B

C.23. AEROBNÍ A ANAEROBNÍ TRANSFORMACE V PŮDĚ

1. METODA

Tato zkušební metoda je replikou metody OECD TG 307 (2002).

1.1. ÚVOD

Tato zkušební metoda je založena na existujících směrnicích (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9). Postup popsaný v této zkušební metodě je vyvinut pro účely hodnocení aerobní a anaerobní transformace chemické látky v půdě. Účelem experimentů je stanovit i) rychlost transformace zkoušené látky a ii) povahu a rychlost tvorby a rozkladu transformačních produktů, kterým mohou být rostliny a půdní organismy vystaveny. Tyto studie jsou požadovány u chemických látek, které se aplikují přímo do půdy nebo pravděpodobně mohou proniknout do půdního ekosystému. Výsledky těchto laboratorních studií mohou být také použity pro vypracování postupů odběru vzorků a analýzy u podobných polních studií.

Pro vyhodnocení způsobu transformace obvykle postačují aerobní a anaerobní studie s jedním druhem půdy (8, 10, 11). Rychlosti transformace se stanoví alespoň pro tři další půdy (8, 10).

O počtu a druzích půd, které mají být použity v této zkoušce, došo k dohodě na semináři OECD Workshop on soil/sediment Selection v Belgirate v Itálii v roce 1995. Druhy zkušebních půd by měly být reprezentativní pro environmentální podmínky, v nichž dojde k použití látky nebo k jejímu uvolnění. Například chemické látky, k jejichž uvolnění může dojít v subtropickém až tropickém klimatu, by měly být zkoušeny s ferrasoly nebo nitosoly (systém FAO). Na tomto semináři byla také vydána doporučení týkající se odběru, zpracování a skladování vzorků půd založená na směrnicích ISO (15). Tato metoda se rovněž týká půd rýžových polí.

1.2. DEFINICE

Zkoušená látka: jakákoli látka, ať již výchozí látka, nebo příslušné transformační produkty.

Transformační produkty: všechny látky vznikající při biotických a abiotických transformačních reakcích zkoušené látky, včetně CO_2 a látek, které jsou přítomny ve vázaných reziduích.

Vázaná rezidua: sloučeniny v půdě, rostlině nebo v živočichu, které po extrakci zůstávají v matrici ve formě výchozí látky nebo jejího metabolitu (jejích metabolitů) nebo transformačních produktů. Metoda extrakce nesmí podstatně měnit samotné sloučeniny nebo strukturu matrice. Povahu vazeb lze částečně vyjasnit extrakcí spojenou se změnami v matrici a náročnými analytickými technikami. Dosud byly tímto způsobem vyjasněny např. kovalentní, iontové a adsorpční vazby a rovněž záchyty. Tvorba vázaných reziduí obecně podstatně snižuje biologickou přístupnost a dostupnost (12) (upraveno podle IUPAC 1984 (13)).

Aerobní transformace: reakce, ke kterým dochází za přítomnosti kyslíku (14).

▼B

Anaerobní transformace: reakce probíhající s vyloučením molekulárního kyslíku (14).

Půda: směs minerálních a organických chemických složek oživená malými organismy (většinou mikroorganismy), přičemž organické složky obsahují sloučeniny s vysokým obsahem uhlíku a dusíku a vysokou molekulovou hmotností. Lze pracovat s dvěma formami půdy:

a) s neporušenou půdou, jak v průběhu času vznikla, s charakteristickými vrstvami různých druhů půdy;

b) s porušenou půdou, která se obvykle vyskytuje na obdělávaných polích v případě, že se vzorky odebírají vyrýváním a používají se v této zkušební metodě (14).

Mineralizace: úplný rozklad organické sloučeniny na CO_2, H_2O za aerobních podmínek a na CH_4, CO_2 a H_2O za anaerobních podmínek. V souvislosti s touto metodou, při níž se používají sloučeniny značené radioisotopy, se mineralizací rozumí rozsáhlý rozklad molekuly, při němž se radioisotopy uhlíku oxidují za tvorby odpovídajícího množství $^{14}CO_2$ (14).

Poločas: $t_{0,5,}$ je čas, za který dojde k 50 % transformaci zkoušené látky, jestliže lze transformaci popsat kinetikou prvního řádu; nezávisí na počáteční koncentraci.

DT_{50} (doba odbourání 50): doba, za kterou se počáteční koncentrace zkoušené látky sníží o 50 %; liší se od poločasu $t_{0,5}$, pokud transformace neprobíhá podle kinetiky prvního řádu.

DT_{75} (doba odbourání 75): doba, za kterou se počáteční koncentrace zkoušené látky sníží o 75 %.

DT_{90} (doba odbourání 90): doba, za kterou se počáteční koncentrace zkoušené látky sníží o 90 %;.

1.3. REFERENČNÍ LÁTKY

Referenční látky se použijí pro charakterizaci a/nebo identifikaci transformačních produktů spektroskopickými a chromatografickými metodami.

1.4. POUŽITELNOST ZKOUŠKY

Tato je metoda je použitelná pro všechny chemické látky (neznačené nebo značené radioaktivními isotopy), pro něž je k dispozici analytická metoda s dostatečnou správností a citlivostí. Je použitelná pro mírně těkavé a netěkavé sloučeniny rozpustné i nerozpustné ve vodě. Zkouška by neměla být použita u látek, které z půdy silně těkají (např. fumiganty, organická rozpouštědla), a nelze je tedy v půdě udržet za experimentálních podmínek této zkoušky.

▼B

1.5. INFORMACE O ZKOUŠENÉ LÁTCE

Pro stanovení rychlosti transformace lze použít jak látky neznačené radioisotopy, tak značené látky. Značený materiál je nezbytný pro studium způsobu transformace a pro stanovení látkové bilance. Doporučuje se značení isotopem ^{14}C, avšak užitečné mohou být i jiné isotopy, např. ^{13}C, ^{15}N, ^{3}H, ^{32}P. Značena by měla být pokud možno nejstabilnější část/části molekuly ([1]). Čistota zkoušené látky by měla být alespoň 95 %.

Před provedením zkoušky na aerobní a anaerobní transformaci v půdě by měly být k dispozici alespoň tyto informace o látce:

a) rozpustnost ve vodě (metoda A.6);

b) rozpustnost v organických rozpouštědlech;

c) tlak par (metoda A.4) a/nebo Henryho konstanta;

d) rozdělovací koeficient n-oktanol/voda (metoda A.8);

e) chemická stabilita v temnu (hydrolýza) (metoda C.7);

f) pK_a pokud u molekuly nastává protonace nebo deprotonace (směrnice OECD 112) (16).

Mezi další užitečné informace patří údaje o toxicitě zkoušené látky pro půdní mikroorganismy (zkušební metody C.21 a C.22) (16).

K dispozici by měly být analytické metody (včetně extrakčních a izolačních metod) pro kvantitativní stanovení a identifikaci zkoušené látky a jejích transformačních produktů.

1.6. PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

Vzorky půdy se exponují zkušební látce a inkubují se v temnu v biometrických baňkách nebo v průtokových systémech za řízených laboratorních podmínek (při konstantní teplotě a vlhkosti půdy). Ve vhodných intervalech se vzorky půd extrahují a analyzuje se obsah výchozí látky a transformačních produktů. Vhodným absorpčním zařízením se k analýze shromáždí také těkavé produkty. Prostřednictvím materiálu značeného isotopem ^{14}C lze po zachycení uvolněného $^{14}CO_2$ měřit různé rychlosti mineralizace zkoušené látky a dále lze stanovit látkovou bilanci včetně tvorby vázaných reziduí v půdě.

1.7. KRITÉRIA JAKOSTI

1.7.1. **Výtěžnost**

Extrakce a analýza provedená alespoň u dvou duplikátních vzorků půdy ihned po přidání zkoušené látky poskytne první informaci o opakovatelnosti analytické metody a o stejnoměrnosti aplikace zkoušené látky. Výtěžnosti pozdějších stupňů experimentu se zjistí z příslušných látkových bilancí, měly by se nacházet v rozmezí 90 % až 110 % u značených chemických látek (8) a v rozmezí 70 % až 110 % u neznačených chemických látek (3).

([1]) Pokud například zkoušená látka obsahuje jeden kruh, je třeba, aby byl tento kruh označen. Pokud zkoušená látka obsahuje dva nebo více kruhů, může být nezbytné provést samostatné studie s cílem podchytit zbytky každého z kruhů, a získat tak vhodné informace o tvorbě transformačních produktů.

▼B

1.7.2. **Opakovatelnost a citlivost analytické metody**

Opakovatelnost analytické metody (kromě účinnosti první extrakce) pro kvantifikaci zkoušené látky a transformačních produktů lze ověřit provedením analýzy duplikátních vzorků týchž extraktů půdy, která byla dostatečně dlouho inkubována, aby došlo k vytvoření transformačních produktů.

Mez detekce (LOD) analytické metody pro zkoušenou látku a pro transformační produkty by měla být alespoň 0,01 mg na kg půdy (pro zkoušenou látku) nebo 1 % aplikované dávky, podle toho, která z hodnot je nižší. Rovněž by měla být specifikována mez kvantifikace (LOQ).

1.7.3. **Správnost dat o transformaci/transformačních dat**

Regresní analýza závislosti koncentrace zkoušené látky na čase poskytuje vhodné informace o spolehlivosti transformační křivky a umožňuje vypočítat intervaly spolehlivosti pro poločasy (v případě zdánlivé kinetiky prvního řádu) nebo pro hodnoty DT_{50}, popřípadě hodnot DT_{75} a DT_{90}.

1.8. POPIS ZKUŠEBNÍ METODY

1.8.1. **Vybavení a chemická činidla**

Inkubačními systémy jsou statické uzavřené systémy nebo vhodné průtokové systémy (7, 17). Příklady vhodných průtokových inkubačních aparatur a biometrických baněk jsou uvedeny na obrázcích 1 a 2. Oba typy inkubačních systémů mají své výhody a svá omezení (7, 17).

Pro zkoušku je nezbytné standardní laboratorní vybavení, zejména:

— analytické přístroje jako zařízení pro GC, HPLC, TLC, včetně odpovídajících detekčních systémů pro analýzu značených a neznačených látek pro inverzní isotopovou zřeďovací metodu,

— přístroje pro účely identifikace (např. MS, GC-MS, HPLC-MS, NMR atd.),

— kapalinový scintilační spektrometr,

— okysličovací zařízení pro spalování radioaktivního materiálu,

— odstředivka,

— extrakční aparatura (např. centrifugační zkumavky pro studenou extrakci a Soxhletův přístroj pro kontinuální extrakci s refluxem),

— zařízení pro zkoncentrování roztoků a extraktů (např. rotační odparka),

— vodní lázeň,

— mechanické míchací zařízení (např. hnětací zařízení, rotační mixér).

▼B

Použijí se např. tato chemická činidla:

— NaOH p.a, 2 mol/l, nebo jiná vhodná zásada (např. KOH, ethanolamin),

— H_2SO_4, p.a., 0,05 mol· dm^3,

— ethylenglykol p.a.,

— tuhý absorpční materiál, např. natronové vápno, a polyurethanové zátky,

— organická rozpouštědla čistoty p.a., např. aceton, methanol atd.,

— kapalný scintilátor.

1.8.2. **Aplikace zkoušené látky**

Za účelem aplikace zkoušené látky do půdy a jejího rozptýlení lze zkoušenou látku rozpustit ve vodě (v deionizované nebo destilované vodě) nebo lze v případě potřeby použít co nejmenší množství acetonu nebo jiných organických rozpouštědel (6), ve kterých je zkoušená látka dostatečně rozpustná a stabilní. Zvolené množství rozpouštědla však nesmí mít významný vliv na mikrobiální aktivitu půdy (viz oddíly 1.5 a 1.9.2 až 1.9.3). Rozpouštědla, která působí jako inhibitory mikrobiální aktivity, např. chloroform, dichloromethan a jiná halogenovaná rozpouštědla, nesmějí být použita.

Látku lze do půdy přidat také např. ve směsi s křemenným pískem (6) nebo ve formě malých dílčích vzorků zkušební půdy, které byly předem vysušeny na vzduchu a sterilizovány. Pokud se látka přidává pomocí rozpouštědla, mělo by být rozpouštědlo odpařeno ještě před tím, než jsou k původním nesterilním vzorkům půdy přidány obohacené dílčí vzorky.

U běžně používaných chemických látek, jež se dostávají do půdy prostřednictvím zemědělské aplikace čistírenských kalů, se zkoušená látka nejprve přidá do kalu, který se poté vpraví do vzorku půdy (viz oddíly 1.9.2 a 1.9.3).

Nedoporučuje se rutinně používat přípravky v komerční úpravě. Například u špatně rozpustných látek však může být použití přípravku v komerční úpravě vhodnou alternativou.

1.8.3. **Půdy**

1.8.3.1. *Výběr půd*

Pro stanovení způsobu transformace lze použít reprezentativní půdy; doporučují se písčitohlinitá, prachovitohlinitá, hlinitá nebo hlinitopísčitá půda (podle klasifikace FAO a USDA (18)) o hodnotě pH 5,5 až 8,0 a obsahu organického uhlíku 0,5–2,5 %, přičemž mikrobiální biomasa by měla tvořit nejméně 1 % celkového organického uhlíku (10).

Pro studie transformačních rychlostí se použijí alespoň tři další půdy reprezentující rozsah relevantních půd. Půdy by se měly lišit, pokud jde o obsah organického uhlíku, pH, obsah jílu a mikrobiální biomasy (10).

▼B

Všechny půdy by měly být charakterizovány alespoň: strukturou (% písku, % prachu, % jílu) (podle klasifikace FAO a USDA (18)), pH, kationtovou výměnnou kapacitou, organickým uhlíkem, sypnou hustotou, schopností zadržet vodu ([1]) a mikrobiální biomasou (pouze pro aerobní studie). Pro interpretaci výsledků mohou být užitečné další informace o vlastnostech půdy. Pro stanovení vlastností půdy lze použít metody doporučené v literatuře (19, 20, 21, 22, 23). Mikrobiální biomasa se stanoví metodou respirace indukované substrátem (SIR) (25, 26) nebo alternativními metodami (20).

1.8.3.2. *Odběr, příprava a skladování půd*

K dispozici by měly být podrobné informace o historii místa, ze kterého je půda odebírána. Těmito informacemi jsou přesná poloha, vegetační kryt, údaje o ošetřování chemickými látkami, použití organických a minerálních hnojiv, přídavky biologického materiálu nebo jiná kontaminace. Pokud byla půda v předchozích čtyřech letech ošetřena zkoušenou látkou nebo látkami s analogickou strukturou, neměla by být použita pro transformační studie (10, 15).

Půda by měla být čerstvě odebraná z terénu (z A horizontu nebo z horní dvaceticentimetrové vrstvy) a měla by být tak vlhká, aby bylo možné snadné prosévání. Kromě půd z rýžových polí by půdy neměly být odebírány v průběhu dlouhých období (více než 30 dnů) sucha, mrazů nebo zavodnění nebo krátce po těchto obdobích (14). Vzorky se přepravují způsobem, který minimalizuje změny obsahu vody v půdě, a uchovávají se v temnu za co největšího přístupu vzduchu. Pro tento účel je obecně vhodný volně uzavřený polyethylenový sáček.

Půda se zpracuje co nejdříve po odběru. Před prosévání na sítu o velikosti 2 mm se z půdy odstraní vegetace, větší živočichové a kameny, při prosévání se půda zbaví malých kamenů, drobných živočichů a zbytků rostlin. Před prosévání by nemělo dojít k nadměrnému vysušení a rozdrcení půdy (15).

Pokud je v zimě obtížné odebrat vzorky v terénu (zmrzlá půda, sněhová pokrývka), mohou být odebrány z půdy skladované ve skleníku pod vegetačním pokryvem (např. zatravněné půdy nebo půdy s travní směsí s jetelem). V každém případě se upřednostňují studie s čerstvě odebranými půdami; pokud má být odebraná a zpracovaná půda před zahájením studie skladována, musí být skladována za odpovídajících podmínek a pouze po omezenou dobu (při 4 ± 2 °C po dobu maximálně tří měsíců), aby byla zachována mikrobiální aktivita ([2]). Podrobné pokyny pro odběr, zpracování a skladování půd pro biotransformační experimenty lze nalézt v literatuře (8, 10, 15, 26, 27).

([1]) Schopnost půdy zadržet vodu lze měřit jako polní kapacitu, jako retenční vodní kapacitu nebo jako vodní sací tlak (pF). Vysvětlení je uvedeno v dodatku 1. V protokolu o zkoušce by mělo být uvedeno, zda byly schopnost půdy zadržet vodu a sypná hustota stanoveny u neporušených polních vzorků, nebo porušených (zpracovaných) vzorků.

([2]) Z výsledků nedávných výzkumů vyplývá, že půdy z mírného pásma lze skladovat při 20 °C déle než tři měsíce (28, 29), aniž dojde k významné ztrátě mikrobiální aktivity.

▼B

Před tím, než se zpracovaná půda použije ve zkoušce, provede se její předběžná inkubace, aby se umožnilo klíčení a odstranila se semena a aby se po změnách podmínek, ke kterým došlo od odběru nebo skladování po nastolení inkubačních podmínek, znovu ustavila rovnováha mikrobiálního metabolismu. Obecně postačuje předběžné inkubační období v délce od 2 do 28 dnů při podmínkách teploty a vlhkosti blížících se podmínkám zkoušky (15). Skladování a předběžná inkubace by dohromady neměly trvat déle než tři měsíce.

1.9. PROVEDENÍ ZKOUŠKY

1.9.1. **Zkušební podmínky**

1.9.1.1. *Zkušební teplota*

V průběhu celé zkoušky by měly být půdy inkubovány v temnu při stálé teplotě, která je typická pro klimatické podmínky, ve kterých dojde k použití látky nebo k jejímu uvolnění. Pro zkoušky všech látek, které se dostávají do půdy v mírném klimatickém pásu, se doporučuje teplota 20 ± 2 °C. Teplota musí být monitorována.

V případě chemických látek aplikovaných nebo uvolňovaných v chladném klimatickém pásu (např. v severských zemích, během podzimu/zimy) se inkubují další vzorky půdy, avšak při nižší teplotě (např. při 10 ± 2 °C).

1.9.1.2. *Vlhkost*

Pro transformační zkoušky při aerobních podmínkách se vlhkost ([1]) nastaví a udržuje na hodnotě pF od 2,0 do 2,5 (3). Vlhkost půdy se vyjádří jako hmotnost vody na jednotku hmotnosti sušiny půdy, pravidelně se kontroluje (např. každé 2 týdny) vážením inkubačních baněk a ztráta vody se vyrovnává přidáním vody (nejlépe sterilně filtrované vody z vodovodu). Při upravování vlhkosti je třeba zabránit ztrátám zkoušené látky a/nebo transformačních produktů v důsledku těkání nebo případné fotodegradace, nebo je třeba tyto ztráty minimalizovat.

V případě transformačních zkoušek za anaerobních podmínek a za podmínek rýžového pole se půda nasytí vodou tak, že se zaplaví.

1.9.1.3. *Podmínky aerobní inkubace*

V průtokových systémech se aerobní podmínky udržují občasným propláchnutím nebo nepřetržitým provětráváním zvlhčeným vzduchem. v biometrických baňkách se výměna vzduchu udržuje difuzí.

1.9.1.4. *Sterilní aerobní podmínky*

Za účelem získání informací o možné abiotické transformaci zkoušené látky lze vzorky půdy sterilizovat (metody sterilizace jsou uvedeny v literatuře 16 a 29), exponovat je sterilní zkoušené látce (např. přidáváním roztoku přes sterilní filtr) a provzdušňovat je zvlhčeným sterilním vzduchem, jak je popsáno v oddíle 1.9.1.3. U půd z rýžových polí se půda a voda sterilizuje a inkubace provede způsobem uvedeným v oddílu 1.9.1.6.

([1]) Pro účely dostatečného provzdušňování a výživy půdní mikroflóry by půda neměla být ani příliš vlhká, ani příliš suchá. Vlhkost půdy doporučená pro optimální růst mikroflóry se nachází v rozmezí od 40 % do 60 % retenční vodní kapacity a v rozmezí od 0,1 do 0,33 bar (6). Naposledy uvedený rozsah odpovídá rozsahu pF od 2,0 do 2,5. Typická vlhkost různých druhů půd je uvedena v dodatku 2.

▼B

1.9.1.5. *Podmínky aerobní inkubace*

S cílem nastolit a udržovat anaerobní podmínky se půda, která byla exponována zkoušené látce a inkubována za aerobních podmínek 30 dnů nebo jeden poločas nebo po dobu odpovídající DT_{50} (podle toho, co je kratší), zaplaví vodou (vrstva vody 1–3 cm) a inkubační systém se propláchne inertním plynem (např. dusíkem nebo argonem) ([1]). Zkušební systém musí umožňovat měření pH, koncentrace kyslíku a oxidačně-redukčního potenciálu a musí být vybaven zařízením pro zachycování těkavých produktů. Biometrický systém musí být uzavřený, aby bylo zabráněno přístupu vzduchu difuzí.

1.9.1.6. *Inkubace za podmínek rýžového pole*

Pro účely studia transformace v půdách rýžových polí se půda zaplaví vrstvou vody o výšce asi 1–5 cm a zkoušená látka se aplikuje do vodné fáze (9). Doporučená tloušťka vrstvy půdy je alespoň 5 cm. Systém se provzdušňuje vzduchem jako za aerobních podmínek. Hodnota pH, koncentrace kyslíku a oxidačně-redukční potenciál vodné vrstvy se monitorují a zaznamenávají. Před zahájením transformačních studií je nezbytné alespoň dvoutýdenní předběžné inkubační období (viz oddíl 1.8.3.2).

1.9.1.7. *Délka zkoušky*

Studie rychlosti a způsobu transformace by neměly za normálních podmínek trvat déle než 120 dnů ([2]) (3, 6, 8), neboť poté by podle očekávání mohlo v umělém laboratorním systému, izolovaném od přirozeného doplňování, postupně docházet ke snižování mikrobiální aktivity půdy. Pokud je to nezbytné pro popis rozkladu zkoušené látky a tvorby a rozkladu hlavních transformačních produktů, lze studie prodloužit (např. na 6 nebo 12 měsíců) (8). Delší inkubační období by měla být zdůvodněna ve zprávě o zkoušce a doplněna měřením biomasy během těchto období a na jejich konci.

1.9.2. **Provedení zkoušky**

Do každé z inkubačních baněk se vpraví asi 50 až 200 g půdy (hmotnost sušiny) (viz obrázky 1 a 2 v příloze 3) a půda se jednou z metod uvedených v oddílu 1.8.2 exponuje zkoušené látce. Pokud se pro účely aplikace zkoušené látky použijí organická rozpouštědla, odstraní se z půdy odpařením. Půda se poté důkladně promíchá špachtlí nebo se baňka protřepe. Pokud se studie provádí za podmínek rýžového pole, půda a voda se po aplikaci zkoušené látky důkladně promísí. Malé podíly (např. 1 g) exponované půdy se analyzují na zkoušenou látku za účelem kontroly rovnoměrnosti distribuce. Alternativní metody jsou uvedeny níže.

([1]) Aerobní podmínky převažují v povrchových půdách a dokonce v podpovrchových půdách, jak ukázal výzkumný projekt podporovaný EU (K. Takagi et al. (1992). Microbial diversity and activity in subsoils: Methods, field site, seasonal variation in subsoil temperatures and oxygen contents. Proc. Internat. Symp. Environm. Aspects Pesticides Microbiol., 270–277, 17–21 17–21. srpen 1992, Sigtuna, Švédsko). Anaerobní podmínky se mohou vyskytovat jen příležitostně během zaplavení půdy po vydatných srážkách, nebo jsou-li takové podmínky ustaveny na rýžových polích.

([2]) Aerobní studie mohou být ukončeny daleko dříve než za 120 dnů, pokud je v dané době jasně dosaženo konečného transformačního schématu a konečné mineralizace. Zkoušku lze ukončit po 120 dnech, nebo pokud se transformovalo 90 % zkoušené látky, avšak pouze tehdy, vytvořilo-li se alespoň 5 % CO_2.

▼B

Aplikované množství by mělo odpovídat nejvyššímu aplikovanému množství přípravku na ochranu rostlin doporučenému podle pokynů k použití a rovnoměrnému zapravení do vhodné hloubky na poli (např. do horní deseticentimetrové vrstvy půdy ([1]). Například u chemických látek aplikovaných na list nebo do půdy bez zapravení se pro výpočet množství chemické látky, které je třeba přidat do každé baňky, použije hloubka vrstvy půdy 2,5 cm. U chemických látek zapravovaných do půdy je příslušná hloubka specifikována v pokynech pro použití. U chemických látek obecně by mělo být aplikované množství odhadnuto na základě hlavní cesty vstupu do půdy; jsou-li například hlavní cestou vstupu do půdy čistírenské kaly, měla by být chemická látka přidána do kalu v koncentraci, která odráží očekávanou koncentraci v kalu, a množství kalu zapravené do půdy by mělo odpovídat normálnímu množství kalu zapravovanému do zemědělských půd. Pokud tato koncentrace není dostatečná pro identifikaci hlavních transformačních produktů, může napomoci inkubace samostatných půdních vzorků obsahujících vyšší koncentrace, avšak neměly by být používány nadměrné koncentrace, které mají vliv na mikrobiální funkce (viz oddíly 1.5 a 1.8.2).

Jinou možností je expozice velké dávky půdy (tj. 1 až 2 kg), její důkladné promísení vhodným míchacím zařízením a přenesení malých podílů o hmotnosti 50 až 200 g do inkubačních baněk (např. pomocí děliče vzorku). Malé podíly (např. 1 g) exponované půdy se analyzují na zkoušenou látku za účelem kontroly rovnoměrnosti distribuce. Takový postup se upřednostňuje, neboť umožňuje stejnoměrnější rozptýlení zkoušené látky v půdě.

Neexponované vzorky se inkubují za stejných (aerobních) podmínek jako vzorky exponované zkoušené látce. Tyto vzorky se použijí pro stanovení biomasy během studií a na jejich konci.

Pokud se látka aplikuje do půdy rozpuštěná v organickém rozpouštědle (organických rozpouštědlech), inkubují se vzorky půdy vystavené témuž množství rozpouštědla (rozpouštědel) za týchž (aerobních) podmínek jako vzorky exponované zkoušené látce. Tyto vzorky se použijí pro stanovení biomasy na začátku studií, v jejich průběhu a na jejich konci za účelem kontroly účinků rozpouštědla (rozpouštědel) na mikrobiální biomasu.

Baňky obsahující exponovanou půdu se buď zapojí do průtokového systému popsaného na obrázku 1, nebo se uzavřou absorbční kolonou, jak je uvedeno na obrázku 2 (viz dodatek 3).

([1]) Výpočet výchozí koncentrace na základě plochy se provede takto:

$$C_{půda}[mg/kg] = \frac{A[kg/ha] \cdot 10^6[mg/kg]}{l[ml] \cdot 10^4[m^2/ha] \cdot d[kg_{půda}/m^3]}$$

$C_{půda}$ = výchozí koncentrace v půdě (mg · kg^{-1})

A = aplikační dávka (kg · ha^{-1}); l = tloušťka půdní vrstvy na poli [m]; d = sypná hustota suché půdy (kg · m^{-3}).

Zhruba platí, že aplikační dávka 1 kg · ha^{-1} vede ke koncentraci v půdě přibližně 1 mg · kg^{-1} v 10 cm vrstvě (při předpokládané sypné hustotě 1 g · cm^{-3}).

▼B

1.9.3. **Odběr vzorků a měření**

V příslušných časových intervalech se vyberou duplikátní inkubační baňky, vzorky půd se extrahují vhodnými rozpouštědly různé polarity a analyzují na zkoušenou látku a/nebo na transformační produkty. U kvalitně připravených studií je k dispozici dostatečný počet baněk, aby bylo možné ke každému odběru vybrat dvě baňky. V různých časových intervalech (v sedmidenních intervalech během prvního měsíce a po prvním měsíci v sedmnáctidenních intervalech) během inkubace každého vzorku půdy a dále na konci inkubace se také odeberou absorpční roztoky nebo tuhé absorpční materiály a analyzují se na těkavé produkty. Kromě vzorku půdy odebraného ihned po aplikaci (vzorek ze dne 0) se provede alespoň dalších 5 odběrů. Časové intervaly se zvolí tak, aby bylo možné stanovit schéma rozkladu zkoušené látky a způsob tvorby a rozkladu transformačních produktů (např. po 0, 1, 3, 7 dnech; po 2, 3 týdnech; po 1, 2, 3 měsících atd.).

V případě zkoušené látky značené isotopem ^{14}C se spálením kvantitativně stanoví neextrahovatelná radioaktivita a pro každý vzorkovací interval se vypočte látková bilance.

V případě anaerobní inkubace nebo inkubace za podmínek rýžového pole se půda a vodná fáze analyzují na zkoušenou látku a transformační produkty buď společně, nebo se před extrakcí a analýzou oddělí filtrací nebo centrifugací.

1.9.4. **Nepovinné zkoušky**

Pro odhad vlivu teploty a vlhkosti půdy na rychlosti transformace zkoušené látky a/nebo jejích transformačních produktů v půdě mohou být užitečné aerobní nesterilní studie při další teplotě nebo vlhkosti půdy.

O další charakterizaci neextrahovatelné radioaktivity se lze pokusit například použitím metody extrakce tekutinou v nadkritickém stavu.

2. **ÚDAJE**

2.1. ZPRACOVÁNÍ VÝSLEDKŮ

Pro každý vzorkovací interval se uvede množství zkoušené látky, transformačních produktů, těkavých látek (pouze v %) a neextrahovatelných látek v procentech výchozí koncentrace, popřípadě v mg na kg půdy (na hmotnost sušiny). Pro každý vzorkovací interval se uvede látková bilance v procentech použité výchozí koncentrace. Grafické znázornění závislosti koncentrace zkoušené látky na čase umožní provést odhad jejího poločasu transformace nebo hodnoty DT_{50}. Měly by být identifikovány hlavní transformační produkty a sestrojeny křivky závislosti koncentrace na čase, aby se ukázala rychlost jejich tvorby a rozkladu. Hlavním transformačním produktem je jakýkoli produkt, který kdykoli během studie tvoří ≥ 10 % aplikované dávky.

Zachycené těkavé produkty jsou určitým ukazatelem těkavosti zkoušené látky a jejích transformačních produktů z půdy.

▼B

Přesnější stanovení poločasů nebo hodnot DT_{50} a popřípadě hodnot DT_{75} a DT_{90} se provede výpočtem za použití vhodného modelu kinetiky. Společně s hodnotami poločasu a DT_{50} se uvede popis použitého modelu kinetiky, řád kinetiky a koeficient determinace (r^2). Pokud není $r^2 < 0,7$ upřednostňuje se kinetika prvního řádu. Podle možnosti se výpočty použijí také na hlavní transformační produkty. Příklady vhodných modelů jsou popsány v literatuře (31 až 35).

V případě studií rychlosti prováděných při různých teplotách se závislost rychlosti transformace na teplotě popíše v rozsahu experimentálních teplot pomocí Arrheniovy rovnice:

$$k = A \cdot e^{-B/T} \text{ nebo } \ln\ k = \ln\ A - \frac{B}{T},$$

kde ln A a B jsou regresní konstanty získané z úseku na abscise a ze směrnice regresní přímky závislosti ln k na 1/T, kde k je rychlostní konstanta při teplotě T a T je teplota v Kelvinech. Je třeba věnovat pozornost omezení rozsahu teplot, v němž platí Arrheniova rovnice, jestliže transformaci určuje mikrobiální činnost.

2.2. HODNOCENÍ A INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

Přestože se studie provádějí v umělém laboratorním systému, umožňují výsledky odhadnout rychlost transformace zkoušené látky a rovněž rychlost tvorby a rozkladu transformačních produktů za polních podmínek (36, 37).

Studie transformačního způsobu zkoušené látky poskytuje informaci o způsobu, jakým se mění struktura aplikované látky v půdě působením chemických a mikrobiálních reakcí.

3. **ZPRÁVY**

PROTOKOL O ZKOUŠCE

Protokol o zkoušce musí obsahovat tyto údaje:

Zkoušená látka:

— obecný název, chemický název, číslo CAS, strukturní vzorec (s uvedením polohy značícího atomu (značících atomů) při použití radionuklidů) a relevantní fyzikálně-chemické vlastnosti (viz oddíl 1.5),

— čistota zkoušené látky (obsah nečistot),

— popřípadě radiochemická čistota značené chemické látky a specifická aktivita.

Referenční látky:

— chemický název a struktura referenčních látek použitých k charakterizaci a/nebo identifikaci transformačního produktu.

Zkušební půdy:

— podrobné údaje o místě odběru,

— datum a postup odběru vzorků půdy,

▼B

— vlastnosti půdy, např. pH, obsah organického uhlíku, struktura (% písku, % prachu, % jílu), kationtová výměnná kapacita, sypná hustota, schopnost zadržet vodu a mikrobiální biomasa,

— doba skladování půdy a podmínky skladování (pokud byla skladována).

Zkušební podmínky:

— datum provedení studií,

— množství aplikované zkoušené látky,

— použitá rozpouštědla a metoda aplikace zkoušené látky,

— hmotnost exponované půdy na začátku zkoušky a hmotnost půdy odebírané pro analýzu v každém intervalu,

— popis použitého inkubačního systému,

— rychlosti průtoku vzduchu (pouze u průtokových systémů),

— zkušební teplota,

— vlhkost půdy během inkubace,

— mikrobiální biomasa na začátku aerobních studií, během nich a na jejich konci,

— pH, koncentrace kyslíku a oxidačně-redukční potenciál na začátku anaerobních studií a studií za podmínek rýžového pole, během nich a na jejich konci,

— metoda (metody) extrakce,

— metody kvantitativního stanovení a identifikace zkoušené látky a hlavních transformačních produktů v půdě a v absorpčních materiálech,

— počet duplikátních vzorků a počet kontrol.

Výsledky:

— výsledky stanovení mikrobiální aktivity,

— opakovatelnost a citlivost použitých analytických metod,

— hodnoty výtěžnosti (hodnoty v % pro platnou studii jsou uvedeny v oddíle 1.7.1),

— tabulky s výsledky vyjádřenými v % výchozí aplikované dávky, popřípadě v mg na kg půdy (vztaženo na hmotnost sušiny půdy),

— látková bilance během studií a na jejich konci,

— charakterizace neextrahovatelné (vázané) radioaktivity nebo reziduí v půdě,

— kvantifikace uvolněného CO_2 a dalších těkavých sloučenin,

— křivky závislostí koncentrací zkoušené látky, popřípadě hlavních transformačních produktů v půdě na čase,

— poločas nebo hodnoty DT_{50}, DT_{75} a DT_{90} pro zkoušenou látku, popřípadě i pro hlavní transformační produkty včetně příslušných intervalů spolehlivosti,

▼B

— odhad rychlosti abiotického rozkladu za sterilních podmínek,

— posouzení kinetiky transformace pro zkoušenou látku, popřípadě i pro hlavní transformační produkty,

— případný návrh způsobu transformace,

— diskuse a interpretace výsledků,

— nezpracovaná data (tj. chromatogramy jednotlivých vzorků, příklady výpočtu rychlostí transformace a metody použité pro identifikaci transformačních produktů).

4. **LITERATURA**

1) US- Environmental Protection Agency (1982). Pesticide Assessment Guidelines, Subdivision N. Chemistry: Environmental Fate.

2) Agriculture Canada (1987). Environmental Chemistry and Fate. Guidelines for registration of pesticides in Canada.

3) European Union (EU) (1995). Commission Directive 95/36/EC of 14 July 1995 amending Council Directive 91/414/EEC concerning the placing of plant protection products on the market. Annex II, Part A and Annex III, Part A: Fate and Behaviour in the Environment.

4) Dutch Commission for Registration of Pesticides (1995). Application for registration of a pesticide. Section G: Behaviour of the product and its metabolites in soil, water and air.

5) BBA (1986). Richtlinie für die amtliche Prüfung von Pflanzenschutzmitteln, Teil IV, 4-1. Verbleib von Pflanzenschutzmitteln im Boden – Abbau, Umwandlung und Metabolismus.

6) ISO/DIS 11266-1 (1994). Soil Quality – Guidance on laboratory tests for biodegradation of organic chemicals in soil – Part 1: Aerobic conditions.

7) ISO 14239 (1997). Soil Quality – Laboratory incubation systems for measuring the mineralization of organic chemicals in soil under aerobic conditions.

8) SETAC (1995). Procedures for Assessing the Environmental Fate and Ecotoxicity of Pesticides. Mark R. Lynch, Ed.

9) MAFF – Japan 2000 – Draft Guidelines for transformation studies of pesticides in soil – Aerobic metabolism study in soil under paddy field conditions (flooded).

10) OECD (1995). Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments. Belgirate, Italy, 18–20 January 1995.

11) Guth, J.A. (1980). The study of transformations. In Interactions between Herbicides and the Soil (R.J. Hance, Ed.), Academic Press, 123–157.

12) DFG: Pesticide Bound Residues in Soil. Wiley – VCH (1998).

13) T.R. Roberts: Non-extractable pesticide residue in soils and plants. Pure Appl. Chem. 56, 945–956 (IUPAC 1984)

14) OECD Test Guideline 304 A: Inherent Biodegradability in Soil (adopted 12 May 1981)

▼B

15) ISO 10381-6 (1993). Soil Quality – Sampling – Part 6: Guidance on the collection, handling and storage of soil for the assessment of aerobic microbial processes in the laboratory.

16) Annex v to Dir. 67/548/EEC

17) Guth, J.A. (1981). Experimental approaches to studying the fate of pesticides in soil. In Progress in Pesticide Biochemistry. D.H. Hutson, T.R. Roberts, Eds. J. Wiley & Sons. Vol 1, 85–114.

18) Soil Texture Classification (US and FAO systems): Weed Science, 33, Suppl. 1 (1985) and Soil Sci. Soc. Amer. Proc. 26: 305 (1962).

19) Methods of Soil Analysis (1986). Part 1, Physical and Mineralogical Methods. A. Klute, Ed.) Agronomy Series No 9, 2nd Edition.

20) Methods of Soil Analysis (1982). Part 2, Chemical and Microbiological Properties. A.L. Page, R.H. Miller and D.R. Kelney, Eds. Agronomy Series No 9, 2nd Edition.

21) ISO Standard Compendium Environment (1994). Soil Quality – General aspects; chemical and physical methods of analysis; biological methods of analysis. First Edition.

22) Mückenhausen, E. (1975). Die Bodenkunde und ihre geologischen, geomorphologischen, mineralogischen und petrologischen Grundlagen. DLG-Verlag, Frankfurt, Main.

23) Scheffer, F., Schachtschabel, P. (1975). Lehrbuch der Bodenkunde. F. Enke Verlag, Stuttgart.

24) Anderson, J.P.E., Domsch, K.H. (1978) A physiological method for the quantitative measurement of microbial biomass in soils. Soil Biol. Biochem. 10, 215–221.

25) ISO 14240-1 and 2 (1997). Soil Quality – Determination of soil microbial biomass – Part 1: Substrate-induced respiration method. Part 2: fumigation-extraction method.

26) Anderson, J.P.E. (1987). Handling and storage of soils for pesticide experiments. In Pesticide Effects on Soil Microflora. L. Somerville, M.P. Greaves, Eds. Taylor & Francis, 45–60.

27) Kato, Yasuhiro. (1998). Mechanism of pesticide transformation in the environment: Aerobic and bio-transformation of pesticides in aqueous environment. Proceedings of the 16th Symposium on Environmental Science of Pesticide, 105–120.

28) Keuken O., Anderson J.P.E. (1996). Influence of storage on biochemical processes in soil. In Pesticides, Soil Microbiology and Soil Quality, 59–63 (SETAC-Europe).

29) Stenberg B., Johansson M., Pell M., Sjödahl-Svensson K., Stenström J., Torstensson L. (1996). Effect of freeze and cold storage of soil on microbial activities and biomass. In Pesticides, Soil Microbiology and Soil Quality, 68–69 (SETAC-Europe).

30) Gennari, M., Negre, M., Ambrosoli, R. (1987). Effects of ethylene oxide on soil microbial content and some chemical characteristics. Plant and Soil 102, 197–200.

31) Anderson, J.P.E. (1975). Einfluss von Temperatur und Feuchte auf Verdampfung, Abbau und Festlegung von Diallat im Boden. Z. PflKrankh Pflschutz, Sonderheft VII, 141–146.

▼B

32) Hamaker, J.W. (1976). The application of mathematical modelling to the soil persistence and accumulation of pesticides. Proc. BCPC Symposium: Persistence of Insecticides and Herbicides, 181–199.

33) Goring, C.A.I., Laskowski, D.A., Hamaker, J.W., Meikle, R.W. (1975). Principles of pesticide degradation in soil. In „Environmental Dynamics of Pesticides“. R. Haque and V.H. Freed, Eds., 135–172.

34) Timme, G., Frehse, H., Laska, V. (1986). Statistical interpretation and graphic representation of the degradational behaviour of pesticide residues. II. Pflanzenschutz – Nachrichten Bayer 39, 188–204.

35) Timme, G., Frehse, H. (1980). Statistical interpretation and graphic representation of the degradational behaviour of pesticide residues. I. Pflanzenschutz – Nachrichten Bayer 33, 47–60.

36) Gustafson D.I., Holden L.R. (1990). Non-linear pesticide dissipation in soil; a new model based on spatial variability. Environm. Sci. Technol. 24, 1032–1041.

37) Hurle K., Walker A. (1980). Persistence and its prediction. In Interactions between Herbicides and the Soil (R.J. Hance, Ed.), Academic Press, 83–122.

▼B

DODATEK 1

TLAK VODY, POLNÍ KAPACITY (PK) A RETENČNÍ VODNÍ KAPACITA (RVK) [1]

Výška vodního sloupce (cm)	pF [a]	bar [b]	Poznámky
10^7	7	10^4	Suchá půda
$1{,}6 \cdot 10^4$	4,2	16	Bod vadnutí
10^4	4	10	
10^3	3	1	
$6 \cdot 10^2$	2,8	0,6	
$3{,}3 \cdot 10^2$	2,5	0,33 [c]	Rozpětí polní kapacity [d]
10^2	2	0,1	
60	1,8	0,06	
33	1,5	0,033	
10	1	0,01	RVK (přibližná hodnota)
1	0	0,001	Půda nasycená vodou

[a] pF = dekadický logaritmus výšky vodního sloupce v cm.
[b] 1 bar = 10^5 Pa.
[c] Odpovídá přibližnému obsahu vody při složení 10 % písku, 35 % hlíny a 45 % jílu.
[d] Polní kapacita není konstanta, ale mění se v závislosti na druhu půdy od pF 1,5 do 2,5.

Tlak vody se vyjadřuje v cm vodního sloupce nebo v jednotkách bar. Vzhledem k velkému rozpětí se sací tlak vyjadřuje jednoduše jako hodnota pF, která je ekvivalentní logaritmu vodního sloupce v cm.

Polní kapacita je definována jako množství vody, které přírodní půda po delším deštivém období nebo po dostatečném zavlažení udrží proti gravitaci 2 dny. Stanovuje se u neporušené půdy v polním pokusu. Naměřená hodnota tedy není použitelná pro laboratorní vzorky porušené půdy. Hodnoty PK stanovené u porušených půd mohou vykazovat větší systematické odchylky.

Retenční vodní kapacita (RVK) se stanovuje v laboratoři u neporušené i porušené půdy tak, že se kapilárním vzlínáním nasytí sloupec půdy vodou. Využije se zejména u porušených půda může být až o 30 % vyšší než polní kapacita (1). Také se stanovuje snadněji než spolehlivé hodnoty PK.

Poznamky

[1] Mückenhausen, E. (1975). Die Bodenkunde und ihre geologischen, geomorphologischen, mineralogischen und petrologischen Grundlagen. DLG-Verlag, Frankfurt, Main.

▼B

DODATEK 2

VLHKOST PUDY (V G VODY NA 100 G SUSINY) U RUZNÝCH DRUHU PUD Z RUZNÝCH ZEMI

Druh půdy	Země	Vlhkost půdy při		
		RVK ([1])	pF = 1,8	pF = 2,5
Písčitá	Německo	28,7	8,8	3,9
Hlinitopísčitá	Německo	50,4	17,9	12,1
Hlinitopísčitá	Švýcarsko	44,0	35,3	9,2
Prachovitohlinitá	Švýcarsko	72,8	56,6	28,4
Jílovitohlinitá	Brazílie	69,7	38,4	27,3
Jílovitohlinitá	Japonsko	74,4	57,8	31,4
Písčitohlinitá	Japonsko	82,4	59,2	36,0
Prachovitohlinitá	USA	47,2	33,2	18,8
Písčitohlinitá	USA	40,4	25,2	13,3

([1]) Retenční vodní kapacita.

▼B

DODATEK 3

Obrázek 1

Příklad průtokové aparatury pro studium transformace chemických látek v půdě ([1]) ([2])

1: jehlový ventil

2: promývačka s vodou

3: ultramembrána (pouze ve sterilních podmínkách), velikost pórů 0,2 µm

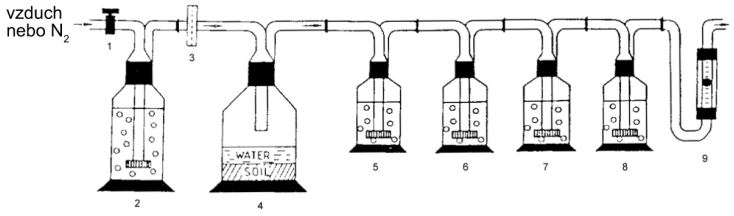
4: baňka pro studium metabolismu v půdě (zalitá vodou pouze v případě anaerobních podmínek a podmínek rýžového pole)

5: baňka s ethylenglykolem pro zachycení organických těkavých sloučenin

6: baňka s kyselinou sírovou pro zachycení alkalických těkavých sloučenin

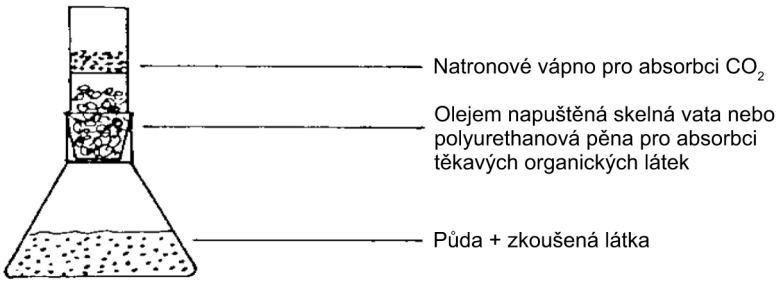
7, 8: zátka z hydroxidu sodného pro zachycení CO_2 a jiných kyselých těkavých látek

9: průtokoměr



Obrázek 2

Příklad biometrické baňky pro studium transformace chemických látek v půdě ([3])



([1]) Guth, J. A. (1980). The study of transformations. In: Interactions between Herbicides and the Soil (R. J. Hance, ed.), Academic Press, 123–157.

([2]) Guth, J. A. (1981). Experimental approaches to studying the fate of pesticides in soil. In: Progress in Pesticide Biochemistry. D.H. Hutson, T.R. Roberts, (eds.) J. Wiley & Sons. Vol 1, 85–114.

([3]) Anderson, J. P. E. (1975). Einfluss von Temperatur und Feuchte auf Verdampfung, Abbau und Festlegung von Diallat im Boden. Z. PflKrankh Pflschutz, Sonderheft VII, 141–146.

▼B

C.24. AEROBNÍ A ANAEROBNÍ TRANSFORMACE V SYSTÉMECH VODA/SEDIMENT

1. METODA

Tato zkušební metoda je replikou metody OECD TG 308 (2002).

1.1. ÚVOD

Chemické látky se mohou dostat do mělkých nebo hlubokých povrchových vod cestami, jako jsou přímá aplikace, unášení postřiku, odtok, ukládání odpadu, průmyslové, komunální nebo zemědělské emise a atmosférický spad. V této zkušební metodě je popsán laboratorní postup posouzení aerobní a anaerobní transformace organických chemických látek v systémech voda/sediment. Vychází ze stávajících směrnic (1, 2, 3, 4, 5, 6). O počtu a druzích půd, které mají být použity ve zkoušce, byla učiněna dohoha na pracovním semináři OECD *Workshop on soil/sediment Selection held at Belgirate*, Itálie, 1995 (7). Zde byla rovněž přijata doporučení týkající se odběru, zpracování a skladování vzorků sedimentů založená na směrnici ISO (8). Tyto studie jsou požadovány u chemických látek, které jsou aplikovány bezprostředně do vody nebo které se mohou dostat do vody výše uvedenými cestami.

Podmínky ve vrchní vodní fázi přírodních systémů voda/sediment jsou často aerobní. Podmínky v povrchové vrstvě sedimentu mohou být buď aerobní, nebo anaerobní, zatímco podmínky hlouběji v sedimentu jsou obvykle anaerobní. S cílem zahrnout všechny tyto možnosti je v tomto dokumentu popsána zkouška jak za aerobních podmínek, tak za anaerobních podmínek. Aerobní zkouškou se simuluje aerobní vodní sloupec nad aerobní vrstvou sedimentu, pod níž leží vrstva s anaerobním gradientem. Anaerobní zkouška simuluje zcela anaerobní systém voda/sediment. Pokud je z okolností zřejmé, že je třeba se odchýlit od těchto doporučení, např. použít nedotčené střední vrstvy sedimentů nebo sedimenty, které mohly být exponovány zkoušenou látkou, existují jiné metody určené k tomuto účelu (9).

1.2. DEFINICE

Ve všech případech je třeba používat mezinárodní soustavu jednotek SI.

Zkoušená látka: jakákoli látka, ať již výchozí látka, nebo příslušné transformační produkty.

Transformační produkty: všechny látky vznikající při biotických a abiotických transformačních reakcích zkoušené látky, včetně CO_2 a vázaných reziduí.

Vázaná rezidua: „vázaná rezidua“ jsou sloučeniny v půdě, rostlinách nebo v živočiších, které po extrakci zůstávají v matrici ve formě výchozí látky nebo jejího metabolitu (jejích metabolitů). Metoda extrakce nesmí podstatně měnit samotné sloučeniny nebo strukturu matrice. Povahu vazeb lze částečně vysvětlit extrakcí spojenou se změnami v matrici a moderními analytickými postupy. Dosud byly tímto způsobem vyjasněny např. kovalentní, iontové a adsorpční vazby a rovněž záchyty. Tvorba vázaných reziduí obecně podstatně snižuje biologickou přístupnost a dostupnost (10) (upraveno IUPAC 1984 (11)).

▼B

Aerobní transformace: (oxidační): reakce, ke kterým dochází za přítomnosti kyslíku (12).

Anaerobní transformace: (redukční): reakce probíhající s vyloučením molekulárního kyslíku (12).

Přírodní vody: jsou povrchové vody získané z rybníků, řek, potoků atd.

Sediment: je směs minerálních a organických chemických složek, přičemž organické složky obsahují sloučeniny s vysokým obsahem uhlíku a dusíku a vysokou molekulovou hmotností. Ukládají se v přírodních vodách a vytvářejí rozhraní s těmito vodami.

Mineralizace: je úplný rozklad organické sloučeniny na CO_2 a H_2O za aerobních podmínek a na CH_4, CO_2 a H_2O za anaerobních podmínek. V rámci této zkušební metody, při níž se používají sloučeniny značené radioisotopy, se mineralizací rozumí rozsáhlý rozklad molekuly, při němž se značící atomy uhlíku kvantitativně oxidují nebo redukují, přičemž se uvolňuje odpovídající množství $^{14}CO_2$ nebo $^{14}CH_4$.

Poločas, $t_{0,5}$: je čas, za který dojde k 50 % transformaci zkoušené látky, jestliže lze transformaci popsat kinetikou prvního řádu; nezávisí na počáteční koncentraci.

DT_{50} (doba odbourání 50): doba, za kterou se počáteční koncentrace zkoušené látky sníží o 50 %.

DT_{75} (doba odbourání 75): doba, za kterou se počáteční koncentrace zkoušené látky sníží o 75 %.

DT_{90} (doba odbourání 90): doba, za kterou se počáteční koncentrace zkoušené látky sníží o 90 %.

1.3. REFERENČNÍ LÁTKY

Referenční látky by měly být použity pro identifikaci a kvantitativní stanovení transformačních produktů spektroskopickými a chromatografickými metodami.

1.4. INFORMACE O ZKOUŠENÉ LÁTCE

Pro stanovení rychlosti transformace lze použít jak látky neznačené radioisotopy, tak látky značené, přičemž značené materiály jsou upřednostňovány. Značený materiál je nezbytný pro studium způsobu transformace a pro stanovení látkové bilance. Doporučuje se značení isotopem ^{14}C, avšak užitečné mohou být i jiné isotopy, např. ^{13}C, ^{15}N, ^{3}H, ^{32}P. Značena by měla být pokud možno nejstabilnější část (části) molekuly ([1]). Chemická a/nebo radiochemická čistota látky by měla být alespoň 95 %.

Před provedením zkoušky by měly být k dispozici tyto informace o látce:

a) rozpustnost ve vodě (metoda A.6);

b) rozpustnost v organických rozpouštědlech;

c) tlak par (metoda A.4) a Henryho konstanta;

([1]) Pokud například látka obsahuje kruh, je třeba tento kruh označit; pokud látka obsahuje dva nebo více kruhů, může být nezbytné provést samostatné studie za účelem stanovení osudu každého z označených kruhů, a získat tak vhodné informace o tvorbě transformačních produktů.

▼B

d) rozdělovací koeficient n-oktanol/voda (metoda A.8);

e) adsorpční koeficient (podle potřeby K_d, K_f nebo K_{oc}) (metoda C.18);

f) hydrolýza (metoda C.7);

g) disociační konstanta (pK_a) (směrnice OECD 112) (13);

h) chemická struktura zkoušené látky a případně poloha značícího nuklidu.

Poznámka: Ve zprávě se uvede teplota, při které byla měření prováděna.

Mezi další užitečné informace patří údaje o toxicitě zkoušené látky pro půdní mikroorganismy, údaje o snadné nebo vlastní biologické rozložitelnosti a údaje o aerobní a anaerobní transformaci v půdě.

K dispozici by měly být analytické metody (včetně extrakčních a izolačních metod) pro kvantitativní stanovení a identifikaci zkoušené látky a jejích transformačních produktů ve vodě a sedimentu (viz oddíl 1.7.2).

1.5. PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

V metodě popsané v této zkoušce se používají aerobní i anaerobní systémy voda/sediment (viz dodatek 1), které umožňují:

i) měřit rychlost transformace zkoušené látky v systému voda/sediment,

ii) měřit rychlost transformace zkoušené látky v sedimentu,

iii) měřit rychlost mineralizace zkoušené látky a/nebo produktů její transformace (pokud se použije zkoušená látka značená isotopem ^{14}C),

iv) identifikaci a kvantifikace produktů transformace ve vodě a v sedimentu, včetně látkové bilance (pokud se použije značená zkoušená látka),

v) měřit distribuci zkoušené látky a produktů její transformace mezi dvěma fázemi během inkubace v temnu (aby nedošlo např. k vykvetení řas) při konstantní teplotě. Pokud to údaje umožňují, stanoví se poločasy a hodnoty DT_{50}, DT_{75} a DT_{90}, které by však neměly být příliš extrapolovány mimo obor experimentálních hodnot (viz oddíl 1.2).

Pro aerobní i anaerobní studie jsou nezbytné alespoň dva sedimenty a příslušné vodní fáze (7). V některých případech by však měly být použity více než dva systémy voda/sediment, např. u chemických látek, které mohou být přítomny ve sladkovodním i mořském ekosystému.

▼B

1.6. POUŽITELNOST ZKOUŠKY

Tato metoda je použitelná pro všechny chemické látky (neznačené nebo značené radioaktivními isotopy), pro které je k dispozici analytická metoda s dostatečnou přesností a citlivostí. Je použitelná pro mírně těkavé a netěkavé sloučeniny rozpustné nebo špatně rozpustné ve vodě. Zkouška by neměla být použita u látek, které z vody silně těkají (např. fumiganty, organická rozpouštědla), a nelze je tedy ve vodě nebo v sedimentu udržet za experimentálních podmínek této zkoušky.

Tato metoda je dosud používána ke studiu transformace chemických látek ve sladkovodním systému voda/sediment, avšak může být v zásadě použita také na estuarní a mořské systémy. Není vhodná k simulaci podmínek v tekoucích vodách (např. řekách) nebo na otevřeném moři.

1.7. KRITÉRIA JAKOSTI

1.7.1. **Výtěžnost**

Extrakce a analýza provedená alespoň u dvou duplikátních vzorků systému voda/sediment ihned po přidání zkoušené látky poskytne první informaci o opakovatelnosti analytické metody a o stejnoměrnosti aplikace zkoušené látky. Výtěžnosti pozdějších stupňů experimentu se zjistí z příslušných látkových bilancí (pokud se použije značený materiál). Výtěžnosti by se měly nacházet v rozmezí 90 % až 110 % u značených chemických látek (6) a v rozmezí 70 % až 110 % u neznačených chemických látek.

1.7.2. **Opakovatelnost a citlivost analytické metody**

Opakovatelnost analytické metody (kromě účinnosti první extrakce) pro kvantifikaci zkoušené látky a transformačních produktů lze ověřit paralelním provedením analýzy duplikátních vzorků týchž extraktů (vzorků) vody nebo sedimentu, které byly dostatečně dlouho inkubovány, aby došlo k vytvoření transformačních produktů.

Mez detekce analytické metody (LOD) pro zkoušenou látku a pro transformační produkty by měla být alespoň 0,01 mg na kg vody nebo sedimentu (pro zkoušenou látku) nebo 1 % výchozího množství aplikovaného do zkušebního systému, podle toho, která z těchto hodnot je nižší. Rovněž by měla být specifikována mez kvantitativní stanovitelnosti (LOQ).

1.7.3. **Správnost dat o transformaci**

Regresní analýza závislosti koncentrace zkoušené látky na čase poskytuje vhodné informace o správnosti transformační křivky a umožňuje vypočítat intervaly spolehlivosti pro poločasy (v případě zdánlivé kinetiky prvního řádu) nebo pro hodnoty DT_{50} a popřípadě hodnoty DT_{75} a DT_{90}.

1.8. POPIS METODY

1.8.1. **Zkušební systém a aparatura**

Studie se provede se skleněnými nádobami (např. baňkami, centrifugačními kyvetami), pokud z předběžných informací (např. z rozdělovacího koeficientu n-oktanol/voda, ze sorpčních dat atd.) nevyplývá, že látka může ulpívat na skle; v takovém případě lze zvážit použití náhradního materiálu (např. teflonu). Pokud je o zkoušené látce známo, že ulpívá na skle, lze problém zmírnit jednou z následujících metod:

▼B

— stanovením hmotnosti zkoušené látky a transformačních produktů sorbovaných na skle,

— zajištěním, aby se na konci zkoušky omylo rozpouštědlem veškeré laboratorní sklo,

— použitím komerční úpravy přípravků (viz také oddíl 1.9.2),

— použitím většího množství pomocného rozpouštědla za účelem přidání zkoušené látky do systému; pokud se použije pomocné rozpouštědlo, nesmí štěpit zkoušenou látku solvolýzou.

Příklady typických zkušebních aparatur, tj. průtokové a biometrické systémy, jsou uvedeny v dodatcích 2 a 3 (14). Jiné užitečné inkubační systémy jsou popsány v literatuře (15). Experimentální aparatura by měla být konstruována tak, aby byla možná výměna vzduchu nebo dusíku a zachycení těkavých produktů. Rozměry aparatury musí splňovat požadavky zkoušky (viz oddíl 1.9.1). Ventilace musí být zajištěna buď jemným probubláváním, nebo prohánění vzduchu nebo dusíku nad hladinou vody. V druhém případě se doporučuje vodu seshora mírně promíchávat, aby docházelo k lepší distribuci kyslíku nebo dusíku ve vodě. Neměl by se použít vzduch zbavený CO_2, neboť by došlo ke zvýšení pH vody. V žádném případě není žádoucí, aby došlo ke zvíření sedimentu, a je tomu třeba pokud možno zabránit. Slabě těkavé chemické látky se zkoušejí v biometrickém systému za mírného promíchávání vodní hladiny. Lze rovněž použít uzavřené nádobky s volným objemem pod víčkem vyplněným atmosférickým vzduchem nebo dusíkem a vnitřní ampulky pro zachycování těkavých produktů (16). U aerobních zkoušek je nezbytná pravidelná výměna plynu pod víčkem, aby se vyrovnávala spotřeba kyslíku biomasou.

Mezi vhodné lapače pro shromažďování těkavých transformačních produktů patří kromě jiných roztok hydroxidu draselného nebo sodného o koncentraci 1 mol/dm^3 pro zachycování oxidu uhličitého ([1]) a ethylenglykol, ethanolamin nebo 2 % parafin v xylenu pro organické sloučeniny. Těkavé látky vznikající za anaerobních podmínek, např. methan, lze zachycovat na molekulovém sítu. Tyto těkavé látky lze spálit např. na CO_2 v křemenné trubičce za přítomnosti CuO při teplotě 900 °C a vzniklý CO_2 lze zachytit v absorbéru s alkálií (17).

Pro chemickou analýzu zkoušené látky a transformačních produktů jsou nezbytné laboratorní přístroje (např. přístroje pro plynovou chromatografii s kapalinovou stacionární fází (GLC), vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii (HPLC), pro chromatografii na tenké vrstvě (TLC), hmotnostní spektrometrii (MS), kombinaci plynové chromatografie a hmotnostní spektrometrie (GC-MS), kombinaci kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie (LC-MS), jadernou magnetickou rezonanci (NMR) atd.), včetně detekčních systémů pro detekci sloučenin značených nebo neznačených radioisotopy. Pokud se použije materiál značený radioisotopy, je třeba mít k dispozici scintilační spektrometr a zařízení pro spalování za přítomnosti oxidačního činidla (pro spalování vzorků sedimentů před analýzou radioaktivity).

Další standardní laboratorní vybavení pro fyzikálněchemická a biologická měření (viz oddíl 1.8.2.2 tabulka 1), laboratorní sklo, chemikálie a činidla se použijí podle potřeby.

([1]) Vzhledem k tomu, že alkalické roztoky absorbují oxid uhličitý ze vzduchu určeného k provzdušňování a oxid uhličitý uvolňující se respirací v aerobních experimentech, musí být pravidelně vyměňovány, aby se nevyčerpala jejich absorpční kapacita.

▼B

1.8.2. **Výběr a počet vodních sedimentů**

Místa odběru by měla být vybrána podle účelu zkoušky v dané situaci. Při výběru místa odběru vzorků musí být přihlédnuto k historii případných zemědělských, průmyslových nebo komunálních vstupů do povodí a do horních toků. Sedimenty by neměly být použity, pokud byly v předchozích 4 letech kontaminovány zkoušenou látkou nebo jejími strukturními analogy.

1.8.2.1. Výběr sedimentů

Pro aerobní studie se obvykle použijí dva sedimenty (7). Tyto dva vybrané sedimenty by se měly lišit co do obsahu organického uhlíku a struktury. Jeden sediment by měl mít vysoký obsah organického uhlíku (2,5–7,5 %) a jemnou strukturu a druhý sediment by měl mít nízký obsah organického uhlíku (0,5–2,5 %) a hrubou strukturu. Obsah organického uhlíku by se měl zpravidla lišit alespoň o 2 %. „Jemná struktura“ je definována obsahem složky (jíl + prach) ([1]) vyšším než 50 % a „hrubá textura“ je definována obsahem složky (jíl + prach) nižším než 50 %. Rozdíl v obsahu složek (jíl + prach) u obou sedimentů by měl být zpravidla alespoň 20 %. V případě, že se může chemikálie dostat do mořských vod, měl by alespoň jeden systém voda/sediment pocházet z moře.

Pro přísně anaerobní studie by měly být odebrány dva sedimenty (včetně okolní vody) z anaerobních zón povrchových vod (7). Se sedimentem i vodní fází by mělo být zacházeno opatrně a měly by být přepravovány s vyloučením přístupu kyslíku.

Pro výběr sedimentu mohou být důležité i jiné parametry, které by měly být zvažovány případ od případu. Rozpětí pH sedimentů je například důležité pro zkoušení chemikálií, u nichž transformace a/nebo sorpce mohou záviset na pH. Závislost sorpce na pH by se mohla odrážet v hodnotě pK_a zkoušené látky.

1.8.2.2. Charakterizace vzorků systému voda/sediment

Klíčové parametry, které musí být jak u vody, tak u sedimentu měřeny a uvedeny ve zprávě (s odkazem na použitou metodu), a fáze zkoušky, ve které mají být měřeny, jsou shrnuty v níže uvedené tabulce. Metody stanovení těchto parametrů jsou pro informaci uvedeny v literatuře (18, 19, 20, 21).

Kromě toho může být případ od případu nezbytné měřit a uvádět další parametry (např. u sladkovodního systému: obsah částic, alkalita, tvrdost, vodivost, NO_3/PO_4 (poměr jednotlivých hodnot); u sedimentů: kationtová výměnná kapacita, retenční vodní kapacita, obsah uhličitanů, celkový obsah dusíku a fosforu; u mořských systémů: salinita). Pro posouzení oxidačně-redukčních podmínek, a zejména v souvislosti s anaerobní transformací, může být také užitečná analýza sedimentů a vody na dusičnany, sírany, biologicky dostupné železo, popřípadě na jiné akceptory elektronů.

([1]) (Jíl + prach) je minerální frakce sedimentu s velikostí částic < 50 μm.

▼B

Měření parametrů pro charakterizaci vzorků systémů voda/sediment (7, 22, 23)

Parametr	Fáze zkušebního postupu					
	odběr v terénu	manipulace po odběru	zahájení aklimatizace	zahájení zkoušky	samotná zkouška	konec zkoušky
Voda						
Původ/zdroj	x					
Teplota	x					
pH	x		x	x	x	x
TOC			x	x		x
Koncentrace O_2 (*)	x		x	x	x	x
Oxidačně-redukční potenciál (*)			x	x	x	x
Sediment						
Původ/zdroj	x					
Hloubka vrstvy	x					
pH		x	x	x	x	x
Distribuce částic		x				
TOC		x	x	x		x
Mikrobiální biomasa (**)		x		x		x
Oxidačně-redukční potenciál (*)	Pozorování (barva/ zápach)		x	x	x	x

(*) Výsledky nedávných výzkumů ukázaly, že měření koncentrace kyslíku ve vodě a oxidačně-redukčního potenciálu vody nemají vypovídací hodnotu, pokud jde o mechanismus růstu a vývoje mikrobiální populace v povrchových vodách, a nemají ani předpovědní hodnotu (24, 25). Stanovení biochemické spotřeby kyslíku (BOD, při odběru vzorků v terénu a při zahájení a na konci zkoušky) a koncentrace mikro- a makroživin Ca, Mg a Mn ve vodě (při zahájení a na konci zkoušky) a měření celkového obsahu N a P v sedimentech (při odběru vzorků v terénu a na konci zkoušky) může být lepším nástrojem pro interpretaci a hodnocení rychlosti a způsobů aerobní biotransformace.

(**) Metoda měření rychlosti mikrobiální respirace (26), fumigační metoda (27) nebo měření počtu mikroorganismů (např. bakterií, aktinomycet, plísní a celkového počtu kolonií) pro aerobní studie; rychlost methanogeneze u anaerobních studií.

1.8.3. **Odběr vzorků, manipulace s nimi a jejich skladování**

1.8.3.1. *Odběr*

Vzorky sedimentu se odeberou podle návrhu směrnice ISO pro odběr vzorků sedimentů ze dna (8). Vzorky se odeberou z celé 5 až 10 cm silné horní vrstvy sedimentu. Současně se sedimentem se odebere z téhož místa i vzorek okolní vody. U anaerobní studie musí být sediment a okolní voda odebrány a přepravovány s vyloučením přístupu kyslíku (28) (viz oddíl 1.8.2.1). V literatuře je popsáno několik odběrových zařízení (8, 23).

▼B

1.8.3.2. *Manipulace*

Sediment se oddělí od vody filtrací a poté se pomocí přebytku vody z místa odběru prosévá za mokra na 2mm sítu; voda se poté odstraní. Následně se v inkubační baňce v požadovaném poměru (viz oddíl 1.9.1) smísí známé množství sedimentu a vody a směs se připraví pro aklimatizaci (viz oddíl 1.8.4). U anaerobní studie musí být všechny kroky prováděny s vyloučením přístupu kyslíku (29, 30, 31, 32, 33).

1.8.3.3. *Skladování*

V každém případě se doporučuje používat čerstvě odebraný sediment a vodu; je-li však skladování nezbytné, sediment s vodou se proseje výše popsaným způsobem a zalitý vodou (vrstva vody 6–10 cm) se skladuje v temnu při 4 ± 2 °C (4) maximálně 4 týdny (7, 8, 23). Vzorky pro aerobní studie se skladují za volného přístupu vzduchu (např. v otevřených nádobách), zatímco vzorky pro anaerobní studie se skladují s vyloučením přístupu kyslíku. Při přepravě a skladování nesmí sediment a voda zmrznout a sediment nesmí být vysušován.

1.8.4. **Příprava vzorků sedimentu/vody ke zkoušce**

Před přidáním zkoušené látky musí proběhnout aklimatizace, při níž musí být vzorky sedimentu/vody umístěny v inkubační nádobě, která se použije při hlavní zkoušce; podmínky aklimatizace musí být totožné s podmínkami inkubace při zkoušce (viz oddíl 1.9.1). Doba aklimatizace je čas nezbytný pro dostatečnou stabilizaci systému, kterou lze posoudit podle pH, koncentrace kyslíku ve vodě, oxidačně-redukčního potenciálu sedimentu a vody a makroskopické separace fází. Doba aklimatizace není obvykle delší než jeden až dva týdny a neměla by překročit čtyři týdny. Výsledky měření provedených během této doby se uvedou ve zprávě.

1.9. PROVEDENÍ ZKOUŠKY

1.9.1. **Zkušební podmínky**

Zkouška se provede v inkubační aparatuře (viz oddíl 1.8.1) s poměrem objemu vody a sedimentu 3:1 až 4:1 a vrstvou sedimentu 2,5 cm (± 0,5 cm) ([1]). Doporučené minimální množství sedimentu na inkubační nádobu je 50 g (hmotnost sušiny).

Zkouška se provádí v temnu za konstantní teploty v rozmezí 10 až 30 °C. Vhodná je teplota 20 ± 2 °C. Podle potřeby lze případ od případu v závislosti na zaměření zkoušky zvolit jinou, nižší teplotu (např. 10 °C). Inkubační teplota se sleduje a uvede se ve zprávě.

([1]) Z nedávných studií vyplývá, že skladování při 4 °C může vést k poklesu obsahu organického uhlíku v sedimentu, který by mohl případně vést k poklesu mikrobiální aktivity.

▼B

1.9.2. **Úprava zkoušené látky a její aplikace**

Použije se jedna zkušební koncentrace chemické látky ([1]). U přípravků na ochranu rostlin aplikovaných přímo do vodního tělesa se použije maximální dávkování uvedené na etiketě jako maximální aplikovaná dávka vypočtená podle plochy hladiny vody ve zkušební nádobě. Ve všech ostatních případech se použije koncentrace založená na odhadech emisí do životního prostředí. Je třeba spolehlivě zajistit, aby byla aplikována dostatečná koncentrace zkoušené látky pro charakterizaci postupu transformace a tvorby a odbourávání transformačních produktů. v situaci, kdy se koncentrace zkoušené látky na začátku studie blíží mezím detekce a/nebo kdy by nebylo možné detekovat hlavní transformační produkty, jsou-li přítomny v množství odpovídajícím 10 % výchozí aplikované dávky, může být nezbytné aplikovat vyšší dávky (např. desetkrát vyšší). Použité vyšší koncentrace však nesmí mít značně nepříznivé účinky na mikrobiální aktivitu voday/sedimentu. S cílem dosáhnout konstantní koncentrace v nádobách různých rozměrů může být nezbytné upravit množství použitého materiálu, přičemž se vychází z výšky vodního sloupce v nádobě v poměru k hloubce vody v odběrovém místě (předpokládá se hloubka 100 cm, možná je však i jiná hloubka). Příklad výpočtu je uveden v příloze 4.

V ideálním případě se zkoušená látka aplikuje do vodné fáze zkoušeného systému ve formě vodného roztoku. Je-li to nevyhnutelné, je přípustné použít pro aplikaci a rozptýlení zkoušené látky malé množství rozpouštědla mísitelného s vodou (např. acetonu nebo ethanolu), avšak jeho množství by nemělo překročit 1 % (obj.); rozpouštědlo by nemělo mít nepříznivé účinky na mikrobiální aktivitu ve zkušebním systému. Přípravě vodného roztoku zkoušené látky je třeba věnovat pozornost a k zajištění naprosté homogenity může být vhodné použít generátorové kolony a předem připravené směsi. Po přidání vodného roztoku do zkušebního systému se doporučuje vodnou fázi mírně promíchat tak, aby se sediment zvířil co nejméně.

Použití komerčních úprav přípravků se v zásadě nedoporučuje, neboť složky přípravku mohou mít vliv na rozptýlení zkoušené látky a/nebo transformačních produktů mezi vodu a sediment. U špatně rozpustných zkoušených látek však může být použití komerční úpravy vhodnou možností.

Počet inkubačních nádob závisí na počtu intervalů, v nichž mají být prováděny odběry (viz oddíl 1.9.3). Je třeba nasadit dostatečný počet zkušebních systémů, aby bylo možné v každém intervalu vyhodnotit dva systémy. Použijí-li se pro každý systém voda/sediment kontrolní systémy, neexponují se zkoušené látce. Kontrolní systémy lze použít pro stanovení mikrobiální biomasy sedimentu a celkového organického uhlíku ve vodě na konci studie. Dva kontrolní systémy (tj. po jednom kontrolním systému z každého systému voda/sediment) mohou být použity pro sledování požadovaných parametrů v sedimentu a ve vodě v průběhu aklimatizace (viz tabulka v oddílu 1.8.2.2). Dva další kontrolní systémy musí být nasazeny za účelem měření nepříznivých účinků na mikrobiální aktivitu ve zkušebním systému v případě, že se zkoušená látka aplikuje pomocí rozpouštědla.

([1]) Zkouška s druhou koncentrací může být užitečná u chemických látek, které se dostávají do vod různými cestami, a vykazují tedy významně odlišné koncentrace, pokud lze nižší koncentraci analyzovat s dostatečnou správností.

▼B

1.9.3. **Délka zkoušky a odběry vzorků**

Délka experimentu by neměla překročit 100 dnů (6) a experiment by měl trvat tak dlouho, dokud se nestanoví způsob rozkladu a rozptýlení ve vodě/sedimentu, nebo dokud se transformací a/nebo těkáním nevyčerpá 90 % zkoušené látky. Odběr by měl být proveden nejméně šestkrát za sebou (včetně času 0), přičemž vhodný režim odběrů a délka zkoušky se stanoví nepovinnou orientační studií (viz oddíl 1.9.4), nejsou-li k dispozici dostačující údaje o zkoušené látce z dřívějších studií. U hydrofobních zkoušených látek může být potřeba dodatečným vzorkováním v průběhu počáteční fáze studie zjistit stupeň rozptýlení mezi vodu a sediment.

V příslušnou dobu se k analýze odebere celý obsah inkubačních nádob (včetně duplikátních nádob). Sediment a voda nad sedimentem se analyzují zvlášť ([1]). Voda se za minimálního zvíření sedimentu opatrně odebere. Vhodnými analytickými postupy se provedou extrakce a charakterizace zkoušené látky a transformačních produktů. Je třeba také pečlivě shromáždit materiál, který může být adsorbován na inkubační nádobě nebo ve spojovacích trubičkách použitých k zachycení těkavých látek.

1.9.4. **Nepovinná orientační zkouška**

Nelze-li délku a režim odběrůodhadnout z jiných relevantních studií zkoušené látky, může se provést předběžná zkouška za týchž zkušebních podmínek, jaké jsou navrženy pro hlavní studii. Příslušné podmínky a výsledky orientační zkoušky, pokud byla provedena, by měly být stručně uvedeny ve zprávě.

1.9.5. **Měření a analýza**

Pro každý jednotlivý odběr se provede měření koncentrace zkoušené látky a transformačních produktů ve vodě a v sedimentu a výsledky se uvedou ve zprávě (jako koncentrace a v procentech aplikovaného množství). V zásadě by měla být při každém odběru provedena identifikace transformačních produktů, které obsahují ≥ 10 % radioaktivity aplikované do celého systému voda/sediment, nejsou-li dostatečné důvody pro jiný postup. Měly by být také identifikovány transformační produkty, jejichž koncentrace se v průběhu studie nepřetržitě zvyšuje, třebaže nedosahuje výše uvedené meze, neboť to může znamenat, že se jedná o perzistentní produkty. Tento postup by měl být zvážen případ od případu a ve zprávě by měl být odůvodněn.

Pro každý jednotlivý odběr se uvedou výsledky ze systémů pro zachycování plynů/těkavých látek (CO_2 a jiných těkavých organických sloučenin). Uvede se rychlost mineralizace. Pro každý jednotlivý odběr se uvedou neextrahovatelná (vázaná) rezidua v sedimentu.

([1]) Může-li snadno docházet k rychlé opětovné oxidaci produktů anaerobní transformace, měly by být během odběru a analýzy zachovány anaerobní podmínky.

▼B

2. **ÚDAJE**

2.1. ZPRACOVÁNÍ VÝSLEDKŮ

Pro každý jednotlivý odběr se vypočte celková látková bilance nebo výtěžnost (viz oddíl 1.7.1) přidané radioaktivity. Výsledky se uvedou v procentech přidané radioaktivity. Pro každý jednotlivý odběr se uvede rozptýlení radioaktivity mezi vodu a sediment (vyjádřeno v koncentracích a v procentech).

Pro zkoušenou látku se vypočítá poločas a hodnoty $DT_{50,}$ případně hodnoty DT_{75} a DT_{90} a intervaly spolehlivosti těchto hodnot (viz oddíl 1.7.3). Vhodnými hodnotícími nástroji lze zjistit míru zániku zkoušené látky ve vodě a v sedimentu. Může jít o použití zdánlivé kinetiky prvního řádu, o techniky proložení empirické křivky za použití grafického nebo numerického řešení a o složitější hodnocení, např. pomocí modelu s jednou nebo více složkami. Další podrobné informace lze získat z příslušné publikované literatury (35, 36, 37).

Všechny přístupy mají své silné a slabé stránky a značně se liší z hlediska komplexnosti. Použití kinetiky prvního řádu může být sice přílišným zjednodušením procesu rozkladu a distribuce, vede však v ideálním případě k hodnotám (rychlostní konstantě nebo poločasu), které jsou snadno srozumitelné a mají význam pro simulační modelování a výpočet předpokládaných koncentrací v životním prostředí. Empirický přístup nebo lineární transformace mohou vést k lepšímu proložení dat křivkami, a tedy k lepšímu odhadu poločasů, hodnot $DT_{50,}$ případně DT_{75} a DT_{90}. Použití odvozených konstant však má své meze. Složkové modely mohou poskytovat řadu užitečných konstant, které jsou důležité pro posouzení rizika a pro popis rozkladu chemické látky v různých složkách a pro její distribuci. Použijí se rovněž pro odhad rychlostních konstant tvorby a rozkladu hlavních transformačních produktů. v každém případě však musí být volba metody odůvodněna a experimentátor by měl graficky nebo statisticky prokázat její oprávněnost.

3. **ZPRÁVY**

3.1. PROTOKOL O ZKOUŠCE

Protokol musí obsahovat následující informace:

Zkoušená látka:

— obecný název, chemický název, číslo CAS, strukturní vzorec (s uvedením polohy značícího nuklidu u látek značených radionuklidy) a relevantní fyzikálně-chemické vlastnosti,

— čistota zkoušené látky (obsah nečistot),

— popřípadě radiochemická čistota značené chemické látky a molární aktivita.

▼B

Referenční látky:

— chemický název a struktura referenčních látek použitých k charakterizaci a/nebo identifikaci transformačního produktu.

Zkušební sedimenty a vody:

— lokalita a popis místa/míst odběru sedimentu a vody, pokud možno včetně dřívější kontaminace,

— všechny informace týkající se odběru, případného skladování a aklimatizace systému voda/sediment,

— charakteristiky vzorků systému voda/sediment, jak jsou uvedeny v tabulce v oddílu 1.8.2.2.

Zkušební podmínky:

— použitý zkušební systém (např. průtokový systém, biometrický systém, způsob provzdušňování, míchání, objem vody, hmotnost sedimentu, tloušťka vrstvy vody i sedimentu, rozměry zkušebních nádob atd.),

— aplikace zkoušené látky do systému: použitá zkušební koncentrace, počet duplikátních vzorků a kontrol, způsob aplikace zkoušené látky (např. případné použití rozpouštědla) atd.,

— inkubační teplota,

— doby odběru,

— metody extrakce a účinnosti extrakce, analytické metody a meze detekce,

— metody charakterizace/identifikace transformačních produktů,

— odchylky od zkušebního postupu nebo zkušebních podmínek.

Výsledky:

— původní číselná data reprezentativních analýz (všechna původní data musí být uložena v archivu vedeném podle zásad správné laboratorní praxe),

— opakovatelnost a citlivost použitých analytických metod,

— hodnoty výtěžnosti (hodnoty v % pro platnou studii jsou uvedeny v oddíle 1.7.1),

— výsledky pro zkoušenou látku, popřípadě i pro transformační produkty a neextrahovatelnou radioaktivitu, zpracované v tabulkové formě a vyjádřené v % aplikované dávky a v mg/kg pro vodu, sediment a celý systém (pouze v %),

— látková bilance během studií na jejich konci,

— grafické schéma transformace ve vodě a sedimentu a v celém systému (včetně mineralizace),

— rychlosti mineralizace,

▼B

— poločas, hodnoty DT_{50} a popřípadě DT_{75} a DT_{90} pro zkoušenou látku, popřípadě i pro hlavní transformační produkty, včetně intervalů spolehlivosti, pro vodu, sediment a celý systém,

— charakteristika kinetiky transformace zkoušené látky, popřípadě i hlavních transformačních produktů,

— případný návrh způsobu transformace,

— diskuse o výsledcích.

4. **LITERATURA**

1) BBA-Guidelines for the examination of plant protectors in the registration process. (1990). Part IV, Section 5-1: Degradability and fate of plant protectors in the water/sediment system. Germany.

2) Commission for registration of pesticides: Application for registration of a pesticide. (1991). Part G. Behaviour of the product and its metabolites in soil, water and air, Section G.2.1 (a). The Netherlands.

3) MAFF Pesticides Safety Directorate. (1992). Preliminary guideline for the conduct of biodegradability tests on pesticides in natural sediment/water systems. Ref No SC 9046. United Kingdom.

4) Agriculture Canada: Environmental chemistry and fate. (1987). Guidelines for registration of pesticides in Canada. Aquatic (Laboratory) – Anaerobic and aerobic. Canada. 35–37.

5) US-EPA: Pesticide assessment guidelines, Subdivision N. Chemistry: Environmental fate (1982). Section 162–3, Anaerobic aquatic metabolism.

6) SETAC-Europe publication. (1995). Procedures for assessing the environmental fate and ecotoxicity of pesticides. (ed. Dr. Mark R. Lynch.) SETAC-Europe, Brussels.

7) OECD Test Guidelines Programme. (1995). Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/sediments, Belgirate, Italy, 18–20 January 1995.

8) ISO/DIS 5667-12. (1994). Water quality – Sampling – Part 12: Guidance on sampling of bottom sediments.

9) US-EPA (1998a). Sediment/water microcosm biodegradation test. Harmonised Test Guidelines (OPPTS 835.3180). EPA 712-C-98-080.

10) DFG: Pesticide Bound Residues in Soil. Wiley-VCH (1998).

11) T. R. Roberts: Non-extractable pesticide residues in soils and plants. *Pure Appl. Chem*. 56, 945-956 (IUPAC 1984).

12) OECD Test Guideline 304A: Inherent Biodegradability in Soil (přijato 12. května 1981).

13) OECD (1993): Guidelines for Testing of Chemicals. Paris. OECD (1994-2000): Addenda 6-11 to Guidelines for the Testing of Chemicals.

14) Scholz, K., Fritz R., Anderson C., Spiteller M. (1988) Degradation of pesticides in an aquatic model ecosystem. BCPC – Pests and Diseases, 3B-4, 149–158.

▼B

15) Guth, J. A. (1981). Experimental approaches to studying the fate of pesticides in soil. In Progress in Pesticide Biochemistry (ed. D. H. Hutson, T. R. Roberts), Vol. 1, 85–114. J. Wiley & Sons.

16) Madsen, T., Kristensen, P. (1997). Effects of bacterial inoculation and non-ionic surfactants on degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil. *Environ. Toxicol. Chem*. 16, 631–637.

17) Steber, J., Wierich, P. (1987). The anaerobic degradation of detergent range fatty alcohol ethoxylates. Studies with ^{14}C-labelled model surfactants. *Water Research* 21, 661–667.

18) Black, C. A. (1965). Methods of Soil Analysis. Agronomy Monograph No. 9. American Society of Agronomy, Madison.

19) APHA (1989). Standard Methods for Examination of Water and Wastewater (17. vyd.). American Public Health Association, American Water Works Association and Water Pollution Control Federation, Washington D.C.

20) Rowell, D. L. (1994). Soil Science Methods and Applications. Longman.

21) Light, T. S. (1972). Standard solution for redox potential measurements. *Anal. Chem.* 44, 1038–1039.

22) SETAC-Europe publication (1991). Guidance document on testing procedures for pesticides in freshwater mesocosms. From the Workshop „A Meeting of Experts on Guidelines for Static Field Mesocosms Tests“, 3.–4. června 1991.

23) SETAC-Europe publication. (1993). Guidance document on sediment toxicity tests and bioassays for freshwater and marine environments. From the Workshop On Sediment Toxicity Assessment (WOSTA), 8.–10. listopadu 1993. (ed. I. R. Hill, P. Matthiessen, F. Heimbach).

24) Vink, J. P. M., van der Zee, S. E. A. T. M. (1997). Pesticide biotransformation in surface waters: multivariate analyses of environmental factors at field sites. *Water Research* 31, 2858–2868.

25) Vink, J. P. M., Schraa, G., van der Zee, S. E. A. T. M. (1999). Nutrient effects on microbial transformation of pesticides in nitrifying waters. *Environ. Toxicol*, 329–338.

26) Anderson, T. H., Domsch, K. H. (1985). Maintenance carbon requirements of actively-metabolising microbial populations under in-situ conditions. *Soil Biol. Biochem*. 17, 197–203.

27) ISO-14240-2. (1997). Soil quality – Determination of soil microbial biomass – Part 2: Fumigation-extraction method.

28) Beelen, P. Van, F. Van Keulen. (1990), The Kinetics of the Degradation of Chloroform and Benzene in Anaerobic Sediment from the River Rhine. *Hydrobiol. Bull*. 24 (1), 13–21.

29) Shelton, D. R., Tiedje, J. M. (1984). General method for determining anaerobic biodegradation potential. *App. Environ. Microbiol*. 47, 850–857.

30) Birch, R. R., Biver, C., Campagna, R., Gledhill, W. E., Pagga, U., Steber, J., Reust, H., Bontinck, W. J. (1989). Screening of chemicals for anaerobic biodegradation. *Chemosphere*, 19, 1527–1550.

31) Pagga, U., Beimborn, D. B. (1993). Anaerobic biodegradation tests for organic compounds. *Chemoshpere*, 27, 1499–1509.

▼B

32) Nuck, B. A., Federle, T. W. (1986). A batch test for assessing the mineralisation of ^{14}C-radiolabelled compounds under realistic anaerobic conditions. *Environ. Sci. Technol*. 30, 3597–3603.

33) US-EPA (1998b). Anaerobic biodegradability of organic chemicals. Harmonised Test Guidelines (OPPTS 835.3400). EPA 712-C-98-090.

34) Sijm, Haller, Schrap (1997). Influence of storage on sediment characteristics and drying sediment on sorption coefficients of organic contaminants. *Bulletin Environ. Contam. Toxicol*. 58, 961–968.

35) Timme, G., Frehse, H., Laska, V. (1986) Statistical interpretation and graphic representation of the degradational behaviour of pesticide residues II. Pflanzenschutz – Nachrichten Bayer, 39, 187–203.

36) Timme, G., Frehse, H. (1980) Statistical interpretation and graphic representation of the degradational behaviour of pesticide residues I. Pflanzenschutz – Nachrichten Bayer, 33, 47–60.

37) Carlton, R.R., Allen, R. (1994). The use of a compartment model for evaluating the fate of pesticides in sediment/water systems. Brighton Crop Protection Conference – Pest and Diseases, 1349–1354.

▼B

DODATEK 1

POKYNY K AEROBNÍM A ANAEROBNÍM ZKUŠEBNÍM SYSTÉMŮM

Aerobní zkušební systém

Aerobní zkušební systém popsaný v této zkušební metodě se skládá z aerobní vodní vrstvy (typická koncentrace kyslíku v rozmezí od 7 do 10 mg/l) a vrstvy sedimentu, která je na povrchu aerobní a pod povrchem anaerobní (typické průměrné oxidačně-redukční potenciály (E_h) v anaerobní zóně sedimentu jsou v rozmezí – 80 až – 190 mV). Nad vodní hladinu v každé inkubační jednotce se zavádí zvlhčený vzduch, aby se v prostoru pod víčkem udržovala dostatečná koncentrace kyslíku.

Anaerobní zkušební systém

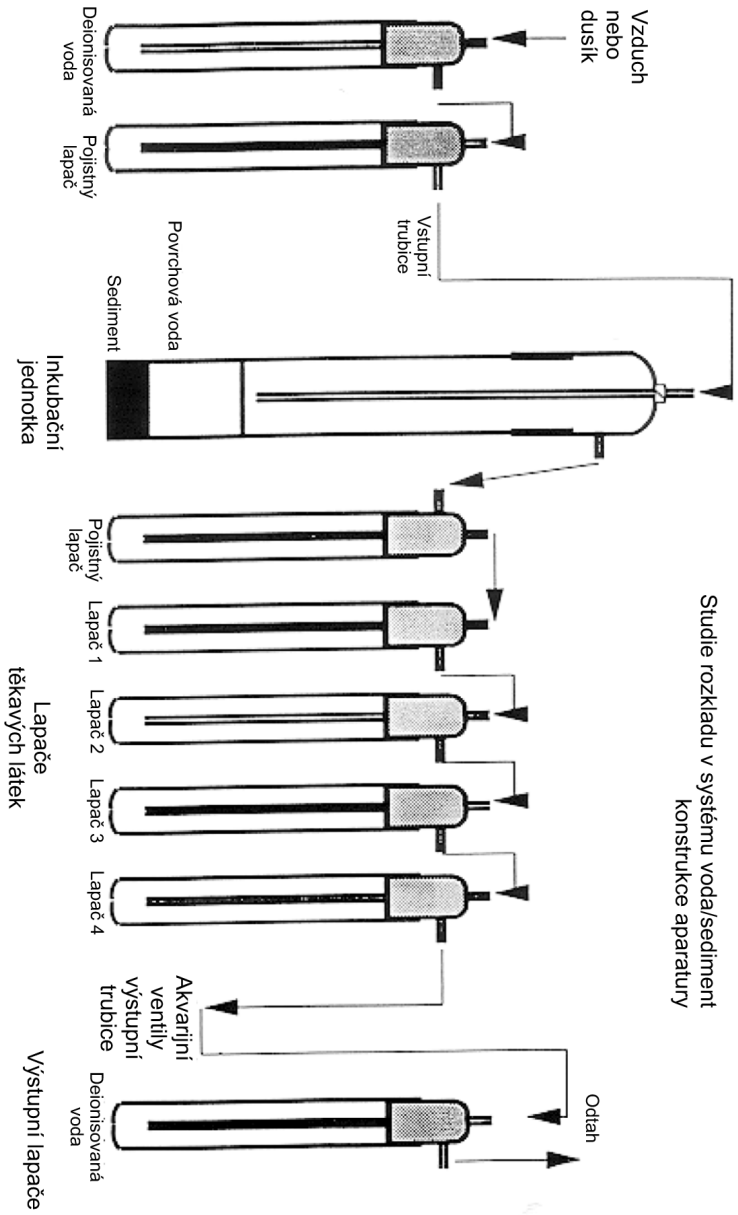
Pro anaerobní zkušební systém je zkušební postup v podstatě tentýž, jako postup popsaný pro aerobní systém, liší se však tím, že nad hladinu vody v každé inkubační jednotce se zavádí zvlhčený dusík, aby se udržovala jeho koncentrace v prostoru pod víčkem. Sediment a voda jsou považovány za anaerobní, pokud je oxidačně-redukční potenciál (E_h) nižší – 100 mV.

V anaerobní zkoušce se mineralizace posuzuje na základě měření uvolněného oxidu uhličitého a methanu.

▼B

DODATEK 2

PŘÍKLAD SKLENĚNÉ PRŮTOKOVÉ APARATURY

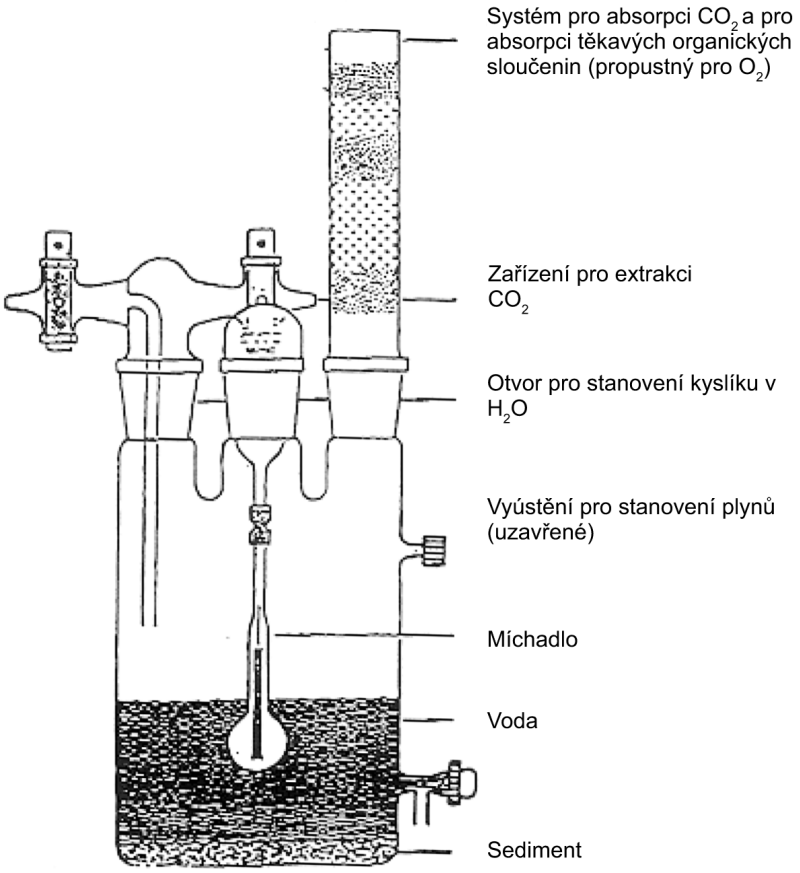


Pojistný lapač: prázdný
Lapač 1:
ethylenglykol pro zachycení organických těkavých látek
Lapač 2:
0,1 M kyselina sírová k zachycení alkalických těkavých látek
Lapače 3 a 4:
2 M hydroxid sodný k zachycení CO_2 jiných kyselých těkavých látek

▼B

DODATEK 3

PŘÍKLAD BIOMETRICKÉ APARATURY



▼B

DODATEK 4

PŘÍKLAD VÝPOČTU DÁVKY APLIKOVANÉ DO ZKUŠEBNÍCH NÁDOB

Vnitřní průměr válce:	= 8 cm
Výška vodního sloupce bez sedimentu:	= 12 cm
Plocha hladiny: $3{,}142 \times 4^2$	= 50,3 cm^2
Dávkování: 500 g zkoušené látky na ha odpovídá 5 µg/cm^2	
Celkové množství v µg: $5 \times 50{,}3$	= 251,5 µg
Přepočet celkového množství na hloubku 100 cm: $12 \times 251{,}5 \div 100$	= 30,18 µg
Objem vodního sloupce: $50{,}3 \times 12$	= 603 ml
Koncentrace ve vodě: $30{,}18 \div 603$	= 0,050 µg/ml nebo 50 µg/l

▼M1

C.25 AEROBNÍ MINERALIZACE V POVRCHOVÉ VODĚ – SIMULAČNÍ ZKOUŠKA BIOLOGICKÉHO ROZKLADU

1. METODA

Tato metoda je rovnocenná Pokynu OECD pro zkoušení 309 (2004) (1).

1.1 ÚVOD

Cílem této zkoušky je změřit časový průběh biologického rozkladu zkoušené látky při nízké koncentraci v aerobní přírodní vodě a kvantifikovat pozorování ve formě výrazů pro kinetickou rychlost. Tato simulační zkouška je dávková zkouška v laboratorní třepací lahvi pro stanovení rychlostí aerobního biologického rozkladu organických látek ve vzorcích přírodní povrchové vody (sladkovodní, brakické nebo mořské). Je založena na ISO/DIS 14592–1 (2) a rovněž obsahuje prvky ze zkušebních metod C.23 a C.24 (3) (4). Volitelně při dlouhých zkušebních časech je dávkové zkoušení nahrazeno polospojitou zkouškou s cílem zabránit zhoršení zkušebního mikrokosmu. Základním cílem simulační zkoušky je určit mineralizaci zkoušené látky v povrchové vodě a mineralizace tvoří základnu pro vyjádření kinetiky rozkladu. Ovšem volitelným sekundárním cílem zkoušky je získat informace o primárním rozkladu a tvorbě významnějších transformačních produktů. Určení transformačních produktů, a bude-li to možné, kvantitativní stanovení jejich koncentrací jsou zvláště důležité pro látky, které jsou velmi pomale mineralizované (např. s poločasy pro celkový zbytkový ^{14}C překračující 60 dnů). Pro určení a kvantitativní stanovení významnějších transformačních produktů by se vzhledem k analytickým omezením měly obvykle používat vyšší koncentrace zkoušené látky (např. > 100 μg/l).

Nízká koncentrace v této zkoušce znamená koncentraci (např. méně než 1 μg/l až 100 μg/l), která je dostatečně nízká na to, aby zajistila, že kinetika biologického rozkladu získaná ve zkoušce odráží kinetiku očekávanou v životním prostředí. V porovnání s celkovou hmotností biologicky rozložitelných uhlíkových substrátů dostupných v přírodní vodě používané pro zkoušku slouží zkoušená látka přítomná v nízké koncentraci jako sekundární substrát. To znamená, že očekávaná kinetika biologického rozkladu je prvního řádu („nerůstová“ kinetika) a že zkoušená látka může být rozkládána „spolumetabolismem“. Z kinetiky prvního řádu vyplývá, že rychlost rozkladu (mg/l/den) je přímo úměrná koncentraci substrátu, která s časem klesá. Při opravdové kinetice prvního řádu je specifická rychlostní konstanta rozkladu, k, nezávislá na času a koncentraci. To znamená, že k se znatelně nemění během doby experimentu a nemění se s rostoucí koncentrací během experimentů. Z definice je specifická rychlostní konstanta rozkladu rovna relativní změně koncentrace za čas: $k = (1/C) \cdot (dC/dt)$. Ačkoliv se za předepsaných podmínek normálně očekává kinetika prvního řádu, mohou nastat určité okolnosti, za kterých se projeví kinetiky jiných řádů. Odchylky od kinetiky prvního řádu lze pozorovat například tehdy, jestliže rychlost biologické transformace omezuje spíše než biologická reakční rychlost jev spojený s přenosem hmoty, například rychlost difuse. Ovšem údaje lze téměř vždy popsat kinetikou pseudoprvního řádu a přijmout rychlost závislou na koncentraci jako konstantní.

▼M1

Informace o biologické rozložitelnosti zkoušené látky při vyšších koncentracích (např. ze standardních screeningových zkoušek) společně s informacemi o abiotické rozložitelnosti, transformačních produktech a relevantních fyzikálně-chemických vlastnostech by měly být dostupné před zkouškou jako pomůcka pro vypracování plánu experimentu a interpretaci výsledků. Použití zkoušených látek značených isotopem ^{14}C a stanovení fázové distribuce ^{14}C na konci zkoušky umožňuje stanovení úplné biologické rozložitelnosti. Při použití neznačené zkoušené látky lze úplný biologický rozklad pouze odhadovat, pokud se zkouší vyšší koncentrace a jsou známy všechny významnější transformační produkty.

1.2 DEFINICE

Primární biologický rozklad: strukturální změna (transformace) chemické látky působením mikroorganismů, která má za následek ztrátu chemické identity.

Funkční biologický rozklad: strukturální změna (transformace) chemické látky působením mikroorganismů, která má za následek ztrátu specifické vlastnosti.

Úplný aerobní biologický rozklad: rozložení chemické látky působením mikroorganismů za přítomnosti kyslíku na oxid uhličitý, vodu a minerální soli jakýchkoli jiných přítomných prvků (mineralizace) a tvorba nové biomasy a organických mikrobiálních produktů biologické syntézy.

Mineralizace: rozložení chemické látky nebo organické hmoty působením mikroorganismů za přítomnosti kyslíku na oxid uhličitý, vodu a minerální soli jakýchkoli jiných přítomných prvků.

Fáze iniciace: doba od počátku zkoušky do dosažení adaptace rozkládajících mikroorganismů a zvýšení stupně biologického rozkladu chemické látky nebo organické hmoty na detekovatelnou úroveň (např. 10 % maximálního teoretického biologického rozkladu nebo nižší v závislosti na přesnosti techniky měření).

Maximální úroveň biologického rozkladu: stupeň biologického rozkladu chemické látky nebo organické hmoty při zkoušce uváděný v procentech, při jehož překročení neprobíhá během zkoušky žádný další biologický rozklad.

Primární substrát: soubor přírodního uhlíku a zdrojů energie, který zajišťuje růst a udržování mikrobiální biomasy.

Sekundární substrát: substrátová složka přítomná v tak nízké koncentraci, že svými rozkladem dodává pouze nevýznamná množství uhlíku a energie kompetentním mikroorganismům v porovnání s uhlíkem a energií dodávanou rozkladem hlavních složek substrátu (primárních substrátů).

Rychlostní konstanta rozkladu: rychlostní konstanta kinetiky prvního nebo pseudoprvního řádu, k (d^{-1}), která ukazuje rychlost rozkladných procesů. U dávkového experimentu se k odhaduje z počáteční části rozkladové křivky získané po ukončení fáze iniciace.

▼M1

Poločas, $t_{1/2}$ (d): termín používaný pro charakteristiku rychlosti reakce prvního řádu. Je to časový interval, který odpovídá poklesu koncentrace na polovinu. Poločas a rychlostní konstanta rozkladu jsou ve vzájemném vztahu vyjádřeném rovnicí $t_{1/2} = \ln 2/k$.

Poločas rozkladu, DT_{50} (d): termín používaný pro kvantifikaci výsledků zkoušek biologického rozkladu. Je to časový interval včetně fáze iniciace potřebný k dosažení 50 % biologického rozkladu.

Mez detekce (LOD) a mez kvantifikace (LOQ): Mez detekce (LOD) je koncentrace látky, pod níž nelze totožnost látky rozlišit od analytických artefaktů. Mez kvantifikace (LOQ) je koncentrace látky, pod níž nelze koncentraci určit s přijatelnou přesností.

Rozpuštěný organický uhlík (*dissolved organic carbon*, DOC): ta část organického uhlíku ve vzorku vody, kterou nelze odstranit stanovenou fázovou separací, například odstřeďováním po dobu 15 minut při zrychlení 40 000 ms^{-2} nebo membránovou filtrací pomocí membrán s póry o průměru 0,2 μm až 0,45 μm.

Celková aktivita organického ^{14}C (*total organic* ^{14}C *activity*, TOA): Celková aktivita ^{14}C spojená s organickým uhlíkem.

Aktivita rozpuštěného organického ^{14}C (*dissolved organic* ^{14}C *activity*, DOA): Celková aktivita ^{14}C spojená s rozpuštěným organickým uhlíkem.

Aktivita částicového organického ^{14}C (*particulate organic* ^{14}C *activity*, POA): Celková aktivita ^{14}C spojená s částicovým organickým uhlíkem.

1.3 POUŽITELNOST ZKUŠEBNÍ METODY

Tato simulační zkouška je použitelná pro netěkavé nebo slabě těkavé organické látky zkoušené při nízkých koncentracích. Při použití baněk otevřených do atmosféry (např. se zátkou z vaty) lze látky s Henryho konstantou nižší než 1 $Pa \cdot m^3/mol$ (přibližně 10^{-5} $atm \cdot m^3/mol$) považovat za prakticky netěkavé. Při použití uzavřených baněk s dostatečným volným prostorem nad látkou je možné zkoušet mírně těkavé látky (s Henryho konstantami < 100 $Pa \cdot m^3/mol$ nebo < 10^{-3} $atm \cdot m^3/mol$) beze ztrát ve zkušebním systému. Při odstraňování CO_2 může dojít ke ztrátám látek značených isotopem ^{14}C, pokud nejsou přijata správná předběžná opatření. V takových situacích může být nezbytné jímat CO_2 v interním absorbéru s alkálií nebo použít externí systém pro absorpci CO_2 (přímé stanovení $^{14}CO_2$, viz dodatek 3). Pro stanovení kinetiky biologického rozkladu musí být koncentrace zkoušené látky nižší než její rozpustnost ve vodě. Je však nutné uvést, že hodnoty rozpustnosti ve vodě uváděné v literatuře mohou být významně vyšší než rozpustnost zkoušené látky v přírodních vodách. Případně lze stanovit rozpustnost zkoušených látek se zvláště špatnou rozpustností ve vodě pomocí zkušebních přírodních vod.

Tuto metodu lze použít pro simulování biologického rozkladu v povrchové vodě bez hrubých částic („pelagická zkouška“) nebo ve zkalené povrchové vodě, která by například mohla existovat v blízkosti rozhraní voda/sediment („zkouška se suspendovanými sedimenty“).

▼M1

1.4 PODSTATA ZKOUŠKY

Zkouška se provádí v dávce inkubací zkoušené látky buď pouze s povrchovou vodou („pelagická zkouška“), nebo povrchovou vodou doplněnou suspendovanými pevnými látkami/sedimenty o suché hmotnosti 0,01 až 1 g/l („zkouška se suspendovanými sedimenty“) pro simulaci vodní hmoty se suspendovanými pevnými látkami nebo resuspendovanými sedimenty. Koncentrace suspendovaných pevných látek/sedimentů v nižším rozmezí tohoto intervalu je typická pro většinu povrchových vod. Zkušební baňky se inkubují ve tmě za teploty okolí za aerobních podmínek a míchání. Pro stanovení kinetiky rozkladu je zapotřebí použít nejméně dvou odlišných koncentrací zkoušené látky. Koncentrace by se měly navzájem lišit faktorem 5 až 10 a měly by představovat očekávané rozmezí koncentrací v životním prostředí. Maximální koncentrace zkoušené látky by neměla překročit 100 μg/l, ale dává se přednost maximálním koncentracím nižším než 10 μg/l, aby se zajistilo, že biologický rozklad dodržuje kinetiku prvního řádu. Nejnižší koncentrace by neměla překročit 10 μg/l, ale dává se přednost nejnižším zkušebním koncentracím 1–2 μg/l nebo méně než 1 μg/l. Normálně lze odpovídající analýzy takové nízké koncentrace provést pomocí komerčně dostupných látek značených isotopem ^{14}C. Kvůli analytickým omezením je často nemožné změřit koncentraci zkoušené látky s požadovanou přesností, pokud se zkoušená látka používá v koncentraci ≤ 100 μg/l (viz bod 1.7.2 druhý odstavec). Vyšší koncentrace zkoušené látky (> 100 μg/l a někdy > 1 mg/l) lze použít pro indentifikaci a stanovení množství významnějších transformačních produktů, nebo není-li k dispozici specifická analytická metoda s nízkou mezí detekce. Jestliže se zkouší vysoké koncentrace zkoušené látky, nemusí být použití výsledků pro odhad rozkladové konstanty prvního řádu a poločasu možné, protože rozklad pravděpodobně nebude probíhat podle kinetiky prvního řádu.

Rozklad je sledován v příslušných časových intervalech měřením zbytkového ^{14}C nebo zbytkové koncentrace zkoušené látky při použití specifické chemické analýzy. Značení nejstabilnější části molekuly isotopem ^{14}C zaručuje určení celkové mineralizace, zatímco značení méně stabilní části molekuly isotopem ^{14}C společně s využitím specifické analýzy umožňuje hodnotit pouze primární biologický rozklad. Ovšem nejstabilnější část nemusí nutně obsahovat relevantní funkční část molekuly (kterou lze vztahovat ke konkrétní vlastnosti, například toxicitě, bioakumulaci atd.). V tomto případě může být vhodné použít zkoušenou látku, která je značena isotopem ^{14}C, ve funkční části ke sledování eliminace konkrétní vlastnosti.

1.5 INFORMACE O ZKOUŠENÉ LÁTCE

V této zkoušce lze použít jak zkoušené látky značené radioisotopy, tak látky neznačené. Doporučuje se metoda značení isotopem ^{14}C, přičemž značena by obvykle měla být nejstabilnější část (části) molekuly (viz také bod 1.4). U látek obsahujících více než jeden aromatický kruh by se isotopem ^{14}C měly nejlépe označit jeden či více uhlíků v každém kruhu. Dále by se isotopem ^{14}C měl nejlépe označit jeden či více uhlíků na obou stranách snadno rozložitelných vazeb. Chemická a/nebo radiochemická čistota zkoušené látky by měla být > 95 %. U radioisotopově značených látek se dává přednost specifické aktivitě přibližně 50 μCi/mg (1,85 MBq) nebo více, aby se usnadnila měření ^{14}C u zkoušek prováděných s nízkými počátečními koncentracemi. O zkoušené látce by měly být k dispozici následující informace:

▼M1

— rozpustnost ve vodě (metoda A.6),

— rozpustnost v organickém(ých) rozpouštědle(ch) (látky používané s rozpouštědlem nebo s nízkou rozpustností ve vodě),

— disociační konstanta (pK_a), jestliže látka podléhá protonaci nebo deprotonaci (Pokyn OECD pro zkoušení 112) (5),

— tlak par (metoda A.4) a Henryho konstanta,

— chemická stálost ve vodě a ve tmě (hydrolýza) (metoda C.7).

Zkouší-li se v mořské vodě látky špatně rozpustné ve vodě, může být rovněž užitečné znát vysolovací konstantu (neboli „Sečenovovu konstantu“) K^s, která je definována výrazem: log (S/S') = K^s C_m, kde S je rozpustnost látky ve sladké vodě a S' v mořské vodě, a C_m je molární koncentrace soli.

Jestliže se zkouška provádí jako „zkouška se suspendovanými sedimenty“, měly by být k dispozici rovněž následující informace:

— rozdělovací koeficient oktanol-1-ol/voda (metoda A.8),

— adsorpční koeficient (metoda C.18).

Mezi další užitečné informace patří:

— koncentrace v životním prostředí, je-li známá nebo odhadnutá,

— toxicita zkoušené látky pro mikroorganismy (metoda C.11),

— snadná a/nebo vlastní biologická rozložitelnost (metody C.4 A–F, C.12, C.9, Pokyn OECD pro zkoušení 302 (5)),

— aerobní nebo anaerobní biologická rozložitelnost v půdě a studie transformace v systémech voda/sediment (metody C.23, C.24).

1.6 REFERENČNÍ LÁTKA

Jako referenční látka by se měla používat látka, která se za aerobních podmínek obvykle snadno rozkládá (např. anilin nebo benzoát sodný). Očekávaný časový interval pro rozklad anilinu a benzoátu sodného je obvykle méně než 2 týdny. Účelem referenčních látek je zajistit, aby byla mikrobiální aktivita zkušební vody v určitých mezích, tj., aby voda obsahovala aktivní mikrobiální populaci.

▼M1

1.7 KRITÉRIA JAKOSTI

1.7.1 **Výtěžnost**

Bezprostředně po přidání zkoušené látky je třeba ověřit každou počáteční zkušební koncentraci měřením aktivity ^{14}C nebo – v případě neznačených látek – chemickými analýzami vždy nejméně v duplikátních vzorcích. Takto se získají informace o použitelnosti a opakovatelnosti analytické metody a o homogenitě distribuce zkoušené látky. V následných analýzách údajů se obvykle namísto nominální koncentrace použije spíše naměřená počáteční aktivita ^{14}C nebo koncentrace zkoušené látky, neboť se jejich použitím kompenzují ztráty způsobené sorpcí a chybami při dávkování. U zkoušené látky značené isotopem ^{14}C se hodnota výtěžnosti na konci experimentu udává pomocí hmotnostní bilance (viz bod 1.8.9.4 poslední odstavec). V ideálním případě by se hmotnostní bilance radioisotopově značené látky měla pohybovat od 90 % do 110 %, zatímco analytická přesnost by měla vést k počáteční výtěžnosti od 70 % do 110 % pro neznačené zkoušené látky. Tato rozmezí je zapotřebí vykládat jako cíle a neměla by se používat jako kritéria pro přijetí zkoušky. Případně lze analytickou přesnost stanovit pro zkoušenou látku při nižší koncentraci, než je koncentrace počáteční, a pro významnější transformační produkty.

1.7.2 **Opakovatelnost a citlivost analytické metody**

Opakovatelnost analytické metody (včetně účinnosti první extrakce) pro kvantitativní stanovení zkoušené látky a případně transformačních produktů by se měla ověřit pěti opakovanými analýzami jednotlivých extraktů povrchové vody.

Mez detekce (LOD) analytické metody pro zkoušenou látku a pro transformační produkty by měla být pokud možno alespoň 1 % počátečního množství použitého ve zkušebním systému. Mez kvantifikace (LOQ) by se měla rovnat nebo být menší než 10 % použité koncentrace. Chemické analýzy mnoha organických látek a jejich transformačních produktů často vyžadují, aby se zkoušená látka používala v relativně vysoké koncentraci, tj. > 100 μg/l.

1.8 POPIS ZKUŠEBNÍ METODY

1.8.1 **Vybavení**

Zkoušku lze provádět v Erlenmeyerových baňkách nebo válcových nádobách vhodné kapacity (např. 0,5 nebo 1,0 litru) uzavřených silikonovou nebo pryžovou zátkou nebo v baňkách na sérum s víky těsnícími proti úniku CO_2 (např. opatřené septou z butylové pryže). Další možností je provádět zkoušku pomocí více baněk a používat jako vzorek celý objem vždy nejméně dvou baněk v každém intervalu odběru vzorku (viz bod 1.8.9.1 poslední odstavec). Pro netěkavé zkoušené látky, které nejsou radioisotopově označeny, nejsou nutné plynotěsné zátky nebo víka; vhodné jsou volné vatové zátky, které brání kontaminaci ze vzduchu (viz bod 1.8.9.1 druhý odstavec). Lehce těkavé látky by měly být zkoušeny v systému biometrického typu s jemným mícháním povrchu vody. Aby se zajistilo, že nedojde k bakteriální kontaminaci, lze nádoby před použitím případně sterilizovat ohřevem nebo autoklávováním. Dále se používá toto standardní laboratorní vybavení:

— desková třepačka nebo magnetické míchačky pro nepřetržité míchání zkušebních baněk,

▼M1

— odstředivka,

— pH-metr,

— turbidimetr pro nefelometrická měření turbidity (zákalu),

— pec nebo mikrovlnná pec pro stanovení suché hmotnosti,

— membránový filtrační přístroj,

— autokláv nebo pec pro tepelnou sterilizaci skleněného nádobí,

— zařízení pro manipulaci s látkami značenými isotopem ^{14}C,

— zařízení pro kvantifikaci aktivity ^{14}C ve vzorcích z roztoků pro s jímaným CO_2 a, bude-li to nutné, ze vzorků sedimentů,

— analytické vybavení pro určení zkoušené (a referenční) látky, jestliže se použije specifická chemická analýza (např. plynový chromatograf, chromatograf pro vysokotlakou kapalinovou chromatografii).

1.8.2 **Zásobní roztoky zkoušené látky**

Pro přípravu zásobních roztoků zkoušených a referenčních látek se používá deionizovaná voda (viz bod 1.8.7 první odstavec). Deionizovaná voda by měla být zbavená látek, které mohou být toxické pro mikroorganismy a podíl rozpuštěného organického uhlíku (DOC) by neměl být vyšší než 1 mg/l (6).

1.8.3 **Odběr a přeprava povrchové vody**

Místo odběru povrchové vody by mělo být vybráno podle účelu zkoušky v dané situaci. Při výběru míst odběru musí být přihlédnuto k historii případných zemědělských, průmyslových nebo domácích vstupů. Jestliže je známo, že bylo vodní prostředí v předchozích čtyřech letech kontaminováno zkoušenou látkou nebo jejími strukturními analogy, nemělo by se používat k odběru zkušební vody, s výjimkou případů, kdy je zkoumání rychlostí rozkladu v dříve exponovaných místech výslovným účelem zkoušejícího. V místě odběru by se měly změřit pH a teplota vody. Dále je třeba zaznamenat hloubku odběru a vzhled vzorku vody (např. barva a turbidita) (viz bod 3). Měly by se měřit koncentrace kyslíku a/nebo oxidačně-redukční potenciál ve vodě a v povrchové vrstvě sedimentu s cílem prokázat aerobní podmínky, s výjimkou případů, kdy je jejich existence patrná ze vzhledu a historické zkušenosti s daným místem. Povrchová voda by se měla přepravovat v důkladně vyčištěném zásobníku. Během přepravy by teplota vzorku neměla významně překračovat teplotu použitou při zkoušce. Doporučuje se chlazení na 4 °C, pokud trvání přepravy překračuje 2 až 3 hodiny. Vzorek vody se nesmí zmrazit.

▼M1

1.8.4 **Skladování a příprava povrchové vody**

Zkouška by měla být nejlépe zahájena do jednoho dne po odběru vzorku. Skladování vody, je-li nutné, by se mělo minimalizovat a nesmí v žádném případě překračovat maximální hranici 4 týdnů. Vzorek vody je zapotřebí skladovat až do použití při teplotě 4 °C za provzdušňování. Před použitím je třeba odstranit hrubé částice, např. filtrací přes nylonový filtr s velikostí ok okolo 100 μm nebo přes hrubý papírový filtr, případně sedimentací.

1.8.5 **Příprava vody doplněné sedimentem (nepovinné)**

Pro zkoušku se suspendovanými sedimenty se do baněk obsahujících přírodní vodu (přefiltrovanou za účelem odstranění hrubých částic, jak je popsáno v bodě 1.8.4) přidává povrchový sediment, aby vznikla suspenze; koncentrace suspendovaných pevných látek by měla být v rozmezí 0,01 až 1 g/l. Povrchový sediment by měl pocházet ze stejného místa, z něhož byl odebrán vzorek vody. V závislosti na konkrétním vodním prostředí může být povrchový sediment buď charakterizován vysokým obsahem organického uhlíku (2,5–7,5 %) a jemnou strukturou, nebo nízkým obsahem organického uhlíku (0,5–2,5 %) a hrubou strukturou (3). Povrchový sediment lze připravit následovně: odeberte několik jader sedimentu pomocí zkumavky z průhledného plastu, bezprostředně po odběru vzorku oddělte horní aerobní vrstvy (od povrchu do hloubky maximálně 5 mm) a smiste je. Výsledný vzorek sedimentu by měl být přepravován v zásobníku s velkým vzduchovým prostorem nad sedimentem, aby se sediment udržel za aerobních podmínek (chladit na 4 °C, jestliže doba přepravy překračuje 2 až 3 hodiny). Vzorek sedimentu by měl být suspendován ve zkušební vodě v poměru 1:10 a do použití skladován při teplotě 4 °C za provzdušňování. Skladování sedimentu, je-li nutné, by se mělo minimalizovat a nesmí v žádném případě překračovat maximální hranici 4 týdnů.

1.8.6 **Polospojitý postup (nepovinné)**

Jestliže nastává dlouhá fáze iniciace před tím, než je možné měřit významný rozklad zkoušené látky, může být nezbytná prodloužená inkubace (několik měsíců). Pokud je tato skutečnost z předchozího zkoušení látky známa, zkoušku lze zahájit používáním polospojitého postupu, který umožňuje pravidelné obnovování části zkušební vody nebo suspenze (viz dodatek 2). Alternativně lze normální dávkovou zkoušku změnit na polospojitou zkoušku, pokud nebylo dosaženo rozkladu zkoušené látky přibližně během 60 dnů zkoušení s využitím dávkového postupu (viz bod 1.8.8.3 druhý odstavec).

1.8.7 **Přidání zkoušené (nebo referenční) látky**

U látek s vysokou rozpustností ve vodě (> 1 mg/l) a nízkou těkavostí (Henryho konstanta < 1 Pa•m^3/mol nebo < 10^{-5} atm•m^3/mol) lze připravit zásobní roztok v deionizované vodě (viz bod 1.8.2), vhodný objem zásobního roztoku se přidává do zkušebních nádob pro dosažení požadované koncentrace. Objem jakéhokoliv přidaného zásobního roztoku je třeba omezit na co nejnižší možnou míru (< 10 % konečného objemu kapaliny, je-li to možné). Dalším postupem, který lze považovat za alternativu pro používání organických rozpouštědel, je rozpustit zkoušenou látku ve větším objemu zkušební vody.

▼M1

Je-li to nevyhnutelné, měly by se zásobní roztoky netěkavých látek se špatnou rozpustností ve vodě připravit za použití těkavého organického rozpouštědla, avšak množství rozpouštědla přidaného do zkušebního systému by nemělo překročit 1 % obj. a nemělo by mít nepříznivé účinky na mikrobiální aktivitu. Rozpouštědlo by nemělo ovlivňovat stálost zkoušené látky ve vodě. Rozpouštědlo by mělo být odstraněno na mimořádně malé množství tak, aby významně nezvyšovalo koncentraci DOC zkušební vody nebo suspenze. Toto je třeba zkontrolovat analýzou specifickou pro danou látku, nebo je-li to možné, analýzou DOC (6). Musí se vynaložit úsilí na omezení přenášeného rozpouštědla na absolutně nezbytné množství a zajistit, aby množství zkoušené látky bylo možné rozpustit v konečném objemu zkušební vody. Pro zavedení zkoušené látky do zkušebních nádob lze používat i další metody, které jsou popsané v literatuře (7) a (8). Používá-li se k aplikaci zkoušené látky organické rozpouštědlo, měly by se kontroly s rozpouštědlem obsahující zkušební vodu (bez přídavků) a zkušební vodu s přidanou referenční látkou exponovat podobně jako aktivní zkušební nádoby doplněné zkoušenou látkou v nosném rozpouštědle. Cílem kontrol s rozpouštědlem je prozkoumat na základě rozkladu referenční látky možné nežádoucí účinky na mikrobiální populaci způsobené rozpouštědlem.

1.8.8 **Zkušební podmínky**

1.8.8.1 *Zkušební teplota*

Inkubace by měla probíhat (nejlépe) v temnu nebo v difuzním světle při kontrolované (±2 °C) teplotě, která může být teplotou terénu nebo standardní teplotou 20 až 25 °C. Teplotou terénu může být buď skutečná teplota vzorku v době odběru, nebo průměrná teplota terénu na místě odběru.

1.8.8.2 *Promíchávání*

Je nutné zajistit promíchávání nepřetržitým protřepáváním nebo mícháním, aby se částice a mikroorganismy udržovaly v suspenzi. Promíchávání rovněž umožňuje přenos kyslíku do kapaliny z volného prostoru nad kapalinou tak, aby bylo možné odpovídajícím způsobem udržovat aerobní podmínky. Umístěte baňky na deskovou třepačku (promíchávání přibližně při 100 ot/min) nebo použijte magnetické míchání. Promíchávání musí být nepřetržité. Třepání nebo míchání by však mělo být co nejjemnější, přičemž je třeba udržovat homogenní suspenzi.

1.8.8.3 *Doba trvání zkoušky*

Doba trvání zkoušky by obecně neměla překročit 60 dnů, pokud se nepoužije polospojitý postup s pravidelným obnovováním zkušební suspenze (viz bod 1.8.6 a dodatek 2). Ovšem doba trvání může být u dávkové zkoušky prodloužena na maximálně 90 dnů, jestliže rozklad zkoušené látky začal během prvních 60 dnů. Rozklad se sleduje ve vhodných časových intervalech určováním zbytkové aktivity ^{14}C nebo uvolněného $^{14}CO_2$ (viz bod 1.8.9.4) a/nebo chemickou analýzou (bod 1.8.9.5). Doba inkubace musí být dostatečně dlouhá pro vyhodnocení procesu rozkladu. Rozsah rozkladu by měl nejlépe překročit 50 %; u pomalu rozložitelných látek musí být rozsah rozkladu dostatečný (obvykle větší než 20 % rozklad) k tomu, aby byl možný odhad kinetické rychlostní konstanty rozkladu.

▼M1

Musí se provádět pravidelná měření pH a koncentrace kyslíku ve zkušebním systému, pokud nejsou k dispozici předchozí zkušenosti z podobných zkoušek se vzorky vody a sedimentů odebraných ze stejného místa, přičemž v takovém případě by tato měření nebyla potřebná. Za určitých podmínek by mohl metabolismus primárních substrátů při mnohem vyšších koncentracích ve vodě nebo v sedimentu vést k tak velkému uvolňování CO_2, a tak značnému vyčerpání kyslíku, že by to významně změnilo experimentální podmínky během zkoušky.

1.8.9 **Postup**

1.8.9.1 *Příprava baněk pro pelagickou zkoušku*

Do zkušebních baněk se převede vhodný objem zkušební vody, a to až do přibližně jedné třetiny objemu baňky a ne méně než přibližně 100 ml. Jestliže se používá více baněk (umožňujících zkoušení na celém objemu baňky v každém čase odběru vzorku), je vhodný objem zkušební vody rovněž přibližně 100 ml, protože malé objemy vzorku mohou ovlivnit délku fáze iniciace. Zkoušená látka se přidá ze zásobního roztoku, jak je popsáno v bodech 1.8.2 a 1.8.7. Pro určení kinetiky rozkladu a výpočet kinetické rychlostní konstanty rozkladu by se měly použít nejméně dvě odlišné koncentrace zkoušené látky lišící se faktorem 5 až 10. Obě zvolené koncentrace by měly být nižší než 100 μg/l a nejlépe v rozmezí < 1–10 μg/l.

Baňky se uzavřou zátkami nebo víčky nepropustnými pro vzduch a CO_2. U netěkavých zkušebních chemických látek neznačených isotopem ^{14}C jsou vhodné volné vatové zátky, které brání kontaminaci ze vzduchu (viz bod 1.8.1), pokud je ovšem o všech hlavních produktech rozkladu známo, že jsou netěkavé, a pokud se používá nepřímé stanovení CO_2 (viz dodatek 3).

Baňky se inkubují při zvolené teplotě (viz bod 1.8.8.1). Vzorky pro chemickou analýzu nebo měření ^{14}C je třeba odebrat na počátku zkoušky (tj. předtím, než začne biologický rozklad; viz bod 1.7.1) a poté ve vhodných časových intervalech v průběhu zkoušky. Odběr vzorků lze provádět odběrem dílčích vzorků (např. 5 ml alikvotních objemů) z každého opakování nebo odběrem vždy celého objemu baňky v každém čase odběru vzorku. Mineralizace zkoušené látky může být určena buď přímo, nebo nepřímo (viz dodatek 3). Obvykle se vyžaduje minimálně pět bodů pro odběr vzorku během fáze rozkladu (tj. po ukončené fázi iniciace) s cílem odhadnout spolehlivou rychlostní konstantu, s výjimkou případů, kdy je možné odůvodnit, že u rychle rozložitelných látek jsou dostatečné tři body odběru vzorku. U látek, které nepodléhají rychlému rozkladu, lze snadno provést více měření během fáze rozkladu, a proto by se k odhadu *k* mělo používat více datových bodů. Pro odběr vzorků nelze uvést žádný pevný časový harmonogram, protože rychlost biologického rozkladu se v jednotlivých případech liší; ovšem doporučuje se odebírat vzorky jednou týdně, pokud je rozklad pomalý. Jestliže zkoušená látka podléhá rychlému rozkladu, odběr vzorků by se měl během prvních tří dnů provádět jednou denně a poté každý druhý nebo třetí den. Za určitých okolností, například u velmi rychle hydrolyzujících látek, může být nezbytné odebírat vzorky v hodinových intervalech. Doporučuje se, aby se před zkouškou provedla předběžná studie s cílem určit vhodné intervaly odběru vzorků. Pokud musí být vzorky k dispozici pro další specifickou analýzu, je užitečné odebrat více vzorků a poté na konci experimentu zvolit ty, které se mají analyzovat, v opačném pořadí, tj. poslední vzorky se analyzují první (viz bod 1.8.9.5 druhý odstavec, kde jsou pokyny ke stálosti vzorků během skladování).

▼**M1**

1.8.9.2 *Počet baněk a vzorků*

Nasaďte dostatečný počet zkušebních baněk v tomto rozsahu:

— zkušební baňky; nejméně dvojí baňky pro každou koncentraci zkoušené látky (nejlépe minimálně 3) nebo více zkušebních baněk pro každou koncentraci, jestliže se jako vzorek použije vždy celý objem baňky v každém čase odběru vzorků (označeno symbolem F_T),

— zkušební baňky pro výpočet hmotnostní bilance; nejméně dvojí baňky pro každou zkušební koncentraci (označeno symbolem F_M),

— slepé zkoušky, bez zkoušené látky; nejméně jedna zkušební baňka pro slepou zkoušku obsahující pouze zkušební vodu (označeno symbolem F_B),

— referenční kontrola; dvojí baňky s referenční látkou (např. anilinem nebo benzoátem sodným v koncentraci 10 µg/l) (označeno symbolem F_C). Cílem referenční kontroly je potvrdit minimum mikrobiální aktivity. Je-li to výhodné, lze použít radioisotopově značenou referenční látku, a to i tehdy, je-li rozklad zkoušené látky sledován chemickými analýzami,

— sterilní kontrola; jedna nebo dvě baňky obsahující sterilizovanou zkušební vodu ke zkoumání možného abiotického rozkladu nebo jiného nebiologického odstranění zkoušené látky (označeno symbolem F_S). Biologickou aktivitu lze zastavit autoklávováním (121 °C, 20 minut) zkušební vody nebo přidáním toxické látky (např. azidu sodného (NaN_3) v množství 10–20 g/l, chloridu rtuťnatého ($HgCl_2$) v množství 100 mg/l nebo formalinu v množství 100 mg/l) nebo zářením gama. Použije-li se $HgCl_2$, měl by se zneškodnit jako toxický odpad. U vody s velkým množstvím přidaného sedimentu se sterilních podmínek dosahuje nesnadno; v tomto případě se doporučuje opakované autoklávování (např. třikrát). Je třeba vzít v úvahu, že sorpční charakteristiky sedimentu se mohou autoklávováním pozměnit,

— kontroly s rozpouštědlem obsahující zkušební vodu a zkušební vodu s referenční látkou; dvojí baňky ošetřené stejným množství rozpouštědla a podrobené stejnému postupu jako v případě aplikace zkoušené látky. Cílem je zkoumat pomocí určení rozkladu referenční látky možné nežádoucí účinky rozpouštědla.

V plánu zkoušky by měl zkoušející vzít v úvahu relativní důležitost většího počtu opakování oproti zvýšenému počtu časů odběru vzorků. Přesný počet požadovaných baněk bude záviset na metodě použité pro měření rozkladu (viz bod 1.8.9.1 třetí odstavec, bod 1.8.9.4 a dodatek 3).

▼M1

V každém čase odběru vzorku by se měly odebrat dva dílčí vzorky (např. 5 ml alikvotních objemů) z každé zkušební baňky. Jestliže se používá více baněk, aby bylo možné použít jako vzorek vždy celý objem baňky, v každém čase odběru vzorků by se měly odebrat minimálně dvě baňky (viz bod 1.8.9.1 první odstavec).

1.8.9.3 *Příprava baněk pro zkoušku se suspendovanými sedimenty [nepovinné]*

Přidejte do zkušebních nádob potřebná množství zkušební vody a případně sedimentu (viz bod 1.8.5). Příprava baněk pro zkoušku se suspendovanými sedimenty je stejná jako pro pelagickou zkoušku (viz body 1.8.9.1 a 1.8.9.2). Nejlépe použijte lahvičky na sérum nebo baňky podobných tvarů. Umístěte uzavřené baňky horizontálně do třepačky. Je zřejmé, že otevřené baňky pro netěkavé látky neznačené isotopem ^{14}C by se měly umístit do svislé polohy; v tomto případě se doporučuje magnetické míchání a používání magnetických tyčinek pokrytých sklem. Je-li to nezbytné, přivádějte do lahví vzduch, aby se udržely správné aerobní podmínky.

1.8.9.4 *Radiochemická stanovení*

Uvolněný $^{14}CO_2$ se měří nepřímo a přímo (viz dodatek 3). Nepřímo se $^{14}CO_2$ určuje jako rozdíl mezi počáteční aktivitou ^{14}C ve zkušební vodě nebo suspenzi a celkovou zbytkovou aktivitou v době odběru vzorku po okyselení vzorku na pH 2–3 a odvedení CO_2. Odstraní se tak anorganický uhlík a naměřená zbytková aktivita se odvodí z organického materiálu. Nepřímé stanovení $^{14}CO_2$ by se nemělo používat, jestliže během transformace zkoušené látky vznikají významnější těkavé transformační produkty (viz dodatek 3). Je-li to možné, uvolňování $^{14}CO_2$ by se mělo měřit přímo (viz dodatek 3) v každém čase odběru vzorků v nejméně jedné zkušební baňce; tento postup umožňuje kontrolovat jak hmotnostní bilanci, tak proces biologického rozkladu, ale je omezen na zkoušky prováděné s uzavřenými baňkami.

Jestliže je uvolněný $^{14}CO_2$ během zkoušky měřen přímo, vyčlení se pro tento účel na počátku zkoušky více baněk. Přímé stanovení $^{14}CO_2$ se doporučuje tehdy, jestliže během transformace zkoušené látky vznikají významnější těkavé transformační produkty. V každém bodě měření se dodatečné zkušební baňky okyselí na pH 2 až 3 a $^{14}CO_2$ se jímá v interním či externím absorbéru (viz dodatek 3).

Případně lze koncentrace zkoušené látky značené isotopem ^{14}C a významnějších transformačních produktů stanovit radiochromatograficky (např. chromatografií na tenké vrstvě, RAD-TLC) nebo pomocí HPLC s radiochemickou detekcí.

Případně lze určit fázovou distribuci zbývající radioaktivity (viz dodatek 1) a zbytkovou zkoušenou látku a transformační produkty.

▼M1

Na konci zkoušky by se měla určit hmotnostní bilance, a to přímým měřením $^{14}CO_2$ pomocí samostatných zkušebních baněk, z nichž se v průběhu zkoušky neodebírají žádné vzorky (viz dodatek 3).

1.8.9.5 *Specifická chemická analýza*

Jestliže je k dispozici citlivá specifická analytická metoda, lze primární biologický rozklad hodnotit měřením celkové zbytkové koncentrace zkoušené látky namísto využívání metod značení radioisotopem. Jestliže se použije zkoušená látka značená radioisotopem (pro měření celkové mineralizace), lze souběžně provádět specifické chemické analýzy s cílem získat užitečné dodatečné informace a ověřit postup. Specifické chemické analýzy lze rovněž použít pro měření transformačních produktů vzniklých během rozkladu zkoušené látky, přičemž se toto doporučuje u látek, které jsou mineralizovány s poločasy překračujícími 60 dnů. Měla by se změřit a v protokolu o zkoušce uvést koncentrace zkoušené látky a transformačních produktů v každém čase odběru vzorků (jako koncentrace a jako procentuální podíl použité koncentrace). Obecně je zapotřebí identifikovat transformační produkty zjištěné při ≥ 10 % použité koncentrace v jakoukoliv dobu odběru vzorku; v opačném případě je nutné přiměřeně odůvodnit, proč nebyly identifikovány. Transformační produkty, jejichž koncentrace během studie trvale rostou, by rovněž měly být určeny, a to i tehdy, pokud jejich koncentrace nepřekračuje shora uvedenou mez, neboť tyto transformační produkty mohou být známkou perzistentnosti. Analýzy transformačních produktů ve sterilních kontrolách by se měly vzít v potaz v případě, že se rychlá abiotická přeměna zkoušené látky (např. hydrolýza) považuje za možnou. Potřeba kvantitativního stanovení a identifikace transformačních produktů by se měla posuzovat případ od případu a odůvodnění by měla být uvedena v protokolu o zkoušce. Extrakční postupy s organickými rozpouštědly by se měly používat podle pokynů uvedených v příslušném analytickém postupu.

Všechny vzorky by se měly skladovat vzduchotěsně při teplotách od 2 do 4 °C, pokud se analýza provádí do 24 hodin (nejlépe). Při delším skladování je zapotřebí vzorky zmrazovat na teplotu nižší než –18 °C nebo je chemicky konzervovat. Okyselení jako metoda pro konzervaci vzorků se nedoporučuje, protože okyselené vzorky mohou být nestálé. Jestliže se vzorky neanalyzují do 24 hodin a jsou-li skladovány po delší dobu, je zapotřebí provést studii stability při skladování, aby se prokázala stálost dotčených chemických látek při teplotách skladování nižších než –18 °C nebo při konzervaci. Jestliže analytická metoda vyžaduje extrakci rozpouštědla nebo extrakci tuhé fáze (SPE), je třeba provést tuto extrakci bezprostředně po odběru vzorků nebo po skladování vzorku v chlazeném stavu po dobu maximálně 24 hodin.

V závislosti na citlivosti analytické metody mohou být nezbytné větší objemy vzorků než objemy uvedené v bodě 1.8.1. Zkoušku lze snadno provést při zkušebních objemech jeden litr v baňkách o objemu 2 až 3 litry, což umožňuje odebírat vzorky o objemu přibližně 100 ml.

▼M1

2. **DATA A ZPRÁVY**

2.1 ZPRACOVÁNÍ VÝSLEDKŮ

2.1.1 **Vynášení dat**

Časy odběru vzorku se zaokrouhlí na celé hodiny (s výjimkou případů, kdy se látka významně rozkládá v řádu minut až hodin), ne však na celé dny. Odhady zbytkové aktivity zkoušené látky (pro látky značené isotopem ^{14}C) nebo zbytkové koncentrace (pro neznačené látky) se vynesou proti času jak v lineárním, tak v semilogaritmickém tvaru (viz obrázky 1a a 1b). Jestliže došlo k rozkladu, výsledky z baněk F_T je třeba porovnat s výsledky z baněk F_S. Jestliže se střední hodnoty výsledků z baněk se zkoušenou látkou (F_T) a sterilních baněk (F_S) odchylují o méně než 10 %, lze předpokládat, že pozorovaný rozklad je převážně abiotický. Jestliže je rozklad v baňkách F_S nižší, lze hodnoty použít pro korekci hodnot získaných pomocí baněk F_T (odečtením), odhadnout tak rozsah biologického rozkladu. Provádí-li se nepovinné analýzy významnějších transformačních produktů, je zapotřebí získat kromě grafického znázornění úbytku zkoušené látky také grafické znázornění jejich tvorby a úbytku.

Trvání fáze iniciace t_L se odhadne z křivky rozkladu (semilogaritmický graf) extrapolací její lineární části na nulový rozklad nebo případně určením doby přibližně 10 % rozkladu (viz obrázky 1a a 1b). Ze semilogaritmického grafu se odhadne rychlostní konstanta prvního řádu, k, a její standardní chyba lineární regresí ln (zbytková aktivita ^{14}C nebo koncentrace zkoušené látky) ve vztahu k času. Zejména při měřeních ^{14}C je nutné používat pouze údaje patřící do počáteční lineární části křivky po ukončení fáze iniciace a dávat přednost výběru spíše malého počtu reprezentativních údajů před výběrem velkého počtu více nejistých dat. Nejistota zde zahrnuje chyby vlastní doporučenému přímému použití naměřených zbytkových aktivit ^{14}C (viz dále). Někdy může být důležité vypočítat dvě odlišné rychlostní konstanty, pokud rozklad postupuje ve dvou fázích. Za tímto účelem se definují dvě odlišné fáze rozkladové křivky. Rychlostní konstanta, k, a poločas, $t_{½} = \ln 2/k$, by se měly vypočítat pro každou z jednotlivých baněk k opakování, pokud se odebírají dílčí vzorky ze stejné baňky, nebo pomocí průměrných hodnot, pokud se použije jako vzorek celý objem baňky v každé době odběru vzorku (viz bod 1.8.9.2 poslední odstavec). Použije-li se první uvedený postup, je třeba v protokolu o zkoušce uvést rychlostní konstantu a poločas pro každou z jednotlivých baněk k opakování a vyjádřit je rovněž jako průměrnou hodnotu se standardní chybou. Jestliže se používaly vysoké koncentrace zkoušené látky, křivka rozkladu se může značně odchylovat od přímky (semilogaritmický graf) a kinetika prvního řádu nemusí platit. Definování poločasu proto nemá žádným smysl. Ovšem při omezeném rozpětí dat lze použít kinetiku pseudoprvního řádu a poločas rozkladu DT_{50} (čas pro dosažení 50 % rozkladu) odhadnout. Je však třeba mít na paměti, že časový průběh rozkladu nad zvolené datové rozpětí nelze předpovídat pomocí parametru DT_{50}, který slouží pouze k popisu dané datové množiny. Analytické nástroje pro usnadnění statistických výpočtů a sestavení křivky jsou snadno dostupné a doporučuje se používat software tohoto typu.

▼M1

Jestliže se provádí specifické chemické analýzy, je třeba odhadnout rychlostní konstanty a poločasy primárního rozkladu, jak je shora uvedeno pro celkovou mineralizaci. Jestliže je limitujícím procesem primární rozklad, lze někdy použít datové body z celého průběhu rozkladu. Je to proto, že měření jsou přímá, na rozdíl od měření aktivity ^{14}C.

Jestliže se použijí látky značené isotopem ^{14}C, hmotnostní bilance by měla být vyjádřena v procentech použité počáteční koncentrace nejméně na konci zkoušky.

2.1.2 **Zbytková aktivita**

Při biologickém rozkladu té části organické látky, která je značená isotopem ^{14}C, se hlavní část ^{14}C přemění na $^{14}CO_2$, zatímco další část se využije pro růst biomasy a/nebo syntézu mimobuněčných metabolitů. Proto zcela „úplný“ biologický rozklad látky nedává 100 % přeměnu jejího uhlíku na $^{14}CO_2$. Isotop ^{14}C zabudovaný do produktů vytvářených biologickou syntézou se následně v důsledku „sekundární mineralizace“ pomalu uvolňuje jako $^{14}CO_2$. Z těchto důvodů vykazují grafy zbytkové aktivity organického ^{14}C (měřeno po odstranění CO_2) nebo vzniklého $^{14}CO_2$ v závislosti na čase i po dokončení rozkladu „chvostování“. Tím se komplikuje kinetická interpretace dat, a proto je k odhadu rychlostní konstanty rozkladu zapotřebí obvykle používat pouze počáteční část křivky (po skončení fáze iniciace a před dosažením přibližně 50 % rozkladu). Při rozkladu zkoušené látky je celková zbytková aktivita organického ^{14}C vždy vyšší než aktivita ^{14}C spojená se zbývající nedotčenou zkoušenou látkou. Jestliže se zkoušená látka rozkládá reakcí prvního řádu a konstantní frakce α se mineralizuje na CO_2, počáteční sklon křivky úbytku ^{14}C (celkový organický ^{14}C vzhledem k času) bude α-násobkem sklonu příslušné křivky koncentrace zkoušené látky (nebo přesněji řečeno té části zkoušené látky, která je značená isotopem ^{14}C). Při použití nekorigovaného měření celkové aktivity organického ^{14}C bude proto vypočítaná rychlostní konstanta rozkladu konzervativní. V literatuře (2) (9) (10) (11) byly popsány postupy pro odhad koncentrací zkoušené látky z naměřených radiochemických aktivit na základě různých zjednodušujících předpokladů. Takové postupy se nejsnáze používají u rychle rozložitelných látek.

2.2 INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

Jestliže se zjistí, že *k* nezávisí na rostoucí koncentraci (tj. pokud je vypočítaná konstanta *k* přibližně stejná při různých koncentracích zkoušené látky), lze předpokládat, že rychlostní konstanta prvního řádu je reprezentativní pro použité zkušební podmínky, tj. pro zkoušenou látku, vzorek vody a zkušební teplotu. Odborníci musí vyhodnotit, do jaké míry lze výsledky generalizovat či extrapolovat na jiné systémy. Jestliže se zkoušená látka použije ve vysoké koncentraci, a rozklad proto neprobíhá podle kinetiky prvního řádu, nelze data použít pro přímý odhad rychlostní konstanty prvního řádu nebo odpovídajícího poločasu. Ovšem data odvozená ze zkoušky s vysokou koncentrací zkoušené látky mohou být přesto použitelná pro odhad stupně celkové mineralizace a/nebo pro detekci a kvantifikaci transformačních produktů.

▼M1

Jestliže jsou známy rychlosti jiných ztrátových procesů než biologického rozkladu (například hydrolýza nebo těkání), mohou být odečteny od čisté ztrátové rychlosti pozorované během zkoušky, čímž se získá přibližný odhad rychlosti biologického rozkladu. Údaje o hydrolýze mohou být například získány ze sterilní kontroly nebo ze souběžného zkoušení pomocí vyšší koncentrace zkoušené látky.

Nepřímé a přímé stanovení $^{14}CO_2$ (bod 1.8.9.4 a dodatek 3) lze použít pouze pro měření rozsahu mineralizace zkoušené látky na CO_2. K analýze koncentrací zkoušené látky značené isotopem ^{14}C a tvorby významnějších transformačních produktů lze použít radiochromatografii (RAD-TLC) nebo HPLC (bod 1.8.9.4 třetí odstavec). Aby byl možný přímý odhad poločasu, je nezbytné, aby nebyly přítomny žádné významnější transformační produkty (definované jako ≥ 10 % použitého množství zkoušené látky). Jestliže jsou přítomny významnější transformační produkty odpovídající této definici, požaduje se podrobné hodnocení dat. To může zahrnovat opakované zkoušení a/nebo identifikaci transformačních produktů (viz bod 1.8.9.5 první odstavec), pokud nelze osud transformačních produktů přiměřeně vyhodnotit na základě zkušenosti (např. informace o cestě rozkladu). Protože se poměr uhlíku zkoušené látky přeměněného na CO_2 mění (do velké míry závisí na koncentraci zkoušené látky a dalších dostupných substrátech, na zkušebních podmínkách a mikrobiálním společenství), tato zkouška nedovoluje přímý odhad úplného biologického rozkladu, jako tomu je u zkoušky na úbytek rozpuštěného organického uhlíku (DOC); výsledek je však podobný výsledku získanému zkouškou respirometrií. Stupeň mineralizace tak bude rovný minimální úrovni úplného biologického rozkladu nebo bude nižší. Pro získání ucelenějšího obrazu úplného biologického rozkladu (mineralizace a zabudování do biomasy) by se měla analýza fázové distribuce ^{14}C provádět na konci zkoušky (viz dodatek 1). ^{14}C obsažený v souboru částic bude obsahovat ^{14}C zabudovaný do bakteriální biomasy a ^{14}C sorbovaný do organických částic.

2.3 VALIDITA ZKOUŠKY

Jestliže se referenční látka nerozloží během očekávaného časového intervalu (u anilinu a benzoátu sodného je to obvykle méně než dva týdny), validita zkoušky je zpochybněna a musí být dále ověřena, případně by se zkouška měla opakovat s novým vzorkem vody. V kroužkové zkoušce této metody pořádané ISO, které se účastnilo sedm laboratoří z celé Evropy, se upravené rychlostní konstanty rozkladu pro anilin pohybovaly od 0,3 do 1,7 dne^{-1} s průměrem 0,8 d^{-1} při teplotě 20 °C a standardní chybě ±0,4 d^{-1} ($t_{½}$ = 0,9 dne). Typické fáze iniciace trvaly 1 až 7 dnů. Ve zkoumaných vodách byla uváděna bakteriální biomasa odpovídající 10^3 až 10^4 jednotek tvořících kolonie (CFU) na ml. Rychlosti rozkladu ve středoevropských vodách bohatých na živiny byly vyšší než ve skandinávských oligotrofních vodách, což může být způsobeno odlišným trofickým stavem nebo expozicí chemickým látkám.

Celková výtěžnost (hmotnostní bilance) na konci experimentu by měl být v rozmezí 90 % až 110 % pro radioisotopově značené látky, zatímco počáteční výtěžnost na počátku experimentu by se měla pohybovat v rozmezí 70 % až 110 % pro neznačené látky. Ovšem tato rozmezí je zapotřebí vykládat pouze jako cílová a neměla by se používat jako kritéria pro přijetí zkoušky.

▼M1

3. **PROTOKOL O ZKOUŠCE**

V protokolu o zkoušce, který bude rovněž obsahovat nejméně následující informace, musí být jasně uveden typ studie, tj. pelagická nebo zkouška se suspendovanými sedimenty:

Zkoušená látka a referenční látka(y):

— obecné názvy, chemické názvy (doporučují se názvy podle IUPAC a/nebo CAS), čísla CAS, strukturní vzorce (uvádějící polohu ^{14}C, pokud se použije radioisotopově značená látka) a relevantní fyzikálně-chemické vlastnosti zkoušené a referenční látky (viz body 1.5 a 1.6),

— chemické názvy, čísla CAS, strukturní vzorce (uvádějící polohu ^{14}C, pokud se použije radioisotopově značená látka) a relevantní fyzikálně-chemické vlastnosti látek použitých jako standardy k identifikaci a kvantifikaci transformačních produktů,

— čistota zkoušené a referenční látky (obsah nečistot),

— popřípadě radiochemická čistota značené chemické látky a specifická aktivita.

Povrchová voda:

O vzorku vody musí být poskytnuty tyto minimální informace:

— lokalita a popis místa odběru vzorku, pokud možno včetně dřívější kontaminace,

— datum a čas odběru vzorku,

— živiny (celkový obsah N, amonia, dusitanů, dusičnanů, celkový fosfor, rozpuštěný orthofosforečnan),

— hloubka odběru,

— vzhled vzorku (např. barva a turbidita),

— DOC a TOC,

— BOD,

— teplota a pH v místě a době odběru,

— kyslík nebo oxidačně-redukční potenciál (povinné pouze v případě, že nejsou zřejmé aerobní podmínky),

— slanost nebo vodivost (v případě mořské vody a brakické vody),

— suspendované pevné látky (v případě zakaleného vzorku),

— podle možnosti další významné informace o lokalitě odběru vzorku v době jeho odběru (např. aktuální či dřívější údaje o průtoku řek nebo mořských proudech v blízkosti hlavních výpustí a typ výpustí, meteorologické podmínky předcházející době odběru vzorku),

a nepovinně:

— mikrobiální biomasa (např. AODC (přímé počítání za použití akridinové oranže) nebo jednotky tvořící kolonie),

▼M1

— anorganický uhlík,

— koncentrace chlorofylu *a* jakožto specifický odhad biomasy řas.

Dále by se měly poskytovat následující informace o sedimentu, pokud se provádí zkouška se suspendovanými sedimenty:

— hloubka odběru sedimentu,

— vzhled sedimentu (například barevný, blátivý, bahnitý nebo písečný),

— struktura (např. % hrubého písku, jemného písku, bahna a jílu),

— suchá hmotnost v g/l suspendovaných pevných látek, koncentrace TOC nebo hmotnostní ztráta při vznícení jako měřítko obsahu organické hmoty,

— pH,

— kyslíkový nebo oxidačně-redukční potenciál (povinné pouze v případě, že nejsou zřejmé aerobní podmínky).

Zkušební podmínky:

— zpoždění mezi odběrem a použitím v laboratorní zkoušce, skladování vzorků a předúprava vzorku, data provádění studií,

— množství použité zkoušené látky, zkušební koncentrace a referenční látka,

— metoda aplikace zkoušené látky včetně použití rozpouštědel,

— objem použité povrchové vody a sedimentu (používá-li se) a objem vzorků odebraných v každém intervalu pro analýzu,

— popis použitého zkušebního systému,

jestliže zkouška nemusí být prováděna v temnu, informace o podmínkách „difuzního světla“,

— informace o použité metodě nebo metodách k vytvoření sterilních kontrol (např. teplota, čas a počet autoklávování),

— inkubační teplota,

— informace o analytických technikách a metodě nebo metodách použitých pro radiochemická měření a pro kontrolu hmotnostní bilance a měření fázové distribuce (provádí-li se),

— počet opakování.

Výsledky:

— výtěžnost v procentech (viz bod 1.7.1),

— opakovatelnost a citlivost používaných analytických metod včetně meze detekce (LOD) a meze kvantifikace (LOQ) (viz bod 1.7.2),

▼M1

— všechna naměřená data (včetně časových bodů odběru vzorků) a vypočítané hodnoty v tabulkové formě a křivky rozkladu; pro každou zkušební koncentraci a pro každou baňku k opakování je nutné v protokolu o zkoušce uvést lineární korelační koeficient pro sklon logaritmického grafu, odhadovanou fázi iniciace a rychlostní konstantu prvního řádu nebo pseudoprvního řádu (je-li to možné) a odpovídající poločas rozkladu (nebo doba poločasu t_{50}),

— v protokolu o zkoušce zaznamenejte relevantní hodnoty jako průměry výsledků zjištěných u jednotlivých opakování, např. délka fáze iniciace, rychlostní konstanta rozkladu a poločas rozkladu (nebo t_{50}),

— na základě vzhledu křivky rozkladu a možného vlivu zkušební koncentrace je třeba systém kategorizovat buď jako nepřizpůsobený, nebo přizpůsobený,

— výsledky kontroly konečné hmotnostní bilance a výsledky měření pro stanovení fázových distribucí (jsou-li k dispozici),

— podíl mineralizovaného ^{14}C, a použijí-li se specifické analýzy, konečná úroveň primárního rozkladu,

— případně identifikace, molární koncentrace a procentuální podíl aplikovaných významnějších transformačních produktů (viz bod 1.8.9.5 první odstavec),

— případně navrhovaná cesta transformace,

— diskuse výsledků.

4. **LITERATURA**

(1) OECD TG 309 (2004) Aerobic Mineralisation in surface water – Simulation Biodegradation Test.

(2) ISO/DIS 14592–1 (1999) Water quality – Evaluation of the aerobic biodegradability of organic compounds at low concentrations – Part 1: Shake flask batch test with surface water or surface water/sediment suspensions.

(3) Zkušební metoda C.23 Aerobní a anaerobní transformace v půdě.

(4) Zkušební metoda C.24 Aerobní a anaerobní transformace v systémech voda/sediment.

(5) OECD (1993). Guidelines for the Testing of Chemicals. OECD, Paris.

(6) ISO 8245 (1999). Water quality – Guidelines on the determination of total organic carbon (TOC) and dissolved organic carbon (DOC).

(7) ISO 10634 (1995). Water quality – Guidance for the preparation and treatment of poorly water-soluble organic compounds for the subsequent evaluation of their biodegradability in an aqueous medium.

(8) OECD, předloha (2000). Guidance Document on aquatic toxicity testing of difficult substances and mixtures. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment. No 22 (předpokládané zveřejnění v létě roku 2000).

▼**M1**

(9) Simkins, S., Alexander, M. (1984). Models for mineralization kinetics with the variables of substrate concentration and population density. *Appl. Environ. Microbiol*. 47, 394–401.

(10) Ingerslev, F., Nyholm, N. (2000). Shake-flask test for determination of biodegradation rates of ^{14}C-labeled chemicals at low concentrations in surface water systems. *Ecotoxicol. Environ. Saf*. 45, 274–283.

(11) ISO/CD 14592–1 (1999). Ring test report: Water Quality – Evaluation of the aerobic biodegradability of organic compounds at low concentrations part 1 – report of 1998/1999 ring-test. Shake flask batch test with surface water or surface water/sediment suspensions.

▼M1

Dodatek 1

Fázová distribuce ^{14}C

Pro kontrolu postupu je zapotřebí doplnit rutinní měření zbytkové celkové aktivity organického ^{14}C (TOA) měřeními hmotnostní bilance zahrnující přímé stanovení uvolněného $^{14}CO_2$ po jímání v absorbéru (viz dodatek 3). Sama o sobě je pozitivní tvorba $^{14}CO_2$ přímým důkazem o biologickém rozkladu, na rozdíl od abiotického rozkladu nebo jiných ztrátových mechanismů, jakými jsou těkání a sorpce. Dodatečné užitečné informace charakterizující chování při biologické rozložitelnosti lze získat z měření distribuce TOA mezi rozpuštěným stavem (aktivita rozpuštěného organického ^{14}C, DOA) a částicovým stavem (aktivita částicového organického ^{14}C, POA) po separaci částic membránovou filtrací nebo odstřeďováním. POA obsahuje zkoušenou látku sorbovanou na mikrobiální biomasu a na další částice a dále z uhlíku zkoušené látky, který byl použit k syntéze nového buněčného materiálu, a tím začleněn do frakce částicové biomasy. Tvorbu rozpuštěného organického materiálu s ^{14}C lze odhadnout jako DOA na konci biologického rozkladu (plató na křivce závislosti rozkladu na čase).

Fázová distribuce zbytkového ^{14}C ve zvolených vzorcích se odhadne filtrováním vzorků na membránovém filtru s velikostí pórů 0,22 μm nebo 0,45 μm a z materiálu, který neabsorbuje významná množství zkoušené látky (vhodné mohou být polykarbonátové filtry). Jestliže sorpce zkoušené látky na filtr není zanedbatelně nízká (tuto skutečnost je nutné ověřit před experimentem), lze použít místo filtrace vysokorychlostní odstřeďování (2 000 g, 10 minut).

Dále je třeba s filtrátem či centrifugátem pracovat tak, jak je uvedeno v dodatku 3 pro nefiltrované vzorky. Membránové filtry se rozpustí ve vhodné scintilační kapalině a počítá se jako obvykle, obecně pouze za použití metody externího standardního poměru pro korekci na zhášení, nebo se použije oxidační činidlo na vzorek. Pokud bylo použito odstřeďování, vytvořené pelety částicové frakce se resuspendují v 1–2 ml destilované vody a převedou se do scintilační lahvičky. Následně se provedou dvě promytí pomocí 1 ml destilované vody a promývací voda se převede do lahvičky. V případě potřeby lze suspenzi ukotvit do gelu za účelem počítání scintilací v roztoku.

▼M1

Dodatek 2

Polospojitý postup

Pro dosažení významného rozkladu obtížně rozložitelných látek může být vyžadována prodloužená inkubace až po několik měsíců. Doba trvání zkoušky by obecně neměla překročit 60 dnů, pokud nebudou zachovány charakteristiky původního vzorku vody obnovením zkušební suspenze. Ovšem doba trvání zkoušky může být prodloužena na maximálně 90 dnů bez obnovení zkušební suspenze, jestliže rozklad zkoušené látky začal během prvních 60 dnů.

Během inkubace po dlouhá období může být různorodost mikrobiální komunity snížena v důsledku různých ztrátových mechanismů a možného vyčerpání významných živin a primárních uhlíkových substrátů ze vzorku vody. Proto se doporučuje, aby se pro adekvátní určení rychlosti rozkladu pomalu se rozkládajících látek používala polospojitá zkouška. Zkouška by se měla zahájit použitím polospojitého postupu, pokud se na základě předchozí zkušenosti očekává, že pro dosažení 20 % rozkladu látky je nezbytná inkubační doba tří měsíců. Alternativně lze normální dávkovou zkoušku změnit na polospojitou zkoušku, pokud nebylo dosaženo rozkladu zkoušené látky přibližně během 60 dnů zkoušení s využitím dávkového postupu. Polospojitý postup lze zastavit a ve zkoušce pokračovat jakožto v dávkovém experimentu, když je zaznamenán významný rozklad (např. > 20 %).

Při polospojité zkoušce se každé dva týdny nahrazuje přibližně jedna třetina objemu zkušební suspenze čerstvě odebranou vodou, do níž byla přidána zkoušená látka v počáteční koncentraci. Podobně se do vody, která má být použita k obnovení, přidá sediment v počáteční koncentraci (mezi 0,01 a 1 g/l), pokud se provádí nepovinná zkouška se suspendovanými sedimenty. Při provádění zkoušky se suspendovanými částicemi sedimentu je důležité, aby byl plně suspendovaný systém zachován také během obnovování vody a aby doba zdržení byla shodná pro pevné látky a vodu, protože jinak se může ztratit zamýšlená podobnost s homogenním vodným systémem bez zakotvených fází. Z těchto důvodů se při použití polospojitého postupu dává přednost počáteční koncentraci suspendovaných sedimentů s nižším rozpětím stanoveného intervalu.

U předepsaného přídavku zkoušené látky se předpokládá, že počáteční koncentrace zkoušené látky není překročena částečným obnovením zkušební suspenze, a proto se zabrání přizpůsobení, které je často pozorováno při vysokých koncentracích zkoušených látek. Protože postup obsahuje opakovanou inokulaci i náhradu vyčerpaných živin a primárních substrátů, obnoví se původní mikrobiální různorodost a dobu trvání zkoušky lze v zásadě prodloužit do nekonečna. Při použití polospojitého postupu je důležité mít na paměti, že zbytková koncentrace zkoušené látky se musí korigovat na množství zkoušené látky přidané a odstraněné v každém postupu obnovení. U sloučenin, které se málo sorbují, lze celkovou koncentraci a koncentraci rozpuštěné zkoušené látky používat zaměnitelně. Sorpce je za stanovených podmínek (0,1–1 g pevných látek/l) pro látky s log $K_{o/v}$ < 3 (platí pro neutrální, lipofilní sloučeniny) nevýznamná (< 5 %). To je ilustrováno následujícím příkladem výpočtu. 0,1 g/l pevných látek zhruba odpovídá 10 mg uhlíku na litr (uhlíková frakce, f_C = 0,01). Předpokládejme, že:

Log $K_{o/v}$ (zkoušené látky) = 3

$K_{ou} = 0{,}42 \times K_{o/v}$

Rozdělovací koeficient $K_d = f_C \times K_{ou}$

rozpuštěná frakce celkové koncentrace (C-voda(C_v)/C-celkové(C_c) je pak:

$C_v/C_c = 1/(1 + K_d \times SS) = 1(1 + K_{oc} \times f_C \times SS) = 1/(1 + 0{,}42 \times 10^3 \times 0{,}01 \times 0{,}1 \times 10^{-3}) = 0{,}999$

▼M1

Dodatek 3

Stanovení $^{14}co_2$

Nepřímé stanovení $^{14}CO_2$

Pro rutinní měření je nepřímá metoda obvykle nejméně časově náročnou a nejpřesnější metodou, pokud je zkoušená látka netěkavá a netransformuje se na těkavé transformační produkty. Nefiltrované vzorky, např. o objemu 5 ml, se jednoduše převedou do scintilačních lahviček. Vhodná aktivita ve vzorcích je na počátku 5 000 dpm–10 000 dpm (80–170 Bq) a minimální počáteční aktivita je přibližně 1 000 dpm. CO_2 by měl být odstraněn po okyselení na pH 2 až 3 pomocí 1 či 2 kapek koncentrované H_3PO_4 nebo HCl. Odstraňování CO_2 lze provádět probubláváním vzduchem přibližně po ½–1 hodinu. Eventuálně lze lahvičky intenzivně protřepávat po dobu 1 až 2 hodin (například na třepačce s mikrodeskou) nebo jemně protřepávat přes noc. Účinnost procesu odstraňování CO_2 se musí zkontrolovat (prodloužením doby provzdušňování nebo protřepávání). Poté by se měla přidat scintilační kapalina vhodná pro počítání vodných vzorků, vzorek by se měl homogenizovat vířivou míchačkou a radioaktivita určit počítáním scintilací v roztoku, přičemž je nutné odečíst aktivitu pozadí zjištěnou ve slepých zkouškách (F_B). Pokud nebude zkušební voda velmi zabarvená ani nebude obsahovat vysokou koncentraci částic, vzorky budou obvykle vykazovat jednotné zhášení a postačí provedení korekcí na zhášení pomocí externího standardu. Je-li zkušební voda vysoce zbarvená, může být nutná korekce na zhášení přidáním interního standardu. Je-li koncentrace částic vysoká, nemusí být možné získat homogenní roztok či gel, případně může být odchylka zhášení mezi vzorky velká. V takovém případě lze použít níže popsanou metodu počítání pro zkušební suspenze. Provádí-li se zkouška jako zkouška se suspendovanými sedimenty, měření $^{14}CO_2$ by se mohlo provádět nepřímo odběrem homogenního 10ml vzorku zkušební vody/suspenze a oddělením fází pomocí odstřeďování při vhodných otáčkách (např. při 40 000 m/s^2 po dobu 15 minut). Vodní fáze by poté měla být ošetřena shora popsaným postupem. Aktivita ^{14}C v částicové fázi (POA) by se měla určit resuspendací sedimentu v malém objemu destilované vody, převedením do scintilačních lahviček a přidáním scintilační kapaliny pro vytvoření gelu (za tímto účelem jsou k dispozici speciální scintilační kapaliny). V závislosti na povaze částic (např. jejich obsahu organického materiálu) může být před přidáním scintilační kapaliny vzorek přes noc vyluhován tkáňovým rozpustidlem a poté homogenizován vířivou míchačkou. Alternativně lze POA určit spalováním v nadbytku kyslíku použitím oxidačního činidla na vzorek. Při počítání je třeba vždy zahrnout interní standard a může být nezbytné provádět korekce na zhášení pomocí přidání interního standardu pro každý jednotlivý vzorek.

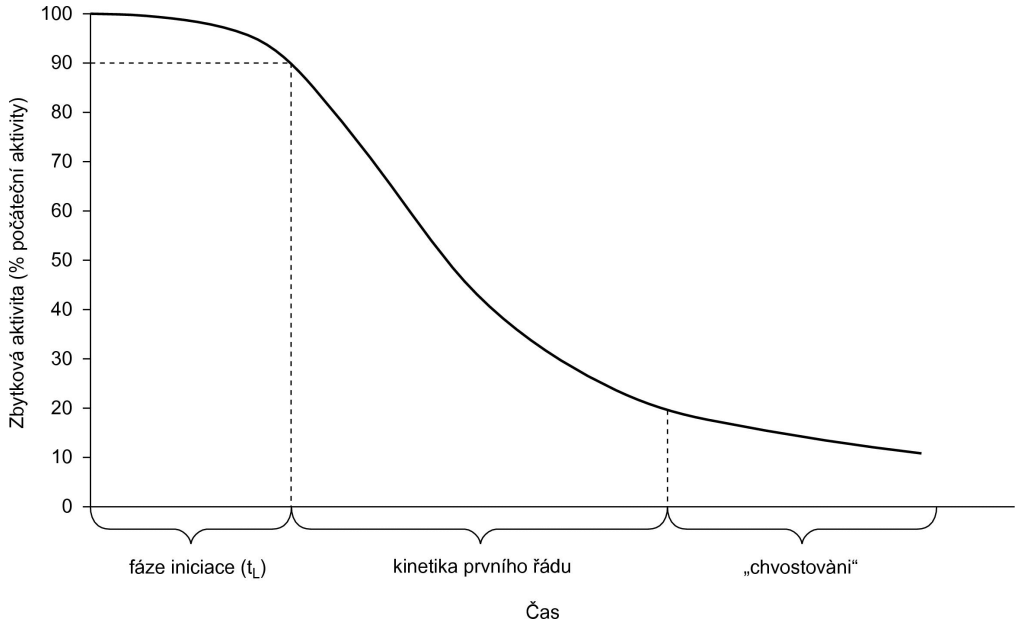
Přímé stanovení $^{14}CO_2$

Měří-li se uvolňovaný $^{14}CO_2$ přímo, je třeba nasadit na počátku zkoušky více baněk, používat jako vzorek vždy celý objem zkušební baňky v každém měřicím bodě, okyselit zkušební baňky na pH 2 až 3 a jímat $^{14}CO_2$ v interním (umístěný v každé zkušební baňce na počátku zkoušky) nebo externím absorbéru. Jako absorpční médium lze používat alkálii (např. 1 N roztok NaOH nebo peleta NaOH), ethanolamin nebo na ethanolaminu založený absorbér a komerčně dostupné absorbéry. Pro přímé měření $^{14}CO_2$ je třeba baňky uzavřít např. septou z butylové pryže.

▼**M1**

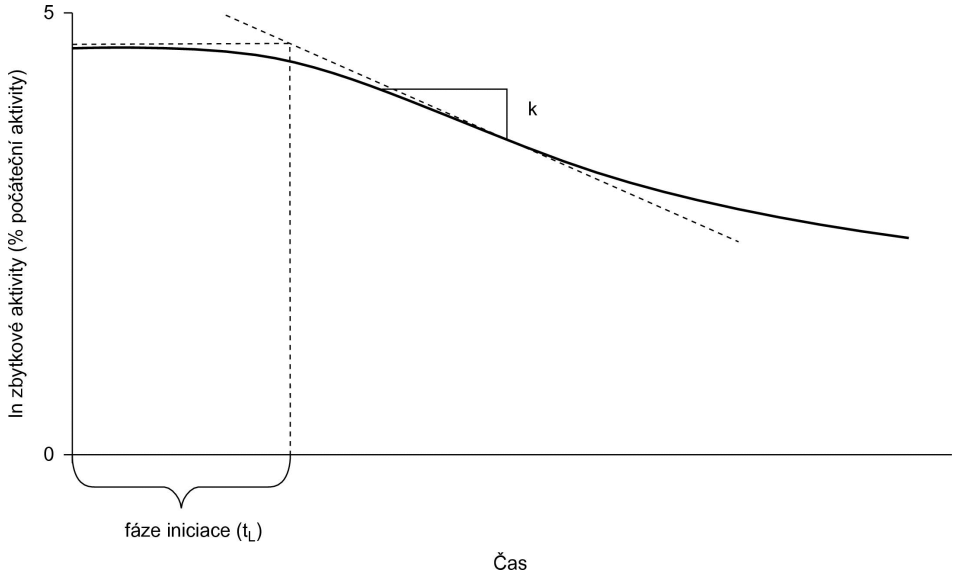
Obrázek 1a

Příklad aritmetického vynášení dat (zbytková aktivita vzhledem k času)



Obrázek 1b

Příklad semilogaritmického vynesení dat (ln zbytkové aktivity vzhledem k času)



▼M6

C.26. ZKOUŠKA INHIBICE RŮSTU DRUHŮ *LEMNA*

ÚVOD

1. Tato zkušební metoda je rovnocenná Pokynu OECD pro zkoušení 221 (2006). Tato zkušební metoda je určena k hodnocení toxicity chemických látek pro sladkovodní rostliny rodu *Lemna* (okřehek). Je založena na existujících metodách (1, 2, 3, 4, 5, 6), ale zahrnuje úpravy těchto metod, aby odrážela nejnovější výsledky výzkumu a konzultace v řadě klíčových otázek. Navrhovaná metoda byla validována mezinárodní okružní zkouškou (7).

2. Tato zkušební metoda popisuje zkoušení toxicity pomocí druhů *Lemna gibba* a *Lemna minor*, které byly oba rozsáhle studovány a jsou předmětem shora uvedených norem. Taxonomie druhů *Lemna* spp. je obtížná, přičemž ji komplikuje existence široké škály fenotypů. Ačkoliv se u druhů *Lemna* může vyskytnout genetická variabilita v odezvě na toxické látky, není v současnosti dostatek údajů o zdroji této variability, aby mohl být pro použití v rámci této metody doporučen specifický klon. Je třeba uvést, že zkouška se neprovádí axenicky (jednodruhově), ale v jednotlivých stupních během zkušebního procesu se provádí opatření pro udržení kontaminace jinými organismy na minimální úrovni.

3. Podrobně se popisuje zkoušení s obnovením (semistatické a průtokové) a bez obnovení (statické) zkušebního roztoku. V závislosti na cílech zkoušky a právních požadavcích se doporučuje zvážit použití semistatických a průtokových metod, například pro chemické látky, které se z roztoku rychle ztrácejí v důsledku odpaření, fotodegradace, srážení nebo biologické rozložitelnosti. Další pokyny jsou uvedeny v (8).

4. Použité definice jsou uvedeny v dodatku 1.

PODSTATA ZKOUŠKY

5. Exponenciálně rostoucí kultury rostlin rodu *Lemna* se po dobu sedmi dnů nechají růst jako monokultury v různých koncentracích zkoušené látky. Cílem zkoušky je kvantifikovat účinky související s chemickou látkou na vegetativní růst během tohoto období, a to na základě hodnocení zvolených proměnných měření. Primární proměnnou měření je počet lístků. Rovněž se měří nejméně jedna další proměnná měření (celková plocha lístků, hmotnost sušiny nebo čerstvá hmotnost), protože některé chemické látky mohou ovlivňovat jiné proměnné měření mnohem více než počet lístků. Pro kvantifikaci účinků souvisejících s chemickou látkou se růst ve zkušebních roztocích porovnává s růstem v kontrolních vzorcích a stanoví se koncentrace způsobující stanovenou x % inhibici růstu (např. 50 %) a vyjádří se jako ECx (např. EC_{50}).

6. Cílovým ukazatelem zkoušky je inhibice růstu vyjádřená jako logaritmické zvýšení proměnné měření (průměrná specifická růstová rychlost) během expoziční doby. Z průměrných specifických růstových rychlostí zaznamenaných v řadě zkušebních roztoků se stanoví koncentrace způsobující stanovenou x % inhibici růstové rychlosti (např. 50 %) a vyjádří se jako E_rC_x (např. E_rC_{50}).

7. Další proměnnou odezvy použitou v této zkušební metodě je výtěžek, který může být nutný ke splnění specifických právních požadavků v některých zemích. Je definován jako proměnná měření na konci expoziční doby minus proměnná měření na počátku expoziční doby. Z výtěžku zaznamenaného v řadě zkušebních roztoků se vypočítá koncentrace způsobující stanovenou x % inhibici výtěžku (např. 50 %) a vyjádří se jako E_yC_x (např. EyC_{50}).

▼M6

8. Kromě toho se může statisticky určit nejnižší koncentrace s pozorovaným účinkem (LOEC) a koncentrace bez pozorovaných účinků (NOEC).

INFORMACE O ZKOUŠENÉ CHEMICKÉ LÁTCE

9. Měla by být k dispozici analytická metoda s odpovídající citlivostí pro kvantifikaci chemické látky ve zkušebním médiu.

10. Užitečnými informacemi o zkoušené chemické látce pro účely stanovení zkušebních podmínek mohou být strukturní vzorec, čistota, rozpustnost ve vodě, stálost ve vodě a na světle, pK_a, K_{ow}, tlak par a biologická rozložitelnost. Rozpustnost ve vodě a tlak par lze použít pro výpočet Henryho konstanty z Henryho zákona, která bude ukazovat, zda jsou pravděpodobné významné ztráty zkoušené chemické látky během doby zkoušky. Toto pomáhá zjistit, zda by se měla podniknout konkrétní opatření ke kontrole takových ztrát. Jestliže nejsou informace o rozpustnosti a stálosti zkoušené látky jisté, doporučuje se, aby byly hodnoceny za podmínek zkoušky, tj. v růstovém médiu, při teplotě a režimu osvětlení, které mají být při zkoušce použity.

11. Pokud je zvláště důležitá kontrola pH zkušebního média, např. zkoušejí-li se kovy nebo chemické látky, které jsou hydrolyticky nestálé, doporučuje se přídavek pufru do růstového média (viz odstavec 21). Další pokyny pro zkoušení chemických látek s fyzikálně-chemickými vlastnostmi, které činí jejich zkoušení obtížné, jsou uvedeny v (8).

PLATNOST ZKOUŠKY

12. Aby byla zkouška platná, musí být doba, za kterou se zdvojnásobí počet lístků v kontrolním vzorku, kratší než 2,5 dne (60 h), což odpovídá přibližně sedmi-násobnému zvýšení v sedmi dnech a průměrné specifické růstové rychlosti 0,275 d^{-1}. Při použití média a zkušebních podmínek popsaných v této zkušební metodě lze tohoto kritéria dosáhnout použitím režimu statické zkoušky (5). Rovněž se předpokládá, že toto kritérium bude splnitelné za podmínek semistatické a průtokové zkoušky. Výpočet doby zdvojnásobení je uveden v odstavci 49.

REFERENČNÍ CHEMICKÁ LÁTKA

13. Jako prostředek kontroly zkušebního postupu lze zkoušet referenční látku (látky), například 3,5-dichlorfenol použitý v mezinárodní okružní zkoušce (7). Doporučuje se zkoušet referenční chemickou látku nejméně dvakrát ročně nebo – pokud se zkoušení provádí s menší četností – souběžně se stanovováním toxicity zkoušené chemické látky.

POPIS METODY

Přístroje a pomůcky

14. Veškeré vybavení přicházející do styku se zkušebními médii by mělo být vyrobeno ze skla nebo jiného chemicky inertního materiálu. Skleněné pomůcky použité pro kultivační a zkušební účely je zapotřebí vyčistit od chemických kontaminantů, které by mohly unikat do zkušebního média, a musí být sterilní. Zkušební nádoby by měly být dostatečně široké, aby mohly lístky jednotlivých kolonií v kontrolních nádobách růst, aniž by se na konci zkoušky překrývaly. Není důležité, zda se kořeny dotýkají dna zkušebních nádob, ale doporučuje se, aby v každé zkušební nádobě byla minimální hloubka 20 mm a minimální objem 100 ml. Volba zkušebních nádob není zásadně důležitá, pokud budou splněny tyto požadavky. Jako vhodné se

▼M6

ukázaly skleněné kádinky, krystalizační misky nebo skleněné Petriho misky vhodných rozměrů. Zkušební nádoby musí být zakryty, aby se minimalizovalo odpařování a náhodná kontaminace, přičemž však musí být umožněna nezbytná výměna vzduchu. Vhodné zkušební nádoby, a zejména kryty, musí zabránit stínění nebo změnám spektrálních charakteristik světla.

15. Kultury a zkušební nádoby by se měly přechovávat odděleně. Toho se nejlépe dosáhne pomocí samostatných komor, inkubátorů či místností pro růst za podmínek prostředí. Osvětlení a teplota musí být regulovatelné a musí se udržovat na stálé úrovni (viz odstavce 35, 36).

Zkušební organismus

16. Organismem použitým pro tuto zkoušku je *Lemna gibba* nebo *Lemna minor*. Stručný popis druhů okřehku, které byly použity pro zkoušení toxicity, je uveden v dodatku 2. Rostlinný materiál lze získat ze sbírky kultur, z jiné laboratoře nebo v terénu. Jestliže se sběr provádí z terénu, rostliny by se měly kultivovat ve stejném médiu, jaké se používá ke zkoušení, minimálně po dobu osmi týdnů před použitím. Terénní místa použitá pro sběr výchozích kultur musí být prostá zřejmých zdrojů kontaminace. Pokud se získávají z jiné laboratoře nebo ze sbírky kultur, měly by se podobně uchovávat po minimální dobu tří týdnů. V závěrečné zprávě je vždy třeba uvést zdroj rostlinného materiálu a druhu a klonu (je-li znám) použitého ke zkoušení.

17. Měly by se používat monokultury, které jsou očividně prosté kontaminace jinými organismy, například řasami a prvoky. Zdravé rostliny *L. minor* obsahují kolonie skládající se ze dvou až pěti lístků, zatímco zdravé kolonie *L. gibba* mohou obsahovat až sedm lístků.

18. Kvalita a jednotnost rostlin použitých ve zkoušce bude mít významný vliv na její výsledek a proto by se jejich výběru měla věnovat velká pozornost. Měly by se používat mladé, rychle rostoucí rostliny bez viditelných lézí či odbarvení (chlorózy). Kultury dobré kvality se vyznačují vysokým výskytem kolonií obsahujících nejméně dva lístky. Velký počet jednotlivých lístků je ukazatelem environmentálního stresu, např. nedostatku živin, a rostlinný materiál z takovýchto kultur by se ke zkoušení neměl používat.

Kultivace

19. Pro snížení četnosti udržování kultury (např. pokud se na určité období neplánují žádné zkoušky s *Lemna*) lze kultury udržovat za sníženého osvětlení a teploty (4–10 °C). Podrobnosti o kultivaci jsou uvedeny v dodatku 3. Očividné známky kontaminace řasami nebo jinými organismy vyžadují povrchovou sterilizaci dílčího vzorku lístků *Lemna* a následný přenos do čerstvého média (viz dodatek 3). V tomto případě je třeba zbývající kontaminovanou kulturu zlikvidovat.

20. Nejméně sedm dnů před zkoušením se dostatečný počet kolonií asepticky převede do čerstvého sterilního média a kultivuje se 7 až 10 dnů za podmínek zkoušky.

Zkušební médium

21. Pro *Lemna minor* a *Lemna gibba* se doporučují odlišná média, jak je dále uvedeno. Je třeba pečlivě zvážit zahrnutí pH pufru do zkušebního média (MOPS (kyselina 4-morfolinpropansulfonová, č. CAS: 1132-61-2) do média pro *L. minor* a $NaHCO_3$ do média pro *L. gibba*), když existuje podezření, že by mohl reagovat se zkoušenou chemickou látkou a ovlivňovat vyjádření její toxicity. Steinbergovo médium (9) je rovněž přijatelné, pokud jsou splněna kritéria platnosti.

▼M6

22. Pro kultivaci a zkoušení s *L. minor* se doporučuje úprava švédského standardního (SIS) růstového média pro *Lemna*. Složení tohoto média je uvedeno v dodatku 4.

23. Ke kultivaci a zkoušení s *L. gibba* se doporučuje růstové médium 20X AAP popsané v dodatku 4.

24. Steinbergovo médium, popsané v dodatku 4, je rovněž vhodné pro *L. minor*, ale může se používat i pro *L. gibba*, pokud jsou splněna kritéria platnosti.

Zkušební roztoky

25. Zkušební roztoky se obvykle připravují ředěním zásobního roztoku. Zásobní roztoky zkoušené chemické látky se obyčejně připravují rozpuštěním látky v růstovém médiu.

26. Nejvyšší zkušební koncentrace zkoušené chemické látky by obvykle neměla překročit rozpustnost látky ve vodě za zkušebních podmínek. Je však třeba poznamenat, že *Lemna* spp. plují na povrchu a mohou být vystaveny působení chemických látek, které se hromadí na rozhraní voda-vzduch (např. látky špatně rozpustné ve vodě nebo hydrofobní či povrchově aktivní látky). Za takových podmínek dochází k expozici jiným látkám, než které se nacházejí v roztoku, a zkušební koncentrace mohou v závislosti na vlastnostech zkoušené chemické látky překračovat rozpustnost ve vodě. Pro zkoušené chemické látky s nízkou rozpustností ve vodě může být nezbytné připravit koncentrovaný zásobní roztok nebo disperzi látky pomocí organického rozpouštědla nebo dispergátoru, aby se usnadnilo přidávání přesných množství zkoušené chemické látky do zkušebního média, a napomohlo se tak její dispergaci a rozpuštění. Měla by být vynaložena maximální snaha takové látky nepoužívat. Používání pomocných rozpouštědel nebo dispergátorů by nemělo způsobovat žádnou fytotoxicitu. Příkladem běžně používaných rozpouštědel, která nezpůsobují fytotoxicitu při koncentracích až do 100 µl/l, jsou aceton a dimetylformamid. Jestliže se použije rozpouštědlo nebo dispergátor, jeho konečná koncentrace by se měla zapsat v závěrečné zprávě a udržovat na minimální hodnotě ($\leq$ 100 µl $\cdot$ l^{-1}) a všechny exponované vzorky a kontroly by měly obsahovat stejnou koncentraci rozpouštědla nebo dispergátoru. Další pokyny k používání dispergátorů jsou uvedeny v (8).

Zkoušené a kontrolní skupiny

27. Předběžná znalost toxicity zkoušené chemické látky pro *Lemna*, např. z orientační zkoušky, pomůže při volbě vhodných zkušebních koncentrací. Při hlavní zkoušce toxicity se zpravidla použije alespoň pět zkušebních koncentrací tvořících geometrickou posloupnost. Faktor mezi zkušebními koncentracemi by nejlépe neměl překročit 3,2, ale lze použít i vyšší hodnotu, jestliže je křivka závislosti koncentrace a odezvy plochá. Použití méně než pěti koncentrací by mělo být zdůvodněno. Pro každou zkušební koncentraci se použijí nejméně tři opakování.

28. Při volbě rozsahu zkušebních koncentrací (pro orientační a/nebo hlavní zkoušku toxicity) je zapotřebí vzít v úvahu následující:

— Pro stanovení EC_x by se zkušební koncentrace měly pohybovat pod a nad hodnotu EC_x, aby se zajistila patřičná úroveň spolehlivosti. Například pokud se odhaduje EC_{50}, nejvyšší zkušební koncentrace by měla být vyšší než hodnota EC_{50}. Jestliže hodnota EC_{50} leží mimo rozmezí zkušebních koncentrací, související intervaly spolehlivosti budou velké, a proto správné hodnocení statistické vhodnosti modelu nemusí být možné.

— Jestliže je cílem odhadnout LOEC/NOEC, nejnižší zkušební koncentrace by měla být dostatečně nízká, aby růst nebyl výrazně nižší než růst v kontrolním vzorku. Dále by nejvyšší zkušební koncentrace měla být dostatečně vysoká, aby byl růst výrazně nižší než růst v kontrolním vzorku. Pokud tomu tak není, zkouška se bude muset opakovat

▼M6

v odlišném rozmezí koncentrací (s výjimkou případů, kdy je nejvyšší koncentrace na mezi rozpustnosti nebo představuje maximální požadovaný koncentrační limit, např. 100 mg/l).

29. Každá zkouška by měla zahrnovat kontrolní vzorky obsahující stejné živné médium, stejný počet lístků a kolonií, stejné podmínky okolního prostředí a postupy, jaké byly zvoleny pro zkušební nádoby, avšak neobsahují zkoušenou chemickou látku. Jestliže se použije pomocné rozpouštědlo nebo dispergátor, měla by být zahrnuta i další kontrolní expozice s rozpouštědlem/dispergátorem přítomným ve stejné koncentraci jako v nádobách se zkoušenou chemickou látkou. Počet kontrolních nádob použitých k opakování (a případných nádob s rozpouštědly) by měl být nejméně roven počtu nádob použitých pro každou zkušební koncentraci; v ideálním případě by měl být dvojnásobný.

30. Jestliže se stanovení NOEC nepožaduje, upořádání zkoušky lze pozměnit tak, že se zvýší počet koncentrací a sníží počet replik pro příslušnou koncentraci. Počet kontrolních replik však musí být nejméně tři.

Expozice

31. Kolonie tvořené 2 až 4 viditelnými lístky se převedou z očkovací kultury a za aseptických podmínek se náhodně přidají do zkušebních nádob. Každá nádoba by měla celkem obsahovat 9 až 12 lístků. Počet lístků a kolonií by měl být v každé zkušební nádobě stejný. Zkušenosti získané s touto metodou a údaje z okružní zkoušky ukazují, že použití tří replik na expozici, kdy pro každé opakování se zpočátku použije od 9 do 12 lístků, je dostatečné ke zjištění rozdílů v inhibici růstu přibližně o 4 až 7 % vypočítaných pomocí růstové rychlosti (10 až 15 % vypočítaných pomocí výtěžku) mezi jednotlivými expozicemi (7).

32. K minimalizaci vlivu prostorových rozdílů v intenzitě světla nebo v teplotě je zapotřebí náhodně uspořádat zkušební nádoby v inkubátoru. Při prováděném pozorování se rovněž vyžaduje uspořádání do bloků nebo náhodné přemísťování nádob (nebo častější přemísťování).

33. Jestliže předběžná zkouška stálosti ukazuje, že během doby trvání zkoušky (7 dnů) nelze udržet koncentraci zkoušené chemické látky (tj. měřená koncentrace poklesne pod 80 % naměřené počáteční koncentrace), doporučuje se režim semistatické zkoušky. V tomto případě by měly být kolonie nejméně dvakrát během zkoušky (např. v den 3 a 5) vystaveny čerstvě připraveným zkušebním a kontrolním roztokům. Četnost expozice čerstvému médiu závisí na stálosti zkoušené chemické látky; pro udržení téměř konstantních koncentrací vysoce nestálých či těkavých látek může být zapotřebí vyšší četnost. Za určitých okolností může být nutný průtokový postup (8, 10).

34. Scénář expozice prostřednictvím aplikace na lístek (rozprašování) není do této zkušební metody zahrnut; tomuto tématu se věnuje literatura (11).

Podmínky inkubace

35. Pomocí kontinuálního teplého nebo chladného bílého fluorescenčního osvětlení je třeba zajistit světelnou intenzitu zvolenou z rozmezí 85–135 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$, přičemž se tato intenzita měří v pásmu fotosynteticky aktivního záření (400 až 700 nm) v bodech nacházejících se ve stejné vzdálenosti od zdroje světla jako lístky *Lemna* (ekvivalent 6 500 až 10 000 luxů). Jakékoliv odchylky od zvolené intenzity světla nad zkušební plochou by neměly překročit ± 15 %. Naměřenou hodnotu bude ovlivňovat metoda detekce

▼M6

světla a měření, zejména typ čidla. Kulová čidla (která reagují na světlo přicházející ze všech úhlů nad i pod rovinou měření) a „kosinová“ čidla (která reagují na světlo přicházející ze všech úhlů nad rovinou měření) jsou vhodnější než jednosměrná čidla, neboť poskytují vyšší naměřené hodnoty pro vícebodový světelný zdroj zde popsaného typu.

36. Teplota v zkušebních nádobách by měla být 24 ± 2 °C. pH kontrolního média by se během zkoušky nemělo zvýšit o více než 1,5. Ovšem odchylka o více než 1,5 nebude znamenat neplatnost zkoušky, pokud je možné prokázat, že byla splněna kritéria platnosti. Zvláštní pozornost je zapotřebí věnovat posunu pH ve speciálních případech, jako jsou zkoušky nestálých chemických látek nebo kovů. Další pokyny naleznete v (8).

Doba trvání zkoušky

37. Zkouška je ukončena za 7 dnů poté, co byly rostliny přeneseny do zkušebních nádob.

Měření a analytická stanovení

38. Na počátku zkoušky se zjistí a zaznamená počet lístků ve zkušebních nádobách, přičemž se pečlivě dbá na to, aby byly započítány vystupující, jasně viditelné lístky. Na počátku zkoušky, dále nejméně jednou během každých 3 dnů během expoziční doby (tj. nejméně dvakrát během celkové doby 7 dnů) a při ukončení zkoušky se musí určit počty lístků, které mají normální či abnormální vzhled. V závěrečné zprávě se musí zaznamenat změny ve vývoji rostlin, např. velikost lístku, vzhled, známky nekrózy, chlorózy nebo hrbatosti, rozpadávání kolonií nebo ztráta vzplývavosti, a v délce a vzhledu kořenu. Je rovněž nutné zaznamenat významné znaky zkušebního média (např. přítomnost nerozpuštěného materiálu, růst řas ve zkušební nádobě).

39. Kromě určení počtu lístků během zkoušky se také hodnotí účinky zkoušené chemické látky na jednu (nebo více) následujících proměnných měření:

i) celková plocha lístků,

ii) hmotnost sušiny,

iii) čerstvá hmotnost.

40. Celková plocha lístků má tu výhodu, že ji lze u každé zkušební a kontrolní nádoby určit na počátku zkoušky, v jejím průběhu i na jejím konci. Hmotnost sušiny nebo čerstvá hmotnost by se měly určit na počátku zkoušky ze vzorku očkovací kultury, která se obvykle používá k zahájení zkoušky, a na konci zkoušky pak na základě rostlinného materiálu z každé zkušební a kontrolní nádoby. Jestliže se plocha lístků neměří, dává se přednost hmotnosti sušiny před čerstvou hmotností.

41. Celková plocha lístků, hmotnost sušiny a čerstvá hmotnost se mohou určit následovně:

i) *Celková plocha lístků:* Celková plocha lístků všech kolonií se může stanovit analýzou obrazu. Pomocí videokamery lze zachytit siluetu zkušební nádoby a rostlin (tj. umístíte nádobu na negatoskop) a výsledný obraz se digitalizuje. Plochu lístků v zkušební nádobě lze poté stanovit kalibrací pomocí plochých tvarů o známé ploše. Je třeba vyloučit rušení způsobené hranou zkušební nádoby. Alternativní, ale pracnější způsob spočívá v pořízení fotografie zkušebních nádob a rostlin, vyříznutí výsledné siluety kolonií a určení jejich plochy pomocí analyzátoru plochy lístku nebo milimetrového papíru. Mohou být vhodné i další postupy (například poměr hmotnosti papírů s plochou siluety kolonií a s jednotkovou plochou).

▼**M6**

ii) *Hmotnost sušiny:* Z každé ze zkušebních nádob se shromáždí všechny kolonie a propláchnou se destilovanou nebo deionizovanou vodou. Nadbytečná voda se odstraní savým papírem a pak se vzorky suší při 60 °C do konstantní hmotnosti. Měly by být zahrnuty jakékoliv úlomky kořenů. Hmotnost sušiny by se měla vyjádřit s přesností alespoň na 0,1 mg.

iii) *Čerstvá hmotnost:* Všechny kolonie se převedou do předem zvážených zkumavek vyrobených z polystyrenu nebo z jiného interního materiálu, s malými (1 mm) otvory v zaoblených dnech. Zkumavky se poté odstřeďují při rychlosti 3 000 ot/min po dobu 10 minut při pokojové teplotě. Zkumavky obsahující nyní osušené kolonie se opětovně zváží a čerstvá hmotnost se vypočítá odečtením hmotnosti prázdné zkumavky.

Četnost měření a analytická stanovení

42. Jestliže se používá statické uspořádání zkoušky, pH každé expozice by se mělo změřit na počátku a na konci zkoušky. Jestliže se používá semistatické uspořádání zkoušky, pH by se mělo měřit v každé vsázce „čerstvého“ zkušebního roztoku před každým obnovením a rovněž i v odpovídajících „spotřebovaných“ roztocích.

43. Intenzita osvětlení by se měla měřit v růstové komoře, inkubátoru nebo místnosti v bodech nacházejících se ve stejné vzdálenosti od zdroje světla jako lístky *Lemna*. Měření je třeba provádět nejméně jednou během zkoušky. Teplota média v náhradní nádobě držené za stejných podmínek v růstové komoře, inkubátoru nebo místnosti by se měla zaznamenávat nejméně jednou denně.

44. Během zkoušky se koncentrace zkoušené látky určují ve vhodných intervalech. Při statických zkouškách je minimálním požadavkem určení koncentrací na počátku a na konci zkoušky.

45. Při semistatických zkouškách, u nichž se neočekává, že koncentrace zkoušené látky zůstane v rozmezí ± 20 % nominální koncentrace, je nezbytné analyzovat všechny čerstvě připravené zkušební roztoky a tytéž roztoky při každém obnovení (viz odstavec 33). Ovšem u zkoušek, u nichž není naměřená počáteční koncentrace zkoušené chemické látky v rozmezí ± 20 % nominální hodnoty, avšak u nichž lze dostatečně prokázat, že počáteční koncentrace jsou reprodukovatelné a stálé (tj. od 80 do 120 % počáteční koncentrace), mohou být chemická stanovení provedena pouze na nejvyšších a nejnižších zkušebních koncentracích. Ve všech případech je třeba určit koncentrace zkoušené chemické látky před obnovením při každé zkušební koncentraci vždy pouze u jedné nádoby z počtu použitých replik (nebo u sdruženého obsahu nádob všech replik).

46. U průtokových zkoušek je vhodný podobný vzorkovací režim, jaký je popsán u semistatických zkoušek včetně analýzy na počátku, uprostřed a na konci zkoušky, ale měření „spotřebovaného“ roztoku není v tomto případě vhodné. U tohoto typu zkoušky je zapotřebí kontrolovat denně průtok ředicí vody a zkoušené chemické látky nebo zásobního roztoku zkoušené látky.

47. Jestliže lze prokázat, že koncentrace zkoušené chemické látky byla po celou dobu zkoušky uspokojivě udržována v rozmezí ± 20 % nominální nebo naměřené počáteční koncentrace, může být analýza výsledků založena na nominálních nebo naměřených počátečních hodnotách. Je-li odchylka od nominální nebo naměřené počáteční koncentrace větší než ± 20 %, analýza výsledků by měla být založena na geometrické střední koncentraci během expozice nebo na modelech popisujících pokles koncentrace zkoušené chemické látky (8).

▼M6

Limitní zkouška

48. Za určitých okolností, např. pokud předběžná zkouška naznačuje, že zkoušená chemická látka nemá žádné toxické účinky při koncentracích až do 100 mg/l nebo až do meze své rozpustnosti ve zkušebním médiu (podle toho, co je nižší), může se provést limitní zkouška zahrnující porovnání odezvy v kontrolní skupině a odezvy v jedné exponované skupině (100 mg/l nebo koncentrace rovná mezi rozpustnosti). Důrazně se doporučuje podpořit tuto zkoušku analýzou expozičních koncentrací. Všechny dříve popsané zkušební podmínky a kritéria platnosti se vztahují i na limitní zkoušku s výjimkou toho, že počet opakování s exponovanými vzorky by se měl zdvojnásobit. Růst v kontrolní a exponované skupině může být analyzován pomocí statistické zkoušky pro porovnání středních hodnot, např. Studentova t-testu.

ÚDAJE A PŘEDKLÁDÁNÍ ZPRÁV

Doba zdvojnásobení

49. Pro stanovení doby zdvojnásobení (T_d) počtu lístků a dodržování tohoto kritéria platnosti ve studii (odstavec 12) se používá následující vzorec s údaji získanými z kontrolních nádob:

$$T_d = \ln 2/\mu$$

kde μ je průměrná specifická růstová rychlost stanovena tak, jak je popsáno v odstavcích 54–55.

Proměnné odezvy

50. Účelem této zkoušky je stanovit účinky zkoušené chemické látky na vegetativní růst *Lemna*. Tato zkušební metoda popisuje dvě proměnné odezvy, protože členské země mají odlišné preference a právní požadavky. Mají-li být výsledky zkoušky přijatelné ve všech členských zemích, účinky je třeba vyhodnotit pomocí obou proměnných odezvy a) a b) popsaných dále.

a) *Průměrná specifická růstová rychlost:* Tato proměnná odezvy se počítá na základě změn logaritmů počtů lístků a dále na základě změn logaritmů jiného parametru měření (celková plocha lístků, hmotnost sušiny nebo čerstvá hmotnost) v čase (vyjádřeno na den) v kontrolních vzorcích a každé exponované skupině. Někdy se označuje jako relativní růstová rychlost (12).

b) *Výtěžek:* Tato proměnná odezvy se počítá na základě změn počtu lístků a dále na základě změn jiného parametru měření (celková plocha lístků, hmotnost sušiny nebo čerstvá hmotnost) v kontrolních vzorcích a každé exponované skupině až do konce zkoušky.

51. Je třeba uvést, že hodnoty toxicity vypočítané pomocí těchto dvou proměnných odezvy nejsou srovnatelné a při používání výsledků zkoušky se musí vzít tento rozdíl na vědomí. Hodnoty EC_x založené na průměrné specifické růstové rychlosti (E_rC_x) budou obecně vyšší než výsledky založené na výtěžku (E_yC_x), pokud se dodrží zkušební podmínky této zkušební metody, a to kvůli matematickému základu příslušných přístupů. Tuto skutečnost nelze vykládat jako rozdíl v citlivosti mezi těmito dvěma proměnnými odezvy; hodnoty jsou jednoduše matematicky odlišné. Koncepce průměrné specifické růstové rychlosti je založena na obecném průběhu exponenciálního růstu okřehku v nelimitovaných kulturách, u nichž se toxicita odhaduje na základě účinků na růstovou rychlost, aniž by závisela na absolutní úrovni specifické růstové rychlosti kontroly, na sklonu křivky závislosti koncentrace-odezva nebo na době trvání zkoušky. Naproti tomu výsledky založené na proměnné odezvy výtěžku jsou závislé na všech těchto ostatních proměnných. E_yC_x závisí na specifické růstové rychlosti druhů okřehku použitých

▼M6

v každé zkoušce a na maximální specifické růstové rychlosti, která se může u jednotlivých druhů, a dokonce i u různých klonů, lišit. Tato proměnná odezvy by se neměla používat pro srovnávání citlivosti na toxické látky mezi druhy okřehku nebo dokonce různými klony. Přestože se z vědeckého hlediska dává při odhadu toxicity přednost použití průměrné specifické růstové rychlosti, odhady toxicity založené na výtěžku jsou rovněž do této zkušební metody zahrnuty, aby uspokojily současné právní požadavky v některých zemích.

52. Odhady toxicity by měly být založeny na počtu lístků a na jedné další proměnné měření (celková plocha lístků, hmotnost sušiny nebo čerstvá hmotnost), protože některé chemické látky mohou ovlivňovat jiné proměnné měření mnohem více než počet lístků. Pouhým určováním počtu lístků by se tento účinek nezjistil.

53. Počet lístků a jakákoliv další zaznamenaná proměnná měření, tj. celková plocha lístků, hmotnost sušiny nebo čerstvá hmotnost, se pro každé měření uvedou v tabulce společně s koncentracemi zkoušené látky. Následná analýza dat, např. odhad LOEC, NOEC nebo EC_x, by měla být založena na hodnotách pro jednotlivá opakování, a nikoliv na vypočítaných středních hodnotách pro každou exponovanou skupinu.

Průměrná specifická růstová rychlost

54. Průměrná specifická růstová rychlost pro konkrétní období se vypočítá jako logaritmické zvýšení proměnných růstu – počtu lístků a jedné další proměnné měření (celková plocha lístků, hmotnost sušiny nebo čerstvá hmotnost) – pomocí následujícího vzorce pro každé opakování kontrolních a exponovaných vzorků:

$$\mu_{i-j} = \frac{\ln(N_j) - \ln(N_i)}{t}$$

kde:

— μ_{i-j}: průměrná specifická růstová rychlost od doby i do doby j,

— N_i: proměnná měření ve zkušební nebo kontrolní nádobě v době i,

— N_j: proměnná měření ve zkušební nebo kontrolní nádobě v době j,

— t: čas od i do j.

Pro každou exponovanou skupinu a kontrolní skupinu se vypočítá střední hodnota růstové rychlosti a odhady rozptylu.

55. Průměrná specifická růstová rychlost by se měla vypočítat pro celou dobu trvání zkoušky (doba „i“ ve shora uvedeném vzorci je počátek zkoušky a doba „j“ je ukončení zkoušky). Pro každou zkušební koncentraci a kontrolu se vypočítá střední hodnota průměrné specifické růstové rychlosti a odhady rozptylu. Dále je zapotřebí vyhodnotit růstovou rychlost v jednotlivých časových úsecích s cílem zhodnotit účinky zkoušené chemické látky, které se vyskytly během expoziční doby (např. kontrolou logaritmicky transformovaných růstových křivek). Významné rozdíly mezi růstovou rychlostí v jednotlivých časových úsecích a průměrnou růstovou rychlostí jsou známkou odchylky od konstantního exponenciálního růstu a vyžadují důkladné prozkoumání růstových křivek. V tomto případě by konzervativní přístup spočíval v porovnání specifických růstových rychlostí exponovaných kultur během doby maximální inhibice se specifickými růstovými rychlostmi kontrolních vzorků pro totéž období.

56. Procentuální inhibici růstové rychlosti (I_r) lze potom vypočítat pro každou zkušební koncentraci (exponovanou skupinu) podle následujícího vzorce:

▼M6

$$\%\ I_r = \frac{(\mu C - \mu T)}{\mu C} \times 100$$

kde:

— % I_r: procentuální inhibice průměrné specifické růstové rychlosti,

— μ_C: střední hodnota μ v kontrolní skupině,

— μ_T: střední hodnota μ v exponované skupině.

Výtěžek

57. Účinky na výtěžek se určují na základě dvou proměnných měření, tj. počtu lístků a jedné další proměnné měření (celková plocha lístků, hmotnost sušiny nebo čerstvá hmotnost), přítomných v každé zkušební nádobě na počátku a konci zkoušky. Pro hmotnost sušiny nebo čerstvou hmotnost se počáteční biomasa určuje na základě vzorku lístků odebraných ze stejné vsázky použité k naočkování zkušebních nádob (viz odstavec 20). Pro každou zkušební koncentraci a kontrolu se vypočítá střední hodnota výtěžku a odhad rozptylu. Střední hodnotu procentuální inhibice výtěžku (% I_y) lze vypočítat pro každou exponovanou skupinu následovně:

$$\%\ I_y = \frac{(b_c - b_T)}{b_c} \times 100$$

kde:

— % I_y: procentuální snížení výtěžku,

— b_C: konečná biomasa minus počáteční biomasa pro kontrolní skupinu,

— b_T: konečná biomasa minus počáteční biomasa pro exponovanou skupinu.

Vynášení křivek závislosti koncentrace-odezva

58. Je třeba vynést křivky závislosti koncentrace-odezva, které vyjadřují vztah střední procentuální inhibice proměnné odezvy (I_r, or I_y vypočítané postupem z odstavce 56 nebo 57) a logaritmu koncentrace zkoušené chemické látky.

Odhad EC_x

59. Odhady EC_x (např. EC_{50}) by měly být založeny jak na průměrné specifické růstové rychlosti (E_rC_x), tak na výtěžku (E_yC_x), přičemž obě tyto hodnoty by zase měly vycházet z počtu lístků a jedné další proměnné měření (celková plocha lístků, hmotnost sušiny nebo čerstvá hmotnost). Důvodem je skutečnost, že existují zkoušené chemické látky, které mají odlišný dopad na počet lístků a na další proměnné měření. Požadovanými parametry toxicity jsou proto čtyři hodnoty EC_x pro každou vypočítanou úroveň inhibice x: E_rC_x (počet lístků); E_rC_x (celková plocha lístků, hmotnost sušiny nebo čerstvá hmotnost); EyC_x (počet lístků) a EyC_x (celková plocha lístků, hmotnost sušiny nebo čerstvá hmotnost).

Statistické postupy

60. Cílem je získat kvantitativní vztah mezi koncentrací a odezvou pomocí regresní analýzy. Je možné použít váženou lineární regresi po provedení linearizující transformace dat odezvy – například do probitových nebo logitových či Weibullových jednotek (13), ale dává se přednost nelineárním regresním postupům, s jejichž pomocí se lépe zpracovávají nevyhnutelné nepravidelnosti dat a odchylky od hladkých distribucí. Při přiblížení se

▼M6

k nule či úplné inhibici mohou být takové nepravidelnosti zesíleny transformací a rušit při analýze (13). Je zapotřebí uvést, že standardní metody analýzy používající probitové, logitové nebo Weibullovy transformace jsou určeny k použití s binárními daty (např. mortalita nebo přežití) a musí se upravit, aby mohly být použity s daty růstové rychlosti nebo výtěžku. Speciální postupy pro stanovení hodnot EC_x ze spojitých dat lze nalézt v literatuře (14, 15 a 16).

61. Pro každou proměnnou odezvy, která se má analyzovat, se použije vztah koncentrace a odezvy pro výpočet bodových odhadů hodnot EC_x. Je-li to možné, je zapotřebí určit 95 % intervaly spolehlivosti pro každý odhad. Dobrá shoda dat odezvy s regresním modelem se vyhodnotí buď graficky, nebo statisticky. Regresní analýza by se měla provádět pomocí odezev jednotlivých opakování, nikoliv pomocí středních hodnot exponovaných skupin.

62. Odhady EC50 a meze spolehlivosti lze rovněž získat lineární interpolací s bootstrapem (17), pokud se dostupné regresní modely/metody pro příslušná data nehodí.

63. Pro odhad LOEC, a tedy i NOEC je nezbytné porovnat střední hodnoty exponovaných vzorků pomocí metod analýzy rozptylu (ANOVA). Střední hodnota pro každou koncentraci se poté musí porovnat se střední hodnotou pro kontrolní skupinu, a to vhodnou metodou vícenásobného porovnání nebo metodou zkoušky trendu. Užitečné mohou být Dunnettův test nebo Williamsův test (18, 19, 20, 21). Je nezbytné vyhodnotit, zda je splněn předpoklad homogenity rozptylu nezbytný pro ANOVA. Toto hodnocení lze provádět graficky nebo formální zkouškou (22). Vhodnými testy jsou Leveneův nebo Bartlettův. Nesplnění předpokladu homogenity rozptylů se dá někdy napravit logaritmickou transformací dat. Jestliže je heterogenita rozptylů extrémní a nelze ji napravit transformací, pak je třeba zvážit analýzu takovými metodami, jako je sestupný Jonckheerův trend test. Další pokyny pro stanovení NOEC lze nalézt v (16).

64. Vědecký vývoj poslední doby vedl k doporučení opustit koncepci NOEC a nahradit ji odhady bodů ECx na základě regrese. Vhodná hodnota x nebyla pro tuto zkoušku s *Lemna* stanovena. Nicméně se zdá, že vhodné je rozmezí od 10 do 20 % (v závislosti na zvolené proměnné odezvy) a nejlépe by se měly uvádět jak EC_{10}, tak EC_{20}.

Závěrečná zpráva

65. V závěrečné zprávě musí být uvedeny tyto údaje:

Zkoušená chemická látka:

— fyzikální povaha a fyzikálně-chemické vlastnosti, včetně meze rozpustnosti ve vodě,

— údaje o chemické identifikaci (např. číslo CAS), včetně čistoty.

Zkušební druh:

— vědecký název, klon (je-li znám) a zdroj.

Zkušební podmínky:

— použitý zkušební postup (statický, semistatický nebo průtokový),

— datum zahájení zkoušky a délka jejího trvání,

— zkušební médium,

— popis experimentálního uspořádání: zkušební nádoby a kryty, objemy roztoků, počty kolonií a lístků na zkušební nádobu na počátku zkoušky,

— zkušební koncentrace (nominální, popř. naměřené) a počet opakování pro každou koncentraci,

▼M6

— metody přípravy zásobních a zkušebních roztoků, včetně použití jakýchkoliv rozpouštědel nebo dispergátorů,

— teplota během zkoušky,

— zdroj světla, intenzita světla a homogenita,

— hodnoty pH zkušebních a kontrolních médií,

— koncentrace zkoušené chemické látky a metoda analýzy s příslušnými údaji pro hodnocení jakosti (validační studie, směrodatné odchylky nebo intervaly spolehlivosti analýz),

— metody pro určení počtu lístků a dalších proměnných měření, např. hmotnost sušiny, čerstvá hmotnost nebo plocha lístků,

— všechny odchylky od této zkušební metody.

Výsledky:

— hrubá data: počet lístků a další proměnné měření v každé zkušební a kontrolní nádobě při každém pozorování a každé analýze,

— střední hodnoty a směrodatné odchylky pro každou proměnnou měření,

— růstové křivky pro každou koncentraci (doporučeno s logaritmicky transformovanou proměnnou měření, viz odstavec 55),

— doba zdvojnásobení/růstová rychlost v kontrole na základě počtu lístků,

— vypočítané proměnné odezvy pro všechna opakování s exponovanými vzorky, spolu se středními hodnotami a variačními koeficienty pro opakování,

— grafické znázornění vztahu koncentrace a odezvy,

— odhady toxických cílových ukazatelů pro proměnné odezvy, např. EC_{50}, EC_{10}, EC_{20}, a související intervaly spolehlivosti. Jestliže se počítají LOEC a/nebo NOEC, uvedou se jejich hodnoty a statistické metody použité k jejich stanovení,

— jestliže byla použita ANOVA, uvede se velikost účinku, který lze detekovat (např. nejmenší významný rozdíl),

— jakákoliv stimulace růstu zjištěná v jakémkoli exponovaném vzorku,

— jakékoliv vizuální známky fytotoxicity, jakož i pozorování zkušebních roztoků,

— diskuse výsledků, včetně případného vlivu na výsledek zkoušky v důsledku odchylek od této zkušební metody.

LITERATURA

1) ASTM International. (2003). Standard Guide for Conducting Static Toxicity Test With *Lemna gibba* G3. E 1415-91 (Reapproved 1998). pp. 733-742. In, Annual Book of ASTM Standards, Vol. 11.05 Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides, ASTM, West Conshohocken, PA.

2) US EPA – United States Environmental Protection Agency. (1996). OPPTS 850.4400 Aquatic Plant Toxicity Test Using *Lemna* spp., „Public draft". EPA 712-C-96-156. 8pp.

3) AFNOR – Association Française de Normalisation. (1996). XP T 90-337: Détermination de l'inhibition de la croissance de *Lemna minor*. 10pp.

4) SSI – Swedish Standards Institute. (1995). Water quality – Determination of growth inhibition (7-d) *Lemna minor*, duckweed. SS 02 82 13. 15pp. (in Swedish).

▼M6

5) Environment Canada. (1999). Biological Test Method: Test for Measuring the Inhibition of Growth Using the Freshwater Macrophyte, *Lemna minor*. EPS 1/RM/37 – 120 pp.

6) Environment Canada. (1993) Proposed Guidelines for Registration of Chemical Pesticides: Non-Target Plant Testing and Evaluation. Canadian Wildlife Service, Technical Report Series No. 145.

7) Sims I., Whitehouse P. and Lacey R. (1999) The OECD *Lemna* Growth Inhibition Test. Development and Ring-testing of draft OECD Test Guideline. R&D Technical Report EMA 003. WRc plc – Environment Agency.

8) OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No.23. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.

9) International Organisation for Standardisation. ISO DIS 20079. Water Quality – Determination of the Toxic Effect of Water Constituents and Waste Water to Duckweed (*Lemna minor*) – Duckweed Growth Inhibition Test.

10) Walbridge C. T. (1977). A flow-through testing procedure with duckweed (*Lemna minor* L.). Environmental Research Laboratory – Duluth, Minnesota 55804. US EPA Report No. EPA-600/3-77 108. September 1977.

11) Lockhart W. L., Billeck B. N. and Baron C. L. (1989). Bioassays with a floating plant (*Lemna minor*) for effects of sprayed and dissolved glyphosate. *Hydrobiologia*, 118/119, 353 – 359.

12) Huebert, D.B. and Shay J.M. (1993) Considerations in the assessment of toxicity using duckweeds. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 12, 481-483.

13) Christensen, E.R.,, Nyholm, N. (1984): Ecotoxicological Assays with Algae: Weibull Dose-Response Curves. *Env. Sci. Technol.* 19, 713-718.

14) Nyholm, N. Sørensen, P.S., Kusk, K.O. and Christensen, E.R. (1992): Statistical treatment of data from microbial toxicity tests. *Environ. Toxicol. Chem*. 11, 157-167.

15) Bruce R.D. and Versteeg D.J. (1992) A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 11, 1485-1494.

16) OECD. (2006). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.

17) Norberg-King T.J. (1988) An interpolation estimate for chronic toxicity: The ICp approach. National Effluent Toxicity Assessment Center Technical Report 05-88. US EPA, Duluth, MN.

18) Dunnett, C.W. (1955) A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. J. Amer. Statist. Assoc., 50, 1096-1121.

19) Dunnett, C.W. (1964) New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics, 20, 482-491.

20) Williams, D.A. (1971) A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics, 27: 103-117.

21) Williams, D.A. (1972) The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics, 28: 519-531.

22) Brain P. and Cousens R. (1989). An equation to describe dose-responses where there is stimulation of growth at low doses. *Weed Research*, 29, 93-96.

▼M6

Dodatek 1

Definice

Pro účely této zkušební metody se používají následující definice a zkratky:

Biomasa je hmotnost sušiny živé hmoty přítomné v populaci. V této zkoušce se obvykle měří náhrady biomasy, například počet lístků nebo plocha lístků, a používání termínu „biomasa“ rovněž odkazuje na tyto náhradní míry.

Chemická látka je látka nebo směs.

Chloróza je žloutnutí tkáně lístků.

Klon je organismus nebo buňka vzniklá z jediného jedince asexuální reprodukcí. Jedinci ze stejného klonu jsou proto geneticky identičtí.

Kolonie znamená soubor mateřských a dceřiných lístků (obvykle 2 až 4) navzájem spolu spojených. Někdy se označuje jako rostlina.

EC_x je koncentrace zkoušené látky rozpuštěné ve zkušebním médiu, která po dané expoziční době (musí se výslovně uvést, pokud se odchyluje od úplné či normální doby trvání zkoušky) vede k x % (např. 50 %) snížení růstu *Lemna*. Pro jednoznačný popis hodnoty EC odvozené z růstové rychlosti nebo z výtěžku se pro růstovou rychlost používá symbol „E_rC“ a pro výtěžek „E_yC“ následovaný proměnnou měření, např. E_rC (počet lístků).

Průtoková zkouška je zkouška, při níž jsou zkušební roztoky průběžně vyměňovány.

Lístek je individuální/samostatná listovitá struktura rostliny okřehku. Je to nejmenší jednotka, tj. jedinec, schopná reprodukce.

Hrbatost znamená lístky mající hrbolatý či napuchlý vzhled.

Růst je zvýšení proměnné měření, např. počtu lístků, hmotnosti sušiny, hmotnosti za mokra nebo plochy lístků, během doby zkoušky.

Růstová rychlost (průměrná specifická růstová rychlost) je logaritmický nárůst biomasy během období expozice.

Nejnižší koncentrace s pozorovaným účinkem (LOEC) je nejnižší zkušební koncentrace, při níž je pro danou expoziční dobu pozorován statisticky významný účinek chemické látky na snížení růstu (na hladině spolehlivosti $p < 0,05$) ve srovnání s kontrolou. Všechny zkušební koncentrace vyšší než LOEC musí však mít stejné nebo závažnější škodlivé účinky, než jsou účinky pozorované při koncentraci LOEC. Nelze-li tyto dvě podmínky splnit, musí být podrobně vysvětleno, jak byla LOEC (a tedy i NOEC) zvolena.

Proměnné měření jsou jakýmkoliv druhem proměnných, které se měří pro vyjádření cílového ukazatele pomocí jedné či více různých proměnných odezvy. V této metodě jsou proměnnými měření počet lístků, plocha lístků, čerstvá hmotnost a hmotnost sušiny.

Monokultura je kultura s jedním druhem rostliny.

Nekróza je mrtvá (tj. bílá či vodou nasáklá) tkáň lístku.

Koncentrace bez pozorovaných účinků (NOEC) je zkušební koncentrace bezprostředně nižší než LOEC.

Fenotyp je pozorovatelná charakteristika organismu určená interakcí jeho genů s jeho prostředím.

Proměnné odezvy jsou proměnné pro odhad toxicity odvozené z jakýchkoliv naměřených proměnných, jež popisují biomasu, různými metodami výpočtu. U této metody jsou proměnnými odezvy růstová rychlost a výtěžek, které se odvozují z proměnných měření jako např. počtu lístků, plochy lístků, čerstvé hmotnosti nebo hmotnosti sušiny.

▼M6

Semistatická (obnovovací) zkouška je zkouška, při níž je zkušební roztok během zkoušky ve stanovených intervalech pravidelně nahrazován.

Statická zkouška je zkušební metoda bez obnovování zkušebního roztoku během zkoušky.

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

Cílový ukazatel popisuje obecný faktor, který bude jakožto cíl zkoušky změněn zkoušenou chemickou látkou vzhledem ke kontrole. Při této metodě je cílovým ukazatelem inhibice růstu, kterou lze vyjádřit různými proměnnými odezvy, jež jsou založeny na jedné či více proměnných měření.

Zkušební médium je úplné syntetické růstové médium, v němž rostou zkušební rostliny při expozici zkoušené chemické látce. Zkoušená chemická látka bude za normálních podmínek v zkušebním médiu rozpuštěna.

Výtěžek je hodnota proměnné měření pro vyjádření biomasy na konci expoziční doby minus proměnná měření na počátku expoziční doby.

▼M6

Dodatek 2

Popis *Lemna* spp.

Vodní rostlina běžně označovaná jako okřehek, *Lemna* spp., patří do čeledi *Lemnaceae* (okřehkovité), která má řadu celosvětově rozšířených druhů ve čtyřech rodech. Jejich rozdílný vzhled a taxonomie byly vyčerpávajícím způsobem popsány v (1, 2). *Lemna gibba* a *L. minor* jsou představiteli druhů oblastí mírného pásu a běžně se používají pro zkoušky toxicity. Oba druhy mají plovoucí nebo ponořenou lodyžku diskovitého tvaru (lístek) a velmi tenký kořínek, který vychází ze středu spodní části každého lístku. *Lemna* spp. zřídkakdy kvetou a rostliny se množí vegetativně vytvářením nových lístků (3). Ve srovnání se staršími rostlinami jsou mladší rostliny spíše světlejší, mají kratší kořínky a skládají se ze dvou až tří lístků různých velikostí. Díky malé velikosti, jednoduché struktuře, asexuální reprodukci a krátké generační době jsou rostliny rodu *Lemna* velmi vhodné pro laboratorní zkoušení (4, 5).

Kvůli pravděpodobným rozdílům v citlivost mezi jednotlivými druhy jsou platná pouze srovnání citlivosti v rámci daného druhu.

Příklady druhů *Lemna*, které byly použity pro zkoušení: odkazy na druh.

Lemna aequinoctialis: Eklund, B. (1996). The use of the red alga *Ceramium strictum* and the duckweed *Lemna aequinoctialis* in aquatic ecotoxicological bioassays. Licentiate in Philosophy Thesis 1996:2. Dep. of Systems Ecology, Stockholm University.

Lemna major: Clark, N. A. (1925). The rate of reproduction of *Lemna major* as a function of intensity and duration of light. J. phys. Chem., 29: 935-941.

Lemna minor: United States Environmental Protection Agency (US EPA). (1996). OPPTS 850.4400 Aquatic Plant Toxicity Test Using *Lemna* spp., „Public draft“. EPA 712-C-96-156. 8pp.

Association Française de Normalisation (AFNOR). (1996). XP T 90-337: Détermination de l'inhibition de la croissance de *Lemna minor*. 10pp.

Swedish Standards Institute (SIS). (1995). Water quality – Determination of growth inhibition (7-d) *Lemna minor*, duckweed. SS 02 82 13. 15pp. (in Swedish).

Lemna gibba: ASTM International. (2003). Standard Guide for Conducting Static Toxicity Test With *Lemna gibba* G3. E 1415-91 (Reapproved 1998). pp. 733-742.

United States Environmental Protection Agency (US EPA). (1996). OPPTS 850.4400 Aquatic Plant Toxicity Test Using *Lemna* spp., „Public draft“. EPA 712-C-96-156. 8pp.

Lemna paucicostata: Nasu, Y., Kugimoto, M. (1981). *Lemna* (duckweed) as an indicator of water pollution. I. The sensitivity of *Lemna paucicostata* to heavy metals. Arch. Environ. Contam. Toxicol., 10:1959-1969.

Lemna perpusilla: Clark, J. R. et al. (1981). Accumulation and depuration of metals by duckweed (*Lemna perpusilla*). Ecotoxicol. Environ. Saf., 5:87-96.

Lemna trisulca: Huebert, D. B., Shay, J. M. (1993). Considerations in the assessment of toxicity using duckweeds. Environ. Toxicol. and Chem., 12:481- 483.

Lemna valdiviana: Hutchinson, T.C., Czyrska, H. (1975). Heavy metal toxicity and synergism to floating aquatic weeds. Verh.-Int. Ver. Limnol., 19:2102-2111.

Zdroje druhu *Lemna*

University of Toronto Culture Collection of Algae and Cyanobacteria
Department of Botany, University of Toronto
Toronto, Ontario, Kanada, M5S 3 B2
Tel: +1-416-978-3641
Fax:+1-416-978-5878
e-mail: jacreman@botany.utoronto.ca

▼**M6**

North Carolina State University
Forestry Dept
Duckweed Culture Collection
Campus Box 8002
Raleigh, NC 27695-8002
USA
phone 001 (919) 515-7572
astomp@unity.ncsu.edu

Institute of Applied Environmental Research (ITM) Stockholm University
SE-106 91
STOCKHOLM
ŠVÉDSKO
Tel: +46 8 674 7240
Fax +46 8 674 7636

Federal Environmental Agency (UBA)
FG III 3.4
Schichauweg 58
12307 Berlin
Německo
e-mail: lemna@uba.de

LITERATURA

1) Hillman, W.S. (1961). The Lemnaceae or duckweeds: A review of the descriptive and experimental literature. The Botanical Review, 27:221-287.

2) Landolt, E. (1986). Biosystematic investigations in the family of duckweed (*Lemnaceae*). Vol. 2. Geobotanischen Inst. ETH, Stiftung Rubel, Zürich, Switzerland.

3) Björndahl, G. (1982). Growth performance, nutrient uptake and human utilization of duckweeds (*Lemnaceae* family). ISBN 82-991150-0-0. The Agricultural Research Council of Norway, University of Oslo.

4) Wang, W. (1986). Toxicity tests of aquatic pollutants by using common duckweed. Environmental Pollution, Ser B, 11:1-14.

5) Wang, W. (1990). Literature review on duckweed toxicity testing. Environmental Research, 52:7-22

▼M6

Dodatek 3

Uchovávání zásobních kultur

Zásobní kultury je možné uchovávat při nižších teplotách (4–10 °C) po delší dobu bez potřeby je znovu zakládat. Růstové médium pro *Lemna* může být stejné jako médium použité pro zkoušení, ale pro zásobní kultury je možné použít jiná média bohatá na živiny.

Pravidelně se několik mladých, světle-zelených rostlin vyjme a za aseptických podmínek umístí do nových kultivačních nádob obsahujících čerstvé médium. Za zde navržených podmínek nižší teploty lze provádět dílčí kultivace v intervalech až tří měsíců.

Je třeba používat chemicky čisté (umyté kyselinou) a sterilní skleněné kultivační nádoby a dodržovat aseptické podmínky manipulace. V případě kontaminace zásobní kultury, např. řasami nebo houbami, je nezbytné podniknout opatření k odstranění kontaminujících organismů. V případě řas a většiny dalších kontaminujících organismů toho lze dosáhnout povrchovou sterilizací. Odebere se vzorek kontaminovaného rostlinného materiálu a uříznou se kořeny. Materiál se pak intenzívně třepe v čisté vodě a následně ponoří do 0,5 % (obj.) roztoku chlornanu sodného na dobu mezi 30 s a 5 min. Pak se rostlinný materiál opláchne sterilní vodou a převede, po várkách, do kultivačních nádob obsahujících čerstvé růstové médium. Při tomto zpracování mnoho lístků odumře, zejména jestliže se použijí delší expoziční doby, ale některé z lístků, které přežijí, budou obvykle prosté kontaminace. Ty je pak možné použít k opětovné inokulaci nových kultur.

▼M6

Dodatek 4

Média

Pro *L. minor* a *L. gibba* se doporučují rozdílná růstová média. Pro *L. minor* je doporučeno upravené médium Švédského standardu (SIS), zatímco pro *L. gibba* je doporučeno médium 20X AAP. Složení obou médií je uvedeno níže. Při přípravě těchto médií je třeba používat chemicky čisté nebo analyticky čisté látky a deionizovanou vodu.

Švédský standard (SIS) pro růstové médium *Lemna*:

— Zásobní roztoky I–V se sterilizují v autoklávu (120 °C, 15 minut) nebo membránovou filtrací (přibližná velikost pórů 0,2 μm).

— Zásobní roztoky VI (a volitelně VII) se sterilizuje pouze membránovou filtrací; tyto roztoky by se neměly autoklávovat.

— Sterilní zásobní roztoky se skladují v chladu a temnu. Zásobní roztoky I–V se musí vylít po šesti měsících, zatímco zásobní roztok VI (a volitelně VII) se mohou skladovat jen jeden měsíc.

Zásobní roztok č.	Látka	Koncentrace v zásobním roztoku (g/l)	Koncentrace v připraveném médiu (mg/l)	Připravené médium	
				Prvek	Koncentrace (mg/l)
I	$NaNO_3$	8,50	85	Na; N	32; 14
	KH_2PO_4	1,34	13,4	K; P	6,0; 2,4
II	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	15	75	Mg; S	7,4; 9,8
III	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	7,2	36	Ca; Cl	9,8; 17,5
IV	Na_2CO_3	4,0	20	C	2,3
V	H_3BO_3	1,0	1,00	B	0,17
	$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	0,20	0,20	Mn	0,056
	$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0,010	0,010	Mo	0,0040
	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0,050	0,050	Zn	0,011
	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0,0050	0,0050	Cu	0,0013
	$Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$	0,010	0,010	Co	0,0020
VI	$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	0,17	0,84	Fe	0,17
	Na_2-EDTA $2H_2O$	0,28	1,4	—	—
VII	MOPS (pufr)	490	490	—	—

Pro přípravu 1 litru média SIS se do 900 ml deionizované vody přidají následující roztoky:

▼**M6**

— 10 ml zásobního roztoku I,

— 5 ml zásobního roztoku II,

— 5 ml zásobního roztoku III,

— 5 ml zásobního roztoku IV,

— 1 ml zásobního roztoku V,

— 5 ml zásobního roztoku VI,

— 1 ml zásobního roztoku VII (volitelně).

Poznámka: Pro určité zkoušené chemické látky může být potřebný další zásobní roztok VII- (pufr MOPS (viz odstavec 11).

pH se nastaví na 6,5 ± 0,2 buď 0,1 mol nebo 1 mol HCl nebo NaOH a objem se doplní do 1 litru deionizovanou vodou.

Růstové médium 20X AAP

Zásobní roztoky se připraví v sterilní destilované nebo deionizované vodě.

Sterilní zásobní roztoky se skladují v chladu a temnu. Za těchto podmínek mají zásobní roztoky skladovatelnost min. 6–8 týdnů.

Pro médium 20X – AAP se připraví pět živných zásobních roztoků (A1, A2, A3, B a C) za použití chemicky čistých látek. 20 ml každého živného zásobního roztoku se přidá do přibližně 850 ml deionizované vody, čímž vznikne růstové médium. pH se nastaví na 7,5 ± 0,1 buď 0,1 nebo 1 mol HCl nebo NaOH a objem se doplní do 1 litru deionizovanou vodou. Médium se pak zfiltruje přes (přibližně) 0,2μm membránový filtr do sterilního kontejneru.

Růstové médium určené pro zkoušení by se mělo připravit 1–2 dny před použitím, aby se pH mohlo stabilizovat. pH růstového média by se mělo před použitím zkontrolovat a podle potřeby znovu upravit přídavkem 0,1 nebo 1 mol NaOH nebo HCl, jak je popsáno výše.

Zásobní roztok č.	Látka	Koncentrace v zásobním roztoku (g/l) (*)	Koncentrace v připraveném médiu (mg/l) (*)	Připravené médium	
				Prvek	Koncentrace (mg/l) (*)
A1	$NaNO_3$	26	510	Na; N	190; 84
	$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	12	240	Mg	58,08
	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	4,4	90	Ca	24,04
A2	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	15	290	S	38,22
A3	$K_2HPO_4 \cdot 3H_2 \cdot O$	1,4	30	K;P	9,4; 3,7
B	H_3BO_3	0,19	3,7	B	0,65
	$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	0,42	8,3	Mn	2,3
	$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	0,16	3,2	Fe	0,66

▼**M6**

Zásobní roztok č.	Látka	Koncentrace v zásobním roztoku (g/l) (*)	Koncentrace v připraveném médiu (mg/l) (*)	Připravené médium	
				Prvek	Koncentrace (mg/l) (*)
	$Na_2EDTA.2H_2O$	0,30	6,0	—	—
	$ZnCl_2$	3,3 mg/l	66 µg/l	Zn	31 µg/l
	$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	1,4 mg/l	29 µg/l	Co	7,1 µg/l
	$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	7,3 mg/l	145 µg/l	Mo	58 µg/l
	$CuCl_2 \cdot 2H_2O$	0,012 mg/l	0,24 µg/l	Cu	0,080 µg/l
C	$NaHCO_3$	15	300	Na;C	220; 43

(*) Pokud není uvedeno

Poznámka: Teoreticky vhodná konečná koncentrace bikarbonátu (kterou se předejde značnému nastavování pH) je 15 mg/L, nikoli 300 mg/l. Avšak dřívější použití média 20X-AAP, včetně okružní zkoušky pro tyto pokyny, vychází z koncentrace 300 mg/l. (I. Sims, P. Whitehouse a R. Lacey. (1999) OECD Zkouška inhibice růstu rodu *Lemna*. Vývoj a okružní test, návrh Pokynu OECD pro zkoušení. R&D Technical Report EMA 003. WRc plc – Environment Agency.)

STEINBERGovo médium (podle ISO 20079)

Koncentrace a zásobní roztoky

Upravené médium podle Steinberga se používá v normě ISO 20079 pro *Lemna minor* samotné (jelikož norma povoluje pouze *Lemna minor*), ale zkoušky ukázaly, že dobré výsledky je možné získat rovněž s *Lemna gibba*.

Při přípravě média je třeba použít chemicky nebo analyticky čisté látky a deionizovaná voda.

Připraví se živné médium ze zásobních roztoků nebo 10násobně koncentrovaného média, které umožňuje maximální koncentraci média bez vysrážení.

Tabulka 1

STEINBERGovo médium se stabilizovaným pH (upraveno podle Altenburgera)

Složka		Živné médium	
Makroprvky	molekulová hmotnost	mg/l	mmol/l
KNO_3	101,12	350,00	3,46
$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$	236,15	295,00	1,25
KH_2PO_4	136,09	90,00	0,66
K_2HPO_4	174,18	12,60	0,072
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	246,37	100,00	0,41

▼**M6**

Složka		Živné médium	
Mikroprvky	molekulová hmotnost	µg/l	µmol/l
H_3BO_3	61,83	120,00	1,94
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	287,43	180,00	0,63
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	241,92	44,00	0,18
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	197,84	180,00	0,91
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	270,21	760,00	2,81
EDTA dvojsodný-dihydrát	372,24	1 500,00	4,03

Tabulka 2

Zásobní roztoky (makroprvky)

1. Makroprvky (50násobně koncentrované)	**g/l**
Zásobní roztok 1:	
KNO_3	17,50
KH_2PO_4	4,5
K_2HPO_4	0,63
Zásobní roztok 2:	
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	5,00
Zásobní roztok 3:	
$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$	14,75

Tabulka 3

Zásobní roztoky (mikroprvky)

2. Mikroprvky (1 000násobně koncentrované)	**mg/l**
Zásobní roztok 4:	
H_3BO_3	120,0
Zásobní roztok 5:	
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	180,0
Zásobní roztok 6:	
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	44,0
Zásobní roztok 7:	
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	180,0
Zásobní roztok 8:	
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	760,00
EDTA dvojsodný-dihydrát	1 500,00

— Zásobní roztoky 2 a 3 a odděleně 4 až 7 se mohou sloučit (je třeba brát v úvahu požadované koncentrace).

▼**M6**

— Pro prodloužení životnosti se zásobní roztoky zpracují v autoklávu při 121 °C po dobu 20 min nebo se alternativně provede sterilní filtrace (0,2 μm). Pro zásobní roztok 8 se důrazně doporučuje sterilní filtrace (0,2 μm).

Příprava konečné koncentrace STEINBERGova média (upraveného):

— 20 ml zásobních roztoků 1, 2 a 3 (viz Tabulka 2) se přidá do přibližně 900 ml deionizované vody, aby se předešlo vysrážení.

— Přidá se 1,0 ml zásobních roztoků 4, 5, 6, 7 a 8 (viz Tabulka 3).

— pH se nastaví na 5,5 ± 0,2 (nastaví se přidáním minimálního objemu roztoku NaOH nebo HCl).

— Doplní se vodou do 1 000 ml.

— Jestliže se zásobní roztoky sterilizují a použije se vhodná voda, není další sterilizace nutná. Jestliže se sterilizace provádí s konečným médiem, zásobní roztok 8 se přidá po zpracování v autoklávu (při teplotě 121 °C po dobu 20 min).

Příprava 10násobně koncentrovaného STEINBERGova média (upraveného) pro středně dlouhé skladování.

— 20 ml zásobních roztoků 1, 2 a 3 (viz Tabulka 2) se přidá do přibližně 30 ml vody, aniž by došlo k vysrážení.

— Přidá se 1,0 ml zásobních roztoků 4, 5, 6, 7 a 8 (viz Tabulka 3). Objem se doplní vodou do 100 ml.

— Jestliže se zásobní roztoky sterilizují a použije se vhodná voda, není další sterilizace nutná. Jestliže se sterilizace provádí s konečným médiem, zásobní roztok 8 se přidá po zpracování v autoklávu (při teplotě 121 °C po dobu 20 min).

— pH média (konečná koncentrace) by mělo být 5,5 ± 0,2.

▼M4

C.27 TEST TOXICITY NA CHIRONOMIDAE V SYSTÉMU SEDIMENT-VODA ZA POUŽITÍ OBOHACENÉHO SEDIMENTU

ÚVOD

1. Tato zkušební metoda odpovídá pokynu OECD pro zkoušení (TG) 218 (2004). Tato zkušební metoda je určena k posouzení účinků dlouhodobé expozice larev sladkovodních pakomárů *Chironomus* sp. žijících v sedimentu chemickým látkám. Je založena na stávajících protokolech o zkoušce toxicity p*ro Chironomus riparius* a *Chironomus tentans,* která byla vyvinuta v Evropě (1, 2, 3) a v Severní Americe (4, 5, 6, 7, 8) a ověřována v mezilaboratorních porovnávacích zkouškách (1, 6, 9). Lze užít rovněž další dobře zdokumentované druhy pakomárů, jako například *Chironomus yoshimatsui* (10, 11).

2. Scénář expozice užitý při této zkušební metodě je vmíchání zkoušené látky do sedimentu. Výběr vhodného scénáře expozice závisí na zamýšleném použití testu. Účelem scénáře vmíchání látky do sedimentu je simulovat nahromaděné množství chemických látek přetrvávajících v sedimentu. Tento systém expozice zahrnuje vmíchání látky do sedimentu ve zkušebním systému sediment–voda.

3. Látky, které je třeba testovat z hlediska organismů žijících v sedimentu, v této složce obvykle přetrvávají po dlouhá časová období. Expozici organismů žijících v sedimentu lze zajistit celou řadou možných cest. Relativní význam jednotlivých cest, jimiž dochází k expozici, a doba nezbytná k tomu, aby každá z nich přispěla k celkovým toxickým účinkům, jsou závislé na fyzikálně chemických vlastnostech dotčené chemické látky. V případě silně adsorbujících látek (např. log K_{ow} > 5) nebo pro chemické látky s kovalentní vazbou na sediment může být významnou expoziční cestou požití kontaminované potravy. Aby nedošlo k podcenění toxicity vysoce lipofilních látek, lze zvážit užití potravy přidané do sedimentu před aplikací zkoušené chemické látky. Aby bylo možné zohlednit všechny potenciální způsoby expozice, zaměřuje se tato zkušební metoda na dlouhodobou expozici. Délka trvání zkoušky se pohybuje v rozmezí 20–28 dní pro *C. riparius* and *C. yoshimatsui* a 28–65 dní pro *C. tentans*. Pokud jsou pro konkrétní účel, například pro studium účinků nestabilní chemické látky, potřebné krátkodobé údaje, mohou být další duplikátní vzorky po deseti dnech odstraněny.

4. Měřené výsledné účinky se rovnají celkovému počtu vylíhlých dospělců a času do vylíhnutí. Pokud jsou nezbytné další krátkodobé údaje, doporučuje se provádět měření přežití a růstu larev až po uplynutí desetidenního období, podle potřeby s využitím dalších duplikátních vzorků.

5. Doporučuje se použití sedimentu doplněného přísadami. Přísadami doplněný sediment má několik výhod oproti přírodním sedimentům:

   — jeho experimentální variabilita je snížena, protože tvoří reprodukovatelnou „standardizovanou matrici“ a je eliminována potřeba hledat zdroje nekontaminovaného čistého sedimentu,

   — zkoušky lze zahájit kdykoliv, aniž by bylo nutno čelit sezonním výkyvům zkušebního sedimentu, a sediment není třeba předem upravit, aby se z něj odstranili původní živočichové; užití přísadami doplněného sedimentu také snižuje náklady spojené s terénním shromažďováním dostatečného množství sedimentu pro rutinní testování,

   — užití přísadami doplněného sedimentu umožňuje porovnání toxicity a odpovídající řazení látek.

6. Použité definice jsou uvedeny v dodatku 1.

▼M4

PODSTATA ZKOUŠKY

7. Larvy pakomárů v prvním instaru jsou vystaveny koncentračnímu rozmezí zkoušené chemické látky v systému sediment–voda. Zkoušená látka se vmíchá do sedimentu a následně jsou do zkušebních kádinek se stabilizovanou koncentrací sedimentu a vody nasazeny larvy prvního instaru. Na konci zkoušky se měří rychlost líhnutí a vývoje pakomárů. V případě potřeby lze po 10 dnech měřit rovněž přežití larev a jejich hmotnost (v případě potřeby lze použít další duplikátní vzorky). Tyto údaje se analyzují buď pomocí regresního modelu s cílem odhadnout koncentraci, která by způsobila x% snížení líhnutí nebo přežití či růstu larev (např. EC_{15}, EC_{50}, atd.), nebo s využitím testování statistických hypotéz pro stanovení NOEC/LOEC. Posledně uvedená metoda vyžaduje srovnání hodnoty účinku s kontrolními hodnotami pomocí statistických testů.

INFORMACE O ZKOUŠENÉ LÁTCE

8. Měla by být známa rozpustnost zkoušené chemické látky ve vodě, její tlak par, naměřená nebo vypočtená distribuce v sedimentu a stabilita ve vodě a sedimentu. Měla by být k dispozici spolehlivá analytická metoda pro kvantitativní stanovení zkoušené chemické látky ve vodě nad sedimentem, kapilární vodě a v sedimentu, a to se známou a doloženou přesností a mezí stanovitelnosti. Užitečné informace zahrnují strukturní vzorec a čistotu zkoušené chemické látky. Užitečnou informací je rovněž chemický osud zkoušené chemické látky (např. zánik, abiotický a biotický rozklad atd.). Další návod pro zkoušení látek s fyzikálně chemickými vlastnostmi, které činí jejich zkoušení obtížné, je uveden v položce seznamu literatury (12).

REFERENČNÍ CHEMICKÉ LÁTKY

9. Referenční chemické látky mohou být pravidelně kontrolovány pro ověření, že zkušební podmínky a protokol o zkoušce jsou spolehlivé. Příkladem referenčních toxických látek úspěšně použitých v mezilaboratorních zkouškách a validačních studiích jsou lindan, trifluralin, pentachlorfenol, chlorid kademnatý a chlorid draselný (1, 2, 5, 6, 13).

PLATNOST ZKOUŠKY

10. Aby byla zkouška platná, měly by být splněny tyto podmínky:

— vylíhnutí v kontrolních nádobách musí být na konci zkoušky nejméně 70 % (1, 6),

— k líhnutí dospělců *C. riparius* a *C. yoshimatsui* v kontrolních nádobách by mělo dojít mezi 12. a 23. dnem po jejich zavedení do nádob; pro *C. tentans* je nutná doba 20–65 dnů,

— na konci zkoušky se v každé nádobě změří pH a koncentrace rozpuštěného kyslíku. Koncentrace kyslíku by měla činit alespoň 60 procent hodnoty nasycení vzduchem (ASV) při použité teplotě a pH vody nad sedimentem by se mělo ve všech zkušebních nádobách pohybovat v rozmezí pH 6–9,

— teplota vody by se neměla lišit o více než ± 1,0 °C. Teplota vody může být řízena v izotermální místnosti a v tomto případě by měla být teplota v místnosti ve vhodném časovém intervalu potvrzována.

▼M4

POPIS METODY

Zkušební nádoby

11. Studie se provádí ve skleněných 600ml kádinkách o průměru 8 cm. Vhodné jsou i jiné nádoby, ale měly by zaručit odpovídající hloubku vody nad sedimentem a sedimentu. Plocha sedimentu by měla být dostatečná, aby poskytovala 2 až 3 cm^2 na larvu. Poměr hloubky sedimentu k hloubce vody nad sedimentem by měl být 1:4. Zkušební nádoby a další aparatura, která přichází do styku se zkušebním systémem, by měly být celé zhotoveny ze skla nebo z jiného chemicky inertního materiálu (např. z teflonu).

Výběr druhů

12. Při zkoušce má být přednostně užito druhu *Chironomus riparius*. Vhodný je i druh *Chironomus tentans*, avšak hůře se s ním manipuluje a vyžaduje i delší trvání zkoušky. Lze užít rovněž druh *Chironomus yohimatsui*. Podrobnosti o kultivačních metodách pro druh *Chironomus riparius* jsou uvedeny v dodatku 2. Informace o kultivačních podmínkách jsou k dispozici také pro jiné druhy, tj. *Chironomus tentans* (4) a *Chironomus yoshimatsui* (11). Identifikace druhu musí být potvrzena před zkouškou, ale není vyžadována před každou zkouškou, pokud organismy pocházejí z domácí kultury.

Sediment

13. Při zkoušce se doporučuje přednostně užívat přísadami doplněný sediment (nazývaný rovněž rekonstituovaný, artificiální nebo syntetický sediment). Pokud se však použije přírodní sediment, je potřeba ho charakterizovat (alespoň pH, obsah organického uhlíku a doporučuje se i stanovení dalších parametrů, jako je poměr C/N a zrnitost), a měl by být prost veškerého znečištění a dalších organismů, které by mohly pakomárům konkurovat nebo je konzumovat. Doporučuje se také přírodní sediment před použitím při zkoušce toxicity pro pakomáry kondicionovat po dobu sedmi dnů za stejných podmínek, které převládají v následující zkoušce. Pro použití v této zkoušce se doporučuje následující přísadami doplněný sediment založený na umělé půdě užité při zkušební metodě C.8 (14) (1, 15, 16):

a) 4–5 % (sušiny) rašeliny s pH co nejblíže 5,5 až 6,0; je důležité, aby byla ve formě prášku, jemně namletá (velikost částic ≤ 1 mm) a sušená výhradně na vzduchu;

b) 20 % (sušiny) kaolinitického jílu (pokud možno s více než 30 % kaolinitu);

c) 75–76 % (sušiny) křemenného písku (měl by převažovat jemný písek s více než 50 % částic velikosti 50 až 200 μm);

d) přidá se deionizovaná voda s cílem dosáhnout 30–50 % vlhkosti v konečné směsi;

e) přidá se chemicky čistý uhličitan vápenatý ($CaCO_3$) pro úpravu pH konečné směsi sedimentu na pH 7,0 ± 0,5. Obsah organického uhlíku v konečné směsi by měl být 2 % (± 0,5 %) a je třeba jej upravit použitím vhodného množství rašeliny a písku v souladu s písm. a) a c).

14. Rašelina, kaolinitický jíl a písek by měly pocházet ze známého zdroje. Jednotlivé složky sedimentu by měly být kontrolovány z hlediska nepřítomnosti chemické kontaminace (např. těžké kovy, chlorované organické sloučeniny, organofosforové sloučeniny atd.). Příklad přípravy přísadami doplněného sedimentu je popsán v dodatku 3. Přijatelné je i míchání suchých složek, pokud se prokáže, že po přidání vody nad sedimentem nedochází k separaci složek sedimentu (např. plovoucí částice rašeliny) a že rašelina nebo sediment jsou dostatečně kondicionovány.

▼M4

Voda

15. Pro tuto zkoušku je vhodná jakákoli voda, která vyhovuje chemickým charakteristikám přípustné ředicí vody uvedeným v dodatcích 2 a 4. Jakákoli vhodná voda, přírodní voda (povrchová nebo podzemní), rekonstituovaná voda (viz příloha 2) nebo odchlorovaná vodovodní voda je přijatelná jako kultivační a zkušební voda, pokud v ní pakomáři přežijí po dobu kultivace a zkoušení bez známek stresu. Na začátku zkoušky by se hodnota pH zkušební vody měla pohybovat mezi 6 a 9 a její celková tvrdost by neměla být vyšší než 400 mg/l $CaCO_3$. V případě, že je podezření na interakci mezi ionty způsobujícími tvrdost vody a zkoušenou látkou, měla by však být použita voda nižší tvrdosti (a proto v této situaci nelze použít Elendtovo médium M4). V průběhu celé studie by měl být užíván stejný typ vody. Charakteristiky jakosti vody uvedené v dodatku 4 by měly být měřeny nejméně dvakrát ročně, nebo pokud existuje podezření, že mohlo dojít k podstatné změně těchto vlastností.

Zásobní roztoky – obohacené sedimenty

16. Obohacené sedimenty zvolené koncentrace se obvykle připraví přidáním roztoku zkoušené chemické látky přímo do sedimentu. Zásobní roztok zkoušené chemické látky rozpuštěné v deionizované vodě se smísí s přísadami doplněným sedimentem pomocí krouživé míchačky, míchačky krmiv nebo ručním smícháním. Je-li zkoušená látka špatně rozpustná ve vodě, může být rozpuštěna v co nejmenším objemu vhodného organického rozpouštědla (např. hexanu, acetonu nebo chloroformu). Tento roztok se pak smísí s 10 g jemného křemičitého písku na jednu zkušební nádobu. Rozpouštědlo se nechá odpařit a musí být zcela odstraněno z písku, písek se pak smísí s vhodným množstvím usazenin na jednotlivé zkušební kádinky. K rozpuštění, dispergaci nebo emulgaci zkoušené chemické látky mohou být použita pouze činidla, která snadno vytěkají. Je třeba mít na paměti, že při přípravě sedimentu je nutno zohlednit písek ze zkoušené chemické látky a směsi písku (tj. při přípravě sedimentu by proto mělo být použito menší množství písku). Je třeba dbát, aby zkoušená látka přidaná do sedimentu byla v sedimentu důkladně a rovnoměrně rozložena. Pokud je to nutné, lze analyzovat dílčí vzorky za účelem stanovení stupně homogenity.

USPOŘÁDÁNÍ ZKOUŠKY

17. Uspořádáním zkoušky se rozumí výběr počtu zkušebních koncentrací a jejich odstupňování, počet nádrží pro každou koncentraci a počet larev v nádrži. Jsou popsána uspořádání pro odhad koncentrace vyvolávající účinek EC, pro odhad NOEC a pro provedení limitní zkoušky.

Uspořádání pro regresní analýzu

18. Koncentrace použité ve zkoušce musí v každém případě pokrývat koncentraci vyvolávající účinek (např. EC_{15}, EC_{50}) a rozsah koncentrací, při nichž dochází k účinku, který je předmětem zájmu. Obecně platí, že přesnost, a zejména platnost, s níž lze provést odhady koncentrace vyvolávající účinek (EC_x), se zvýší, pokud se daná koncentrace vyvolávající účinek nachází v rozmezí zkoušených koncentrací. Je třeba se vyhnout extrapolaci hluboko pod nejnižší pozitivní koncentrací nebo přesahující nejvyšší koncentraci. Předběžná orientační zkouška je užitečná pro výběr rozsahu koncentrací, které mají být použity (viz odstavec 27).

▼M4

19. V případě, že EC_x je třeba odhadnout, je třeba zkoušku provést alespoň v pěti koncentracích a třech opakováních pro každou koncentraci. V každém případě je vhodné, aby byly užity dostatečné zkušební koncentrace umožňující dobrý odhad modelu. Faktor mezi koncentracemi nesmí být větší než 2 (výjimku lze učinit v případech, kdy má křivka závislosti odezvy na dávce malý sklon). Počet opakování při každé expozici lze snížit, pokud se zvýší počet zkušebních koncentrací s různými odezvami. Zvýšení počtu opakování nebo snížení velikosti zkušebních koncentrací obvykle vede k zúžení intervalu spolehlivosti zkoušky. Pro odhad desetidenního přežití a růstu larev jsou nutná další opakování.

Uspořádání odhadu NOEC/LOEC

20. Pro odhad LOEC nebo NOEC se použije pět zkušebních koncentrací s nejméně čtyřmi opakováními a faktor mezi koncentracemi by neměl být vyšší než 2. Počet opakování by měl být dostatečný, aby zajistil odpovídající statistickou významnost, s jakou má být rozeznán 20 % rozdíl oproti kontrolnímu vzorku na 5 % hladině významnosti ($p = 0,05$). Pro rychlost vývoje je zpravidla vhodné použít analýzu rozptylu (ANOVA) jako například Dunnettův nebo Williamsův test (17, 18, 19, 20). Pro procento vylíhlých jedinců lze použít Cochranův-Armitageův test, Fisherův exaktní test (s Bonferroniho korekcí) nebo Mantelův-Haenszelův test.

Limitní zkouška

21. Limitní zkouška může být provedena (jedna zkušební koncentrace a kontrola), pokud nebyl zjištěn žádný dopad při předběžné orientační zkoušce. Účelem limitní zkoušky je provést zkoušku při dostatečně vysoké koncentraci umožňující osobám s rozhodovací pravomocí vyloučit možné toxické účinky zkoušené chemické látky a limit je stanoven v takové koncentraci, jejíž výskyt se v žádném případě nepředpokládá. Doporučená koncentrace je 1 000 mg/kg (sušiny). Obvykle je pro expozici i kontrolu zapotřebí alespoň šesti opakování. Počet opakování by měl být dostatečný, aby zajistil odpovídající statistickou významnost, s jakou má být rozeznán 20 % rozdíl oproti kontrolnímu vzorku na 5 % hladině významnosti ($p = 0,05$). S metrickou reakcí (rychlost vývoje a hmotnost), je t-test vhodnou statistickou metodou, pokud údaje splňují požadavky tohoto testu (normalita, homogenní rozptyly). Pokud tyto požadavky splněny nejsou, lze použít t-test nestejných rozptylů nebo neparametrický test, jako je například Wilcoxon-Mann-Whitneyův test. Pro procento vylíhlých jedinců je vhodný Fisherův exaktní test.

POSTUP

Podmínky expozice

Příprava systému obohacený sediment–voda

22. Pro aplikaci zkoušené chemické látky se doporučuje postup vmíchání popsaný ve zkušební metodě C.8: Toxicita pro žížaly (14). Obohacené sedimenty se umístí do nádob a přidá se voda nad sediment tak, aby vznikl objemový poměr vody a sedimentu 1:4 (viz odstavce 11 a 15). Hloubka vrstvy sedimentu by se měla pohybovat v rozmezí od 1,5 do 3 cm. Aby se zabránilo oddělení složek sedimentu a resuspenzi jemného materiálu v průběhu přidávání zkušební vody ve vodním sloupci, lze sediment přikrýt plastovým diskem, na který se voda nalije, a disk se bezprostředně poté vyjme. Mohou být vhodná i jiná zařízení.

23. Zkušební nádoby se přikryjí (například skleněnými víčky). Pokud je to nutné, v průběhu studie se hladina vody doplní na původní objem s cílem kompenzovat odpařování vody. K tomuto účelu by měla být použita destilovaná nebo deionizovaná voda, aby se zabránilo hromadění solí.

▼M4

Stabilizace

24. Jakmile je připraven obohacený sediment s vodou nad sedimentem, je žádoucí umožnit rozdělení zkoušené chemické látky z vodné fáze do sedimentu (3, 4, 6, 13). To by se mělo provádět pokud možno za stejných podmínek z hlediska teploty a provzdušňování, které byly použity při zkoušce. Vhodná rovnovážná doba je specifická pro konkrétní sediment a chemickou látku a může se pohybovat v řádu hodin až dní, zřídka až několika týdnů (4–5 týdnů). Vzhledem k tomu, že tato doba by umožnila rozklad mnoha chemických látek, není očekávána rovnováha, ale doporučuje se doba do ustavení rovnováhy v trvání 48 hodin. Na konci této další doby do ustavení rovnováhy by měla být změřena koncentrace zkoušené chemické látky ve vodě nad sedimentem, v kapilární vodě a v sedimentu, a to nejméně při nejvyšší koncentraci a při jedné nižší koncentraci (viz odstavec 38). Tato analytická stanovení zkoušené chemické látky umožňují výpočet hmotnostní bilance a vyjádření výsledků na základě naměřených koncentrací.

Přidání zkušebních organismů

25. Čtyři až pět dnů před přidáním zkušebních organismů do zkušebních nádob by měly být z kultur odebrány shluky vajíček a umístěny do malých nádob do kultivačního média. Lze použít starší médium ze zásobní kultury nebo čerstvě připravené médium. Pokud je použito čerstvé médium, mělo by být do kultivačního média přidáno malé množství potravy, např. zelené řasy a/nebo několik kapek filtrátu z jemně mleté suspenze vločkového krmiva pro ryby (viz dodatek 2). Měly by být použity pouze čerstvě nakladené shluky vajíček. Za normálních okolností se larvy začínají líhnout několik dní po nakladení vajíček (2 až 3 dny u *Chironomus riparius* při 20 °C a 1 až 4 dny u *Chironomus tentans* při 23 °C a *Chironomus yoshimatui* při 25 °C) a během larválního vývoje se vystřídají čtyři instary, z nichž každý trvá 4–8 dnů. Při zkoušce se použijí larvy prvního instarového stadia (2–3 nebo 1–4 dnů po vylíhnutí). Instar pakomárů lze případně zkontrolovat pomocí šířky hlavové kapsuly (6).

26. Dvacet larev prvního instaru se pomocí pipety bez špičky náhodně rozdělí do jednotlivých zkušebních nádob obsahujících obohacený sediment a vodu. Provzdušňování vody je nutné ukončit při přidání larev do zkušebních nádob a znovu ho zahájit nejdříve po uplynutí dalších 24 hodin po přidání larev (viz odstavce 25 a 32). Podle použitého uspořádání zkoušky (viz odstavce 19 a 20) je počet larev užitý na jednu koncentraci minimálně 60 pro odhad koncentrace vyvolávající účinek a 80 pro stanovení NOEC.

Zkušební koncentrace

27. Orientační zkouška může být užitečná pro stanovení rozsahu koncentrací pro vlastní zkoušku. K tomuto účelu jsou pakomáři exponováni řadě široce odstupňovaných koncentrací zkoušené chemické látky. S cílem zajistit stejnou hustotu povrchu na jednoho pakomára, která má být užita pro vlastní zkoušku, se pakomáři vystaví jednotlivým koncentracím zkoušené chemické látky po dobu, která umožňuje odhad vhodných zkušebních koncentrací; opakování nejsou vyžadována.

28. Zkušební koncentrace pro vlastní zkoušku jsou stanoveny podle výsledku zjištění předběžné orientační zkoušky. Mělo by být vybráno a použito nejméně pět koncentrací v souladu s popisem uvedeným v odstavcích 18 až 20.

▼M4

Kontroly

29. Při zkoušce se použijí kontrolní nádoby bez zkoušené chemické látky, avšak obsahující sediment, s příslušným počtem opakování (viz odstavce 19–20). Pokud bylo pro aplikaci zkoušené chemické látky použito rozpouštědlo (viz odstavec 16), bude přidána kontrola rozpouštědla v sedimentu.

Zkušební zařízení

30. Užívají se statické systémy. Ve výjimečných případech, jako například tehdy, pokud je specifikace kvality vody nevhodná pro růst zkušebního organismu nebo ovlivňuje chemickou rovnováhu (např. přílišný pokles úrovně rozpuštěného kyslíku, přílišné zvýšení koncentrace exkrementů nebo výluh minerálů ze sedimentů, který ovlivňuje pH a/nebo tvrdost vody) lze použít semistatické nebo průtokové systémy s přerušovanou nebo kontinuální obnovou vody nad sedimentem. Zpravidla však budou postačující a vhodnější jiné metody zvýšení jakosti vody nad sedimentem, jako je například provzdušňování.

Krmení

31. Larvy je třeba krmit optimálně denně nebo nejméně třikrát týdně. Jako dostatečná dávka pro mladé larvy po dobu prvních 10 dnů se jeví krmivo pro ryby (suspenze ve vodě nebo jemně rozmělněné krmivo, např. Tetra-Min nebo Tetra-Phyll, viz podrobnosti v dodatku 2) v množství 0,25 až 0,5 mg (0,35 až 0,5 mg pro *C. yoshimatui*) na larvu za den. Starší larvy mohou potřebovat o něco větší množství potravy: po zbývající dobu zkoušky by mělo dostačovat 0,5–1 mg na larvu denně. U všech expozic by se měl snížit přísun potravy a mělo by se kontrolovat, zda dochází k růstu plísní nebo je pozorována mortalita. Pokud není možné růst plísní zastavit, je nutno zkoušku opakovat. Při testování silně adsorbujících látek (např. log K_{ow} > 5) nebo látek s kovalentní vazbou na sediment lze dávku potravy nezbytnou pro zajištění přežití a přirozeného růstu organismů přidat do přísadami doplněného sedimentu před fází stabilizace. V takovém případě je nutno místo krmiva pro ryby použít rostlinný materiál, například přídavek 0,5 % (sušiny) jemně mletých listů např. kopřivy dvoudomé (*Urtica dioica*), morušovníku bílého (*Morus alba*), jetele plazivého (*Trifolium repens*), špenátu setého (*Spinacia oleracea*) nebo jiného rostlinného materiálu (*Cerophylu* nebo alfa-celulózy).

Inkubační podmínky

32. Voda nad sedimentem ve zkušebních nádobách se mírně provzdušňuje v optimálním případě 24 hodin po přidání larev a je sledována po celou dobu zkoušky (je třeba dbát, aby koncentrace rozpuštěného kyslíku neklesla pod 60 procent ASV). Provzdušňování se provádí pomocí skleněné Pasteurovy pipety upevněné 2–3 cm nad vrstvou sedimentu (tj. jedna nebo několik bublin/s). Při zkoušení těkavých chemických látek lze zvolit možnost systém sediment-voda neprovzdušňovat.

33. Zkouška se provádí při konstantní teplotě 20 °C (± 2 °C). Doporučená teplota pro *C. tentans* je 23 °C a pro *C. yoshimatui* 25 °C (± 2 °C). Fotoperioda je 16 hodin a intenzita světla by měla být 500 až 1 000 lux.

▼M4

Trvání expozice

34. Expozice je zahájena přidáním larev do obohacených a kontrolních nádob. Maximální délka trvání expozice je 28 dnů pro *C. riparius* a *C. yoshimatsui* a 65 dnů pro *C. tentans*. Pokud se pakomáři vylíhnou dříve, lze zkoušku ukončit po uplynutí nejméně pěti dnů od vylíhnutí posledního dospělce v kontrolní nádobě.

Pozorování

Líhnutí

35. Určí se čas potřebný pro vývoj a celkový počet plně vylíhlých samců a samic pakomárů. Samce lze snadno rozlišit podle vějířovitých tykadel.

36. Zkušební nádoby se kontrolují alespoň třikrát týdně s cílem vizuálně posoudit jakékoli neobvyklé chování (např. opouštění sedimentu, neobvyklé plavání) ve srovnání s kontrolními nádobami. Během období předpokládaného líhnutí je nutné denně počítat vylíhlé pakomáry. Pohlaví a počet plně vylíhlých pakomárů se denně zaznamenávají. Po identifikaci se pakomáři z nádob odstraní. Veškeré shluky vajíček nakladené před ukončením testu se zaznamenají a pak se odstraní, aby se zabránilo opětovnému zavlečení larev do sedimentu. Zaznamená se rovněž počet viditelných kukel, které se dosud nevylíhly. Pokyny pro měření líhnutí jsou uvedeny v dodatku 5.

Růst a přežívání

37. Pokud je nutné uvést údaje o desetidenním přežití a růstu larev, je třeba na počátku zkoušky přidat další zkušební nádoby tak, aby je bylo možné následně použít. Sediment z těchto dalších nádob se proseje za použití síta o velikosti 250 μm, které udrží larvy. Kritéria uhynutí jsou nepohyblivost nebo nedostatečná reakce na mechanické podněty. Larvy, které nejsou nalezeny, by měly být rovněž považovány za uhynulé (larvy uhynulé na počátku zkoušky mohly být již rozloženy mikroby). Stanoví se hmotnost sušiny (prosté popelovin) larev, které přežily, na zkušební nádobu a vypočte se průměrná individuální hmotnost sušiny na nádobu. Je vhodné určit, do kterého instaru přežívající larvy patří, pomocí změření šířky hlavové kapsuly každého jedince.

Analytická měření

Koncentrace zkoušené chemické látky

38. Před zahájením zkoušky (tj. přidáním larev), se alespoň z jedné nádoby na každou expozici odstraní souhrnné vzorky sedimentu za účelem analytického stanovení koncentrace zkoušené chemické látky v sedimentu. Doporučuje se, aby byly analyzovány minimálně vzorky vody nad sedimentem, kapilární vody a sedimentu na počátku (viz bod 24) a na konci zkoušky při nejvyšší koncentraci a jedné nižší koncentraci. Tato stanovení koncentrace zkoušené chemické látky poskytují informace o chování/distribuci zkoušené chemické látky v systému voda–sediment.

39. Při provádění průběžných měření (např. 7. den) a v případě, že jsou pro analýzu zapotřebí rozsáhlé vzorky, které nelze ze zkušebních nádob odebrat bez dopadu na zkušební systém, je potřeba provést analytická stanovení na vzorcích z dalších zkušebních nádob, s nimiž bylo zacházeno stejným způsobem (včetně přítomnosti zkušebních organismů), ale nebyly použity pro biologická pozorování.

▼M4

40. Doporučeným postupem izolace intersticiální vody je odstřeďování např. při 10 000 g a 4 °C po dobu 30 minut. Neadsorbuje-li se však zkoušená látka prokazatelně na filtry, je přijatelná i filtrace. V některých případech může být nemožné provést analýzu koncentrací v kapilární vodě vzhledem k tomu, že vzorek je příliš malý.

Fyzikálně-chemické parametry

41. pH a teplotu ve zkušebních nádobách je nutno měřit vhodným způsobem (viz odstavec 10). Tvrdost a obsah amoniaku by měly být měřeny v kontrolních nádobách a v jedné zkušební nádobě při nejvyšší koncentraci na počátku zkoušky a na jejím konci.

ÚDAJE A JEJICH PŘEDKLÁDÁNÍ

Zpracování výsledků

42. Účelem této zkoušky je stanovit účinek zkoušené chemické látky na rychlost vývoje a celkový počet plně vylíhlých samců a samic, pakomárů nebo v případě desetidenní zkoušky účinky na přežití a hmotnost larev. Pokud nejsou k dispozici žádné údaje o statistických rozdílech citlivosti mezi oběma pohlavími, lze výsledky pro samce a pro samice sloučit pro účely statistické analýzy. Rozdíly v citlivosti mezi pohlavími lze statisticky posoudit např. pomocí tabulkového $\chi^2 - r \times 2$ testu. Je-li vyžadováno stanovení přežití larev a průměru individuální sušiny na jednu nádobu, je nutno tak učinit po 10 dnech.

43. Koncentrace s pozorovanými účinky vyjádřené a vztažené k sušině se vypočtou přednostně na základě naměřených koncentrací sedimentu na počátku zkoušky (viz odstavec 38).

44. Pro výpočet bodového odhadu EC_{50} nebo jakékoli jiné hodnoty EC_x lze jako skutečné opakování použít statistiku na jednu nádobu. Při výpočtu intervalu spolehlivosti pro každý EC_x je nutno zohlednit variabilitu mezi jednotlivými nádobami, případně prokázat, že tato variabilita je tak nízká, že ji lze ignorovat. Je-li u modelu užita metoda nejmenších čtverců, je nutné u statistik jednotlivých nádob uplatnit transformaci za účelem homogenity rozptylu. Hodnoty EC_x je však třeba vypočítat až poté, co je reakce převedena zpět na původní hodnotu.

45. Pokud je cílem statistické analýzy stanovení hodnoty NOEC/LOEC testováním hypotéz, je nutno vzít v úvahu variabilitu mezi nádobami, například pomocí analýzy rozptylu ANOVA. Případně mohou být vhodnější robustnější testy (21) v případě, že dojde k porušení předpokladů obvykle užitých při analýze ANOVA.

Procento vylíhlých jedinců

46. Procenta vylíhlých jedinců jsou binární údaje a lze je analyzovat s použitím postupně klesajícího Cochranova-Armitageova testu, který předpokládá monotónní odezvu na dávku, a údaje jsou konzistentní s tímto očekáváním. V opačném případě lze použít Fisherův exaktní test nebo Mantelův-Haenszelův test s Bonferroniho-Holmovou korekcí p-hodnot. Pokud existují důkazy o větší variabilitě mezi replikacemi ve stejné koncentraci, pak by binomické rozdělení (často uváděné jako „extra-binomická“ variabilita) nasvědčovalo tomu, že je nutno použít robustní Cochranův-Armitageův test nebo Fisherův exaktní test, jak je navrhováno v odstavci (21).

▼**M4**

Určí se součet pakomárů vylíhlých v jedné nádobě ne a vydělí se počtem vložených larev na:

$$ER = \frac{n_e}{n_a}$$

kde:

ER = procento vylíhlých jedinců,

n_e = počet pakomárů vylíhlých v nádobě,

n_a = počet larev nasazených do nádoby.

47. Nejvhodnější alternativou pro rozsáhlé vzorky s extra binomickou variací je pojmout procento vylíhlých jedinců jako kontinuální odezvu a použít postupy, jako je například Williamsův test, pokud existuje předpoklad monotónní odezvy na dávku a je konzistentní s těmito daty ER. V případě nemonotónní odezvy by byl vhodný Dunnettův test. Rozsáhlý vzorek je zde definován situací, při níž jak počet vylíhlých jedinců, tak počet nevylíhlých jedinců přesáhnou v jednom duplikátním vzorku (nádobě) hodnotu pět.

48. Při použití metody ANOVA je nutno hodnoty ER nejprve transformovat (například druhou odmocninou funkce arcsin) nebo transformací podle Freemana-Tukeyho s cílem získat přibližné normální rozdělení údajů a vyrovnat odchylky. Při použití absolutních frekvencí lze použít test dle Cochrana-Armitage, Fisherův exaktní test (s Bonferroniho korekcí), nebo Mantelův-Haenszelův test. Transformace funkcí √arcsin se vypočte pomocí převrácené hodnoty sinu ($\sin^{-1}$) z odmocniny ER.

49. Pro procento vylíhlých jedinců se hodnoty EC_x vypočtou pomocí regresní analýzy (nebo např. pomocí modelu probit (22), logit, Weibull, vhodného komerčního softwaru atd.). V případě selhání regresní analýzy (např. v případě méně než dvou koncentrací s parciálními odezvami) se použijí další neparametrické metody, jako je například klouzavý průměr nebo prostá interpolace.

Rychlost vývoje

50. Průměrná doba vývoje představuje průměrné časové rozpětí mezi nasazením larev (den 0 zkoušky) a vylíhnutím experimentální kohorty pakomárů. (Pro výpočet skutečné doby vývoje by mělo být zohledněno stáří larev v okamžiku nasazení. Rychlost vývoje je převrácenou hodnotou doby vývoje (jednotka: 1/den) a představuje tu část larválního vývoje, která se odehraje za den. Rychlost vývoje je z hlediska hodnocení těchto studií toxicity sedimentů preferována před dobou vývoje vzhledem k její nižší variabilitě, vyšší homogenitě a vyšší blízkosti normálnímu rozdělení. Z tohoto důvodu mohou být použity silné parametrické zkušební postupy pro rychlost vývoje spíše než pro dobu vývoje. Pro rychlost vývoje jako kontinuální odezvu lze hodnoty EC_x stanovit odhadem pomocí regresní analýzy (např. (23), (24)).

51. U následujících statistických testů se má za to, že počet pakomárů pozorovaných v inspekčním dni × se vylíhl v průměru časového intervalu mezi dnem x a dnem x – l (l = délka intervalu mezi pozorováními, obvykle 1 den). Průměrná rychlost vývoje na nádobu (*x*) se vypočte podle vzorce:

$$\overline{x} = \sum_{i=1}^{m} \frac{f_i x_i}{n_e}$$

▼M4

kde:

$\bar{x}$: střední rychlost vývoje v kádince,

i: index intervalu mezi pozorováními,

m: počet všech intervalů mezi pozorováními,

f_i: počet vylíhlých jedinců během daného intervalu i mezi pozorováními,

n_e: počet vylíhlých jedinců celkem na konci pokusu $\sum f_i$,

x: rychlost vývoje larev vylíhlých v intervalu i,

$$x_i = \frac{1}{\left(den_i - \frac{l_i}{2}\right)}$$

kde:

den_i: den pozorování (ve dnech od aplikace),

l_i: délka intervalu mezi pozorováními (ve dnech, obvykle 1 den).

Protokol o zkoušce

52. Protokol o zkoušce musí obsahovat minimálně tyto údaje:

Zkoušená látka:

— fyzikální povahu a případně fyzikálně-chemické vlastnosti (rozpustnost ve vodě, tlak par, rozdělovací koeficient v půdě (případně v sedimentu), stabilita ve vodě atd.,

— chemické identifikační údaje (obecný název, chemický název, strukturní vzorec, číslo CAS atd.) včetně čistoty a analytické metody pro kvantitativní stanovení zkoušené látky.

Testovací druh:

— užitá pokusná zvířata: druh, vědecký název, zdroj organismů a podmínky množení,

— informace o nakládání se shluky vajíček a s larvami,

— stáří testovaných zvířat po nasazení do zkušebních nádob.

Zkušební podmínky:

— použitý sediment, tj. přírodní nebo přísadami doplněný sediment,

— u přírodního sedimentu lokalita a popis místa odběru sedimentu, pokud možno včetně dřívější kontaminace, charakteristiky: pH, obsah organického uhlíku, poměr C/N a zrnitost (je-li to vhodné),

— příprava přísadami doplněného sedimentu: složky a charakteristiky (obsah organického uhlíku, pH, vlhkost, atd. na začátku zkoušky),

— příprava zkušební vody (pokud se používá rekonstituovaná voda) a její charakteristiky (koncentrace kyslíku, pH, vodivost, tvrdost, atd. na začátku zkoušky),

— hloubka sedimentu a vody nad sedimentem,

— objem vody nad sedimentem a kapilární vody, hmotnost vlhkého sedimentu s kapilární vodou a bez ní,

▼M4

— zkušební nádoby (materiál a rozměry),

— způsob vmíchávání do sedimentu, použité zkušební koncentrace, počet duplikátních vzorků a případné použití rozpouštědla,

— stabilizace rovnovážné fáze obohaceného systému sediment/voda: trvání a podmínky,

— inkubační podmínky: teplota, cyklus a intenzita světla, provzdušňování (frekvence a intenzita),

— podrobnější informace o krmení včetně typu krmiva, přípravy, množství a režimu krmení.

Výsledky:

— nominální zkušební koncentrace, naměřené zkušební koncentrace a výsledky všech analýz pro stanovení koncentrace zkoušené chemické látky ve zkušební nádobě,

— jakost vody ve zkušebních nádobách, tj. pH, teplota, rozpuštěný kyslík, tvrdost a amoniak,

— případné nahrazování odpařené zkušební vody,

— počet vylíhlých samců a samic pakomárů na nádobu za den,

— počet larev, z nichž se nevylíhli dospělci, na nádobu,

— průměrná individuální hmotnost sušiny larev na nádobu a případně na instar,

— procento vylíhlých jedinců na duplikátní vzorek a zkušební koncentraci (směsný vzorek samců a samic pakomárů),

— průměrná rychlost vývoje plně vylíhlých pakomárů na duplikátní vzorek a aplikované množství (směsný vzorek samců a samic pakomárů),

— odhady koncových bodů toxicity, např. ECx (a související intervaly spolehlivosti), NOEC a/nebo LOEC a statistické metody použité k jejich stanovení,

— diskuse o výsledcích včetně případného vlivu na výsledek zkoušky v důsledku odchylek od této zkušební metody.

LITERATURA:

1) BBA (1995). Long-term toxicity test with Chironomus riparius: Development and validation of a new test system. Edited by M. Streloke and H.Köpp. Berlin 1995.

2) Fleming R *et al.* (1994). Sediment Toxicity Tests for Poorly Water-Soluble Substances. Final Report to them European Commission. Report No: EC 3738. August 1994. WRc, UK.

3) SETAC (1993). Guidance Document on Sediment toxicity Tests and Bioassays for Freshwater and Marine Environments. From the WOSTA Workshop held in the Netherlands.

4) ASTM International/E1706-00 (2002). Test Method for Measuring the Toxicity of Sediment-Associated Contaminants with Freshwater Invertebrates. pp 1125–1241. In ASTM International 2002 Annual Book of Standards. Volume 11.05. Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides. ASTM. International, West Conshohocken, PA.

5) Environment Canada (1997). Test for Growth and Survival in Sediment using Larvae of Freshwater Midges (*Chironomus tentans* or *Chironomus riparius*). Biological Test Method. Report SPE 1/RM/32. Prosinec 1997.

▼**M4**

6) US-EPA (2000). Methods for Measuring the Toxicity and Bioaccumulation of Sediment-associated Contaminants with Freshwater Invertebrates. Second edition. EPA 600/R-99/064. March 2000. Revision to the first edition dated June 1994.

7) US-EPA/OPPTS 850.1735. (1996): Whole Sediment Acute Toxicity Invertebrates.

8) US-EPA/OPPTS 850.1790. (1996): Chironomid Sediment toxicity Test.

9) Milani D, Day KE, McLeay DJ, and Kirby RS (1996). Recent intra- and inter-laboratory studies related to the development and standardisation of Environment Canada's biological test methods for measuring sediment toxicity using freshwater amphipods *(Hyalella azteca)* and midge larvae *(Chironomus riparius)*. Technical Report. Environment Canada. National Water Research Institute. Burlington, Ontario, Canada.

10) Sugaya Y (1997). Intra-specific variations of the susceptibility of insecticides *in Chironomus yoshimatsui*. Jp. J. Sanit. Zool. 48 (4): 345–350.

11) Kawai K (1986). Fundamental studies on Chironomid allergy. I. Culture methods of some Japanese Chironomids (Chironomidae, Diptera). Jp. J. Sanit. Zool. 37(1): 47–57.

12) OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 23.

13) Environment Canada (1995). Guidance Document on Measurement of Toxicity Test Precision Using Control Sediments Spiked with a Reference Toxicant. Report EPS 1/RM/30. September 1995.

14) Zkušební metoda C.8 této přílohy, Toxicita pro žížaly.

15) Suedel BC and JH Rodgers (1994). Development of formulated reference sediments for freshwater and estuarine sediment testing. Environ. Toxicol. Chem. 13: 1163–1175.

16) Naylor C and C Rodrigues (1995). Development of a test method for Chironomus riparius using a formulated sediment. Chemosphere 31: 3291–3303.

17) Dunnett CW (1964). A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. J. Amer. Statis. Assoc., 50: 1096–1121.

18) Dunnett CW (1964). New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics, 20: 482–491.

19) Williams DA (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics, 27: 103–117.

20) Williams DA (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics, 28: 510–531.

21) Rao JNK and Scott AJ (1992). A simple method for the analysis of clustered binary data. Biometrics 48: 577–585.

22) Christensen ER (1984). Dose-response functions in aquatic toxicity testing and the Weibull model. Water Research 18: 213–221.

23) Bruce and Versteeg (1992). A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. Environmental Toxicology and Chemistry 11: 1485–1494.

24) Slob W (2002). Dose-response modelling of continuous endpoints. Toxicol. Sci. 66: 298–312.

▼**M4**

Dodatek 1

DEFINICE

Pro účely této zkušební metody se použijí tyto definice:

Přísadami doplněný sediment nebo rekonstituovaný, umělý nebo syntetický sediment je směs materiálů užitá k napodobení fyzických složek přírodního sedimentu.

Voda nad sedimentem je voda nacházející se nad sedimentem ve zkušební nádobě.

Intersticiální voda nebo kapilární voda je voda zabírající prostor mezi sedimentem a částicemi půdy.

Obohacený sediment je sediment, do něhož byla přidána zkoušená látka.

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

▼M4

Dodatek 2

Doporučení pro kultivaci kultury *Chironomus riparius*

1. Larvy rodu *Chironomus* lze chovat v krystalizačních miskách nebo ve větších nádobách. Jemný křemičitý písek se rozprostře po dně nádoby v tenké vrstvě silné 5 až 10 mm. Bylo prokázáno, že substrátem vhodným jako podklad je také křemelina (např. Merck, čl. 8117), (dostačující je tenčí vrstva silná jen několik málo mm). Následně se přidá několikacentimetrová vrstva vhodné vody. Objem vody by se měl podle potřeby doplňovat s cílem nahradit ztráty vzniklé odpařováním a zabránit vysychání. Vodu lze v případě potřeby vyměnit. Je třeba zajistit mírné provzdušňování. Nádoby, v nichž jsou larvy chovány, by měly být umístěny ve vhodné kleci, která zabrání úniku líhnoucích se dospělců. Tato klec by měla být dostatečně velká, aby umožňovala rojení vylíhlých dospělců, jinak by nemuselo dojít k jejich páření (minimum je přibližně 30 × 30 × 30 cm).

2. Klece by měly být umístěny při pokojové teplotě nebo v místnosti s konstantní teplotou 20 ± 2 °C s fotoperiodou 16 hodin světlo (intenzity přibližně 1 000 lux) a 8 hodin tma. Bylo zjištěno, že vzdušná vlhkost nižší než 60 % RH může bránit rozmnožování.

Ředicí voda

3. Lze použít jakoukoli vhodnou přírodní nebo syntetickou vodu. Zpravidla se užívá studniční voda, odchlorovaná vodovodní voda a umělá média (např. Elendtovo médium „M4“ nebo „M7“, viz níže). Vodu je před použitím nutno provzdušnit. Je-li to nutné, lze kultivační vodu obnovit opatrným odlitím nebo odčerpáním použité vody z kultivačních nádob tak, aby nedošlo k poškození schránek larev.

Krmení larev

4. Larvy rodu *Chironomus* se krmí vločkovým krmivem pro ryby (TetraMin(®, Tetra Phyll® nebo jiná podobná značka patentovaného krmiva pro ryby), v množství přibližně 250 mg na nádobu a den. Potravu lze aplikovat v podobě suchého mletého prášku nebo v podobě suspenze ve vodě: 1,0 g vločkového krmiva se přidá do 20 ml ředicí vody a vytvoří se homogenní směs. Tento přípravek lze dodávat v množství přibližně 5 ml na nádobu na den (před použitím protřepat). Starším larvám lze přidat více krmiva.

5. Krmení se upraví podle kvality vody. V případě, že se kultivační médium „zakalí“, je třeba krmnou dávku snížit. Přidávání potravy je nutno pečlivě sledovat. Příliš malé množství krmiva způsobí, že larvy opouštějí sediment a vznášejí se ve vodním sloupci, a příliš mnoho krmiva způsobí zvýšenou mikrobiální činnost a pokles koncentrace kyslíku. Obojí může způsobit snížení rychlosti růstu.

6. Do nových kultivačních nádob mohou být přidány i buňky zelených řas (např. *Scenedesmus subspicatus*, *Chlorella vulgaris*).

Krmení vylíhlých dospělců

7. Někteří experimentátoři se domnívají, že jako potrava vylíhlých dospělců může sloužit vata namočená do nasyceného roztoku sacharózy.

▼M4

Líhnutí

8. Dospělci se začnou v chovných nádobách líhnout při teplotě 20 ± 2 °C přibližně po 13–15 dnech. Samce lze snadno rozlišit podle vějířovitých tykadel.

Shluky vajíček

9. Jakmile se ve snubní komůrce nacházejí dospělci, je třeba třikrát týdně kontrolovat všechny reprodukční nádoby, zda se v nich nacházejí shluky vajíček spojené želatinózní hmotou. Pokud se zde shluky vajíček nacházejí, je nutno je opatrně odstranit a přemístit do malé misky obsahující vzorek chovného vodního prostředí. Shluky vajíček se užijí pro založení nové nádoby s kulturou (např. 2–4 shluky vajíček na nádobu) nebo se užijí pro zkoušky toxicity.

10. Larvy prvního instarového stadia by se měly vylíhnout za 2–3 dny.

Zakládání nových kultivačních nádob

11. Jakmile jsou kultury založeny, mělo by být možné zakládat nové nádoby s kulturami larev jednou týdně nebo méně často v závislosti na zkušebních požadavcích a odstraňovat starší nádoby po vylíhnutí dospělců. Pomocí tohoto systému se zajistí pravidelné dodávky dospělců s minimální potřebou dohledu.

Příprava zkušebních roztoků „M4“ a „M7“

12. Elendt (1990) popsal médium „M4“. Médium „M7“ se připraví obdobně jako médium „M4“ s výjimkou látek uvedených v tabulce 1, u nichž jsou koncentrace u „M7“ čtyřikrát nižší než u „M4“. Připravuje se publikace o médiu „M7“ (Elendt, osobní sdělení). Podle Elendta a Biase (1990) by se zkušební roztok neměl připravovat pro koncentrace $NaSiO_3$ 5 H_2O, $NaNO_3$, KH_2PO_4 a K_2HPO_4 vzhledem k tomu, že nejsou pro přípravu zásobních roztoků vyhovující.

Příprava média „M7“

13. Každý zásobní roztok (I) se připraví samostatně a z těchto zásobních roztoků (I) se pak připraví kombinovaný zásobní roztok (II) (viz tabulka 1). Médium „M7“ se připraví přidáním 50 ml kombinovaného zásobního roztoku (II) a množství zásobního roztoku jednotlivých makroživin, které jsou uvedeny v tabulce 2, do 1 litru deionizované vody. Připraví se vitaminový zásobní roztok přidáním tří vitaminů do deionizované vody, jak je uvedeno v tabulce 3, a 0,1 ml kombinovaného vitaminového zásobního roztoku se přidá do výsledného média „M7“ krátce před použitím. (Vitaminový zásobní roztok se uskladňuje zmrazený v malých alikvotních dílech.) Médium se provzdušní a stabilizuje.

LITERATURA:

BBA (1995). Long-term toxicity test with *Chironomus riparius*: Development and validation of a new test system. Edited by M. Streloke and H.Köpp. Berlin 1995.

▼**M4**

Tabulka 1

Zásobní roztoky stopových prvků pro médium M4 a M7

Zásobní roztoky (I)	Množství (mg) doplněné na 1 litr deionizované vody	Kombinovaný zásobní roztok (II) se připraví smícháním následujících množství (v ml) zásobních roztoků (I) a doplněním na 1 litr deionizované vody		Konečné koncentrace ve zkušebním roztoku (mg/l)	
		M4	M7	M4	M7
H_3BO_3 (1)	57 190	1,0	0,25	2,86	0,715
$MnCl_2 \cdot 4\ H_2O$ (1)	7 210	1,0	0,25	0,361	0,090
LiCl (1)	6 120	1,0	0,25	0,306	0,077
RbCl (1)	1 420	1,0	0,25	0,071	0,018
$SrCl_2 \cdot 6\ H_2O$ (1)	3 040	1,0	0,25	0,152	0,038
NaBr (1)	320	1,0	0,25	0,016	0,004
$Na_2MoO_4 \cdot 2\ H_2O$ (1)	1 260	1,0	0,25	0,063	0,016
$CuCl_2 \cdot 2\ H_2O$ (1)	335	1,0	0,25	0,017	0,004
$ZnCl_2$	260	1,0	1,0	0,013	0,013
$CaCl_2 \cdot 6\ H_2O$	200	1,0	1,0	0,010	0,010
KI	65	1,0	1,0	0,0033	0,0033
Na_2SeO_3	43,8	1,0	1,0	0,0022	0,0022
NH_4VO_3	11,5	1,0	1,0	0,00058	0,00058
$Na_2EDTA \cdot 2\ H_2O$ (1) (2)	5 000	20,0	5,0	2,5	0,625
$FeSO_4 \cdot 7\ H_2O$ (1) (2)	1 991	20,0	5,0	1,0	0,249

(1) Tyto chemické látky se u M4 a M7 liší, jak je uvedeno výše.
(2) Tyto roztoky se připravují samostatně, spojí se a ihned se zpracují v autoklávu.

Tabulka 2

Zásobní roztoky makroživin pro médium M4 a M7

	Množství doplněné na 1 litr deionizované vody (mg)	Množství zásobních roztoků makroživin přidané za účelem přípravy média M4 a M7 (ml/l)	Konečné koncentrace ve zkušebním roztoku M4 a M7 (mg/l)
$CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$	293 800	1,0	293,8
$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$	246 600	0,5	123,3
KCl	58 000	0,1	5,8
$NaHCO_3$	64 800	1,0	64,8
$NaSiO_3 \cdot 9\ H_2O$	50 000	0,2	10,0
$NaNO_3$	2 740	0,1	0,274
KH_2PO_4	1 430	0,1	0,143
K_2HPO_4	1 840	0,1	0,184

▼**M4**

Tabulka 3

Vitaminový zásobní roztok pro médium M4 a M7. Všechny tři vitaminové roztoky se smísí do jediného vitaminového zásobního roztoku

	Množství doplněné na 1 litr deionizované vody (mg)	Množství vitaminového zásobního roztoku přidané za účelem přípravy média M4 a M7 (ml/l)	Konečné koncentrace ve zkušebním roztoku M4 a M7 (mg/l)
Thiaminhydrochlorid	750	0,1	0,075
Kyanokobalamin (B12)	10	0,1	0,0010
Biotin	7,5	0,1	0,00075

LITERATURA:

Elendt, B.P. (1990). Selenium Deficiency in Crustacean. *Protoplasma* 154: 25–33.

Elendt, B.P. & W.-R. Bias (1990). Trace Nutrient Deficiency in *Daphnia magna* Cultured in Standard Medium for Toxicity Testing. Effects on the Optimization of Culture Conditions on Life History Parameters of *D. magna*. *Water Research* 24 (9): 1157–1167.

▼M4

Dodatek 3

PŘÍPRAVA PŘÍSADAMI DOPLNĚNÉHO SEDIMENTU

Složení sedimentu

Složení přísadami doplněného sedimentu by mělo být následující:

Složka	Charakteristika	% sušiny sedimentu
Rašelina:	rašelina mechu Sphagnum s pH co nejblíže 5,5 až 6,0, bez viditelných zbytků rostlin a jemně mletá (velikost částic ≤ 1 mm) a vysušená na vzduchu	4–5
Křemičitý písek	velikost zrn: > 50 % částic musí být v rozpětí 50–200 μm	75–76
Kaolinitický jíl	obsah kaolinitu ≥ 30 %	20
Organický uhlík	upraven přidáním rašeliny a písku	2 (± 0,5)
Uhličitan vápenatý	$CaCO_3$, práškový, chemicky čistý	0,05–0,1
Voda	vodivost ≤ 10 μS/cm	30–50

Příprava

Rašelina se usuší na vzduchu a rozemele se na jemný prášek. Připraví se suspenze požadovaného množství rašelinného prášku v deionizované vodě s použitím vysoce výkonného homogenizačního zařízení. pH této suspenze se upraví na 5,5 ± 0,5 pomocí $CaCO_3$. Suspenze se kondicionuje po dobu nejméně dvou dní za mírného promíchávání při 20 ±2° C za účelem stabilizace pH a vytvoření stabilní mikrobiální složky. Poté se opět změří pH, které by se mělo rovnat 6,0 ± 0,5. Pak se suspenze rašeliny smísí s ostatními složkami (písek a kaolín) a s deionizovanou vodou s cílem získat homogenní sediment s obsahem vody v rozmezí 30–50 procent sušiny sedimentu. Znovu se změří pH konečné směsi a v případě nutnosti je opět upraveno pomocí $CaCO_3$ na hodnotu 6,5 až 7,5. Odeberou se vzorky sedimentu pro stanovení obsahu sušiny a obsahu organického uhlíku. Následně se doporučuje před použitím pro zkoušku toxicity pro pakomáry přísadami doplněný sediment kondicionovat po dobu sedmi dnů za stejných podmínek, které převládají v následné zkoušce.

Skladování

Suché složky pro přípravu umělého sedimentu lze skladovat na suchém a chladném místě při pokojové teplotě. Přísadami doplněný (mokrý) sediment by neměl být před použitím ve zkoušce skladován. Měl by být použit ihned po uplynutí sedmidenního období kondicionování, kterým končí jeho příprava.

LITERATURA:

Kapitola C.8 této přílohy. Toxicita pro žížaly.

Meller M, Egeler P, Rombke J, Schallnass H, Nagel R, Streit B (1998). Short-term Toxicity of Lindane, Hexachlorobenzene and Copper Sulfate on Tubificid Sludgeworms (Oligochaeta) in Artificial Media. Ecotox. and Environ. Safety 39: 10–20.

▼**M4**

Dodatek 4

Chemické charakteristiky přípustné ředicí vody

Látka	Koncentrace
Částice tuhé	< 20 mg/l
Celkový obsah organického uhlíku	< 2 mg/l
Neionizovaný amoniak	< 1 μg/l
Tvrdost jako $CaCO_3$	< 400 mg/l (*)
Zbytkový chlor	< 10 μg/l
Celkové organické fosforové pesticidy	< 50 ng/l
Celkové organické chlorové pesticidy a polychlorované bifenyly	< 50 ng/l
Celkový organický chlor	< 25 ng/l

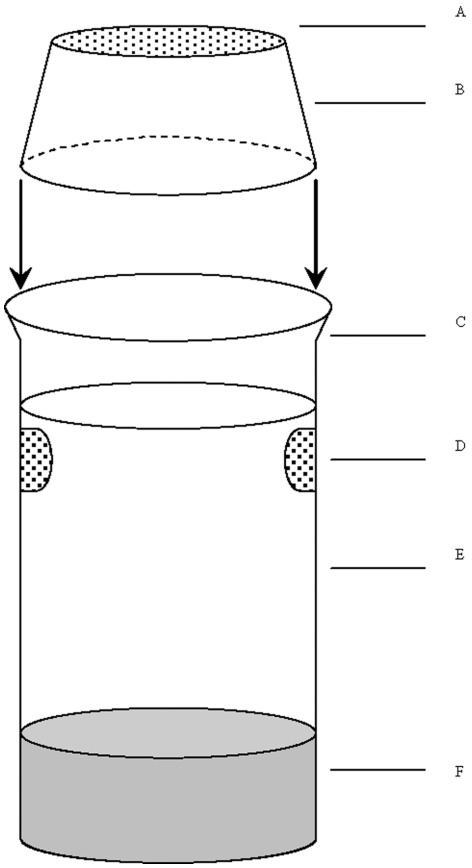
(*) Je však třeba poznamenat, že v případě, že je podezření na interakci mezi ionty způsobujícími tvrdost vody a zkoušenou látkou, by měla být použita voda nižší tvrdosti (a proto v této situaci nesmí být použito Elendtovo médium M4).

▼**M4**

Dodatek 5

Pokyny pro monitorování líhnutí larev pakomárů

Na zkušební kádinky jsou umístěny výletové pasti. Tyto pasti jsou potřebné od 20. dne až do konce zkoušky. Níže je nakreslen příklad používané pasti:



A: nylonová síťka

B: plastový kryt

C: kádinka bez zobáčku

D: otvory na výměnu vody

E: voda

F: sediment

▼M4

C.28 TEST TOXICITY NA CHIRONOMIDAE V SYSTÉMU SEDIMENT–VODA ZA POUŽITÍ OBOHACENÉ VODY

ÚVOD

1. Tato zkušební metoda odpovídá pokynu OECD pro zkoušení (TG) 219 (2004). Tato zkušební metoda je určena k posouzení účinků dlouhodobé expozice larev sladkovodních pakomárů *Chironomus* sp. žijících v sedimentu chemickým látkám. Je založena především na pokynu BBA s užitím zkušebního systému sediment-voda s umělou půdou a scénáře expozice vodního sloupce (1). Zohledňuje rovněž stávající protokoly o zkouškách toxicity pro *Chironomus riparius* a *Chironomus tentans*, které byly vyvinuty v Evropě a Severní Americe a (2, 3, 4, 5, 6, 7, 8) a zkoušeny v mezilaboratorních porovnávacích zkouškách (1, 6, 9). Lze užít rovněž další dobře zdokumentované druhy pakomárů, jako například *Chironomus yoshimatsui* (10, 11).

2. Scénář expozice užitý při této zkušební metodě spočívá v obohacení vody. Výběr vhodného scénáře expozice závisí na zamýšleném použití testu. Účelem scénáře expozice vody, který zahrnuje obohacení vodního sloupce, je simulovat rozprášení pesticidního postřiku a zahrnuje počáteční maximální koncentrace v kapilární vodě. Je vhodný také pro jiné druhy expozic (včetně úniků chemikálií) s výjimkou akumulačních procesů, jejichž délka přesahuje trvání zkušebního období.

3. Látky, které je třeba testovat z hlediska organismů žijících v sedimentu, v této složce obvykle přetrvávají po dlouhá časová období. Expozici organismů žijících v sedimentu lze zajistit celou řadou možných cest. Relativní význam jednotlivých cest, jimiž dochází k expozici, a doba nezbytná k tomu, aby každá z nich přispěla k celkovým toxickým účinkům, je závislá na fyzikálně chemických vlastnostech dotčené chemické látky. V případě silně adsorbujících látek (např. log K_{ow} > 5) nebo pro chemické látky s kovalentní vazbou na sediment může být významnou expoziční cestou požití kontaminované potravy. Aby nedošlo k podcenění toxicity vysoce lipofilních látek, lze zvážit užití potravy přidané do sedimentu před aplikací zkoušené chemické látky. Aby bylo možné zohlednit všechny potenciální způsoby expozice, zaměřuje se tato zkušební metoda na dlouhodobou expozici. Délka trvání zkoušky se pohybuje v rozmezí 20–28 dní pro *C. riparius* and *C. yoshimatsui* a 28–65 dní pro *C. tentans*. Pokud jsou pro konkrétní účel, například pro studium účinků nestabilní chemické látky, potřebné krátkodobé údaje, mohou být další duplikátní vzorky po deseti dnech odstraněny.

4. Měřené výsledné účinky se rovnají celkovému počtu vylíhlých dospělců a času do vylíhnutí. Pokud jsou nezbytné další krátkodobé údaje, doporučuje se provádět měření přežití a růstu larev až po uplynutí desetidenního období, podle potřeby s využitím dalších duplikátních vzorků.

5. Doporučuje se použití přísadami doplněného sedimentu. Přísadami doplněný sediment má několik výhod oproti přírodním sedimentům:

   — jeho experimentální variabilita je snížena, protože tvoří reprodukovatelnou „standardizovanou matrici“, a odpadá potřeba hledat zdroje nekontaminovaného čistého sedimentu,

   — zkoušky lze zahájit kdykoliv, aniž by bylo nutné čelit sezónním výkyvům zkušebního sedimentu, a sediment není třeba předem upravit s cílem odstranit původní živočichy; užití přísadami doplněného sedimentu také snižuje náklady spojené s terénním shromažďováním dostatečného množství sedimentu pro rutinní testování,

▼M4

— užití přísadami doplněného sedimentu umožňuje porovnání toxicity a odpovídající řazení látek; údaje o toxicitě ze zkoušek s přírodními a umělými sedimenty byly pro více látek porovnatelné (2).

6. Použité definice jsou uvedeny v dodatku 1.

PODSTATA ZKOUŠKY

7. Larvy pakomárů jsou během prvního instaru vystaveny koncentračnímu rozmezí zkoušené chemické látky v systému sediment-voda. Zkouška začíná tím, že se larvy prvního instaru nasadí do zkušebních kádinek obsahujících systém sediment-voda a voda se následně obohatí zkoušenou látkou. Na konci zkoušky se měří počet vylíhnutí a rychlost vývoje pakomárů. V případě potřeby lze po 10 dnech měřit rovněž přežití larev a jejich hmotnost (v případě potřeby lze použít další duplikátní vzorky). Tyto údaje se analyzují buď pomocí regresního modelu s cílem odhadnout koncentraci, která by způsobila x% snížení líhnutí nebo přežití či růstu larev (např. EC_{15}, EC_{50}, atd.), nebo s využitím testování statistických hypotéz pro stanovení NOEC/LOEC. Posledně uvedená metoda vyžaduje srovnání hodnoty účinku s kontrolními hodnotami pomocí statistických testů.

INFORMACE O ZKOUŠENÉ LÁTCE

8. Měla by být známa rozpustnost zkoušené chemické látky ve vodě, její tlak par, naměřená nebo vypočtená distribuce v sedimentu a stabilita ve vodě a sedimentu. Měla by být k dispozici spolehlivá analytická metoda pro kvantitativní stanovení zkoušené chemické látky ve vodě nad sedimentem, kapilární vodě a v sedimentu, a to se známou a doloženou přesností a mezí stanovitelnosti. Užitečné informace zahrnují strukturní vzorec a čistotu zkoušené chemické látky. Užitečnou informací je rovněž chemický osud zkoušené chemické látky (např. zánik, abiotický a biotický rozklad atd.) Další návod pro zkoušení látek s fyzikálně chemickými vlastnostmi, které činí jejich zkoušení obtížné, je uveden v odstavci (12).

REFERENČNÍ CHEMICKÉ LÁTKY

9. Referenční chemické látky mohou být pravidelně kontrolovány pro ověření, že zkušební podmínky a protokol o zkoušce jsou spolehlivé. Příkladem referenčních toxických látek úspěšně použitých v mezilaboratorních zkouškách a validačních studiích jsou lindan, trifluralin, pentachlorfenol, chlorid kademnatý a chlorid draselný (1, 2, 5, 6, 13).

PLATNOST ZKOUŠKY

10. Aby byla zkouška platná, měly by být splněny tyto podmínky:

— vylíhnutí v kontrolních nádobách musí být na konci zkoušky nejméně 70 % (1, 6),

— k líhnutí dospělců *C. riparius* and *C. yoshimatsui* v kontrolních nádobách by mělo dojít mezi 12. a 23. dnem po jejich zavedení do nádob; pro *C. tentans* je nutná doba 20–65 dnů,

— na konci zkoušky se v každé nádobě změří pH a koncentrace rozpuštěného kyslíku. Koncentrace kyslíku by měla činit alespoň 60 procent hodnoty nasycení vzduchem (ASV), při použité teplotě, a pH vody nad sedimentem by se mělo ve všech zkušebních nádobách pohybovat v rozmezí pH 6–9,

▼M4

— teplota vody by se neměla lišit o více než ± 1,0 °C. Teplota vody může být řízena v izotermální místnosti a v tomto případě by měla být teplota v místnosti ve vhodném časovém intervalu potvrzována.

POPIS METODY

Zkušební nádoby

11. Studie se provádí ve skleněných 600ml kádinkách o průměru 8 cm. Vhodné jsou i jiné nádoby, ale měly by zaručit odpovídající hloubku vody nad sedimentem a sedimentu. Plocha sedimentu by měla být dostatečná, aby poskytovala 2 až 3 cm^2 na larvu. Poměr hloubky sedimentu k hloubce vody nad sedimentem by měl být 1:4. Zkušební nádoby a další aparatura, která přichází do styku se zkušebním systémem, by měly být celé zhotoveny ze skla nebo z jiného chemicky inertního materiálu (např. z teflonu).

Výběr druhů

12. Při zkoušce má být přednostně užito druhu *Chironomus riparius*. Vhodný je i druh *Chironomus tentans*, avšak hůře se s ním manipuluje a vyžaduje i delší trvání zkoušky. Lze užít rovněž druh *Chironomus yohimatsui*. Podrobnosti o kultivačních metodách pro druh *Chironomus riparius* jsou uvedeny v dodatku 2. Informace o kultivačních podmínkách jsou k dispozici také pro jiné druhy, tj. *Chironomus tentans* (4) a *Chironomus yoshimatsui* (11). Identifikace druhu musí být potvrzena před zkouškou, ale není vyžadována před každou zkouškou, pokud organismy pocházejí z domácí kultury.

Sediment

13. Doporučuje se přednostně užívat přísadami doplněný sediment (nazývaný rovněž rekonstituovaný, umělý nebo syntetický sediment). Pokud se však použije přírodní sediment, je potřeba ho charakterizovat (alespoň pH, obsah organického uhlíku a doporučuje se i stanovení dalších parametrů, jako je poměr C/N a zrnitost) a měl by být prost veškerého znečištění a dalších organismů, které by mohly pakomárům konkurovat nebo je konzumovat. Doporučuje se také přírodní sediment před použitím při zkoušce toxicity pro pakomáry kondicionovat po dobu sedmi dnů za stejných podmínek, které převládají v následující zkoušce. Pro použití v této zkoušce se doporučuje následující přísadami doplněný sediment založený na umělé půdě užité při zkušební metodě C.8 (14) (1, 15, 16):

a) 4–5 % (sušiny) rašeliny s pH co nejblíže 5,5 až 6,0; ve formě prášku, jemně namletá (velikost částic ≤ 1 mm) a vysušená výhradně na vzduchu;

b) 20 % (sušiny) kaolinitického jílu (pokud možno s více než 30 % kaolinitu);

c) 75–76 % (sušiny) křemenného písku (měl by převažovat jemný písek s více než 50 % částic velikosti 50 až 200 μm);

d) přidá se deionizovaná voda s cílem dosáhnout 30–50 % vlhkosti v konečné směsi;

e) přidá se chemicky čistý uhličitan vápenatý ($CaCO_3$) pro úpravu pH konečné směsi sedimentu na pH 7,0 ± 0,5;

f) obsah organického uhlíku v konečné směsi by měl být 2 % (± 0,5 %) a je třeba jej upravit použitím vhodného množství rašeliny a písku v souladu s písm. a) a c).

▼M4

14. Rašelina, kaolinitický jíl a písek by měly pocházet ze známého zdroje. Jednotlivé složky sedimentu by měly být kontrolovány z hlediska nepřítomnosti chemické kontaminace (např. těžké kovy, chlorované organické sloučeniny, organofosforové sloučeniny atd.). Příklad přípravy přísadami doplněného sedimentu je popsán v dodatku 3. Přijatelné je i míchání suchých složek, pokud se prokáže, že po přidání vody nad sedimentem nedochází k separaci složek sedimentu (např. vyplavování částic rašeliny) a že rašelina nebo sediment jsou dostatečně kondicionovány.

Voda

15. Pro tuto zkoušku je vhodná jakákoli voda, která vyhovuje chemickým charakteristikám přípustné ředicí vody uvedeným v dodatcích 2 a 4. Jakákoli vhodná voda, přírodní voda (povrchová nebo podzemní), rekonstituovaná voda (viz příloha 2) nebo odchlorovaná vodovodní voda je přijatelná jako kultivační a zkušební voda, pokud v ní pakomáři přežijí po dobu kultivace a zkoušení bez známek stresu. Na začátku zkoušky by se hodnota pH zkušební vody měla pohybovat mezi 6 a 9 a její celková tvrdost by neměla být vyšší než 400 mg/l $CaCO_3$. V případě, že je podezření na interakci mezi ionty způsobujícími tvrdost vody a zkoušenou látkou, měla by však být použita voda nižší tvrdosti (a proto se v této situaci nesmí použít Elendtovo médium M4). V průběhu celé studie by měl být užíván stejný typ vody. Charakteristiky jakosti vody uvedené v dodatku 4 by měly být měřeny nejméně dvakrát ročně, nebo pokud existuje podezření, že mohlo dojít k podstatné změně těchto vlastností.

Zásobní roztoky – obohacená voda

16. Zkušební koncentrace se vypočtou na základě koncentrace vodního sloupce, tj. vody nad sedimentem. Zkušební roztoky zvolené koncentrace jsou obvykle připraveny ředěním zásobního roztoku. Zásobní roztoky by měly být připraveny přednostně rozpuštěním zkoušené látky ve zřeďovací vodě. Použití rozpouštědel nebo dispergátorů může být v některých případech pro vytvoření zásobního roztoku o vhodné koncentraci nezbytné. Ke vhodným rozpouštědlům patří aceton, ethanol, methanol, ethylenglykol-monoethylether, ethylenglykol-dimethylether, dimethylformamid a triethylenglykol. Disperzní činidla, která mohou být použita, jsou Cremophor RH40, Tween 80, 0,01 % methylcelulosa a HCO-40. Koncentrace solubilizačního činidla v konečném zkušebním médiu by měla být minimální (tj. ≤ 0,1 ml/l) a měla by být u všech expozic stejná. Je-li použito solubilizační činidlo, nesmí mít významné účinky na přežití ani viditelné nepříznivé účinky na larvy *Chironomidae*, což musí být prokázáno na kontrolní skupině vystavené pouze rozpouštědlu. Měla by však být vynaložena maximální snaha takové chemické látky nepoužívat.

USPOŘÁDÁNÍ ZKOUŠKY

17. Uspořádáním zkoušky se rozumí výběr počtu zkušebních koncentrací a jejich odstupňování, počet nádrží pro každou koncentraci a počet larev v nádrži. Jsou popsána uspořádání pro odhad koncentrace vyvolávající účinek EC, odhad NOEC a pro provedení limitní zkoušky. Regresní analýze se dává přednost před testováním hypotéz.

Uspořádání pro regresní analýzu

18. Koncentrace použité ve zkoušce musí v každém případě pokrývat koncentraci vyvolávající účinek (např. EC_{15}, EC_{50}) a rozsah koncentrací, při nichž dochází k účinku, který je předmětem zájmu. Obecně platí, že přesnost, a zejména platnost, s níž lze provést odhady koncentrace vyvolávající účinek (EC_x), se zvýší, pokud se daná koncentrace vyvolávající účinek nachází

▼M4

v rozmezí zkoušených koncentrací. Je třeba se vyhnout extrapolaci hluboko pod nejnižší pozitivní koncentrací nebo přesahující nejvyšší koncentraci. Předběžná orientační zkouška je užitečná pro výběr rozsahu koncentrací, které mají být použity (viz odstavec 27).

19. V případě, že ECx je třeba odhadnout, je třeba zkoušku provést alespoň v pěti koncentracích a třech opakováních pro každou koncentraci. V každém případě je vhodné, aby byly užity dostatečné zkušební koncentrace umožňující dobrý odhad modelu. Faktor mezi koncentracemi nesmí být větší než 2 (výjimku lze učinit v případech, kdy má křivka závislosti odezvy na dávce malý sklon). Počet opakování při každé expozici lze snížit, pokud se zvýší počet zkušebních koncentrací s různými odezvami. Zvýšení počtu opakování nebo zúžení rozsahu zkušebních koncentrací obvykle vede k zúžení intervalu spolehlivosti zkoušky. Pro odhad desetidenního přežití a růstu larev jsou nutná další opakování.

Uspořádání odhadu NOEC/LOEC

20. Pro odhad LOEC/NOEC se použije pět zkušebních koncentrací s nejméně čtyřmi opakováními a faktor mezi koncentracemi by neměl být vyšší než 2. Počet opakování by měl být dostatečný, aby zajistil odpovídající statistickou významnost, s jakou má být rozeznán 20 % rozdíl oproti kontrolnímu vzorku na 5 % hladině významnosti (p = 0,05). Pro rychlost vývoje je zpravidla vhodné použít analýzu rozptylu (ANOVA), jako například Dunnettův nebo Williamsův test (17, 18, 19, 20). Pro procento vylíhlých jedinců lze použít Cochranův-Armitageův test, Fisherův exaktní test (s Bonferroniho korekcí) nebo Mantelův-Haenszelův test.

Limitní zkouška

21. Limitní zkouška může být provedena (jedna zkušební koncentrace a kontrola), pokud nebyl zjištěn žádný dopad při předběžné orientační zkoušce. Účelem limitní zkoušky je určit, že hodnota toxicity zkoušené látky je vyšší než zkoušený koncentrační limit. V této zkušební metodě nelze navrhnout doporučenou koncentraci: její stanovení je ponecháno na úsudku osob s rozhodovací pravomocí. Obvykle je pro expozici i kontrolu zapotřebí alespoň šesti opakování. Počet opakování by měl být dostatečný, aby zajistil odpovídající statistickou významnost, s jakou má být rozeznán 20 % rozdíl oproti kontrolnímu vzorku na 5 % hladině významnosti (p = 0,05). S metrickou reakcí (rychlost vývoje a hmotnost), je t-test vhodnou statistickou metodou, pokud údaje splňují požadavky tohoto testu (normalita, homogenní rozptyly). Pokud tyto požadavky splněny nejsou, lze použít t-test nestejných rozptylů nebo neparametrický test, jako je například Wilcoxon-Mann-Whitneyův test. Pro procento vylíhlých jedinců je vhodný Fisherův exaktní test.

POSTUP

Podmínky expozice

Příprava systému obohacená voda–sediment

22. Do zkušebních nádob se přidá vhodné množství přísadami doplněného sedimentu (viz odstavce 13–14 a dodatek 3) tak, aby tvořil vrstvu o hloubce nejméně 1,5 cm. Přidá se voda do hloubky 6 cm (viz odstavec 15). Poměr vrstvy sedimentu a hloubky vody by neměl překročit 1:4 a vrstva sedimentu by neměla být hlubší než 3 cm. Systém sediment–voda se před přidáním zkušebních organismů (viz odstavec 14 a dodatek 3). mírně provzdušňuje po dobu sedmi týdnů. Aby se zabránilo oddělení složek sedimentu a resuspenzi jemného materiálu v průběhu přidávání zkušební vody ve vodním sloupci, lze sediment přikrýt plastovým diskem, na který se voda nalije a disk se bezprostředně poté vyjme. Mohou být vhodná i jiná zařízení.

▼M4

23. Zkušební nádoby se přikryjí (například skleněnými víčky). Pokud je to nutné, v průběhu studie se hladina vody doplní na původní objem s cílem kompenzovat odpařování vody. K tomuto účelu by měla být použita destilovaná nebo deionizovaná voda, aby se zabránilo hromadění solí.

Přidání zkušebních organismů

24. Čtyři až pět dnů před přidáním zkušebních organismů do zkušebních nádob by měly být z kultur odebrány shluky vajíček a umístěny do malých nádob do kultivačního média. Lze použít starší médium ze zásobní kultury nebo čerstvě připravené médium. Pokud je použito čerstvé médium, mělo by být do kultivačního média přidáno malé množství potravy, např. zelené řasy a/nebo několik kapek filtrátu z jemně mleté suspenze vločkového krmiva pro ryby (viz dodatek 2). Měly by být použity pouze čerstvě nakladené shluky vajíček. Za normálních okolností se larvy začínají líhnout několik dní po nakladení vajíček (2 až 3 dny u *Chironomus riparius* při 20 °C a 1 až 4 dny u *Chironomus tentans* při 23 °C a *Chironomus yoshimatui* při 25 °C) a během larválního vývoje se vystřídají čtyři instary, z nichž každý trvá 4–8 dnů. Při zkoušce se použijí larvy prvního instaru (2–3 nebo 1–4 dnů po vylíhnutí). Instar pakomárů lze případně zkontrolovat pomocí šířky hlavové kapsuly (6).

25. Dvacet larev prvního instaru se pomocí pipety bez špičky náhodně rozdělí do jednotlivých zkušebních nádob obsahujících obohacený sediment a vodu. Provzdušňování vody je nutno ukončit při přidání larev do zkušebních nádob a znovu ho zahájit nejdříve po uplynutí dalších 24 hodin po přidání larev (viz odstavce 25 a 32). Podle užitého uspořádání zkoušky (viz odstavce 19 a 20) je počet larev užitý na jednu koncentraci minimálně 60 pro odhad koncentrace vyvolávající účinek a 80 pro stanovení NOEC.

26. Dvacet čtyři hodin po přidání larev se zkoušená látka vmísí do sloupce vody nad sedimentem a znovu se zavede mírné provzdušňování. Pod hladinou vody se pomocí pipety aplikují malé objemy roztoků zkoušené látky. Voda nad sedimentem se poté opatrně promíchá, aby se nerozrušil sediment.

Zkušební koncentrace

27. Orientační zkouška může být užitečná pro stanovení rozsahu koncentrací pro vlastní zkoušku. K tomuto účelu jsou pakomáři exponováni řadě široce odstupňovaných koncentrací zkoušené chemické látky. S cílem zajistit stejnou hustotu povrchu na jednoho pakomára, která má být užita pro vlastní zkoušku, se pakomáři vystaví jednotlivým koncentracím zkoušené chemické látky po dobu, která umožňuje odhad vhodných zkušebních koncentrací; opakování nejsou vyžadována.

28. Zkušební koncentrace pro vlastní zkoušku jsou stanoveny podle výsledku zjištění předběžné orientační zkoušky. Mělo by být vybráno a použito nejméně pět koncentrací v souladu s popisem uvedeným v odstavcích 18 až 20.

Kontroly

29. Při zkoušce se použijí kontrolní nádoby bez zkoušené chemické látky, avšak obsahující sediment s příslušným počtem opakování (viz odstavce 19–20). Pokud bylo pro aplikaci zkoušené chemické látky použito rozpouštědlo (viz odstavec 16), bude přidána kontrola rozpouštědla v sedimentu.

▼M4

Zkušební zařízení

30. Užívají se statické systémy. Ve výjimečných případech, jako například tehdy, pokud je specifikace kvality vody nevhodná pro růst zkušebního organismu nebo ovlivňuje chemickou rovnováhu (např. přílišný pokles úrovně rozpuštěného kyslíku, přílišné zvýšení koncentrace exkrementů nebo výluh minerálů ze sedimentů, který ovlivňuje pH a/nebo tvrdost vody), lze použít semistatické nebo průtokové systémy s přerušovanou nebo kontinuální obnovou vody nad sedimentem. Zpravidla však budou postačující a vhodnější jiné metody zvýšení kvality vody nad sedimentem, jako je například provzdušňování.

Potrava

31. Larvy je třeba krmit optimálně denně nebo nejméně třikrát týdně. Jako dostatečná dávka pro mladé larvy po dobu prvních 10 dnů se jeví krmivo pro ryby (suspenze ve vodě nebo jemně rozmělněné krmivo, např. Tetra-Min nebo Tetra-Phyll, viz podrobnosti v dodatku 2) v množství 0,25 až 0,5 mg (0,35 až 0,5 mg pro *C. yoshimatui*)) na larvu za den. Starší larvy mohou potřebovat o něco větší množství potravy: po zbývající dobu zkoušky by mělo dostačovat 0,5–1 mg na larvu denně. Pokud dojde v kontrolních skupinách k růstu plísní nebo je u nich zjištěna mortalita, je nutné přísun potravy u všech expozic snížit a kontrolovat. Pokud není možné růst plísní zastavit, je nutné zkoušku opakovat. Při testování silně adsorbujících látek (např. log K_{ow} > 5), nebo látek s kovalentní vazbou na sediment lze dávku potravy nezbytnou pro zajištění přežití a přirozeného růstu organismů přidat do přísadami doplněného sedimentu před fází stabilizace. V takovém případě je nutno místo krmiva pro ryby použít rostlinný materiál, například přídavek 0,5 % (sušiny) jemně mletých listů např. kopřivy dvoudomé (*Urtica dioica*), morušovníku bílého (*Morus alba*), jetele plazivého (*Trifolium repens*), špenátu setého (*Spinacia oleracea*) nebo jiného rostlinného materiálu (*Cerophylu* nebo alfa-celulózy).

Inkubační podmínky

32. Voda nad sedimentem ve zkušebních nádobách se mírně provzdušňuje v optimálním případě 24 hodin po přidání larev a je sledována po celou dobu zkoušky (je třeba dbát, aby koncentrace rozpuštěného kyslíku neklesla pod 60 % ASV). Provzdušňování se provádí pomocí skleněné Pasteurovy pipety upevněné 2–3 cm nad vrstvou sedimentu (tj. jedna nebo několik bublin/s). Při zkoušení těkavých chemických látek je možné zvolit možnost systém sediment–voda neprovzdušňovat.

33. Zkouška se provádí při konstantní teplotě 20 °C (± 2 °C). Doporučená teplota pro *C. tentans* je 23 °C a pro *C. yoshimatui* 25 °C (± 2 °C). Fotoperioda je 16 hodin a intenzita světla by měla být 500 až 1 000 lux.

Trvání expozice

34. Expozice je zahájena přidáním larev do obohacených a kontrolních nádob. Maximální délka trvání expozice je 28 dnů pro *C. riparius* a *C. yoshimatsui* a 65 dnů pro *C. tentans*. Pokud se pakomáři vylíhnou dříve, lze zkoušku ukončit po uplynutí nejméně pěti dnů od vylíhnutí posledního dospělce v kontrolní nádobě.

POZOROVÁNÍ

Líhnutí

35. Určí se čas potřebný pro vývoj a celkový počet plně vylíhlých samců a samic pakomárů. Samce lze snadno rozlišit podle vějířovitých tykadel.

▼M4

36. Zkušební nádoby se kontrolují alespoň třikrát týdně s cílem vizuálně posoudit jakékoli neobvyklé chování (např. opouštění sedimentu, neobvyklé plavání), ve srovnání s kontrolními nádobami. Během období předpokládaného líhnutí je nutné denně počítat vylíhlé pakomáry. Pohlaví a počet plně vylíhlých pakomárů se denně zaznamenávají. Po identifikaci se pakomáři z nádob odstraní. Veškeré shluky vajíček nakladené před ukončením testu se zaznamenají a pak se odstraní, aby se zabránilo opětovnému zavlečení larev do sedimentu. Zaznamená se rovněž počet viditelných kukel, které se dosud nevylíhly. Pokyny pro měření líhnutí jsou uvedeny v dodatku 5.

Růst a přežívání

37. Pokud je nutné uvést údaje o desetidenním přežití a růstu larev, je třeba na počátku zkoušky přidat další zkušební nádoby tak, aby je bylo možné následně použít. Sediment z těchto dalších nádob se proseje za použití síta o velikosti 250 μm, které udrží larvy. Kritéria uhynutí jsou nepohyblivost nebo nedostatečná reakce na mechanické podněty. Larvy, které nejsou nalezeny, by měly být rovněž považovány za uhynulé (larvy uhynulé na počátku zkoušky mohly být již rozloženy mikroby). Stanoví se váha sušiny (prosté popelovin) larev, které přežily, na zkušební nádobu a vypočte se průměrná individuální hmotnost sušiny na nádobu. Je vhodné určit, do kterého instaru přežívající larvy patří; tohoto cíle lze dosáhnout pomocí změření šířky hlavové kapsuly každého jedince.

Analytická měření

Koncentrace zkoušené chemické látky

38. Musí být analyzovány minimálně vzorky vody nad sedimentem, kapilární vody a sedimentu na počátku (nejlépe hodinu po aplikaci zkoušené látky) a na konci zkoušky při nejvyšší koncentraci a jedné nižší koncentraci. Tato stanovení koncentrace zkoušené chemické látky poskytují informace o chování/distribuci zkoušené chemické látky v systému voda/sediment. Odběr vzorků sedimentu při zahájení zkoušky může ovlivnit zkušební systém (může dojít k odstranění zkušebních larev), a měly by proto být užity další zkušební nádoby k provedení analytického stanovení koncentrace na počátku zkoušky a v jejím průběhu, pokud je to vhodné (viz odstavec 39). Měření v sedimentu nemusí být nutná, pokud distribuce zkoušené látky mezi vodou a sedimentem byla jasně stanovena studií voda/sediment za srovnatelných podmínek (např. poměr sedimentu k vodě, typ aplikace, obsah organického uhlíku v sedimentu).

39. Při provádění průběžných měření (např. 7. den), a v případě, že jsou pro analýzu zapotřebí rozsáhlé vzorky, které nelze ze zkušebních nádob odebrat bez dopadu na zkušební systém, je potřeba provést analytická stanovení na vzorcích z dalších zkušebních nádob, s nimiž bylo zacházeno stejným způsobem (včetně přítomnosti zkušebních organismů), ale nebyly použity pro biologická pozorování.

40. Doporučeným postupem izolace intersticiální vody je odstřeďování např. při odstředivé síle 10 000 g a 4 °C po dobu 30 minut. Neadsorbuje-li se však zkoušená látka prokazatelně na filtry, je přijatelná i filtrace. V některých případech může být nemožné provést analýzu koncentrací v kapilární vodě vzhledem k tomu, že vzorek je příliš malý.

▼M4

Fyzikálně-chemické parametry

41. pH a rozpuštěný kyslík ve zkušební vodě a teplotu ve zkušebních nádobách je nutno měřit vhodným způsobem (viz odstavec 10). Tvrdost a obsah amoniaku by měly být měřeny v kontrolních nádobách a v jedné zkušební nádobě při nejvyšší koncentraci na počátku zkoušky a na jejím konci.

ÚDAJE A JEJICH PŘEDKLÁDÁNÍ

Zpracování výsledků

42. Účelem této zkoušky je stanovit účinek zkoušené chemické látky na rychlost vývoje a celkový počet plně vylíhlých samců a samic pakomárů, nebo v případě desetidenní zkoušky účinky na přežití a hmotnost larev. Pokud nejsou k dispozici žádné údaje o statistických rozdílech citlivosti mezi oběma pohlavími, lze výsledky pro samce a pro samice sloučit pro účely statistické analýzy. Rozdíly v citlivosti mezi pohlavími lze statisticky posoudit např. pomocí $\chi^2 - r \times 2$ tabulkového testu. Je-li vyžadováno stanovení přežití larev a průměru individuální sušiny na jednu nádobu, je nutné tak učinit po 10 dnech.

43. Koncentrace s pozorovanými účinky vyjádřené jako koncentrace ve vodě nad sedimentem se vypočtou přednostně na základě naměřených koncentrací na počátku zkoušky (viz bod 38).

44. Pro výpočet bodového odhadu EC_{50} nebo jakékoli jiné hodnoty EC_x lze jako skutečné opakování použít statistiku na jednu nádobu. Při výpočtu intervalu spolehlivosti pro každý EC_x je nutno zohlednit variabilitu mezi jednotlivými nádobami, případně prokázat, že tato variabilita je tak nízká, že ji lze ignorovat. Je-li u modelu užita metoda nejmenších čtverců, je nutné u statistik jednotlivých nádob uplatnit transformaci za účelem homogenity rozptylu. Hodnoty EC_x je však třeba vypočítat až poté, co je reakce převedena zpět na původní hodnotu.

45. Pokud je cílem statistické analýzy stanovení hodnoty NOEC/LOEC testováním hypotéz, je nutné vzít v úvahu variabilitu mezi nádobami, například pomocí analýzy rozptylu ANOVA. Případně mohou být vhodnější robustnější testy (21) v případě, že dojde k porušení předpokladů obvykle užitých při analýze ANOVA.

Procento vylíhlých jedinců

46. Procento vylíhlých jedinců jsou kvantové údaje a lze je analyzovat s použitím postupně klesajícího Cochranova-Armitageova testu, který předpokládá monotónní odezvu na dávku, a tato data jsou konzistentní s tímto očekáváním. V opačném případě lze použít Fisherův exaktní test nebo Mantelův-Haenszelův test s Bonferroniho-Holmovou korekcí hodnot p. Pokud existují důkazy o větší variabilitě mezi replikacemi ve stejné koncentraci, pak by binomické rozdělení (často uváděné jako „extra-binomická“ variabilita) nasvědčovala tomu, že je nutno použít robustní Cochranův-Armitageův test nebo Fisherův exaktní test, jak je navrhováno v odstavci (21).

47. Určí se součet pakomárů vylíhlých v jedné nádobě ne a vydělí se počtem vložených larev na:

$$ER = \frac{n_e}{n_a}$$

▼**M4**

kde:

ER = procento vylíhlých jedinců,

n_e = počet pakomárů vylíhlých v nádobě,

n_a = počet larev nasazených do nádoby.

48. Nejvhodnější alternativou pro rozsáhlé vzorky s extra binomickou variací je pojmout procento vylíhlých jedinců jako kontinuální odezvu a použít postupy, jako je například Williamsův test, pokud existuje předpoklad monotónní odezvy na dávku a je konzistentní s těmito daty ER. V případě nemonotónní odezvy by byl vhodný Dunnettův test. Rozsáhlý vzorek je zde definován situací, při níž jak počet vylíhlých jedinců, tak počet nevylíhlých jedinců přesáhnou v jednom duplikátním vzorku (nádobě) hodnotu pět.

49. Při použití metody ANOVA je nutno hodnoty ER nejprve transformovat (například druhou odmocninou arcsinu) nebo transformací podle Freemana-Tukeyho s cílem získat přibližné normální rozdělení údajů a vyrovnat odchylky. Při použití absolutních frekvencí lze použít test dle Cochrana-Armitage, Fisherův exaktní test (s Bonferroniho korekcí) nebo Mantelův-Haenszelův test. Transformace funkcí rovnou √arcsin se vypočte pomocí převrácené hodnoty sinu ($\sin^{-1}$) z odmocniny ER.

50. Pro procento vylíhlých jedinců se hodnoty EC_x vypočtou pomocí regresní analýzy (nebo např. pomocí modelu probit, (22), logit, Weibull, vhodného komerčního softwaru atd.). V případě selhání regresní analýzy (např. v případě méně než dvou koncentrací s parciálními odezvami) se použijí další neparametrické metody, jako je například klouzavý průměr nebo prostá interpolace.

Rychlost vývoje

51. Průměrná doba vývoje představuje průměrné časové rozpětí mezi nasazením larev (den 0 zkoušky) a vylíhnutím experimentální kohorty pakomárů. (Pro výpočet skutečné doby vývoje by mělo být zohledněno stáří larev v okamžiku nasazení. Rychlost vývoje je převrácenou hodnotou doby vývoje (jednotka: 1/den) a představuje část larválního vývoje, která se odehraje za den. Rychlost vývoje je z hlediska hodnocení těchto studií toxicity sedimentů preferována před dobou vývoje vzhledem k její nižší variabilitě, vyšší homogenitě a větší blízkosti normálnímu rozdělení. Z tohoto důvodu mohou být použity silné parametrické zkušební postupy pro rychlost vývoje, a ne pro dobu vývoje. Pro rychlost vývoje jako kontinuální odezvu lze hodnoty EC_x stanovit odhadem pomocí regresní analýzy (např. (23), (24).)

52. U následujících statistických testů se má za to, že počet pakomárů pozorovaných v inspekčním dni x se vylíhl v průměru časového intervalu mezi dnem x a dnem x – l (l = délka intervalu mezi pozorováními, obvykle 1 den). Průměrná rychlost vývoje na nádobu (x) se vypočte podle vzorce:

$$\bar{x} = \sum_{i=1}^{m} \frac{f_i x_i}{n_e}$$

kde:

$\bar{x}$: střední rychlost vývoje v kádince,

i: index intervalu mezi pozorováními,

m: maximální počet všech intervalů mezi pozorováními,

▼M4

f_i: počet vylíhlých jedinců během daného intervalu mezi pozorováními i,

n_e: celkový počet vylíhlých jedinců celkem na konci pokusu ($\sum f_i$)

x_i: rychlost vývoje pakomárů vylíhlých v intervalu i,

$$x_i = 1/\left(den_i - \frac{l_i}{2}\right)$$

kde:

den_i: den pozorování (ve dnech od aplikace),

l_i: délka intervalu i mezi pozorováními (ve dnech, obvykle 1 den).

Protokol o zkoušce

53. Protokol o zkoušce musí obsahovat minimálně tyto údaje:

Zkoušená látka:

— fyzikální povahu a případně fyzikálně-chemické vlastnosti (rozpustnost ve vodě, tlak par, rozdělovací koeficient v půdě (případně v sedimentu), stabilita ve vodě, atd.),

— chemické identifikační údaje (obecný název, chemický název, strukturní vzorec, číslo CAS atd.) včetně čistoty a analytické metody pro kvantitativní stanovení zkoušené látky.

Testovací druh:

— užitá pokusná zvířata: druh, vědecký název, zdroj organismů a podmínky množení,

— informace o nakládání se shluky vajíček a s larvami,

— stáří testovaných zvířat po nasazení do zkušebních nádob.

Zkušební podmínky:

— použitý sediment, tj. přírodní nebo přísadami doplněný sediment,

— u přírodního sedimentu lokalita a popis místa odběru sedimentu, pokud možno včetně dřívější kontaminace, charakteristiky: pH, obsah organického uhlíku, poměr C/N a zrnitost (je-li to vhodné),

— příprava přísadami doplněného sedimentu: složky a charakteristiky (obsah organického uhlíku, pH, vlhkost, atd. na začátku zkoušky),

— příprava zkušební vody (pokud se používá rekonstituovaná voda) a její charakteristiky (koncentrace kyslíku, pH, vodivost, tvrdost, atd. na začátku zkoušky),

— hloubka sedimentu a vody nad sedimentem,

— objem vody nad sedimentem a kapilární vody, hmotnost vlhkého sedimentu s kapilární vodou a bez ní,

— zkušební nádoby (materiál a rozměry),

— metoda přípravy zásobních roztoků a zkušební koncentrace,

▼M4

— aplikace zkoušené látky, použité zkušební koncentrace, počet duplikátních vzorků a případné použití rozpouštědla,

— inkubační podmínky: teplota, cyklus a intenzita světla, provzdušňování (frekvence a intenzita),

— podrobné informace o krmení včetně typu krmiva, přípravy, množství a režimu krmení.

Výsledky:

— nominální zkušební koncentrace, naměřené zkušební koncentrace a výsledky všech analýz pro stanovení koncentrace zkoušené chemické látky ve zkušební nádobě,

— kvalita vody ve zkušebních nádobách, tj. pH, teplota, rozpuštěný kyslík, tvrdost a amoniak,

— případné nahrazování odpařené zkušební vody,

— počet vylíhlých samců a samic pakomárů na nádobu a na den,

— počet larev, z nichž se nevylíhli dospělci, na nádobu,

— průměrná individuální hmotnost sušiny larev na nádobu a případně na instar,

— procento vylíhlých jedinců na duplikátní vzorek a zkušební koncentraci (směsný vzorek samců a samic pakomárů),

— průměrná rychlost vývoje plně vylíhlých pakomárů na duplikátní vzorek a aplikované množství (směsný vzorek samců a samic pakomárů),

— odhady koncových bodů toxicity, např. ECx (a související intervaly spolehlivosti), NOEC a/nebo LOEC a statistické metody použité k jejich stanovení,

— diskuse o výsledcích včetně případného vlivu na výsledek zkoušky v důsledku odchylek od této zkušební metody.

LITERATURA:

1) BBA (1995). Long-term toxicity test with *Chironomus riparius*: Development and validation of a new test system. Edited by M. Streloke and H. Köpp. Berlin 1995.

2) Fleming R *et al.* (1994). Sediment Toxicity Tests for Poorly Water-Soluble Substances. Final Report to them European Commission. Report No: EC 3738. August 1994. WRc, UK.

3) SETAC (1993). Guidance Document on Sediment toxicity Tests and Bioassays for Freshwater and Marine Environments. From the WOSTA Workshop held in the Netherlands.

4) ASTM International/E1706-00 (2002). Test Method for Measuring the Toxicity of Sediment-Associated Contaminants with Freshwater Invertebrates. pp 1125-1241. In ASTM International 2002 Annual Book of Standards. Volume 11.05. Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides. ASTM International, West Conshohocken, PA.

5) Environment Canada (1997). Test for Growth and Survival in Sediment using Larvae of Freshwater Midges (*Chironomus tentans* or *Chironomus riparius*). Biological Test Method. Report SPE 1/RM/32. December 1997.

6) US-EPA (2000). Methods for Measuring the Toxicity and Bioaccumulation of Sediment-associated Contaminants with Freshwater Invertebrates. Second edition. EPA 600/R-99/064. March 2000. Revision to the first edition dated June 1994.

▼**M4**

7) US-EPA/OPPTS 850.1735. (1996): Whole Sediment Acute Toxicity Invertebrates.

8) US-EPA/OPPTS 850.1790. (1996): Chironomid Sediment toxicity Test.

9) Milani D, Day KE, McLeay DJ, Kirby RS (1996). Recent intra- and inter-laboratory studies related to the development and standardisation of Environment Canada's biological test methods for measuring sediment toxicity using freshwater amphipods *(Hyalella azteca)* and midge larvae *(Chironomus riparius)*. Technical Report. Environment Canada. National Water Research Institute. Burlington, Ontario, Canada.

10) Sugaya Y (1997). Intra-specific variations of the susceptibility of insecticides *in Chironomus yoshimatsui*. Jp. J. Sanit. Zool. 48 (4): 345–350.

11) Kawai K (1986). Fundamental studies on Chironomid allergy. I. Culture methods of some Japanese Chironomids (Chironomidae, Diptera). Jp. J. Sanit. Zool. 37(1): 47–57.

12) OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 23.

13) Environment Canada (1995). Guidance Document on Measurement of Toxicity Test Precision Using Control Sediments Spiked with a Reference Toxicant. Report EPS 1/RM/30. September 1995.

14) Kapitola C.8 této přílohy, Toxicita pro žížaly,

15) Suedel BC and Rodgers JH (1994). Development of formulated reference sediments for freshwater and estuarine sediment testing. Environ. Toxicol. Chem. 13: 1163–1175.

16) Naylor C and Rodrigues C (1995). Development of a test method for Chironomus riparius using a formulated sediment. Chemosphere 31: 3291–3303.

17) Dunnett CW (1964). A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. J. Amer. Statis. Assoc. 50: 1096–1121.

18) Dunnett CW (1964). New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics 20: 482–491.

19) Williams DA (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics 27: 103–117.

20) Williams DA (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics 28: 510–531.

21) Rao JNK and Scott AJ (1992). A simple method for the analysis of clustered binary data. Biometrics 48:577–585.

22) Christensen ER (1984). Dose-response functions in aquatic toxicity testing and the Weibull model. Water Research 18: 213–221.

23) Bruce and Versteeg (1992). A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. Environmental Toxicology and Chemistry 11:1485–1494.

24) Slob W (2002). Dose-response modelling of continuous endpoints. Toxicol. Sci. 66: 298–312.

▼**M4**

Dodatek 1

DEFINICE

Pro účely této metody se použijí tyto definice:

Přísadami doplněný sediment nebo rekonstituovaný, umělý nebo syntetický sediment je směs materiálů užitá k napodobení fyzických složek přírodního sedimentu.

Voda nad sedimentem je voda nacházející se nad sedimentem ve zkušební nádobě.

Intersticiální voda nebo kapilární voda je voda zabírající prostor mezi sedimentem a částicemi půdy.

Obohacená voda je zkušební voda, do níž byla přidána zkoušená látka.

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

▼M4

Dodatek 2

Doporučení pro kultivaci kultury *Chironomus riparius*

1. Larvy rodu *Chironomus* lze chovat v krystalizačních miskách nebo ve větších nádobách. Jemný křemičitý písek se rozprostře po dně nádoby v tenké vrstvě silné 5 až 10 mm. Bylo prokázáno, že substrátem vhodným jako podklad je také křemelina (např. Merck, čl. 8117), (dostačující je tenčí vrstva silná jen několik málo mm). Následně se přidá několikacentimetrová vrstva vhodné vody. Objem vody by se měl podle potřeby doplňovat s cílem nahradit ztráty vzniklé odpařováním a zabránit vysychání. Vodu lze v případě potřeby vyměnit. Je třeba zajistit mírné provzdušňování. Nádoby, v nichž jsou larvy chovány, by měly být umístěny ve vhodné kleci, která zabrání úniku líhnoucích se dospělců. Tato klec by měla být dostatečně velká, aby umožňovala rojení vylíhlých dospělců, jinak by nemuselo dojít k jejich páření (minimum je přibližně 30×30×30 cm).

2. Klece by měly být umístěny při pokojové teplotě nebo v místnosti s konstantní teplotou 20 ± 2 °C s fotoperiodou 16 hodin světlo (intenzity přibližně 1 000 lux) a 8 hodin tma. Bylo zjištěno, že vzdušná vlhkost nižší než 60 % RH může bránit rozmnožování.

Ředicí voda

3. Lze použít jakoukoli vhodnou přírodní nebo syntetickou vodu. Zpravidla se užívá studniční voda, odchlorovaná vodovodní voda a umělá média (např. Elendtovo médium „M4“ nebo „M7“, viz níže). Vodu je před použitím nutno provzdušnit. Je-li to nutné, lze kultivační vodu obnovit opatrným odlitím nebo odčerpáním použité vody z kultivačních nádob tak, aby nedošlo k poškození schránek larev.

Krmení larev

4. Larvy rodu *Chironomus* by se měly krmit vločkovým krmivem pro ryby (TetraMin(®, Tetra Phyll® nebo jiná podobná značka patentovaného krmiva pro ryby), v množství přibližně 250 mg na nádobu a den. Potravu lze aplikovat v podobě suchého mletého prášku nebo v podobě suspenze ve vodě: 1,0 g vločkového krmiva se přidá do 20 ml ředicí vody a vytvoří se homogenní směs. Tento přípravek lze dodávat rychlostí přibližně 5 ml na nádobu na den (před použitím protřepat). Starším larvám lze přidat více krmiva.

5. Krmení se upraví podle kvality vody. V případě, že se kultivační médium „zakalí“, je třeba krmnou dávku snížit. Přidávání potravy je nutno pečlivě sledovat. Příliš malé množství krmiva způsobí, že larvy opouštějí sediment a vznášejí se ve vodním sloupci, a příliš mnoho krmiva způsobí zvýšenou mikrobiální činnost a pokles koncentrace kyslíku. Obojí může způsobit snížení rychlosti růstu.

6. Do nových kultivačních nádob mohou být přidány i buňky zelených řas (např. *Scenedesmus subspicatus*, *Chlorella vulgaris*).

Krmení vylíhlých dospělců

7. Někteří experimentátoři se domnívají, že jako potrava vylíhlých dospělců může sloužit vata namočená do nasyceného roztoku sacharózy.

▼M4

Líhnutí

8. Dospělci se začnou v chovných nádobách líhnout při teplotě 20 ± 2 °C přibližně po 13–15 dnech. Samce lze snadno rozlišit podle vějířovitých tykadel.

Shluky vajíček

9. Jakmile se ve snubní komůrce nacházejí dospělci, je třeba třikrát týdně kontrolovat všechny reprodukční nádoby, zda se v nich nacházejí shluky vajíček spojené želatinózní hmotou. Pokud se zde shluky vajíček nacházejí, je nutno je opatrně odstranit a přemístit do malé misky obsahující vzorek chovného vodního prostředí. Shluky vajíček se užijí pro založení nové nádoby s kulturou (např. 2–4 shluky vajíček na nádobu) nebo se užijí pro zkoušky toxicity.

10. Larvy prvního instarového stadia by se měly vylíhnout za 2–3 dny.

Zakládání nových kultivačních nádob

11. Jakmile jsou kultury založeny, mělo by být možné zakládat nové nádoby s kulturami larev jednou týdně nebo méně často v závislosti na zkušebních požadavcích a odstraňovat starší nádoby po vylíhnutí dospělců. Pomocí tohoto systému se zajistí pravidelné dodávky dospělců s minimální potřebou dohledu.

Příprava zkušebních roztoků „M4“ a „M7“

12. Elendt (1990) popsal médium „M4“. Médium „M7“ se připraví obdobně jako médium „M4“ s výjimkou látek uvedených v tabulce 1, u nichž jsou koncentrace u „M7“ čtyřikrát nižší než u „M4“. Připravuje se publikace o médiu „M7“ (Elendt, osobní sdělení). Podle Elendta a Biase (1990) by se zkušební roztok neměl připravovat pro koncentrace $NaSiO_3$ 5 H_2O, $NaNO_3$, KH_2PO_4 a K_2HPO_4 vzhledem k tomu, že nejsou pro přípravu zásobních roztoků vyhovující.

Příprava média „M7“

13. Každý zásobní roztok (I) se připraví samostatně a z těchto zásobních roztoků (I) se pak připraví kombinovaný zásobní roztok (II) (viz tabulka 1). Médium „M7“ se připraví přidáním 50 ml kombinovaného zásobního roztoku (II) a množství zásobního roztoku jednotlivých makroživin, které jsou uvedeny v tabulce 2, do 1 litru deionizované vody. Připraví se vitaminový zásobní roztok přidáním tří vitaminů do deionizované vody, jak je uvedeno v tabulce 3, a 0,1 ml kombinovaného vitaminového zásobního roztoku se přidá do výsledného média „M7“ krátce před použitím. (Vitaminový zásobní roztok se uskladňuje zmrazený v malých alikvotních dílech.) Médium se provzdušní a stabilizuje.

Tabulka 1

Zásobní roztoky stopových prvků pro médium M4 a M7

Zásobní roztoky (I)	Množství (mg) doplněné na 1 litr deionizované vody	Kombinovaný zásobní roztok (II) se připraví smícháním následujících množství (v ml) zásobních roztoků (I) a doplněním na 1 litr deionizované vody		Konečné koncentrace ve zkušebním roztoku (mg/l)	
		M4	M7	M4	M7
H_3BO_3 (1)	57 190	1,0	0,25	2,86	0,715
$MnCl_2 \cdot 4\ H_2O$ (1)	7 210	1,0	0,25	0,361	0,090
LiCl (1)	6 120	1,0	0,25	0,306	0,077

▼**M4**

Zásobní roztoky (I)	Množství (mg) doplněné na 1 litr deionizované vody	Kombinovaný zásobní roztok (II) se připraví smícháním následujících množství (v ml) zásobních roztoků (I) a doplněním na 1 litr deionizované vody		Konečné koncentrace ve zkušebním roztoku (mg/l)	
		M4	M7	M4	M7
RbCl (1)	1 420	1,0	0,25	0,071	0,018
$SrCl_2 \cdot 6\ H_2O$ (1)	3 040	1,0	0,25	0,152	0,038
NaBr (1)	320	1,0	0,25	0,016	0,004
$Na_2MoO_4 \cdot 2\ H_2O$ (1)	1 260	1,0	0,25	0,063	0,016
$CuCl_2 \cdot 2\ H_2O$ (1)	335	1,0	0,25	0,017	0,004
$ZnCl_2$	260	1,0	1,0	0,013	0,013
$CaCl_2 \cdot 6\ H_2O$	200	1,0	1,0	0,010	0,010
KI	65	1,0	1,0	0,0033	0,0033
Na_2SeO_3	43,8	1,0	1,0	0,0022	0,0022
NH_4VO_3	11,5	1,0	1,0	0,00058	0,00058
Na2EDTA $\cdot 2\ H_2O$ (1) (2)	5 000	20,0	5,0	2,5	0,625
FeSO4 $\cdot 7\ H_2O$ (1) (2)	1 991	20,0	5,0	1,0	0,249

(1) Tyto chemické látky se u M4 a M7 liší, jak je uvedeno výše.
(2) Tyto roztoky se připravují samostatně, spojí se a ihned se zpracují v autoklávu.

Tabulka 2

Zásobní roztoky makroživin pro médium M4 a M7

	Množství doplněné na 1 litr deionizované vody (mg)	Množství zásobních roztoků makroživin přidané za účelem přípravy média M4 a M7 (ml/l)	Konečné koncentrace ve zkušebním roztoku M4 a M7 (mg/l)
$CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$	293 800	1,0	293,8
$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$	246 600	0,5	123,3
KCl	58 000	0,1	5,8
$NaHCO_3$	64 800	1,0	64,8
$NaSiO_3 \cdot 9\ H_2O$	50 000	0,2	10,0
$NaNO_3$	2 740	0,1	0,274
KH_2PO_4	1 430	0,1	0,143
K_2HPO_4	1 840	0,1	0,184

▼**M4**

Tabulka 3

Vitaminový zásobní roztok pro médium M4 a M7

Všechny tři vitaminové roztoky se smísí do jediného vitaminového zásobního roztoku.

	Množství doplněné na 1 litr deionizované vody (mg)	Množství vitaminového zásobního roztoku přidané za účelem přípravy média M4 a M7 (ml/l)	Konečné koncentrace ve zkušebním roztoku M4 a M7 (mg/l)
Thiaminhydrochlorid	750	0,1	0,075
Kyanokobalamin (B12)	10	0,1	0,0010
Biotin	7,5	0,1	0,00075

LITERATURA:

BBA (1995). Long-term toxicity test with Chironomus riparius: Development and validation of a new test system. Edited by M. Streloke and H.Köpp. Berlin 1995.

Elendt BP (1990). Selenium Deficiency in Crustacean. *Protoplasma* 154: 25-33.

Elendt BP and Bias W-R (1990). Trace Nutrient Deficiency in *Daphnia magna* Cultured in Standard Medium for Toxicity Testing. Effects on the Optimization of Culture Conditions on Life History Parameters of *D. magna*. *Water Research* 24 (9): 1157-1167.

▼M4

Dodatek 3

PŘÍPRAVA PŘÍSADAMI DOPLNĚNÉHO SEDIMENTU

Složení sedimentu

Složení přísadami doplněného sedimentu by mělo být následující:

Složka	Charakteristika	% sušiny sedimentu
Rašelina:	rašelina mechu Sphagnum s pH co nejblíže 5,5 až 6,0, bez viditelných zbytků rostlin a jemně mletá (velikost částic ≤ 1 mm) a vysušená na vzduchu	4–5
Křemičitý písek	velikost zrn: > 50 % částic musí být v rozpětí 50–200 μm	75–76
Kaolinitický jíl	obsah kaolinitu≥ 30 %	20
Organický uhlík	upraven přidáním rašeliny a písku	2 (± 0,5)
Uhličitan vápenatý	$CaCO_3$, práškový, chemicky čistý	0,05–0,1
Voda	vodivost ≤ 10 μS/cm	30–50

Příprava

Rašelina se usuší na vzduchu a rozemele se na jemný prášek. Připraví se suspenze požadovaného množství rašelinného prášku v deionizované vodě s použitím vysoce výkonného homogenizačního zařízení. pH této suspenze se upraví na 5,5 ± 0,5 pomocí $CaCO_3$. Suspenze se kondicionuje po dobu nejméně dvou dní za mírného promíchávání při 20 ± 2 °C za účelem stabilizace pH a vytvoření stabilní mikrobiální složky. Poté se opět změří pH, které by se mělo rovnat 6,0 ± 0,5. Pak se suspenze rašeliny smísí s ostatními složkami (písek a kaolín) a s deionizovanou vodou s cílem získat homogenní sediment s obsahem vody v rozmezí 30–50 procent sušiny sedimentu. Znovu se změří pH konečné směsi a v případě nutnosti je opět upraveno pomocí $CaCO_3$ na hodnotu 6,5 až 7,5. Odeberou se vzorky sedimentu pro stanovení obsahu sušiny a obsahu organického uhlíku. Následně se doporučuje před použitím pro zkoušku toxicity pro pakomáry přísadami doplněný sediment kondicionovat po dobu sedmi dnů za stejných podmínek, které převládají v následné zkoušce.

Skladování

Suché složky pro přípravu umělého sedimentu lze skladovat na suchém a chladném místě při pokojové teplotě. Přísadami doplněný (mokrý) sediment by neměl být před použitím ve zkoušce skladován. Měl by být použit ihned po uplynutí sedmidenního období kondicionování, kterým končí jeho příprava.

LITERATURA:

Kapitola C.8 této přílohy. Toxicita pro žížaly.

Meller M, Egeler P, Rombke J, Schallnass H, Nagel R, Streit B (1998). Short-term Toxicity of Lindane, Hexachlorobenzene and Copper Sulfate on Tubificid Sludgeworms (Oligochaeta) in Artificial Media. Ecotox. and Environ. Safety 39: 10–20.

▼**M4**

Dodatek 4

Chemické charakteristiky přípustné ředicí vody

Látka	Koncentrace
Částice tuhé	< 20 mg/l
Celkový obsah organického uhlíku	< 2 mg/l
Neionizovaný amoniak	< 1 µg/l
Tvrdost jako $CaCO_3$	< 400 mg/l (*)
Zbytkový chlor	< 10 µg/l
Celkové organické fosforové pesticidy	< 50 ng/l
Celkové organické chlorové pesticidy a polychlorované bifenyly	< 50 ng/l
Celkový organický chlor	< 25 ng/l

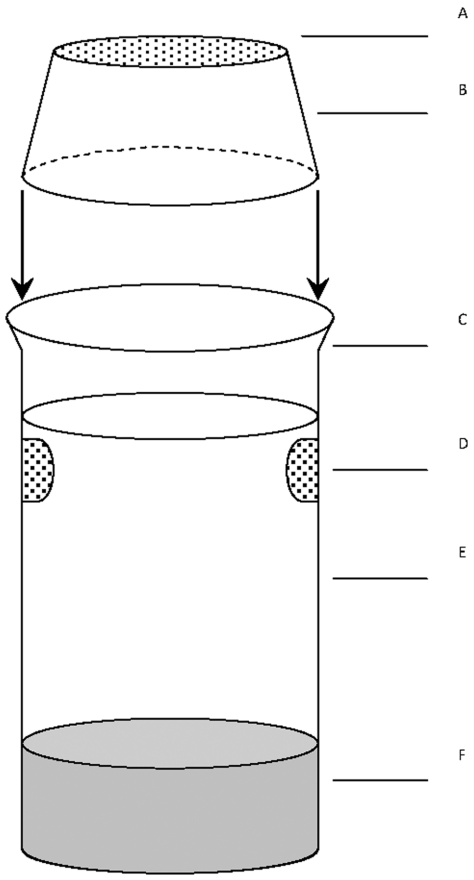
(*) Je však třeba poznamenat, že v případě, že je podezření na interakci mezi ionty způsobujícími tvrdost vod a zkoušenou látkou, by měla být použita voda nižší tvrdosti (a proto se v této situaci nesmí použít Elendtovo médium M4).

▼**M4**

Dodatek 5

Pokyny pro monitorování líhnutí larev pakomárů

Na zkušební kádinky jsou umístěny výletové pasti. Tyto pasti jsou potřebné od 20. dne až do konce zkoušky. Níže je nakreslen příklad používané pasti:



A: nylonová síťka

B: plastový kryt

C: kádinka bez zobáčku

D: otvory na výměnu vody

E: voda

F: sediment

▼M4

C.29 HODNOCENÍ SNADNÉ BIOLOGICKÉ ROZLOŽITELNOSTI – UVOLŇOVÁNÍ CO_2 V TĚSNĚ UZAVŘENÝCH LAHVIČKÁCH (*HEADSPACE TEST*)

ÚVOD

1. Tato zkušební metoda odpovídá pokynu OECD pro zkoušení (TG) 310 (2006). Tato zkušební metoda je screeningovou metodou pro hodnocení snadné biologické rozložitelnosti chemických látek a poskytuje obdobné informace jako šest zkušebních metod popsaných v kapitole C.4 této přílohy A až F. Proto lze chemickou látku, která v této zkušební metodě vykazuje pozitivní výsledky, považovat za snadno biologicky rozložitelnou a v důsledku toho rychle rozložitelnou v prostředí.

2. Dobře vyzkoušená metoda uvolňování oxidu uhličitého (CO_2) (1), která je založena na původní Sturmově zkoušce (2) hodnocení biologické rozložitelnosti organických chemických látek měřením emisí oxidu uhličitého produkovaného mikrobiální činností, je zpravidla první možností testování špatně rozpustných a silně absorbujících chemických látek. Je užívána rovněž v případě rozpustných (avšak nikoli těkavých) látek, protože uvolňování oxidu uhličitého řada odborníků považuje za jediný nepochybný důkaz mikrobiální aktivity. Odstranění rozpuštěného organického uhlíku se může uskutečnit fyzikálně-chemickými procesy – adsorpcí, vypařováním, srážením, hydrolýzou, ale je spotřebováván i mikrobiální činností a při řadě nebiologických reakcí; jen vzácně vzniká CO_2 z organických sloučenin abioticky. V původní a modifikované Sturmově zkoušce (1, 2) se odstraní CO_2 z kapalné fáze do absorpčních nádob probubláváním (tj. bublající vzduch upravený na odstraňování CO_2 prostřednictvím kapalného prostředí), zatímco v Larsonově verzi (3, 4) se CO_2 přenáší z reakční nádoby do absorbérů prohánění vzduchu bez CO_2 přes plynnou fázi, a navíc neustálým třepáním zkušební nádobou. Pouze v Larsonově modifikaci se reakční nádobou třepe; míchání je určeno pouze pro nerozpustné látky podle normy ISO 9439 (5) a v originální americké verzi (6), které obě uvádějí probublávání, a nikoli nahrazování plynné fáze. V jiné oficiální metodě US EPA (7) založené na Gledhillově metodě (8) se třesená reakční nádoba uzavře před atmosférou a vytvořený CO_2 se shromažďuje ve vnitřním zásaditém zařízení pro zachycování přímo z plynné fáze, stejně jako v klasických Warburg/Barcroftových respirometrických baňkách.

3. U anorganického uhlíku (IC) však bylo prokázáno, že se při použití standardní modifikované Sturmovy zkoušky u řady chemických látek hromadí v médiu (9). Při rozkladu 20 mg C/l anilinu byla zjištěna koncentrace IC až 8 mg/l. To znamená, že zachycování CO_2 v zásaditém zařízení pro zachycování neposkytovalo věrný obraz o množství CO_2 vyprodukovaného mikrobiologicky v mezičasech během rozkladu. V důsledku této skutečnosti nebude specifikace, že > 60 % teoretické maximální produkce CO_2 (TCO_2) se musí shromáždit v průběhu „10denního období rozkladu“ (10 dnů, které následují bezprostředně po dosažení 10 % rozkladu), aby bylo možno zkoušenou chemickou látku klasifikovat jako snadno biologicky rozložitelnou, dodržena u některých chemických látek, které by byly takto klasifikovány pomocí odstranění rozpuštěného organického uhlíku (DOC).

4. Když má procento rozkladu nižší než předpokládanou hodnotu, je možné, že dochází k hromadění IC ve zkušebním roztoku. V takovém případě lze rozložitelnost odhadnout pomocí ostatních zkoušek snadné biologické rozložitelnosti.

▼M4

5. Další nedostatky Sturmovy metodiky (těžkopádná, časově náročná, náchylnější k experimentálním chybám a nepoužitelná pro těkavé chemické látky) již dříve podnítily snahu hledat jinou než Gledhillovu techniku využívající těsně uzavřené nádoby, která by nebyla založena na průtoku plynu. (10, 11). Boatman a spolupracovníci (12) přezkoumali již existující metody a přijali metodu systému těsně uzavřených lahviček, v nichž se CO_2 uvolňuje do plynné fáze na konci inkubace po okyselení média. Obsah CO_2 byl měřen pomocí plynové chromatografie (analýza GC)/IC) ve vzorcích automaticky odebíraných z plynné fáze, avšak nebyl zohledněn rozpuštěný anorganický uhlík (DIC) v kapalné fázi. Rovněž použité nádobky byly velmi malé (20 ml) a obsahovaly pouze 10 ml média, což bylo příčinou problémů, např. při přidávání množství nerozpustných zkoušených chemických látek, které nutně muselo být jen velmi malé, případně vzhledem k přítomnosti nedostatečného nebo nulového množství mikroorganismů schopných rozložit zkoušené chemické látky v inokulovaném médiu.

6. Tyto obtíže překonaly nezávislé studie Struijse a Stoltenkampa (13) a Birche a Fletchera (14), přičemž poslední z uvedených byli inspirováni svými zkušenostmi se zařízením používaným při zkoušce anaerobního biologického rozkladu (15). Při užití původní metody (13) se měří CO_2 v plynné fázi po okyselení a ustavení rovnováhy, zatímco ve druhém případě (14) se měřil DIC v plynné i v kapalné fázi bez expozice; přes 90 % vytvořeného IC se nacházelo v kapalné fázi. Obě metody mají oproti Sturmově zkoušce výhodu v tom, že zkušební systém byl kompaktnější a lépe ovladatelný, lze v něm zkoušet těkavé chemické látky a lze se vyhnout zpoždění při měření vyprodukovaného CO_2.

7. Oba tyto přístupy byly spojeny v normě ISO upravující CO_2 „headspace“ metodu (16), která byla zkoušena v mezilaboratorních porovnávacích zkouškách (17), a tato norma tvoří základ této zkušební metody. Oba uvedené přístupy byly použity rovněž v metodě US EPA (18). Jsou doporučovány dvě metody měření CO_2, a to měření CO_2 v plynné fázi po okyselení (13) a IC v kapalné fázi po přídavku nadbytku zásady. Druhou metodu zavedl Peterson při mezilaboratorní porovnávací zkoušce CONCAWE (19) této headspace metody upravené tak, aby měřila vlastní biologickou rozložitelnost. Do této zkušební metody byly začleněny změny provedené při přepracování těchto metod z roku 1992 (20) v kapitole C.4 této přílohy o snadné biologické rozložitelnosti, takže podmínky (médium, trvání apod.) jsou jinak stejné jako podmínky v přepracované Sturmově zkoušce (20). Birch a Fletcher (14) ukázali, že pomocí této headspace zkoušky byly získány velmi podobné výsledky jako u stejných chemických látek v mezilaboratorní porovnávací zkoušce přepracovaných zkušebních metod OECD (21).

PODSTATA ZKOUŠKY

8. Zkoušená látka se zpravidla v koncentraci 20 mg C/l jako jediný zdroj uhlíku a energie inkubuje v pufru – médiu vytvořeném z minerálních solí, které je inokulováno směsnou kulturou mikroorganismů. Zkouška se provádí v těsně uzavřených nádobách s určitým volným objemem vzduchu pod víčkem, který představuje rezervoár kyslíku pro aerobní biologický rozklad. Uvolňování CO_2 v důsledku úplného aerobního biologického rozkladu zkoušené chemické látky se stanoví měřením produkce IC ve zkušebních nádobách, která je větší než produkce slepým stanovením u nádob obsahujících pouze inokulované médium. Stupeň biologického rozkladu se vyjadřuje v procentech teoretické maximální produkce anorganického uhlíku (ThIC), vztažené k množství zkoušené chemické látky (jako je například organický uhlík) přidané na začátku zkoušky.

9. U zkoušených látek lze stanovit také úbytek DOC a/nebo rozsah primárního biologického rozkladu nebo zkoušené chemické látky (20).

▼M4

INFORMACE O ZKOUŠENÉ LÁTCE

10. Pro výpočet procenta rozkladu musí být znám obsah organického uhlíku (% w/w) ve zkoušené chemické látce, a to buď na základě její chemické struktury, nebo na základě měření. U těkavých zkoušených látek je pro stanovení vhodného poměru mezi plynnou a kapalnou fází vhodné použít změřenou nebo vypočítanou Henryho konstantu. Informace o toxicitě zkoušené látky pro mikroorganismy jsou užitečné při výběru vhodné zkušební koncentrace a při interpretaci výsledků, které ukazují na špatnou biologickou rozložitelnost; doporučuje se zahrnout kontrolu inhibice s výjimkou případů, kdy je známo, že zkoušená látka nepůsobí inhibičně na mikrobiální aktivity (viz odstavec 24).

VHODNOST ZKUŠEBNÍ METODY

11. Zkoušku lze použít pro zkoušené chemické látky, které jsou rozpustné ve vodě, i pro nerozpustné zkoušené chemické látky, avšak je nezbytné, aby se zkoušená chemická látka dobře rozptýlila. Při použití doporučeného poměru 1:2 mezi plynnou a kapalnou fází lze zkoušet těkavé chemické látky s Henryho konstantou do 50 $Pa.m^3.mol^{-1}$ vzhledem k tomu, že podíl zkoušené chemické látky v plynné fázi nepřesáhne 1 % (13). Při zkoušení chemických látek, které jsou méně stálé, lze použít menší objem plynné fáze, avšak jejich biologická dostupnost může být omezující, zejména v případě, že jsou špatně rozpustné ve vodě. Uživatelé však musí zajistit, aby poměr mezi plynnou a kapalnou fází a koncentrace zkoušené chemické látky byly takové, aby zajišťovaly dostatečnou koncentraci kyslíku v plynné fázi pro úplný aerobní biologický rozklad (např. je nutné se vyvarovat použití vysokých koncentrací substrátu a malého objemu plynné fáze). Pokyny týkající se této problematiky lze nalézt v bodech (13, 23).

REFERENČNÍ CHEMICKÉ LÁTKY

12. Za účelem kontroly zkušebního postupu by měla být současně zkoušena referenční látka známé biologické rozložitelnosti. Za tímto účelem lze použít anilin, benzoát sodný nebo ethylenglykol pro zkoušení chemických látek rozpustných ve vodě a oktan-1-ol pro špatně rozpustné zkoušené chemické látky (13). Biologický rozklad těchto látek musí do 14 dnů dosáhnout > 60 % ThIC.

REPRODUKOVATELNOST

13. V mezilaboratorní porovnávací zkoušce této metody dle ISO (17), byly při dodržení doporučených podmínek včetně koncentrace zkoušené chemické látky 20 mg C/l dosaženy tyto výsledky:

Zkoušená chemická látka	Průměrné procento biologického rozkladu (28 d)	Variační koeficient (%)	Počet laboratoří
Anilin	90	16	17
Oktan-1-ol	85	12	14

Mezilaboratorní variabilita (reprodukovatelnost) byla u anilinu nízká, přičemž variační koeficient téměř u všech zkoušek nepřesáhl 5 %. V obou případech, kdy byla reprodukovatelnost nižší, byla vyšší variabilita pravděpodobně důsledkem vysoké produkce IC u slepého stanovení. Reprodukovatelnost u oktan-1-olu byla nižší, přesto však byla u 79 % zkoušek nižší než 10 %. Tato větší variabilita v rámci zkoušek může být způsobena chybami v dávkování vzhledem k tomu, že do pevně uzavřených zkušebních lahviček je nutno vstříknout malý objem (3–4 µl) oktan-1-olu. Vyšších variačních koeficientů by bylo dosaženo při použití nižších koncentrací zkoušené chemické látky, a to zejména v koncentracích nižších než 10 mg C/l. Tomu by bylo možné částečně předejít snížením koncentrace celkového anorganického uhlíku (TIC) v inokulu.

▼M4

14. V mezilaboratorní porovnávací zkoušce EU (24) byly z pěti povrchově aktivních látek přidaných na 10 mg C/l získány tyto výsledky:

Zkoušená chemická látka	Průměrné procento biologického rozkladu (28 d)	Variační koeficient (%)	Počet laboratoří
Tetrapropylen Benzensulfonát	17	45	10
Di-iso-oktylsulfosukcinát (aniontový)	72	22	9
Hexadecyl-trimethyl (*) Chlorid amonný (kationtový)	75	13	10
Iso-nonylfenol -*(ethoxylát)*$_9$ (neiontový)	41	32	10
Kokamidopropyl Dimethylhydroxy sulfobetain (amfoterní)	60	23	11

(*) Pro neutralizaci toxicity byl přidán SiO_2.

Výsledky ukazují, že obecně platí, že variabilita byla vyšší u hůře rozložených povrchově aktivních látek. Variabilita v rámci zkoušky byla u více než 90 % případů nižší než 15 %, přičemž nejvyšší dosáhla 30–40 %.

POZNÁMKA: Většina povrchově aktivních látek nejsou jednotlivé molekuly, ale jedná se o směsi izomerů, homology atd., které se rozkládají po různých charakteristických lagových fázích a podle různých kinetických rychlostních konstant vedoucích k „rozostření“ zeslabených křivek, takže 60 % hodnoty „vyhověla“ nelze dosáhnout v rámci „10denního období rozkladu“, i kdyby každá jednotlivá molekula dosáhla hodnoty > 60 % během 10 dnů, pokud by byla testována samostatně. Obdobně je tomu při použití jiných komplexních směsí.

POPIS METODY

Přístroje a pomůcky

15. Obvyklé laboratorní vybavení a dále:

a) skleněné lahvičky na sérum, těsně uzavřené pryžovým septem z butylkaučuku s hliníkovými lemovacími uzávěry. Doporučená velikost je „125 ml“, která má celkový objem asi 160 ml (v tomto případě by mělo být známo, že objem každé láhve je 160 ± 1 ml). Menší nádobu lze použít tehdy, pokud výsledky splňují podmínky uvedené v odstavcích 66 a 67;

b) analyzátor uhlíku nebo jiný přístroj (například plynový chromatograf) ke stanovení anorganického uhlíku;

▼M4

c) stříkačky s vysokou přesností pro plynné a vodné vzorky;

d) orbitální třepačka v termostatovaném prostředí;

e) zásoba vzduchu bez CO_2 – lze ji připravit prohánění vzduchu přes granule natronového vápna nebo použitím plynné směsi 80 % N_2 a 20 % O_2 (nepovinné) (viz odstavec 28);

f) zařízení pro filtraci s membránovými filtry porozity 0,20 až 0,45 μm (nepovinné);

g) analyzátor organického uhlíku (nepovinné).

Činidla

16. Používají se pouze chemikálie zaručené analytické jakosti.

Voda

17. Měla by se používat destilovaná nebo deionizovaná voda s celkovým obsahem organického uhlíku ≤ 1 mg/l. To představuje ≤ 5 % z počáteční hodnoty organického uhlíku vneseného doporučenou dávkou zkoušené chemické látky.

Zásobní roztoky pro médium s minerálními solemi

18. Zásobní roztoky a médium s minerálními solemi jsou obdobné jako u zkoušek „snadné biologické rozložitelnosti“ podle ISO 14593 (16) a C.4 (20). Použití vyšší koncentrace chloridu amonného (2,0 g/l místo 0,5 g/l) by mělo být nutné jen ve velmi výjimečných případech, např. tehdy, pokud je koncentrace zkoušené chemické látky > 40 mg C/l. Zásobní roztoky by měly být skladovány v chladničce a zlikvidovány po šesti měsících, nebo dříve, pokud dochází k tvorbě sraženin nebo růstu mikroorganismů. Připraví se tyto zásobní roztoky:

a) Bezvodý dihydrogenfosforečnan draselný (KH_2PO_4) 8,50 g

Bezvodý hydrogenfosforečnan draselný (K_2HPO_4) 21,75 g

Dihydrát hydrogenfosforečnanu sodného ($Na_2HPO_4.2H_2O$) 33,40 g

Chlorid amonný(NH_4Cl) 0,50 g

Rozpustí se ve vodě a doplní na 1 litr. pH tohoto roztoku musí být 7,4 (± 0,2). Pokud tomu tak není, připraví se nový roztok.

b) Dihydrát chloridu vápenatého ($CaCl_2.2H_2O$) 36,40 g

Rozpustí se ve vodě a doplní na 1 litr.

c) Heptahydrát síranu hořečnatého ($MgSO_4.7H_2O$) 22,50 g

Rozpustí se ve vodě a doplní na 1 litr.

d) Hexahydrát chloridu železitého ($FeCl_3.6H_20$) 0,25 g

Rozpustí se ve vodě a doplní na 1 litr a přidá se kapka koncentrované kyseliny chlorovodíkové.

Příprava minerálního média

19. Smísí se 10 ml roztoku a) s přibližně 800 ml vody (odstavec 17), přidá se po 1 ml roztoků b), c) a d) a doplní se vodou na 1 litr (odstavec 17).

Další činidla

20. Koncentrovaná kyselina orthofosforečná (H_3PO_4) (> 85 % hmotnosti na objem).

▼M4

Roztok hydroxidu sodného 7M

21. V litru vody se rozpustí 280 g hydroxidu sodného (NaOH) (odstavec 17). Stanoví se koncentrace DIC tohoto roztoku a tato hodnota se bere v úvahu při výpočtu výsledku zkoušky (viz odstavce 55 a 61), zejména ve světle kritéria validity v odstavci 66 b). Pokud je koncentrace DIC příliš vysoká, použije se čerstvě připravený roztok.

Zkoušená látka

22. Připraví se zásobní roztok zkoušené chemické látky dostatečně rozpustné ve vodě (odstavec 17) nebo ve zkušebním médiu (odstavec 19) v koncentraci optimálně stonásobně vyšší, než bude výsledná koncentrace při zkoušce; může být nutné upravit pH zásobního roztoku. Zásobní roztok se přidá do minerálního média tak, aby konečná koncentrace organického uhlíku byla 2 až 40 mg C/l, optimálně 20 mg C/l. Při použití nižších koncentrací může dojít k omezení výsledné přesnosti. Rozpustné i nerozpustné kapalné chemické látky mohou být do nádob dávkovány přímo stříkačkami s vysokou přesností. Málo rozpustné a nerozpustné zkoušené chemické látky mohou vyžadovat speciální zacházení (25). Lze použít následující postupy:

a) přímý přídavek známých odvážených množství;

b) dispergace ultrazvukem před přidáním;

c) dispergace za přídavku emulgačních činidel, která bude nezbytná pro zjištění, zda mají inhibiční nebo stimulační účinky na mikrobiální aktivitu před přidáním;

d) adsorpce kapalných zkoušených chemických látek nebo roztoku ve vhodném těkavém rozpouštědle, na inertním nosiči nebo prostředí (např. filtr ze skleněných vláken) s následným odpařením rozpouštědla, pokud bylo použito, a přímé přidání známého množství;

e) přidání známého množství roztoku zkoušené chemické látky v lehce těkavém rozpouštědle do prázdné zkušební nádoby a následné odpaření rozpouštědla.

Prostředky nebo rozpouštědla užitá v písmenech c), d) a e) musí být testovány na případné stimulační nebo inhibiční účinky na mikrobiální aktivitu (viz odstavec 42 (b)).

Referenční chemická látka

23. Připraví se zásobní roztok (rozpustné) referenční chemické látky ve vodě (odstavec 17) v koncentraci optimálně stonásobně vyšší než bude výsledná koncentrace (20 mg C/l) při zkoušce.

Kontrola inhibice

24. U zkoušených chemických látek často nedochází k významnému rozkladu za podmínek užitých při stanovení snadného biologického rozkladu. Jednou z možných příčin je to, že zkoušená látka působí inhibičně na inokulum v koncentraci užité při zkoušce. Do zkoušky může být zahrnuta kontrola inhibice s cílem usnadnit (zpětnou) identifikaci inhibice jako možné příčiny nebo přispívajícího faktoru. Kontrola inhibice může rovněž vyloučit takové interference a prokázat, že nulový nebo jen mírný rozklad je důsledkem výhradně nedostatečné náklonnosti k mikrobiologickému napadení za podmínek zkoušky. Pro získání informací o toxicitě zkoušené chemické látky pro (aerobní) mikroorganismy se připraví roztok ve zkušebním médiu obsahujícím zkoušenou látku a referenční chemickou látku (bod 19) obsahující stejnou koncentraci jak zkoušené chemické látky, tak referenční chemické látky (viz odstavec 22 a 23).

▼M4

Inokulum

25. Inokulum lze získat z řady zdrojů: z aktivovaného kalu, ze splaškových vod (nechlorovaných), z povrchových vod a půd nebo z jejich směsi (20). Aktivita zdroje z hlediska biologického rozkladu se ověří referenční látkou. Bez ohledu na zdroj by v případě, že se postup má užít jako zkouška na snadnou biologickou rozložitelnost, neměly použít mikroorganismy, které byly již dříve vystaveny působení zkoušené chemické látky.

Upozornění: Aktivovaný kal, odpadní voda a splašková voda obsahují patogenní organismy a je nutno s nimi zacházet s opatrností.

26. Na základě zkušeností se optimálním objemem inokula rozumí:

— objem, který vykazuje dostatečnou aktivitu k biologickému rozkladu,

— objem, který rozkládá referenční látku v dohodnuté procentuální míře (viz odstavec 66)

— objem obsahující 10^2 až 10^5 kolonie tvořících jednotek v 1 ml konečné směsi,

— objem, který obvykle poskytuje koncentraci sušiny aktivovaného kalu ve výsledné směsi 4 mg/l (koncentrace až do 30 mg/l jsou možné, mohou však významně ovlivnit produkci CO_2 slepého stanovení (26),

— objem, který poskytuje koncentraci rozpuštěného organického uhlíku v inokulu menší než 10 % počáteční koncentrace organického uhlíku v přidané zkoušené látce,

— obecně objem 1–10 ml inokula na litr zkoušeného roztoku.

Aktivovaný kal

27. Odebere se čerstvý vzorek aktivovaného kalu z aerační nádrže čistírny odpadních vod nebo laboratorní jednotky čistící převážně domovní odpadní vody. Pokud je to nutné, odstraní se hrubé částice filtrací sítem (např. s velikostí ok 1 mm^2) a kal se udržuje za aerobních podmínek.

28. Kal se může po odstranění hrubých částic také usadit nebo odstředit (např. 1 100 × g po dobu 10 minut). Kapalná fáze nad usazeninou se odstraní. Kal lze promýt minerálním roztokem. Koncentrovaný kal se suspenduje v minerálním médiu na koncentraci 3–5 g suspendovaných tuhých látek na litr. Následně se kal před použitím provzdušňuje.

29. Kal by měl být odebrán z dobře fungující konvenční čistírny. Je-li nutné odebrat kal z čistírny s vysokým výkonem, nebo předpokládá-li se, že kal obsahuje inhibitory, je třeba jej promýt. Po důkladném promíchání se kal nechá usadit nebo se odstředí, kapalina nad usazeninou se odstraní a promytý kal se opět suspenduje v nové dávce minerálního média. Tento postup se opakuje, dokud se kal nepovažuje za prostý přebytečného substrátu nebo inhibitoru.

30. Po opakovaném suspendování nebo z neupravovaného kalu se těsně před použitím odebere vzorek pro stanovení hmotnosti sušiny suspendovaných tuhých látek.

31. Další možností je homogenizace aktivovaného kalu (3–5 g suspendovaných látek v litru). Kal se 2 minuty rozmělňuje v mixeru Waring při střední rychlosti. Rozmělněný kal se nechá 30 minut (popřípadě déle) usazovat a kapalina se dekantuje pro použití jako inokulum v koncentraci 10 ml/l minerálního média.

▼M4

32. Aby se ještě dále snížila hodnota slepého stanovení CO_2, může být kal před použitím aklimatizován provzdušňováním přes noc vzduchem bez obsahu CO_2. Jako inokulum se při této zkoušce použije koncentrace sušiny aktivovaného kalu 4 mg/l.

Inokulum z druhého stupně čistírny odpadních vod

33. Inokulum lze získat rovněž z výstupu druhého stupně čistírny odpadních vod nebo laboratorní jednotky zpracovávající převážně domovní odpadní vody. Tento vzorek se udržuje v aerobních podmínkách a používá se v den odběru nebo podle potřeby po aklimatizaci. Z odtoku se odstraní větší částice filtrací přes hrubý filtr a změří se hodnota pH.

34. Filtrát se za účelem snížení obsahu IC provzdušňuje vzduchem bez CO_2 (odstavec 15-e) po dobu 1 h, přičemž se hodnota pH udržuje na 6,5 kyselinou fosforečnou (odstavec 20). Potom se hodnota pH upraví na původní hodnotu hydroxidem sodným (odstavec 21) a nakonec se vzorek ponechá v klidu po dobu 1 h a vhodný objem kapalné fáze se použije pro inokulaci. Tento postup snižuje obsah IC inokula. Jestliže se například použije jako inokulum maximálně 100 ml filtrovaného provzdušněného odtoku na 1 litr, mělo by se při slepém stanovení množství vznikajícího IC pohybovat v rozmezí od 0,4 do 1,3 mg/l (14), což představuje 2–6,5 % zkoušené chemické látky C při 20 mg C/l a 4–13 % při 10 mg C/l.

Povrchové vody

35. Odebere se vzorek vhodné povrchové vody. Vzorek se uchovává za aerobních podmínek a použije se v den odběru. Podle potřeby se vzorek koncentruje filtrací nebo odstředěním. Objem inokula, které má být použito v jednotlivých zkušebních nádobách, by měl splňovat kritéria uvedená v odstavci 26.

Půdy

36. Odebere se vzorek vhodné půdy do maximální hloubky 20 cm pod povrchem. Ze vzorku půdy se nejprve odstraní kameny, zbytky rostlin a bezobratlých a půda se následně proseje přes síto o velikosti oka 2 mm (v případě, že vzorek je příliš mokrý na to, aby ho bylo možné prosít okamžitě, částečně se usuší na vzduchu pro usnadnění prosévání). Vzorek se uchová v aerobních podmínkách a musí být použit v týž den, kdy byl odebrán. (Je-li vzorek přepravován ve volně uzavřeném černém polyethylenovém sáčku, lze jej v tomto sáčku skladovat při 2 až 4 °C po dobu až jednoho měsíce.)

Aklimatizace inokula

37. Inokulum lze aklimatizovat pro experimentální podmínky, ale nikoli předběžně adaptovat na zkoušenou chemickou látku. Aklimatizace může snížit uvolňování CO_2 ve slepých pokusech. Aklimatizace spočívá v aeraci aktivovaného kalu po jeho rozpuštění ve zkušebním médiu na 30 mg/l vlhkým vzduchem bez obsahu CO_2 po dobu 5 až 7 dnů při zkušební teplotě.

POSTUP ZKOUŠKY

Počet lahviček

38. Počet potřebných zkušebních lahviček (odstavec 15-a) závisí na četnosti analýz a na trvání testu.

39. Doporučuje se provést analýzu lahviček třikrát po uplynutí dostatečného počtu časových intervalů tak, aby bylo možno identifikovat desetidenní období rozkladu. Na konci zkoušky se rovněž analyzuje nejméně pět zkušebních lahviček (odstavec 15 písm. a)) ze sady a), b) a c) (viz odstavec 42) s cílem umožnit výpočet 95 % intervalů spolehlivosti pro průměrnou hodnotu biologického rozkladu v procentech.

▼M4

Inokulované médium

40. Inokulum se používá v koncentraci sušiny v aktivovaném kalu 4 mg/l. Dostatečně inokulované médium se připraví bezprostředně před použitím například přidáním 2 ml vhodně upraveného aktivovaného kalu (odstavce 27 až 32) na 2 000 mg/l na 1 litr média s minerálními solemi (odstavec 19). Při použití výstupu z druhého stupně čistírny odpadních vod se přidá až 100 ml odtoku (odstavec 33) do 900 ml média s minerálními solemi (odstavec 19) a zředí se médiem na 1 litr.

Příprava lahviček

41. Alikvotní díly inokulovaného média se rozdělí do duplikátních lahviček tak, aby se poměr mezi plynnou a kapalnou fází rovnal 1:2 (přidá se např. 107 ml do lahviček o kapacitě 160 ml). Lze použít i jiné poměry, ale je nutno dbát upozornění uvedeného v odstavci 11. Při použití jednoho i druhého typu inokula je nutno zajistit, aby bylo inokulované médium odpovídajícím způsobem promícháno s cílem zajistit jeho rovnoměrné rozdělení do zkušebních lahviček.

42. Připraví se sady lahviček (odstavec 15a), které budou obsahovat:

a) zkušební nádoby (označené F_T), obsahující zkoušenou chemickou látku;

b) nádoby pro slepé stanovení (označené F_B) obsahující jen zkušební médium a inokulum; je nutné přidat rovněž veškeré chemické látky, rozpouštědla, činidla nebo filtry ze skelných vláken užívané k zavedení zkoušené chemické látky do zkušebních nádob;

c) nádoby pro kontrolu postupu (označené F_C), obsahující referenční chemickou látku;

d) podle potřeby nádoby pro kontrolu možného inhibičního vlivu zkoušené chemické látky (označené F_I) obsahující zkoušenou chemickou látku a referenční chemickou látku ve stejné koncentraci (odstavec 24) jako v lahvích F_T (zkoušená látka) a F_C, (referenční látka);

e) nádoby pro kontrolu případného biotického rozkladu (označeného F_S), jako v bodě a) plus 50 mg/l $HgCl_2$, nebo sterilizované jiným způsobem (např. v autoklávu).

43. Ve vodě rozpustné zkoušené chemické látky a referenční chemické látky se přidají jako vodné zásobní roztoky (odstavce 22, 23 a 24) tak, aby výsledná koncentrace byla 10 až 20 mg C/l.

44. Nerozpustné zkoušené chemické látky a nerozpustné referenční chemické látky se přidávají do lahviček celou řadou různých způsobů (viz odstavec 22a-e) v závislosti na povaze zkoušené látky, a to buď před přidáním inokulovaného média, nebo po něm v závislosti na metodě expozice zkoušené chemické látky. Pokud se užije některý z postupů uvedených v odstavci 22a-e, bude se slepými lahvičkami F_B (odstavec 42b) zacházeno podobným způsobem, avšak bez přidání zkoušené chemické látky nebo referenční chemické látky.

45. Těkavé zkoušené chemické látky je třeba vstříknout do uzavřených lahviček (bod 47) s použitím injekční mikrostříkačky. Dávka se vypočítá ze vstříknutého objemu a z hustoty zkoušené chemické látky.

46. Potom se v případě potřeby do nádob přidá voda tak, aby objem kapaliny byl ve všech nádobách stejný. Poměr mezi plynnou a kapalnou fází (obvykle 1:2) a koncentrace zkoušené látky musí zajistit dostatečnou koncentraci kyslíku v plynné fázi pro úplný biologický rozklad.

▼M4

47. Všechny lahve se poté těsně uzavřou, například pryžovými septy z butylkaučuku a hliníkovými lemovacími uzávěry. V této fázi jsou přidány těkavé zkoušené chemické látky (bod 45). Pokud má být sledován pokles koncentrace DOC ve zkušebním roztoku a provedeny analýzy počáteční koncentrace IC v čase nula (sterilní kontroly, bod 42e) nebo jiné determinanty, příslušný vzorek se odstraní ze zkušební nádoby. Zkušební nádoba a její obsah jsou pak vyřazeny.

48. Těsně uzavřené lahvičky se umístí na orbitální třepačku (odstavec 15d) při rychlosti zajišťující dostatečné promíchání obsahu zkušebních nádob a v suspenzi (např. 150 až 200 otáček za minutu), a jsou inkubovány v temnu při teplotě 20 °C ± 1 °C.

Odběr vzorků

49. Vzorec odběru vzorků závisí na trvání lagové fáze a na kinetické rychlosti biologického rozkladu zkoušené chemické látky. Vybrané nádoby se analyzují v den vzorkování, ale nejméně jednou za týden nebo častěji (např. dvakrát týdně), jestliže se požaduje celková křivka biologické rozložitelnosti. Z třepačky se odstraní potřebný počet opakovaných vzorků odpovídajících F_T, F_B a F_C a pokud byly nasazeny také F_I a F_S (viz odstavec 42). Zkouška musí obvykle probíhat 28 dní. Zkouška může být ukončena před uplynutím 28 dní, jestliže z křivky biologické rozložitelnosti vyplývá, že prodlevy bylo dosaženo již dříve. Odeberou se vzorky pro analýzu z pěti lahví rezervovaných pro 28. den zkoušky a výsledky se použijí k výpočtu mezí spolehlivosti nebo variačního koeficientu procenta biologického rozkladu. Z lahviček představujících kontrolní vzorky pro inhibici a abiotický rozklad nemusí být vzorky odebírány tak často jako z ostatních lahviček; postačí odběr v 1. den a v 28. den.

Analýza anorganického uhlíku (IC)

50. Produkce CO_2 v lahvičkách se stanoví měřením zvýšení koncentrace anorganického uhlíku (IC) v průběhu inkubace. Existují dvě doporučené metody stanovení množství IC vznikajícího během zkoušky, které jsou popsány bezprostředně níže. Tyto metody mohou poskytovat poněkud odlišné výsledky, a proto by během zkoušky měla být používána jen jedna z nich.

51. Metoda a) se doporučuje v případě, že médium pravděpodobně obsahuje zbytky například skleněného filtračního papíru a/nebo nerozpustné zkoušené chemické látky. Pokud není k dispozici analyzátor uhlíku, lze tuto analýzu provést pomocí plynového chromatografu. Je důležité, aby láhve měly při analýze plynu v plynné fázi zkušební teplotu nebo se jí alespoň blížily. Metoda b) může být jednodušší pro laboratoře, které užívají pro měření IC analyzátory uhlíku. Je důležité, aby roztok hydroxidu sodného (odstavec 21), který slouží k přeměně CO_2 na uhličitan, byl buď čerstvě připravený, nebo byl znám jeho obsah IC, aby jej bylo možno zohlednit při výpočtu výsledků zkoušek (viz odstavec 66-b).

Metoda a): okyselení na hodnotu pH < 3

52. Před analýzou každé šarže se analyzátor uhlíku kalibruje vhodným IC standardem (např. dusíkem s hmotnostním podílem CO_2 1 %). Septem se vstříkne do každé zkušební nádoby koncentrovaná kyselina fosforečná (odstavec 20), aby se hodnota pH média snížila na < 3 (přidá se například 1 ml kyseliny na každých 107 ml zkušebního média). Potom se nádoby znovu umístí na třepačku. Po 1 h třepání při zkušební teplotě se nádoby sejmou z třepačky a z každé zkušební nádoby se odebere alikvotní podíl (např. 1 ml) plynné fáze a vstříkne se do analyzátoru uhlíku. Zaznamenají se naměřené koncentrace IC (v mg C na litr plynu).

▼M4

53. Podstata této metody spočívá v tom, že po okyselení na pH < 3 a po dosažení rovnováhy při 20 °C je rovnovážná konstanta pro distribuci CO_2 mezi kapalnou a plynnou fází ve zkušebních nádobách rovna 1,0, pokud je měřena jako koncentrace (13). To by mělo být nejméně jednou ověřeno pro zkušební systém následujícím způsobem:

Připraví se zkušební nádoby obsahující roztok bezvodého uhličitanu sodného (Na_2CO_3) ve vodě prosté CO_2 o koncentracích odpovídajících 5 a 10 mg IC na litr, přičemž voda prostá CO_2 se připraví okyselením vody na pH 6,5 koncentrovanou kyselinou orthofosforečnou (odstavec 20), kterou se přes noc prohání vzduch prostý CO_2 a nakonec se pH sníží přidáním zásady na neutrální hodnotu. Zajistí se, aby poměr mezi plynnou a kapalnou fází byl stejný jako při vlastní zkoušce (např. 1:2). Obsah v nádobách se okyselí a po dosažení rovnováhy, jak je uvedeno v odstavci 52, se stanoví koncentrace IC v plynné i kapalné fázi. Ověří se, zda v rámci experimentální chyby jsou obě koncentrace stejné. V případě, že tomu tak není, experimentátor by měl uvedené postupy přehodnotit. Tuto kontrolu distribuce IC mezi plynnou a kapalnou fází není nutné provádět vždy při provedení testu; lze ji provádět nejspíše při provádění kalibrace.

54. Jestliže má být stanoven úbytek DOC (platí pouze pro vodou rozpustné zkoušené chemické látky), odeberou se vzorky kapalné fáze ze samostatných (neokyselených) nádob, filtrují se membránovým filtrem a vstříknou do DOC analyzátoru. Tyto nádoby lze podle potřeby užít pro další analýzy s cílem stanovit primární biologický rozklad.

Metoda b): přeměna CO_2 na uhličitany

55. Před analýzou každé šarže se analyzátor IC kalibruje na vhodný standard – například roztokem hydrogenuhličitanu sodného ($NaHCO_3$) ve vodě prosté CO_2 (viz odstavec 53) v koncentračním rozsahu IC od 0 mg/l do 20 mg/l. Septem se do každé zkušební lahvičky vstříkne 1 ml roztoku hydroxidu sodného (7M, odstavec 21) (např. 1 ml do 107 ml média) a nádobami se třepe při zkušební teplotě po dobu 1 h. Tentýž roztok NaOH se použije pro všechny lahvičky užité v daném dni, avšak není nutno jej užívat při každém odběru vzorků v průběhu zkoušky. Jestliže jsou při všech odběrech vzorků požadovány absolutní slepé hodnoty IC, bude stanovení IC v roztoku NaOH požadováno při každém jeho použití. Nádoby se sejmou z třepačky a nechají se odsadit. Z každé nádoby se stříkačkou odebere vhodný objem kapalné fáze (např. od 50 µl do 1 000 µl). Vzorky se vstříknou do analyzátoru IC a zaznamenají se koncentrace IC. Je třeba zajistit, aby užívaný analyzátor byl řádně vybaven ke zpracování zásaditých vzorků vytvořených v rámci této metody.

56. Podstata této metody spočívá v tom, že po přídavku zásady a třepání je koncentrace IC v plynné fázi zanedbatelná. To by mělo být ověřeno pro zkušební systém nejméně jednou s použitím standardů IC, přidáním zásady a ustálením a změřením koncentrace IC v plynné i kapalné fázi (viz odstavec 53). Koncentrace v plynné fázi by se měla blížit nule. Tuto kontrolu na téměř kompletní absorpci CO_2 není nutno provádět při každé zkoušce.

57. Jestliže má být stanoven úbytek DOC (platí pouze pro vodou rozpustné zkoušené chemické látky), odeberou se vzorky kapalné fáze ze samostatných nádob (které neobsahují přidanou zásadu), filtrují se membránovým filtrem a vstříknou do DOC analyzátoru. Tyto nádoby lze podle potřeby užít pro další analýzy s cílem stanovit primární biologickou rozložitelnost.

▼M4

ÚDAJE A JEJICH PŘEDKLÁDÁNÍ

Výpočet výsledků

58. Za předpokladu 100 % mineralizace zkoušené chemické látky na CO_2 se teoretická produkce anorganického uhlíku (ThIC), která je větší než produkovaná slepým stanovením, rovná množství celkového organického uhlíku (TOC) přidaného do každé zkušební nádoby na začátku zkoušky, takže:

$$ThIC = TOC.$$

Celkový objem anorganického uhlíku (TIC) v každé zkušební nádobě je:

$$TIC = (\text{mg C v kapalné fázi} + \text{mg C v plynné fázi}) = (V_L \times C_L) + (V_H \times C_H) \qquad \text{rovnice [1]}$$

kde:

V_L = objem kapaliny v láhvi (v litrech),

CL = koncentrace IC v kapalné fázi (v mg uhlíku na 1 litr kapalné fáze),

VH = objem plynné fáze (v litrech),

CL = koncentrace IC v plynné fázi (v mg uhlíku na 1 litr plynné fáze).

Výpočet TIC pro tyto dvě analytické metody užívané ke stanovení IC při této zkoušce je popsán níže v odstavcích 60 a 61. Procento biologického rozkladu (*% D*) se pro každý případ vypočte podle:

$$\%D = \frac{(TIC_t - TIC_b)}{TOC} \times 100 \qquad \text{Rovnice [2]}$$

kde:

TIC_t = TIC ve zkušební nádobě v čase t v miligramech,

TIC_b = průměrná hodnota TIC v nádobách pro slepé stanovení v čase t v miligramech,

TOC = TOC původně přidaný do zkušební nádoby v miligramech.

Procento biologického rozkladu % D se vypočte ve zkušebních nádobách (F_T), referenčních nádobách (F_C) a nádobách pro kontrolu inhibice z příslušného množství TIC produkovaného při každé době odběru vzorku (pokud byly zařazeny).

59. Jestliže došlo během zkušební doby k významnému vzrůstu TIC sterilních kontrol (F_S), pak lze dospět k závěru, že došlo k abiotickému rozkladu zkoušené chemické látky a tuto skutečnost je třeba zohlednit ve výpočtu D v rovnici [2].

Okyselení na hodnotu pH < 3

60. Vzhledem k tomu, že okyselení na hodnotu pH < 3 a ustálení má za následek dosažení rovnováhy mezi koncentrací TIC v kapalné a plynné fázi, stačí měřit jen koncentraci IC v plynné fázi. Proto je v rovnici [1] $TIC = (V_L + V_H) \times C_H = V_B \times C_H$
, kde V_B = je objem lahve se sérovým uzávěrem.

Přeměna CO_2 na uhličitany

61. Při této metodě se výpočty provádějí, jak je popsáno v rovnici [1], avšak zanedbatelný obsah IC v plynné fázi se nebere v úvahu, to znamená, že $V_H \times C_H = 0$, a $TIC = V_L \times C_L$.

▼M4

Vyjadřování výsledků

62. Křivka biologického rozkladu se získá vynesením závislosti procenta biologického rozkladu D na čase inkubace, a pokud možno se vyznačí také lagová fáze, doba biologického rozkladu, 10denní období rozkladu a prodleva, tj. fáze, v níž bylo dosaženo maximálního rozkladu a v níž se vyrovnala křivka biologického rozkladu. Jestliže se pro dvě souběžná stanovení ve zkušebních nádobách F_T (rozdíl menší než 20 %) získají srovnatelné výsledky, vynesou se do grafů průměrné hodnoty (viz dodatek 2, obr. 1); v opačném případě se vynesou křivky pro každou nádobu zvlášť. Zjistí se průměrná hodnota biologického rozkladu v procentech v prodlevě nebo se odhadne nejvyšší hodnota (například když křivka v prodlevě klesá), ale je důležité stanovit, že v tomto druhém případě se nejedná o odlehlou hodnotu. Tento maximální stupeň biologického rozkladu se v protokolu o zkoušce uvede jako „stupeň biologického rozkladu zkoušené chemické látky“. Jestliže počet zkušebních nádob nebyl dostatečný pro odhad prodlevy, použijí se údaje změřené poslední den zkoušky a vypočte se průměrná hodnota. Tato poslední hodnota, průměr pěti opakovaných zkoušek, slouží jako indikátor přesnosti, s nímž bylo stanoveno procento biologického rozkladu. Uvede se rovněž hodnota získaná na konci 10denního období rozkladu.

63. Stejným způsobem se vynese křivka biologického rozkladu pro referenční látku F_C, a pokud byla provedena, i pro závislost abiotické eliminace F_S a kontroly inhibice F_I.

64. Zaznamená se produkce TIC při slepém stanovení (F_B) a v nádobách pro kontrolu abiotické eliminace (F_S), pokud byly tyto nádoby zařazeny do zkoušky.

65. Vypočte se D pro nádoby F_I na základě teoretické produkce IC předpokládané pouze na základě referenční složky směsi. Jestliže je 28. den $[(D_{FC}\ (^1) - D_{FI}\ (^2))/D_{FC}] \times 100 > 25$ %, lze předpokládat, se zkoušená chemická látka působí inhibičně na aktivitu inokula, a to může být důsledkem nízkých hodnot D_{FT} získaných za podmínek zkoušky. V tomto případě by mohla být zkouška opakována s nižší zkušební koncentrací, a pokud možno se snížením DIC v inokulu a TIC vytvořeného ve slepých kontrolních nádobách vzhledem k tomu, že nižší koncentrace jinak sníží přesnost této metody. V úvahu přichází i použití jiného inokula. Jestliže v nádobě F_S (abiotické) byl pozorován významný nárůst (> 10 %) množství TIC, mohou přicházet v úvahu procesy abiotického rozkladu.

Platnost výsledků

▼M7

66. Zkouška se považuje za platnou, jestliže:

(a) průměrné procento rozkladu v nádobách F_C s referenční chemickou látkou je po 14 dnech inkubace > 60 % a

(b) průměrná produkce TIC při slepých kontrolách FB na konci zkoušky je < 3 mg C/l.

Pokud není těchto limitů dosaženo, měla by se zkouška opakovat s inokulem z jiného zdroje, případně by měl být přezkoumán použitý postup. Pokud je například problémem vysoká produkce IC při slepých kontrolách, je nutno opakovat postup uvedený v odstavcích 27 až 32.

(1) Procento rozkladu v nádobách F_C obsahujících referenční látku.
(2) Procento rozkladu v nádobách F_I.

▼M4

67. Pokud zkoušená látka nedosáhne 60 % ThIC a bylo prokázáno, že není inhibující (odstavec 65), lze zkoušku opakovat s vyšší koncentrací inokula (až 30 mg/l aktivovaného kalu a 100 ml odtoku/l) nebo s inokuly z jiných zdrojů, zejména tehdy, pokud byl rozklad v rozmezí 20 až 60 %.

Interpretace výsledků

68. Biologický rozklad > 60 % ThIC v rámci 10denního období rozkladu v této zkoušce prokazuje, že zkoušená chemická látka je snadno biologicky rozložitelná v aerobních podmínkách.

69. Pokud není dosaženo vyhovující hodnoty 60 % ThIC, určí se hodnota pH v médiích v lahvičkách, které nebyly upraveny kyselinou ani zásadou; hodnota menší než 6,5 by mohla znamenat, že došlo k nitrifikaci. V takovém případě se zkouška opakuje s roztokem pufru o vyšší koncentraci.

Protokol o zkoušce

70. Sestaví se tabulka % D pro každou zkušební nádobu (F_T), referenční nádobu (F_C) a nádobu pro kontrolu inhibice (F_I), pokud byly zařazeny do vzorku, pro každý den odběru vzorku. Pokud jsou získány srovnatelné výsledky pro duplikátní vzorky, vynese se křivka průměrných hodnot % D v reálném čase. Zaznamená se množství TIC ve slepých (F_B) a sterilních kontrolách (F_S) DOC a/nebo jiné determinanty a jejich procento úbytku.

71. Určí se průměrná hodnota procenta D ve fázi prodlevy, nebo se použije nejvyšší hodnota, pokud křivka biologického rozkladu ve fázi prodlevy klesá, a tato skutečnost se uvede jako „stupeň biologického rozkladu zkoušené chemické látky“. Je důležité zajistit, aby v tomto druhém případě nejvyšší hodnota nebyla hodnotou odlehlou.

72. Protokol o zkoušce musí obsahovat tyto údaje:

Zkoušená chemická látka:

— obecný název, chemický název, číslo CAS, strukturní vzorec a relevantní fyzikálně-chemické vlastnosti,

— čistota zkoušené látky (obsah nečistot).

Zkušební podmínky:

— odkaz na tuto zkušební metodu,

— popis užitého zkušebního systému (např. objem nádoby, poměr mezi plynnou a kapalnou fází, metoda míchání atd.),

— aplikace zkoušené chemické látky a referenční chemické látky do zkušebního systému: užitá zkušební koncentrace a množství uhlíku dávkovaného do jednotlivých zkušebních nádob; jakékoli užití rozpouštědla,

— podrobnosti o použitém inokulu, jakákoli adaptace a aklimatizace,

— teplota inkubace,

— validace principu analýzy IC,

— hlavní charakteristika použitého analyzátoru IC (a jakýchkoli dalších použitých analytických metod),

— počet duplikátních vzorků.

Výsledky:

— nezpracovaná data a vypočtené hodnoty biologického rozkladu v tabelární formě,

▼M4

— graf závislosti procenta rozkladu na čase u zkoušených a referenčních chemických látek, lagová fáze, fáze rozkladu, 10denní období rozkladu a směrnice,

— procento úbytku ve fázi prodlevy, na konci zkoušky a po uplynutí 10denního období rozkladu,

— odůvodnění případného odmítnutí výsledků zkoušky,

— jakékoli další skutečnosti, které jsou důležité pro užitý postup,

— diskuse o výsledcích.

LITERATURA:

1) Kapitola C.4 této přílohy – Stanovení „snadné“ biologické rozložitelnosti – Zkouška na uvolňování CO_2 (metoda C.4-C).

2) Sturm RN (1973). Biodegradability of Nonionic surfactants: screening test for predicting rate and ultimate biodegradation. J.A,.Oil Chem Soc. 50: 159–167.

3) Larson RJ (1979). Estimation of biodegradation potential of xenobiotic organic chemicals. Appl Env. Microbiol. 38: 1153–1161.

4) Larson RJ, Hansmann MA and Bookland EA (1996). Carbon dioxide recovery in ready biodegradability tests: mass transfer and kinetic constants, Chemosphere 33: 1195–1210.

5) ISO 9439 (1990; přepracována v roce 1999). Jakost vod – Hodnocení úplné biologické rozložitelnosti organických látek ve vodném prostředí – Metoda stanovení uvolněného oxidu uhličitého (Sturm).

6) US EPA (1996). Fate, Transport and Transformation Test Guideline. 835. 3110 Carbon dioxide evolution test. Office, Prevention Pesticides and Toxic Substances Washington, DC.

7) US EPA (1996). Fate, Transport and Transformation Test Guideline. 835. 3100. Aerobic aquatic biodegradation. Office, Prevention Pesticides and Toxic Substances Washington, DC.

8) Gledhill WE (1975). Screening test for assessment of biodegradability: Linear alkyl benzene sulfonate. Appl Microbiol. 30: 922–929.

9) Weytjens D, Van Ginneken I and Painter HA (1994). The recovery of carbon dioxide in the Sturm test for ready biodegradability. Chemosphere 28: 801–812.

10) Ennis DM and Kramer A (1975). A rapid microtechnique for testing biodegradability of nylons and polyamides. J. Food Sci. 40: 181–185.

11) Ennis DM, Kramer A, Jameson CW, Mazzoccki PH and Bailey PH (1978). Appl. Env. Microbiol. 35: 51–53.

12) Boatman RJ, Cunningham SL and Ziegler DA (1986). A method for measuring the biodegradation of organic chemicals, Env. Toxicol. Chem. 5: 233–243.

13) Struijs J and Stoltenkamp J (1990). Head space determination of evolved carbon dioxide in a biodegradability screening test. Ecotox. Env. Safety 19: 204–211.

14) Birch RR and Fletcher RJ (1991). The application of dissolved inorganic carbon measurements to the study of aerobic biodegradability. Chemosphere 23: 507–524.

15) Birch RR, Biver C, Campagna R, Gledhill WE, Pagga U, Steber J, Reust H, and Bontinck WJ (1989). Screening of chemicals for anaerobic biodegradation. Chemosphere 19: 1527–1550.

▼**M4**

16) ISO 14593, (1999) Jakost vod – Hodnocení úplné aerobní biologické rozložitelnosti organických látek ve vodním prostředí – Metoda stanovení anorganického uhlíku v těsně uzavřených lahvičkách ($C0_2$ headspace metoda).

17) Battersby NS (1997). The ISO headspace $C0_2$ biodegradation test, Chemosphere 34: 1813–1822.

18) US EPA (1996). Fate, Transport and Transportation. 835,3120. Sealed vessel carbon dioxide production test. Office, Prevention Pesticides and Toxic Substance, Washington, DC.

19) Battersby NS, Ciccognani D, Evans MR, King D, Painter HA, Peterson DR and Starkey M (1999). An „inherent“ biodegradability test for oil products: description and results of an international ring test. Chemosphere 38: 3219–3235.

20) Kapitola C.4 této přílohy – Stanovení „snadné“ biologické rozložitelnosti.

21) OECD (1988). OECD Ring-test of methods for determining ready biodegradability: Chairman's report (M. Hashimoto; MITI) and final report (M. Kitano and M. Takatsuki; CITI). Paris.

22) Kapitola C.11 této přílohy – Zkouška na inhibici dýchání aktivovaného kalu.

23) Struijs J, Stoltenkamp-Wouterse MJ and Dekkers ALM (1995). A rationale for the appropriate amount of inoculum in ready biodegradability tests. Biodegradation 6: 319–327.

24) EU (1999). Ring-test of the ISO Headspace CO_2 method: application to surfactants: Surfactant Ring Test-1, Report EU4697, Water Research Centre, May 1999, Medmenham, SL7 2HD, UK.

25) ISO 10634 (1996) Jakost vod – Pokyny pro přípravu a zpracování ve vodě těžko rozpustných organických látek pro následující hodnocení jejich biologické rozložitelnosti ve vodním prostředí.

▼M4

Dodatek 1

ZKRATKY A DEFINICE

IC: Anorganický uhlík (*Inorganic carbon*).

TCO_2: Teoretický oxid uhličitý (theoretical carbon dioxide, $ThCO_2$) (mg) je množství oxidu uhličitého, které by mělo vzniknout ze známého nebo změřeného obsahu uhlíku ve zkoušené chemické látce za předpokladu její úplné mineralizace; vyjadřuje se rovněž v mg oxidu uhličitého uvolněného z 1 mg zkoušené látky.

DOC: Rozpuštěný organický uhlík (dissolved organic carbon) je celkový organický uhlík, který je přítomný v roztoku nebo projde přes filtr o velikosti pórů 0,45 μm nebo zůstane v supernatantu po odstřeďování po dobu 15 minut při odstředivém zrychlení 40 000 m/s^{-2} (což odpovídá odstředivé síle přibližně 4 000 g)

DIC: Rozpuštěný anorganický uhlík.

ThIC: Teoretická produkce anorganického uhlíku.

TIC: Celkový anorganický uhlík.

Snadno biologicky rozložitelná: je dohodnutá klasifikace chemických látek, které prošly určitými screeningovými zkouškami úplné biologické rozložitelnosti; tyto zkoušky jsou tak přísné, že lze předpokládat, že se látky budou ve vodném prostředí za aerobních podmínek rychle a úplně biologicky rozkládat.

10denní období rozkladu: je 10 dnů, které následují bezprostředně po dosažení 10 % biologického rozkladu.

Biologická rozložitelnost: je klasifikace chemických látek, pro něž existuje nepochybný důkaz o jejich biologické rozložitelnosti (primární nebo konečné) v kterékoli uznávané zkoušce biologické rozložitelnosti.

Úplný aerobní biologický rozklad: je stupeň rozkladu zkoušené látky dosažený po jejím úplném zužitkování mikroorganismy, vedoucí k produkci oxidu uhličitého, vody, minerálních solí a nové mikrobiální buněčné hmoty (biomasy).

Mineralizace: Mineralizace je úplný rozklad organické látky na CO_2 a H_2O za aerobních podmínek a na CH_4, CO_2 a H_2O za anaerobních podmínek.

Lagová fáze: Čas od začátku zkoušky až do doby dosažení aklimatizace a/nebo adaptace rozkládajících se mikroorganismů a vzrůstu stupně biologického rozkladu zkoušené chemické látky nebo organické chemické látky na detekovatelnou úroveň (např. 10 % maxima teoretického biologického rozkladu nebo nižší v závislosti na přesnosti techniky měření).

Doba rozkladu: Doba od konce lagové fáze až do doby, kdy bylo dosaženo 90 % maximálního stupně biologického rozkladu.

Prodleva (plato): Prodleva je fáze, kdy bylo dosaženo maximálního rozkladu a křivka biologického rozkladu se ustálila.

Zkoušená chemická látka: Jakákoliv látka nebo směs testovaná pomocí této zkušební metody.

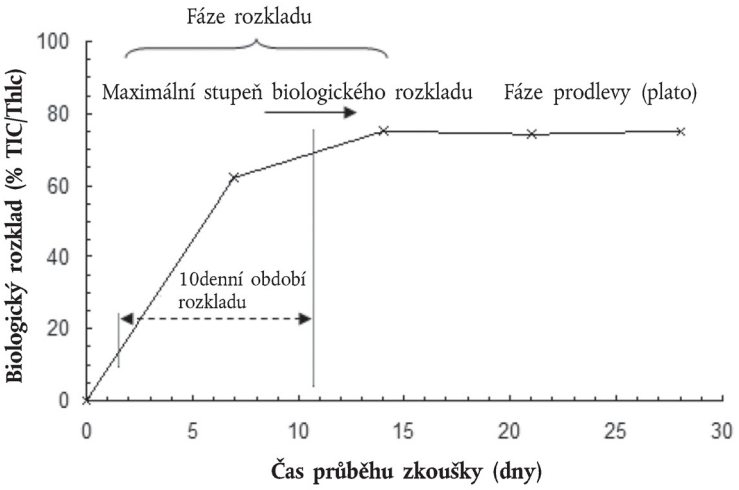
▼M4

Dodatek 2

Příklad křivky biologického rozkladu

Obrázek 1

Biologický rozklad oktan-1-olu CO_2 headspace metodou



Slovníček

Biologický rozklad:

Fáze rozkladu:

Maximální stupeň biologického rozkladu:

Fáze prodlevy (plato):

10denní období rozkladu:

Čas průběhu zkoušky (dny):

▼M4

C. 30 BIOAKUMULACE U TERESTRICKÝCH MÁLOŠTĚTINATCŮ

ÚVOD

1. Tato zkušební metoda odpovídá pokynu OECD pro zkoušení (TG) 317 (2010). Ze zkušebních metod týkajících se rozpadu v životním prostředí byly v roce 1996 publikovány Bioakumulace: Průtoková zkouška na rybách (kapitola C.13 této přílohy (49)) a v roce 2008 Bioakumulace u bentických máloštětinatců žijících v sedimentu (53). Extrapolovat údaje o bioakumulaci ve vodním prostředí na suchozemské organismy, jako jsou žížaly, je obtížné až nemožné. Pro stanovení bioakumulace chemických látek v půdě se v současné době užívají modelové výpočty založené na lipofilitě zkoušené chemické látky, např. (14, 37), jako např. v technických pokynech EU (19). Potřeba zkušební metody specifické pro určité prostředí již byla vyřešena, např. (55). Tato metoda je zvláště důležitá pro posouzení druhotné otravy v terestrických potravních řetězcích (4). Několik vnitrostátních zkušebních metod řeší problém bioakumulace u jiných organismů než u ryb, např. (2) a (72). Jednu z metod měření bioakumulace z kontaminovaných půd v žížalách (Eisenia fetida, Savigny) a kroužkovcích vyvinula Americká společnost pro zkoušení a materiály (3). Mezinárodně uznávaná metoda pro stanovení bioakumulace v obohacené půdě zlepší posuzování rizik, která představují chemické látky pro terestrické ekosystémy, např. (25, 29).

2. Půdu přijímající bezobratlí jsou exponováni chemickým látkám vázaným v půdě. Mezi tyto živočichy patří terestričtí máloštětinatci, kteří hrají významnou úlohu ve struktuře a funkci půdy (15), (20). Terestičtí máloštětinatci žijí v půdě a částečně na jejím povrchu (zejména ve vrstvě L) a často reprezentují nejpočetnější druh, pokud jde o biomasu (54). Jelikož tito živočichové víří půdu a slouží jako potrava, mohou mít silný vliv na biologickou dostupnost látek pro jiné organismy, jako jsou bezobratlí (např. draví roztoči a brouci, např. (64)) nebo dravci (např. lišky a racci) z řad obratlovců (18, 62). Některé druhy terestrických máloštětinatců, kteří jsou v současné době využíváni pro ekotoxikologické zkoušky, jsou popsány v dodatku 5.

3. Řadu podstatných a užitečných údajů pro provedení této zkušební metody bioakumulace v půdě poskytuje dokument „ASTM Standard Guide for Conducting Laboratory Soil Toxicity or Bioaccumulation Tests with the Lumbricid Earthworm Eisenia fetida and the Enchytraeid Potworm Enchytraeus albidus“ 3). Dalšími dokumenty, na které tato zkušební metoda odkazuje, je kapitola C.13 této přílohy Bioakumulace: Průtoková zkouška na rybách (49) a OECD TG 315: Bioakumulace u bentických máloštětinatců žijících v sedimentu (53). Významným zdrojem informací pro tuto zkušební metodu jsou rovněž praktické zkušenosti se studiemi bioakumulace v půdě a publikovaná literatura, např. (1, 5, 11, 12, 28, 40, 43, 45, 57, 59, 76, 78, 79).

4. Tato metoda je vhodná zejména pro testování stabilních, neutrálních organických chemických látek, které mají tendenci k adsorpci na půdu. Touto zkušební metodou lze rovněž testovat bioakumulaci s půdou spjatých stabilních organokovových sloučenin. Lze ji použít i pro kovy a jiné stopové prvky.

PŘEDPOKLADY

5. Zkoušky pro měření bioakumulace chemické látky v pozemních máloštětinatcích byly provedeny s těžkými kovy (viz např. (63)) a persistentními organickými chemickými látkami, jejichž hodnoty log K_{ow} se pohybují mezi 3,0 a 6,0 např. (40). Tyto zkoušky lze použít také pro:

— chemické látky, které mají log K_{ow} vyšší než 6,0 (superhydrofobní chemické látky),

▼M4

— chemické látky, které patří do kategorie organických látek, o nichž je známo, že mají potenciál bioakumulace v živých organismech, např. povrchově aktivní nebo vysoce adsorpční chemické látky,

— chemické látky, které vykazují potenciál pro bioakumulaci na základě strukturálních prvků, např. analogy chemické látky se známým bioakumulačním potenciálem, a

— kovy.

6. Informace o zkoušené chemické látce, jako je obecný název, chemický název, (optimálně název podle IUPAC), strukturní vzorec, registrační číslo CAS, čistota, bezpečnostní opatření, vhodné podmínky skladování a analytické metody, by měly být získány před zahájením studie. Kromě toho by měly být známy tyto údaje:

a) rozpustnost ve vodě;

b) rozdělovací koeficient oktanol-voda K_{ow};

c) rozdělovací koeficient půda-voda vyjádřený jako K_{oc};

d) tlak par;

e) rozložitelnost (např. v půdě, ve vodě);

f) známé metabolity.

7. Lze použít radioizotopově značené i neznačené zkoušené chemické látky. Pro usnadnění analýzy se však doporučuje použít radiotopově značenou zkoušenou chemickou látku. Rozhodnutí bude záviset na mezích stanovitelnosti nebo na požadavku na měření výchozí zkoušené chemické látky a metabolitů. Je-li použita radioizotopově značená zkoušená látka a měří-li se celkový obsah radioaktivního zbytku, je pro výpočet bioakumulačního faktoru (BAF) výchozí chemické látky a příslušných půdních metabolitů (viz odstavec 50) důležité, aby radioizotopově značené zbytky v půdě i ve zkušebních organismech a testovací organismy byly charakterizovány procentem výchozí zkoušené chemické látky a značené nevýchozí chemické látky, např. ve vzorcích odebraných v ustáleném stavu nebo na konci fáze příjmu. U měření radioaktivně neznačené organické zkoušené látky nebo kovů může být nutné popsanou metodu upravit například tak, aby vzniklo dostatečné množství biomasy. Měří-li se celkový obsah radioaktivního zbytku (počítáním scintilací v roztoku například po extrakci, spálení nebo solubilizaci tkáně), je hodnota bioakumulačního faktoru založena na výchozí zkoušené chemické látce a na metabolitech. Výpočet BAF by měl být přednostně založen na koncentraci výchozí zkoušené chemické látky v organismech a na celkovém objemu radioaktivních zbytků. Následně by měl být na základě BAF vypočten akumulační faktor sediment-biota (BSAF) normalizovaný na obsah lipidů v červech a obsah organického uhlíku (OC) v půdě z důvodů srovnatelnosti mezi výsledky různých bioakumulačních zkoušek.

8. Měla by být známa toxicita zkoušené látky pro druh použitý při zkoušce, například koncentrace vyvolávající účinek (EC_x) nebo letální koncentrace (LC_x) po dobu fáze příjmu (např. (19)). Zvolená koncentrace zkoušené látky by měla v optimálním případě být na úrovni 1 % její asymptotické hodnoty akutní LC_{50} a měla by být nejméně desetkrát vyšší než je mez detekce této látky v půdě při použité analytické metodě. Pokud je to možné, měla by být dána přednost hodnotám toxicity odvozeným z dlouhodobých studií o subletálních koncových bodech (51, 52). Pokud tyto údaje nejsou k dispozici, poskytne užitečné informace zkouška akutní toxicity (viz např. (23)).

▼M4

9. K dispozici musí být vhodná analytická metoda o známé správnosti, přesnosti a citlivosti pro kvantitativní stanovení chemické látky ve zkušebních roztocích, v půdě a v biologickém materiálu a dále podrobnosti o přípravě a uchovávání vzorků a materiálové bezpečnostní listy. Měly by být také známy meze stanovitelnosti zkoušené látky jak v půdě, tak v tkáních červů. Je-li použita zkoušená látka značená ^{14}C, měla by být známá specifická radioaktivita ((tj. Bq/mol) a aktivita nečistot vyjádřená v procentech. Specifická radioaktivita zkoušené chemické látky by měla být dostatečně vysoká, aby umožňovala analýzu a použité zkušební koncentrace by neměly vyvolávat toxické účinky.

10. Zkoušku je možno provést s umělou půdou nebo s přírodními půdami. U přírodních půd je před zahájením zkoušky třeba znát informace o vlastnosti užité přírodní půdy, jako je například původ půdy nebo jejích složek, pH, obsah organického uhlíku, distribuce částic (procento písku, prachu a jílu) a vodní kapacita (WHC) (3, 48).

PODSTATA ZKOUŠKY

11. Mezi parametry, které charakterizují bioakumulaci zkoušené chemické látky, patří bioakumulační faktor (BAF), rychlostní konstanta příjmu (k_s) a rychlostní konstanta vylučování (k_e). Definice jsou uvedeny v dodatku 1.

12. Zkouška se skládá ze dvou fází: fáze příjmu (expozice) a vylučovací (poexpoziční) fáze. Ve fázi příjmu jsou paralelní vzorky červů vystaveny působení půdy, která byla obohacena zkoušenou chemickou látkou. Zároveň se zkušebními organismy je za stejných podmínek, ale bez zkoušené chemické látky držena kontrolní skupina červů. Měří se hmotnost po vysušení a obsah lipidů ve zkušebních organismech. To lze provést pomocí červů v kontrolní skupině. Analytické hodnoty pozadí (slepé) lze získat analýzou vzorků červů z kontrolní skupiny a půdy. Ve fázi vylučování jsou červi přemístěni do půdy bez zkoušené chemické látky. Fáze vylučování je nutná vždy s výjimkou případů zanedbatelné absorpce zkoušené chemické látky v průběhu fáze expozice. Fáze vylučování poskytuje informace o míře vylučování testované látky zkušebními organismy (např. (27)). Pokud nebylo ve fázi příjmu dosaženo ustáleného stavu, mělo by být stanovení kinetických parametrů – kinetického bioakumulačního faktoru BAF_K a rychlostní konstanty (rychlostních konstant) příjmu a vylučování – založeno v optimálním případě na současném proložení výsledků fáze příjmu a fáze vyprázdnění. Koncentrace zkoušené látky v červech a na nich je sledována v průběhu obou fází zkoušky.

13. Během fáze příjmu se provádí měření v době odběru vzorků po dobu až 14 dnů (roupice) nebo 21 dnů (žížaly), dokud není dosaženo ustáleného stavu (11, 12, 67). Ustálený stav nastává, jestliže vynesení koncentrace červů v čase je rovnoběžné s časovou osou a tři po sobě jdoucí analýzy koncentrací provedené na vzorcích odebraných nejméně v dvoudenních intervalech se vzájemně neliší o více než ± 20 % na základě statistických srovnání (např. analýza rozptylu, regresní analýza).

14. Fáze vylučování spočívá v přenesení zkušebních organismů do nádob, které obsahují stejný substrát bez obsahu zkoušené chemické látky. V průběhu fáze vyprázdnění se měření provádějí v době odběru vzorků po dobu až 14 dnů (roupice) nebo 21 dnů (žížaly), pokud již dříve nebylo analyticky stanoveno 90 % snížení reziduí zkoušené chemické látky v červech. Koncentrace zkoušené chemické látky v červech na konci fáze vyprázdnění se uvede jako neodstraněná rezidua. Bioakumulační faktor ustáleného stavu

▼M4

(BAF_{SS}) se optimálně vypočte jako poměr koncentrace v červech (C_a) a v půdě (C_s) ve zřetelném ustáleném stavu, a jako kinetický bioakumulační faktor BAF_K, tj. poměr rychlostní konstanty příjmu z půdy (k_s) a rychlostní konstanty vylučování (k_e) (definice viz dodatek 1) za předpokladu kinetiky prvního řádu (výpočty viz dodatek 2). Pokud kinetiku prvního řádu zjevně nelze použít, měly by být použity jiné modely.

15. Rychlostní konstanta příjmu, rychlostní konstanta (nebo konstanty, jsou-li použity složitější modely) vylučování, kinetický bioakumulační faktor (BAF_K) a, je-li to možné, intervaly spolehlivosti každého z těchto parametrů se vypočítají z modelových rovnic za použití počítače (návod viz dodatek 2). Oprávněnost jakéhokoli modelu lze určit např. z korelačního koeficientu nebo z koeficientu determinace (koeficienty, jejichž hodnota se blíží jedné, indikují oprávněnost), nebo na základě druhé mocniny chí (χ^2). Také velikost standardní odchylky nebo intervalu spolehlivosti kolem odhadovaných parametrů mohou svědčit o oprávněnosti modelu.

16. Ke snížení rozptylu výsledků zkoušek pro zkoušené chemické látky s vysokou lipofilností by měly být bioakumulační faktory vyjádřeny ve vztahu k obsahu lipidů a obsahu organického uhlíku (kg organického uhlíku v půdě (OC) na kg lipidů v červech). Tento přístup je založen na skutečnosti, že u některých skupin chemických látek existuje jasný vztah mezi potenciálem bioakumulace a lipofilností, což je široce používáno v případě ryb (47). Existuje vztah mezi obsahem lipidů v rybách a bioakumulací těchto chemických látek. U bentických organismů byly zjištěny podobné korelace např. (30, 44). Obdobně byla tato korelace prokázána u terestrických máloštětinatců, např. (5, 6, 7, 14). Pokud je k dispozici dostatečné množství tkání červů, lze stanovit obsah lipidů u pokusných živočichů na stejném biologickém materiálu, který byl použit ke stanovení koncentrace zkoušené chemické látky. Ke stanovení obsahu lipidů lze použít rovněž kontrolní živočichy.

PLATNOST ZKOUŠKY

17. Má-li být zkouška platná, musí být při kontrole i expozici splněny následující podmínky:

— Celková úmrtnost ve fázi příjmu a ve fázi vyprázdnění nesmí na konci zkoušky překročit 10 % (žížaly) nebo 20 % (roupice) z celkového počtu vložených červů.

— Průměrná ztráta hmotnosti u *Eisenia fetida a Eisenia andrei* měřená na konci fáze příjmu a na konci fáze vylučování by neměla přesáhnout 20 % v porovnání s původní čerstvou hmotností (f.w.) na začátku každé fáze.

POPIS METODY

Testovací druh

18. Pro zkoušky bioakumulace se doporučuje používat několik druhů terestrických máloštětinatců. Nejběžněji používané druhy *Eisenia fetida* nebo *Eisenia Andrei* (Lumbricidae) nebo *Enchytraeus albidus*, *Enchytraeus crypticus*, nebo *Enchytraeus luxuriosus* (Enchytraeidae)) jsou popsány v dodatku 5.

▼M4

Přístroje a pomůcky

19. U všech částí zařízení je třeba se vyhýbat použití materiálů, které se mohou rozpouštět, adsorbovat zkoušenou chemickou látku nebo vyluhovat jiné chemické látky a mají nepříznivý účinek na pokusné živočichy. Lze použít standardní pravoúhlé nebo válcové nádrže vyrobené z chemicky inertního materiálu a mající vhodný objem s ohledem na náplň, tj. počet zkušebních červů. Veškeré vybavení, které se dostane do styku se zkušebním médiem, může být vyrobeno z korozivzdorné oceli, plastu nebo skla. Zkušební nádoby by měly být vhodným způsobem zakryty, aby se zabránilo úniku červů, přičemž je nutné zajistit dostatečný přívod vzduchu. Pro látky s vysokými adsorpčními koeficienty, jako jsou syntetické pyrethroidy, může být nutné použít silanizované sklo. V těchto případech musí být zařízení po použití zlikvidováno (49). U radioaktivně značených zkoušených látek a těkavých chemických látek je nutné zabránit jejich úniku. Je nutno použít lapače (např. skleněné promývačky plynu) obsahující vhodný absorbent schopný udržet zbytky odpařující se ze zkušebních nádob.

Půda

20. Zkušební půda by měla mít takovou kvalitu, která umožní přežití zkušebních organismů, a pokud možno jejich reprodukci po dobu aklimatizace a v průběhu fází zkoušky, aniž by vykazovaly abnormální vzhled nebo chování. Červi by se měli zavrtat do půdy.

21. Jako zkušební substrát se doporučuje užít umělou půdu popsanou v kapitole C.8 této přílohy (48). Příprava umělé půdy pro použití při zkouškách bioakumulace a doporučení pro skladování umělé půdy jsou uvedeny v příloze 4. Umělou půdu vysušenou na vzduchu lze uchovávat při pokojové teplotě až do použití.

22. Jako zkušební a/nebo kultivační půdu však lze použít i přírodní půdu z neznečištěných lokalit. Přírodní půdy by měly být charakterizovány alespoň podle původu (místa odběru), pH, obsahu organického uhlíku, distribuce částic (procento písku, prachu a jílu), maximální vodní kapacity (WHC_{max}) a procenta obsahu vody (3). Užitečné informace by měla poskytnout analýza půdy nebo jejích složek na mikroskopické znečišťující látky před použitím. Pokud se využívá zemědělská půda z pole, neměla by být ošetřena přípravky na ochranu rostlin ani hnojem od exponovaných zvířat jako hnojivem po dobu nejméně jednoho roku a organickými hnojivy po dobu nejméně šesti měsíců před odběrem vzorku (50). Postupy manipulace s přírodními půdami před použitím při ekotoxikologických laboratorních zkouškách na máloštětinatcích jsou popsány v bodě (3). U přírodní půdy by doba skladování v laboratoři měla být co nejkratší.

Aplikace zkoušené chemické látky

23. Zkoušená chemická látka se přidá do půdy. Měly by být vzaty v úvahu fyzikálně-chemické vlastnosti zkoušené chemické látky. Ve vodě rozpustná zkoušená chemická látka by měla být před smísením s půdou zcela rozpuštěna ve vodě. Doporučený postup vmíchávání těžko rozpustných zkoušených chemických látek zahrnuje obalení jedné nebo více složek (umělé) půdy zkoušenou chemickou látkou. Například křemenný písek nebo jeho část se ponoří do roztoku zkoušené chemické látky ve vhodném organickém rozpouštědle, které se pak pomalu odpaří do sucha. Obalenou frakci lze následně promíchat s vlhkou půdou. Hlavní výhodou tohoto postupu je, že se do půdy nevpravují žádná rozpouštědla. Je-li použita přírodní půda, lze zkoušenou chemickou látku přidat vmícháním části půdy vysušené na vzduchu, jak bylo popsáno výše u umělé půdy, nebo vmícháním zkoušené

▼M4

chemické látky do vlhké půdy s následným odpařováním, pokud bylo použito solubilizační činidlo. Obecně platí, že je třeba pokud možno se vyhnout kontaktu vlhké půdy s rozpouštědly. Je třeba zvážit následující skutečnosti (3):

— Užije-li se jiné rozpouštědlo než voda, mělo by být takové, aby bylo mísitelné s vodou a/nebo odbouratelné (například odpařením) tak, že v půdě zůstane jen zkoušená chemická látka.

— Použije-li se kontrola rozpouštědla, není nutno provést negativní kontrolu. Kontrola rozpouštědla by měla obsahovat nejvyšší koncentraci rozpouštědla přidávaného do půdy a mělo by při ní být užito rozpouštědla ze stejné šarže, která byla použita pro zásobní roztok. Hlavním kritériem pro výběr vhodného solubilizačního činidla by měla být toxicita a těkavost rozpouštědla a rozpustnost zkoušené látky ve zvoleném rozpouštědle.

24. Pro chemické látky, které jsou obtížně rozpustné ve vodě a v organických rozpouštědlech, lze smísit 2,0–2,5 g jemně rozemletého křemenného písku na zkušební nádobu, např. pomocí třecí misky a tloučku s takovým množstvím zkoušené látky, aby bylo dosaženo požadované zkušební koncentrace. Tato směs křemenného písku a zkoušené chemické látky se přidá do navlhčené půdy a důkladně se promíchá s příslušným množstvím deionizované vody, aby bylo dosaženo požadované vlhkosti. Konečná směs se rozdělí do zkušebních nádob. Tento postup se opakuje pro každou zkušební koncentraci a připraví se také příslušná kontrola s 2,0–2,5 g jemně rozemletého křemenného písku na zkušební nádobu.

25. Po vmíchání by měla být stanovena koncentrace zkoušené látky v půdě. Před vložením zkušebních organismů je třeba ověřit homogenní distribuci zkoušené chemické látky v půdě. Měla by být uvedena metoda vmíchání a důvody pro výběr konkrétní metody vmíchání (24).

26. Rovnováha mezi půdou a fází kapilární vody by měla být v ideálním případě nastolena před přidáním organismů; doporučuje se doba čtyř dnů při teplotě 20 °C. Pro řadu organických chemických látek těžko rozpustných ve vodě se doba potřebná k dosažení skutečné rovnováhy mezi adsorbovanou a rozpuštěnou frakcí počítá ve dnech nebo v měsících. V závislosti na účelu studie, například když je potřeba napodobit podmínky okolního prostředí, může obohacená půda „zrát“ i déle, například u kovů po dobu tří týdnů při teplotě 20 °C (22).

Kultivace zkušebních organismů

27. Červi by měli být v optimálním případě nepřetržitě udržováni v laboratorních podmínkách. Pokyny týkající se metod laboratorní kultury pro *Eisenia fetida*, *Eisenia Andrei* a roupice jsou uvedeny v příloze 5 (viz také (48, 51, 52)).

28. Červi použití při zkouškách nesmí vykazovat pozorovatelné nemoci, abnormality a parazity.

PROVEDENÍ ZKOUŠKY

29. Zkušební organismy se exponují zkoušené látce během fáze příjmu. Fáze příjmu by měla trvat 14 dnů (roupice) nebo 21 dnů (žížaly), pokud není prokázáno, že bylo dosaženo ustáleného stavu.

▼M4

30. Ve fázi vylučování se červi přenesou do půdy bez zkoušené látky. První vzorek by měl být odebrán 4–24 hodin po zahájení fáze vylučování. Příklady harmonogramů odběru vzorků pro jedenadvacetidenní fázi příjmu a jedenadvacetidenní fázi vylučování jsou uvedeny v dodatku 3.

Zkušební organismy

31. Řada druhů terestrických roupic má jen velmi nízkou individuální hmotnost (např. 5–10 mg hmotnosti ve vlhkém stavu na jedince u *Enchytraeus albidus* a ještě méně u *Enchytraeus crypticus* či *Enchytraeus luxuriosus*); aby bylo možné provést vážení a chemickou analýzu, může být nezbytné sdružovat červy v paralelních zkušebních nádobách (tj. k získání jednoho analytického výsledku tkáně se použijí všichni červi v paralelní nádobě). Do každé paralelní nádoby se vloží 20 jednotlivých roupic a použijí se nejméně tři paralelní nádoby. V případě, že jsou meze stanovitelnosti zkoušené látky příliš vysoké, může být potřeba více červů. U zkušebních druhů s vyšší individuální hmotnosti (*Eisenia fetida* a *Eisenia Andrei*) lze použít paralelní nádoby obsahující pouze jednoho jedince.

32. Žížaly použité ke zkoušce by měly mít podobnou hmotnost (např. *Eisenia fetida* a *Eisenia Andrei* by měly mít individuální hmotnost 250–600 mg). Roupice např. *Enchytraeus albidus*) by měly být přibližně 1 cm dlouhé. Všichni červi užití pro konkrétní zkoušku musí pocházet ze stejného zdroje a mělo by se jednat o dospělé jedince s opaskem (viz příloha 5). Vzhledem k tomu, že hmotnost a stáří živočicha může mít vliv na hodnoty BAF (např. z důvodu různého obsahu lipidů a/nebo přítomnosti vajíček), měly by být tyto parametry přesně zaznamenány a zohledněny při interpretaci výsledků. Kromě toho mohou být v průběhu doby expozice vyprodukovány kokony, což rovněž ovlivní hodnoty BAF. Doporučuje se zvážit před zkouškou dílčí vzorek zkoušených červů s cílem odhadnout střední hmotnost ve vlhkém a v suchém stavu.

33. Volí se vysoký poměr množství půdy k počtu červů, aby se minimalizovalo snížení koncentrace zkoušené chemické látky v půdě v průběhu fáze příjmu. V případě *Eisenia fetida* a *Eisenia Andrei* se doporučuje minimální množství 50 g suché hmotnosti (d.w.) půdy na jednoho červa a v případě roupic minimálně 10–20 g suché hmotnosti půdy na zkušební nádobu. Nádoby by měly obsahovat vrstvu půdy o tloušťce 2–3 cm (roupice) nebo 4–5 cm (žížaly).

34. Červi použití ke zkoušce se vyjmou z kultury (např. roupice pomocí klenotnické pinzety). Dospělí jedinci se přenesou na neexponovanou zkušební půdu za účelem aklimatizace a krmí se (viz odstavec 36). V případě, že se zkušební podmínky liší od kultivačních podmínek, měla by pro přizpůsobení červů zkušebním podmínkám postačovat aklimatizační fáze v trvání 24 až 72 hodin. Po aklimatizaci se žížaly omyjí přenesením do skleněných misek (např. Petriho misek), které obsahují čistou vodu, a následně se před přidáním do zkušební půdy zváží. Před zvážením se z červů odstraní přebytečná voda jemným oklepáním o okraj misky nebo opatrným osušením do sucha pomocí lehce navlhčeného papírového ručníku.

35. Zavrtávání zkušebních organismů by mělo být sledováno a zaznamenáváno. Při zkouškách s žížalami se jedinci (v kontrolních i exponovaných nádobách), běžně zavrtají do půdy do několika hodin; tuto skutečnost je nutno zkontrolovat nejpozději do 24 hodin po vložení červů do zkušebních nádob. V případě, že se žížaly nezavrtají do půdy (např. více než 10 % v době přesahující polovinu fáze příjmu), znamená to, že buď nejsou vytvořeny vhodné zkušební podmínky, nebo zkušební organismy nejsou zdravé.

▼M4

V takovém případě je nutno zkoušku ukončit a opakovat. Roupice žijí hlavně v intersticiálních pórech v půdě a jejich integument je často v kontaktu s okolním substrátem jen částečně; expozice zavrtávajících se a nezavrtávajících se roupic se považuje za rovnocennou a nezavrtávání roupic nemusí nutně vyžadovat opakování zkoušky.

Krmení

36. Krmení by se mělo předpokládat při použití půdy s nízkým celkovým obsahem organického uhlíku. Při použití umělé půdy se doporučuje týdenní frekvence krmení (tj. červi by měli být krmeni jednou týdně) 7 mg sušeného hnoje na gram suché hmotnosti půdy pro žížaly a týdenní frekvence 2–2,5 mg mletých ovesných vloček na gram suché hmotnosti půdy pro roupice (11). První krmná dávka se smíchá s půdou bezprostředně před přidáním zkušebních organismů. Optimálně by měl být užíván stejný typ krmiva jako v kulturách (viz dodatek 5).

Světlo a teplota

37. Zkouška se provede za řízených světelných podmínek v prostorách, kde jsou umístěny zkušební nádoby, nejlépe 16 h světlo / 8 h tma, optimálně při intenzitě osvětlení 400 lux až 800 lux (3). Zkušební teplota by se měla udržovat na 20 ± 2 °C po celou dobu zkoušky.

Zkušební koncentrace

38. Použije se jedna koncentrace. Situace, kdy je vyžadována (jsou vyžadovány) další koncentrace, by měly být zdůvodněny. Pokud se toxicita (EC_x) zkoušené chemické látky blíží mezi detekce analytické metody, doporučuje se užití zkoušené látky značené radioizotopy s vysokou specifickou radioaktivitou. Pro kovy by její koncentrace měla být vyšší než koncentrace v pozadí ve tkáních a v půdě.

Paralelní vzorky

39. Pro kinetická měření (ve fázi příjmu a vylučování) je minimální počet exponovaných paralelních nádob tři na jeden odběr. Celkový počet připravených paralelních nádob by měl být dostatečný k pokrytí všech odběrů ve fázi příjmu i vylučování.

40. Pro biologická pozorování a měření (např. poměr hmotnosti ve vlhkém stavu a suché hmotnosti, obsah lipidů) a pro analýzu koncentrací v pozadí v červech a půdě je zapotřebí nejméně 12 paralelních nádob negativních kontrol (čtyři vzorky odebrané na začátku a čtyři na konci fáze příjmu a čtyři na konci fáze vylučování) v případě, že není použito jiné rozpouštědlo než voda. Pokud bylo pro aplikaci zkoušené chemické látky užito jakékoli solubilizační činidlo, měly by být kromě exponovaných paralelních nádob připraveny i kontroly rozpouštědla (ze čtyř paralelních nádob by měly být odebrány vzorky na začátku, ze čtyř na konci fáze příjmu a ze čtyř na konci fáze vylučování), které budou obsahovat všechny složky s výjimkou zkoušené látky. V tomto případě je možno použít další čtyři paralelní nádoby jako negativní kontroly (bez rozpouštědla) za účelem volitelného odběru vzorků na konci fáze příjmu. Tyto paralelní nádoby lze biologicky srovnat s kontrolou rozpouštědla s cílem získat informace o možném vlivu rozpouštědla na zkušební organismy. Doporučuje se použít dostatečný počet dalších rezervních paralelních nádob (např. osm) pro expozici a kontrolu.

▼M4

Četnost měření kvality půdy

41. Na počátku a na konci fáze příjmu a fáze vyprázdnění se změří pH půdy, vlhkost půdy a teplota (kontinuálně) ve zkušební místnosti. Jednou týdně by se měla kontrolovat vlhkost půdy zvážením zkušebních nádob a porovnáním jejich skutečné hmotnosti s počáteční hmotností na začátku zkoušky. Ztráty vody by měly být kompenzovány přidáním deionizované vody.

Odběr vzorků a analýza červů a půdy

42. Příklad harmonogramu fází příjmu a vylučování u bioakumulačních zkoušek na žížalách a roupicích je uveden v dodatku 3.

43. Vzorky půdy ze zkušebních nádob pro stanovení koncentrace zkoušené chemické látky se odebírají před vložením červů, během fáze příjmu a během fáze vylučování. Během zkoušky se stanoví koncentrace zkoušené chemické látky v červech a v půdě. Obecně platí, že se měří celkové koncentrace v půdě. Nepovinně lze měřit koncentrace v kapilární vodě, a v takovém případě je před zahájením studie nutno uvést zdůvodnění a vhodné metody, které jsou zahrnuty také do zprávy.

44. Vzorky z červů a půdy se odebírají nejméně šestkrát během fáze příjmu a fáze vylučování. V případě, že se prokáže stabilita zkoušené chemické látky, lze počet analýz půdy snížit. Doporučuje se analyzovat nejméně tři paralelní vzorky na začátku a na konci fáze příjmu. V případě, že se koncentrace v půdě měřená na konci fáze příjmu liší od počáteční koncentrace o více než 30 %, měly by být analyzovány i vzorky půdy odebrané v jiných termínech.

45. Červi v dané paralelní nádobě se vyjmou z půdy při každém odběru (např. rozprostřením půdy z paralelní nádoby na mělkou podložku a vyjmutím červů pomocí měkké klenotnické pinzety) a rychle se opláchnou vodou na mělké skleněné nebo ocelové podložce. Odstraní se přebytečná voda (viz bod 34). Červi se opatrně přenesou do předem zvážené nádoby a okamžitě se zváží, včetně střevního obsahu.

46. Žížalám (*Eisenia* sp.) by pak mělo být umožněno přes noc vyprázdnit střeva např. na vlhkém filtračním papíru v přikryté Petriho misce (viz bod 34). Po vyprázdnění by měla být stanovena hmotnost červů za účelem posouzení možného úbytku biomasy během zkoušky (viz kritéria platnosti v bodě 17). Vážení a analýza tkání u roupic se provádí bez vyprázdnění, které by bylo technicky obtížné vzhledem k malé velikosti těchto červů. Po konečném určení hmotnosti by měli být červi okamžitě usmrceni nejvhodnější metodou (např. pomocí tekutého dusíku nebo zmrazením při teplotách pod –18 °C).

47. V průběhu fáze vylučování nahradí červi kontaminovaný střevní obsah čistou zeminou. To znamená, že měření u nevyprázdněných červů (v tomto kontextu roupic), kde byly odebrány vzorky bezprostředně před fází vylučování, obsahují kontaminovanou půdu ze střeva. U vodních máloštětinatců se předpokládá, že po počátečních 4–24 hodinách vylučovací fáze je již většina kontaminovaného obsahu střeva nahrazena čistým sedimentem, např. (46). Obdobné výsledky jsou uváděny u žížal v případě studií o hromadění radioaktivně značeného kadmia a zinku (78). U nevyprázdněných roupic lze koncentraci tohoto prvního vzorku vylučovací fáze považovat za koncentraci v tkáni po vyprázdnění střeva. Pro zohlednění naředění koncentrace zkoušené látky nekontaminovanou půdou v průběhu fáze vylučování lze odhadnout hmotnost střevního obsahu z poměru hmotnosti červa ve vlhkém stavu a hmotnosti popela po spálení červa, případně z poměru suché hmotnosti červa a hmotnosti popela po spálení červa.

▼M4

48. Vzorky půdy a červů se pokud možno analyzují ihned po vyjmutí (tj. do 1–2 dnů) s cílem předejít rozkladu nebo jiným ztrátám a výpočet přibližné rychlosti příjmu a vylučování se doporučuje provést ještě v průběhu zkoušky. Neprovede-li se analýza okamžitě, vzorky se vhodným způsobem uchovají, např. hlubokým zmrazením (≤ –18 °C).

49. Je třeba zkontrolovat, že přesnost a reprodukovatelnost chemické analýzy a rovněž výtěžek zkoušené látky jak z půdy, tak ze vzorků červů jsou pro danou analytickou metodu dostatečné; uvádí se rovněž účinnost extrakce, mez detekce (LOD) a mez kvantifikace (LOQ). Stejně tak je třeba zkontrolovat, zda se zkoušená chemická látka nevyskytuje v kontrolních nádobách v koncentracích vyšších než koncentrace v pozadí. Pokud je koncentrace zkoušené chemické látky ve zkušebním organismu u kontrolní skupiny červů Ca > 0, měla by být zahrnuta do výpočtu kinetických parametrů (viz dodatek 2). Všechny vzorky by měly být v průběhu celé zkoušky zpracovávány tak, aby se minimalizovala kontaminace a ztráty (např. v důsledku adsorpce zkoušené chemické látky odběrným zařízením).

50. Jsou-li použity zkušební chemické látky značené radioizotopy, je možné provést analýzu pro výchozí látku i s metabolity. Kvantifikace výchozí zkušební chemické látky a metabolitů v ustáleném stavu nebo na konci fáze příjmu poskytuje důležité informace. Následně by měla být provedena separace, aby mohla být výchozí látka analyzována samostatně. Pokud obsah radioaktivity v jednotlivých metabolitech přesáhne 10 % celkové radioaktivity v analyzovaném vzorku (vzorcích), doporučuje se stanovit i tyto metabolity.

51. Měl by být zaznamenán a hlášen celkový vývin a vývin zkoušené látky v červech, v půdě a případně i v lapačích obsahujících absorbenty k zachycení odpařené zkoušené chemické látky.

52. U roupic, které jsou menší než žížaly, je přijatelné sdružování jedinců odebraných jako vzorek z dané zkušební nádoby. Pokud sdružování znamená redukci počtu paralelních nádob, omezuje to statistické postupy, které lze na údaje aplikovat. Pokud je vyžadován určitý statistický postup a statistická váha, měl by být ve zkoušce nasazen přiměřený počet paralelních zkušebních nádob vyhovující požadovanému sdružování, postupu a statistické váze.

53. Doporučuje se, aby byla hodnota BAF vyjádřena jako funkce celkové suché hmotnosti, a bude-li to vyžadováno (např. u vysoce hydrofobních chemických látek), také jako funkce obsahu lipidů. Pro stanovení obsahu lipidů by měla být použita vhodná metoda (pro tento účel by měly být přizpůsobeny některé již existující metody – např. (31), (58). yto metody využívají extrakci pomocí chloroformu/methanolu. Aby se zabránilo používání chlorovaných rozpouštědel, měla by však být použita modifikace Bligh/Dyerovy metody (9) uvedené v odstavci (17). Vzhledem k tomu, že různé metody nemusí poskytovat stejné hodnoty (10), je důležité uvést podrobnosti o použité metodě. Je-li to možné, tj. pokud je k dispozici dostatečné množství tkáně červů, měla by být analýza lipidů provedena optimálně na stejném vzorku extraktu, který byl užit pro analýzu zkoušené chemické látky, neboť lipidy musí být často z extraktu před chromatografickou analýzou odstraněny. Pro stanovení obsahu lipidů lze použít rovněž kontrolní živočichy a tento obsah lze pak použít k normalizaci hodnot BAF. Tento druhý postup snižuje kontaminaci zařízení zkoušenou chemickou látkou.

▼M4

ÚDAJE A JEJICH PŘEDKLÁDÁNÍ

Zpracování výsledků

54. Křivka příjmu zkoušené látky se sestrojí vynesením její koncentrace v červech nebo na nich v průběhu fáze příjmu proti času v lineárním měřítku. Dosáhla-li křivka fáze plató čili ustáleného stavu (viz definice v dodatku 1), vypočítá se hodnota bioakumulačního faktoru v ustáleném stavu BAF_{SS} z poměru:

$$\frac{C_a \text{v ustáleném stavu nebo na konci fáze příjmu (střední hodnota)}}{C_s \text{v ustáleném stavu nebo na konci fáze příjmu (střední hodnota)}}$$

C_a je koncentrace zkoušené chemické látky ve zkušebním organismu,

C_s je koncentrace zkoušené chemické látky v půdě.

55. Není-li dosaženo ustáleného stavu, měla by být místo hodnoty BAF_{SS} vypočtena hodnota BAF_K na základě rychlostních konstant, jak je popsáno níže:

— Stanoví se akumulační faktor (BAF_K) jako poměr k_s/k_e.

— Rychlost příjmu a vylučování se optimálně vypočtou současně (viz rovnice 11 v dodatku 2).

— Rychlostní konstanta vylučování (k_e) se obvykle stanoví z křivky vylučování (tj. grafu poklesu koncentrace zkoušené chemické látky v červech v průběhu fáze vylučování). Následně se vypočte rychlostní konstanta příjmu pomocí hodnoty k_e a hodnoty C_a, odvozené z křivky příjmu (popis těchto metod viz dodatek 2). Upřednostňovanou metodou pro získání hodnoty BAF_K a rychlostních konstant k_s a k_e je metoda nelineárního odhadu parametrů s využitím počítače. Není-li zjevně křivka vylučování křivkou prvního řádu, měly by být použity složitější modely.

Protokol o zkoušce

56. Protokol o zkoušce by měl obsahovat tyto informace:

Zkoušená látka:

— veškeré dostupné informace o akutní nebo dlouhodobé toxicitě (např. EC_x, LC_x“ NOEC) zkoušené chemické látky pro půdní máloštětinatce,

— čistotu, fyzikální povahu a fyzikálně-chemické vlastnosti, např. log K_{ow}, rozpustnost ve vodě,

— chemické identifikační údaje; zdroj zkoušené položky, identifikaci a koncentraci případného použitého rozpouštědla,

— v případě značení radioaktivními izotopy jejich přesnou polohu, specifickou radioaktivitu a radiochemickou čistotu.

Testovací druh:

— vědecký název, kmen, zdroj, případné předběžné ošetření, aklimatizace, stáří, rozmezí velikostí atd.

▼M4

Zkušební podmínky:

— použitý zkušební postup,

— typ a charakteristiky použitého osvětlení a fotoperioda (fotoperiody),

— uspořádání zkoušky (např. počet a velikost zkušebních nádob, hmotnost půdy a tloušťka půdní vrstvy, počet paralelních nádob, počet červů v jedné paralelní nádobě, počet zkušebních koncentrací, délka fází příjmu a vylučování, četnost odběru vzorků),

— zdůvodnění výběru materiálu zkušební nádoby,

— metoda přípravy a aplikace zkoušené položky a důvody pro výběr konkrétní metody,

— nominální zkušební koncentrace, střední hodnoty naměřených koncentrací ve zkušebních nádobách, jejich směrodatné odchylky a metody, jimiž byly tyto hodnoty získány,

— zdroj složek umělé půdy nebo – v případě užití přírodního média – původ půdy, popis jakékoli předchozí úpravy, výsledky kontrol (přežití, vývoj biomasy, reprodukce), charakteristika půdy, (pH, obsah celkového organického uhlíku, distribuce částic (procento písku, prachu a jílu), procento obsahu vody WHC_{max} na začátku a na konci zkoušky a jiná provedená měření),

— podrobné informace o expozici vzorků půdy a červů včetně podrobností o přípravě, uchovávání, postupech vmíchávání, extrakci a analytických postupech (a přesnosti), pokud jde o zkoušenou látku v červech a půdě, obsah lipidů (je-li měřen) a výtěžky zkoušené položky.

Výsledky:

— úhyn kontrolních červů a červů v každé zkušební nádobě a jakékoli pozorované neobvyklé chování (např. snaha uniknout z půdy, nerozmnožování v bioakumulačních zkouškách na roupicích),

— poměr suché hmotnosti půdy a zkušebních organismů k jejich hmotnosti ve vlhkém stavu (užitečné pro normalizaci),

— hmotnost červů ve vlhkém stavu při každém odběru; u žížal vlhká hmotnost na začátku zkoušky a po každém odběru před pročištěním střev a po něm,

— obsah lipidů ve zkoušených organismech (je-li stanoven),

— křivky kinetiky příjmu a vylučování zkoušené chemické látky červy a doba dosažení ustáleného stavu,

— hodnoty C_a a C_s (popřípadě se směrodatnými odchylkami a rozpětím) pro všechny odběry (hodnota C_a se vyjadřuje v g/kg vlhké a suché hmotnosti celého těla, hodnota C_s se vyjadřuje v g/kg vlhké a suché hmotnosti půdy). Pokud je vyžadován akumulační faktor biota-půda (BSAF) (například pro porovnání výsledků dvou nebo více zkoušek provedených s živočichy s odlišným obsahem lipidů), lze navíc vyjádřit i hodnotu C_a jako g/kg obsahu lipidů v organismu a hodnotu C_s jako g/kg organického uhlíku (OC) v půdě.

— dodatečně lze uvést i BAF (vyjádřený v kg půdy na·kg červů), rychlostní konstantu příjmu půdy k_s (vyjádřenou v g půdy na kg červů za den) a rychlostní konstantu vylučování k_e (vyjádřenou v číselné hodnotě za den); BSAF (vyjádřený v kg organického půdního uhlíku na kg obsahu lipidů v červech),

▼M4

— měří-li se, procentuální podíl výchozí chemické látky, metabolitů a vázaných reziduí (tj. procentní podíl zkoušené chemické látky, který nelze extrahovat běžnými metodami extrakce) zjištěný v půdě a ve zkoušených živočiších,

— metody užívané pro statistické analýzy dat.

Vyhodnocení výsledků

— soulad výsledků s kritérii validity uvedenými v odstavci 17,

— neočekávané nebo neobvyklé výsledky, např. neúplné odstranění zkoušené látky z pokusných zvířat.

LITERATURA:

1) Amorim M (2000). Chronic and toxicokinetic behavior of Lindane (γ-HCH) in the Enchytraeid Enchytraeus albidus. Master thesis, University Coimbra.

2) ASTM (2000). Standard guide for the determination of the bioaccumulation of sediment-associated contaminants by benthic invertebrates. American Society for Testing and Materials, E 1688-00a.

3) ASTM International (2004). Standard guide for conducting laboratory soil toxicity or bioaccumulation tests with the Lumbricid earthworm *Eisenia fetida* and the Enchytraeid potworm *Enchytraeus albidus.* ASTM International, E1676-04: 26 pp.

4) Beek B, Boehling S, Bruckmann U, Franke C, Joehncke U, Studinger G (2000). The assessment of bioaccumulation. In Hutzinger, O. (editor), The Handbook of Environmental Chemistry, Vol. 2 Part J (Vol. editor: B. Beek): Bioaccumulation - New Aspects and Developments. Springer-Verlag Berlin Heidelberg: 235–276.

5) Belfroid A, Sikkenk M, Seinen W, Van Gestel C, Hermens J (1994). The toxicokinetic behavior of chlorobenzenes in earthworms (*Eisenia andrei*): Experiments in soil. Environ. Toxicol. Chem. 13: 93–99.

6) Belfroid A, Van Wezel A, Sikkenk M, Van Gestel C, Seinen W & Hermens J (1993). The toxicokinetic behavior of chlorobenzenes in earthworms (*Eisenia andrei*): Experiments in water. Ecotox. Environ. Safety 25: 154–165.

7) Belfroid A, Meiling J, Drenth H, Hermens J, Seinen W, Van Gestel C (1995). Dietary uptake of superlipophilic compounds by earthworms (*Eisenia andrei*). Ecotox. Environ. Safety 31: 185–191.

8) Bell AW (1958). The anatomy of *Enchytraeus albidus*, with a key to the species of the genus *Enchytraeus.* Ann. Mus. Novitat. 1902: 1–13.

9) Bligh EG and Dyer WJ (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. Can. J. Biochem. Pysiol. 37: 911–917.

10) Bouche M (1972). Lombriciens de France. Ecologie et Systematique. INRA, Annales de Zoologie-Ecologie animale, Paris, 671 p.

11) Bruns E, Egeler Ph, Moser T, Römbke J, Scheffczyk A, Spörlein P (2001a). Standardisierung und Validierung eines Bioakkumulationstests mit terrestrischen Oligochaeten. Report to the German Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Berlin), R&D No.: 298 64 416.

12) Bruns E, Egeler Ph, Römbke J Scheffczyk A, Spörlein P (2001b). Bioaccumulation of lindane and hexachlorobenzene by the oligochaetes *Enchytraeus luxuriosus* and *Enchytraeus albidus* (Enchytraeidae, Oligochaeta, Annelida). Hydrobiologia 463: 185–196.

13) Conder JM and Lanno RP (2003). Lethal critical body residues as measures of Cd, Pb, and Zn bioavailability and toxicity in the earthworm *Eisenia fetida.* J. Soils Sediments 3: 13–20.

▼M4

14) Connell DW and Markwell RD (1990). Bioaccumulation in the Soil to Earthworm System. Chemosphere 20: 91–100.

15) Didden WAM (1993). Ecology of Terrestrial Enchytraeidae. Pedobiologia 37: 2-29.

16) Didden W (2003). Oligochaeta, In: Bioindicators and biomonitors. Markert, B.A., Breure, A.M. & Zechmeister, H.G. (eds.). Elsevier Science Ltd., The Netherlands, pp. 555–576.

17) De Boer J, Smedes F, Wells D, Allan A (1999). Report on the QUASH interlaboratory study on the determination of total-lipid in fish and shellfish. Round 1 SBT-2, Exercise 1000, EU, Standards, Measurement and Testing Programme.

18) Dietrich DR, Schmid P, Zweifel U, Schlatter C, Jenni-Eiermann S, Bachmann H, Bühler U, Zbinden N (1995). Mortality of birds of prey following field application of granular carbofuran: A Case Study. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 29: 140–145.

19) Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1907/2006 ze dne 18. prosince 2006 o registraci, hodnocení, povolování a omezování chemických látek, o zřízení Evropské agentury pro chemické látky, o změně směrnice 1999/45/ES a o zrušení nařízení Rady (EHS) č. 793/93, nařízení Komise (ES) č. 1488/94, směrnice Rady 76/769/EHS a směrnic Komise 91/155/EHS, 93/67/EHS, 93/105/ES a 2000/21/ES, Úř. věst. L 396, 30.12.2006, s. 1.

20) Edwards CA and Bohlen PJ (1996). Biology and ecology of earthworms. Third Edition, Chapman & Hall, London, 426 pp.

21) OECD (2008), *Bioaccumulation in Sediment-dwelling Benthic Oligochates*, Test Guideline No. 315, Guidelines for the testing of chemicals, OECD, Paris.

22) Egeler Ph, Gilberg D, Scheffczyk A, Moser Th and Römbke J (2009). Validation of a Soil Bioaccumulation Test with Terrestrial Oligochaetes by an International Ring Test (Validierung einer Methode zur standardisierten Messung der Bioakkumulation mit terrestrischen Oligochaeten). Report to the Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Dessau-Rosslau), R&D No.: 204 67 458: 149 pp. Ke stažení na adrese: http://www.oecd.org/dataoecd/12/20/42552727.pdf.

23) Elmegaard N and Jagers op Akkerhuis GAJM (2000). Safety factors in pesticide risk assessment, Differences in species sensitivity and acute-chronic relations. National Environmental Research Institute, NERI Technical Report 325: 57 pp.

24) Environment Canada (1995). Guidance document on measurement of toxicity test precision using control sediments spiked with a reference toxicant. Environmental Protection Series Report EPS 1/RM/30.

25) EPPO (2003). Environmental Risk Assessment scheme for plant protection products. Soil organisms and functions, EPPO (European Plant Protection Organization) Standards, Bull, OEPP/EPPO 33: 195–208.

26) Franke C (1996). How meaningful is the bioconcentration factor for risk assessment? Chemosphere 32: 1897–1905.

27) Franke C, Studinger G, Berger G, Böhling S, Bruckmann U, Cohors-Fresenborg D, Jöhncke U (1994). The assessment of bioaccumulation. Chemosphere 29: 1501–1514.

28) Füll C (1996). Bioakkumulation und Metabolismus von -1,2,3,4,5,6-Hexachlorcyclohexan (Lindan) und 2-(2,4-Dichlorphenoxy)-propionsäure (Dichlorprop) beim Regenwurm *Lumbricus rubellus* (Oligochaeta, Lumbricidae). Dissertation University Mainz, 156 pp.

▼M4

29) Füll C, Schulte C, Kula C (2003). Bewertung der Auswirkungen von Pflanzenschutzmitteln auf Regenwürmer. UWSF - Z. Umweltchem, Ökotox. 15: 78–84.

30) Gabric A.J, Connell DW, Bell PRF (1990). A kinetic model for bioconcentration of lipophilic compounds by oligochaetes. Wat. Res. 24: 1225–1231.

31) Gardner WS, Frez WA, Cichocki EA, Parrish CC (1985). Micromethods for lipids in aquatic invertebrates. Limnology and Oceanography 30: 1099–1105.

32) Hawker DW and Connell DW (1988). Influence of partition coefficient of lipophilic compounds on bioconcentration kinetics with fish. Wat. Res. 22: 701–707.

33) Hund-Rinke K and Wiechering H (2000). Earthworm avoidance test for soil assessments: An alternative for acute and reproduction tests. J. Soils Sediments 1: 15–20.

34) Hund-Rinke K, Römbke J, Riepert F, Achazi R (2000). Beurteilung der Lebensraumfunktion von Böden mit Hilfe von Regenwurmtests. In: Toxikologische Beurteilung von Böden. Heiden, S., Erb, R., Dott, W. & Eisentraeger, A. (eds.), Spektrum Verl., Heidelberg, 59–81.

35) ISO 11268-2 (1998) Soil Quality – Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 2: Determination of effects on reproduction.

36) Jaenike J (1982). „*Eisenia foetida*“ is two biological species. Megadrilogica 4: 6–8.

37) Jager T (1998). Mechanistic approach for estimating bioconcentration of organic chemicals in earthworms (Oligochaeta). Environ. Toxicol. Chem. 17: 2080–2090.

38) Jager T, Sanchez PA, Muijs B, van der Welde E, Posthuma L (2000). Toxicokinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons in *Eisenia andrei* (Oligochaeta) using spiked soil. Environ. Toxicol. Chem. 19: 953–961.

39) Jager T, Baerselman R, Dijkman E, De Groot AC, Hogendoorn EA, DeJong A, Kruitbosch JAW, Peijnenburg W J G. M (2003a). Availability of polycyclic aromatic hydrocarbons to earthworms (*Eisenia andrei*, Oligochaeta) in field-polluted soils and soil-sediment mixtures. Environ. Toxicol. Chem. 22: 767–775.

40) Jager T, Fleuren RLJ, Hoogendoorn E, de Korte G (2003b). Elucidating the routes of exposure for organic chemicals in the earthworm, *Eisenia andrei* (Oligochaeta). Environ. Sci. Technol. 37: 3399–3404.

41) Janssen MPM, Bruins A, De Vries TH, Van Straalen NM (1991). Comparison of cadmium kinetics in four soil arthropod species. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 20: 305–312.

42) Kasprzak K (1982). Review of enchytraeid community structure and function in agricultural ecosystems. Pedobiologia 23: 217–232.

43) Khalil AM (1990). Aufnahme und Metabolismus von ^{14}C-Hexachlorbenzol und ^{14}C-Pentachlornitrobenzol in Regenwürmern. Dissertation University München, 137 pp.

44) Landrum PF (1989). Bioavailability and toxicokinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons sorbed to sediments for the amphipod *Pontoporeia hoyi.* Environ. Sci. Toxicol. 23: 588–595.

45) Marinussen MPJC, Van der Zee SEATM, De Haan FA (1997). Cu accumulation in *Lumbricus rubellus* under laboratory conditions compared with accumulation under field conditions. Ecotox. Environ. Safety 36: 17–26.

46) Mount DR, Dawson TD, Burkhard LP (1999). Implications of gut purging for tissue residues determined in bioaccumulation testing of sediment with *Lumbriculus variegates.* Environ. Toxicol. Chem. 18: 1244–1249.

▼**M4**

47) Nendza M (1991). QSARs of bioaccumulation: Validity assessment of log K_{ow}/log BCF correlations, In: R. Nagel and R. Loskill (eds.): Bioaccumulation in aquatic systems, Contributions to the assessment, Proceedings of an international workshop, Berlin 1990, VCH, Weinheim.

48) Kapitola C.8 této přílohy - Toxicita pro žížaly.

49) Kapitola C.13 této přílohy - Bioakumulace: průtoková zkouška na rybách.

50) Kapitola C.21 této přílohy - Půdní mikroorganismy: zkouška na transformaci dusíku.

51) OECD (2004a), Enchytraeid reproduction test, Test Guideline No. 220, Guidelines for the testing of chemicals, OECD, Paris.

52) OECD (2004b), Earthworm reproduction test (Eisenia fetida/Eisenia Andrei), Test Guideline No. 222, Guidelines for the testing of chemicals, OECD, Paris.

53) OECD (2008), Bioaccumulation in Sediment-dwelling Benthic Oligochates, Test Guideline No. 315, Guidelines for the testing of chemicals, OECD, Paris.

54) Petersen H and Luxton M (1982). A comparative analysis of soil fauna populations and their role in decomposition processes. Oikos 39: 287-388.

55) Phillips DJH (1993). Bioaccumulation. In: Handbook Ecotoxicology Vol. 1. Calow P. (ed.). Blackwell Scientific Publ., Oxford. 378–396.

56) Pflugmacher J (1992). Struktur-Aktivitätsbestimmungen (QSAR) zwischen der Konzentration von Pflanzenschutzmitteln und dem Octanol-Wasser-Koeffzienten UWSF- Z. Umweltchem. Ökotox. 4: 77–81.

57) Posthuma L, Weltje L, Anton-Sanchez FA (1996). Joint toxic effects of cadmium and pyrene on reproduction and growth of the earthworm *Eisenia fetida.* RIVM Report No. 607506001, Bilthoven.

58) Randall RC, Lee II H, Ozretich RJ, Lake JL, Pruell RJ (1991). Evaluation of selected lipid methods for normalising pollutant bioaccumulation. Environ.Toxicol. Chem. 10: 1431–1436.

59) Römbke J, Egele, P, Füll C (1998). Literaturstudie über Bioakkumulationstests mit Oligochaeten im terrestrischen Medium. UBA-Texte 28/98, 84 S.

60) Römbke J and Moser Th (1999). Organisation and performance of an international ring-test for the validation of the Enchytraeid reproduction test. UBA-Texte 4/99: 373 pp.

61) Römbke J, Riepert F, Achazi R (2000). Enchytraeen als Testorganismen, In: Toxikologische Beurteilung von Böden. Heiden, S., Erb, R., Dott, W. & Eisentraeger, A. (eds.). Spektrum Verl., Heidelberg. 105–129.

62) Romijn CA.FM, Luttik R, Van De Meent D, Slooff W,Canton JH (1993). Presentation of a General Algorithm to Include Effect Assessment on Secondary Poisoning in the Derivation of Environmental Quality Criteria, Part 2: Terrestrial food chains. Ecotox. Envir. Safety 27: 107–127.

63) Sample BE, Suter DW, Beauchamp JJ, Efroymson RA (1999). Literature-derived bioaccumulation models for earthworms: Development and validation. Environ. Toxicol. Chem. 18: 2110–2120.

64) Schlosser H-J and Riepert F (1992). Entwicklung eines Prüfverfahrens für Chemikalien an Bodenraubmilben (Gamasina), Teil 2: Erste Ergebnisse mit Lindan und Kaliumdichromat in subletaler Dosierung. Zool. Beitr. NF 34: 413–433.

65) Schmelz R and Collado R (1999). *Enchytraeus luxuriosus* sp. nov., a new terrestrial oligochaete species (Enchytraeide, Clitellata, Annelida). Carolinea 57: 93–100.

▼M4

66) Sims R W and Gerard BM (1985). Earthworms, In: Kermack, D. M. & Barnes, R. S. K. (Hrsg.): Synopses of the British Fauna (New Series) No. 31. 171 S. London: E. J. Brill/Dr. W. Backhuys.

67) Sousa JP, Loureiro S, Pieper S, Frost M, Kratz W, Nogueira AJA, Soares AMVM (2000). Soil and plant diet exposure routes and toxicokinetics of lindane in a terrestrial isopod. Environ. Toxicol. Chem. 19: 2557–2563.

68) Spacie A and Hamelink JL (1982). Alternative models for describing the bioconcentration of organics in fish. Environ. Toxicol. Chem. 1, 309–320.

69) Stephenson GL, Kaushik A, Kaushik NK, Solomon KR, Steele T, Scroggins RP (1998). Use of an avoidance-response test to assess the toxicity of contaminated soils to earthworms. In: Advances in earthworm ecotoxicology. S. Sheppard, J. Bembridge, M. Holmstrup, L. Posthuma (eds.). Setac Press, Pensacola, 67–81.

70) Sterenborg I, Vork NA, Verkade SK, Van Gestel CAM, Van Straalen NM (2003). Dietary zinc reduces uptake but not metallothionein binding and elimination of cadmium in the springtail *Orchesella cincta.* Environ. Toxicol. Chemistry 22: 1167–1171.

71) UBA (Umweltbundesamt, 1991). Bioakkumulation - Bewertungskonzept und Strategien im Gesetzesvollzug. UBA-Texte 42/91. Berlin.

72) US EPA (2000). Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates. Second Edition, EPA 600/R-99/064, US, Environmental Protection Agency, Duluth, MN, March 2000.

73) Van Brummelen TC and Van Straalen NM (1996). Uptake and elimination of benzo(a)pyrene in the terrestrial isopod *Porcellio scaber.* Arch. Environ. Contam. Toxicol. 31: 277–285.

74) Van Gestel CAM. (1992). The influence of soil characteristics on the toxicity of chemicals for earthworms; a review, In: Ecotoxicology of Earthworms (Ed. Becker, H, Edwards, PJ, Greig-Smith, PW & Heimbach, F). Intercept Press, Andover (GB).

75) Van Gestel CA and Ma W-C (1990). An approach to quantitative structure-activity relationships (QSARs) in earthworm toxicity studies. Chemosphere 21: 1023–1033.

76) Van Straalen NM, Donker MH, Vijver MG, van Gestel CAM (2005). Bioavailability of contaminants estimated from uptake rates into soil invertebrates. Environmental Pollution 136: 409–417.

77) Venter JM and Reinecke AJ (1988). The life-cycle of the compost-worm *Eisenia fetida* (Oligochaeta). South African J. Zool. 23: 161–165.

78) Vijver MG, Vink JPM, Jager T, Wolterbeek HT, van Straalen NM, van Gestel CAM (2005). Biphasic elimination and uptake kinetics of Zn and Cd in the earthworm *Lumbricus rubellus* exposed to contaminated floodplain soil. Soil Biol, Biochem. 37: 1843–1851.

79) Widianarko B and Van Straalen NM (1996). Toxicokinetics-based survival analysis in bioassays using nonpersistent chemicals, Environ. Toxicol. Chem. 15: 402–406.

▼M4

Dodatek 1

DEFINICE

Bioakumulace je nárůst koncentrace zkoušené chemické látky v organismu nebo na něm vzhledem ke koncentraci zkoušené chemické látky v okolním médiu. Bioakumulace je výsledkem biokoncentračních a bioobohacovacích procesů (viz níže).

Biokoncentrace je nárůst koncentrace zkoušené chemické látky v organismu nebo na něm příjmem zkoušené chemické látky výhradně z okolního média (tj. povrchem těla a ingescí půdy) vzhledem ke koncentraci zkoušené chemické látky v okolním médiu.

Bioobohacování je nárůst koncentrace zkoušené chemické látky v organismu nebo na něm hlavně příjmem kontaminované potravy nebo kořisti vzhledem ke koncentraci zkoušené chemické látky v této potravě nebo kořisti. Bioobohacování může vést k přestupu nebo akumulaci zkoušené látky v potravních řetězcích.

Vylučování zkoušené chemické látky je úbytek této chemické látky z tkáně zkoušeného organismu na základě aktivních nebo pasivních procesů, ke kterému dochází nezávisle na přítomnosti nebo nepřítomnosti zkoušené položky v okolním médiu.

Bioakumulační faktor (BAF) je koncentrace zkoušené látky ve zkoušeném organismu nebo na něm (C_a v g/kg suché hmotnosti červů) dělená koncentrací chemikálie v okolním médiu (C_s jako g/kg suché hmotnosti půdy), a to kdykoliv ve fázi příjmu při této bioakumulační zkoušce. Jednotkou BAF je kg půdy·na kg červů.

Bioakumulační faktor v ustáleném stavu (BAF_{SS}) je BAF v ustáleném stavu a po dlouhou dobu se výrazně nemění; koncentrace zkoušené látky v okolním médiu (C_s jako g/kg suché hmotnosti půdy) je po tuto dobu konstantní.

Biokoncentrační faktory vypočtené přímo z poměru rychlostní konstanty příjmu z půdy a rychlostní konstanty vylučování (k_s a k_e, viz níže) se nazývají kinetický bioakumulační faktor (BAF_K).

Akumulační faktor biota-půda (BSAF) je koncentrace zkoušené látky ve zkoušeném organismu nebo na něm normalizovaná na lipidy, dělená koncentrací zkoušené látky v půdě v ustáleném stavu normalizované na organický uhlík. C_a se pak vyjádří jako g/kg obsahu lipidů v organismu a C_s jako g/kg obsahu organických látek v půdě; jednotkami BSAF jsou kg OC na·kg lipidů.

Plató nebo **ustálený stav** je definován jako rovnováha mezi procesem příjmu a vylučování, k němuž dochází při fázi expozice současně. Ustáleného stavu je dosaženo tehdy, je-li při grafickém znázornění křivka časové závislosti BAF rovnoběžná s časovou osou a tři po sobě jdoucí analýzy BAF vzorků odebraných v intervalech alespoň dvou dnů se neliší více než o ±20 % a není-li mezi těmito třemi dobami odběru žádný statisticky významný rozdíl. V případě zkoušených látek, jejichž příjem probíhá pomalu, jsou vhodnější sedmidenní intervaly (49).

Rozdělovací koeficient organický uhlík/voda (K_{oc}) je rovnovážný poměr mezi koncentrací chemické látky ve/na frakci organického uhlíku v půdě a koncentrace chemické látky ve vodě.

Rozdělovací koeficient n-oktanol/voda (K_{ow}) je rovnovážný poměr mezi rozpustností chemické látky v n-oktanolu a ve vodě (někdy se označuje také jako $P_{ow)}$. Logaritmus hodnoty K_{ow} (log K_{ow}) se používá jako ukazatel potenciálu chemikálie bioakumulovat se ve vodních organismech.

▼M4

Expozice nebo fáze příjmu je časový úsek, během něhož jsou zkoušené organismy vystaveny působení zkoušené chemické látky.

Rychlostní konstanta příjmu z půdy (k_s) je číselná hodnota definující rychlost nárůstu koncentrace zkoušené položky ve zkoušených organismech nebo na nich v důsledku příjmu z půdní fáze. k_s se vyjadřuje v g půdy na kg červů za den.

Vylučovací fáze je časový úsek po přemístění zkušebních organismů z kontaminovaného média do média, které zkoušenou látku neobsahuje, během něhož se studuje vylučování chemické látky ze zkušebních organismů (nebo její čistý úbytek v nich).

Rychlostní konstanta vylučování (k_e) je číselná hodnota definující rychlost poklesu koncentrace zkoušené látky ve zkoušeném organismu nebo na něm po přemístění zkoušených organismů z média obsahujícího zkoušenou látku do média, které neobsahuje chemické látky; k_e je vyjádřeno jako číselná hodnota za den.

Zkoušená chemická látka: jakákoliv látka nebo směs testovaná pomocí této zkušební metody.

▼M4

Dodatek 2

Výpočet parametrů příjmu a vylučování

Hlavním koncovým bodem bioakumulační zkoušky je bioakumulační faktor BAF. Měřený BAF lze vypočítat tak, že se koncentrace ve zkušebním organismu C_a, vydělí koncentrací v půdě C_s v ustáleném stavu. Pokud není ustáleného stavu dosaženo během fáze příjmu, vypočte se BAF_K z rychlostních konstant místo BAF_{SS}. Je však třeba zaznamenat, zda je BAF založen na koncentracích v ustáleném stavu či nikoli.

Obvyklou metodou pro získání hodnoty kinetického bioakumulačního faktoru (BAF_K), rychlostní konstanty příjmu (k_s) a rychlostní konstanty vylučování (k_e) jsou metody nelineárního odhadu parametrů s využitím počítače, např. na základě modelů popsaných v odstavci (68). Na základě souboru po sobě jdoucích údajů o koncentracích a modelových rovnic:

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} \times C_s(1 - e^{-k}e^{t}) \qquad 0 < t < t_c \qquad \text{[rovnice 1]}$$

nebo

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} \times C_s(e^{-k}e^{(t-tc)} - e^{-k}e^{t}) \qquad t > t_c \qquad \text{[rovnice 2]}$$

kde:

C_a = koncentrace chemické látky v červech [g/kg hmotnosti ve vlhkém stavu nebo suché hmotnosti],

k_s = rychlostní konstanta příjmu v tkáni [g půdy na kg červů za den],

C_s = koncentrace chemické látky v půdě [g/kg hmotnosti ve vlhkém stavu nebo suché hmotnosti],

k_e = rychlostní konstanta vylučování [1/d],

t_c = čas konce fáze příjmu.

Tyto počítačové programy vypočtou hodnoty BAF_K, k_s a k_e.

V případě, že se koncentrace neexponovaných červů například v den 0 významně liší od nuly (k tomu může dojít například v případě kovů), měla by být tato koncentrace v pozadí ($C_{a,0}$) zahrnuta do uvedených rovnic takto:

$$C_a = C_{a,0} + \frac{k_s}{k_e} \times C_s(1 - e^{-k}e^{t}) \qquad 0 < t < t_c \qquad \text{[rovnice 3]}$$

a

$$C_a = C_{a,0} + \frac{k_s}{k_e} \times C_s(e^{-k}e^{(t-tc)} - e^{-k}e^{t}) \qquad t > t_c \qquad \text{[rovnice 4]}$$

V případech, kdy dojde v průběhu času během fáze příjmu k významnému poklesu koncentrace zkoušené chemické látky v půdě lze použít následující modely, např. (67, 79):

$$C_s = C_0(e^{-k}0^{t}) \qquad \text{[rovnice 5]}$$

▼M4

kde:

C_s = koncentrace chemické látky v půdě [g/kg hmotnosti ve vlhkém stavu nebo suché hmotnosti],

k_0 = rychlostní konstanta rozkladu v půdě [1/d],

C_0 = počáteční koncentrace chemické látky v půdě [g/kg hmotnosti ve vlhkém stavu nebo suché hmotnosti].

$$C_a = \frac{k_s}{k_e - k_0} \times (e^{-k_0 t} - e^{-k} e^{t}) \qquad 0 < t < t_c \qquad \text{[rovnice 6]}$$

$$C_a = \frac{k_s}{k_e - k_0} \times e^{-k_0 tc} - e^{-k} e^{tc} * e^{-k(t-tc)} \qquad t > t_c \qquad \text{[rovnice 7]}$$

kde:

C_a = koncentrace chemické látky v červech [g na kg hmotnosti ve vlhkém stavu nebo suché hmotnosti],

k_s = rychlostní konstanta příjmu v tkáni [g půdy na kg červů za den],

k_0 = rychlostní konstanta rozkladu v půdě [1/d],

k_e = rychlostní konstanta vylučování [1/d],

t_c = čas konce fáze příjmu.

Když je během fáze příjmu dosaženo ustáleného stavu (tj. $t = \infty$), rovnice 1

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} \times C_s(1 - e^{-k} e^{t}) \qquad 0 < t < t_c \qquad \text{[rovnice 1]}$$

může být zjednodušena na rovnici:

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} \times C_s$$

nebo

$$C_a / C_s = k_s / k_e = BAF_K \qquad \text{[rovnice 8]}$$

Pak k_s/k_e x C_s je přiblížením ke koncentraci zkoušené látky ve tkáni červů v ustáleném stavu ($C_{a,ss}$).

Akumulační faktor biota-půda (BSAF) lze vypočítat následovně:

$$BSAF = BAF_K * \frac{f_{oc}}{f_{lip}} \qquad \text{[rovnice 9]}$$

kde f_{oc} je frakcí organického uhlíku v půdě a f_{lip} je frakcí lipidů v červech, obojí v optimálním případě stanoveno na vzorcích odebraných při zkoušce buď na základě hmotnosti po vysušení (f_{oc}) nebo živé váhy (f_{lip}).

Kinetiku vylučování lze modelovat pomocí dat z fáze vylučování za použití níže uvedené modelové rovnice a metody nelineárního odhadu parametrů s využitím počítače. Pokud data vynesená do grafu proti času indikují konstantní exponenciální pokles koncentrace zkoušené látky u zvířat, lze použít k popisu časového průběhu vylučování model s jedním kompartmentem (rovnice 9).

$$C_a(t) = C_{a,ss} \times e^{-k} e^{t} \qquad \text{[rovnice 10]}$$

▼**M4**

Procesy vylučování se někdy jeví jako dvoufázové, neboť vykazují rychlý pokles C_a během raných fází, který se v pozdějších fázích vylučování změní na pomalejší úbytek zkoušených látek, např. (27) (68). Tyto dvě fáze mohou být interpretovány na základě předpokladu, že v organismu existují dva různé kompartmenty, z nichž dochází k úbytku zkoušené látky odlišnou rychlostí. V těchto případech je nutno studovat specifickou literaturu, např. (38, 39, 40, 78).

Pomocí výše uvedených modelových rovnic lze rovněž zároveň vypočítat kinetické parametry (k_s a k_e) uplatněním modelu kinetiky prvního řádu na všechna data z fáze příjmu a z fáze vylučování současně. Popis metody, která by mohla umožnit takovýto kombinovaný výpočet rychlostních konstant příjmu a vylučování, lze nalézt v odkazech (41, 73 a 70).

$$C_a = \left[\frac{K_s}{K_e} \cdot C_s(1 - e^{-k_e t}) \times (m = 1)\right] + \left[\frac{K_s}{k_e} \times C_s(e^{-K_e(t-t_c)} - e^{-K_e t}) \times (m = 2)\right] \quad \text{[rovnice 11]}$$

Poznámka: Pokud se parametry příjmu a vylučování odhadují současně z kombinovaných dat o příjmu a vylučování, je hodnota „m“ uvedená v rovnici 11 deskriptorem, který umožňuje počítačovému programu přiřadit dílčí členy rovnice datovým sadám příslušné fáze a provést správné vyhodnocení (m = 1 pro fázi příjmu, m = 2 pro fázi vylučování).

Tyto modelové rovnice je však nutno užívat obezřetně, zvláště v případě změn biologické dostupnosti zkoušené chemické látky nebo (bio) rozkladu, k nimž dojde během zkoušky (viz např. (79)).

▼M4

Dodatek 3

PŘÍKLADY HARMONOGRAMŮ ZKOUŠEK BIOAKUMULACE V PŮDĚ

Zkouška na žížalách

a) Fáze příjmu s 8 daty odběrů vzorků užitými pro výpočet kinetiky

Den	Činnost
– 6	kondicionování připravené půdy po dobu 48 hodin
– 4	vmíchání roztoku zkoušené chemické látky do půdní frakce, odpaření případného rozpouštědla, promísení půdních složek, rozdělení půdy do zkušebních nádob, ustavování rovnováhy při zkušebních podmínkách po dobu 4 dnů (3 týdny u půdy obohacené kovem)
– 3 až – 1	oddělení zkušebních organismů z kultury za účelem aklimatizace; příprava a zvlhčení půdních složek,
0	měření teploty a pH půdy, odstraňování vzorků půdy ze zkušebních nádob a kontrola rozpouštědel pro stanovení koncentrace zkoušené chemické látky, doplnění krmné dávky, zvážení a náhodné rozdělení červů do zkušebních nádob, zachování dostatečných dílčích vzorků červů pro stanovení analytických hodnot pozadí, hmotnosti ve vlhkém stavu a suché hmotnosti a obsahu lipidů, zvážení všech zkušebních nádob za účelem kontroly vlhkosti půdy, kontrola přívodu vzduchu, pokud je užit uzavřený zkušební systém
1	kontrola přívodu vzduchu, zaznamenání chování červů a teploty, odebrání vzorků půdy a červů za účelem stanovení koncentrace zkoušené položky
2	stejný jako 1. den
3	kontrola přívodu vzduchu, chování červů a teploty
4	stejný jako 1. den
5–6	stejný jako 3. den
7	stejný jako 1. den; doplnění krmné dávky, kontrola vlhkosti půdy převážením zkušebních nádob a doplnění odpařené vody
8–9	stejný jako 3. den
10	stejný jako 1. den
11–13	stejný jako 3. den
14	stejný jako 1. den; doplnění krmné dávky, kontrola vlhkosti půdy převážením zkušebních nádob a doplnění odpařené vody
15–16	stejný jako 3. den
17	stejný jako 1. den
18–20	stejný jako 3. den

▼**M4**

Den	Činnost
21	stejný jako 1 den; měření teploty a pH půdy, kontrola vlhkosti půdy převážením zkušebních nádob, ukončení fáze příjmu, přenesení červů ze zbývajících exponovaných paralelních nádob do nádob obsahujících čistou půdu pro fázi eliminace (bez vyprázdnění střev), odběr vzorků půdy a červů z rozpouštědlové kontroly
	adaptační činnosti (fáze ustavování rovnováhy) by měly být naplánovány s ohledem na vlastnosti zkoušené chemické látky
	činnosti popsané pro 3. den by se měly provádět denně (alespoň v pracovní dny).

b) Fáze vylučování

Den	Činnost
– 6	příprava a zvlhčení půdních složek, kondicionování připravené půdy po dobu 48 hodin
– 4	smísení půdních složek, rozdělení půdy do zkušebních nádob, inkubace při zkušebních podmínkách po dobu 4 dnů
0 (konec fáze příjmu)	měření teploty a pH půdy, vážení a náhodné rozdělení červů do zkušebních nádob, doplnění krmné dávky, přemístění červů ze zbývajících exponovaných paralelních vzorků do nádob obsahujících čistou půdu, odebrání vzorků půdy a červů po 4–6 hodinách za účelem stanovení koncentrace zkoušené chemické látky
1	kontrola přívodu vzduchu, zaznamenání chování červů a teploty, odebrání vzorků půdy a červů za účelem stanovení koncentrace zkoušené chemické látky
2	stejný jako 1. den
3	kontrola přívodu vzduchu, chování červů a teploty
4	stejný jako 1. den
5–6	stejný jako 3. den
7	stejný jako 1. den; doplnění krmné dávky, kontrola vlhkosti půdy převážením zkušebních nádob a doplnění odpařené vody
8–9	stejný jako 3. den
10	stejný jako 1. den
11–13	stejný jako 3. den
14	stejný jako 1. den; doplnění krmné dávky, kontrola vlhkosti půdy převážením zkušebních nádob a doplnění odpařené vody
15–16	stejný jako 3. den
17	stejný jako 1. den

▼M4

Den	Činnost
18–20	stejný jako 3. den
21	stejný jako 1. den; měření teploty a pH půdy; kontrola vlhkosti půdy převážením zkušebních nádob; odběr vzorků půdy a červů z kontrol rozpouštědla
	příprava půdy před zahájením fáze vylučování by měla být provedena stejným způsobem jako před fází příjmu.
	činnosti popsané pro 3. den by se měly provádět denně (alespoň v pracovní dny)

Zkouška na roupicích

a) Fáze příjmu s 8 daty odběrů vzorků užitými pro výpočet kinetiky

Den	Činnost
– 6	kondicionování připravené půdy po dobu 48 hodin
– 4	vmíchání roztoku zkoušené chemické látky do půdní frakce, odpaření případného rozpouštědla, promísení půdních složek, rozdělení půdy do zkušebních nádob, ustavování rovnováhy při zkušebních podmínkách po dobu 4 dnů (3 týdny u půdy obohacené kovem)
– 3 až – 1	oddělení zkušebních organismů z kultury za účelem aklimatizace; příprava a zvlhčení půdních složek
0	měření teploty a pH půdy, odstraňování vzorků půdy ze zkušebních nádob a kontrola rozpouštědel pro stanovení koncentrace zkoušené chemické látky, doplnění krmné dávky do půdy, zvážení a náhodné rozdělení červů do zkušebních nádob, zachování dostatečných dílčích vzorků červů pro stanovení analytických hodnot pozadí, hmotnosti ve vlhkém stavu a suché hmotnosti a obsahu lipidů, zvážení všech zkušebních nádob za účelem kontroly vlhkosti půdy, kontrola přívodu vzduchu, pokud je užit uzavřený zkušební systém
1	kontrola přívodu vzduchu, zaznamenání chování červů a teploty, odebrání vzorků půdy a červů za účelem stanovení koncentrace zkoušené položky
2	stejný jako 1. den
3	kontrola přívodu vzduchu, zaznamenání chování červů a teploty
4	stejný jako 1. den
5–6	stejný jako 3. den
7	stejný jako 1. den; doplnění krmné dávky do půdy, kontrola vlhkosti půdy převážením zkušebních nádob a doplnění odpařené vody
9	stejný jako 1. den
10	stejný jako 3. den

▼**M4**

Den	Činnost
11	stejný jako 1. den
12–13	stejný jako 3. den
14	stejný jako 1. den; doplnění krmné dávky do půdy, měření teploty a pH půdy, kontrola vlhkosti půdy převážením zkušebních nádob, ukončení fáze příjmu, přenesení červů ze zbývajících exponovaných paralelních nádob do nádob obsahujících čistou půdu pro fázi vylučování (bez vyprázdnění střev), odběr vzorků půdy a červů z rozpouštědlové kontroly
	adaptační činnosti (fáze ustavování rovnováhy) by měly být naplánovány s ohledem na vlastnosti zkoušené chemické látky
	činnosti popsané pro 3. den by se měly provádět denně (alespoň v pracovní dny)

▼M4

Dodatek 4

Umělá půda – doporučení pro přípravu a skladování

Vzhledem k tomu, že přírodní půda z určitého zdroje nemusí být k dispozici po celý rok a zkoušku mohou ovlivnit původní organismy i přítomnost mikroskopických znečišťujících látek, doporučuje se použít při této zkoušce umělý substrát, umělou půdu podle kapitoly C.8 této přílohy – Toxicita pro žížaly (48). V této půdě může přežít, růst a rozmnožovat se více zkušebních testovacích druhů a je zajištěna maximální standardizace i zkušební a kultivační podmínky srovnatelné vnitrolaboratorně i mezilaboratorně.

Složky půdy

Rašelina:	10 %	Sfagnová rašelina v souladu se směrnicí OECD č. 207 (48);
Křemenný písek:	70 %	Průmyslový křemenný písek (vysušený na vzduchu); velikost částic: více než 50 % částic by se měla pohybovat v rozpětí 50–200 μm, ale všechny částice by měly být ≤ 2 mm
Kaolinitický jíl	20 %	Obsah kaolinitu ≥ 30 %
Uhličitan vápenatý	≤ 1 %	$CaCO_3$, práškový, chemicky čistý

Obsah organického uhlíku v umělé půdě lze podle potřeby snížit například snížením obsahu rašeliny na 4–5 % suché půdy a odpovídajícím zvýšením obsahu písku. Takovým snížením obsahu organického uhlíku se může snížit schopnost adsorpce zkoušené chemické látky (organický uhlík), do půdy a dostupnost zkoušené chemické látky pro červy se může zvýšit (74). Bylo prokázáno, že *Enchytraeus albidus* a *Eisenia fetida* mohou splnit kritéria validity pro reprodukci při testování v polních půdách s nižším obsahem organického uhlíku, např. 2,7 % (33), (61), a dle zkušenosti toho lze dosáhnout i v umělé půdě s 5 % obsahem rašeliny.

Příprava

Suché složky půdy se důkladně promísí (např. ve velké laboratorní míchačce). To by mělo být provedeno přibližně týden před zahájením zkoušky. Smíchané suché složky půdy by se měly navlhčit deionizovanou vodou minimálně 48 hodin před aplikací zkoušené chemické látky, aby se vyrovnala/stabilizovala kyselost. Hodnota pH se měří po smíchání půdy s roztokem 1M KCl v poměru 1:5. Pokud není hodnota pH v požadovaném rozsahu (6,0 ± 0,5), musí se do půdy přidat dostatečné množství $CaCO_3$ nebo se musí připravit nová šarže půdy.

Maximální vodní kapacita (WHC) v umělé půdě se stanoví v souladu s normou ISO 11268-2 (35). Nejméně dva dny před započetím zkoušky se suchá umělá půda zvlhčí přídavkem dostatečného množství deionizované nebo rekonstituované vody, aby bylo dosaženo přibližně poloviny výsledného obsahu vody. Výsledný obsah vody by se měl rovnat 40 % až 60 % maximální vodní kapacity. Na začátku zkoušky se navlhčená půda rozdělí do tolika dávek, kolik je zkušebních koncentrací a kontrol při zkoušce, a obsah vlhkosti se upraví na 40–60 % WHC_{max} pomocí roztoku zkoušené chemické látky a/nebo přidáním deionizované nebo rekonstituované vody. Obsah vlhkosti se stanoví na začátku a na konci zkoušky (při 105 °C). Měl by optimálně vyhovovat potřebám jednotlivých druhů (obsah vlhkosti lze rovněž ověřit lehkým stlačením rukou a mezi prsty by se měly objevit pouze malé kapičky vody).

▼M4

Uchovávání

Suché složky umělé půdy mohou být uchovávány při pokojové teplotě až do použití. Připravenou předvlhčenou půdu lze skladovat v chladu po dobu až tří dnů před vmícháním; je třeba dbát na minimalizaci odpařování vody. Půda obohacená zkoušenou látkou by měla být použita bezprostředně, pokud nejsou k dispozici informace o tom, že tuto určitou půdu lze skladovat bez vlivu na toxicitu a biologickou dostupnost zkoušené chemické látky. Vzorky obohacené půdy pak mohou být uchovány za podmínek doporučených pro konkrétní zkoušenou látku až do provedení analýzy.

▼M4

Dodatek 5

Druhy terestrických máloštětinatců doporučené pro zkoušky bioakumulace z půdy

Žížaly

Doporučeným zkušebním druhem je *Eisenia fetida* (Savigny 1826), patřící do čeledi Lumbricidae. Od roku 1972 je rozdělen do dvou poddruhů (*Eisenia fetida* and *Eisenia andrei* (10)). Podle Jaenikeho (36) se jedná o samostatné oddělené druhy. *Eisenia fetida* je snadno rozpoznatelná podle jasně žlutých pruhů na článcích, zatímco *Eisenia andrei* má jednolitou tmavě červenou barvu. Oba druhy pravděpodobně pocházejí z černomořské oblasti a dnes jsou rozšířeny po celém světě, zejména v antropogenně modifikovaných přírodních stanovištích, jako jsou hromady kompostu. Oba tyto druhy lze použít pro ekotoxikologické zkoušky i pro zkoušky bioakumulace.

Eisenia fetida a *Eisenia andrei* jsou komerčně dostupné, např. jako rybí návnada Ve srovnání s jinými druhy z čeledi žížalovitých mají krátký životní cyklus, dosahují dospělosti za přibližně 2–3 měsíce (při pokojové teplotě). Jejich optimální teplota je přibližně 20 až 24 °C. Dávají přednost relativně vlhkým substrátům s téměř neutrálním pH a vysokým obsahem organických látek. Vzhledem k široce rozšířenému využívání těchto druhů ve standardizovaných ekotoxikologických zkouškách po dobu již asi 25 let je jejich kultivace dobře zavedena (48, 77).

Oba druhy lze chovat v celé řadě zvířecích exkrementů. Chovné médium, které doporučuje ISO (35) je 50:50 směs koňského nebo hovězího hnoje a rašeliny. Médium musí mít pH asi 6 až 7 (upraví se uhličitanem vápenatým) a nízkou iontovou vodivost (méně než 6 mS/cm nebo koncentraci solí nižší než 0,5 %), a nemělo by být příliš znečištěno amoniakem nebo zvířecí močí Lze použít rovněž komerční zahradní zeminu bez přísad nebo umělou půdu podle OECD (48), nebo jejich směs v poměru 50:50. Substrát musí být vlhký, ale ne příliš mokrý. Jako chovné nádoby jsou vhodné nádoby o objemu 10 až 50 litrů.

Pro získání červů standardního stáří a hmotnosti je nejlépe založit kulturu se zámotky. Dospělí červi se proto vloží do chovné nádoby obsahující čerstvý substrát umožňující vytvoření zámotků. Praktické zkušenosti ukázaly, že k dobrým hodnotám reprodukce vede hustota populace přibližně 100 dospělých červů na 1 kg substrátu (hmotnost ve vlhkém stavu). Po 28 dnech se dospělí červi vyjmou. Žížaly vylíhlé ze zámotků se použijí ke zkoušení poté, co dospějí (nejméně po dvou, ale po méně než dvanácti měsících).

Červy výše popsaných druhů lze považovat za zdravé, pokud se v substrátu pohybují, nepokoušejí se ze substrátu uniknout a nepřetržitě se rozmnožují. Velmi pomalý pohyb nebo žlutý zadní konec v případě *Eisenia fetida*) svědčí o vyčerpání substrátu. V takovém případě se doporučuje použít čerstvý substrát a/nebo snížit počet živočichů v nádobě.

Další vybrané odkazy

Gerard BM (1964). Synopsis of the British fauna. No. 6 Lumbricidae. Linnean Soc. London, 6: 1-58.

Graff O (1953). Die Regenwürmer Deutschlands. Schr. Forsch. Anst. Landwirtsch. 7: 1-81.

Römbke J, Egeler P, Füll C (1997). Literaturstudie über Bioakkumulationstests mit Oligochaeten im terrestrischen Medium. Bericht für das UBA F + E 206 03 909, 86 S.

Rundgren S (1977). Seasonality of emergence in lumbricids in southern Sweden. Oikos 28: 49-55.

Satchell JE (1955). Some aspects of earthworm ecology. Soil Zoology (Kevan): 180-201.

▼M4

Sims RW and Gerard BM (1985). A synopsis of the earthworms. Linnean Soc. London 31: 1-171.

Tomlin AD (1984). The earthworm bait market in North America. In: Earthworm Ecology - from Darwin to vermiculture. Satchell, J.E. (ed.), Chapman & Hall, London. 331–338 pp.

Roupice

Doporučovaným zkušebním druhem je *Enchytraeus albidus* Henle 1837 (roupice bělavá). *Enchytraeus albidus* je jeden z největších druhů roupic (měří až 15 mm) z čeledi *Enchytraeidae*, řádu *Oligochaeta*, kmene *Annelida* a je celosvětově rozšířen, např. (8). *Enchytraeus albidus* lze nalézt v mořském, sladkovodním a suchozemském prostředí, zejména v rozkládajícím se organickém materiálu (chaluhách, kompostu) a pouze zřídkakdy na loukách (42). Tato široká ekologická tolerance a některé morfologické proměny naznačují, že tento druh může tvořit několik ras.

Enchytraeus albidus lze získat komerčně, protože se prodává jako krmivo pro ryby. Mělo by se ověřit, zda není kultura kontaminována jinými, obvykle menšími druhy (60). Pokud se znečištění objeví, omyjí se všechny roupice vodou v Petriho misce. Pomocí stereomikroskopu se následně vyberou velké dospělé exempláře *Enchytraeus albidus* jako počátek nové kultury. Všechny ostatní roupice se vyřadí. Tato roupice má krátký životní cyklus: dospělosti dosahuje mezi 33 dny (při 18 °C) až 74 dny (při 12 °C). Pro zkoušku mohou být použity pouze kultury, které byly bez problémů udržovány v laboratorních podmínkách minimálně 5 týdnů (jeden generační cyklus).

Jako zkušební organismy jsou vhodné i další druhy rodu *Enchytraeus,* zejména *Enchytraeus luxuriosus.* Tento druh je skutečným obyvatelem půdy, který byl nově popsán v (65). Pokud se použijí jiné druhy *Enchytraeus*, musí být jasně identifikovány a musí být logicky zdůvodněna volba druhu.

Enchytraeus crypticus (Westheide & Graefe 1992) je druh, který náleží ke stejné skupině jako *Enchytraeus luxuriosus*. Dosud nebylo s jistotou zjištěno, zda existuje ve volné přírodě, neboť byl popsán pouze v kulturách žížal a hromadách kompostu (Römbke 2003). Jeho původní ekologické požadavky proto nejsou známy. Nedávné laboratorní studie různých polních půd však potvrdily, že tento druh má širokou toleranci k vlastnostem půdy, jako je pH a struktura (Jänsch et al. 2005). Vzhledem k jednoduchosti jeho chovu a postupu zkoušení se v posledních letech tento druh velmi často používá při ekotoxikologických studiích, např. Kuperman et al. 2003). Avšak malá velikost (3–12 mm; v průměru 7 mm (Westheide & Müller 1996), je důvodem obtížnější manipulace s ním než s *Enchytraeus albidus*. Je-li použit tento druh namísto druhu *Enchytraeus albidus*, lze použít menší zkušební nádobu, není to však povinností. Navíc je potřeba vzít v úvahu, že tento druh se velmi rychle rozmnožuje – doba jeho reprodukce je kratší než 20 dnů při teplotě 20 ± 2 °C (Achazi et al. 1999) a při vyšších teplotách ještě kratší.

Enchytraeidae druhu *Enchytraeus albidus* (právě tak jako jiné druhy *Enchytraeus* sp.) je možno chovat ve velkých plastových boxech (např. 30×60×10 cm nebo 20×12×8 cm, který je vhodnější pro pěstování menších červů) naplněných směsí umělé půdy a komerčně dostupné přírodní neznečištěné zahradní půdy. Kompostovaný materiál by se neměl používat, protože by mohl obsahovat toxické chemické látky, jakými jsou těžké kovy. Před použitím by měla být z chovné půdy odstraněna veškerá fauna trojnásobným hlubokým zmrazením. Je možné použít také neznečištěnou umělou půdu, ale ve srovnání s míchanými substráty by reprodukce mohla být pomalejší. Substrát by měl mít pH 6,0 ± 0,5. Kultura se udržuje v inkubátoru ve tmě při teplotě 15 ± 2 °C. V každém případě by teplota neměla být vyšší než 23 °C. Umělá/přírodní půda by měla být vlhká, ale ne mokrá. Pokud se půda jemně stlačí rukou, měly by se objevit pouze malé kapičky vody. V každém případě by se mělo zabránit vzniku anaerobních podmínek (např. pokud se použije víčko, mělo by mít dostatečný počet otvorů, který umožní dostatečnou výměnu vzduchu). Chovný substrát by měl být jednou týdně provzdušňován opatrným promícháváním.

▼M4

Roupice se krmí nejméně jednou týdně ad libitum ovesnými vločkami, které se umístí do dutiny na povrchy půdy a přikryjí se půdou. Pokud v nádobě zbude potrava od posledního krmení, mělo by se dodávané množství potravy odpovídajícím způsobem upravit. Pokud na zbylé potravě rostou plísně, měla by se nahradit novou dávkou ovesných vloček. Pro stimulaci reprodukce se do ovesných vloček může každé dva týdny přidat komerčně dostupný proteinový prášek s příměsí vitaminů. Po třech měsících se živočichové přemístí do čerstvě připravené kultury nebo chovného substrátu. Ovesné vločky, které se uchovávají v utěsněných nádobách, by se měly před použitím autoklávovat nebo zahřát, aby se zabránilo infikování roztoči (např. *Glyzyphagus* sp., Astigmata, Acarina) nebo dravými roztoči (např. *Hypoaspis (Cosmolaelaps) miles*, Gamasida, Acarina). Po dezinfekci se potrava rozdrtí, takže ji lze snadno rozsypat po povrchu půdy. Dalším možným zdrojem potravy jsou pekařské kvasnice nebo krmení pro ryby TetraMin®.

Obecně jsou podmínky pro kultivaci dostatečné, pokud se roupice nepokoušejí uniknout ze substrátu, pohybují se půdou rychle, povrch jejich těla je lesklý bez ulpělých částic půdy, mají víceméně bělavé zabarvení a jsou viditelné roupice různého stáří. Roupice lze považovat za zdravé, pokud se nepřetržitě rozmnožují.

Další vybrané odkazy

Achazi RK, Fröhlich E, Henneken M, Pilz C (1999). The effect of soil from former irrigation fields and of sewage sludge on dispersal activity and colonizing success of the annelid *Enchytraeus crypticus* (Enchytraeidae, Oligochaeta). Newsletter on Enchytraeidae 6: 117–126.

Jänsch S, Amorim MJB, Römbke J (2005). Identification of the ecological requirements of important terrestrial ecotoxicological test species. Environ. Reviews 13: 51–83.

Kuperman RG, Checkai RT, Simini M, Phillips CT, Kolakowski JE, Kurnas CW, Sunahara GI (2003). Survival and reproduction of *Enchytraeus crypticus* (Oligochaeta, Enchytraeidae) in a natural sandy loam soil amended with the nitro-heterocyclic explosives RDX and HMX. Pedobiologia 47: 651–656.

Römbke J (2003). Ecotoxicological laboratory tests with enchytraeids: A review. Pedobiologia 47: 607–616.

Westheide W and Graefe U (1992). Two new terrestrial *Enchytraeus* species (Oligochaeta, Annelida). J. Nat. Hist. 26: 479–488.

Westheide W and Müller MC (1996). Cinematographic documentation of enchytraeid morphology and reproductive biology. Hydrobiologia 334: 263–267.

▼M6

C.31. ZKOUŠKA SUCHOZEMSKÝCH ROSTLIN: ZKOUŠKA VZCHÁZIVOSTI OSIVA A RŮSTU SEMENÁČKŮ

ÚVOD

1. Tato zkušební metoda je rovnocenná Pokynu OECD pro zkoušení 208 (2006). Zkušební metody se pravidelně přezkoumávají s ohledem na vědecký pokrok a aplikovatelnost pro zákonné použití. Tato aktualizovaná zkušební metoda je určena pro hodnocení potenciálních účinků chemických látek na vzcházivost osiva a růst semenáčků. Jako taková nepokrývá chronické účinky nebo účinky na reprodukci (tj. množství semen, tvorba květů, zrání plodů). Je třeba brát v úvahu podmínky expozice a vlastnosti chemické látky určené ke zkoušení, aby se zajistilo, že budou použity příslušné zkušební metody (např. při zkoušení kovů/kovových sloučenin je třeba počítat s efekty pH a s tím spojených protiiontů) (1). Tato zkušební metoda se netýká rostlin vystavených parám chemických látek. Zkušební metoda je vhodná pro zkoušení obecných chemických látek, biocidů a přípravků na ochranu plodin (rovněž známých jako přípravky na ochranu rostlin nebo pesticidy). Metoda byla vyvinuta na základě stávajících metod (2, 3, 4, 5, 6, 7). Rovněž byly zohledněny další dokumenty vztahující se ke zkoušení rostlin (8, 9, 10). Použité definice jsou uvedeny v dodatku 1.

PODSTATA ZKOUŠKY

2. Zkouška hodnotí účinky na vzcházivost osiva a rané fáze růstu vyšších rostlin po expozici zkoušené chemické látce v půdě (nebo jiné vhodné půdní matrici). Semena se umístí do půdy vystavené působení zkoušené chemické látky a účinky se vyhodnotí obvykle 14 až 21 dnů poté, co vzejde 50 % osiva v kontrolní skupině. Cílovými ukazateli jsou vizuální hodnocení vzcházivosti osiva, hmotnost suchých výhonků (alternativně hmotnost čerstvých výhonků) a v určitých případech výška výhonků a rovněž hodnocení viditelných škodlivých účinků na různé části rostlin. Tato měření a pozorování se porovnají s neexponovanými kontrolními rostlinami.

3. V závislosti na očekávaném způsobu expozice se zkoušená chemická látka buď zapracuje do půdy (nebo případně do umělé půdní matrice) nebo se aplikuje na povrch půdy, což správně představuje potenciální způsob expozice chemické látce. Zapracování do půdy se provede zpracováním půdy v objemu. Po aplikaci se půda přemístí do květináčů a semena daného rostlinného druhu se vysejí do půdy. Povrchová aplikace se provádí na půdu v květináčích, do které již byla vsazena semena. Zkoušené jednotky (kontrolní a exponované půdy se semeny) se pak umístí do prostoru s vhodnými podmínkami pro podporu klíčení/růstu rostlin.

4. Zkoušku lze provádět tak, aby se stanovila křivka dávka-odezva nebo pro jednotlivou koncentraci/dávku jako limitní zkoušku podle účelu studie. Jestliže výsledky ze zkoušky s jednou koncentrací/dávkou překročí určitou úroveň toxicity (např. jsou-li pozorovány účinky vyšší než x %), provede se orientační zkouška pro stanovení horní a dolní meze toxicity; následuje zkouška s několika koncentracemi/dávkami pro stanovení křivky dávka-odezva. Použije se příslušná metoda statistické analýzy pro získání účinné koncentrace EC_x nebo účinné dávky ER_x vyvolávající účinek (např. EC_{25}, ER_{25}, EC_{50}, ER_{50}) pro nejcitlivější významný(é) parametr(y). Při této zkoušce je možno rovněž vypočítat koncentraci bez pozorovaných účinků (NOEC) a nejnižší koncentraci s pozorovaným účinkem (LOEC).

INFORMACE O ZKOUŠENÉ CHEMICKÉ LÁTCE

5. Následující informace jsou užitečné pro identifikaci očekávaného způsobu expozice chemické látce a pro uspořádání zkoušky: strukturní vzorec, čistota, rozpustnost ve vodě, rozpustnost v organických rozpouštědlech, rozdělovací

▼M6

koeficient 1-oktanol/voda, sorpční chování půdy, tlak par, stabilita chemické látky ve vodě a na světle a biologická rozložitelnost.

PLATNOST ZKOUŠKY

6. Aby byla zkouška uznána za platnou, musí být v kontrolních vzorcích splněna následující kritéria platnosti:

— vzcházivost osiva je alespoň 70 %,

— semenáčky nevykazují žádné viditelné fytotoxické účinky (např. chloróza, nekróza, vadnutí, deformace listů a stonků) a rostliny vykazují pouze normální odchylky v růstu a morfologii pro příslušný druh,

— střední hodnota přežití vzešlých kontrolních semenáčků je alespoň 90 % po dobu trvání studie,

— podmínky prostředí pro příslušný druh jsou identické a růstová média obsahují stejné množství půdní matrice, podpůrných médií nebo substrátu ze stejného zdroje.

REFERENČNÍ CHEMICKÁ LÁTKA

7. Referenční chemická látka se může zkoušet v pravidelných intervalech pro ověření, zda se účinnost zkoušky a odezva příslušných zkoušených rostlin a zkušebních podmínek v průběhu zkoušky významně nezměnily. Alternativně je možné použít dřívější měření biomasy nebo růstu kontrolních vzorků pro vyhodnocení fungování zkušebního systému v příslušných laboratořích a výsledky mohou sloužit jako měřítko kontroly kvality pro danou laboratoř.

POPIS METODY

Přírodní půda – umělý substrát

8. Rostliny se mohou pěstovat v květináčích v půdě písčitohlinité, hlinitopísčité nebo písčitojílovitohlinité obsahující až 1,5 % organického uhlíku (přibližně 3 % organické hmoty). Rovněž se dá použít běžně prodávaný substrát nebo syntetická půdní směs, která obsahuje do 1,5 % organického uhlíku. Jílovité půdy by se neměly používat, jestliže je o zkoušené chemické látce známo, že vykazuje vysokou afinitu k jílu. Půda z pole se musí prosít na velikost částic 2 mm, aby se homogenizovala a odstranily se hrubé částice. V závěrečné zprávě se musí uvést typ a textura půdy, procentuální zastoupení organického uhlíku, pH a obsah solí měřením elektrické vodivosti konečné připravené půdy. Půda by měla být klasifikována podle standardního klasifikačního systému (11). Půdu je možné pasterizovat nebo tepelně ošetřit, aby se snížil účinek půdních patogenů.

9. Přírodní půda může komplikovat interpretaci výsledků a zvýšit variabilitu způsobenou měnícími se fyzikálně/chemickými vlastnostmi a mikrobiálními populacemi. Tyto proměnné zase mění schopnost zadržovat vlhkost, kapacitu vázat chemické látky, provzdušňování a obsah živin a stopových prvků. Kromě kolísání těchto fyzikálních faktorů se budou rovněž vyskytovat odchylky v chemických vlastnostech, jako je pH a oxidačně-redukční potenciál, což může ovlivnit biologickou dostupnost zkoušené chemické látky (12, 13, 14).

10. Umělé substráty se obvykle nepoužívají ke zkoušení přípravků na ochranu rostlin, lze je ale použít ke zkoušení běžných chemických látek nebo v případech, kdy je žádoucí minimalizovat variabilitu přírodních půd a zlepšit srovnatelnost výsledků zkoušek. Použité substráty by měly být složeny z inertních materiálů, které minimalizují interakce se zkoušenou chemickou látkou, nosným rozpouštědlem nebo s oběma. Jako vhodné inertní materiály se ukázaly křemenný písek vypraný kyselinou, minerální vlna a skleněné kuličky (např. o průměru 0,35 až 0,85 mm), které minimálně absorbují

▼M6

zkoušenou chemickou látku (15) a tím zajišťují, že chemická látka bude v maximální míře k dispozici pro sazenice příjmem kořeny. Nevhodnými substráty jsou vermikulit, perlit nebo jiné vysoce absorpční materiály. Rostlinám je třeba pro jejich růst poskytnout živiny, aby se předešlo strádání rostlin kvůli nedostatku živin, a tam, kde je to možné, je třeba stav vyhodnotit chemickou analýzou nebo vizuálním posouzením kontrolních rostlin.

Kritéria pro výběr zkušebního druhu

11. Spektrum vybraných druhů by mělo být rozumně široké, např. s ohledem na taxonomickou rozmanitost v rostlinné říši, distribuci druhů, jejich hojnost, druhově specifické charakteristiky životního cyklu a oblast přírodního výskytu, aby bylo možno stanovit rozsah odezvy (8, 10, 16, 17, 18, 19, 20). Při výběru je třeba brát v úvahu následující charakteristiky možných zkušebních druhů:

— druhy mají jednotná semena, která jsou přímo dostupná ze spolehlivých standardních zdrojů semen a která zajišťují konzistentní, spolehlivé a rovnoměrné klíčení, a rovněž jednotný růst semenáčků,

— rostlina je vhodná pro zkoušení v laboratoři a může poskytnout spolehlivé a reprodukovatelné výsledky v rámci jedné zkušební laboratoře i mezi zkušebními laboratořemi navzájem,

— citlivost zkoušených druhů by měla být konzistentní s odezvami rostlin v přírodním prostředí vystaveným účinku chemické látky,

— byly použity v určitém rozsahu v dřívějších zkouškách toxicity a jejich použití, například při biologických zkouškách herbicidů, screeningu těžkých kovů, zátěžových testech vztahujících se ke slanosti nebo obsahu minerálů nebo alelopatických studiích, ukazuje citlivost na širokou škálu stresových faktorů,

— jsou kompatibilní s růstovými podmínkami zkušební metody,

— splňují kritéria platnosti zkoušky.

Některé v minulosti nejčastěji používané zkušební druhy jsou uvedeny v dodatku 2 a možné neplodinové druhy v dodatku 3.

12. Počet druhů určených ke zkoušení závisí na příslušných právních požadavcích, proto není v této zkušební metodě specifikován.

Aplikace zkoušené chemické látky

13. Chemická látka se aplikuje ve vhodném nosiči (např. voda, aceton, etanol, polyethylenglykol, arabská guma, písek). Zkoušeny mohou být rovněž směsi (upravené produkty nebo přípravky) obsahující účinné složky a různé pomocné látky.

Zapracování do půdy/umělého substrátu

14. Chemické látky rozpustné ve vodě nebo suspendované ve vodě se mohou rozmíchat ve vodě a roztok se pak promíchá s půdou ve vhodném mísícím zařízení. Tento typ zkoušky může být vhodný, jestliže k expozici chemické látce dochází prostřednictvím půdy nebo vody v půdních pórech a jestliže je cílem sledovat příjem kořeny. Přidáním zkoušené chemické látky by neměla být překročena retenční vodní kapacita půdy. Objem přidané vody by měl být stejný pro každou zkušební koncentraci, ale měl by být omezen, aby se zabránilo hromadění shluků v půdě.

▼M6

15. Chemické látky s nízkou rozpustností ve vodě se rozpustí ve vhodném těkavém rozpouštědle (např. aceton, ethanol) a promíchají s pískem. Rozpouštědlo se pak odstraní z písku pomocí proudu vzduchu za stálého promíchávání písku. Takto zpracovaný písek se pak promíchá s experimentální půdou. Připraví se druhý kontrolní vzorek, ve kterém bude pouze písek a rozpouštědlo. Do vzorků o všech expozičních úrovních a do druhého kontrolního vzorku se přidají stejná množství písku se zamíchaným a s odstraněným rozpouštědlem. V případě pevných, nerozpustných zkoušených chemických látek se suchá půda a chemická látka promíchají ve vhodném míchacím zařízení. Půda se pak přidá do květináčů a ihned se zasejí semena.

16. Je-li namísto půdy použit umělý substrát, chemické látky rozpustné ve vodě se mohou rozpustit v živném roztoku bezprostředně před začátkem zkoušky. Chemické látky, které jsou nerozpustné ve vodě, ale které se dají ve vodě suspendovat použitím nosného rozpouštědla, se přidají s nosičem do živného roztoku. Ve vodě nerozpustné chemické látky, pro které není k dispozici žádný netoxický nosič rozpustný ve vodě, se rozpustí ve vhodném těkavém rozpouštědle. Roztok se promíchá s pískem nebo skleněnými kuličkami a odpaří v rotační vakuové odparce, přičemž vznikne jednotný povlak chemické látky na písku nebo kuličkách. Zvážený podíl kuliček se extrahuje stejným organickým rozpouštědlem a chemická látka se stanoví před naplněním květináčů.

Povrchová aplikace

17. V případě přípravků na ochranu rostlin se pro aplikaci zkoušené chemické látky často používá postřik povrchu půdy zkoušeným roztokem. Veškeré zařízení použité při provádění zkoušek, včetně vybavení použitého k přípravě a dávkování zkoušené chemické látky, by mělo mít takovou konstrukci a kapacitu, aby zkoušky zahrnující toto zařízení mohly být provedeny přesně a poskytly reprodukovatelné pokrytí. Pokrytí by mělo být jednotné po celém půdním povrchu. Pozornost je třeba věnovat tomu, aby se předešlo možnosti, že by chemická látka byla adsorbována nebo reagovala s vybavením (např. s plastovými trubkami a lipofilními chemikáliemi nebo ocelovými částmi a elementy). Zkoušená chemická látka se nastříkne na půdní povrch, čímž se simuluje typický postřik aplikovaný v nádržích. Obecně by objemy postřiku měly být v rozmezí normální zemědělské praxe a objemů (množství vody atd. je třeba uvést v závěrečné zprávě). Typ trysky se zvolí tak, aby umožnil jednotné pokrytí půdního povrchu. Jestliže se používají rozpouštědla a nosiče, připraví se druhá skupina kontrolních rostlin, na kterou se aplikuje pouze rozpouštědlo/nosič. To není nezbytné u přípravků na ochranu rostlin, u nichž se testuje složení.

Ověření koncentrace/dávky zkoušené chemické látky

18. Koncentrace/aplikační dávky se musí ověřit vhodnou analytickou metodou. U rozpustných chemických látek se ověření všech zkušebních koncentrací/dávek může provést analýzou nejvyšší koncentrace zkoušeného roztoku použitého při zkoušce; zaznamená se následné zředění a použití kalibrovaných pomůcek (např. kalibrovaného analytického laboratorního skladu, kalibrovaného vybavení pro aplikaci postřiku). V případě nerozpustných chemikálií musí být spolu s ověřením materiálu složek uvedeny hmotnosti zkoušené chemické látky přidané do půdy. Jestliže je nutné prokázat homogenitu, může být nutné provést analýzu půdy.

POSTUP

Uspořádání zkoušky

19. Semena stejného druhu se vysejí do květináčů. Počet semen vysetých v květináči závisí na druhu, velikosti květináče a době trvání zkoušky. Počet rostlin v květináči by měl poskytovat adekvátní podmínky růstu a předejít přeplnění během trvání zkoušky. Maximální hustota rostlin je okolo 3–10 semen na 100 cm^2 v závislosti na velikosti semen. Například se doporučuje jedna až

▼M6

dvě rostliny kukuřice, sóji, rajčete, okurky nebo cukrové řepy v 15cm květináči; tři rostliny řepky nebo hrachu v 15cm květináči; a 5 až 10 cibulových, pšeničných nebo jiných malých semen v 15cm květináči. Počet semen a paralelních květináčů (paralelní vzorek je definován jako květináč, proto rostliny ve stejném květináči nejsou považovány za paralelní vzorek) by měl být dostatečný pro optimální statistickou analýzu (21). Je třeba poznamenat, že variabilita bude větší u zkušebních druhů s velkými semeny, kterých se dává méně na květináč (opakování) ve srovnání se zkušebním druhem s malými semeny, jichž je možné použít větší počet na jeden květináč. Vysetím stejného počtu semen do každého květináče lze tuto variabilitu minimalizovat.

20. Kontrolní skupiny se používají, aby bylo jisté, že pozorované účinky jsou spojeny pouze s expozicí zkoušené chemické látce, nebo je lze této expozici přisoudit. Příslušná kontrolní skupina by měla být v každém ohledu identická se zkoušenou skupinou s výjimkou expozice zkoušené chemické látce. Během dané zkoušky by všechny zkušební rostliny, včetně kontrolních, měly být ze stejného zdroje. Aby se zabránilo systematickým chybám, je vyžadováno náhodné přiřazení zkušebních a kontrolních květináčů.

21. Semena pokrytá insekticidy nebo fungicidy (tzv. „oblečená“ semena) se musí vyloučit. Avšak některé regulační orgány použití určitých nesystemických kontaktních fungicidů (např. kaptan, thiram) povolují (22). Jestliže je obava z patogenů vnesených semeny, mohou se semena nechat krátce nasáknout ve slabém 5 % roztoku chlornanu, pak důkladně opláchnout pod tekoucí vodou a osušit. Není povoleno žádné léčivé ošetření jiným přípravkem na ochranu rostlin.

Zkušební podmínky

22. Zkušební podmínky by měly napodobit podmínky nezbytné pro normální růst zkoušených druhů a odrůd (v dodatku 4 jsou uvedeny příklady zkušebních podmínek). Vyvíjející se rostliny je třeba udržovat v podmínkách správné zahradnické praxe v řízeném prostředí komor, fytotronů nebo skleníků. Při použití růstových zařízení tato praxe obvykle zahrnuje regulaci a dostatečně časté (např. jednou za den) zaznamenávání teploty, vlhkosti, koncentrace oxidu uhličitého, světelných podmínek (intenzity, vlnové délky, fotosynteticky aktivního záření), doby osvětlení, prostředků zavlažování atd.; tím se zajistí dobrý růst rostlin, což se posuzuje pomocí kontrolních rostlin zvoleného druhu. Teplota ve skleníku by se měla regulovat pomocí systémů ventilace, vytápění anebo chlazení. Pro zkoušení ve sklenících jsou obecně doporučeny následující podmínky:

— teplota: 22 °C ± 10 °C,

— relativní vlhkost: 70 % ± 25 %,

— fotoperioda: minimálně 16 hodin osvětlení,

— intenzita záření dopadajícího na povrch (ozářenost): 350 ± 50 μE · m^{-2} · s^{-1}. Dodatečné osvětlení může být nezbytné, jestliže se intenzita sníží pod 200 μE · m^{-2} · s^{-1}, vlnová délka 400–700 nm s výjimkou určitých druhů, jejichž požadavky na osvětlení jsou menší.

V průběhu studie se podmínky prostředí monitorují a zaznamenávají. Rostliny se pěstují v neporézních plastových nebo glazovaných květináčích

▼M6

s táckem nebo miskou pod nimi. Květináče se mohou pravidelně přemísťovat, aby se minimalizovala variabilita v růstu rostlin (v důsledku rozdílů ve zkušebních podmínkách v růstovém zařízení). Květináče musí být dostatečně velké, aby umožnily normální růst.

23. Půdní živiny je možné dodávat podle potřeby pro zachování dobré vitality rostlin. Potřeba a načasování dodatečných živin se mohou určit pozorováním kontrolních rostlin. Doporučuje se spodní zavlažování zkušebních květináčů (např. použitím knotů ze skelných vláken). Počáteční vrchní zavlažení se však může použít pro stimulaci klíčení semen; při aplikaci zkoušené chemické látky na půdní povrch se takto usnadní její průnik do půdy.

24. Specifické růstové podmínky by měly být vhodné pro zkušební druh a zkoušenou chemickou látku, které jsou předmětem zkoumání. Kontrolní a exponované rostliny se musí držet za stejných podmínek okolního prostředí; je však třeba přijmout adekvátní opatření, aby se zabránilo křížné expozici zkoušené chemické látce (např. těkavé látce) mezi různými exponovanými a kontrolními vzorky.

Zkoušení jediné koncentrace/dávky

25. Pro stanovení vhodné koncentrace/dávky chemické látky při provádění zkoušky (provokační/mezní) s jedinou koncentrací nebo dávkou je třeba zvážit řadu faktorů. U běžných chemikálií k takovým faktorům patří fyzikální a chemické vlastnosti chemické látky, u přípravků na ochranu rostlin je třeba brát v úvahu fyzikální a chemické vlastnosti a způsob použití zkoušené chemické látky, její maximální koncentraci nebo aplikační dávku, počet aplikací za sezónu anebo stálost zkoušené látky. Pro stanovení, zda běžná chemikálie vykazuje fytotoxické vlastnosti, může být vhodné provést zkoušku při maximální dávce 1 000 mg/kg suché půdy.

Orientační zkouška

26. Podle potřeby je možné provádět orientační zkoušku pro určení rozsahu koncentrací/dávek, které mají být zkoušeny v hlavní studii zjišťující vztah dávka-odezva. Při orientační zkoušce by zkušební koncentrace/dávky měly být zvoleny s velkými intervaly (např. 0,1, 1,0, 10, 100 a 1 000 mg/kg suché půdy). U přípravků na ochranu rostlin mohou koncentrace/dávky vycházet z doporučených nebo maximálních hodnot koncentrací nebo aplikačních dávek, např. 1/100, 1/10, 1/1 doporučené/maximální koncentrace nebo aplikační dávky.

Zkouška s několika koncentracemi/dávkami

27. Účelem zkoušky s několika koncentracemi/dávkami je určit vztah dávka-odezva a stanovit hodnotu EC_x nebo ER_x pro vzcházivost, biomasu anebo viditelné účinky ve srovnání s neexponovanými kontrolními vzorky podle požadavků regulačních orgánů.

28. Počet a rozložení koncentrací nebo dávek by mělo být dostatečné, aby poskytly spolehlivý vztah dávka-odezva a regresní rovnici a umožnily odhad EC_x nebo ER_x. Zvolené koncentrace/dávky by měly zahrnovat hodnoty EC_x nebo ER_x, které mají být stanoveny. Například, jestliže je požadována hodnota EC_{50}, bude žádoucí provést zkoušku při dávkách vyvolávajících 20–80 % účinek. Doporučený počet zkoušených koncentrací/dávek, kterými se toho dosáhne, je alespoň pět v geometrické posloupnosti

▼M6

plus neexponovaný kontrolní vzorek, rozložených s faktorem nepřekračujícím tři. Pro každou exponovanou a kontrolní skupinu by počet opakování měl být alespoň čtyři a celkový počet semen alespoň 20. Pro zvýšení statistické síly zkoušky může být zapotřebí více opakování s určitými rostlinami vykazujícími nízkou rychlost klíčení nebo proměnné růstové průběhy. Jestliže se použije větší počet zkušebních koncentrací/dávek, může se počet opakování snížit. Jestliže je třeba odhadnout hodnotu NOEC, může být potřeba více opakování pro dosažení požadované statistické síly (23).

Pozorování

29. Během doby pozorování, tj. 14 až 21 dní poté, co vzešlo 50 % kontrolních rostlin (rovněž případně kontrolních vzorků s rozpouštědly), jsou rostliny často pozorovány (alespoň jednou za týden a, je-li to možné, denně) z hlediska vzcházivosti a viditelné fytotoxicity a mortality. Na konci zkoušky se zaznamená změřený procentní podíl vzcházivosti a biomasy přeživších rostlin a rovněž viditelné škodlivé účinky na různých částech rostlin. Škodlivými účinky jsou abnormální vzhled vzešlých semenáčků, zakrslý růst, chloróza, odbarvení, odumření a účinky na vývoj rostlin. Konečnou biomasu lze měřit prostřednictvím konečné průměrné hmotnosti suchých výhonků přeživších rostlin, kdy se požnou výhonky při povrchu půdy a usuší do konstantní hmotnosti při 60 °C. Alternativně se může konečná biomasa měřit prostřednictvím hmotnosti čerstvých výhonků. Výška výhonku může představovat další cílový ukazatel, jestliže je požadován regulačními orgány. Pro vyhodnocení pozorovatelných toxických účinků je třeba použít jednotný systém vyhodnocování viditelného poškození. Příklady provádění kvalitativního a kvantitativního vizuálního hodnocení jsou uvedeny v odkazech (23, 24).

ÚDAJE A PŘEDKLÁDÁNÍ ZPRÁV

Statistická analýza

Zkouška s jedinou koncentrací/dávkou

30. Údaje pro každý druh rostlin se analyzují použitím vhodné statistické metody (21). V závěrečné zprávě by se měla uvést úroveň účinku při zkušební koncentraci/dávce nebo nedosažení daného účinku při zkušební koncentraci/dávce (např. < *x* % účinek pozorovaný při koncentraci nebo dávce *y*).

Zkouška s několika koncentracemi/dávkami

31. Vztah dávka-odezva se stanoví ve formě regresní rovnice. Je možné použít rozdílné modely: například pro odhad hodnoty EC_x nebo ER_x (např. EC_{25}, ER_{25}, EC_{50}, ER_{50}) a jejího intervalu spolehlivosti pro vzcházivost v binárním tvaru mohou být vhodné metody logitová, probitová, Weibullova, Spearman-Karberova, upravená Spearman-Karberova atp. Pro růst semenáčků – tj. jejich hmotnost a výšku jako průběžné ukazatele – se mohou hodnoty EC_x nebo ER_x a jejich intervaly spolehlivosti odhadnout použitím vhodné regresní analýzy (např. Bruce-Versteegova nelineární regresní analýza (25)). Tam, kde je to možné, by hodnota R^2 měla být 0,7 nebo vyšší pro většinu citlivých druhů a použité zkušební koncentrace/dávky by měly zahrnovat 20 % až 80 % účinky. Jestliže má být odhadnuta hodnota NOEC, dává se přednost použití silných statistických testů zvolených na základě rozdělení dat (21, 26).

Závěrečná zpráva

32. Závěrečná zpráva by měla obsahovat výsledky studií a rovněž podrobný popis zkušebních podmínek, důkladnou diskusi výsledků, analýzu dat a závěry získané na základě analýz. Rovněž by měl být obsažen tabelární souhrn a abstrakt výsledků. Závěrečná zpráva musí zahrnovat následující:

▼**M6**

Zkoušená chemická látka:

— identifikační údaje chemické látky, relevantní vlastnosti zkoušené chemické látky (např. log P_{ow}, rozpustnost ve vodě, tlak par a informace o osudu a chování v životním prostředí, jsou-li k dispozici);

— podrobnosti o přípravě zkušebního roztoku a ověření zkušebních koncentrací, jak je specifikováno v odstavci 18.

Zkušební druh:

— podrobnosti o zkušebním organismu: druh/odrůda, čeledi rostliny, vědecký a obecný název, zdroj a historie semen co nejpodrobnější (tj. jméno dodavatele, procentuální klíčivost, třída velikosti semen, číslo várky nebo dávky, rok setí nebo sezóna pěstování shromážděných vzorků, datum hodnocení klíčení), životaschopnost atd.,

— počet zkoušených jedno- a dvouděložných druhů,

— odůvodnění výběru druhu,

— popis skladování, zpracování a udržování semen.

Zkušební podmínky:

— zkušební zařízení (např. růstová komora, fytotron a skleník),

— popis zkušebního systému (např. rozměry květináčů, materiál květináčů a množství půdy),

— charakteristiky půdy (textura nebo typ půdy: distribuce půdních částic a klasifikace, fyzikální a chemické vlastnosti, včetně podílu organické hmoty, podílu organického uhlíku a pH),

— příprava půdy/substrátu (např. půda, umělá půda, písek a jiné) před zkouškou,

— popis živného média, jestliže se používá,

— aplikace zkoušené chemické látky: popis metody aplikace, popis vybavení, stupně a objemy expozice včetně ověření chemické látky, popis kalibrační metody a popis podmínek během aplikace,

— podmínky růstu: ozářenost (např. PAR (parabolický hliníkový reflektor), fotosynteticky aktivní záření), fotoperioda, maximální/minimální teplota, harmonogram a způsob zavlažování, hnojení,

— počet semen v květináči, počet rostlin na dávku, počet opakování (květináčů) na stupeň expozice,

— typ a počet kontrolních vzorků (negativní anebo pozitivní kontrolní vzorky, kontrolní vzorky s rozpouštědlem, jestliže se použije),

— doba trvání zkoušky.

Výsledky:

— tabulka všech cílových ukazatelů pro každé opakování, zkušební koncentrace/dávka a druh,

— počet a procentuální vzcházivost ve srovnání s kontrolními vzorky,

— měření biomasy (hmotnost suchých výhonků nebo čerstvých výhonků) rostlin vyjádřená jako procentuální podíl kontrolního vzorku,

▼M6

— výška výhonků rostlin jako procentuální podíl kontrolního vzorku, jestliže se měří,

— procentuální podíl viditelně poškozených rostlin a kvalitativní a kvantitativní popis viditelného poškození (chloróza, nekróza, vadnutí, deformace listů a stonků, jakýkoli nedostatečný účinek) zkoušenou chemickou látkou ve srovnání s kontrolními rostlinami,

— popis stupnice hodnocení použité k posouzení viditelného poškození, jestliže se vizuální hodnocení provádí,

— u studií s jedinou dávkou je třeba uvést procentuální podíl poškození,

— hodnoty EC_x nebo ER_x (např. EC_{50}, ER_{50}, EC_{25}, ER_{25}) a příslušné intervaly spolehlivosti. Když se provádí regresní analýza, uvede se standardní odchylka pro regresní rovnici a standardní odchylka pro jednotlivý odhadnutý parametr (např. směrnice, úsek),

— hodnoty NOEC (a LOEC), jestliže byly vypočítány,

— popis použitých statistických postupů a předpokladů,

— grafické zobrazení těchto dat a vztah dávka-odezva zkoušeného druhu.

Odchylky od postupů popsaných v této zkušební metodě a jakékoli neobvyklé skutečnosti během zkoušky.

LITERATURA

1) Schrader G., Metge K., and Bahadir M. (1998). Importance of salt ions in ecotoxicological tests with soil arthropods. Applied Soil Ecology, 7, 189-193.

2) International Organisation of Standards. (1993). ISO 11269-1. Soil Quality – Determination of the Effects of Pollutants on Soil Flora – Part 1: Method for the Measurement of Inhibition of Root Growth.

3) International Organisation of Standards. (1995). ISO 11269-2. Soil Quality – Determination of the Effects of Pollutants on Soil Flora – Part 2: Effects of Chemicals on the Emergence and Growth of Higher Plants.

4) American Standard for Testing Material (ASTM). (2002). E 1963-98. Standard Guide for Conducting Terrestrial Plant Toxicity Tests.

5) U.S. EPA. (1982). FIFRA, 40CFR, Part 158.540. Subdivision J, Parts 122-1 and 123-1.

6) US EPA. (1996). OPPTS Harmonized Test Guidelines, Series 850. Ecological Effects Test Guidelines:

— 850.4000: Background – Non-target Plant Testing;

— 850.4025: Target Area Phytotoxicity;

— 850.4100: Terrestrial Plant Toxicity, Tier I (Seedling Emergence);

— 850.4200: Seed Germination/Root Elongation Toxicity Test;

— 850.4225: Seedling Emergence, Tier II;

— 850.4230: Early Seedling Growth Toxicity Test.

7) AFNOR, X31-201. (1982). Essai d'inhibition de la germination de semences par une substance. AFNOR X31-203/ISO 11269-1. (1993) Determination des effets des polluants sur la flore du sol: Méthode de mesurage de l'inhibition de la croissance des racines.

8) Boutin, C., Freemark, K.E. and Keddy, C.J. (1993). Proposed guidelines for registration of chemical pesticides: Non-target plant testing and evaluation. Technical Report Series No.145. Canadian Wildlife Service (Headquarters), Environment Canada, Hull, Québec, Canada.

▼**M6**

9) Forster, R., Heimbach, U., Kula, C., and Zwerger, P. (1997). Effects of Plant Protection Products on Non-Target Organisms – A contribution to the Discussion of Risk Assessment and Risk Mitigation for Terrestrial Non-Target Organisms (Flora and Fauna). Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd. No 48.

10) Hale, B., Hall, J.C., Solomon, K., and Stephenson, G. (1994). A Critical Review of the Proposed Guidelines for Registration of Chemical Pesticides; Non-Target Plant Testing and Evaluation, Centre for Toxicology, University of Guelph, Ontario Canada.

11) Soil Texture Classification (US and FAO systems): Weed Science, 33, Suppl. 1 (1985) and Soil Sc. Soc. Amer. Proc. 26:305 (1962).

12) Audus, L.J. (1964). Herbicide behaviour in the soil. In: Audus, L.J. ed. The Physiology and biochemistry of Herbicides, London, New York, Academic Press, NY, Chapter 5, pp. 163-206.

13) Beall, M.L., Jr. and Nash, R.G. (1969). Crop seedling uptake of DDT, dieldrin, endrin, and heptachlor from soil, J. Agro. 61:571-575.

14) Beetsman, G.D., Kenney, D.R. and Chesters, G. (1969). Dieldrin uptake by corn as affected by soil properties, J. Agro. 61:247-250.

15) U.S. Food and Drug Administration (FDA). (1987). Environmental Assessment Technical Handbook. Environmental Assessment Technical Assistance Document 4.07, Seedling Growth, 14 pp., FDA, Washington, DC.

16) McKelvey, R.A., Wright, J.P., Honegger, J.L. and Warren, L.W. (2002). A Comparison of Crop and Non-crop Plants as Sensitive Indicator Species for Regulatory Testing. Pest Management Science vol. 58:1161-1174

17) Boutin, C.; Elmegaard, N. and Kjær, C. (2004). Toxicity testing of fifteen non-crop plant species with six herbicides in a greenhouse experiment: Implications for risk assessment. Ecotoxicology vol. 13(4): 349-369.

18) Boutin, C., and Rogers, C.A. (2000). Patterns of sensitivity of plant species to various herbicides – An analysis with two databases. Ecotoxicology vol.9(4):255-271.

19) Boutin, C. and Harper, J.L. (1991). A comparative study of the population dynamics of five species of Veronica in natural habitats. J. Ecol. 9:155-271.

20) Boutin, C., Lee, H.-B., Peart, T.E., Batchelor, S.P. and Maguire, R.J.. (2000). Effects of the sulfonylurea herbicide metsulfuron methyl on growth and reproduction of five wetland and terrestrial plant species. Envir. Toxicol. Chem. 19 (10): 2532-2541.

21) OECD (2006). Draft Guidance Document, Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. Series on Testing and Assessment No 54, Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.

22) Hatzios, K.K. and Penner, D. (1985). Interactions of herbicides with other agrochemicals in higher plants. Rev. Weed Sci. 1:1-63.

23) Hamill, P.B., Marriage, P.B. and G. Friesen. (1977). A method for assessing herbicide performance in small plot experiments. Weed Science 25:386-389.

24) Frans, R.E. and Talbert, R.E. (1992). Design of field experiments and the measurement and analysis of plant response. In: B. Truelove (Ed.) Research Methods in Weed Science, 2nd ed. Southern weed Science Society, Auburn, 15-23.

25) Bruce, R.D. and Versteeg, D. J.(1992). A Statistical Procedure for Modelling Continuous Toxicity Data. Environmental Toxicology and Chemistry 11, 1485-1492.

26) Kapitola C.33 této přílohy: Zkouška toxicity pro reprodukci žížal (*Eisenia fetida/Eisenia andrei*).

▼M6

Dodatek 1

Definice

Účinná složka (ú.s.) (nebo účinná látka (ú.l.)) je látka určená k vyvolání specifického biologického účinku (např. hubení hmyzu, likvidace nákazy rostlin, hubení plevele na ošetřených plochách), rovněž je známá jako technická účinná složka, účinná látka.

Chemická látka je látka nebo směs.

Přípravky na ochranu plodin (CPP) nebo přípravky na ochranu rostlin (PPP) nebo pesticidy jsou látky se specifickou biologickou aktivitou záměrně používané k ochraně plodin před škůdci (např. plísňové choroby, hmyz a konkurenční rostliny).

EC_x – účinná koncentrace s x % účinkem nebo ER_x – účinná dávka s x % účinkem je koncentrace nebo dávka, jejímž výsledkem je nežádoucí změna u x % ve zkoušeném cílovém ukazateli v porovnání s kontrolou (např. 25 % nebo 50 % snížení vzcházivosti osiva, hmotnosti výhonku či konečného počtu přítomných rostlin nebo nárůst viditelného poškození by představovaly EC_{25}/ER_{25} nebo EC_{50}/ER_{50}).

Vzklíčení je objevení se koleoptile nebo děložního lístku nad půdním povrchem.

Přípravek je komerčně upravený výrobek obsahující účinnou látku (účinnou složku), rovněž znám jako konečný přípravek ([1]) nebo typický výrobek pro konečné použití (TEP).

Nejnižší koncentrace s pozorovaným účinkem (LOEC) je nejnižší koncentrace zkoušené chemické látky, u níž byl účinek pozorován. Při této zkoušce vykazuje koncentrace odpovídající LOEC statisticky významný účinek ($p < 0,05$) během dané expoziční doby ve srovnání s kontrolou a je vyšší než hodnota NOEC.

Necílové rostliny: Rostliny, které jsou mimo cílovou pěstební plochu. U přípravků na ochranu rostlin to obvykle znamená rostliny mimo plochu, na které se provádí expozice.

Koncentrace bez pozorovaných účinků (NOEC) je nejvyšší koncentrace zkoušené chemické látky, při které nebyl pozorován žádný účinek. Při této zkoušce nevykazuje koncentrace odpovídající NOEC žádný statisticky významný účinek ($p < 0,05$) během dané expoziční doby ve srovnání s kontrolou.

Fytotoxicita: Škodlivé odchylky (zjištěné měřením a vizuálním hodnocením) od normálního vzhledu a růstu rostlin v odezvě na danou chemickou látku.

Opakování je experimentální jednotka, která představuje kontrolní skupinu anebo exponovanou skupinu. V těchto studiích je jako opakování definován květináč.

Vizuální hodnocení: Hodnocení viditelného poškození na základě pozorování postoje rostlin, jejich vitality, znetvoření, chlorózy, nekrózy a celkového vzhledu ve srovnání s kontrolní skupinou.

Zkoušená chemická látka: Jakákoli látka nebo směs zkoušená touto metodou.

([1]) Konečný přípravek: komerčně upravený výrobek prodávaný v obchodě, který obsahuje účinnou chemickou látku (účinnou složku).

▼**M6**

Dodatek 2

Seznam druhů v minulosti použitých při zkoušení rostlin

Čeleď	Druh	Obecné názvy
DICOTYLEDONAE		
Apiaceae (Umbelliferae)	*Daucus carota*	mrkev obecná
Asteraceae (Compositae)	*Helianthus annuus*	slunečnice roční
Asteraceae (Compositae)	*Lactuca sativa*	salát hlávkový
Brassicaceae (Cruciferae)	*Sinapis alba*	hořčice setá
Brassicaceae (Cruciferae)	*Brassica campestris* var. *chinensis*	brukev zelí (čínské)
Brassicaceae (Cruciferae)	*Brassica napus*	brukev řepka (olejka)
Brassicaceae (Cruciferae)	*Brassica oleracea* var. *capitata*	brukev zelná (hlávkové zelí)
Brassicaceae (Cruciferae)	*Brassica rapa*	brukev řepák (vodnice)
Brassicaceae (Cruciferae)	*Lepidium sativum*	řeřicha setá
Brassicaceae (Cruciferae)	*Raphanus sativus*	ředkev setá
Chenopodiaceae	*Beta vulgaris*	řepa obecná
Cucurbitaceae	*Cucumis sativus*	okurka setá
Fabaceae (Leguminosae)	*Glycine max (G. soja)*	Sója luštinatá
Fabaceae (Leguminosae)	*Phaseolus aureus*	fazol zlatý (mungo)
Fabaceae (Leguminosae)	*Phaseolus vulgaris*	fazol obecný
Fabaceae (Leguminosae)	*Pisum sativum*	hrách setý
Fabaceae (Leguminosae)	*Trigonella foenum-graecum*	pískavice řecké seno
Fabaceae (Leguminosae)	*Lotus corniculatus*	štírovník růžkatý
Fabaceae (Leguminosae)	*Trifolium pratense*	jetel luční
Fabaceae (Leguminosae)	*Vicia sativa*	vikev setá
Linaceae	*Linum usitatissimum*	len setý
Polygonaceae	*Fagopyrum esculentum*	pohanka obecná
Solanaceae	*Solanum lycopersicum*	rajče jedlé

▼**M6**

Čeleď	Druh	Obecné názvy
MONOCOTYLEDONAE		
Liliaceae (Amaryllidaceae)	*Allium cepa*	cibule kuchyňská
Poaceae (Gramineae)	*Avena sativa*	oves setý
Poaceae (Gramineae)	*Hordeum vulgare*	ječmen setý
Poaceae (Gramineae)	*Lolium perenne*	jílek vytrvalý
Poaceae (Gramineae)	*Oryza sativa*	rýže setá
Poaceae (Gramineae)	*Secale cereale*	žito seté
Poaceae (Gramineae)	*Sorghum bicolor*	čirok obecný
Poaceae (Gramineae)	*Triticum aestivum*	pšenice setá
Poaceae (Gramineae)	*Zea mays*	kukuřice setá

▼M6

Dodatek 3

Seznam potenciálních neplodinových druhů

Potenciální druhy pro zkoušení toxicity na rostlinách podle OECD.

Poznámka: Následující tabulka poskytuje informace o 52 neplodinových druzích (odkazy jsou uvedeny v závorkách u každé položky). Uvedené vzcházivosti pocházejí z publikované literatury a slouží pouze jako obecné vodítko. Individuální zkušenost se může lišit v závislosti na zdroji semen a dalších faktorech.

ČELEĎ Botanický název druhu (český obecný název)	Délka života [1] a přirozené prostředí	Hmotnost semene (mg)	Fotoperioda pro klíčení nebo růst [2]	Hloubka setí (mm) [3]	Doba do vzklíčení (dny) [4]	Speciální zpracování [5]	Zkouška toxicity [6]	Dodavatelé semen [7]	Další odkazy [8]
APIACEAE *Torilis japónica* (tařice skalní)	A, B narušené oblasti, živé ploty, pastviny (16, 19)	1,7–1,9 (14, 19)	L = D (14)	0 (1, 19)	5 (50 %) (19)	studená stratifikace (7, 14, 18, 19) zrání může být nezbytné (19) klíčení tlumeno tmou (1, 19) žádné speciální zpracování (5)	POST (5)		
ASTERACEAE *Bellis perennis* (sedmikráska chudobka)	P louky, orná pole, trávníky (16, 19)	0,09–0,17 (4, 19)	L = D (14)	0 (4)	3 (50 %) (19) 11 (100 %) (18)	klíčení neovlivněno ozářeností (18, 19) žádné speciální zpracování (4, 14)	POST (4)	A, D, F	7
Centaurea cyanus (chrpa modrá)	A pole, okraje silnic, otevřená stanoviště (16)	4,1–4,9 (4, 14)	L = D (14)	0–3 (2, 4, 14)	14–21 (100 %) (14)	žádné speciální zpracování (2, 4)	POST (2,4)	A, D, E, F	7
Centaurea nigra (chrpa černá)	P pole, okraje silnic, otevřená stanoviště (16, 19)	2,4–2,6 (14, 19)	L = D (14)	0 (19)	3 (50 %) (19) 4 (97 %) (18)	zrání může být nezbytné (18, 19) klíčení tlumeno tmou (19) žádné speciální zpracování (5, 14, 26)	POST (5, 22, 26)	A	
Inula helenium (oman pravý)	P vlhká, narušená místa (16)	1–1,3 (4, 14, 29)		0 (4, 29)		žádné speciální zpracování (4)	POST (4)	A, F	

▼M6

ČELEĎ Botanický název druhu (český obecný název)	Délka života [1] a přirozené prostředí	Hmotnost semene (mg)	Fotoperioda pro klíčení nebo růst [2]	Hloubka setí (mm) [3]	Doba do vzklíčení (dny) [4]	Speciální zpracování [5]	Zkouška toxicity [6]	Dodavatelé semen [7]	Další odkazy [8]
Leontodon hispidus (máchelka srstnatá, pampeliška)	P pole, okraje silnic, narušené oblasti (16, 19)	0,85–1,2 (14, 19)	L = D (14)	0 (19)	4 (50 %) (19) 7 (80 %) (18)	klíčení tlumeno tmou (17, 18, 19) žádné speciální zpracování (5, 23)	POST (5, 22, 23)		
Rudbeckia hirta (třapatka srstnatá)	B, P narušené (16)	0,3 (4, 14)	L = D (14)	0 (4, 33)	< 10 (100 %) (33)	žádné speciální zpracování (4, 14, 33)	POST (4, 33)	C, D, E, F	
Solidago canadensis (zlatobýl kanadský)	P pastviny, otevřená stanoviště (16)	0,06–0,08 (4, 14)	L = D (11)	0 (4)	14–21 (11)	smíchat se stelným podílem písku a nasáknout v 500 ppm GA 24 hod. (11) žádné speciální zpracování (4)	POST (4)	E, F	
Xanthium pensylvanicum (řepeň pensylvánská)	A pole, otevřená stanoviště (16)	25–61 (14, 29)		0(1) 5(29)		klíčení může být tlumeno tmou (1), nasáknout v teplé vodě 12 hod. (29)	PRE & POST (31)	A	
Xanthium spinosum (řepeň trnitá)	A otevřená stanoviště (16)	200 (14)	L = D (14) L > D (6)	10 (6)		skarifikace (14) žádné speciální zpracování (6)	PRE & POST (6)	A	
Xanthium strumarium (řepeň italská)	A pole, otevřená stanoviště (16)	67,4 (14)	L = D (14)	10–20 (6, 21)		žádné speciální zpracování (6, 14, 21)	PRE & POST (6, 21, 28, 31)	A	
BRASSICACEAE *Cardamine pratensis* (řeřišnice luční)	P pole, okraje silnic, trávníky (16, 19)	0,6 (14, 19)	L = D (14)	0 (19)	5 (50 %) (19) 15 (98 %) (18)	klíčení tlumeno tmou (18, 19) žádné speciální zpracování (5, 14, 22)	POST (5, 22)	F	

▼M6

ČELEĎ Botanický název druhu (český obecný název)	Délka života [1] a přirozené prostředí	Hmotnost semene (mg)	Fotoperioda pro klíčení nebo růst [2]	Hloubka setí (mm) [3]	Doba do vzklíčení (dny) [4]	Speciální zpracování [5]	Zkouška toxicity [6]	Dodavatelé semen [7]	Další odkazy [8]
CARYOPHYLLACEAE *Lychnis flos-cuculi* (kohoutek lučnì)	P (16)	0,21 (14)	L = D (14)		< 14 (100 %) (14, 25)	zrání může být nezbytné (18) žádné speciální zpracování (5, 14, 15, 22-26)	POST (5, 15, 22-26)	F	
CHENOPODIACEAE *Chenopodium album* (merlík bílý)	A okraje polí, narušené oblasti (16, 19)	0,7–1,5 (14, 19, 34)	L = D (14)	0 (1, 19)	2 (50 %) (19)	zpracování se liší v závislosti na barvě semen (19) suché skladování v době klidu (19) klíčení tlumeno tmou (1, 18, 19) studená stratifikace (18) žádné speciální zpracování (14, 34)	PRE & POST (28, 31, 34)	A	32
CLUSIACEAE *Hypericum perforatum* (třezalka tečkovaná)	P pole, orná půda, otevřená stanoviště (16, 19)	0,1–0,23 (14, 19)	L= D (14)	0 (1, 19)	3 (19) 11 (90 %) (18)	klíčení tlumeno tmou (1, 18, 19) žádné speciální zpracování (5, 14, 15, 25, 27)	POST (5, 15, 25, 27)	A, E, F	
CONVOLVULACEAE *Ipomoea hederacea* (povijnice břečťanovitá, svlačec)	A okraje silnic, otevřená stanoviště, obilná pole (16)	28,2 (14)	L > D (6, 10)	10–20 (6, 10, 21)	4 (100 %) (10)	klíčení neovlivněno ozářeností (1) žádné speciální zpracování (6, 21)	PRE & POST (6, 12, 21, 28)	A	
CYPERACEAE *Cyperus rotundus* (šáchor hlíznatý)	P orná půda, pastviny, okraje silnic (16, 30)	0,2 (14)	L= D (14)	0 (1) 10–20 (6, 10)	12 (91 %) (10)	klíčení tlumeno tmou (1) žádné speciální zpracování (6, 10, 14)	PRE & POST (6, 28, 31)	B	7
FABACEAE *Lotus corniculatus* (štírovník růžkatý)	P zatravněné plochy, okraje silnic, otevřená stanoviště (16, 19)	1–1,67 (14, 19)	L = D (14)		1 (50 %) (19)	skarifikace (14, 19) klíčení neovlivněno ozářeností (18, 19) žádné speciální zpracování (23, 25)	POST (5, 23, 25)	A, D, E, F	

▼M6

ČELEĎ Botanický název druhu (český obecný název)	Délka života ([1]) a přirozené prostředí	Hmotnost semene (mg)	Fotoperioda pro klíčení nebo růst ([2])	Hloubka setí (mm) ([3])	Doba do vzklíčení (dny) ([4])	Speciální zpracování ([5])	Zkouška toxicity ([6])	Dodavatelé semen ([7])	Další odkazy ([8])
Senna obtusifolia (kasie tora)	A vlhké lesy (16)	23–28 (9)	L = D (14) L > D (9)	10–20 (6, 9)		nasáknutí semen ve vodě 24 hodin (9) skarifikace (14) životaschopnost semen se liší v závislosti na barvě (1) žádné speciální zpracování (6)	POST (6, 9)	A	
Sesbania exaltata (sesbánie bylinná)	A naplavená půda (16)	11–13 (9, 14)	L > D (9)	10–20 (9, 21)		nasáknutí semen ve vodě 24 hodin (9) klíčení neovlivněno ozářeností (1) žádné speciální zpracování (21)	PRE & POST (9, 21, 28, 31)	A	
Trifolium pratense (jetel luční)	P pole, okraje silnic, orná půda (16, 19)	1,4–1,7 (14, 19)	L = D (14)		1 (50 %) (19)	skarifikace (14, 18) může vyžadovat zrání (19) klíčení neovlivněno ozářeností (1, 19) žádné speciální zpracování (5)	POST (5)	A, E, F	
LAMIACEAE *Leonurus cardiaca* (buřina srdečník)	P otevřená stanoviště (16)	0,75–1,0 (4, 14)	L = D (14)	0 (4)		žádné speciální zpracování (4, 14)	POST (4)	F	
Mentha spicata (máta klasnatá)	P vlhké plochy (16)	2,21 (4)		0 (4)		žádné speciální zpracování (4)	POST (4)	F	
Nepeta cataria (šanta kočičí)	P narušené oblasti (16)	0,54 (4, 14)	L = D (14)	0 (4)		žádné speciální zpracování (2, 4, 14)	POST (2, 4)	F	

▼M6

ČELEĎ Botanický název druhu (český obecný název)	Délka života ([1]) a přirozené prostředí	Hmotnost semene (mg)	Fotoperioda pro klíčení nebo růst ([2])	Hloubka setí (mm) ([3])	Doba do vzklíčení (dny) ([4])	Speciální zpracování ([5])	Zkouška toxicity ([6])	Dodavatelé semen ([7])	Další odkazy ([8])
Prunella vulgaris (černohlávek obecný)	P orná pole, zatravněné plochy, narušené oblasti (16, 19)	0,58–1,2 (4, 14, 19)	L = D (14)	0 (4, 19)	5 (50 %) (19) 7 (91 %) (18)	klíčení tlumeno tmou (18, 19) intenzivnější klíčení s většími semeny (1), žádné speciální zpracování (4, 14, 22)	POST (4, 22)	A, F	
Stachys officinalis (bukvice lékařská, čistec)	P louky, okraje polí (19)	14–18 (14, 19)	L = D (14)		7 (50 %) (19)	žádné speciální zpracování (5, 14, 22)	POST (5, 22)	F	
MALVACEAE *Abutilón theophrasti* (mračňák Theophrastův)	A pole, otevřená stanoviště (16)	8,8 (14)	L = D (14)	10–20 (6, 10, 21)	4 (84 %) (10)	skarifikace (14) žádné speciální zpracování (5, 10, 21)	PRE & POST (6, 22, 28, 31)	A, F	
Sida spinosa (vlákeň ostnitá)	A pole, okraje silnic (16)	3,8 (14)	L = D (14)	10–20 (6, 21)		skarifikace (14) klíčení neovlivněno ozářeností (1) žádné speciální zpracování (6, 21)	PRE & POST (6, 21, 28, 31)	A, F	
PAPAVERACEAE *Papaver rhoeas* (mák vlčí)	A pole, orná půda, narušené oblasti (16, 19)	0,1–0,3 (4, 14, 19, 29)	L = D (14)	0 (4, 29)	4 (50 %) (19)	studená stratifikace a skarifikace (1, 19, 32) žádné speciální zpracování (4, 14, 29)	POST (4)	A, D, E, F, G	
POACEAE *Agrostis tenuis* (psineček obecný)	trávníky, pastviny (16)	0,07 (14)	L > D (IO)	20 (10)	10 (62 %) (10)	klíčení tlumeno tmou (1, 17-19) žádné speciální zpracování (10)	POST (10)	A, E	
Alopecurus myosuroides (psárka polní)	A pole, otevřená stanoviště (16)	0,9–1,6 (29, 34)	L = D (14)	2 (29)	< 24 (30 %) (34)	skarifikace (14) ošetřit 101 mg/l KNO_3 (14) teplá stratifikace (1) klíčení tlumeno tmou (1) žádné speciální zpracování (34)	PRE & POST (28, 34)	A	32

▼M6

ČELEĎ Botanický název druhu (český obecný název)	Délka života [1] a přirozené prostředí	Hmotnost semene (mg)	Fotoperioda pro klíčení nebo růst [2]	Hloubka setí (mm) [3]	Doba do vzklíčení (dny) [4]	Speciální zpracování [5]	Zkouška toxicity [6]	Dodavatelé semen [7]	Další odkazy [8]
Avena fatua (oves hluchý)	A obdělávané plochy, otevřená stanoviště (16)	7–37,5 (14, 30)	L = D (14) L > D (6)	10–20 (6, 10)	3 (70 %) (18)	skarifikace (7, 32) tma potlačuje klíčení (1) studená stratifikace (1, 18) žádné speciální zpracování (6, 10, 14)	PRE & POST (6, 10, 28, 31)	A	
Bromus tectorum (sveřep střešní)	A pole, okraje silnic, orná půda (16)	0,45–2,28 (14, 29)	L = D (14)	3 (29)		období zrání (1, 7, 32) klíčení tlumeno světlem (1), žádné speciální zpracování (14)	PRE & POST (28, 31)	A	
Cynosurus cristatus (poháňka hřebenitá)	P pole, okraje silnic, otevřená stanoviště (16, 19)	0,5–0,7 (14, 19, 29)	L = D (14)	0 (29)	3 (50 %) (19)	klíčení neovlivněno ozářeností (19) žádné speciální zpracování (14, 29)	POST (5)	A	
Digitaria sanguinalis (rosička krvavá)	A pole, trávník, otevřená stanoviště (16)	0,52–0,6 (14, 30)	L = D (14)	10–20 (21)	7 (75 %) 14 (94 %) (7)	skarifikace, studená stratifikace, a zrání (1, 7, 14, 32) ošetřit 101 mg/l KNO_3 (14) klíčení tlumeno tmou (1), žádné speciální zpracování (21)	PRE & POST (18, 25, 31)	A	
Echinochloa crusgalli (ježatka kuří noha)	A (16)	1,5 (14)	L = D (14) L > D (3)	10–20 (7, 21)		skarifikace (7, 32) klíčení neovlivněno ozářeností (1), žádné speciální zpracování (3, 14, 21)	PRE & POST (3, 21, 28, 31)	A	
Elymus canadensis (pýrovník kanadský)	P pobřeží, narušené oblasti (16)	4–5 (14, 30)	L = D (11)	1 (11)	14–28 (11)	žádné speciální zpracování (2, 11)	POST (2)	C, D, E	
Festuca pratensis (kostřava luční)	P pole, vlhké plochy (16, 19)	1,53–2,2 (16, 19)	L = D (14) L > D (10)	20 (10)	9 (74 %) (10) 2 (50 %) (19)	žádné speciální zpracování (10, 19)	POST (10)	A	7

▼M6

ČELEĎ Botanický název druhu (český obecný název)	Délka života [1] a přirozené prostředí	Hmotnost semene (mg)	Fotoperioda pro klíčení nebo růst [2]	Hloubka setí (mm) [3]	Doba do vzklíčení (dny) [4]	Speciální zpracování [5]	Zkouška toxicity [6]	Dodavatelé semen [7]	Další odkazy [8]
Hordeum pusillum (ječmen malý)	A pastviny, okraje silnic, otevřená stanoviště (16)	3,28 (14)				teplá stratifikace (1) klíčení neovlivněno ozářeností (1)	PRE (31)		7
Phieum pratense (bojínek luční)	P pastviny, orná pole, narušená místa (16, 19)	0,45 (14, 19)	L > D (10, 14)	0–10 (10, 19)	2 (74 %) (10) 8 (50 %) (19)	klíčení tlumeno tmou (19) klíčení neovlivněno ozářeností (17) žádné speciální zpracování (10, 14, 17, 19)	POST (10)	A, E	
POLYGONACEAE *Polygonum convolvulus* (opletka svlačcovitá)	A otevřená stanoviště, okraje silnic (16)	5–8 (4, 14, 29)	L = D (20)	0–2 (4, 29)		studená stratifikace 4–8 týdnů (1, 2, 4, 20, 29) klíčení neovlivněno ozářeností (1)	PRE & POST 1, 2, 20, 28, 31	A	32
Polygonum lapathifolium (rdesno blešník)	A vlhká půda (16)	1,8–2,5 (14)	L > D (6)		5 (94 %) (18)	klíčení neovlivněno ozářeností (1) klíčení tlumeno tmou (18) studená stratifikace (1) žádné speciální zpracování (5)	PRE & POST (6)	A, E	
Polygonum pennsylvanicum (rdesno pensylvánské)	A pole, otevřená stanoviště (16)	3,6–7 (14, 29)		2 (29)		studená stratifikace 4 týdny při 0–5 °C (1, 29) klíčení tlumeno tmou (1)	PRE (31)	A, E	
Polygonum periscaria (rdesno červivec)	A narušené oblasti, orná půda (16, 19)	2,1–2,3 (14, 19)	L > D (13)	0 (19)	< 14 (13) 2 (50 %) (19)	skarifikace, studená stratifikace, GA zpracování (14) studená stratifikace, zrání (17-19) klíčení tlumeno tmou (19) žádné speciální zpracování (13)	POST (13)	A	32

▼M6

ČELEĎ Botanický název druhu (český obecný název)	Délka života ([1]) a přirozené prostředí	Hmotnost semene (mg)	Fotoperioda pro klíčení nebo růst ([2])	Hloubka setí (mm) ([3])	Doba do vzklíčení (dny) ([4])	Speciální zpracování ([5])	Zkouška toxicity ([6])	Dodavatelé semen ([7])	Další odkazy ([8])
Rumex crispus (šťovík kadeřavý)	P orná pole, okraje silnic, otevřené plochy (16, 19)	1,3–1,5 (4, 14, 19)	L = D (14, 33)	0 (4, 19, 33)	3 (50 %) (19) 6 (100 %) (33)	klíčení tlumeno tmou (18, 19) zrání může být nezbytné (18) žádné speciální zpracování (4, 14, 33)	POST (4, 33)	A, E	32
PRIMULACEAE *Anagallis arvensis* (drchnička rolní)	A orná pole, otevřené plochy, narušená místa (16, 19)	0,4–0,5 (4, 14, 19)	L = D (14)		1 (50 %) (19)	studená stratifikace, GA zpracování (1,14, 18, 19, 32) klíčení vyžaduje světlo (1), žádné speciální zpracování (2, 4)	POST (2,4)	A, F	
RANUNCULACEAE *Ranunculus acris* (pryskyřičník prudký)	P orná pole, okraje silnic, otevřené plochy (16, 19)	1,5–2 (14, 19, 29)	L = D (14)	1 (29)	41–56 (19, 29)	žádné speciální zpracování (5, 14, 22, 24 -26)	POST (5, 22, 24-26)		32
ROSACEAE *Geum urbanum* (kuklík městský)	P živý plot, vlhké plochy (16, 19)	0,8–1,5 (14, 19)	L = D (14)	0 (19)	5 (50 %) (19) 16 (79 %) (18)	klíčení tlumeno tmou (18, 19) teplá stratifikace (1) žádné speciální zpracování (5, 14, 22, 25, 26)	POST (5, 22, 25, 26)	A	
RUBIACEAE *Galium aparine* (svízel přítula)	A orná pole, vlhké plochy, narušené oblasti (16, 19)	7–9 (14, 19)	L = D (14)		5 (50 %) (19) 6 (100 %) (18)	studená stratifikace (1, 18, 19) klíčení neovlivněno ozářeností (18, 19) klíčení tlumeno světlem (1) žádné speciální zpracování (6, 14)	PRE & POST (6, 28)	A	32

▼M6

ČELEĎ Botanický název druhu (český obecný název)	Délka života (1) a přirozené prostředí	Hmotnost semene (mg)	Fotoperioda pro klíčení nebo růst (2)	Hloubka setí (mm) (3)	Doba do vzklíčení (dny) (4)	Speciální zpracování (5)	Zkouška toxicity (6)	Dodavatelé semen (7)	Další odkazy (8)
Galium mollugo (svízel povázka)	P ohrady s živým plotem, otevřené plochy (8)	7 (29)	L = D (14)	2 (29)		žádné speciální zpracování (5, 14, 22, 24, 26, 29)	POST (5, 22, 24, 26)	A	
SCROPHULARIACEAE *Digitalis purpurea* (náprstník červený)	B, P živý plot, otevřené plochy (16, 19)	0,1–0,6 (4, 14, 19)	L = D (14)	0 (4, 19)	6 (50 %) (19) 8 (99 %) (18)	klíčení tlumeno tmou (1, 17-19) žádné speciální zpracování (4, 22-26)	POST (4, 22–26)	D, G, F	
Veronica persica (rozrazil perský)	A orná pole, otevřené plochy, narušené oblasti(16, 19)	0,5–0,6 (14, 19)	L = D (14)	0 (19)	3 (19) 5 (96 %) (18)	klíčení tlumeno tmou (18, 19) studená stratifikace (18) žádné speciální zpracování (14)	PRE & POST (28)	A	32

(1) A = jednoleté, B = dvouleté, P = trvalé.
(2) Odkazy 11,14 a 33 se týkají podílu světla (L) a tmy (D) požadovaného pro vyvolání klíčení semen. Odkazy 3, 6, 9, 10, 13, 20 se týkají podmínek růstu ve sklenících.
(3) 0 mm znamená, že semena byla vyseta na povrch půdy nebo že semena potřebují ke klíčení světlo.
(4) Uvedená čísla znamenají počet dní, za které podíl % semen vyklíčil podle uvedeného odkazu, např. 3 dny (50 %) klíčení (odkaz 19).
(5) Doba zrání anebo stratifikace není vždy k dispozici. S výjimkou požadavků na studené ošetření nejsou teplotní podmínky specifikovány, neboť při zkoušení ve skleníku je omezená možnost regulace teploty. Většina semen vyklíčí při běžně kolísajících teplotách ve sklenících.
(6) Označuje, že druh byl použit ve zkoušce toxicity u rostlin buď před vzklíčením (PRE) anebo po vzklíčení (POST) za použití herbicidů.
(7) Jsou uvedeny příklady komerčních dodavatelů semen.
(8) Jsou uvedeny dva alternativní odkazy, ze kterých se vycházelo.

▼**M6**

Uvádění dodavatelé semen

ID dodavatele	Informace o dodavateli
A	Herbiseed New Farm, Mire Lane, West End, Twyford RG10 0NJ ENGLAND +44 (0) 1189 349 464 www.herbiseed.com
B	Tropilab Inc. 8240 Ulmerton Road, Largo, FL 33771-3948 USA (727) 344 – 4050 www.tropilab.com
C	Pterophylla – Native Plants & Seeds #316 Regional Road 60, RR#1, Walsingham, ON N0E 1X0 CANADA (519) 586 – 3985
D	Applewood Seed Co. 5380 Vivian St., Arvada, CO 80002 USA (303) 431 – 7333 www.applewoodseed.com
E	Ernst Conservation Seeds 9006 Mercer Pike, Meadville, PA 16335 USA (800) 873 – 3321 www.ernstseed.com
F	Chiltern Seeds Bortree Stile, Ulverston, Cumbria LA12 7PB ENGLAND +44 1229 581137 www.chiltemseeds.co.uk
G	Thompson & Morgan P.O. Box 1051, Fort Erie, ON L2A 6C7 CANADA (800) 274 – 7333 www.thompson-morgan.com

LITERATURA

1) Baskin, C.C. & Baskin, J.M. 1998. Seeds. Academic Press, Toronto.

2) Blackburn, L.G. & Boutin, C. 2003. Subtle effects of herbicide use in the context of genetically modified crops: a case study with glyphosate (Round-Up®). Ecotoxicology, 12:271-285.

3) Boutin, C., Lee, H-B., Peart, T., Batchelor, P.S., & Maguire, R.J. 2000. Effects of the sulfonylurea herbicide metsulfuron methyl on growth and reproduction of five wetland and terrestrial plant species. Environmental Toxicology & Chemistry, 19(10):2532-2541.

4) Boutin, C., Elmegaard, N., & Kjaer, C. 2004. Toxicity testing of fifteen non-crop plant species with six herbicides in a greenhouse experiment: implications for risk assessment. Ecotoxicology, 13:349-369.

5) Breeze, V., Thomas, G., & Butler, R. 1992. Use of a model and toxicity data to predict the risks to some wild plant species from drift of four herbicides. Annals of Applied Biology, 121:669-677.

6) Brown, R.A., & Farmer, D. 1991. Track-sprayer and glasshouse techniques for terrestrial plant bioassays with pesticides. In: Plants for toxicity assessment: 2nd volume. ASTM STP 1115, J.W. Gorsuch, W.R. Lower, W.Wang, & M.A. Lewis, eds. American Society for Testing & Materials, Philadelphia. pp 197 – 208.

▼M6

7) Buhler, D.D. & Hoffman, M.L. 1999. Anderson's guide to practical methods of propagating weeds and other plants. Weed Science Society of America, Lawrence, K.

8) Clapham, A.R., Tutin, T.G., & Warburg, E.F. 1981. Excursion flora of the British Isles, 3rd ed. Cambridge University Press, Cambridge.

9) Clay, P.A. & Griffin, J.L. 2000. Weed seed production and seedling emergence response to late-season glyphosate applications. Weed Science, 48:481-486.

10) Cole, J.F.H. & Canning, L. 1993. Rationale for the choice of species in the regulatory testing of the effects of pesticides on terrestrial non-target plants. BCPC – Weeds. pp. 151 – 156.

11) Fiely, M. (Ernst Conservation Seeds). 2004. Personal communication. (www.ernstseed.com)

12) Fletcher, J.S., Johnson, F.L., & McFarlane, J.C. 1990. Influence of greenhouse versus field testing and taxonomic differences on plant sensitivity to chemical treatment. Environmental Toxicology & Chemistry, 9:769-776.

13) Fletcher, J.S., Pfleeger, T.G., Ratsch, H.C., & Hayes, R. 1996. Potential impact of low levels of chlorsulfuron and other herbicides on growth and yield of nontarget plants. Environmental Toxicology & Chemistry, 15(7):1189-1196.

14) Flynn, S., Turner, R.M., and Dickie, J.B. 2004. Seed Information Database (release 6.0, Oct 2004) Royal Botanic Gardens, Kew (www.rbgkew.org.uk/data/sid).

15) Franzaring, J., Kempenaar, C., & van der Eerden, L.J.M. 2001. Effects of vapours of chlorpropham and ethofumesate on wild plant species. Environmental Pollution, 114:21-28.

16) Gleason, H.A. & Cronquist, A. 1991. Manual of vascular plants of northeastern United States and adjacent Canada, 2nd ed. New York Botanical Garden, Bronx, NY.

17) Grime, J.P. 1981. The role of seed dormancy in vegetation dynamics. Annals of Applied Biology, 98:555-558.

18) Grime, J.P., Mason, G., Curtis, A.V., Rodman, J., Band, S.R., Mowforth, M.A.G., Neal, A.M., & Shaw, S. 1981. A comparative study of germination characteristics in a local flora. Journal of Ecology, 69:1017-1059.

19) Grime, J.P., Hodgson, J.G., & Hunt, R. 1988. Comparative plant ecology: a functional approach to common British species. Unwin Hyman Ltd., London.

20) Kjaer, C. 1994. Sublethal effects of chlorsulfuron on black bindweed (Polygonum convolvulus L.). Weed Research, 34:453-459.

21) Klingaman, T.E., King, C.A., & Oliver, L.R. 1992. Effect of application rate, weed species, and weed stage of growth on imazethapyr activity. Weed Science, 40:227-232.

22) Marrs, R.H., Williams, C.T., Frost, A.J., & Plant, R.A. 1989. Assessment of the effects of herbicide spray drift on a range of plant species of conservation interest. Environmental Pollution, 59:71-86.

23) Marrs, R.H., Frost, A.J., & Plant, R.A. 1991. Effects of herbicide spray drift on selected species of nature conservation interest: the effects of plant age and surrounding vegetation structure. Environmental Pollution, 69:223-235.

24) Marrs, R.H., Frost, A.J., & Plant, R.A. 1991. Effects of mecoprop drift on some plant species of conservation interest when grown in standardized mixtures in microcosms. Environmental Pollution, 73:25-42.

25) Marrs, R.H., Frost, A.J., Plant, R.A., & Lunnis, P. 1993. Determination of buffer zones to protect seedlings of non-target plants from the effects of glyphosate spray drift. Agriculture, Ecosystems, & Environment, 45:283-293.

▼**M6**

26) Marrs, R.H. & Frost, A.J. 1997. A microcosm approach to detection of the effects of herbicide spray drift in plant communities. Journal of Environmental Management, 50:369-388.

27) Marshall, E.J.P. & Bernie, J.E. 1985. Herbicide effects on field margin flora. BCPC – Weeds. pp. 1021-1028.

28) McKelvey, R.A., Wright, J.P., & Honegger, J.L. 2002. A comparison of crop and non-crop plants as sensitive species for regulatory testing. Pest Management Science, 58:1161-1174.

29) Morton, S. (Herbiseed). 2004. Personal communication. (http://www.herbiseed.com)

30) USDA, NRCS. 2004. The Plants Database, version 3.5. (http://plants.usda.gov). National Plant Data Centre, Baton Rouge, LA 70874-4490 USA.

31) USEPA. 1999. One-Liner Database. [U.S. E.P.A./Office of Pesticide Programs/Environmental Fate and Effects Division/Environmental Epidemiology Branch].

32) Webster, R.H. 1979. Technical Report No. 56: Growing weeds from seeds and other propagules for experimental purposes. Agricultural Research Council Weed Research Organization, Oxford.

33) White, A. L. & Boutin, C. (National Wildlife Research Centre, Environment Canada). 2004. Personal communication.

34) Zwerger, P. & Pestemer, W. 2000. Testing the phytotoxic effects of herbicides on higher terrestrial non-target plants using a plant life-cycle test. Z. PflKrankh. PflSchutz, Sonderh., 17:711-718.

▼**M6**

Dodatek 4

Příklady vhodných podmínek pro růst určitých druhů plodin

Následující podmínky byly shledány vhodnými pro 10 druhů plodin a mohou se použít jako vodítko rovněž při zkouškách v růstových komorách s určitými dalšími druhy:

Koncentrace oxidu uhličitého: 350 ± 50 ppm

Relativní vlhkost: 70 ± 5 % během období světa a 90 ± 5 % během období tmy

Teplota: 25 ± 3 °C během dne, 20 ± 3 °C během noci

Fotoperioda: 16 hodin světla/8 hodin tma, předpokládá se průměrná vlnová délka 400 až 700 nm

Světlo: svítivost 350 ± 50 μE/m^2/s měřená na vrchu klenby.

Plodinové druhy:

— rajče jedlé (*Solanum lycopersicum*),

— okurka setá (*Cucumis sativus*),

— salát hlávkový (*Lactuca sativa*),

— sója luštinatá (*Glycine max*),

— hlávkové zelí (*Brassica oleracea var. capitata*),

— mrkev obecná (*Daucus carota*),

— oves setý (*Avena sativa*),

— jílek vytrvalý (*Lolium perenne*),

— kukuřice setá (*Zea mays*),

— cibule kuchyňská (*Allium cepa*).

▼M6

C.32. ZKOUŠKA TOXICITY PRO REPRODUKCI ROUPICOVITÝCH

ÚVOD

1. Tato zkušební metoda je rovnocenná Pokynu OECD pro zkoušení 220 (2004). Je určena pro použití v hodnocení účinků chemických látek na reprodukční schopnost roupice bělavé, *Enchytraeus albidus* Henle 1873, v půdě. V zásadě vychází z metody vyvinuté v německém spolkovém úřadu pro ochranu životního prostředí (Umweltbundesamt) (1), která byla podrobena okružnímu testu (2). Byly rovněž brány v úvahu další metody zkoušení toxicity chemických látek na roupicovité a žížaly (3, 4, 5, 6, 7, 8).

VÝCHOZÍ ÚVAHY

2. V půdě žijící kroužkovci rodu roupice (*Enchytraeus)* jsou ekologicky vhodným druhem pro ekotoxikologické zkoušky. I když se roupicovití často vyskytují v půdách, kde žijí žížaly, rovněž je pravda, že se často nalézají v hojném množství i tam, kde žížaly nejsou. Roupicovití se dají použít v laboratorních zkouškách, stejně jako v poloterénních a terénních studiích. Z praktického hlediska je řada druhů *Enchytraeus* vhodných vzhledem k snadné manipulaci a snadnému chovu a jejich generační perioda je významně kratší než u žížal. Doba trvání zkoušky toxicity pro reprodukci s roupicovitými je proto pouze 4–6 týdnů, zatímco u žížal hnojních (*Eisenia fetida*) je to 8 týdnů.

3. Základní informace o ekologii a ekotoxikologii roupicovitých v suchozemském životním prostředí lze nalézt v literatuře (9, 10, 11, 12).

PODSTATA ZKOUŠKY

4. Dospělí roupicovití červi jsou vystaveni celé řadě koncentrací zkoušené chemické látky zamíchané do umělé půdy. Zkoušku je možné rozdělit na dva kroky: a) v případě, že nejsou k dispozici dostatečné informace, orientační zkoušku pro nalezení rozmezí dávek, ve které je hlavním cílovým ukazatelem mortalita hodnocená po dvou týdnech expozice, a b) hlavní zkoušku toxicity pro reprodukci, ve které se hodnotí celkový počet mláďat zplozených rodičovskými jedinci a přežití rodičů. Doba trvání hlavní zkoušky je šest týdnů. Po prvních třech týdnech se dospělí jedinci vyjmou a zaznamenají se morfologické změny. Po dalších třech týdnech se zjistí počet potomků vylíhnutých ze zámotků vytvořených dospělými jedinci. Reprodukční schopnost živočichů vystavených zkoušené chemické látce se srovná s aktivitou kontrolní skupiny pro stanovení i) koncentrace bez pozorovaných účinků (NOEC), nebo ii) EC_x (např. EC_{10}, EC_{50}) za použití regresního modelu pro odhad koncentrace, která způsobí x % snížení reprodukční schopnosti. Rozsah zkušebních koncentrací by měl zahrnovat EC_x (např. EC_{10}, EC_{50}) tak, aby se pak hodnota EC_x získala interpolací spíše než extrapolací.

INFORMACE O ZKOUŠENÉ CHEMICKÉ LÁTCE

5. U zkoušené chemické látky by optimálně měly být známy rozpustnost ve vodě, log K_{ow}, rozdělovací koeficient půda/voda (např. kapitola C.18 nebo C.19 této přílohy) a tlak par. Žádoucí jsou další informace o osudu zkoušené chemické látky v půdě, jako je rychlost fotolýzy a hydrolýzy.

6. Tato zkušební metoda se dá použít jak pro chemické látky ve vodě rozpustné, tak i nerozpustné. Režim aplikace zkoušené chemické látky se však bude příslušně lišit. Zkušební metoda se nedá aplikovat na těkavé chemické látky, tj. látky, jejichž Henryho konstanta nebo rozdělovací koeficient vzduch/voda je větší než jedna, nebo chemické látky, jejichž tlak par je vyšší než 0,0133 Pa při 25 °C.

▼M6

PLATNOST ZKOUŠKY

7. Má-li být zkouška platná, musí být u kontrolních skupin splněna tato kritéria reprodukční schopnosti:

— na konci orientační zkoušky a po prvních třech týdnech zkoušky toxicity pro reprodukci by mortalita dospělých jedinců neměla překročit 20 %,

— za předpokladu, že v uspořádání zkoušky bylo použito 10 dospělých jedinců na nádobu, mělo by být na konci zkoušky zplozeno průměrně alespoň 25 mláďat na nádobu,

— variační koeficient okolo střední hodnoty počtu mláďat by na konci zkoušky toxicity pro reprodukci neměl být vyšší než 50 %.

Tam, kde zkouška nesplní uvedená kritéria platnosti, musí být ukončena. Případné pokračování zkoušky musí být odůvodněno. Odůvodnění musí být uvedeno v závěrečné zprávě.

REFERENČNÍ CHEMICKÁ LÁTKA

8. Referenční chemická látka by se měla zkoušet buď v pravidelných intervalech, nebo by případně měla být zahrnuta v každé zkoušce, aby se ověřilo, že reakce zkušebních organismů se během času významně nezměnila. Vhodnou referenční látkou je karbendazim, u kterého bylo zjištěno, že ovlivňuje přežití a reprodukci roupicovitých (13, 14), nebo je rovněž možné použít jiné chemické látky, u nichž jsou dobře známé údaje týkající se toxicity. Přípravek karbendazim známý pod obchodním názvem Derosal™, který dodává firma AgrEvo (Frankfurt, Německo) a který obsahuje 360 g/l (32,18 %) účinné složky, byl použit v okružním testu (2). Hodnota EC_{50} pro reprodukci stanovená okružním testem byla v rozsahu 1,2 ± 0,8 mg účinné složky na kg sušiny (2). Jestliže se do zkušební série zahrne pozitivní kontrolní látka, použije se jedna koncentrace a počet opakování by měl být stejný jako u kontrolních vzorků. V případě karbendazimu se doporučuje zkoušení 1,2 mg ú.s./kg hmotnosti sušiny (zkoušeno jako kapalný přípravek).

POPIS ZKOUŠKY

Vybavení

9. Zkušební nádoby by měly být vyrobeny ze skla nebo jiného chemicky inertního materiálu. Vhodné jsou skleněné nádoby (např. o objemu 0,20–0,25 litru; průměr: ≈ 6 cm). Nádoby by měly mít průhledná víka (např. skleněná nebo polyethylenová), která jsou navržena tak, aby snižovala odpařování vody a současně umožňovala výměnu plynů mezi půdou a atmosférou. Víka by měla být průhledná, aby umožňovala průchod světla.

10. Je požadováno běžné laboratorní vybavení, zejména následující:

— sušárna,

— stereomikroskop,

— pH-metr a fotometr,

— vhodné přesné váhy,

— adekvátní zařízení pro regulaci teploty,

— adekvátní zařízení pro regulaci vlhkosti (není podstatné, jestliže exponované nádoby mají víka),

— inkubátor nebo malá místnost s klimatizací,

— pinzeta, háčky nebo smyčky,

— foto miska.

Příprava umělé půdy

11. V této zkoušce se používá umělá půda (5, 7) s následujícím složením (vztaženo na hmotnost sušiny, sušeno do konstantní hmotnosti při 105 °C):

▼M6

— 10 % sfagnové rašeliny sušené na vzduchu a jemně mleté (přijatelná je velikost částic 2 ± 1 mm); před použitím ve zkoušce se doporučuje prověřit, zda je půda připravená s čerstvou várkou rašeliny vhodná pro kultivaci roupic,

— 20 % kaolinitického jílu (obsah kaolinitu pokud možno vyšší než 30 %);

— přibližně 0,3 až 1,0 % uhličitanu vápenatého ($CaCO_3$, práškový, analyticky čistý) pro dosažení pH 6,0 ± 0,5; množství uhličitanu vápenatého, které je třeba doplnit, může v podstatě záviset na kvalitě/charakteru rašeliny;

— přibližně 70 % na vzduchu vysušeného křemenného písku (v závislosti na potřebném množství $CaCO_3$), převážně jemný písek s více než 50 % částic o velikosti 50 a 200 mikrometrů.

Před použitím půdy v hlavní zkoušce se doporučuje prokázat vhodnost umělé půdy pro kultivaci roupic a pro splnění kritérií platnosti zkoušky. Zejména se doporučuje provést takové prověření, kterým se zjistí, zda se účinnost zkoušky nesníží, jestliže se obsah organického uhlíku v umělé půdě sníží, např. snížením obsahu rašeliny na 4–5 % a odpovídajícím zvýšením obsahu písku. Takovým snížením obsahu organického uhlíku se může snížit schopnost adsorpce zkoušené chemické látky (organický uhlík) v půdě a dostupnost zkoušené chemické látky pro živočichy se může zvýšit. Bylo prokázáno, že *Enchytraeus albidus* může splnit kritéria platnosti pro reprodukci při testování v polních půdách s nižším obsahem organického uhlíku, např. 2,7 % (15); dle zkušeností, i když omezených, toho lze dosáhnout i v umělé půdě s 5 % obsahem rašeliny.

Poznámka: Při použití přírodní půdy v dodatečné zkoušce (např. vyššího stupně) je třeba rovněž prokázat vhodnost půdy a splnění kritérií platnosti zkoušky.

12. Suché složky půdy se důkladně promísí (např. ve velké laboratorní míchačce). To by se mělo provést alespoň týden před zahájením zkoušky. Promíchaná půda by se měla skladovat dva dny, aby se dosáhlo rovnováhy a stabilizovala se kyselost. Pro stanovení pH se použije směs půdy a roztoku 1 M chloridu draselného (KCl) nebo 0,01 M chloridu vápenatého ($CaCl_2$) v poměru 1:5 (viz (16) a dodatek 3). Jestliže je kyselost půdy vyšší než požadovaný rozsah (viz odstavec 11), nastaví se pH přidáním vhodného množství $CaCO_3$. Jestliže je půda příliš alkalická, nastaví se pH přidáním více směsi uvedené v odstavci 11, ale s vyloučením $CaCO_3$.

13. Maximální retenční vodní kapacita (RVK_{max}, též WHC_{max}) umělé půdy se stanoví podle postupů popsaných v dodatku 2. Jeden až dva dny před začátkem zkoušky se suchá umělá půda předběžně zvlhčí přidáním dostatečného množství deionizované vody, aby se dosáhlo přibližně poloviny konečného obsahu vody, což představuje 40 až 60 % maximální retenční vodní kapacity. Na začátku zkoušky se předem zvlhčená půda rozdělí na díly odpovídající počtu zkušebních koncentrací (a referenční chemické látce, je-li použita) a kontrolních vzorků použitých při zkoušce. Obsah vlhkosti se

▼M6

nastaví na 40–60 % maximální RVK přidáním roztoku zkoušené chemické látky anebo přidáním destilované nebo deionizované vody (viz odstavce 19–21). Obsah vlhkosti se stanoví na začátku a na konci zkoušky (vysušením na konstantní hmotnost při 105 °C) a měl by spadat do optimálního rozsahu pro přežití živočichů. Hrubý odhad obsahu vlhkosti v půdě lze učinit tak, že mírně stisknete půdu v ruce; jestliže je obsah vlhkosti správný, měly by se mezi prsty objevit malé kapky vody.

Výběr a příprava zkušebních živočichů

14. Doporučený zkušební druh je *Enchytraeus albidus* Henle 1837 (roupice bělavá) z čeledi *Enchytraeidae* (třída *Oligochaeta,* kmen *Annelida*). *E. albidus* je jedním z největších druhů roupicovitých, u nějž byli zaznamenáni jedinci o délce až 35 mm (17, 18). *E. albidus* je celosvětově rozšířen a nalézá se na mořských, sladkovodních i suchozemských stanovištích, zejména v tlející organické hmotě (chaluhy, kompost) a vzácně na lukách (9). Jeho široká ekologická tolerance a některé morfologické odchylky mohou ukazovat na existenci rozdílných poddruhů.

15. *E. albidus* je komerčně dostupný jako krmivo pro ryby. Mělo by se ověřit, zda není kultura kontaminována jinými, obvykle menšími druhy (1, 19). Pokud se znečištění objeví, omyjí se všechny roupice vodou v Petriho misce. Velcí dospělí jedinci *E. albidus* se pak vyberou (použitím stereomikroskopu) pro začátek nové kultury, ostatní jedinci se vyřadí. *E. albidus* lze snadno chovat v široké škále organických materiálů (viz dodatek 4). Životní cyklus *E. albidus* je krátký, jelikož dospělosti dosáhne mezi 33 dny (při 18 °C) a 74 dny (při 12 °C) (1). Pro zkoušku se použijí pouze kultury, které byly uchovávány bez problémů v laboratoři po dobu alespoň 5 týdnů (jednu generaci).

16. Ostatní druhy rodu *Enchytraeus* jsou rovněž vhodné, např. *E. buchholzi* Vejdovský 1879 nebo *E. crypticus* Westheide a Graefe 1992 (viz dodatek 5). Pokud se použijí jiné druhy rodu *Enchytraeus*, musí být jasně identifikovány a musí být logicky zdůvodněný výběr druhu.

17. Při zkouškách se používají dospělí jedinci. Měli by mít vajíčka (bílé skvrny) v oblasti clitella (střední kroužkové části) a mít přibližně stejnou velikost (přibližně 1 cm na délku). Synchronizace množících se kultur není nezbytná.

18. Jestliže roupicovití nejsou chováni ve stejném půdním typu a za podmínek (včetně výživy) použitých při konečné zkoušce, musí se aklimatizovat po dobu nejméně 24 hodin až tří dnů. Na počátku by se měl aklimatizovat větší počet dospělých jedinců, než bude zapotřebí pro provádění zkoušky, aby vznikla rezerva pro vyřazení poškozených nebo jinak nevyhovujících jedinců. Na konci doby aklimatizace se jako vhodní pro zkoušku vyberou pouze jedinci mající vajíčka a nevykazující žádné anomálie v chování (např. pokus o únik z půdy). Roupice se opatrně vyjmou použitím klenotnických pinzet, háčků nebo smyček a umístí do Petriho misek obsahujících malé množství čerstvé vody. Pro tento účel se přednostně použije rekonstituovaná sladká voda podle návrhu v kapitole C.20 této přílohy (Zkouška toxicity pro reprodukci druhu *Daphnia magna*), neboť voda deionizovaná, demineralizovaná nebo voda z vodovodu by pro roupice mohla být nebezpečná. Živočichové se prohlédnou pod stereomikroskopem a všichni, kteří neobsahují vajíčka, jsou vyřazeni. Je třeba dbát na to, aby byli vyjmuti a odstraněni všichni roztoči nebo chvostoskoci, kteří mohli infikovat kultury. Zdraví jedinci nepoužití pro zkoušku se vrátí do zásobní kultury.

▼M6

Příprava zkušebních koncentrací

Zkoušená chemická látka rozpustná ve vodě

19. Připraví se roztok zkoušené chemické látky v deionizované vodě v množství dostatečném pro všechna opakování jedné zkušební koncentrace. Doporučuje se použít vhodné množství vody, aby byl dosažen požadovaný obsah vlhkosti, tj. 40 až 60 % maximální RVK_{max} (viz odstavec 13). Před vložením do zkušební nádoby se každý roztok zkoušené chemické látky důkladně promíchá s jednou várkou předem navlhčené půdy.

Zkoušená chemická látka nerozpustná ve vodě

20. V případě chemických látek nerozpustných ve vodě, ale rozpustných v organických rozpouštědlech, se může zkoušená chemická látka rozpustit v co nejmenším objemu vhodného nosiče (např. acetonu). Měla by se použít pouze těkavá rozpouštědla. Nosič se nastříkne nebo promíchá s malým množstvím, například 2,5 g, jemného křemenného písku. Nosič se odstraní odpařením v digestoři po dobu alespoň jedné hodiny. Tato směs křemenného písku a zkoušené chemické látky se přidá do navlhčené půdy a důkladně se promíchá; předem se přidá příslušné množství deionizované vody, aby bylo dosaženo požadované vlhkosti. Konečná směs se přemístí do zkušebních nádob.

21. V případě chemických látek obtížně rozpustných ve vodě i v organických rozpouštědlech se ekvivalent 2,5 g jemně mletého křemenného písku na zkušební nádobu promíchá s příslušným množstvím zkoušené chemické látky, aby se získala požadovaná zkušební koncentrace. Tato směs křemenného písku a zkoušené chemické látky se přidá do navlhčené půdy a důkladně se promíchá; předem se přidá příslušné množství deionizované vody, aby se dosáhlo požadované vlhkosti. Konečná směs se rozdělí mezi zkušební nádoby. Tento postup se opakuje pro každou zkušební koncentraci a připraví se rovněž příslušné kontrolní vzorky.

22. Chemické látky by se obvykle neměly zkoušet při koncentracích vyšších než 1 000 mg/kg suché hmotnosti půdy. Zkoušení při vyšších koncentracích však může být požadováno podle cílů konkrétní zkoušky.

ÚČINNOST ZKOUŠEK

Zkoušené a kontrolní skupiny

23. Pro každou zkušební koncentraci se do zkušební nádoby umístí příslušné množství zkušební půdy odpovídající 20 g hmotnosti sušiny (viz odstavce 19–21). Připraví se rovněž kontrolní vzorky bez zkoušené chemické látky. Do každé nádoby se přidá krmivo podle postupů popsaných v odstavci 29. Do každé zkušební nádoby se náhodně rozmístí deset roupic. Roupice se opatrně přemístí do každé ze zkušebních nádob a položí na povrch půdy použitím například klenotnických pinzet, háčků nebo smyček. Počet opakování pro zkušební koncentrace a pro kontrolní vzorky závisí na použitém uspořádání zkoušky (viz odstavec 34). Zkušební nádoby se umístí náhodně do zkušebního inkubátoru a tyto polohy se jednou za týden náhodně obmění.

24. Jestliže se pro aplikaci zkoušené chemické látky použije nosič, je třeba kromě zkoušené série provést zkoušku s jednou kontrolní sérií obsahující křemenný písek postříknutý nebo promíchaný s rozpouštědlem. Koncentrace rozpouštědla nebo dispergátoru by měla být stejná jako v případě zkušebních nádob obsahujících zkoušenou chemickou látku. V případě chemické látky vyžadující administraci ve shodě s postupy popsanými v odstavci 21 by se měla provést zkouška s kontrolní sérií obsahující další křemenný písek (2,5 g na nádobu).

▼M6

Zkušební podmínky

25. Zkušební teplota je 20 ± 2 °C. Aby se roupicím zabránilo uniknout z půdy, provádí se zkouška v řízených cyklech světlo-tma (výhodně 16 hodin světla a 8 hodin tmy) s intenzitou osvětlení 400 až 800 luxů v místě zkušebních nádob.

26. Při prověřování vlhkosti půdy se nádoby váží na začátku zkoušky a pak jednou týdně. Ztráta hmotnosti se doplní přidáním příslušného množství deionizované vody. Je třeba poznamenat, že ztrátu vody je možné snížit tak, že se ve zkušebním inkubátoru udržuje vysoká vlhkost vzduchu (> 80 %).

27. Obsah vlhkosti a pH se měří na začátku a konci jak orientační zkoušky, tak hlavní zkoušky. Měření se provádí v kontrolních a exponovaných (všechny koncentrace) vzorcích půdy připravených a udržovaných stejným způsobem jako zkušební kultury, ale neobsahujících roupice. Krmivo se přidává pouze do těchto vzorků půdy na začátku zkoušky, aby byla usnadněna mikrobiální aktivita. Množství přidaného krmiva musí být stejné, jako se přidává do zkušebních kultur. Není nezbytné do těchto nádob během zkoušky přidávat další krmivo.

Krmení

28. Je možné použít krmivo schopné uchovat populaci roupicovitých. Jako vhodný krmný materiál se ukázaly ovesné vločky, přednostně před použitím ošetřené v autoklávu, aby se předešlo mikrobiální kontaminaci (zahřátí je rovněž vhodné).

29. Krmivo se nejdříve podává promícháním 50 mg mletých vloček s půdou v každé nádobě před vložením roupic. Pak se krmivo dodává týdně až do 21. dne. Krmení se neprovádí 28. den neboť dospělí jedinci byli v této fázi vyjmuti a mladé roupice potřebují po tomto dni relativně málo dalšího krmiva. Krmení během zkoušky spočívá v 25 mg mletých ovesných vloček na nádobu umístěných opatrně na povrch půdy, aby se předešlo poranění živočichů. Aby se potlačil růst plísní, měly by se ovesné vločky zapracovat do půdy pokrytím malým množstvím půdy. Jestliže krmivo zůstane nesnědené, dávka se sníží.

Uspořádání orientační zkoušky

30. Je-li to nezbytné, provede se orientační zkouška, například s pěti koncentracemi zkoušené chemické látky 0,1; 1,0; 10; 100 a 1 000 mg/kg (suchá hmotnost půdy). Dostatečné je jedno opakování pro každou koncentraci a kontrolu.

31. Doba trvání orientační zkoušky je dva týdny. Na konci zkoušky se vyhodnotí mortalita roupic. Živočich je zaznamenán jako mrtvý, jestliže nijak nereaguje na mechanické stimuly na ventrálním konci. Pro rozhodování o rozsahu koncentrací použitých v hlavní zkoušce mohou být užitečné i další informace o mortalitě. Proto je třeba zaznamenat změny v chování dospělých jedinců (např. neschopnost zavrtat se do půdy; ležení bez pohybu proti skleněné stěně zkušební nádoby) a v morfologii (např. přítomnost otevřených ran) spolu s přítomností jakýchkoli mláďat. Mláďata je možné identifikovat použitím barvící metody popsané v dodatku 6.

32. Hodnotu LC_{50} je možné přibližně stanovit výpočtem geometrického průměru z dat mortality. Při určování rozsahu koncentrací pro hlavní zkoušku se předpokládá, že účinky na reprodukci jsou nižší než LC_{50} s faktorem až 10. Jedná se však o empirický vztah a v každém specifickém případě může být tato hodnota jiná. Další pozorování prováděná během

▼M6

orientační zkoušky, jako je výskyt mláďat, mohou pomoci v přesnějším určení rozsahu koncentrací zkoušené chemické látky, který má být použit v hlavní zkoušce.

33. Pro přesné stanovení LC_{50} se doporučuje provádět zkoušku s použitím alespoň čtyř opakování pro každou koncentraci zkoušené chemické látky a adekvátní počet koncentrací, aby bylo dosaženo alespoň čtyř statisticky významně rozdílných středních hodnot odezvy při těchto koncentracích. Podobný počet koncentrací a opakování se použije pro kontrolní vzorky, když se používají.

Uspořádání hlavní zkoušky toxicity pro reprodukci

34. Jsou navržena tři uspořádání na základě doporučení plynoucích z okružního testu (2)

— Při stanovení NOEC by se mělo zkoušet alespoň pět koncentrací tvořících geometrickou posloupnost. Doporučují se čtyři opakování pro každou zkoušenou koncentraci plus osm kontrolních vzorků. Koncentrace by měly být rozloženy tak, že interval mezi nimi nepřekročí faktor 1,8.

— Při stanovení EC_x (např. EC_{10}, EC_{50}) je třeba zkoušet alespoň pět koncentrací a rozsah koncentrací by měl zahrnovat EC_x, aby bylo možno hodnotu EC_x interpolovat, a nebylo nutno extrapolovat. Doporučuje se použít alespoň čtyři opakování pro každou zkušební koncentraci a čtyři kontrolní opakování. Faktor pro interval se může měnit, tj. faktor může být nižší nebo roven 1,8 v očekávaném rozsahu účinku a větší než 1,8 při vyšších nebo nižších koncentracích.

— Kombinovaný přístup umožňuje stanovení jak NOEC, tak EC_x. Použije se osm koncentrací testované chemické látky v geometrické posloupnosti. Doporučena jsou čtyři opakování pro každou koncentraci plus osm kontrol. Koncentrace by měly být rozloženy tak, že faktor pro interval dávek nepřekračuje 1,8.

35. Na zkušební nádobu se použije deset dospělých jedinců (viz odstavec 23). Krmivo se přidá do zkušebních nádob na začátku zkoušky a pak jednou za týden (viz odstavec 29) až do 21. dne (včetně). 21. dne se vzorky půdy opatrně ručně prozkoumají; pozorují se a spočítají žijící dospělí jedinci; zaznamenají se změny v chování (např. neschopnost zavrtat se do půdy; ležení bez pohybu u skleněné stěny zkušební nádoby) a v morfologii (např. otevřené rány). Všichni dospělí jedinci se pak vyjmou ze zkušebních nádob a ze zkušební půdy. Zkušební půdy obsahující jakékoli zplozené zámotky se inkubují po další tři týdny za stejných zkušebních podmínek s tou výjimkou, že krmení se provádí pouze v 35. den (tj. 25 mg mletých ovesných vloček na nádobu).

36. Po šesti týdnech se spočítají nově vylíhlí jedinci. Doporučuje se metoda využívající barvení bengálskou červení (viz dodatek 6), ačkoli se jako vhodné ukázaly i jiné techniky používající mokrou (ale ne horkou) extrakci a flotaci (viz dodatek 6) (4, 10, 11, 20). Barvení bengálskou červení se doporučuje, protože mokrá extrakce z půdního substrátu může být brzděna turbiditou způsobenou suspendovanými jílovými částicemi.

Limitní zkouška

37. Jestliže při nejvyšší koncentraci v orientační zkoušce (tj. 1 000 mg/kg) nejsou pozorovány žádné účinky, může se zkouška toxicity pro reprodukci provést jako limitní zkouška použitím koncentrace 1 000 mg/kg, aby se prokázalo, že hodnota NOEC pro reprodukci je vyšší než tato hodnota.

▼M6

Souhrn a harmonogram zkoušky

38. Jednotlivé kroky zkoušky je možné shrnout následovně:

Čas	Orientační zkouška	Hlavní zkouška
Den – 7 nebo dříve	— Připraví se umělá půda (smísením suchých složek)	— Připraví se umělá půda (smísením suchých složek)
Den – 5	— Zjistí se pH umělé půdy — Změří se RVK_{max} půdy	— Zjistí se pH umělé půdy — Změří se RVK_{max} půdy
Den – 5 až – 3	— Vytřídí se roupice pro aklimatizaci	— Vytřídí se roupice pro aklimatizaci
Den – 3 až 0	— Roupice se aklimatizují alespoň 24 hodin	— Roupice se aklimatizují alespoň 24 hodin
Den – 1	— Umělá půda se zvlhčí a rozdělí do várek	— Umělá půda se zvlhčí a rozdělí do várek
Den 0	— Připraví se zásobní roztoky — Aplikuje se zkoušená chemická látka — Odváží se zkušební substrát do zkušebních nádob — Zamíchá se krmivo — Přidají se roupice — Změří se pH a obsah vlhkosti půdy	— Připraví se zásobní roztoky — Aplikuje se zkoušená chemická látka — Odváží se zkušební substrát do zkušebních nádob — Zamíchá se krmivo — Přidají se roupice — Změří se pH a obsah vlhkosti půdy
Den 7	— Zjistí se obsah vlhkosti půdy	— Zjistí se obsah vlhkosti půdy — Krmivo
Den 14	— Stanoví se mortalita dospělých jedinců — Odhadne se počet mláďat — Změří se pH a obsah vlhkosti půdy	— Zjistí se obsah vlhkosti půdy — Krmivo
Den 21		— Pozoruje se chování dospělých jedinců — Vyjmou se dospělí jedinci — Stanoví se mortalita dospělých jedinců — Zjistí se obsah vlhkosti půdy — Krmivo
Den 28		— Zjistí se obsah vlhkosti půdy — Žádné krmení
Den 35		— Zjistí se obsah vlhkosti půdy — Krmivo
Den 42		— Spočítají se mladí jedinci — Změří se pH a obsah vlhkosti půdy

▼M6

ÚDAJE A PŘEDKLÁDÁNÍ ZPRÁV

Zpracování výsledků

39. Ačkoli je přehled statistických metod uveden v dodatku 7, neexistují u této zkušební metody žádné závazné pokyny pro statistickou analýzu výsledků zkoušky.

40. Při orientační zkoušce je hlavním cílovým ukazatelem mortalita. Změny v chování (např. neschopnost zavrtat se do půdy; ležení bez pohybu proti skleněné stěně zkušební nádoby) a v morfologii (např. přítomnost otevřených ran) dospělých jedinců by však rovněž měly být zaznamenány spolu s přítomností jakýchkoli mláďat. Pro stanovení LC_{50} se obvykle užívá probitová analýza (21) nebo logistická regrese. Avšak v případech, kdy tato metoda analýzy není vhodná (např. jsou-li k dispozici méně než tři koncentrace s usmrcením pouze části zkušební skupiny), je možné použít alternativní metody. Mezi takové metody můžeme počítat klouzavé průměry (22), upravenou Spearman-Karberovu metodu (23) nebo jednoduchou interpolaci (např. geometrický průměr LC_0 a LC_{100} vypočítaný jako druhá odmocnina ze součinu LC_0 a LC_{100}).

41. V hlavní zkoušce je cílovým ukazatelem plodnost (tj. počet zplozených mláďat). Avšak stejně jako v orientační zkoušce musí být i v závěrečné zprávě uvedeny všechny ostatní škodlivé účinky. Statistická analýza vyžaduje výpočet aritmetického průměru a směrodatné odchylky účinku na reprodukci u exponovaných a kontrolních souborů.

42. Jestliže byla provedena analýza rozptylu, mohou se směrodatná odchylka s a stupně volnosti df nahradit odhadnutým sloučeným rozptylem získaným z ANOVA a jeho stupni volnosti – za předpokladu, že rozptyl nezávisí na koncentraci. V tomto případě se použijí hodnoty jednotlivých rozptylů kontrolních a exponovaných souborů. Tyto hodnoty se obvykle vypočítají pomocí běžně dostupného statistického softwaru použitím výsledků pro jednu nádobu jako opakování. Jestliže se sloučení dat pro negativní a kontrolní vzorky s rozpouštědly ukáže jako rozumnější než statistické testování vůči jedné z variant, pak je třeba provést test, který prokáže, zda je mezi nimi významný rozdíl (vhodné statistické metody jsou uvedeny v odstavci 45 a dodatku 7).

43. Další statistické testy a závěry závisejí na tom, zda mají opakované hodnoty normální rozdělení a zda je jejich rozptyl homogenní.

Odhad NOEC

44. Přednost by se měla dávat aplikaci výkonných testů. Měly by se použít informace, např. z předchozích zkušeností s okružním testem nebo jiné údaje z minulosti, o tom, zda data mají přibližně normální distribuci. Ještě důležitější je homogenita rozptylu (homoskedasticita). Zkušenost ukazuje, že rozptyl se často zvyšuje s rostoucí střední hodnotou. V těchto případech je možno homoskedasticity dosáhnout transformací dat. Avšak taková transformace by měla být založena spíše na zkušenostech s předchozími daty než na datech právě zkoumaných. S homogenními daty se provádějí vícenásobné t-testy, jako je Williamsův test ($\alpha = 0{,}05$, jednostranný) (24, 25) nebo v určitých případech Dunnettův test (26, 27). Nutno poznamenat, že v případě nerovnoměrného opakování musí být tabulkové t-hodnoty korigovány podle návrhu Dunnetta a Williamse. Někdy v důsledku velké odchylky nerostou/neklesají odezvy pravidelně. V případě takto velké odchylky od monotónnosti je vhodnější Dunnettův test. Jestliže existují odchylky od homoskedasticity, může být rozumné zkoumat možné účinky na hodnoty rozptylu blíže, aby se rozhodlo, zda může být aplikován t-test, aniž by se podstatně snížila vypovídací schopnost testu (28). Alternativně může být aplikován vícenásobný U-test, např. Bonferroniho-U-test

▼M6

podle Holma (29), nebo když tato data vykazují heteroskedasticitu, ale jinak jsou konzistentní se základním monotónním vztahem dávka-odezva, jiný neparametrický test [např. Jonckheere-Terpstrův (30, 31) nebo Shirleyův (32, 33)], a byla by mu obecně dávána přednost před t-testy s nerovností rozptylů (viz rovněž schéma v dodatku 7).

45. Jestliže byla provedena limitní zkouška a podmínky pro použití parametrických testů jsou splněny (normálnost, homogenita), je možné použít párový Studentův t-test, v opačném případě pak neparametrický Mann-Whitneyův U-test (29).

Odhad EC_x

46. Při výpočtu jakékoli hodnoty EC_x se pro regresní analýzu (lineární nebo nelineární) použijí střední hodnoty pro jednu expozici poté, co byla získána příslušná funkce dávka-odezva. Pro růst roupic jako kontinuální odezvu mohou být hodnoty EC_x odhadnuty použitím vhodné regresní analýzy (35). Mezi vhodné funkce pro binární data (mortalita/přežití a počet zplozených potomků) patří normální sigmoidní, logistická nebo Weibullova funkce obsahující dva až čtyři parametry, z nichž některé mohou rovněž modelovat hormetické odezvy. Jestliže funkce dávka-odezva vyhovují lineární regresní analýze, tomu odpovídající r^2 (koeficient determinace) a/nebo směrnice by měly být stanoveny prostřednictvím regresní analýzy před odhadem EC_x, a to dosazením hodnoty odpovídající x % střední hodnoty kontroly do rovnice zjištěné regresní analýzou. Meze 95 % intervalu spolehlivosti se vypočítají podle Fiellera (citován ve Finney (21)) nebo jinými vhodnými moderními metodami.

47. Alternativně se odpověď modeluje jako procentní část modelového parametru, který je interpretován jako střední hodnota odpovědi kontroly. V těchto případech je často možné výsledky snadno proložit normální (logistickou, Weibullovou) sigmoidní křivkou za použití probitového regresního postupu (21). V těchto případech musejí být váhové funkce nastaveny pro metrické odezvy, jak uvádí Christensen (36). Avšak jestliže byla pozorována hormeze, měla by se probitová analýza nahradit čtyřparametrickou logistickou nebo Weibullovou funkcí za použití nelineární regrese (36). Jestliže není možné data proložit vhodnou funkcí dávka-odezva, je možné použít alternativní metody pro odhad hodnoty EC_x a jejího intervalu spolehlivosti, jako je metoda klouzavých průměrů podle Thompsona (22) a očištěná Spearman-Karberova metoda (23).

ZÁVĚREČNÁ ZPRÁVA

48. Závěrečná zpráva musí obsahovat následující informace:

Zkoušená chemická látka:

— fyzikální povaha a tam, kde je to podstatné, fyzikálně-chemické vlastnosti (např. rozpustnost ve vodě, tlak par),

— chemická identifikace zkoušené chemické látky podle nomenklatury IUPAC, číslo CAS, šarže, dávka, strukturní vzorec a čistota,

— datum konce použitelnosti vzorku.

Zkušební druh:

— použití zkušební živočichové: druh, vědecký název, zdroj organismů a podmínky chovu.

Zkušební podmínky:

— složky umělé půdy a její příprava,

▼M6

— metoda aplikace zkoušené chemické látky,

— popis zkušebních podmínek, včetně teploty, obsahu vlhkosti, pH atd.,

— úplný popis experimentálního uspořádání a postupů.

Výsledky zkoušky:

— mortalita dospělých roupic po dvou týdnech a počet mláďat na konci orientační zkoušky,

— mortalita dospělých roupic po třech týdnech expozice a úplný záznam mláďat na konci hlavní zkoušky,

— jakékoli pozorované fyzikální nebo patologické symptomy a změny chování zkušebních organismů,

— hodnoty LC_{50}, NOEC anebo EC_x (např. EC_{50}, EC_{10}) pro reprodukci, jestliže některé z nich jsou použitelné pro intervaly spolehlivosti, a graf proložené modelové křivky použité při jeho výpočtu, všechny informace a pozorování užitečné pro interpretaci výsledků.

Odchylky od postupů popsaných v této zkušební metodě a jakékoli neběžné jevy, které se vyskytly během zkoušky.

LITERATURA

1) Römbke, J. (1989). Entwicklung eines Reproduktionstests an Bodenorganismen – Enchytraeen. Abschlußbericht des Battelle-Instituts e.V. Frankfurt für das Umweltbundesamt (Berlin), FE-Vorhaben 106 03 051/01.

2) Römbke, J. and Moser, T. (1999). Organisation and Performance of an International Ringtest for the Validation of the Enchytraeid Reproduction Test. UBA-Texte 4/99, 150 + 223 pp.

3) Westheide, W. and Bethge-Beilfuss, D. (1991). The sublethal enchytraeid test system: guidelines and some results, In: Modern Ecology: Basic and Applied Aspects. Ed. by Esser, G. and Overdieck, D. pp 497-508. Elsevier, Amsterdam.

4) Dirven-Van Breemen, E., Baerselmann, R. and Notenboom, J. (1994). Onderzoek naar de Geschiktheid van de Potwormsoorten Enchytraeus albidus en Enchytraeus crypticus (Oligochaeta, Annelida) in Bodemecotoxicologisch Onderzoek. RIVM Rapport Nr. 719102025. 46 pp.

5) Kapitola C.8 této přílohy, Zkouška akutní toxicity pro žížaly.

6) ISO (International Organization for Standardization) (1993). Soil Quality – Effects of pollutants on earthworms (Eisenia fetida). Part 1: Determination of acute toxicity using Artificial Soil substrate, No. 11268-1. ISO, Geneve.

7) ISO (International Organization for Standardization) (1996). Soil Quality – Effects of pollutants on earthworms (Eisenia fetida). Part 2: Determination of effects on reproduction, No. 11268-2. ISO, Geneve.

8) Rundgren, S. and A.K. Augustsson (1998). Test on the enchytraeid Cognettia sphagnetorum (Vejdovsky 1877). In: Løkke, H. and C.A.M. Van Gestel, Handbook of soil invertebrate toxicity tests. John Wiley and Sons, Chichester, 73-94.

9) Kasprzak, K. (1982). Review of enchytraeid community structure and function in agricultural ecosystems. Pedobiologia 23, 217-232.

10) Römbke, J. (1995). Enchytraeen (Oligochaeta) als Bioindikator, UWSF – Z. Umweltchem. Ökotox. 7, 246-249.

11) Dunger, W. and Fiedler, H.J. (1997). Methoden der Bodenbiologie. G. Fischer Verlag, Stuttgart, New York.

▼M6

12) Didden, W.A.M. (1993). Ecology of terrestrial Enchytraeidae. Pedobiologia 37, 2-29.

13) Becker, H. (1991). Bodenorganismen – Prüfungskategorien der Forschung. UWSF – Z. Umweltchem. Ökotox. 3, 19-24.

14) Römbke, J. and Federschmidt, A. (1995). Effects of the fungicide Carbendazim on Enchytraeidae in laboratory and field tests, Newsletter on Enchytraeidae 4, 79-96.

15) Römbke, J., Riepert, F. & Achazi R. (2000): Enchytraeen als Testorganismen. In: Toxikologische Beurteilung von Böden. Heiden, S., Erb, R., Dott, W. & Eisentraeger, A. (eds.). Spektrum Verl., Heidelberg. 59-81.

16) ISO (International Organization for Standardization) (1994). Soil Quality – Determination of pH, No. 10390. ISO, Geneve.

17) Bell, A.W. (1958). The anatomy of Enchytraeus albidus, with a key to the species of the genus Enchytraeus. Ann. Mus. Novitat. 1902, 1-13.

18) Nielsen, C.O. and Christensen, B. (1959). The Enchytraeidae, critical revision and taxonomy of European species. Natura Jutlandica 8-9, 1-160.

19) Bouguenec, V. and Giani, N. (1987). Deux nouvelles especes d'Enchytraeus (Oligochaeta, Enchytraeidae) et rediscription d'E. bigeminus. Remarques sur le genre Enchytraeus. Ann. Limnol. 23, 9-22.

20) Korinkova, J. and Sigmund, J. (1968). The colouring of bottom-fauna samples before sorting, Věstník Československé společnosti zoologické 32, 300-305.

21) Finney, D.J. (1971). Probit Analysis (3rd ed.), pp. 19-76. Cambridge Univ. Press.

22) Finney, D.J. (1978). Statistical Method in Biological Assay. – Charles Griffin & Company Ltd, London.

23) Hamilton, M.A., R.C. Russo and R.V. Thurston. (1977). Trimmed Spearman-Karber Method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. Environ. Sci. Technol. 11(7), 714-719; Correction Environ. Sci. Technol. 12(1998), 417.

24) Williams, D.A., (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics 27, 103-117.

25) Williams, D.A., (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics 28, 519-531.

26) Dunnett, C.W., (1955). A multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control. Amer. Statist. Ass. J. 50, 1096-1121.

27) Dunnett, C.W., (1964) New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics 20, 482-491.

28) Hoeven, N. van der, (1998). Power analysis for the NOEC: What is the probability of detecting small toxic effects on three different species using the appropriate standardized test protocols? Ecotoxicology 7: 355-361.

29) Holm, S., (1979): A simple sequentially rejective multiple test procedure. Scand. J. Statist. 6, 65-70.

30) Jonckheere, A. R. (1954); A Distribution-free k-Sample Test Against Ordered Alternatives, Biometrika 41, 133-145.

31) Terpstra, T. J. (1952); The Asymptotic Normality and Consistency of Kendall's Test Against Trend, When Ties are Present in One Ranking, Indagationes Math. 14, 327-333.

32) Shirley, E. A. (1979); The comparison of treatment to control group means in toxicology studies, Applied Statistics 28, 144-151.

▼**M6**

33) Williams, D.A. (1986); A Note on Shirley's Nonparametric Test for Comparing Several Dose Levels with a Zero-Dose Control, Biometrics 42, 183-186.

34) Sokal, R.R. and F.J. Rohlf. (1981). Biometry. The Principle and practice of statistics in biological research. 2nd edition. W.H. Freeman and Company. New York.

35) Christensen, E.R., (1984). Dose-response functions in aquatic toxicity testing and the Weibull model. Water Research 18, 213-221.

36) Van Ewijk, P.H. and J.A. Hoekstra. (1993). Calculation of the EC50 and its confidence interval when sub-toxic stimulus is present. Ecotox, Environ. Safety. 25, 25-32.

▼M6

Dodatek 1

Definice

Pro účel této zkušební metody jsou platné následující definice:

Chemická látka je látka nebo směs.

EC_x (účinná koncentrace s x % účinkem) je koncentrace, která vyvolá x % účinek u zkušebních organismů během dané expoziční doby ve srovnání s kontrolou. Při této zkoušce jsou koncentrace vyvolávající účinek vyjádřeny jako hmotnost zkoušené chemické látky na hmotnost sušiny zkušební půdy.

LC_0 (koncentrace bez letálního účinku) je koncentrace zkoušené chemické látky, která neusmrtí žádné exponované zkušební organismy během daného časového období. Při této zkoušce je LC_0 vyjádřena jako hmotnost zkoušené chemické látky na hmotnost sušiny zkušební půdy.

LC_{50} (medián letální koncentrace) je koncentrace zkoušené chemické látky, která zahubí 50 % exponovaných zkušebních organismů během daného časového období. Při této zkoušce je LC_{50} vyjádřena jako hmotnost zkoušené chemické látky na hmotnost sušiny zkušební půdy.

LC_{100} (letální koncentrace) je koncentrace zkoušené chemické látky, která zahubí 100 % exponovaných zkušebních organismů během daného časového období. Při této zkoušce je LC_{100} vyjádřena jako hmotnost zkoušené chemické látky na hmotnost sušiny zkušební půdy.

Nejnižší koncentrace s pozorovaným účinkem (LOEC) je nejnižší koncentrace zkoušené chemické látky, která má statisticky významný účinek ($p < 0,05$). Při této zkoušce je LOEC vyjádřena jako hmotnost zkoušené chemické látky na hmotnost sušiny zkušební půdy. Všechny zkušební koncentrace vyšší než LOEC by obvykle měly vykazovat účinek, který je statisticky rozdílný od kontroly. Jakékoli odchylky z výše uvedeného v identifikaci LOEC musejí být zdůvodněny v závěrečné zprávě.

Koncentrace bez pozorovaných účinků (NOEC) je nejvyšší koncentrace zkoušené chemické látky bezprostředně nižší než LOEC, při které není pozorován žádný účinek. Při této zkoušce nemá koncentrace odpovídající NOEC žádný statisticky významný účinek ($p < 0,05$) během dané expoziční doby ve srovnání s kontrolou.

Rychlost reprodukce je střední hodnota počtu mladých roupic zplozených daným počtem dospělých jedinců během zkušebního období.

Zkoušená chemická látka je jakákoli látka nebo směs zkoušená použitím této zkušební metody.

▼M6

Dodatek 2

Stanovení maximální retenční vodní kapacity

Stanovení retenční vodní kapacity umělé půdy

Následující metoda byla shledána vhodnou. Je popsána v příloze C normy ISO DIS 11268-2.

Odeberte stanovené množství (např. 5 g) zkušebního půdního substrátu použitím vhodného nástroje na odběr vzorku (spirálový trubkový vzorkovač atd.). Dno trubky se pokryje kusem filtračního papíru, trubka se naplní vodou a umístí na stojan ve vodní lázni. Trubka se postupně ponořuje, až je vodní hladina nad povrchem půdy. Pak se ponechá ve vodě přibližně tři hodiny. Jelikož ne všechna voda absorbovaná půdními kapilárami může být zadržena, měl by se vzorek půdy ponechat okapat dvě hodiny tak, že se trubka umístí na lůžko z velmi mokrého, jemně mletého křemenného písku v uzavřené nádobě (aby se zabránilo vysušení). Vzorek se pak zváží a vysuší do konstantní hmotnosti při 105 °C. Retenční vodní kapacita (RVK) se pak vypočítá podle následujícího vzorce:

$$\text{RVK (v \% sušiny)} = \frac{S - T - D}{D} \times 100$$

Kde:

S = vodou nasycený substrát + hmotnost trubky + hmotnost filtračního papíru

T = tára (hmotnost trubky + hmotnost filtračního papíru)

D = hmotnost sušiny substrátu

LITERATURA:

ISO (International Organization for Standardization) (1996). Soil Quality -Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 2: Determination of effects on reproduction, No. 11268-2. ISO, Geneve.

▼**M6**

Dodatek 3

Stanovení pH půdy

Následující metoda stanovení pH vzorku půdy vychází z popisu v ISO 10390 (Kvalita půdy – Stanovení pH).

Definované množství půdy se vysuší při laboratorní teplotě po dobu alespoň 12 hodin. Suspenze půdy (obsahující alespoň 5 gramů půdy) se pak doplní do 5násobného objemu buď 1 M analyticky čistého chloridu draselného (KCl) nebo 0,01 M roztoku analyticky čistého chloridu vápenatého ($CaCl_2$). Suspenze se pak důkladně třepe 5 minut. Po protřepání se suspenze ponechá usadit alespoň 2 hodiny, ale ne déle než 24 hodin. pH kapalné fáze se pak změří použitím pH-metru kalibrovaného před každým měřením pomocí vhodné řady roztoků pufrů (např. pH 4,0 a 7,0).

LITERATURA:

ISO (International Organization for Standardization) (1994). Soil Quality – Determination of pH, No. 10390. ISO, Geneve.

▼M6

Dodatek 4

Kultivační podmínky *Enchytraeus sp.*

Roupicovití druhu *Enchytraeus albidus* (stejně jako jiné druhy *Enchytraeus*) mohou být kultivováni ve velkých plastových krabicích (např. 30 × 60 × 10 cm) naplněných 1:1 směsí umělé půdy a přírodní nekontaminované zahradní půdy. Nesmí se používat kompostovaný materiál, protože by mohl obsahovat toxické chemické látky, jakými jsou těžké kovy. Fauna se musí z půdy před použitím odstranit (např. hlubokozmrazením). Je rovněž možné použít substrát obsahující pouze umělou půdu, ale rychlost reprodukce může být nižší než v případě promíchaného půdního substrátu. Substrát použitý pro kultivaci by měl mít pH 6,0 ± 0,5.

Kultura se udržuje v temnu při teplotě 15 až 20 °C ± 2 °C. Teplota nesmí překročit 23 °C. Půda se musí udržovat vlhká, ale ne mokrá. Správný obsah vlhkosti půdy je indikován malými kapkami vody, které se objeví mezi prsty po lehkém stisknutí půdy. Je třeba zabránit vytvoření anaerobních podmínek tak, že zajistíme, aby kryty kontejnerů s kulturou umožňovaly dostatečnou výměnu plynů s atmosférou. Každý týden se půda musí opatrně rozrušit, aby bylo umožněno provzdušňování.

Roupice je možné krmit ovesnými vločkami. Ovesné vločky se uchovávají v utěsněných nádobách a před použitím by se měly zpracovat v autoklávu nebo zahřát, aby se zabránilo infikování moučnými roztoči (např. *Glyzyphagus sp., Astigmata, Acarina*) nebo dravými roztoči (např. *Hypoaspis (Cosmolaelaps) miles, Gamasida, Acarina*). Po zahřátí se krmivo umele, aby se dalo snadno rozsypat na půdní povrch. Občas se mohou ovesné vločky obohatit přidáním vitamínů, mléka a oleje z tresčích jater. Dalšími vhodnými krmnými zdroji jsou pekařské droždí a rybí krmivo „Tetramin“.

Krmení se provádí přibližně dvakrát týdně. Vhodné množství ovesných vloček se rozsype na půdní povrch nebo opatrně zamíchá do substrátu při rozrušování půdy pro možné provzdušnění. Absolutní množství dodaného krmiva závisí na počtu roupic přítomných v substrátu. Jako vodítko, že množství krmiva je třeba zvýšit, může sloužit pozorování, že je všechno spotřebováno během jednoho dne od přidání. Naopak jestliže krmivo ještě zůstává na povrchu v čase druhého krmení (po týdnu), je třeba dávku snížit. Krmivo kontaminované plísněmi se musí odstranit a nahradit. Po třech měsících se červi přemístí do čerstvě připraveného substrátu.

Kultivační podmínky se považují za vyhovující, jestliže roupice: a) se nepokoušejí opustit půdní substrát, b) se pohybují rychle půdou, c) vykazují lesklý vnější povrch bez ulpívajících půdních částic, d) jejich zbarvení je více méně bělavé, e) vykazují rozmanitost rozmezí stáří v kulturách a f) kontinuálně se reprodukují.

▼M6

Dodatek 5

Účinnost zkoušky s jinými druhy *Enchytraeus*

Výběr druhu

Je možné použít jiné druhy než *E. albidus*, ale postup zkoušky a kritéria platnosti se musí příslušně upravit. Mnoho druhů *Enchytraeus* je snadno k dispozici a mohou se vyhovujícím způsobem udržovat v laboratoři, proto je nejdůležitějším kritériem pro výběr druhu jiného než *E. albidus* ekologická významnost a srovnatelná citlivost. Pro výměnu druhů mohou rovněž existovat formální důvody. Například v zemích, kde se *E. albidus* nevyskytuje a není možné ho dovézt (např. z důvodů karanténních omezení), bude nezbytné použít jiný druh *Enchytraeus*.

Příklady vhodných alternativních druhů

— *Enchytraeus crypticus* (Westheide a Graefe 1992): V nedávné době byl tento druh často používán v ekotoxikologických studiích z důvodu jednoduchosti jeho chovu a zkoušení. Tento druh je však malý a to činí nakládání s ním obtížnější ve srovnání s *E. albidus* (zejména ve stádiích před použitím barvící metody). U *E. crypticus* nebyl s určitostí zjištěn jeho výskyt na polích, který byl popsán pouze u kultur žížal. Jeho ekologické požadavky proto nejsou známé.

— *Enchytraeus buchholzi* (Vejdovský 1879): Tento název pravděpodobně zahrnuje skupinu úzce příbuzných druhů, které se dají morfologicky obtížně rozlišit. Jeho použití pro zkoušení se nedoporučuje, dokud nebude možné jedince použité ve zkoušce identifikovat s jednotlivými druhy. *E. buchholzi* se obvykle nalézá na loukách a narušených místech, jako jsou okraje silnic.

— *Enchytraeus luxuriosus*: Tento druh byl původně znám jako *E. „minutus“,* ale nedávno byl popsán (1). Poprvé ho nalezl U. Graefe (Hamburk) na louce blízko St. Peter-Ording (Šlesvicko-Holštýnsko, Německo). *E. luxuriosus* má přibližně poloviční velikost ve srovnání s *E. albidus*, je ale větší než ostatní druhy zde probírané; to ho činí dobrou alternativou za *E. albidus*.

— *Enchytraeus bulbosus* (Nielsen a Christensen 1963): Až doposud byl výskyt tohoto druhu popsán v německých a španělských minerálních půdách, kde je běžný, ale obvykle ne příliš hojný. Ve srovnání s ostatními malými druhy tohoto rodu se dá relativně snadno identifikovat. Nic není známo o jeho chování při laboratorních zkouškách nebo o jeho citlivosti na chemické látky. Bylo však zjištěno, že se dá snadno kultivovat (E. Belotti, soukromé sdělení).

Podmínky chovu

Všechny výše zmíněné druhy *Enchytraeus* mohou být kultivovány ve stejných substrátech jako *E. albidus*. Jejich menší velikost znamená, že kultivační nádoby mohou být menší a že při použití stejného krmiva se dávkování musí nastavit. Životní cyklus těchto druhů je kratší než u *E. albidus* a krmení se provádí častěji.

Zkušební podmínky

Zkušební podmínky jsou obecně stejné jako u *E. albidus*, s výjimkou, že:

— velikost zkušební nádoby může (ale nemusí) být menší,

— trvání zkoušky toxicity pro reprodukci může (ale nemusí) být kratší, tj. čtyři namísto šesti týdnů, avšak doba trvání orientační zkoušky by se neměla měnit,

— s ohledem na malou velikost mláďat roupic se pro počítání důrazně doporučuje použití barvící metody,

— kritérium platnosti vztahující se k „počtu mláďat na zkušební nádobu v kontrolním vzorku“ se mění na „50“.

▼**M6**

LITERATURA

1) Schmelz, R.M. and Collado, R. (1999). Enchytraeus luxuriosus sp.nov., a new terrestrial oligochaete species (Enchytraeidae, Clitellata, Annelida). Carolinea 57, 93-100.

▼M6

Dodatek 6

Podrobný popis extrakčních technik

Barvení bengálskou červení

Tato metoda, původně vyvinutá v limnické ekologii (1), byla poprvé navržena W. de Coenem (Univerzita v Ghentu, Belgie) pro počítání mláďat při zkoušce toxicity pro reprodukci roupicovitých. Nezávisle vyvinul upravenou verzi (bengálská červeň smíchaná s formaldehydem místo s ethanolem) RIVM Bilthoven (2, 3).

Na konci hlavní zkoušky (tj. po šesti týdnech) se půda ze zkušebních nádob přemístí do mělké misky. Vhodné pro tento účel jsou třeba nádoby z bella-plastu nebo fotografické misky s žebrovaným dnem; fotomiska je vhodná, protože „žebra“ omezují pohyb roupic v rámci pole pozorování. Mláďata jsou fixována etanolem (přibližně 5 ml na opakování). Do nádoby se pak přilije voda, až vznikne vrstva vysoká 1 až 2 cm. Přidá se několik kapek (200 až 300 µl) bengálské červeně (1 % roztok v ethanolu) (alternativně lze použít 0,5 % eozinové barvivo) a obě složky se opatrně promíchají. Po 12 hodinách by se roupice měly zbarvit do červena a bude možné je snadno spočítat, protože budou ležet na povrchu substrátu. Alternativně lze směs substrát/alkohol přecedit přes síto (velikost ok 0,250 mm) a pak roupice spočítat. Při použití tohoto postupu se kaolinit, rašelina a část písku vymyje a roupice zbarvené do červena bude možné snadno rozlišit a spočítat. Použití osvětlených čoček (velikost čočky alespoň 100 × 75 mm s příčným zvětšením 2 až 3) rovněž usnadní počítání.

Barvící technika zkracuje dobu počítání na několik minut na nádobu a zhruba řečeno je možné, aby jeden pracovník vyhodnotil všechny nádoby z jedné zkoušky maximálně za dva dny.

Mokrá extrakce

Mokrou extrakci je třeba začít ihned po ukončení zkoušky. Půda z každé zkušební nádoby se umístí do plastových sít s velikostí ok přibližně 1 mm. Síta se pak zavěsí do plastových mís, aniž by se dotýkala dna. Mísy se opatrně naplní vodou, až jsou vzorky v sítech úplně ponořeny. Aby byla zajištěna rychlost regenerace přítomných roupic vyšší než 90 %, musí se extrakce provádět 3 dny při 20 ± 2 °C. Na konci extrakce se síta vyjmou a voda (až na malé množství) se pomalu dekantuje; přitom se dbá na to, aby se nerozvířil sediment na dně misek. Plastové mísy se pak mírně protřepou, aby se sediment suspendoval v překrývající vodě. Voda se přelije do Petriho misek a po usazení půdních částic mohou být roupicovití identifikováni, vyjmuti a spočítáni použitím stereomikroskopu a měkké ocelové pinzety.

Flotace

Metoda založená na flotaci byla popsána v článku R. Kupermana (4). Obsahy zkušebních nádob se fixují ethanolem a půda se zaplaví přípravkem Ludox (AM-30 koloidní oxid křemičitý, 30 hm. % suspenze ve vodě) do výšky 10 až 15 mm nad povrch půdy. Po důkladném promíchání půdy s flotačním činidlem po dobu 2–3 minut se mohou mláďata roupic plovoucí na povrchu snadno spočítat.

LITERATURA

1) Kořínková, J. and Sigmund, J. (1968). The colouring of bottom-fauna samples before sorting, Věstník Československé společnosti zoologické 32, 300-305.

▼**M6**

2) Dirven-Van Breemen, E., Baerselmann, R. and Notenboom, J. (1994). Onderzoek naar de Geschiktheid van de Potwormsoorten Enchytraeus albidus en Enchytraeus crypticus (Oligochaeta, Annelida) in Bodemecotoxicologisch Onderzoek. RIVM Rapport Nr. 719102025. 46 pp.

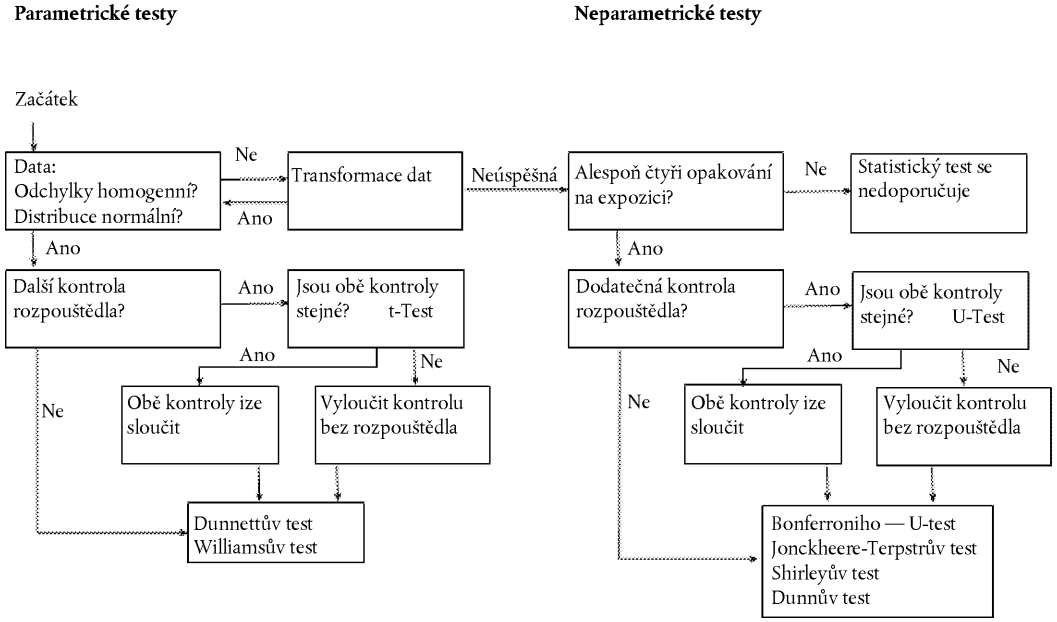
3) Posthuma, L., Baerselmann, R., Van Veen, R.P.M. and Dirven-Van Breemen, E.M. (1997). Single and joint toxic effects of copper and zinc on reproduction of Enchytraeus crypticus in relation to sorption of metals in soils. Ecotox. Envir. Safety 38, 108-121.

4) Phillips, C.T., Checkai, R.T. and Kuperman, R.G. (1998). An alternative to the O'Connor Method for Extracting Enchytraeids from Soil. SETAC 19th Annual Meeting, Charlotte, USA. Abstract Book No. PMP069, p. 157.

▼**M6**

Dodatek 7

Schéma statistického vyhodnocení dat (stanovení NOEC)



▼M6

C.33. ZKOUŠKA TOXICITY PRO REPRODUKCI ŽÍŽAL (*EISENIA FETIDA/EISENIA ANDREI)*

ÚVOD

1. Tato zkušební metoda je rovnocenná Pokynu OECD pro zkoušení 222 (2004). Je určena k použití pro zhodnocení účinků chemických látek v půdě na reprodukční schopnost (a další subletální cílové ukazatele) žížal druhu *Eisenia fetida* (Savigny 1826) nebo *Eisenia andrei* (Andre 1963) (1, 2). Zkouška byla testována v okružním testu (3). Existuje zkušební metoda pro zkoušku akutní toxicity pro žížaly (4). Byla publikována řada dalších mezinárodních a vnitrostátních pokynů pro zkoušky akutní a chronické toxicity (5, 6, 7, 8).

2. Druhy *Eisenia fetida / Eisenia andrei* se považují za jedny z představitelů půdní fauny, a zejména žížal. Podkladové informace o ekologii žížal a jejich použití v ekotoxikologických zkouškách jsou k dispozici (7, 9, 10, 11, 12).

PODSTATA ZKOUŠKY

3. Dospělé žížaly jsou vystaveny rozmezí koncentrací zkoušené chemické látky, která se buď přimíchá do půdy, nebo se v případě pesticidů aplikuje do půdy nebo na půdu postupy odpovídajícími způsobu použití chemické látky. Metoda aplikace je specifická pro daný účel zkoušky. Rozmezí zkušebních koncentrací se vybere tak, aby zahrnovalo koncentrace, které pravděpodobně povedou k subletálním a letálním účinkům během období osmi týdnů. Po 4 týdnech expozice se stanoví mortalita a účinky na růst dospělých žížal. Dospělí jedinci se poté z půdy odstraní a po dalších 4 týdnech se zhodnotí účinky na reprodukci spočítáním potomků přítomných v půdě. Reprodukční schopnost žížal vystavených zkoušené chemické látce se porovná s hodnotou kontrol(y), aby se stanovila i) koncentrace bez pozorovaných účinků (NOEC) a/nebo ii) EC_x (např. EC_{10}, EC_{50}) pomocí regresního modelu k odhadnutí koncentrace, která by způsobila x % snížení reprodukční schopnosti. Hodnota EC_x by se měla nacházet mezi zkušebními koncentracemi (např. EC_{10}, EC_{50}), aby hodnota EC_x vycházela spíše z interpolace než extrapolace (definice viz dodatek 1).

INFORMACE O ZKOUŠENÉ CHEMICKÉ LÁTCE

4. Aby bylo možno navrhnout vhodné zkušební postupy, měly by být k dispozici tyto informace o zkoušené chemické látce:

   — rozpustnost ve vodě,

   — log K_{ow},

   — tlak par a

   — pokud možno informace o osudu a chování v životním prostředí (např. rychlost fotolýzy a rychlost hydrolýzy, pokud jsou relevantní pro způsoby aplikace).

5. Tato zkušební metoda je použitelná pro všechny chemické látky bez ohledu na jejich rozpustnost ve vodě. Není použitelná pro těkavé chemické látky, které jsou zde definovány jako chemické látky, u nichž je hodnota Henryho konstanty nebo rozdělovacího koeficientu vzduch/voda větší než jedna, ani pro chemické látky s tlakem par přesahujícím 0,0133 Pa při teplotě 25 °C.

6. V této zkušební metodě není zohledněn možný rozklad zkoušené chemické látky v průběhu zkoušky. Tudíž nelze předpokládat, že se expoziční koncentrace udrží na počátečních hodnotách po celou dobu zkoušky. V takovém případě se doporučuje provést na začátku a na konci zkoušky chemickou analýzu zkoušené chemické látky.

▼M6

REFERENČNÍ CHEMICKÁ LÁTKA

7. Musí se stanovit NOEC a/nebo EC_x referenční chemické látky, aby se zajistilo, že jsou laboratorní zkušební podmínky přiměřené, a aby se ověřilo, zda se odezva zkušebních organismů v průběhu času statisticky nemění. Doporučuje se zkoušet referenční chemickou látku nejméně jednou ročně nebo – pokud se zkoušení provádí s menší četností – souběžně se stanovováním toxicity zkoušené látky. Vhodnými referenčními chemickými látkami, u nichž se prokázalo, že ovlivňují reprodukci, jsou karbendazim nebo benomyl (3). Významné účinky by měly být pozorovány v rozmezí a) 1 až 5 mg účinné složky (ú.s.) / kg sušiny nebo b) 250–500 g/ha nebo 25–50 mg/m^2. Pokud je do série zkoušení zařazena pozitivní kontrola, měla by se použít jedna koncentrace a počet opakování by měl být stejný jako u kontrol.

PLATNOST ZKOUŠKY

8. Aby se výsledek zkoušky mohl považovat za platný, měly by kontroly splňovat tato kritéria:

— v každém opakování (obsahujícím 10 dospělých jedinců) se do konce zkoušky vyprodukuje ≥ 30 nedospělých jedinců,

— variační koeficient reprodukce je ≤ 30 %,

— mortalita dospělých jedinců během prvních 4 týdnů zkoušky je ≤10 %.

Pokud zkouška nesplní výše uvedená kritéria platnosti, měla by se ukončit. Případné pokračování ve zkoušce je nutné zdůvodnit. Odůvodnění by mělo být obsaženo v závěrečné zprávě.

POPIS ZKOUŠKY

Vybavení

9. Měly by se použít zkušební nádoby ze skla nebo jiného chemicky inertního materiálu o objemu jeden až dva litry. Nádoby by měly mít průřez přibližně 200 cm^2, aby se dosáhlo přibližně 5–6 cm hloubky vlhkého substrátu, když se přidá 500 až 600 g suché hmotnosti substrátu. Víko nádoby by mělo umožňovat výměnu plynů mezi substrátem a atmosférou a přístup světla (např. prostřednictvím děrovaného průhledného víka) a zároveň zabraňovat žížalám v úniku. Pokud množství použitého zkušebního substrátu výrazně převyšuje 500 až 600 g na zkušební nádobu, měl by se úměrně zvýšit počet žížal.

10. Pro zkoušku je třeba normální laboratorní vybavení, konkrétně:

— sušárna,

— stereomikroskop,

— pH-metr a fotometr,

— vhodné přesné váhy,

— náležité vybavení pro regulaci teploty,

— náležité vybavení pro regulaci vlhkosti (není nezbytné, pokud mají expoziční nádoby víka),

— inkubátor nebo malá místnost s klimatizací,

— pinzety, háčky nebo očka,

— vodní lázeň.

▼M6

Příprava umělé půdy

11. V této zkoušce se používá umělá půda (5, 7) následujícího složení (vychází se ze suchých hmotností získaných vysušením na konstantní hmotnost při teplotě 105 °C):

— 10 % sfagnové rašeliny (o hodnotě pH co nejvíce se blížící 5,5 až 6,0, bez viditelných zbytků rostlin, jemně mleté, vysušené na měřený obsah vlhkosti),

— 20 % kaolinitického jílu (obsah kaolinitu pokud možno více než 30 %),

— 0,3 až 1,0 % uhličitanu vápenatého ($CaCO_3$, práškový, p.a.) k získání počátečního pH o hodnotě 6,0 ± 0,5,

— 70 % na vzduchu vysušeného křemenného písku (v závislosti na potřebném množství $CaCO_3$), převážně jemný písek s více než 50 % částic o velikosti 50 až 200 mikrometrů.

Poznámka 1: Požadované množství $CaCO_3$ bude záviset na složkách půdního substrátu včetně potravy a mělo by se stanovit pomocí měření dílčích půdních vzorků bezprostředně před zkouškou. Hodnota pH se měří ve smíšeném vzorku v 1 M roztoku chloridu draselného (KCl) nebo 0,01 M roztoku chloridu vápenatého ($CaCl_2$) (13).

Poznámka 2: Obsah organického uhlíku v umělé půdě lze snížit, např. snížením obsahu rašeliny na 4–5 % a odpovídajícím zvýšením obsahu písku. Takovým snížením obsahu organického uhlíku lze snížit možnost adsorpce zkoušené chemické látky na půdu (organický uhlík) a zvýšit dostupnost zkoušené chemické látky pro žížaly. Bylo prokázáno, že *Eisenia fetida* může splnit kritéria platnosti pro reprodukci při testování v polních půdách s nižším obsahem organického uhlíku (např. 2,7 %) (14), a dle zkušeností toho lze dosáhnout i v umělé půdě s 5 % obsahem rašeliny. Proto není pro splnění kritérií platnosti zkoušky nutné před použitím takové půdy v hlavní zkoušce prokázat vhodnost umělé půdy, pokud nebyl obsah rašeliny snížen více, než je uvedeno výše.

Poznámka 3: Při použití přírodní půdy v dalších zkouškách (např. vyššího stupně) by se měla rovněž prokázat vhodnost půdy a splnění kritérií platnosti zkoušky.

12. Suché složky půdy se důkladně promísí (např. ve velké laboratorní míchačce) v dobře větraném prostoru. Před zahájením zkoušky se suchá umělá půda zvlhčí přidáním dostatečného množství deionizované vody, aby se dosáhlo přibližně poloviny konečného obsahu vody, který činí 40 % až 60 % maximální retenční vodní kapacity (což odpovídá 50 ± 10 % vlhkosti sušiny). Vznikne substrát, který neobsahuje žádnou stojatou vodu a při stisknutí v dlani neuvolňuje vodu. Maximální retenční vodní kapacita (RVK_{max}) umělé půdy se stanoví v souladu s postupy popsanými v dodatku 2, normě ISO 11274 (15) nebo rovnocenné normě EU.

13. Pokud se zkoušená chemická látka aplikuje na povrch půdy nebo se vmíchává do půdy bez vody, je možné přidat konečné množství vody do umělé půdy při její přípravě. Pokud se zkoušená chemická látka do půdy vmíchává s určitým množstvím vody, je možné doplňující objem vody přidat společně se zkoušenou chemickou látkou (viz odstavec 19).

14. Obsah vlhkosti v půdě se stanoví na začátku a na konci zkoušky podle normy ISO 11465 (16) nebo rovnocenné normy EU a hodnota pH se stanoví podle dodatku 3 nebo normy ISO 10390 (13) nebo rovnocenné normy EU. Tato stanovení by se měla provádět ve vzorku kontrolní půdy a ve vzorcích půdy s každou zkušební koncentrací. Pokud se zkouší kyselé nebo zásadité

▼M6

chemické látky, nemělo by se pH půdy upravovat. Obsah vlhkosti by se měl v průběhu zkoušky kontrolovat pravidelným vážením nádob (viz odstavec 26 a 30).

Výběr a příprava zkušebních živočichů

15. V této zkoušce se používá druh *Eisenia fetida* nebo *Eisenia andrei* (1, 2). K zahájení zkoušky jsou potřeba dospělé žížaly ve stáří dvou měsíců až jednoho roku a s opaskem. Žížaly by se měly vybrat ze synchronizované kultury s relativně homogenní věkovou strukturou (dodatek 4). Stáří jedinců ve zkušební skupině by se nemělo lišit o více než 4 týdny.

16. Vybrané žížaly by se měly aklimatizovat alespoň po dobu jednoho dne v umělém půdním substrátu takového typu, který se použije ve zkoušce. Během tohoto období by se měly žížaly krmit stejnou potravou, jaká se bude používat ve zkoušce (viz odstavce 31 až 33).

17. Na začátku zkoušky by se měly individuálně zvážit skupiny po 10 žížalách a náhodně přiřadit do zkušebních nádob. Před vážením se žížaly omyjí (deionizovanou vodou) a přebytečná voda se odstraní krátkým umístěním žížal na filtrační papír. Mokrá hmotnost jednotlivých žížal by se měla pohybovat mezi 250 a 600 mg.

Příprava zkušebních koncentrací

18. Lze použít dvě metody aplikace zkoušené chemické látky: zamíchání zkoušené chemické látky do půdy (viz odstavce 19–21) nebo její aplikace na povrch půdy (viz odstavce 22–24). Výběr vhodné metody závisí na účelu zkoušky. Obecně se doporučuje zamíchání zkoušené chemické látky do půdy. Nicméně mohou být vyžadovány i aplikační postupy, které odpovídají běžné zemědělské praxi (např. nastříkání kapalné formy nebo použití speciálních forem pesticidů, jako jsou granule nebo moření semen). Rozpouštědla použitá k ošetření půdy zkoušenou chemickou látkou by se měla zvolit na základě jejich nízké toxicity pro žížaly a v uspořádání zkoušky musí být zahrnuta příslušná kontrola s rozpouštědlem (viz odstavec 27).

Zamíchání zkoušené chemické látky do půdy

Zkoušená chemická látka rozpustná ve vodě

19. Bezprostředně před zahájením zkoušky se připraví roztok zkoušené chemické látky v deionizované vodě v množství dostačujícím pro všechna opakování jedné koncentrace. K usnadnění přípravy zkušebního roztoku může být nutné pomocné rozpouštědlo. Je praktické připravit si množství roztoku potřebné k dosažení konečného obsahu vlhkosti (40 až 60 % maximální retenční vodní kapacity). Před umístěním do zkušební nádoby se roztok důkladně smíchá s půdním substrátem.

Zkoušená chemická látka nerozpustná ve vodě

20. Zkoušená chemická látka se rozpustí v malém objemu vhodného organického rozpouštědla (např. acetonu) a poté se nastříká na malé množství jemného křemenného písku nebo se s ním smísí. Poté se rozpouštědlo odstraní odpařováním v digestoři po dobu alespoň několika minut. Ošetřený písek se poté důkladně smísí s předem zvlhčenou umělou půdou. Následně se přidá a vmíchá deionizovaná voda (požadované množství), aby se dosáhlo konečného obsahu vlhkosti 40 až 60 % maximální retenční vodní kapacity. Poté je půda připravena k umístění do zkušebních nádob. Je třeba postupovat opatrně, neboť některá rozpouštědla mohou být pro žížaly toxická.

▼M6

Zkoušená chemická látka nerozpustná ve vodě a organických rozpouštědlech

21. Připraví se směs obsahující 10 g jemně mletého průmyslového křemenného písku s množstvím zkoušené chemické látky nutným k dosažení zkušební koncentrace v půdě. Směs se poté důkladně promísí s předem zvlhčenou umělou půdou. Následně se přidá a vmíchá deionizovaná voda v množství potřebném k dosažení konečného obsahu vlhkosti 40 až 60 % maximální retenční vodní kapacity. Pak je půda připravena k umístění do zkušebních nádob.

Aplikace zkoušené chemické látky na povrch půdy

22. Půda se ošetří po přidání žížal. Zkušební nádoby se nejprve naplní zvlhčeným půdním substrátem a zvážené žížaly se umístí na povrch. Zdravé žížaly se obvykle okamžitě zavrtají do substrátu, tudíž všichni jedinci, kteří na povrchu zůstanou po 15 minutách, se považují za poškozené a musí se nahradit. Pokud se nějaké žížaly nahrazují, měli by se noví jedinci a nahrazovaní jedinci zvážit, aby byla na začátku zkoušky známa celková živá hmotnost exponované skupiny žížal a celková hmotnost nádoby se žížalami.

23. Aplikuje se zkoušená chemická látka. Neměla by se do půdy přidávat dříve než za půl hodiny po umístění žížal (nebo pokud se žížaly nacházejí na povrchu půdy), aby se zabránilo přímé expozici zkoušené chemické látce kontaktem s kůží. Pokud je zkoušená chemická látka pesticid, může být vhodné aplikovat ji na povrch půdy postřikem. Zkoušená chemická látka by se měla aplikovat na povrch půdy co nejrovnoměrněji pomocí vhodného laboratorního nástroje na postřik, aby se simulovala aplikace postřikem na poli. Před aplikací by se mělo víko zkušební nádoby sejmout a nahradit vložkou, která chrání stěny nádoby před postřikem. Vložka může být vyrobena ze zkušební nádoby s odstraněným dnem. Aplikace by se měla provádět při teplotě pohybující se v rozmezí 20 ± 2 °C a u vodných roztoků, emulzí nebo disperzí při aplikační dávce vody v rozmezí 600 a 800 µl/m^2. Dávka by se měla ověřit pomocí vhodné kalibrační techniky. Speciální formy, jako jsou granule nebo moření semen, by se měly aplikovat způsobem odpovídajícím zemědělskému použití.

24. Zkušební nádoby by se měly nechat nezakryté po dobu jedné hodiny, aby se mohl případný těkavý roztok spojený s aplikací zkoušené chemické látky vypařit. Je třeba zajistit, aby během této doby neunikla ze zkušebních nádob žádná žížala.

POSTUP

Zkušební skupiny a kontroly

25. Doporučuje se nasazovat 10 žížal na 500–600 g suché hmotnosti umělé půdy (tj. 50–60 g půdy na jednu žížalu). Pokud se použije větší množství půdy, například při zkouškách pesticidů se speciálním způsobem aplikace, jako je moření semen, měl by se udržet příděl 50–60 g půdy na jednu žížalu zvýšením počtu žížal. Pro každou kontrolní nádobu a nádobu s ošetřenou půdou se připraví deset žížal. Žížaly se omyjí vodou, otřou a poté se na krátkou dobu umístí na savý papír, aby se odvedla přebytečná voda.

26. Aby při rozdělování žížal do zkušebních nádob nedošlo k systematickým chybám, měla by se stanovit homogenita populace individuálním zvážením 20 žížal vybraných náhodně z populace, ze které budou pocházet žížaly použité k provedení zkoušky. Po zajištění homogenity se vyberou skupiny žížal, zváží se a randomizací (tj. náhodně) se přidělí do jednotlivých zkušebních nádob. Po přidání pokusných žížal by se měla zvážit hmotnost každé

▼M6

zkušební nádoby, aby se získala hodnota počáteční hmotnosti, kterou lze použít jako výchozí bod pro sledování obsahu vlhkosti v půdě v průběhu zkoušky, jak je popsáno v odstavci 30. Zkušební nádoby se poté zakryjí způsobem popsaným v odstavci 9 a umístí se do zkušební komory.

27. Pro každou z metod aplikace zkoušené chemické látky popsaných v odstavci 18 až 24 se připraví odpovídající kontroly. Při přípravě kontrol se dodržují příslušné popsané postupy, pouze se nepřidá zkoušená chemická látka. V odpovídajících případech se tedy aplikují organická rozpouštědla, křemenný písek či jiné nosiče i na kontroly v koncentracích/množstvích odpovídajících těm, které byly použity k ošetření půdy. Pokud se ke zkoušené chemické látce přidává rozpouštědlo nebo jiný nosič, měla by se rovněž připravit a otestovat další kontrola bez nosiče či zkoušené chemické látky, aby se zajistilo, že nosič nemá na žádný vliv výsledek.

Zkušební podmínky

28. Zkušební teplota je 20 ± 2 °C. Zkouška se provádí při řízených cyklech osvětlení-tmy (pokud možno 16 hodin světlo a 8 hodin tma) s intenzitou osvětlení v místě se zkušebními nádobami o hodnotě 400 až 800 luxů.

29. Zkušební nádoby se během zkoušky neprovzdušňují, ale konstrukce vík zkušebních nádob by měla umožňovat výměnu plynů a zároveň omezovat vypařování vlhkosti (viz odstavec 9).

30. Obsah vody v půdním substrátu ve zkušebních nádobách se během zkoušky udržuje a sleduje opakovaným pravidelným vážením zkušebních nádob (bez vík). Vodní ztráty se doplní dle potřeby deionizovanou vodou. Obsah vody by se neměl lišit o více než 10 % od hodnoty na začátku zkoušky.

Krmení

31. Za přijatelnou se považuje jakákoli potrava o takové kvalitě, která je prokazatelně vhodná alespoň k udržení hmotnosti žížal během zkoušky. Zkušenosti ukázaly, že vhodnou potravou jsou ovesné vločky a kravský či koňský hnůj. Je třeba provádět kontroly zajišťující, že krávy či koně, od kterých se hnůj získává, nejsou léčeni či ošetřováni chemickými látkami, například látkami podporujícími růst, nematocidy či podobnými veterinárními přípravky, které by mohly žížaly během zkoušky nepříznivě ovlivnit. Doporučuje se používat osobně odebraný kravský hnůj, neboť zkušenosti ukázaly, že komerčně dostupný kravský hnůj používaný jako zahradní hnojivo může mít na žížaly nežádoucí účinky. Hnůj by se měl před použitím nechat vyschnout na vzduchu, jemně rozemlít a pasterizovat.

32. Každá čerstvá dávka potravy by se měla před použitím ve zkoušce podat netestované kultuře žížal, aby se ověřilo, že je vhodné kvality. Růst a tvorba zámotků by se neměla snížit v porovnání s žížalami chovanými v substrátu, který neobsahuje novou dávku potravy (podmínky popsané ve zkušební metodě C.8(4)).

33. Potrava se poprvé podá jeden den po přidání žížal a aplikaci zkoušené chemické látky do půdy. Přibližně 5 g potravy se rozptýlí na povrch půdy

▼M6

v každé nádobě a zvlhčí se deionizovanou vodou (asi 5 až 6 ml na jednu nádobu). Poté se potrava podává jednou týdně během 4týdenního zkušebního období. Pokud není veškerá potrava zkonzumována, měla by se její porce zmenšit, aby nedošlo k růstu hub nebo zplesnivění. 28. den zkoušky se z půdy odeberou dospělí jedinci. Poté se do každé zkušební nádoby přidá dalších 5 g potravy. Během zbývajících 4 týdnů zkoušky se již neprovádí žádné další krmení.

Výběr zkušebních koncentrací

34. Při výběru vhodných zkušebních koncentrací by měly pomoci předchozí znalosti toxicity zkoušené chemické látky, např. ze zkoušky akutní toxicity (4) a/nebo z orientačních studií. Pokud je to nutné, provede se orientační zkouška, např. s pěti zkušebními koncentracemi 0,1, 1,0, 10, 100 a 1 000 mg/kg (suché hmotnosti půdy). Jedno opakování pro každé ošetření zkoušenou látkou a kontrolu je dostačující. Orientační zkouška trvá dva týdny a na jejím konci se vyhodnotí mortalita.

Experimentální uspořádání

35. I když pro tuto zkoušku nelze předepsat jednoduchou souhrnnou statistiku, umožňuje tato metoda stanovení hodnoty NOEC a EC_x. Hodnota NOEC bude pravděpodobně vyžadována regulačními orgány v dohledné budoucnosti. V důsledku statistických a ekologických úvah může v blízké budoucnosti dojít k více rozšířenému používání hodnoty EC_x Proto jsou navržena tři uspořádání, a to na základě doporučení vycházejících z okružního testu zkušební metody reprodukce roupic (17).

36. Při volbě rozsahu koncentrací by měly být zohledněny tyto zásady:

— Ke stanovení hodnoty NOEC by se mělo testovat alespoň pět/dvanáct koncentrací v geometrických posloupnostech. Doporučuje se použít čtyři opakování pro každé ošetření zkoušenou látkou a osm kontrol. Při odstupňování koncentrací by se měl použít faktor, který nepřevyšuje 2,0.

— Ke stanovení hodnoty EC_x (např. EC_{10}, EC_{50}) se doporučuje použít dostačující počet koncentrací, aby vedl k alespoň čtyřem statisticky významným různým průměrným odezvám při těchto koncentracích. Doporučuje se použít alespoň dvě opakování pro každou zkušební koncentraci a šest kontrolních opakování. Koeficient odstupňování koncentrací se může měnit, tj. faktor může být $\leq 1{,}8$ v očekávaném rozsahu účinku a $> 1{,}8$ při vyšších nebo nižších koncentracích.

— Stanovit jak hodnotu NOEC, tak EC_x umožňuje kombinovaný přístup. Mělo by se použít osm zkušebních koncentrací v geometrické posloupnosti. Doporučuje se použít čtyři opakování pro každou zkušební koncentraci a osm kontrol. Při odstupňování koncentrací by se měl použít faktor nepřevyšující 1,8.

Délka zkoušky a měření

37. 28. den se provede pozorování živých dospělých žížal a spočítají se. Rovněž se zaznamená jakékoli neobvyklé chování (např. neschopnost zavrtat se do půdy; nehybně ležící jedinci) a morfologické změny (např. otevřené rány). Všechny dospělé žížaly se poté odeberou ze zkušebních nádob a zváží se. Vyhledávání dospělých jedinců může usnadnit přemístění půdy se žížalami na čistý tác před hodnocením. Žížaly odebrané z půdy by se měly před vážením omýt (deionizovanou vodou) a přebytečná voda odstranit krátkým umístěním žížal na filtrační papír. Všechny žížaly, které v tuto dobu nebudou nalezeny, se zaznamenají jako uhynulé, neboť se předpokládá, že takové žížaly uhynuly a rozložily se ještě před hodnocením.

▼M6

38. Pokud se půda přemisťovala z nádob, vrátí se zpět (bez dospělých žížal, ale se zámotky, které vytvořily). Poté se půda inkubuje po další čtyři týdny za stejných zkušebních podmínek s jedinou výjimkou, že krmení proběhne pouze jednou, na začátku této fáze zkoušky (viz odstavec 33).

39. Na konci druhého 4týdenního období se pomocí postupů popsaných v dodatku 5 určí počet nedospělých jedinců, kteří se vylíhli ze zámotků ve zkušební půdě, a počet zámotků. Během celého období zkoušky by se měly rovněž zaznamenávat všechny známky poranění či poškození žížal.

Limitní zkouška

40. Pokud při nejvyšší koncentraci v orientační zkoušce (tj. 1 000 mg/kg) nejsou pozorovány žádné účinky, provede se zkouška reprodukce jako limitní zkouška s použitím zkušební koncentrace 1 000 mg/kg. Limitní zkouška umožní prokázat, že hodnota NOEC pro reprodukci je větší než limitní koncentrace, a zároveň se minimalizuje počet žížal použitých ve zkoušce. Mělo by se použít osm opakování jak pro půdu ošetřenou zkoušenou chemickou látkou, tak pro kontrolu.

ÚDAJE A PŘEDKLÁDÁNÍ ZPRÁV

Zpracování výsledků

41. Přestože v dodatku 6 je uveden přehled statistických metod, nejsou u této zkušební metody uvedeny žádné závazné pokyny pro statistickou analýzu výsledků zkoušky.

42. Základním cílovým ukazatelem je mortalita. Měly by se však zaznamenat také změny chování (např. neschopnost zavrtat se do půdy; nehybně ležící jedinci nalepení na skleněnou stěnu nádoby) a morfologické změny (např. otevřené rány) dospělých žížal a rovněž přítomnost nedospělých jedinců. Ke stanovení hodnoty LC_{50} se obvykle používá probitová analýza (18) nebo logistická regrese. Nicméně v případech, kdy je tato metoda analýzy nevhodná (např. jsou k dispozici méně než tři koncentrace s usmrcením pouze části skupiny), lze použít alternativní metody. Mezi tyto metody by mohly patřit klouzavé průměry (19), upravená Spearman-Karberova metoda (20) nebo jednoduchá interpolace (např. geometrický průměr LC_0 a LC_{100} vypočítaný jako druhá odmocnina součinu LC_0 a LC_{100}).

43. Dalším cílovým ukazatelem je plodnost (např. počet vyprodukovaných nedospělých jedinců). V závěrečné zprávě by se však měly zaznamenat i všechny ostatní známky poškození, stejně jako u orientační zkoušky. V rámci statistické analýzy se spočítá aritmetický průměr $\bar{x}$ a směrodatná odchylka u každého ošetření zkoušenou látkou a každé kontroly.

44. Pokud byla provedena analýza rozptylu, je možné nahradit směrodatnou odchylku s a stupně volnosti df odhadem sdruženého rozptylu získaným z ANOVA a jeho stupni volnosti – za předpokladu, že rozptyl nezávisí na koncentraci. V takovém případě použijte jednotlivé rozptyly kontrol a ošetření. Tyto hodnoty se obvykle spočítají pomocí běžně dostupného statistického softwaru, přičemž výsledky pro jednotlivé nádoby se považují za opakování. Pokud se sdružení dat pro negativní kontrolu a kontrolu s rozpouštědlem jeví jako rozumnější než testování oproti jedné z nich, mělo by se otestovat, zda se významně neliší (k určení vhodného testu nahlédněte do odstavce 47 a dodatku 6).

45. Další statistické testy a závěry závisí na tom, zda mají hodnoty opakování normální rozdělení a jsou homogenní, co se týká jejich rozptylu.

▼M6

Odhad hodnoty NOEC

46. Mělo by se upřednostnit použití výkonných testů. Je třeba použít informace např. z předchozích zkušeností s okružním testováním či jiná historická data ke zjištění, zda mají data přibližně normální distribuci. Ještě důležitější je homogenita rozptylu (homoskedasticita). Zkušenosti ukazují, že rozptyl se často zvětšuje s rostoucí střední hodnotou. V těchto případech je možno homoskedasticity dosáhnout transformací dat. Taková transformace by však měla vycházet spíše ze zkušeností s historickými daty než ze zkoumaných dat. U homogenních dat by se měly provést mnohonásobné t-testy, jako je Williamsův test ($\alpha = 0,05$, jednostranný) (21, 22) nebo v určitých případech Dunnettův test (23, 24). Je třeba upozornit, že v případě nerovného počtu opakování se musí tabulkové t-hodnoty korigovat způsobem navrženým Dunnettem a Williamsem. Odezvy někdy v důsledku velkého rozptylu nevzrůstají/neklesají pravidelně. V případě silné odchylky od monotónnosti je vhodnější Dunnetův test. Existují-li odchylky od homoskedasticity, může být rozumné důkladněji prozkoumat možný dopad na rozptyly, aby bylo možno rozhodnout, zda lze t-testy použít, aniž by se podstatně snížila vypovídací schopnost testu (25). Jinak lze použít mnohonásobný U-test, např. Bonferroniho U-test podle Holma (26), nebo pokud tato data vykazují heteroskedasticitu, avšak jinak jsou v souladu se základním monotónním vztahem mezi dávkou a odezvou, lze použít jiný neparametrický test (např. Jonckheere-Terpstrův (27)(28) nebo Shirleyův (29) (30)) a obecně by se v takovém případě upřednostňoval před t-testy upravené pro nerovnost rozptylů. (viz také schéma v dodatku 6).

47. Pokud byla provedena limitní zkouška a jsou splněny nezbytné předpoklady pro použití parametrických testů (normálnost, homogenita), lze použít párový Studentův t-test, v opačném případě pak neparametrický Mann-Whitneyův U-test (31).

Odhad hodnoty EC_x

48. Pro výpočet hodnoty EC_x se poté, co byla získána vhodná funkce závislosti odezvy na dávce, použijí k regresní analýze střední hodnoty pro každé ošetření zkoušenou látkou (lineární nebo nelineární). Pro růst žížal jakožto spojitou proměnnou odezvy lze hodnoty EC_x odhadnout pomocí vhodné regresní analýzy. Mezi funkce vhodné pro binární data (mortalita/přežití) a počet vyprodukovaných potomků patří normální sigmoidní, logistická nebo Weibullova funkce obsahující dva nebo čtyři parametry, z nichž některé mohou modelovat rovněž hormetické odezvy. Pokud byla funkce závislosti odezvy na dávce proložena pomocí lineární regresní analýzy, měl by se před odhadnutím hodnoty EC_x pomocí regresní analýzy zjistit významný r^2 (koeficient determinace) a/nebo směrnice vložením hodnoty odpovídající x % střední hodnoty kontroly do rovnice zjištěné při regresní analýze. 95 % intervaly spolehlivosti se vypočítají podle Fiellera (citováno v práci Finneye (18)) nebo jinými vhodnými moderními metodami.

49. Jinou možností je modelovat účinek jako procento nebo podíl modelového parametru, který je interpretován jako průměrný účinek u kontroly. V těchto případech lze výsledky snadno proložit normální (logistickou, Weibullovu) sigmoidní křivkou pomocí probitové regrese (18). V těchto případech je nutné upravit váženou funkci pro metrické odezvy, jak uvádí Christensen (33). Pokud však byla pozorována hormeze, měla by se probitová analýza nahradit čtyřparametrickou logistickou nebo Weibullovou funkcí proloženou pomocí nelineární regrese (34). Pokud data nelze proložit vhodnou funkcí závislosti odezvy na dávce, je možné použít k odhadu hodnoty EC_x a jejích mezí spolehlivosti jiné metody, např. klouzavé průměry dle Thompsona (19) a upravený Spearman-Kärberův postup (20).

ZÁVĚREČNÁ ZPRÁVA

50. Závěrečná zpráva musí obsahovat tyto údaje:

▼**M6**

Zkoušená chemická látka:

— úplný popis zkoušené chemické látky, šarže, dávka a číslo CAS, čistota,

— vlastnosti zkoušené chemické látky (např. log K_{ow}, rozpustnost ve vodě, tlak par, Henryho konstanta (H) a informace o jejím osudu a chování).

Zkušební organismy:

— použité zkušební organismy: druh, vědecký název, zdroj organismů a podmínky chovu,

— věk, rozmezí velikosti (hmotnosti) zkušebních organismů.

Zkušební podmínky

— podrobné údaje o přípravě zkušební půdy,

— maximální retenční vodní kapacita půdy,

— popis techniky použité k aplikaci zkoušené chemické látky do půdy,

— podrobné údaje o pomocných chemických látkách použitých k aplikaci zkoušené chemické látky,

— kalibrační údaje o zařízení použitém k postřiku, je-li to vhodné,

— popis experimentálního uspořádání a postupu,

— velikost zkušebních nádob a objem zkušební půdy,

— zkušební podmínky: intenzita osvětlení, doba trvání cyklů světla-tmy, teplota,

— popis krmného režimu, typ a množství potravy použité ve zkoušce, data krmení,

— pH půdy a obsah vody v půdě na začátku a na konci zkoušky.

Výsledky zkoušky:

— mortalita dospělých jedinců (%) v každé zkušební nádobě na konci prvních 4 týdnů zkoušky,

— celková hmotnost dospělých jedinců na začátku zkoušky v každé zkušební nádobě,

— změny tělesné hmotnosti živých dospělých jedinců (% původní hmotnosti) v každé zkušební nádobě po prvních čtyřech týdnech zkoušky,

— počet nedospělých jedinců vyprodukovaných v každé zkušební nádobě na konci zkoušky,

— popis zjevných patologických příznaků či zřetelných změn chování,

— výsledky získané s referenční zkoušenou chemickou látkou,

— hodnoty LC_{50}, NOEC a/nebo EC_x (např. EC_{50}, EC_{10}) pro reprodukci, pokud jsou některé z nich vhodné, s intervaly spolehlivosti a grafem příslušného modelu použitého pro jejich výpočet, všechny informace a pozorování užitečné pro interpretaci výsledků,

— graf vztahu mezi dávkou a odezvou,

— výsledky pro každou zkušební nádobu.

Odchylky od postupů popsaných v této zkušební metodě a jakékoli neobvyklé jevy, které se vyskytly během zkoušky.

LITERATURA

1) Jaenicke, J. (1982). '*Eisenia foetida'* is two biological species. Megadrilogica 4, 6-8.

2) Oien, N. and J. Stenerson (1984). Esterases of earthworm – III. Electrophoresis reveals that *Eisenia foetida* (Savigny) is two species. Comp. Biochem. Physiol. 78c (2), 277 – 282.

▼**M6**

3) Kula, C. (1996). Development of a test method on sublethal effects of pesticides on the earthworm species *Eisenia fetida/Eisenia andrei* – comparison of two ringtests. In: Riepert, F., Kula, C. (1996): Development of laboratory methods for testing effects of chemicals and pesticides on collembola and earthworms. Mitt. Biol. Bundesamst. f. Land- Forstwirtsch. Berlin-Dahlem, 320, p. 50-82.

4) Kapitola C.8 této přílohy, Zkouška akutní toxicity pro žížaly.

5) ISO (International Organization for Standardization) (1996). Soil Quality – Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 2: Determination of effects on reproduction, No.11268-2. ISO, Geneve.

6) ISO (International Organization for Standardization) (1993). Soil Quality – Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida)*. Part 1: Determination of acute toxicity using artificial soil substrate, No.11268-1. ISO, Geneve.

7) SETAC (1998). Advances in Earthworm Ecotoxicology. Sheppard, S.C., Bembridge, J.D., Holmstrup, M., and L. Posthuma, (eds). SETAC Press, 456 pp.

8) EPA (1996). Ecological effects test guidelines. Earthworm Subchronic Toxicity Test (850.62.00). United States Environmental Protection Agency. Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances. EPA712-C-96-167, April 1996.

9) Bouché, M.B. (1972). Lombriciens de France, Ecologie et systématique. Publication de l'Institut National de la Recherche Agronomique.

10) Edwards, C.A. (1983). Development of a standardized laboratory method for assessing the toxicity of chemical substances to earthworms. Report EUR 8714 EN, Commission of European Communities.

11) Greig-Smith, P.W., H. Becker, P.J. Edwards and F. Heimbach (eds.) (1992). Ecotoxicology of Earthworms. Intercept.

12) Edwards, C.A. and J. P. Bohlen, (1996). Biology and ecology of Earthworms, 3rd Edition. Chapman and Hall, London.

13) (ISO (International Organization for Standardization) (1994). Soil Quality – Determination of pH, No. 10390. ISO, Geneve.

14) Hund-Rinke, K, Römbke, J., Riepert, F. & Achazi R. (2000): Beurteilung der Lebensraumfunktion von Böden mit Hilfe von Regenwurmtests. In: Toxikologische Beurteilung von Böden. Heiden, S., Erb, R., Dott, W. & Eisentraeger, A. (eds.). Spektrum Verl., Heidelberg. 59-81.

15) ISO (International Organization for Standardization) (1992). Soil Quality –Determination of water retention characteristics –Laboratory methods, No. 11274. ISO, Geneve.

16) ISO (International Organization for Standardization) (1993). Soil Quality –Determination of dry matter and water content on a mass basis – Gravimetric method, No. 11465. ISO, Geneve.

17) Römbke, J. and Th. Moser (1999). Organisation and Performance of an International Ringtest for the validation of the Enchytraeid Reproduction Test. UBA-Texte 4/99, 150+ 223 pp.

▼**M6**

18) Finney, D.J. (1971). Probit Analysis (3rd ed.), pp. 19-76. Cambridge Univ. Press.

19) Finney, D.J. (1978). Statistical Method in Biological Assay. – Charles Griffin & Company Ltd, London.

20) Hamilton, M.A., R.C. Russo and R.V. Thurston. (1977). Trimmed Spearman-Karber Method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. Microbiol. Tecn. Technol. 11(7), 714-719; Correction Environ. Tecn. Technol. 12(1998), 417.

21) Williams, D.A., (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics 27, 103-117.

22) Williams, D.A., (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics 28, 519-531.

23) Dunnett, C.W., (1955). A multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control. Amer. Statist. Ass. J. 50, 1096-1121.

24) Dunnett, C.W., (1964) New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics 20, 482-491.

25) Hoeven, N. van der, (1998). Power analysis for the NOEC: What is the probability of detecting small toxic effects on three different species using the appropriate standardized test protocols? Ecotoxicology 7: 355-361.

26) Holm, S., (1979): A simple sequentially rejective multiple test procedure. Scand. J. Statist. 6, 65-70.

27) Jonckheere, A. R. (1954); A Distribution-free k-Sample Test Against Ordered Alternatives, Biometrika 41, 133-145.

28) Terpstra, T. J. (1952); The Asymptotic Normality and Consistency of Kendall's Test Against Trend, When Ties are Present in One Ranking, Indagationes Math. 14, 327-333.

29) Shirley, E. A. (1979); The comparison of treatment to control group means in toxicology studies, Applied Statistics 28, 144-151.

30) Williams, D.A. (1986); A Note on Shirley's Nonparametric Test for Comparing Several Dose Levels with a Zero-Dose Control, Biometrics 42, 183-186.

31) Sokal, R.R. and F.J. Rohlf. (1981). Biometry. The Principle and practice of statistics in biological research. 2nd edition. W.H. Freeman and Company. New York.

32) Bruce R.D. and Versteeg D.J. (1992) A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. Environmental Toxicology and Chemistry 11:1485-1494.

33) Christensen, E.R., (1984). Dose-response functions in aquatic toxicity testing and the Weibull model. Water Research 18, 213-221.

34) Van Ewijk, P.H. and J.A. Hoekstra. (1993). Calculation of the EC50 and its confidence interval when sub-toxic stimulus is present. Ecotox, Environ. Safety. 25, 25-32.

▼M6

Dodatek 1

Definice

V rámci této zkušební metody se používají následující definice:

Chemická látka je látka nebo směs.

EC_x (účinná koncentrace s x % účinkem) je koncentrace, která má x % účinek na zkušební organismus během daného období expozice v porovnání s kontrolou. Například EC_{50} je koncentrace, u níž se odhaduje, že povede k účinku na testovaný cílový ukazatel u 50 % exponované populace během definovaného období expozice. V této zkoušce jsou účinné koncentrace vyjádřeny jako hmotnost zkoušené chemické látky na suchou hmotnost zkušební půdy nebo jako hmotnost zkoušené chemické látky na jednotku plochy půdy.

LC_0 (koncentrace bez letálního účinku) je koncentrace zkoušené chemické látky, která neusmrtí žádný z exponovaných zkušebních organismů během daného období. V této zkoušce je LC_0 vyjádřena jako hmotnost zkoušené chemické látky na suchou hmotnost zkušební půdy.

LC_{50} (medián letální koncentrace) je koncentrace zkoušené chemické látky, která usmrtí 50 % exponovaných zkušebních organismů během daného období. V této zkoušce je LC_{50} vyjádřena jako hmotnost zkoušené chemické látky na suchou hmotnost zkušební půdy nebo jako hmotnost zkoušené chemické látky na jednotku plochy půdy.

LC_{100} (letální koncentrace) je koncentrace zkoušené chemické látky, která usmrtí 100 % exponovaných zkušebních organismů během daného období. V této zkoušce je LC_{100} vyjádřena jako hmotnost zkoušené chemické látky na suchou hmotnost zkušební půdy.

Nejnižší koncentrace s pozorovaným účinkem (LOEC) je nejnižší koncentrace zkoušené chemické látky, který má statisticky významný účinek ($p < 0,05$). V této zkoušce je LOEC vyjádřena jako hmotnost zkoušené chemické látky na suchou hmotnost zkušební půdy nebo jako hmotnost zkoušené chemické látky na jednotku plochy půdy. Všechny zkušební koncentrace vyšší než LOEC by měly obvykle vykazovat účinek, který je statisticky odlišný od kontroly. Jakékoli odchylky od výše uvedeného musí být zdůvodněny v závěrečné zprávě.

Koncentrace bez pozorovaných účinků (NOEC) je nejvyšší koncentrace zkoušené chemické látky hned pod LOEC, při níž nejsou pozorovány žádné účinky. V této zkoušce nemá koncentrace odpovídající NOEC žádný statisticky významný účinek ($p < 0,05$) během daného období expozice v porovnání s kontrolou.

Míra reprodukce: Průměrný počet nedospělých jedinců vyprodukovaných na počet dospělých jedinců během období zkoušky.

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

▼M6

Dodatek 2

Stanovení maximální retenční vodní kapacity půdy

Zjistilo se, že vhodnou metodou pro stanovení maximální retenční vodní kapacity je následující metoda. Je popsána v příloze C normy ISO DIS 11268-2 (1).

Odeberte stanovené množství (např. 5 g) zkušebního půdního substrátu pomocí vhodného nástroje na odběr vzorků (spirálový trubkový vzorkovač atd.). Zakryjte spodek trubky kouskem filtračního papíru, naplňte ji vodou a poté ji umístěte na stojan ve vodní lázni. Trubka by se měla postupně nořit pod hladinu, až se hladina vody dostane nad povrch půdy. Poté by se měla nechat ve vodě asi tři hodiny. Protože půda nemůže udržet veškerou vodu absorbovanou půdními kapilárami, je třeba nechat půdní vzorek po dobu dvou hodin odkapat umístěním trubky na vrstvu velmi vlhkého jemně mletého křemenného písku v zakryté nádobě (aby se zabránilo vysychání). Poté by se měl vzorek zvážit, vysušit na konstantní hmotnost při teplotě 105 °C. Retenční vodní kapacita (RVK) se poté vypočítá takto:

$$\text{RVK (v \% hmotnosti sušiny)} = \frac{S - T - D}{D} \times 100$$

Kde:

S = vodou nasycený substrát + hmotnost trubky + hmotnost filtračního papíru

T = tára (hmotnost trubky + hmotnost filtračního papíru)

D = hmotnost suchého substrátu

LITERATURA:

1) ISO (International Organization for Standardisation) (1996). Soil Quality – Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 2: Determination of effects on reproduction, No.11268-2. ISO, Geneve.

▼**M6**

Dodatek 3

Stanovení pH půdy

Následující metoda stanovení pH půdy vychází z popisu uvedeného v normě ISO DIS 10390: Kvalita půdy – Stanovení pH (1).

Definované množství půdy se nechá schnout při pokojové teplotě po dobu alespoň 12 hodin. Poté se připraví suspenze půdy (obsahující alespoň 5 gramů půdy) buď v 1 M roztoku chloridu draselného p.a. (KCl), nebo v 0,01 M roztoku chloridu vápenatého p.a. ($CaCl_2$) o objemu rovnajícímu se pětinásobku objemu půdy. Poté se suspenze důkladně protřepe po dobu pěti minut a nechá se usadit alespoň 2 hodiny, avšak ne déle než 24 hodin. Následně se změří pH kapalné fáze pomocí pH-metru, který se před každým měřením kalibruje pomocí vhodné sady roztoků pufru (např. o pH 4,0 a 7,0).

LITERATURA:

1) ISO (International Organization for Standardization) (1994). Soil Quality – Determination of pH, No. 10390. ISO, Geneve.

▼M6

Dodatek 4

Kultivace žížal druhu Eisenia fetida/Eisenia andrei

Chov by se měl provádět pokud možno v klimatizované komoře při teplotě 20 °C ± 2 °C. Při této teplotě a dostatečném přísunu potravy žížaly dospějí po asi 2 až 3 měsících.

Oba druhy mohou být kultivovány v celé řadě zvířecích exkrementů. Doporučeným chovným médiem je směs koňského nebo kravského hnoje a rašeliny v poměru 50:50. Je třeba provádět kontroly zajišťující, že krávy či koně, od kterých se hnůj získává, nejsou léčeni či ošetřováni chemickými látkami, například látkami podporujícími růst, nematocidy či podobnými veterinárními přípravky, které by mohly žížaly během zkoušky nepříznivě ovlivnit. Doporučuje se používat osobně odebraný hnůj z „biologického“ zdroje, neboť zkušenosti ukázaly, že komerčně dostupný hnůj používaný jako zahradní hnojivo může mít na žížaly nežádoucí účinky. Médium by mělo mít hodnotu pH přibližně 6 až 7 (upraví se uhličitanem vápenatým), nízkou iontovou vodivost (méně než 6 mS/cm nebo 0,5 % koncentrace solí) a nemělo by být příliš kontaminováno amoniakem nebo zvířecí močí. Substrát by měl být vlhký, ale ne příliš mokrý. Vhodnými chovnými nádobami jsou nádoby o objemu 10 až 50 litrů.

Pro získání žížal standardního stáří a velikosti (hmotnosti) je nejlepší založit kulturu pomocí zámotků. Jakmile je kultura založena, udržuje se umístěním dospělých žížal do chovné nádoby s čerstvým substrátem na dobu 14 až 28 dnů, aby mohly vyprodukovat další zámotky. Poté se dospělí jedinci odeberou a nedospělí jedinci vylíhlí ze zámotků se použijí jako základ další kultury. Žížaly se kontinuálně krmí zvířecími exkrementy a občas se přenesou do čerstvého substrátu. Zkušenosti ukázaly, že vhodnou potravou je na vzduchu vysušený jemně mletý kravský či koňský hnůj nebo ovesné vločky. Je třeba zajistit, že krávy či koně, od kterých se hnůj získává, nejsou léčeni či ošetřováni chemickými látkami, například látkami podporujícími růst, které by mohly žížaly během dlouhodobé kultivace nepříznivě ovlivnit. Žížaly vylíhlé ze zámotků se použijí ke zkoušce, když dosáhnou stáří 2 až 12 měsíců a považují se za dospělé jedince.

Žížaly lze považovat za zdravé, pokud se pohybují substrátem, nesnaží se substrát opustit a průběžně se množí. Vyčerpání substrátu se projeví tím, že se žížaly velmi pomalu pohybují a mají žlutý zadní konec. V takovém případě se doporučuje zajistit čerstvý substrát a/nebo snížit hustotu jedinců v půdě.

▼**M6**

Dodatek 5

Techniky pro počítání nedospělých jedinců vylíhlých ze zámotků

Ruční vybírání žížal z půdního substrátu je velmi časově náročné. Proto se doporučují dvě alternativní metody:

a) Zkušební nádoby se umístí do vodní lázně, nejprve při teplotě 40 °C, která se postupně zvýší na 60 °C. Po uběhnutí asi 20 minut by se měli nedospělí jedinci objevit na povrchu půdy, odkud je lze snadno odebrat a spočítat.

b) Zkušební půdu lze promýt přes síto pomocí metody vyvinuté van Gestelem et al. (1) za předpokladu, že rašelina a hnůj nebo ovesné vločky přidané do půdy byly pomlety na jemný prášek. Dvě síta o velikosti ok 0,5 mm (průměr 30 cm) se umístí na sebe. Obsah zkušební nádoby se promyje skrz síta silným proudem vodovodní vody, což zanechá mladé žížaly a zámotky převážně na horním sítě. Je třeba poznamenat, že během tohoto postupu by se měl celý povrch horního síta udržovat vlhký, aby se juvenilní jedinci vznášeli na vrstvičce vody a nemohli prolézt oky v sítu. Nejlepších výsledků se dosáhne při použití sprchové hlavice.

Jakmile se půdní substrát promyje skrz síto, je možné nedospělé jedince a zámotky z horního síta vypláchnout do misky. Obsah misky se poté nechá stát, aby prázdné zámotky vyplavaly na povrch vody a plné zámotky a mladé žížaly klesly ke dnu. Stojící vodu je možné následně slít a mladé žížaly a zámotky přemístit do Petriho misky naplněné malým množstvím vody. Poté je možné žížaly odebrat ke spočítání pomocí jehly nebo pinzety.

Zkušenosti ukázaly, že metoda a) se více hodí k odebrání nedospělých jedinců, kteří by mohli při promytí projít i skrze síto o velikosti ok 0,5 mm.

Vždy by se měla stanovit účinnost metody použité k odběru žížal (a případně zámotků) z půdního substrátu. Pokud se k odběru nedospělých jedinců použije ruční technika třídění, doporučuje se provést celý postup na všech vzorcích dvakrát.

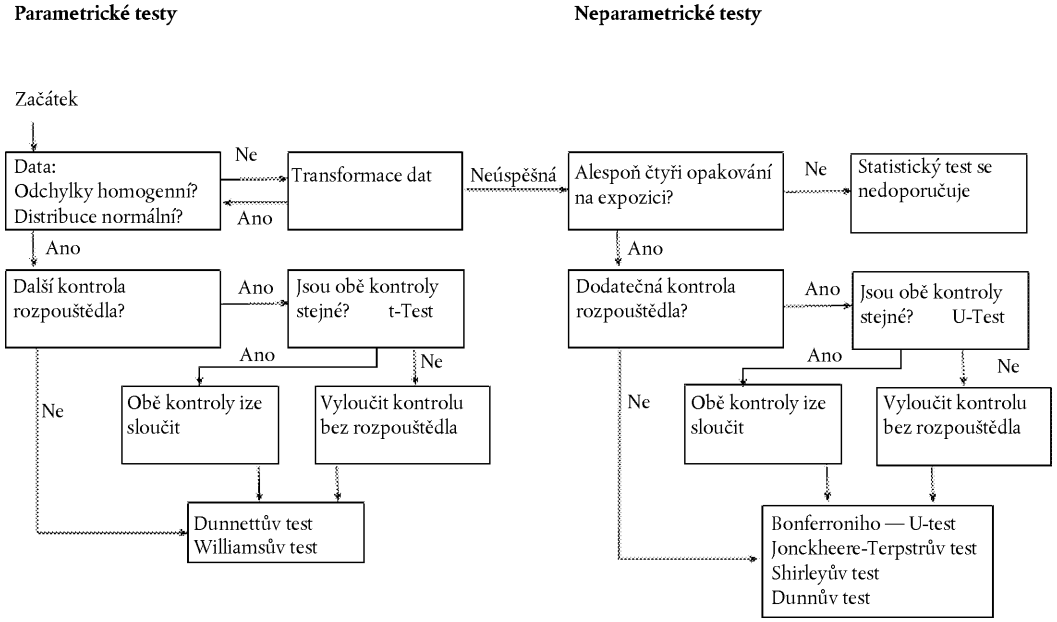
LITERATURA:

1) Van Gestel, C.A.M., W.A. van Dis, E.M. van Breemen, P.M. Sparenburg (1988). Comparison of two methods determining the viability of cocoons produced in earthworm toxicity experiments. Pedobiologia 32:367-371.

▼**M6**

Dodatek 6

Přehled statistického vyhodnocení dat (stanovení NOEC)



▼M6

C.34. STANOVENÍ INHIBICE AKTIVITY ANAEROBNÍCH BAKTERIÍ – SNÍŽENÍ PRODUKCE PLYNŮ Z ANAEROBNĚ ROZKLÁDAJÍCÍHO (ČISTÍRENSKÉHO) KALU

ÚVOD

1. Tato zkušební metoda je rovnocenná Pokynu OECD pro zkoušení 224 (2007). Chemické látky uvolněné do vodného prostředí procházejí aerobními i anaerobními zónami, ve kterých se mohou rozkládat a/nebo inhibovat bakteriální aktivitu. V některých případech mohou zůstat v anaerobních zónách v netknuté podobě po desetiletí i déle. První fáze čištění odpadních vod – primární usazení – je aerobní v supernatantní tekutině a anaerobní v subnatantním kalu. Následuje sekundární fáze v aerobní zóně provzdušňovací nádrže s aktivovaným kalem a v anaerobní zóně v subnatantním kalu v sekundární usazovací nádrži. Kal z obou těchto fází se obvykle zpracovává anaerobně, přičemž vzniká methan a oxid uhličitý, které se obvykle používají k výrobě elektřiny. Chemické látky, které se v širším prostředí dostanou do sedimentů v zátokách, ústích řek a moři, v těchto zónách pravděpodobně zůstanou trvale, pokud nejsou biologicky rozložitelné. Díky svým fyzikálním vlastnostem, jako je nízká rozpustnost ve vodě, vysoká adsorpce na suspendované pevné částice a rovněž nemožnost rozložit je biologicky aerobním způsobem, se určité chemické látky dostanou do těchto zón přednostně ve větším množství.

2. Zatímco je žádoucí, aby byly chemické látky uvolňované do životního prostředí biologicky rozložitelné jak za aerobních, tak anaerobních podmínek, je nezbytné, aby tyto chemické látky neinhibovaly aktivitu mikroorganismů v žádné z těchto zón. Ve Spojeném království se vyskytlo několik případů úplné inhibice produkce methanu způsobené například pentachlorfenolem v průmyslových odpadech, což mělo za následek velmi nákladný transport inhibovaného kalu z vyhnívacích nádrží na „bezpečná“ místa a dovoz zdravého rozkládajícího kalu ze sousedních zařízení. Došlo však také k mnoha případům méně závažného narušení rozkládání několika dalšími chemickými látkami, mezi něž patřily halogenované alifatické uhlovodíky (chemické čištění oděvů) a detergenty, což vedlo k významnému zhoršení účinnosti vyhnívací nádrže.

3. Inhibicí bakteriální aktivity (respirace aktivovaného kalu) se zabývá pouze jediná zkušební metoda – C.11 (1), která posuzuje účinek zkoušených chemických látek na rychlost spotřeby kyslíku v přítomnosti substrátu. Tato metoda se obecně používá k časnému zjištění možných škodlivých účinků chemických látek na aerobní čištění odpadních vod a rovněž ke zjištění neinhibičních koncentrací zkoušených chemických látek pro použití v různých zkouškách biologické rozložitelnosti. Zkušební metoda C.43 (2) nabízí omezenou možnost stanovení toxicity zkoušené chemické látky pro produkci plynů anaerobním kalem. Používá kal naředěný na jednu desetinu své normální koncentrace pevných částic, aby bylo možno stanovit procento biologického rozkladu s požadovanou přesností. Protože naředěný kal by mohl být citlivější na inhibiční chemické látky, rozhodla se pracovní skupina pro normy ISO vypracovat metodu využívající neředěný kal. Byly přezkoumány nejméně tři texty (z Dánska, Německa a Spojeného království) a nakonec byly vypracovány dvě normy ISO, z nichž jedna používá neředěný kal – ISO 13 641-1 (3) a druhá používá stokrát ředěný kal – ISO 13 641-2 (4), který představuje bahna a sedimenty s málo početnými bakteriálními populacemi. Obě metody byly podrobeny okružnímu testu (5). 1. část byla potvrzena jako přijatelná norma, avšak na 2. část panovaly rozdílné názory. Spojené království zastávalo názor, že tato metoda vyžaduje další výzkum, neboť významné procento účastníků hlásilo velmi malou nebo žádnou produkci plynů, částečně i proto, že procento prostoru pro plyny bylo příliš vysoké (75 %) pro dosažení optimální citlivosti.

4. Dřívější práce provedená ve Spojeném království (6)(7) popisovala manometrickou metodu používající jako substrát neředěný rozkládající kal a nezpracovaný čistírenský kal v 500ml baňkách. Zařízení bylo neskladné a zápach nezpracovaného kalu byl velmi nepříjemný. Později Wilson et al. (10) úspěšně použil kompaktnější a praktičtější zařízení Sheltona a Tiedjeho (8), jak ho vyvinuli Battersby a Wilson (9). Kawaraha et al. (11) připravil v laboratoři úspěšně standardnější kaly pro použití při zkouškách anaerobní

▼M6

biologické rozložitelnosti a inhibice u řady chemických látek. Nezpracovaný kal jako substrát byl rovněž nahrazen a zkouška se provádí buď se stokrát zředěným anaerobním kalem, nebo s bahny, sedimenty atd. o nízké bakteriální aktivitě.

5. Tato metoda může přinést informace, které jsou užitečné při předpovídání pravděpodobného účinku zkoušené chemické látky na produkci plynu v anaerobních vyhnívacích nádržích. Nicméně pouze delší zkoušky lépe simulující vyhnívací nádrže v provozu mohou ukázat, zda může dojít k adaptaci mikroorganismů na zkoušenou chemickou látku, nebo zda se chemické látky, které se budou pravděpodobně absorbovat a adsorbovat na kal, mohou nahromadit až do toxické koncentrace během delšího období, než které umožňuje tato zkouška.

PODSTATA ZKOUŠKY

6. Alikvoty směsi anaerobně rozkládajícího kalu (celková koncentrace pevných částic 20 g/l až 40 g/l) a rozložitelný roztok substrátu se inkubují v uzavřených nádobách samostatně a paralelně také s řadou koncentrací zkoušené chemické látky po dobu až 3 dnů. Množství vyprodukovaného plynu (methan a oxid uhličitý) se určuje podle zvýšení tlaku (Pa) v nádobách. Procento inhibice produkce plynů způsobené různými koncentracemi zkoušené chemické látky se vypočítá z množství plynu vyprodukovaného v příslušné zkušební a kontrolní nádobě. Hodnota EC_{50} a další účinné koncentrace se vypočítají z grafů závislosti procentuální inhibice na koncentraci zkoušené chemické látky nebo, obvykleji, na logaritmu její koncentrace.

INFORMACE O ZKOUŠENÉ CHEMICKÉ LÁTCE

7. Zkoušené chemické látky by se měly obvykle použít v nejčistší snadno dostupné formě, neboť nečistoty v některých chemických látkách, např. chlorfenoly, mohou být mnohem toxičtější než zkoušená chemická látka sama. Je však třeba zvážit potřebu zkoušet chemické látky v té formě, ve které jsou komerčně produkovány/vyráběny. Použití komerčně upravovaných přípravků se běžně nedoporučuje, avšak u špatně rozpustných zkoušených chemických látek může být použití upravovaných přípravků vhodné. Mezi vlastnosti zkoušené chemické látky, které by měly být známy, patří rozpustnost ve vodě a některých organických rozpouštědlech, tlak par, adsorpční koeficient, hydrolýza a biologická rozložitelnost za anaerobních podmínek.

POUŽITELNOST ZKUŠEBNÍ METODY

8. Tuto zkoušku lze použít u chemických látek, které jsou rozpustné nebo nerozpustné ve vodě, včetně těkavých chemických látek. Při práci s materiály o nízké rozpustnosti ve vodě (viz odkaz (12)) a vysoké těkavosti je však zapotřebí zvláštní opatrnosti. Rovněž lze použít inokula z jiných anaerobních míst, např. bahna, nasycené půdy, sedimenty. Anaerobní bakteriální systémy, které byly v minulosti vystaveny toxickým chemickým látkám, se mohou adaptovat tak, aby si udržely svou aktivitu v přítomnosti xenobiotických chemických látek. Inokula z adaptovaných bakteriálních systémů mohou vykazovat vyšší snášenlivost vůči zkoušeným chemickým látkám v porovnání s inokuly získanými z neadaptovaných systémů.

REFERENČNÍ CHEMICKÉ LÁTKY

9. Ke kontrole celého postupu se jako součást normální zkoušky souběžně provede ve vhodných nádobách zkouška s referenční chemickou látkou. Ukázalo se, že 3,5-dichlorfenol je stálý inhibitor anaerobní produkce plynů a rovněž spotřeby kyslíku aktivovaným kalem a jiných biochemických reakcí. Zjistilo se, že ještě větší inhibici produkce methanu než 3,5-dichlorfenol způsobují dvě další chemické látky, a sice methylen-dithiokyanát a pentachlorfenol, avšak výsledky s těmito látkami nebyly validovány. Pentachlorfenol se nedoporučuje, neboť není snadno dostupný v čisté formě.

▼M6

REPRODUKOVATELNOST VÝSLEDKŮ

10. V mezinárodním okružním testu (5) byly výsledky hodnot EC_{50} pro 3,5-dichlorfenol a 2-bromethansulfonovou kyselinu reprodukovatelné mezi 10 zúčastněnými laboratořemi pouze uspokojivě. (Rozpětí pro první látku bylo 32 až 502 mg/l a pro druhou 220–2 190 mg/l.)

Počet laboratoří	v mg/l			v mg/g kalu		
	střední hodnota	SD	var. koef. (%)	střední hodnota	SD	var. koef. (%)
	3,5-dichlorfenol					
10	153	158	103	5	4,6	92
	2-bromethansulfonová kyselina					
10	1 058	896	85	34	26	76

EC_{50} z okružního testu pro neředěný kal

11. Vysoké variační koeficienty mezi laboratořemi do velké míry odrážejí rozdíly v citlivosti kalových mikroorganismů způsobené tím, zda tyto mikroorganismy byly, nebo nebyly v minulosti vystaveny zkoušené chemické látce nebo jiným chemicky příbuzným látkám. Přesnost, s jakou byla stanovena hodnota EC_{50} na základě koncentrace kalu, byla sotva lepší než „volumetrická“ hodnota (mg/l). Tři laboratoře, které uváděly přesnost hodnot EC_{50} pro 3,5-dichlorfenol, vykazovaly mnohem nižší variační koeficienty (22, 9 a 18 % pro EC_{50} mg/g), než byly variační koeficienty středních hodnot všech deseti laboratoří. Jednotlivé střední hodnoty činily u těchto laboratoří 3,1, 3,2 a 2,8 mg/g. Nižší, přijatelné variační koeficienty v rámci jednotlivých laboratoří v porovnání s mnohem vyššími koeficienty mezi laboratorními hodnotami, a sice 9–22 % srov. 92 %, naznačují, že se jednotlivé kaly významně liší svými vlastnostmi.

POPIS METODY

Přístroje a pomůcky

12. Je zapotřebí obvyklé laboratorní vybavení a tyto pomůcky:

a) Inkubátor – s ochranou proti jiskření a s řízenou teplotou v rozmezí 35 °C ± 2 °C;

b) Tlakuvzdorné skleněné zkušební nádoby vhodné nominální velikosti ([1]), každá vybavená plynotěsným potaženým septem, které je schopno vydržet tlak přibližně 2 bary nebo 2×10^5 Pa (pro potah použijte např. PTFE = polytetrafluorethen, teflon). Doporučují se skleněné lahve na sérum o nominálním objemu 125 ml se skutečným objemem přibližně 160 ml, uzavřené septem ([2]) a tvarovaným hliníkovým uzávěrem, avšak je možné úspěšně použít i lahve o celkovém objemu 0,1 až 1 litr;

([1]) Doporučená velikost se pohybuje od 0,1 do 1 litru.

([2]) Doporučuje se použít plynotěsná silikonová septa. Dále se doporučuje otestovat plynotěsnost uzávěrů, zejména sept z butylové pryže, protože několik komerčně dostupných sept není dostatečně plynotěsných vůči methanu a některá septa neudrží těsnost při propíchnutí jehlou za podmínek této zkoušky.

— Pro těkavé chemické látky se doporučují a musí použít plynotěsná potažená septa (některá komerční septa jsou relativně tenká, méně než 0,5 cm, a nezachovají si plynotěsnost po propíchnutí injekční jehlou).

— Pokud zkoušené látky nejsou těkavé, doporučuje se použít septa z butylové pryže (asi 1 cm) (obvykle si po propíchnutí zachovají plynotěsnost).

— Před zkouškou se doporučuje pečlivě zkontrolovat schopnost sept zachovat si plynotěsnost po propíchnutí.

▼M6

c) Přesný tlakoměr ([1]) a nástavec s jehlou;

Celková produkce plynů (methanu a oxidu uhličitého) naměřená pomocí tlakoměru upraveného tak, aby umožňoval měření a ventilaci vyprodukovaného plynu. Příkladem vhodného přístroje je ruční přesný tlakoměr připojený na injekční jehlu. Trojcestný plynotěsný ventil usnadňuje uvolnění nadměrného tlaku (dodatek 1). Je třeba udržet vnitřní objem trubice pro přenos tlaku a ventilu co možná nejnižší, aby byly chyby vzniklé zanedbáním objemu zařízení nevýznamné;

d) Izolované nádoby pro transport rozkládajícího kalu;

e) Trojcestné tlakové ventily;

f) Síto s oky o rozměru 1 mm^2;

g) Nádrž pro rozkládající kal, skleněná láhev nebo láhev z polyethylenu o vysoké hustotě, s objemem asi 5 litrů, vybavená míchadlem a zařízením pro průchod proudu plynného dusíku (viz odstavec 13) skrz prostor nad kapalinou;

h) membránové filtry (0,2 μm) pro sterilizaci substrátu;

i) mikrostříkačky pro plynotěsné připojení tlakového snímače (viz odstavec 12 c)) k prostoru nad kapalinou v lahvi (viz odstavec 12 b)) a rovněž pro přidání nerozpustných tekutých zkoušených materiálů do lahví;

j) rukavicový box, volitelný, avšak doporučuje se, s lehkým přetlakem dusíku.

Činidla

13. Používají se pouze chemická činidla o čistotě p.a. V celé zkoušce by se měl používat plynný dusík o vysoké čistotě s obsahem kyslíku méně než 5 μl/l.

Voda

14. Je-li v jakékoli fázi zapotřebí provést ředění, použijte odvzdušněnou deionizovanou vodu. Analytické kontroly této vody nejsou nutné, ale zajistěte pravidelnou údržbu deionizačního přístroje. Deionizovanou vodu použijte také k přípravě zásobních roztoků. Před přidáním anaerobního inokula k jakémukoli roztoku či naředěnému zkoušenému materiálu se ujistěte, že neobsahují kyslík. Provedete to buď probubláváním plynného dusíku skrz vodu používanou k ředění (nebo skrz ředěné roztoky) po dobu 1 hodiny před přidáním inokula, nebo zahřátím vody používané k ředění k bodu varu a vychlazením na pokojovou teplotu v atmosféře bez kyslíku.

Rozkládající kal

15. Odeberte aktivně rozkládající kal z vyhnívací nádrže v čistírně odpadních vod nebo z laboratorní vyhnívací nádrže, která čistí kal pocházející převážně z domácích odpadních vod. Praktické informace týkající se kalu z laboratorní vyhnívací nádrže naleznete jinde (11). Pokud zamýšlíte použít adaptované inokulum, je možné zvážit použití rozkládajícího kalu z čistírny průmyslových odpadních vod. K odběru kalu použijte lahve se širokým

([1]) Tlakoměr by se měl používat a kalibrovat v pravidelných intervalech v souladu s pokyny výrobce. Pokud se používá tlakoměr o předepsané kvalitě, např. zapouzdřený v ocelové membráně, není kalibrace v laboratoři nutná. Měl by být v doporučených intervalech kalibrován oprávněným ústavem. Přesnost kalibrace lze v laboratoři zkontrolovat jednobodovým měřením při tlaku 1×10^5 Pa oproti tlakoměru s mechanickým displejem. Pokud je tento bod naměřen správně, linearita se také nezmění. Pokud se používají jiné měřicí přístroje (bez certifikované kalibrace výrobcem), doporučuje se provádět v pravidelných intervalech konverzi celého rozsahu (dodatek 2).

▼M6

hrdlem vyrobené z polyethylenu o vysoké hustotě nebo podobného materiálu, který se může roztáhnout. Naplňte vzorkovací lahve do výšky asi 1 cm od hrdla, pevně je uzavřete, nejlépe pojistným ventilem (odstavec 12 e)), a umístěte je do izolovaných nádob (odstavec 12 d)), aby se minimalizoval teplotní šok, dokud se nepřemístí do inkubátoru s teplotou udržovanou na 35 °C ± 2 °C. Při otvírání lahví dbejte na to, abyste uvolnili přetlak plynu buď opatrným povolením uzávěru, nebo pomocí trojcestného tlakového ventilu (odstavec 12 e)). Nejlepší je použít kal do několika hodin od odběru, jinak ho uchovávejte při teplotě 35 °C ± 2 °C pod ochrannou vrstvou dusíku po dobu až 3 dnů, kdy obvykle dochází k malé ztrátě aktivity.

Varování – rozkládající kal produkuje hořlavé plyny, které představují riziko požáru a výbuchu: rovněž obsahuje potenciálně patogenní organismy, proto při manipulaci s kalem dodržujte vhodná bezpečnostní opatření. Z bezpečnostních důvodů nepoužívejte pro odběr kalu skleněné nádoby.

Inokulum

16. Bezprostředně před použitím kal opatrně zamíchejte a nechte ho protéci skrz síto s oky o velikosti 1 mm^2 (odstavec 12 f)) do vhodné lahve (odstavec 12 g)) skrz prostor, kterým prochází proud dusíku. Dejte stranou vzorek pro měření koncentrace celkových suchých pevných částic (viz např. norma ISO 11 923 (13) nebo odpovídající norma EU). Obecně používejte neředěný kal. Koncentrace pevných částic se obvykle pohybuje mezi 2 % a 4 % (hmotnost/objem). Zkontrolujte hodnotu pH kalu, a pokud je to nutné, upravte ji na 7 ± 0,5.

Zkušební substrát

17. Rozpusťte 10 g živné půdy (např. Oxoid), 10 g kvasničného extraktu a 10 g D-glukózy v deionizované vodě a nařeďte na objem 100 ml. Sterilizujte pomocí filtrace přes membránový filtr s velikostí pórů 0,2 μm (odstavec 12(h)) a ihned použijte nebo uchovávejte při teplotě 4 °C maximálně 1 den.

Zkoušená chemická látka

18. Připravte si samostatný zásobní roztok každé zkoušené chemické látky rozpustné ve vodě, který bude obsahovat například 10 g/l chemické látky ve vodě zbavené kyslíku (odstavec 14). Použijte vhodné objemy těchto zásobních roztoků k přípravě reakčních směsí obsahujících odstupňované koncentrace. Alternativně si připravte ředicí řadu každého zásobního roztoku tak, aby byl objem přidávaný do každé zkušební nádoby stejný pro každou požadovanou konečnou koncentraci. Hodnota pH zásobních roztoků by se měla v případě potřeby upravit na 7 ± 0,2.

19. U zkoušených chemických látek, které nejsou dostatečně rozpustné ve vodě, nahlédněte do normy ISO 10 634 (12) nebo odpovídající normy EU. Je-li třeba použít organické rozpouštědlo, vyhněte se rozpouštědlům, jako je chloroform a tetrachlormethan, o nichž je známo, že silně inhibují produkci methanu. Ve vhodném těkavém rozpouštědle, například acetonu či diethyletheru, připravte roztok chemické látky nerozpustné ve vodě o příslušné koncentraci. Požadované objemy roztoku rozpouštědla přidejte do prázdných zkušebních nádob (odstavec 12 b)) a před přidáním kalu nechte rozpouštědlo odpařit. Pro jiné způsoby ošetření použijte normu ISO 10 634 (12) nebo odpovídající normu EU, avšak mějte na paměti, že surfaktanty používané k výrobě emulzí mohou působit inhibičně na anaerobní produkci plynů. Pokud se domníváte, že přítomnost organických rozpouštědel a emulzifikátorů vede k nahodilým chybám, měla by se zkoušená chemická látka přidat přímo do zkušební směsi jako prášek nebo tekutina. Těkavé chemické látky a kapalné zkoušené chemické látky nerozpustné ve vodě je možné vstříknout do inokulovaných sérových lahví pomocí mikrostříkaček (odstavec 12(i)).

▼M6

20. Přidejte zkoušené chemické látky do lahví v takových množstvích, abyste získali geometrickou posloupnost koncentrací, např. 500 mg/l, 250 mg/l, 125 mg/l, 62,5 mg/l, 31,2 mg/l a 15,6 mg/l. Není-li znám rozsah toxicity u podobných chemických látek, proveďte nejprve předběžnou orientační zkoušku k nalezení vhodného rozmezí koncentrací, při níž použijete koncentrace 1 000 mg/l, 100 mg/l a 10 mg/l.

Referenční chemická látka

21. Připravte vodný roztok 3,5-dichlorfenolu (10 g/l) postupným přidáváním minimálního množství 5 mol/l roztoku hydroxidu sodného k pevné látce za neustálého třepání, dokud se látka nerozpustí. Poté roztok doplňte ředicí vodou zbavenou kyslíku (odstavec 14) na požadovaný objem; rozpouštění můžete usnadnit pomocí ultrazvukové lázně. Je možné použít jiné referenční chemické látky, pokud u nich bylo zjištěno průměrné rozmezí hodnot EC_{50} v alespoň třech zkouškách s různými inokuly (z různých zdrojů nebo různých časů odběru).

RUŠIVÉ VLIVY / CHYBY

22. Některé složky kalu by mohly pravděpodobně reagovat s potenciálními inhibitory, a činit je tak nedostupnými pro mikroorganismy, což by vedlo k nízké nebo žádné inhibici. Také pokud již kal obsahuje chemickou látku, která působí inhibičně, došlo by k chybným výsledkům, pokud by se tato chemická látka podrobila zkoušce. Kromě těchto možností byla identifikována řada faktorů, které mohou vést k chybným výsledkům. Tyto faktory jsou uvedeny v dodatku 3 spolu s metodami pro vyloučení či alespoň snížení chyb.

POSTUP ZKOUŠKY

23. Počet potřebných opakování závisí na požadovaném stupni přesnosti ukazatelů inhibice. Pokud si uzávěry lahví uchovají dostatečnou plynotěsnost po celou dobu zkoušky, založte pouze jednu sadu (alespoň tři lahve) zkušebních lahví pro každou požadovanou koncentraci. Stejně tak založte jednu sadu lahví s referenční chemickou látkou a jednu sadu kontrol. Pokud jsou však uzávěry lahví spolehlivé jen při jednom nebo při několika málo propíchnutích, založte sadu (např. tří lahví) zkušebních lahví pro každý interval (t), pro který jsou požadovány výsledky, pro všechny koncentrace zkoušené chemické látky, jež se mají testovat. Stejně tak založte sady lahví „t“ pro referenční chemickou látku a pro kontroly.

24. Doporučuje se použít rukavicový box (odstavec 12 j)). Nejméně 30 minut před zahájením zkoušky spusťte proudění plynného dusíku skrz rukavicový box obsahující veškeré nezbytné pomůcky. Ujistěte se, že teplota kalu se během manipulace s lahvemi a uzavírání lahví pohybuje v rozmezí 35 °C ± 2 °C.

Předběžná zkouška

25. Není-li aktivita kalu známa, doporučuje se provést předběžnou zkoušku. Připravte kontroly obsahující pevné částice v koncentraci například 10 g/l, 20 g/l a 40 g/l a substrát, avšak nepřidávejte do nich žádnou zkoušenou chemickou látku. Rovněž použijte různé objemy reakční směsi, abyste získali tři nebo čtyři různé poměry objemu prostoru nad kapalinou k objemu kapaliny v lahvi. Z výsledků objemů plynů vyprodukovaných při různých časových intervalech zvolte nejvhodnější podmínky, které umožní dvě měření denně a vedou k produkci významného objemu plynu a rovněž umožní každodenní uvolnění tlaku při optimální citlivosti ([1]) bez nebezpečí výbuchu.

Přidání zkoušených chemických látek

26. Ve vodě rozpustné zkoušené chemické látky přidejte do prázdných zkušebních nádob (odstavec 12 b)) ve formě vodných roztoků (odstavec 18). Pro každou koncentraci z daného rozmezí použijte sadu alespoň tří lahví (odstavec 20). V případě nerozpustných a špatně rozpustných zkoušených

([1]) To se týká experimentálního uspořádání a experimentálních podmínek, kdy lze objem vyprodukovaného plynu – ze slepých kontrol a z nádob vykazujících 70–80 % inhibici – odhadnout s přijatelnou statistickou chybou.

▼M6

chemických látek vstříkněte roztoky těchto látek v organických rozpouštědlech pomocí mikrostříkačky do prázdných nádob, abyste získali sady opakování pro každou z pěti koncentrací zkoušené chemické látky. Rozpouštědlo odpařte vedením proudu plynného dusíku po povrchu roztoků ve zkušebních lahvích. Nerozpustné pevné chemické látky můžete přidat do zkušebních nádob také přímo jako odvážená množství pevné látky.

27. Pokud se nerozpustné a ve vodě špatně rozpustné tekuté zkoušené chemické látky nepřidávají pomocí rozpouštědla, přidejte je do zkušebních nádob přímo pomocí mikrostříkačky po přidání inokula a zkušebního substrátu (viz odstavec 30). Stejným způsobem lze přidat těkavé zkoušené chemické látky.

Přidání inokula a substrátu

28. Míchejte vhodný objem procezeného rozkládajícího kalu (viz odstavec 16) v 5litrové lahvi (odstavec 12 g)) za současného proudění plynného dusíku prostorem nad kapalinou v lahvi. Promývejte zkušební lahve obsahující vodný roztok zkoušené chemické látky nebo roztok zkoušené chemické látky s odpařeným rozpouštědlem proudem plynného dusíku po dobu asi dvou minut, abyste odstranili vzduch. Rozdělte alikvotní díly, např. objemy 100 ml, dobře promíchaného kalu do zkušebních nádob pomocí pipety s dlouhou špičkou nebo odměrného válce. Je nezbytné naplnit pipetu přesným objemem požadovaného kalu v jediném kroku, protože pevné částice kalu se snadno usazují. Pokud naberete více, vyprázdněte pipetu a začněte znovu.

29. Poté za stálého promývání dusíkem přidejte dostatečné množství roztoku substrátu (odstavec 17), abyste dosáhli koncentrace 2 g/l jak živné půdy, tak kvasničného extraktu a D-glukózy ve směsi. Níže je uveden příklad pro zkušební sady.

Konečná hmotnostní koncentrace zkoušené chemické látky ve zkušebních lahvích (mg/l)	Objem zkoušené chemické látky (ml)		Činidla a média (ml)		
	Zásobní roztok a) 10 g/l odst. 18	Zásobní roztok b) 1 g/l odst. 18	Ředicí voda odst. 14	Inokulum odst. 16	Substrát odst. 17
0	—	0	1,0	100	2
1	—	0,1	0,9	100	2
3,3	—	0,33	0,67	100	2
10	0,1	—	0,9	100	2
33	0,33	—	0,67	100	2
100	1,0	—	0	100	2

Celkový objem lahve = 160 ml. Objem kapaliny = 103 ml
Objem plynu = 57 ml nebo 35,6 % celkového objemu.

30. Obdobně dostatečně promyjte plynným dusíkem prázdné zkušební nádoby pro manipulaci s těkavou nebo nerozpustnou tekutou zkoušenou chemickou látkou (viz odstavec 27).

▼M6

Kontroly a referenční chemická látka

31. Připravte sady lahví alespoň po třech kusech, které obsahují pouze kal a substrát a budou sloužit jako kontroly. Připravte další lahve pro opakování obsahující kal a substrát a dostatečné množství zásobního roztoku referenční chemické látky 3,5-dichlorfenolu (odstavec 21) vedoucí k výsledné koncentraci 150 mg/l. Tato koncentrace by měla inhibovat produkci plynů asi o 50 %. Alternativně vytvořte řadu koncentrací referenční chemické látky. Kromě toho připravte navíc čtyři lahve na měření pH, které obsahují kal, vodu zbavenou kyslíku a substrát. Do dvou lahví přidejte zkoušenou chemickou látku v nejvyšší zkoušené koncentraci a do zbývajících dvou lahví vodu zbavenou kyslíku.

32. Ujistěte se, že všechny lahve – se zkoušenou a referenční chemickou látkou a kontroly – obsahují stejný objem (V_R) kapaliny. Pokud je to třeba, doplňte na požadovaný objem deionizovanou vodou zbavenou kyslíku (odstavec 14). Objem prostoru nad kapalinou v lahvi by se měl nacházet v rozmezí 10 % až 40 % objemu lahve, přičemž skutečný objem se vybere na základě údajů získaných při předběžné zkoušce. Po přidání všech složek do lahví odstraňte jehlu přivádějící plyn a uzavřete každou z lahví pryžovou zátkou a hliníkovou zátkou (odstavec 12 b)), přičemž zátku navlhčete kapkou deionizované vody pro usnadnění jejího zavedení. Promíchejte obsah každé lahve protřepáním.

Inkubace lahví

33. Přemístěte lahve do inkubátoru s termostatem, pokud možno vybaveného třepačkou, s teplotou udržovanou na hodnotě 35 °C ± 2 °C. Lahve se inkubují ve tmě. Po uplynutí asi 1 hodiny vyrovnejte tlak v lahvích na atmosférický tlak zavedením injekční jehly připojené k tlakoměru (odstavec 12 c)) skrz zátku každé lahve, otevřete ventil a počkejte, dokud hodnota tlaku naměřená tlakoměrem neklesne na nulu. Nakonec ventil zavřete. Jehla by se měla zavádět pod úhlem 45°, aby se zabránilo úniku plynu z lahví. Pokud se lahve inkubují bez třepačky, protřepejte je manuálně dvakrát denně každý den během celého inkubačního období, aby systém dosáhl rovnováhy. Lahve inkubujte a obraťte je dnem vzhůru, aby se zabránilo úniku plynu skrz septum. Obrácení však není vhodné v případě nerozpustných zkoušených chemických látek, které mohou přilnout ke dnu lahve.

Měření tlaku

34. Když lahve dosáhnou teploty 35 °C ± 2 °C, změřte a zaznamenejte pH obsahu dvou ze čtyř lahví připravených pro tento účel a obsah zlikvidujte. Zbývající lahve dále inkubujte ve tmě. Během následujících 48 až 72 hodin měřte a zaznamenávejte tlak v lahvích dvakrát denně, a sice zavedením jehly tlakoměru skrz zátku do každé lahve (postupně). Jehlu mezi jednotlivými měřeními osušte. Při měření udržujte všechny části lahve při inkubační teplotě a proveďte měření co možná nejrychleji. Nechte hodnotu tlaku zobrazenou na tlakoměru, aby se ustálila, a zaznamenejte ji. Poté otevřete ventil pro ventilaci, a když tlak klesne na nulu, zavřete ho. Ve zkoušce pokračujte obvykle po dobu 48 hodin od doby prvního vyrovnání tlaku, která se označuje jako „čas 0“. Počet měření a ventilací by se měl u těkavých chemických látek omezit na jedno (na konci inkubace) či dvě, aby se minimalizovaly ztráty zkoušené chemické látky (10).

35. Pokud se na tlakoměru zobrazí záporná hodnota tlaku, ventil neotvírejte. Někdy se v injekční jehle a trubici nahromadí vlhkost, o čemž svědčí malá záporná hodnota tlaku zobrazená na tlakoměru. V takovém případě jehlu odstraňte, protřepejte trubici, osušte papírovou utěrkou a připojte novou jehlu.

Měření pH

36. Po posledním měření tlaku změřte a zaznamenejte pH obsahu každé lahve.

▼M6

ÚDAJE A PŘEDKLÁDÁNÍ ZPRÁV

Vyjádření výsledků

37. Vypočítejte součet a průměr zaznamenaných tlaků v každém časovém intervalu pro každou sadu opakování (lahví) a vypočítejte střední kumulativní úhrnný tlak plynu pro každý časový interval pro každou sadu opakování. Střední kumulativní produkci plynu (Pa) v kontrolních, zkušebních a referenčních lahvích vyneste do grafu jako funkci času. V lineární části vynesené křivky zvolte čas, obvykle 48 hodin, a vypočítejte procento inhibice (I) pro každou koncentraci z rovnice [1]:

$$I = (1 - P_t/P_C) \times 100 \quad [1],$$

kde

I = procento inhibice v %;

P_t = tlak plynu vyprodukovaného zkoušeným materiálem ve vybranou dobu v Pascalech (Pa);

P_t = tlak plynu vyprodukovaného kontrolou ve stejnou dobu v Pascalech (Pa);

Je vhodné sestrojit oba grafy, tj. vynést inhibici (I) jako funkci koncentrace a rovněž logaritmu koncentrace, aby bylo možné zvolit křivku, která se více blíží linearitě. Z křivky, která se více blíží linearitě, stanovte hodnotu EC_{50} (mg/l) vizuálně nebo regresní analýzou. Pro účely srovnání může být užitečnější vyjádřit koncentraci chemické látky v mg chemické látky na g celkové suché hmotnosti pevných částic. K získání této koncentrace vydělte objemovou koncentraci (mg/l) chemické látky objemovou koncentrací pevných částic kalu (g/l) (odstavec 16).

38. Vypočítejte buď procento inhibice dosažené použitím jediné koncentrace referenční chemické látky, nebo EC_{50}, pokud byl zkoumán dostatečný počet koncentrací.

39. Přepočítejte střední tlak plynu vyprodukovaného v kontrole P_c (Pa) na objem pomocí vztahu ke kalibrační křivce tlakoměru (dodatek 2) a z této hodnoty vypočítejte výtěžek plynu, vyjádřený jako objem vyprodukovaný za 48 hodin ze 100 ml neředěného kalu při koncentraci pevných částic 2 % (20 g/l) až 4 % (40 g/l).

Kritéria platnosti

40. Výsledky z mezilaboratorního hodnocení ISO (5) ukázaly, že referenční chemická látka (3,5-dichlorfenol) způsobila 50 % inhibici produkce plynu v rozmezí koncentrací od 32 mg/l do 510 mg/l, se střední hodnotou 153 mg/l (odstavec 10). Tento interval je tak velký, že pevné meze inhibice nelze spolehlivě nastavit jako kritéria platnosti. Mělo by to být možné, pokud další vývoj povede k produkci více konzistentních inokul. Hodnoty objemu plynu vyprodukovaného v kontrolních lahvích za 48 hodin se pohybovaly od 21 ml/g sušiny kalu do 149 ml/g (střední hodnota 72 ml/g). Mezi objemem vyprodukovaného plynu a odpovídající hodnotou EC_{50} nebyl žádný zjevný vztah. Konečná hodnota pH se pohybovala mezi 6,1 a 7,5.

41. Zkouška se považuje za platnou, když se v referenční kontrole obsahující 150 mg/l 3,5-dichlorfenolu dosáhne inhibice vyšší než 20 %, ve slepé kontrole se vyprodukuje více než 50 ml plynu na g sušiny a hodnota pH se na konci zkoušky pohybuje v rozmezí od 6,2 do 7,5.

Závěrečná zpráva

42. Závěrečná zpráva musí obsahovat tyto údaje:

Zkoušená chemická látka

— obecný název, chemický název, číslo CAS, strukturní vzorec a relevantní fyzikálně-chemické vlastnosti,

▼M6

— čistota zkoušené látky (obsah nečistot).

Zkušební podmínky

— objemy kapaliny ve zkušebních nádobách a prostoru nad ní,

— popis zkušebních nádob a měření plynu (např. typ tlakoměru),

— aplikace zkoušené chemické látky a referenční chemické látky na zkušební systém, použité zkušební koncentrace a použití jakýchkoli rozpouštědel,

— podrobné údaje o použitém inokulu: jméno čistírny odpadních vod, popis zdroje čištěné odpadní vody (např. provozní teplota, doba retence kalu, převážně domácí odpadní vody nebo průmyslový odpad atd.), koncentrace pevných částic, produkce plynů v anaerobní vyhnívací nádrži, předchozí expozice či možná předběžná adaptace na toxické chemické látky nebo místo odběru bahna, sedimentu atd.,

— inkubační teplota a rozmezí,

— počet opakování.

Výsledky

— hodnoty pH na konci zkoušky,

— všechna data naměřená v nádobách se zkoušenou chemickou látkou, referenční chemickou látkou a slepou kontrolou, podle potřeby (např. tlak v Pa nebo milibarech) v tabulkové formě,

— procento inhibice v lahvích se zkoušenou a referenční chemickou látkou a křivky závislosti inhibice na koncentraci,

— vypočítané hodnoty EC_{50} vyjádřené v mg/l a mg/g,

— produkce plynu na jeden gram kalu za 48 hodin,

— odůvodnění případného odmítnutí výsledků zkoušky,

— diskuze výsledků, včetně jakýchkoli odchylek od postupů této zkušební metody a diskuze jakýchkoli odchylek ve výsledcích zkoušky způsobených rušivými vlivy a chybami od toho, co by se očekávalo,

— rovněž uveďte, zda bylo cílem zkoušky měřit toxicitu vůči předem exponovaným, nebo předem neexponovaným mikroorganismům.

LITERATURA

1) Kapitola C.11 této přílohy: Zkouška inhibice respirace aktivovaného kalu.

2) Kapitola C.43 této přílohy: Anaerobní biologická rozložitelnost organických sloučenin ve vyhnilém kalu: metoda měřením produkce plynů.

3) International Organisation for Standardisation (2003) ISO 13 641-1 Water Quality – Determination of inhibition of gas production of anaerobic bacteria – Part 1: General Test.

4) International Organisation for Standardisation (2003) ISO 13 641-2 Water Quality – Determination of inhibition of gas production of anaerobic bacteria – Part 2: Test for low biomass concentrations.

5) ISO (2000) Ring test of ISO 13 641-1 and ISO 13 641-2. Determination of inhibition of activity of anaerobic bacteria. BL 6958/A. Evans MR, Painter HA. Brixham Environmental Laboratory, AstraZeneca UK Ltd., Brixham, TQ5 8BA UK.

▼**M6**

6) Swanwick JD, Foulkes M (1971). Inhibition of anaerobic digestion of sewage sludge by chlorinated hydrocarbons. Wat. Control Fed. Control, 70, 58-70.

7) HMSO (1986) Determination of the inhibitory effects of chemicals and waste waters on the anaerobic digestion of sewage sludge. ISBN 0 117519 43 X, In: Methods for the Examination of Waters and Associated Materials UK.

8) Shelton DR, Tiedje JM (1984). General method for determining anaerobic biodegradation potential. Environ. Env. Microbiol. 47, 850-857.

9) Battersby NS and Wilson V (1988). Evaluation of a serum bottle technique for assessing the anaerobic biodegradability of organic compounds under methanogenic conditions. Chemosphere 17, 2441-2460.

10) Wilson V, Painter HA and Battersby NS (1992). A screening method for assessing the inhibition of the anaerobic gas production from sewage sludge. Ind. Int. Symp. on Ecotoxicology. Ecotoxicological Relevance of Test Methods, GSF Forschungzentrum, Neuherberg, Germany (1990). Eds. Steinberg C and Kettrup A, pp 117-132 (1992).

11) Kawahara K, Yakabe Y, Chida T, and Kida K (1999). Evaluation of laboratory-made sludge for an anaerobic biodegradability test and its use for assessment of 13 chemicals. Chemosphere, 39 (12), 2007-2018.

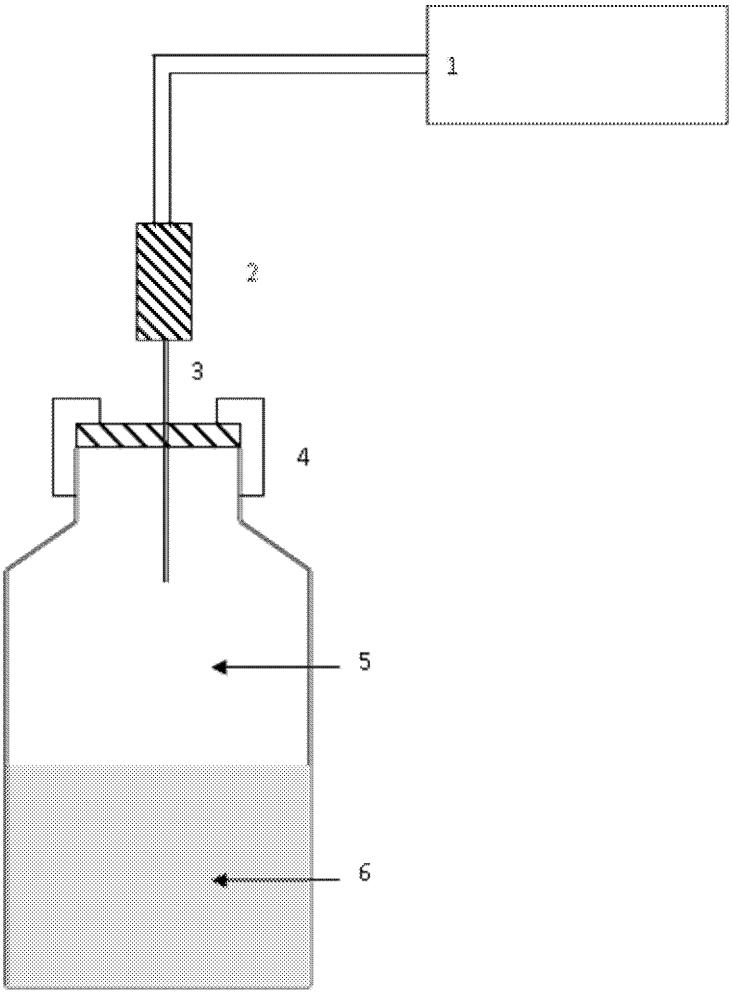
12) International Organization for Standardization (1995) ISO 10 634 Water Quality – Guidance for the preparation and treatment of poorly water-soluble organic compounds for the subsequent evaluation of their biodegradability in an aqueous medium.

13) International Organization for Standardization (1997) ISO 11 923 Water Quality – Determination of suspended solids by filtration through glass-fibre filters.

▼**M6**

Dodatek 1

Příklad přístroje k měření produkce bioplynu pomocí tlaku plynu



Poznámky:

1 – Tlakoměr

2 – Trojcestný plynotěsný ventil

3 – Injekční jehla

4 – Plynotěsný uzávěr (krimpované víčko a septum)

5 – Prostor nad kapalinou v lahvi

6 – Inokulum rozkládajícího kalu

Zkušební nádoby v prostředí o teplotě 35 °C ± 2 °C

▼M6

Dodatek 2

Převod hodnot naměřených tlakoměrem

Hodnoty naměřené tlakoměrem lze převést na objemy plynu pomocí standardní křivky a z nich lze vypočítat objem plynu vyprodukovaný na jeden gram suchého kalu za 48 hodin. Tento index aktivity se používá jako jedno z kritérií pro hodnocení platnosti výsledků zkoušky. Kalibrační křivka se získá vstříknutím známých objemů plynu při teplotě 35 °C ± 2 °C do sérových lahví obsahujících objem vody odpovídající objemu reakční směsi V_R.

— Rozdělte alikvotní díly vody o objemu V_R ml udržované při teplotě 35 °C ± 2 °C do pěti sérových lahví. Lahve uzavřete a umístěte je do vodní lázně o teplotě 35 °C ± 2 °C a nechte 1 hodinu, aby systém dosáhl rovnováhy.

— Zapněte tlakoměr, počkejte, až se ustálí a nastavte ho na nulu.

— Zaveďte injekční jehlu skrz uzávěr jedné z lahví, otevřete ventil, počkejte, dokud se na tlakoměru neobjeví nula, a potom ventil zavřete.

— Zopakujte tento postup se zbývajícími lahvemi.

— Vstříkněte do každé lahve 1 ml vzduchu při teplotě 35 °C ± 2 °C. Zaveďte jehlu (tlakoměru) skrz uzávěr jedné z lahví a počkejte, dokud se naměřená hodnota tlaku neustálí. Tlak zaznamenejte, otevřete ventil, počkejte, dokud se na tlakoměru nezobrazí nula, a potom ventil zavřete.

— Zopakujte tento postup se zbývajícími lahvemi.

— Zopakujte celý postup se 2 ml, 3 ml, 4 ml, 5 ml, 6 ml, 8 ml, 10 ml, 12 ml, 16 ml, 20 ml, a 50 ml vzduchu.

— Vyneste do grafu převodní křivku tlaku (Pa) jako funkci vstříknutého objemu plynu (ml). Odezva přístroje je lineární v rozmezí 0 Pa až 70 000 Pa a 0 ml až 50 ml vyprodukovaného plynu.

▼M6

Dodatek 3

Zjištěné faktory, které mohou vést k chybným výsledkům

a) *Kvalita uzávěrů lahví*

Existují různé druhy komerčně dostupných sept pro sérové lahve. Mnoho z nich, včetně sept z butylové pryže, ztrácí těsnost při propíchnutí jehlou za podmínek této zkoušky. Někdy tlak po propíchnutí septa injekční jehlou klesá velmi pomalu. Doporučuje se používat plynotěsná septa, aby se zamezilo únikům plynu (odstavec 12 b)).

b) *Vlhkost v injekční jehle*

Někdy se v injekční jehle a trubici nahromadí vlhkost, o čemž svědčí malá záporná hodnota tlaku zobrazená na tlakoměru. K nápravě této situace jehlu odstraňte, protřepejte trubici, osušte papírovou utěrkou a připojte novou jehlu (odstavce 12 c) a 35).

c) *Kontaminace kyslíkem*

Anaerobní metody vykazující chybu v důsledku kontaminace kyslíkem, který může způsobit nižší produkci plynu. V této metodě by se měla tato možnost minimalizovat použitím přísně anaerobních technik, včetně použití rukavicového boxu.

d) *Hrubé částice substrátu v kalu*

Anaerobní produkce plynu a citlivost kalu jsou ovlivněny substráty, které jsou do zkušebních lahví přeneseny spolu s inokulem. Rozkládající kal z domácích anaerobních vyhnívacích nádrží často ještě obsahuje rozeznatelný materiál, jako jsou vlasy a celulózové rostlinné zbytky, který znesnadňuje odběr reprezentativních vzorků. Procezením lze hrubý nerozpustný materiál z kalu odstranit, a zvýšit tak pravděpodobnost odběru reprezentativních vzorků (odstavec 16).

e) *Těkavé zkoušené chemické látky*

Těkavé zkoušené chemické látky se budou uvolňovat do prostoru nad kapalinou ve zkušebních lahvích. Tato skutečnost může vést ke ztrátě části zkoušeného materiálu ze systému během ventilace po měřeních tlaku a k získání falešně vysokých hodnot EC_{50}. Tuto chybu lze snížit volbou vhodného poměru objemu prostoru nad kapalinou vůči objemu kapaliny a neprováděním ventilace po měřeních tlaku (10).

f) *Nelinearita produkce plynu*

Pokud graf střední kumulativní produkce plynu jako funkce doby inkubace nemá přibližně lineární průběh v intervalu 48 hodin, může se přesnost zkoušky snížit. Odstranění tohoto nedostatku lze docílit použitím rozkládajícího kalu z jiného zdroje a/nebo přidáním zvýšené koncentrace zkušebního substrátu – živné půdy, kvasničného extraktu a glukózy (odstavec 29).

▼M6

Dodatek 4

Použití na environmentální vzorky s nízkou koncentrací biomasy – anaerobní bahna, sedimenty atd.

ÚVOD

A.1 Obecně platí, že specifická mikrobiální aktivita (objem plynu vyprodukovaného na gram sušiny) přirozeně se vyskytujících anaerobních bahen, sedimentů, půd atd. je mnohem nižší než aktivita anaerobního kalu získaného z odpadních vod. Proto je třeba změnit některé experimentální podmínky, pokud se mají měřit inhibiční účinky chemických látek na tyto méně aktivní vzorky. U těchto méně aktivních vzorků jsou možné dva obecné způsoby provedení zkoušky:

a) provést modifikovanou předběžnou zkoušku (odstavec 25) s neředěným vzorkem bahna, půdy atd. při teplotě 35 °C ± 2 °C nebo při teplotě místa odběru vzorku, chceme-li dosáhnout přesnější simulace (stejně jako v části 1 normy ISO 13 641);

b) nebo provést zkoušku s ředěným vzorkem (1:100) kalu z vyhnívací nádrže za účelem simulace nízké aktivity očekávané u vzorku prostředí, avšak při teplotě udržované na 35 °C ± 2 °C (stejně jako v části 2 normy ISO 13 641).

A.2 Možnost a) lze provést podle zde popsané metody (odpovídající části 1 normy ISO 13 641), avšak je třeba provést předběžnou zkoušku (odstavec 25) ke zjištění optimálních podmínek, pokud již nejsou známy z předchozích zkoušek. Vzorek bahna nebo sedimentu by se měl důkladně promíchat, např. v míchačce, a je-li to nutné, naředit malým množstvím odvzdušněné vody (odstavec 14), aby byl dostatečně tekutý pro přenos pipetou s dlouhou špičkou nebo odměrným válcem. Pokud se má za to, že ve vzorku mohou chybět živiny, je možné vzorek bahna odstředit (za anaerobních podmínek) a resuspendovat v minerálním médiu obsahujícím kvasničný extrakt (A.11).

A.3 Možnost b). Tato možnost přiměřeně napodobuje nízkou aktivitu environmentálních vzorků, avšak chybí při ní vysoká koncentrace suspendovaných pevných částic přítomných v těchto vzorcích. Úloha těchto pevných částic při inhibici není známa, avšak je možné, že by reakce mezi zkoušenými chemickými látkami a složkami bahna a rovněž adsorpce zkoušených chemických látek na pevné částice mohly vést ke snížení toxicity zkoušené chemické látky.

A.4 Teplota je dalším důležitým faktorem: k dosažení přesné simulace by se měly zkoušky provádět při teplotě místa odběru vzorku, protože je známo, že různé skupiny bakteriálních společenstev produkujících methan jsou aktivní při různých teplotních rozmezích, a sice termofilové při teplotě ~30–35 °C, mezofilové při 20–25 °C, a psychrofilové při < 20 °C, což může vést k různým inhibičním vzorcům.

A.5 Doba trvání. V obecné zkoušce, části 1, používající neředěný kal, byla produkce plynu za 2–4 dny vždy dostatečná, zatímco v části 2 se stokrát ředěným kalem bylo za toto období v okružním testu vyprodukováno nedostatečné či žádné množství plynu. Madsen et al. (1996) při popisu této druhé zkoušky uvádí, že je třeba vyčkat alespoň 7 dní.

Zkouška při nízké koncentraci biomasy (možnost b)

Měly by se provést následující změny a úpravy, které přidávají či nahrazují některé stávající odstavce a pododstavce hlavního textu.

▼**M6**

A.6 V odstavci 6 se doplňuje: Podstata zkoušky;

„Tato technika se může použít s anaerobním kalem naředěným 1:100, částečně proto, aby se simulovala nízká aktivita bahen a sedimentů. Inkubační teplota může být buď 35 °C, nebo odpovídat teplotě místa, z něhož byl vzorek odebrán. Protože bakteriální aktivita je mnohem nižší než v neředěném kalu, měla by se inkubační doba prodloužit alespoň na 7 dní.“

A.7 V odstavci 12 a) se doplňuje:

„inkubátor by měl být schopen provozu při teplotách klesajících až k 15 °C.“

A.8 Za odstavec 13 se přidává další činidlo:

„kyselina fosforečná (H_3PO_4), 85 % (hmot.) vodný roztok.“

A.9 Na konec odstavce 16 se doplňuje:

„Ve zkoušce použijte konečnou koncentraci 0,20 ± 0,05 g/l celkové sušiny.“

A.10 Odstavec 17 Zkušební substrát:

Tento substrát se nepoužívá, nýbrž se nahrazuje kvasničným extraktem (viz odstavce 17, A.11, A.12. A.13).

A.11 K naředění anaerobního kalu je třeba minerální médium obsahující stopové prvky a pro usnadnění se k tomuto médiu přidá organický substrát, jímž je kvasničný extrakt.

Za odstavec 17 se vkládá nový odstavec, který zní

„a) Zkušební minerální médium s kvasničným extraktem.

Připraví se z 10násobně koncentrovaného zkušebního média (odstavec 17 b); A.12) s roztokem stopových prvků (odstavec 17 c); A.13). Použijte čerstvě dodaný nonahydrát sulfidu sodného (odstavec 17 b); A.12) nebo ho před použitím namočte a vysušte, aby bylo zajištěno, že má dostatečnou redukční kapacitu. Pokud se zkouška provádí bez použití rukavicového boxu (odstavec 12 j)), měla by se koncentrace sulfidu sodného v zásobním roztoku zvýšit na 2 g/l (z 1 g/l). Sulfid sodný lze rovněž z vhodného zásobního roztoku přidat skrz septum uzavřených zkušebních lahví (neboť tento postup snižuje riziko oxidace) k dosažení konečné koncentrace 0,2 g/l. Alternativně je možné použít citrát titanitý (odstavec 17 b)). Přidejte ho skrz septum uzavřených zkušebních lahví, abyste získali koncentraci 0,8 mmol/l až 1,0 mmol/l. Citrát titanitý je vysoce účinné redukční činidlo o nízké toxicitě, které se připravuje tímto způsobem: Rozpusťte 2,94 g citrátu sodného dihydrátu v 50 ml ředicí vody zbavené kyslíku (odstavec 14) (vznikne roztok 200 mmol/l) a přidejte 5 ml roztoku chloridu titanitého (15 g/100 ml vody). Roztok pomocí uhličitanu sodného neutralizujte na pH 7 ± 0,5 a přelijte do vhodné sérové lahve pod proudem plynného dusíku. Koncentrace citrátu titanitého v tomto zásobním roztoku je 164 mmol/l. Zkušební médium ihned použijte, nebo ho uchovávejte při teplotě 4 °C maximálně po dobu 1 dne.

A.12 b) Desetinásobně koncentrované zkušební médium připravené z těchto látek:

bezvodý dihydrogenfosforečnan draselný (KH_2PO_4)	2,7 g
hydrogenfosforečnan sodný (Na_2HPO_4)	4,4 g
(nebo 11,2 g dodekahydrátu)	5,3 g
chlorid amonný (NH_4Cl)	

▼**M6**

dihydrát chloridu vápenatého ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$)	0,75 g
hexahydrát chloridu manganatého ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$)	1,0 g
tetrahydrát chloridu železnatého ($FeCl_2 \cdot 4H_2O$)	0,2 g
resazurin (redoxní indikátor)	0,01 g
nonahydrát sulfidu sodného ($Na_2S \cdot 9H_2O$)	1,0 g
(nebo citrát titanitý) konečná koncentrace	0,8 mmol/l až 1,0 mmol/l
roztok stopových prvků (viz odstavec 17 c); A.13)	10,0 ml
kvasničný extrakt	100 g
Rozpusťte v ředicí vodě (odstavec 14) a doplňte na objem:	1 000 ml

A.13 c) Roztok stopových prvků připravený z těchto látek:

tetrahydrát chloridu manganatého ($MnCl_2 \cdot 4H_2O$)	0,5 g
kyselina orthoboritá (H_3BO_3)	0,05 g
chlorid zinečnatý ($ZnCl_2$)	0,05 g
chlorid měďnatý ($CuCl_2$)	0,03 g
dihydrát molybdenanu sodného ($Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$)	0,01 g
hexahydrát chloridu kobaltnatého ($CoCl_2 \cdot 6H_2O$)	1,0 g
hexahydrát chloridu nikelnatého ($NiCl_2 \cdot 6H_2O$)	0,1 g
seleničitan sodný (Na_2SeO_3)	0,05 g
Rozpusťte v ředicí vodě (odstavec 14) a doplňte na objem:	1 000 ml“

A.14 Odstavec 25: Předběžná zkouška

Je nezbytné provést předběžnou zkoušku způsobem popsaným v odstavci 24 s tím rozdílem, že koncentrace pevných částic v kalu by měla být stokrát nižší, to jest 0,1 g/l, 0,2 g/l a 0,4 g/l. Inkubace by měla trvat alespoň 7 dní.

Poznámka: V okružním testu (5) byl objem prostoru nad kapalinou příliš vysoký, činil 75 % celkového objemu; měl by se pohybovat v doporučeném rozmezí 10 %–40 %. Příslušným kritériem je skutečnost, že objem vyprodukovaného plynu při přibližně 80 % inhibici by měl být měřitelný s přijatelnou přesností (např. ± 5 % až ± 10 %).

A.15 Odstavce 26 až 30: Přidání zkoušené chemické látky, inokula a substrátu.

Přidání se provede stejným způsobem, jaký je popsán v těchto odstavcích, avšak roztok substrátu (odstavec 17) se nahradí zkušebním médiem s kvasničným extraktem (A.11).

Rovněž konečná koncentrace pevných částic v kalu se sníží z 2 g/l–4 g/l na 0,2 ± 0,05 g/l (A.9). V tabulce A.1 jsou uvedeny dva příklady přidání složek do zkušební směsi. Tato tabulka nahrazuje tabulku v odstavci 29.

A.16 Odstavec 33: Inkubace lahví

Protože se očekává snížená rychlost produkce plynu, provádí se inkubace po dobu alespoň 7 dní.

▼**M6**

A.17 Odstavec 34: Měření tlaku

Pokud je třeba zjistit objem plynné fáze, použije se pro měření tlaku v prostoru nad kapalinou v lahvích stejný postup, jaký je popsaný v odstavci 34. Pokud se mají měřit celková množství CO_2 a CH_4, sníží se pH kapalné fáze na cca pH 2 vstříknutím H_3PO_4 do každé příslušné lahve a tlak se změří po 30 minutách třepání při zkušební teplotě. Více informací o kvalitě inokula však lze získat měřením tlaku v každé lahvi před okyselením a po něm. Pokud je například rychlost produkce CO_2 mnohem vyšší než rychlost produkce methanu, může být citlivost fermentačních baktérií pozměněna a/nebo budou zkoušenou chemickou látkou přednostně ovlivněny methanogenní baktérie.

A.18 Odstavec 36; měření pH

Pokud se má použít H_3PO_4, bude třeba připravit několik dalších lahví, do nichž se nepřidá žádná H_3PO_4, zejména pro měření pH.

LITERATURA:

Madsen, T, Rasmussen, HB; and Nilsson, L (1996), Methods for screening anaerobic biodegradability and toxicity of organic chemicals. Project No.336, Water Quality Institute, Danish Environment Protection Agency, Copenhagen.

Tabulka A.1

Příklady uspořádání zkušebních sad ve zkoušce

Složky reakční směsi	Příklad 1	Příklad 2	Normální pořadí přidání
Koncentrace připraveného inokula (g/l)	0,42	2,1	—
Objem přidaného inokula (ml)	45	9	4
Koncentrace inokula ve zkušebních lahvích (g/l)	0,20	0,20	—
Objem přidaného zkušebního média (ml)	9	9	2
Objem přidané ředicí vody (ml)	36	72	3
Koncentrace kvasničného extraktu ve zkušebních lahvích (g/l)	9,7	9,7	—
Objem zásobního roztoku zkoušené chemické látky (ml)	3	3	1
Celkový objem kapaliny (ml)	93	93	—

▼**M6**

Dodatek 5

Definice

Pro účely této zkušební metody se použijí tyto definice:

Chemickou látkou se rozumí látka nebo směs.

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

▼M6

C.35. ZKOUŠKA TOXICITY PRO ROD *LUMBRICULUS* V SYSTÉMU SEDIMENT-VODA ZA POUŽITÍ SEDIMENTU SE ZNÁMÝM PŘÍDAVKEM ZKOUŠENÉ CHEMICKÉ LÁTKY

ÚVOD

1. Tato zkušební metoda je rovnocenná Pokynu OECD pro zkoušení 225 (2007). Endobentické organismy živící se sedimentem podléhají potenciálně vysoké expozici chemickým látkám vázaným na sediment, a proto je třeba jim věnovat přednostní pozornost, např. (1, 2, 3). Mezi těmito organismy živícími se sedimentem hrají vodní máloštětinatci (Oligochaeta) důležitou roli v sedimentech vodních systémů. Bioturbací sedimentu a tím, že slouží jako kořist, mohou mít tito živočichové velký vliv na biologickou dostupnost těchto chemických látek pro ostatní organismy, např. bentivorní ryby. Na rozdíl od epibentických organismů se endobentičtí vodní máloštětinatci (např. *Lumbriculus variegatus*) zavrtávají do sedimentu a požívají částice sedimentu, které se nacházejí pod povrchem sedimentu. Tím je zajištěna expozice zkušebních organismů zkoušené chemické látce všemi možnými cestami příjmu (např. kontaktem s kontaminovanými částicemi sedimentu a jejich požitím, ale také prostřednictvím kapilární vody a vody nad sedimentem).

2. Tato zkušební metoda je určena k zhodnocení účinků dlouhodobé expozice endobentického máloštětinatce žížalice pestré (*Lumbriculus variegatus*; Müller) chemickým látkám vázaným na sediment. Vychází ze stávajících závěrečných zpráv zkoušek toxicity sedimentu a bioakumulace, např. (3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10). Metoda je popsána pro statické zkušební podmínky. Scénář expozice užitý při této zkušební metodě spočívá v přidání známého množství zkoušené chemické látky do sedimentu (spiking). Použití sedimentu se známým přídavkem chemické látky (spiked sediment) má simulovat sediment kontaminovaný zkoušenou chemickou látkou.

3. Chemické látky, které je třeba testovat z hlediska organismů žijících v sedimentu, v této složce obvykle přetrvávají po dlouhá časová období. Organismy žijící v sedimentu mohou být chemické látce vystaveny několika cestami. Relativní význam jednotlivých cest, jimiž dochází k expozici, a doba nezbytná k tomu, aby každá z nich přispěla k celkovým toxickým účinkům, závisí na fyzikálně chemických vlastnostech dotčené chemické látky a jejím konečném osudu v daném organismu. V případě silně adsorbujících chemických látek (např. log K_{ow} > 5) nebo chemických látek s kovalentní vazbou na sediment může být významnou cestou expozice požití kontaminované potravy. Aby nedošlo k podcenění toxicity takových chemických látek, přidá se potrava nezbytná pro reprodukci a růst zkušebních organismů do sedimentu před aplikací zkoušené chemické látky (11). Popisovaná zkušební metoda je dostatečně podrobná, aby bylo možné zkoušku provést, a zároveň umožňuje přizpůsobení experimentálního uspořádání podmínkám v příslušné laboratoři a rozličným vlastnostem zkoušených chemických látek.

4. Zkušební metoda má za cíl stanovit účinky zkoušené chemické látky na reprodukci a biomasu zkušebních organismů. Měřenými biologickými parametry jsou celkový počet přeživších jedinců a biomasa (hmotnost sušiny) na konci expozice. Tyto údaje se analyzují buď pomocí regresního modelu, který slouží k odhadnutí koncentrace, jež by vyvolala x % účinek (např. EC_{50}, EC_{25} a EC_{10}), nebo použitím testování statistické hypotézy ke stanovení koncentrace bez pozorovaných účinků (NOEC) a nejnižší koncentrace s pozorovaným účinkem (LOEC).

5. Kapitola C.27 této přílohy „Zkouška toxicity pro chironomidy v systému sediment-voda za použití sedimentu se známým přídavkem zkoušené chemické látky“ (6) poskytuje mnoho podstatných a užitečných podrobných údajů pro provádění zde uváděné zkušební metody toxicity sedimentu.

▼M6

Tento dokument tedy sloužil jako základ, na němž se vypracovaly úpravy pro provádění zkoušek toxicity sedimentu s *Lumbriculus variegatus*. Další dokumenty, na něž se odkazuje, zahrnují např. Standardní příručku ASTM pro stanovení bioakumulace kontaminujících látek vázaných na sediment bentickými bezobratlými (3), Metody Agentury pro ochranu životního prostředí USA pro měření toxicity a bioakumulace kontaminujících látek vázaných na sediment sladkovodními bezobratlými (7) a Standardní příručku ASTM pro sběr, uchovávání, charakterizaci sedimentů pro toxikologické zkoušky a manipulaci s nimi a výběr vzorkovačů používaných pro sběr bentických bezobratlých (12). Dalšími důležitými zdroji informací pro vypracování tohoto dokumentu byly praktické zkušenosti získané během okružního testování této zkušební metody ((13), zpráva o okružním testu).

NEZBYTNÉ A POMOCNÉ INFORMACE PRO PROVEDENÍ ZKOUŠKY

6. Před zahájením studie je třeba získat informace o zkoušené chemické látce, jako jsou bezpečnostní opatření, správné podmínky uchovávání a analytické metody. Pokyny pro zkoušení chemických látek s fyzikálně chemickými vlastnostmi, které činí jejich zkoušení obtížné, jsou uvedeny v literatuře (14).

7. Před provedením zkoušky je třeba mít o zkoušené chemické látce k dispozici tyto informace:

   — obecný název, chemický název (nejlépe název IUPAC), strukturní vzorec, číslo CAS, čistotu,

   — tlak par,

   — rozpustnost ve vodě.

8. Dále je před zahájením zkoušky užitečné znát tyto doplňující informace:

   — rozdělovací koeficient oktanol-voda, K_{ow},

   — rozdělovací koeficient organický uhlík-voda, vyjádřený jako K_{oc},

   — hydrolýzu,

   — fototransformaci ve vodě,

   — biologickou rozložitelnost,

   — povrchové napětí.

9. Před zahájením zkoušky by se měly získat informace o určitých vlastnostech sedimentu, který se bude používat (7). Podrobnosti naleznete v odstavcích 22 až 25.

PODSTATA ZKOUŠKY

10. Zkušební organismy v podobném fyziologickém stavu (synchronizované způsobem popsaným v dodatku 5) jsou vystaveny řadě toxických koncentrací látky aplikované na sediment v systému sediment-voda. Jako médium by se měl použít umělý sediment a rekonstituovaná voda. Zkušební nádoby bez přídavku zkoušené chemické látky slouží jako kontroly. Zkoušená chemická látka se do sedimentu přidá hromadně pro každou úroveň koncentrace, aby se minimalizovala variabilita mezi opakováními při každé úrovni koncentrace, a následně se do zkušebních nádob, ve kterých byly ekvilibrovány koncentrace ve vodě a sedimentu, přidají zkušební organismy (viz odstavec 29). Zkušební organismy se vystaví systému sediment-voda na dobu 28 dnů. Vzhledem k nízkému obsahu živin v umělém sedimentu by se měl sediment doplnit zdrojem potravy (viz odstavce 22 až 23 a dodatek 4), aby se zajistilo, že organismy porostou a budou se množit za kontrolovaných podmínek. Tímto způsobem je zajištěno, že jsou organismy vystaveny chemické látce prostřednictvím vody, sedimentu a rovněž potravy.

11. Upřednostňovaným cílovým ukazatelem tohoto typu studie je EC_x (např. EC_{50}, EC_{25} a EC_{10}; účinná koncentrace ovlivňující x % zkušebních organismů) pro reprodukci a biomasu v porovnání s kontrolou. Je však třeba

▼M6

poznamenat, že vezme-li se v úvahu vysoká nejistota nízké EC_x (např. EC_{10}, EC_{25}) s extrémně vysokými 95 % intervaly spolehlivosti (např. (15)) a statistická síla vypočítaná během testování hypotézy, považuje se za nejprůkaznější cílový ukazatel hodnota EC_{50}. Kromě toho je možné vypočítat koncentraci bez pozorovaných účinků (NOEC) a nejnižší koncentraci s pozorovaným účinkem (LOEC) pro biomasu a reprodukci, pokud uspořádání zkoušky a data tyto výpočty podporují (viz odstavce 34 až 38). Uspořádání zkoušky je závislé na účelu studie – odvození EC_x nebo NOEC.

REFERENČNÍ ZKOUŠKY

12. Očekává se, že chování kontrolních organismů dostatečně prokáže schopnost laboratoře provést danou zkoušku, a pokud jsou k dispozici historická data, opakovatelnost zkoušky. Kromě toho je možné provádět v pravidelných intervalech referenční zkoušky toxicity s použitím referenční toxické látky ke stanovení citlivosti zkušebních organismů. 96hodinové referenční zkoušky toxicity pouze ve vodě mohou dostatečně ukázat citlivost a stav zkušebních živočichů (4, 7). V dodatku 6 a ve zprávě o okružním testu zkušební metody jsou uvedeny informace o toxicitě pentachlorfenolu (PCP) v úplných zkouškách (28denní expozice sedimentu se známým přídavkem chemické látky) (13). Akutní toxicita PCP pouze ve vodě je popsána např. v (16). Tyto informace je možné použít k porovnání citlivosti zkušebních organismů v referenčních zkouškách s PCP jako referenční toxickou látkou. Jako referenční toxické látky pro zkoušky s *L. variegatus* byly doporučeny chlorid draselný (KCl) nebo síran měďnatý ($CuSO_4$) (4, 7). Stanovení kritérií kvality vycházejících z údajů o toxicitě KCl je dosud obtížné vzhledem k nedostatku publikovaných údajů o *L. variegatus*. Informace o toxicitě mědi pro *L. variegatus* jsou uvedeny v (17) až (21).

PLATNOST ZKOUŠKY

13. Má-li být zkouška platná, měly by být splněny tyto požadavky:

— Okružní test (13) ukázal, že u druhu *Lumbriculus variegatus* by se měl průměrný počet živých jedinců v každém opakování v kontrolách zvýšit alespoň 1,8krát do konce expozice v porovnání s počtem jedinců v každém opakování na začátku expozice.

— pH vody nad sedimentem by se mělo nacházet v rozmezí 6 až 9 po celou dobu zkoušky.

— Koncentrace kyslíku ve vodě nad sedimentem by v průběhu zkoušky neměla být nižší než 30 % hodnoty nasycení vzduchem (air saturation value, ASV) při zkušební teplotě.

POPIS ZKUŠEBNÍ METODY

Zkušební systém

14. Doporučují se statické systémy bez výměny vody nad sedimentem. Pokud je poměr sedimentu k vodě (viz odstavec 15) vhodný, postačí obvykle mírné provzdušňování k udržení kvality vody na přijatelné úrovni pro zkušební organismy (např. maximalizujte hladinu rozpuštěného kyslíku, minimalizujte hromadění výměšků). Semistatické nebo průtokové systémy s občasnou nebo kontinuální výměnou vody nad sedimentem by se měly používat pouze ve výjimečných případech, neboť se předpokládá, že pravidelná výměna vody nad sedimentem ovlivní chemickou rovnováhu (např. dojde ke ztrátám zkoušené chemické látky ze zkušebního systému).

Zkušební nádoby a přístroje

15. Expozice by se měla provádět ve skleněných kádinkách o objemu např. 250 ml a průměru 6 cm. Lze použít i jiné skleněné nádoby, ale měly by zaručit odpovídající hloubku vody nad sedimentem a sedimentu. Do každé nádoby se přidá přibližně 1,5–3cm vrstva uměle vytvořeného sedimentu.

▼M6

Poměr hloubky vrstvy sedimentu k hloubce vody nad sedimentem by měl být 1:4. Nádoby by měly mít vhodný objem pro příslušnou násadu, tj. počet zkušebních organismů přidaných na jednotku hmotnosti sedimentu (viz rovněž odstavec 39).

16. Zkušební nádoby a další přístroje, které přichází do styku se zkoušenou chemickou látkou, by měly být celé zhotoveny ze skla nebo z jiného chemicky inertního materiálu. U všech částí zařízení je třeba se vyhnout použití materiálů, které se mohou rozpouštět, absorbovat zkoušenou chemickou látku nebo vyluhovat jiné chemické látky a mají nepříznivý účinek na zkušební živočichy. Zařízení, které přijde do kontaktu se zkušebním médiem, by mělo být vyrobeno z polytetrafluorethylenu (PTFE; teflon), nerezové oceli a/nebo skla. U organických chemických látek, které mohou adsorbovat na sklo, může být nutné použít silanizované sklo. V takových případech se musí zařízení po použití zlikvidovat.

Zkušební druh

17. Zkušebním druhem používaným v tomto typu studie je sladkovodní máloštětinatec *Lumbriculus variegatus* (Müller). Tento druh toleruje širokou škálu typů sedimentu a je široce používán při zkouškách toxicity sedimentu a bioakumulace (např. 3, 5, 7, 9, 13, 15, 16, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35). V závěrečné zprávě by se měl uvést původ zkušebních živočichů, potvrzení identity druhu (např. (36)) a rovněž podmínky kultivace. Identifikace druhu se nevyžaduje před každou zkouškou, pokud organismy pocházejí z vlastní kultury.

Kultivace zkušebních organismů

18. Aby se zajistil dostatečný počet jedinců pro provádění zkoušek toxicity sedimentů, je užitečné udržovat stálou laboratorní kulturu zkušebních organismů. Pokyny ohledně metod laboratorní kultivace *Lumbriculus variegatus* a zdroje startovacích kultur jsou uvedeny v dodatku 5. Podrobnosti o kultivaci tohoto druhu naleznete v literatuře (3, 7, 27).

19. Důrazně se doporučuje založení kultur jediného druhu, aby se zajistilo, že se zkoušky provádějí s živočichy stejného druhu. Ujistěte se, že kultury, a zejména organismy používané ve zkouškách netrpí žádnými viditelnými nemocemi a abnormalitami.

Voda

20. Jako vodu nad sedimentem se ve zkouškách doporučuje použít vodu rekonstituovanou podle metody C.1 této přílohy (37). Lze ji také použít pro laboratorní kultury zkušebních organismů (příprava viz dodatek 2). Je-li to nutné, může se použít přírodní voda. Vybraná voda musí mít takovou kvalitu, která umožní růst a reprodukci zkušebních druhů po dobu aklimatizace a v průběhu fází zkoušky, aniž by vykazovaly abnormální vzhled nebo chování. Bylo prokázáno, že *Lumbriculus variegatus* v tomto typu vody přežije, roste a množí se (30), a je zajištěna maximální standardizace zkušebních a kultivačních podmínek. Pokud se použije rekonstituovaná voda, mělo by se uvést její složení a voda by se měla před použitím charakterizovat alespoň uvedením pH, obsahu kyslíku a tvrdosti (vyjádřené jako mg $CaCO_3$/l). Analýza vody na mikropolutanty provedená před použitím může poskytnout užitečné informace (viz např. dodatek 3).

21. pH vody nad sedimentem by se mělo pohybovat mezi 6,0 a 9,0 (viz odstavec 13). Pokud se očekává zvýšená tvorba amoniaku, považuje se za užitečné udržovat hodnotu pH v rozmezí 6,0 až 8,0. Pro zkoušky např. slabých organických kyselin se doporučuje upravit pH pufrováním vody používané ve zkoušce, jak popisuje např. (16). Celková tvrdost přírodní vody používané ve zkoušce by se měla pohybovat mezi 90 a 300 mg $CaCO_3$ na litr. V dodatku 3 jsou shrnuta další kritéria pro přijatelnou ředicí vodu dle Pokynu OECD č. 210 (38).

▼M6

Sediment

22. Protože nekontaminované přírodní sedimenty z určitého zdroje nemusí být k dispozici po celý rok a původní organismy a rovněž přítomnost mikropolutantů mohou ovlivnit zkoušku, měl by se raději použít uměle vytvořený sediment (rovněž nazývaný rekonstituovaný, artificiální či syntetický sediment). Použití uměle vytvořeného sedimentu minimalizuje variabilitu zkušebních podmínek a rovněž kontaminaci původní faunou. Níže uvedený uměle vytvořený sediment vychází z umělého sedimentu dle (6), (39) a (40). Doporučuje se použít ho v tomto typu zkoušky (6, 10, 30, 41, 42, 43):

a) 4–5 % (hmotnost sušiny) sfagnové rašeliny; je důležité použít rašelinu v práškové formě, stupeň rozkladu: „střední“, jemně mletou (velikost částic ≤ 0,5 mm) a sušenou pouze na vzduchu;

b) 20 ± 1 % (hmotnost sušiny) kaolinitického jílu (pokud možno s více než 30 % kaolinitu);

c) 75–76 % (hmotnost sušiny) křemenného písku (jemný písek, velikost zrn: ≤ 2 mm, ale > 50 % částic musí být v rozpětí 50–200 μm);

d) Deionizovaná voda, 30–50 % hmotnosti sušiny sedimentu, navíc k suchým složkám sedimentu;

e) Přidá se chemicky čistý uhličitan vápenatý ($CaCO_3$) pro úpravu pH konečné směsi sedimentu;

f) Celkový obsah organického uhlíku (TOC) v konečné směsi by měl činit 2 % (± 0,5 %) hmotnosti sušiny sedimentu a je třeba jej upravit použitím vhodného množství rašeliny a písku v souladu s písm. a) a c);

g) Potrava, např. sušený drcený list kopřivy (*Urtica sp.*, v souladu s lékárenskými normami, pro lidskou spotřebu) nebo směs listu *Urtica sp.* v prášku s alfa-celulózou (1:1) v množství 0,4–0,5 % suché hmotnosti sedimentu, navíc k suchým složkám sedimentu; podrobnosti viz dodatek 4.

23. Rašelina, kaolinitický jíl, potrava a písek by měly pocházet ze známého zdroje. Jako doplněk k položce g) uvádí kapitola C.27 této přílohy (6) alternativní rostlinné materiály, které lze použít jako zdroj výživy: dehydratované listy morušovníku bílého (*Morus alba*), jetele plazivého (*Trifolium repens*), špenátu setého (*Spinacia oleracea*) nebo obilovin.

24. Vybraný zdroj potravy by se měl přidat do sedimentu před přidáním zkoušené chemické látky nebo během něj. Vybraný zdroj potravy by měl umožňovat alespoň přijatelnou reprodukci v kontrolách. Užitečné informace by mohla poskytnout analýza umělého sedimentu nebo jeho složek na mikropolutanty před použitím. Příklad přípravy uměle vytvořeného sedimentu je popsán v dodatku 4. Přijatelné je i smíchání suchých složek, pokud se prokáže, že po přidání vody nad sedimentem nedochází k separaci složek sedimentu (např. vyplavování částic rašeliny) a že rašelina nebo sediment jsou dostatečně kondicionovány (viz také odstavec 25 a dodatek 4). Umělý sediment by se měl charakterizovat alespoň uvedením původu složek, distribuce velikosti zrn (procento písku, naplavenin a jílu), celkového obsahu organického uhlíku (TOC), obsahu vody a pH. Měření oxidačně-redukčního potenciálu je volitelné.

25. Je-li to nutné, např. pro specifické zkušební účely, mohou jako zkušební a/nebo kultivační sediment sloužit také přírodní sedimenty z neznečištěných míst (3). Pokud se však použije přírodní sediment, měl by se charakterizovat alespoň uvedením původu (místa odběru), pH a obsahu amoniaku v kapilární vodě, celkového obsahu organického uhlíku (TOC) a obsahu dusíku, distribuce velikosti částic (procento písku, naplavenin a jílu) a procentuálního

▼M6

obsahu vody (7) a měl by být prostý jakékoli kontaminace a jiných organismů, které by mohly se zkušebními organismy soutěžit nebo je lovit. Měření oxidačně-redukčního potenciálu a kationtové výměnné kapacity je volitelné. Doporučuje se také přírodní sediment před přidáním známého množství zkoušené chemické látky kondicionovat po dobu sedmi dnů za stejných podmínek, které převládají v následující zkoušce. Na konci tohoto období kondicionování by se měla voda nad sedimentem odstranit a zlikvidovat.

26. Používaný sediment musí mít takovou kvalitu, která umožní přežití a reprodukci kontrolních organismů po celou dobu expozice, aniž by vykazovaly abnormální vzhled nebo chování. Kontrolní jedinci by se měli zavrtat do země a měli by požírat sediment. Reprodukce v kontrolách by měla dosáhnout alespoň hodnoty uvedené v kritériu platnosti popsaném v odstavci 13. Měla by se zaznamenat přítomnost nebo nepřítomnost pelet trusu na povrchu sedimentu, které svědčí o tom, že organismy požírají sediment. Tato informace může být užitečná při interpretaci výsledků zkoušky s ohledem na cesty expozice. Další informace o požírání sedimentu lze získat pomocí metod popsaných v (24), (25), (44) a (45), které specifikují požírání sedimentu nebo výběr částic u zkušebních organismů.

27. Postupy manipulace s přírodními sedimenty před použitím v laboratoři jsou popsány v (3), (7) a (12). Příprava a uchovávání umělého sedimentu, který se doporučuje používat ve zkoušce s *Lumbriculus*, jsou popsány v dodatku 4.

Aplikace zkoušené chemické látky

28. Zkoušená chemická látka se přidá do sedimentu ve známém množství. Protože se předpokládá, že většina zkoušených chemických látek bude mít nízkou rozpustnost ve vodě, měly by se rozpustit v co nejmenším objemu vhodného organického rozpouštědla (např. aceton, n-hexan, cyklohexan), čímž se vytvoří zásobní roztok. Zásobní roztok by se měl naředit stejným rozpouštědlem k získání zkušebních roztoků. Hlavním kritériem pro výběr vhodného solubilizačního činidla by měla být toxicita a těkavost rozpouštědla a rozpustnost zkoušené chemické látky ve zvoleném rozpouštědle. Pro každou úroveň koncentrace by se měl použít stejný objem odpovídajícího roztoku. Zkoušená chemická látka by se měla do sedimentu přidat pro každou úroveň koncentrace hromadně, aby se minimalizovala variabilita mezi opakováními příslušné koncentrace zkoušené chemické látky. Každý ze zkušebních roztoků se poté smísí s křemenným pískem, jak je popsáno v odstavci 22 (např. 10 g křemenného písku na zkušební nádobu). Zjistilo se, že k úplnému nasáknutí křemenného písku postačuje objem 0,20–0,25 ml na gram písku. Poté se musí rozpouštědlo nechat do sucha odpařit. Aby se minimalizovaly ztráty zkoušené chemické látky souběžným odpařováním (např. v závislosti na tlaku par chemické látky), měl by se písek pokrytý chemickou látkou použít ihned po usušení. Suchý písek se smísí s vhodným množstvím uměle vytvořeného sedimentu o odpovídající úrovni koncentrace. Při přípravě sedimentu je nutno zohlednit písek pocházející ze směsi písku se zkoušenou chemickou látkou (tj. při přípravě sedimentu by se mělo použít menší množství písku). Hlavní výhodou tohoto postupu je fakt, že se do sedimentu nezanese prakticky žádné rozpouštědlo (7). Další možností, jak zkoušenou chemickou látku přidat do sedimentu, např. v případě terénního sedimentu, je přidat zkoušenou chemickou látku do suché a jemně namleté části sedimentu způsobem popsaným výše pro křemenný písek, nebo zamíchat zkoušenou chemickou látku do vlhkého sedimentu a následně nechat odpařit použité solubilizační činidlo. Je třeba dbát na to, aby zkoušená chemická látka přidaná do sedimentu byla v sedimentu důkladně a rovnoměrně rozložena. Je-li třeba, je možné analyzovat dílčí vzorky pro potvrzení konečné koncentrace látky v sedimentu a stanovení stupně homogenity. Rovněž může být užitečné analyzovat dílčí vzorky zkušebních roztoků pro potvrzení konečných koncentrací látky v sedimentu. Protože se k nanesení zkoušené chemické látky na křemenný písek používá rozpouštědlo, měla by se zavést kontrola s rozpouštědlem, která se připraví se stejným množstvím rozpouštědla jako zkušební sedimenty. Měla by se uvést metoda použitá pro přidání zkoušené chemické látky a důvody pro

▼M6

výběr jiného konkrétního postupu přidání, než jaký je uveden výše. Metodu přidání lze upravit pro fyzikálně-chemické vlastnosti zkoušené chemické látky, např. aby se zabránilo ztrátám z důvodu odpařování (těkání) během přidávání látky nebo ekvilibrace. Další pokyny pro postupy přidávání zkoušené chemické látky jsou uvedeny v Environment Canada (1995) (46).

29. Jakmile se připraví sediment se známým přídavkem zkoušené chemické látky, rozdělí se do zkušebních nádob pro jednotlivá opakování a přelije zkušební vodou, je vhodné nechat proběhnout rozdělení zkoušené chemické látky ze sedimentu do vodné fáze (např. 3, 7, 9). To by se mělo provádět pokud možno za stejných podmínek z hlediska teploty a provzdušňování, jaké se používají při zkoušce. Vhodná doba pro ustavení rovnováhy je specifická pro konkrétní sediment a chemickou látku a může se pohybovat v řádu hodin až dní, zřídka až několika týdnů (4–5 týdnů) (např. 27, 47). V této zkoušce se nečeká na dosažení rovnováhy, ale doporučuje se doba ekvilibrace 48 hodin až 7 dní. Tím se minimalizuje doba pro rozklad zkoušené chemické látky. V závislosti na účelu studie, např. pokud se mají napodobit environmentální podmínky, je možné nechat sediment s přidanou látkou stabilizovat po delší dobu.

30. Na konci období ekvilibrace by se měly odebrat vzorky alespoň vody nad sedimentem a sedimentu alespoň u nejvyšší koncentrace a nižší koncentrace pro analýzu koncentrace zkoušené chemické látky. Tato analytická stanovení zkoušené chemické látky by měla umožnit výpočet hmotnostní bilance a vyjádření výsledků na základě naměřených počátečních koncentrací. Odběr vzorků obecně narušuje nebo ničí systém sediment-voda. Proto obvykle není možné použít stejná opakování pro odběr vzorku sedimentu a živočichů. Je třeba připravit doplňující „analytické“ nádoby vhodných rozměrů, které se ošetří stejným způsobem (včetně přítomnosti zkušebních organismů), avšak nepoužijí se pro biologická pozorování. Rozměry nádob by se měly zvolit tak, aby zajišťovaly požadovaný počet vzorků pro danou analytickou metodu. Podrobnosti o odběru vzorků jsou uvedeny v odstavci 53.

PROVEDENÍ ZKOUŠKY

Předběžná zkouška

31. Pokud nejsou k dispozici žádné informace o toxicitě zkoušené chemické látky pro *Lumbriculus variegatus*, může být užitečné provést předběžný experiment ke stanovení rozmezí koncentrací, které se budou testovat v hlavní zkoušce, a k optimalizaci zkušebních podmínek v hlavní zkoušce. K tomuto účelu se použije řada široce odstupňovaných koncentrací zkoušené chemické látky. Žížalice se vystaví každé koncentraci zkoušené chemické látky po dobu (např. 28 dní, jako v konečné zkoušce), která umožňuje odhadnout vhodné zkušební koncentrace. Opakování nejsou třeba. Během předběžné zkoušky by se mělo pozorovat a zaznamenávat chování zkušebních živočichů, například vyhýbání se sedimentu, které by mohlo být způsobeno zkoušenou chemickou látkou a/nebo sedimentem. V předběžné zkoušce by se neměly testovat koncentrace vyšší než 1 000 mg/kg hmotnosti sušiny sedimentu.

Hlavní zkouška

32. V hlavní zkoušce by se mělo použít alespoň pět koncentrací, které se zvolí např. na základě výsledku předběžné orientační zkoušky (odstavec 31) a způsobem popsaným v odstavcích 35, 36, 37 a 38.

▼M6

33. Kromě zkušebních sad se zkoušce podrobí i kontrola (co se týká opakování, viz odstavce 36, 37 a 38) obsahující všechny složky vyjma zkoušené chemické látky. Pokud se k aplikaci zkoušené chemické látky použije solubilizační činidlo, nemělo by mít žádný významný vliv na zkušební organismy, což se zjistí pomocí doplňující kontroly obsahující pouze rozpouštědlo.

Uspořádání zkoušky

34. Uspořádáním zkoušky se rozumí výběr počtu zkušebních koncentrací a jejich odstupňování, počet nádob pro každou koncentraci a počet červů v každé nádrži. Uspořádání pro odhad EC_x, odhad NOEC a pro provedení limitní zkoušky jsou popsána v odstavcích 35, 36, 37 a 38.

35. Koncentrace použité ve zkoušce by měly pokrývat účinnou koncentraci (např. EC_{50} EC_{25}, EC_{10}) a rozsah koncentrací, při nichž dochází k účinku zkoušené chemické látky, který je předmětem zájmu. Je třeba vyhnout se extrapolaci koncentrací mnohem nižších, než je nejnižší koncentrace ovlivňující zkušební organismy, nebo nad nejvyšší testovanou koncentrací. Pokud se – ve výjimečných případech – taková extrapolace provede, je třeba v závěrečné zprávě uvést úplné vysvětlení.

36. Pokud se má odhadnout hodnota EC_x, je třeba testovat alespoň pět koncentrací a minimálně tři opakování pro každou koncentraci. Doporučuje se šest opakování pro kontrolu, nebo kontrolu s rozpouštědlem (pokud se používá), aby se zlepšil odhad variability kontroly. V každém případě je vhodné, aby se použily dostatečné zkušební koncentrace umožňující dobrý odhad modelu. Koeficient rozložení koncentrací by neměl být větší než dvě (výjimku lze učinit v případě, kdy má křivka závislosti odezvy na koncentraci malý sklon). Počet opakování při každé expozici lze snížit, pokud se zvýší počet zkušebních koncentrací s odezvami v rozmezí 5–95 %. Zvýšení počtu opakování nebo zmenšení intervalů zkušebních koncentrací obvykle vede k zmenšení intervalu spolehlivosti zkoušky.

37. Pokud se mají odhadnout hodnoty LOEC/NOEC, mělo by se použít alespoň pět zkušebních koncentrací s alespoň čtyřmi opakováními (pro kontrolu nebo, pokud se používá, kontrolu s rozpouštědlem se doporučuje šest opakování, aby se zlepšil odhad variability kontroly) a koeficient rozložení by neměl být větší než dvě. V dodatku 6 je uvedeno několik informací o statistické síle zjištěné během testování hypotézy v okružním testu této zkušební metody.

38. Pokud se neočekávají žádné účinky až do koncentrace 1 000 mg/kg suché hmotnosti sedimentu (např. na základě výsledků předběžné orientační zkoušky) nebo pokud bude testování při jediné koncentraci dostačující pro potvrzení hodnoty NOEC, která je předmětem zájmu, lze provést limitní zkoušku. Ve druhém zmiňovaném případě by mělo být v závěrečné zprávě uvedeno podrobné odůvodnění pro výběr limitní koncentrace. Účelem limitní zkoušky je provést zkoušku při dostatečně vysoké koncentraci umožňující osobám s rozhodovací pravomocí vyloučit možné toxické účinky chemické látky a limit je stanoven v takové koncentraci, jejíž výskyt se v žádném případě nepředpokládá. Doporučená koncentrace je 1 000 mg/kg (hmotnosti sušiny). Obvykle je pro expozici i kontroly zapotřebí alespoň šest opakování. V dodatku 6 je uvedeno několik informací o statistické síle zjištěné během testování hypotézy v okružním testu této zkušební metody.

Podmínky expozice

Zkušební organismy

39. Zkouška se provádí s alespoň 10 jedinci v každém opakování použitém pro stanovení biologických parametrů. Tento počet jedinců odpovídá přibližně 50–100 mg mokré biomasy. Za předpokladu obsahu sušiny 17,1 % (48) to vede k přibližně 9–17 mg suché biomasy v každé nádobě. Agentura pro ochranu životního prostředí USA (2000 (7)) doporučuje použít násadu

▼M6

nepřevyšující poměr 1:50 (suchá biomasa: TOC). V případě uměle vytvořeného sedimentu popsaného v odstavci 22 to odpovídá přibližně 43 g sedimentu (hmotnosti sušiny) na 10 jedinců při obsahu TOC 2,0 % suchého sedimentu. V případě, že se použije více než 10 jedinců na nádobu, by se mělo podle toho upravit množství sedimentu a vody nad sedimentem.

40. Organismy použité ve zkoušce by měly všechny pocházet ze stejného zdroje a mělo by se jednat o živočichy v podobném fyziologickém stavu (viz dodatek 5). Měli by se vybrat jedinci podobné velikosti (viz odstavec 39). Doporučuje se zvážit před zkouškou dílčí vzorek sady či zásoby zkušebních organismů s cílem odhadnout střední hmotnost.

41. Jedinci, kteří se použijí ve zkoušce, se vyjmou z kultury (podrobnosti viz dodatek 5). Velcí (dospělí) jedinci, kteří nevykazují známky nedávné fisiparie, se přenesou do skleněných misek (např. Petriho misek) s čistou vodou. Poté se synchronizují způsobem popsaným dodatku 5. Po období regenerace, které trvá 10 až 14 dní, by se měli ve zkoušce použít neporušení, úplní jedinci podobné velikosti, kteří po jemném mechanickém stimulu aktivně plavou nebo se plazí. Pokud se zkušební podmínky liší od podmínek kultivace (např. teplotou, světelným režimem a vodou nad sedimentem), měla by být k adaptaci organismů na zkušební podmínky dostačující aklimatizační fáze v délce např. 24 h při teplotě, světelném režimu a s použitím stejné vody nad sedimentem jako ve zkoušce. Adaptovaní máloštětinatci by se měli náhodně přiřadit do zkušebních nádob.

Krmení

42. Protože se potrava přidává do sedimentu před aplikací zkoušené chemické látky (nebo během ní), zkušební organismy se již v průběhu zkoušky dále nepřikrmují.

Světlo a teplota

43. Fotoperioda při kultivaci a během zkoušky je obvykle 16 hodin (3), (7). Intenzita osvětlení by se měla udržovat nízká (např. 100–500 lx), aby se imitovaly přirozené podmínky na povrchu sedimentu, a měla by se měřit alespoň jednou během období expozice. Teplota by se měla udržovat na 20 ± 2 °C po celou dobu zkoušky. V jednom daném dni měření by rozdíl teplot mezi zkušebními nádobami neměl být vyšší než ± 1 °C. Zkušební nádoby by se měly umístit do zkušebního inkubátoru nebo do prostoru, kde se zkouška provádí, náhodným způsobem, např. aby se minimalizovalo zkreslení reprodukce v důsledku umístění nádob.

Provzdušňování

44. Voda nad sedimentem ve zkušebních nádobách by se měla jemně provzdušňovat (např. 2–4 bubliny za sekundu) pomocí Pasteurovy pipety umístěné přibližně 2 cm nad povrchem sedimentu, aby se minimalizovala perturbace sedimentu. Je třeba dbát na to, aby koncentrace rozpuštěného kyslíku neklesla pod 30 % hodnoty nasycení vzduchem (ASV). Dodávka vzduchu by měla být regulovaná, a je-li to nezbytné, upravována alespoň jednou denně během pracovních dnů.

Měření kvality vody

45. Ve vodě nad sedimentem by se měly měřit tyto parametry kvality vody:

Teplota:	alespoň v jedné zkušební nádobě každé úrovně koncentrace a jedné zkušební nádobě kontrol jednou týdně a na začátku a na konci období expozice. Pokud je to možné, lze jako doplňující údaj zaznamenávat teplotu okolního média (vzduch v okolním prostředí nebo vodní lázeň), např. v hodinových intervalech;

▼M6

Obsah rozpuštěného kyslíku:	alespoň v jedné zkušební nádobě každé úrovně koncentrace a jedné zkušební nádobě kontrol jednou týdně a na začátku a na konci období expozice; vyjádřen v mg/l a % ASV (hodnota nasycení vzduchem);
Dodávka vzduchu:	měla by se kontrolovat alespoň jednou denně v pracovních dnech a v případě potřeby upravit;
pH:	alespoň v jedné zkušební nádobě každé úrovně koncentrace a jedné zkušební nádobě kontrol jednou týdně a na začátku a na konci období expozice;
Celková tvrdost vody:	alespoň v jednom opakování kontrol a v jedné zkušební nádobě s nejvyšší koncentrací na začátku a na konci období expozice; vyjádřená v mg/ml $CaCO_3$;
Celkový obsah amoniaku:	alespoň v jednom opakování kontrol a v jedné zkušební nádobě každé úrovně koncentrace na začátku období expozice a poté 3 × týdně; vyjádřen v mg/l NH_4^+ nebo NH_3 nebo celkového amonného dusíku.

Pokud měření parametrů kvality vody vyžaduje odebrání významných vzorků vody z nádob, může být vhodné použít samostatné nádoby pro měření kvality vody, aby se neměnil poměr objemu vody vůči sedimentu.

Biologická pozorování

46. Během expozice by se měly ve zkušebních nádobách zrakem vyhodnotit jakékoli změny v chování zkušebních organismů (např. vyhýbání se sedimentu, pelety trusu viditelné na povrchu sedimentu) v porovnání s kontrolami. Pozorování by se měla zaznamenat.

47. Na konci zkoušky se prohlédne každé opakování (doplňující nádoby určené k chemickým analýzám lze z této prohlídky vyloučit). Měla by se použít vhodná metoda pro získání všech jedinců ze zkušební nádoby. Je třeba dbát na to, aby se při odběru žádný jedinec neporanil. Jednou z možných metod je prosít žížalice ze sedimentu. Lze k tomu použít síto z nerezové oceli o vhodné velikosti ok. Většina vody nad sedimentem se opatrně slije a zbývající sediment a voda se protřepou, aby vznikla řídká kaše, kterou lze přecedit přes síto. Při použití síta s otvory o průměru 500 μm projde většina částic sedimentu sítem velmi rychle, nicméně cezení je třeba provést rychle, aby žížalice nezalezly do síta či neprolezly sítem. Použití 250μm síta zabrání žížalicím zalézt do síta nebo jím prolézt, nicméně je třeba dbát na to, aby na sítu zůstalo co nejméně částic sedimentu. Procezenou řídkou kaši z nádoby každého opakování je možné procedit znovu, aby se zajistilo, že se zachytí všechny žížalice. Alternativním způsobem by mohlo být zahřátí sedimentu umístěním zkušebních nádob do vodní lázně o teplotě 50–60 °C. Žížalice vylezou ze sedimentu a je možné je sebrat z povrchu sedimentu pomocí pipety se širokým ústím protažené plamenem. Dalším alternativním způsobem by mohlo být vytvoření řídké kaše sedimentu a nalití této kaše do mělké misky vhodné velikosti. Z tenké vrstvy řídké kaše lze zkušební organismy snadno vybrat pomocí ocelové jehly nebo hodinářské pinzety (použít raději jako vidličku než kleště, aby nedošlo k jejich poranění) a přemístit je do čisté vody. Žížalice se po vybrání z řídké kaše sedimentu promyjí zkušebním médiem a spočítají.

48. Bez ohledu na použitý způsob by laboratoře měly prokázat, že jejich zaměstnanci jsou schopni získat v průměru nejméně 90 % organismů z celého sedimentu. Například je možné přidat do kontrolního

▼M6

sedimentu nebo zkušebních sedimentů určitý počet zkušebních organismů a za 1 h stanovit počet jedinců, které personál ze sedimentu získá (7).

49. Měl by se zaznamenat a vyhodnotit celkový počet živých a mrtvých jedinců v každém opakování. Za mrtvé se považují tyto skupiny organismů:

a) nevykazující žádnou reakci na jemný mechanický stimul;

b) vykazující známky rozkladu (v kombinaci s písmenem a));

c) chybějící (počet).

Živé organismy lze navíc zařadit do jedné ze tří skupin:

a) velcí úplní jedinci (dospělí) bez regenerovaných částí těla;

b) úplní jedinci s regenerovanými, světle zbarvenými částmi těla (tj. s novou zadní částí, novou přední částí nebo s novou zadní i přední částí);

c) neúplní jedinci (tj. jedinci, kteří se nedávno rozdělili, a dosud jim nezregenerovaly části těla).

Tato dodatečná pozorování nejsou povinná, ale lze je použít pro doplňující interpretaci biologických výsledků (například vysoký počet jedinců zařazených o skupiny c může naznačovat opoždění reprodukce nebo regenerace při dané expozici). Dále, pokud jsou zpozorovány nějaké rozdíly ve vzhledu (např. léze pokožky, edematózní části těla) mezi exponovanými a kontrolními jedinci, měly by se zaznamenat.

50. Ihned po spočítání/vyhodnocení se živí jedinci nalezení v každém opakování přenesou do suchých, předem zvážených a označených misek vah (jedna pro každé opakování) a usmrtí pomocí kapky ethanolu na každou misku. Misky vah se poté umístí do sušicí trouby s teplotou nastavenou na 100 ± 5 °C, aby přes noc vyschly, a poté se nechají zchladnout v desikátoru, následně se zváží a stanoví se hmotnost sušiny jedince (nejlépe v g, s přesností alespoň na 4 desetinná místa).

51. Kromě celkové hmotnosti sušiny je možné stanovit hmotnost sušiny bez anorganických částic způsobem popsaným v (49), aby se zohlednily anorganické složky pocházející z požitého sedimentu přítomného v trávicím traktu organismů.

52. Biomasa se stanoví jako celková biomasa v každém opakování včetně dospělých a mladých jedinců. Mrtví jedinci by se při stanovování biomasy v každém opakování neměli brát v úvahu.

Ověření koncentrací zkoušené chemické látky

Odběr vzorků

53. Pro chemickou analýzu zkoušené chemické látky by se měly odebrat vzorky alespoň u nejvyšší koncentrace a nižší koncentrace, alespoň na konci fáze ustavování rovnováhy (před přidáním zkušebních organismů) a na konci zkoušky. Pro analýzu by se měl odebrat nejméně vzorek celkového sedimentu a vody nad sedimentem. V každý odběrový den by se měly odebrat alespoň dva vzorky pro každý substrát a expozici. Jeden z těchto

▼M6

dvou vzorků lze uchovat jako rezervu (která se bude analyzovat např. v případě, že výsledek první analýzy se bude nacházet mimo rozmezí nominální koncentrace ± 20 %). V případě specifických chemických vlastností, např. očekává-li se rychlý rozklad zkoušené chemické látky, lze analytický harmonogram upravit (např. častější odběr vzorků, analýza více úrovní koncentrací) na základě odborného posouzení. Vzorky pak je možné odebírat i průběžně (např. sedmý den po zahájení expozice).

54. Vzorek vody nad sedimentem by se měl odebrat opatrným odlitím nebo vypuštěním vody, aby se minimalizovala perturbace sedimentu. Měl by se zaznamenat objem vzorků.

55. Poté, co byla voda nad sedimentem odstraněna, by se sediment měl homogenizovat a přemístit do vhodné nádoby. Zaznamená se hmotnost vzorku vlhkého sedimentu.

56. Pokud se navíc vyžaduje analýza zkoušené chemické látky v kapilární vodě, měly by se homogenizované a zvážené vzorky sedimentu odstředit, aby se získala kapilární voda. Například je možné přibližně 200 ml vlhkého sedimentu naplnit do 250ml centrifugačních kádinek. Poté by se měly vzorky odstředit bez filtrace, aby se izolovala kapilární voda, např. při 10 000 ± 600 × *g* po dobu 30–60 minut při teplotě nepřesahující teplotu použitou ve zkoušce. Po odstředění se supernatant slije nebo odpipetuje, přičemž je třeba dát pozor, aby se do něj nedostaly částice sedimentu, a objem se zaznamená. Zaznamená se hmotnost zbylé pelety sedimentu. Pokud se v každém odběrovém dni stanoví hmotnost sušiny sedimentu, může to usnadnit odhad hmotnostní bilance či výtěžku zkoušené chemické látky v systému voda-sediment. V některých případech nemusí být možné provést analýzu koncentrací v kapilární vodě, protože vzorek je příliš malý.

57. Není-li možné provést okamžitou analýzu, měly by se všechny vzorky uchovávat vhodným způsobem, např. za podmínek uchovávání doporučených pro minimalizaci rozkladu příslušné zkoušené chemické látky (např. vzorky odebrané z prostředí se obvykle uchovávají ve tmě při teplotě – 18 °C). Obstarejte si informace o správných podmínkách uchovávání příslušné zkoušené chemické látky, např. o délce a teplotě uchovávání, extrakčních postupech atd., ještě před zahájením studie.

Analytická metoda

58. Vzhledem k tomu, že celý postup je určen hlavně správností, přesností a citlivostí analytické metody použité pro analýzu zkoušené chemické látky, je třeba experimentálně kontrolovat, že přesnost a reprodukovatelnost chemické analýzy a rovněž výtěžek zkoušené chemické látky jak z vody, tak ze vzorků sedimentu jsou pro danou analytickou metodu dostatečné alespoň při nejnižší a nejvyšší zkušební koncentraci. Rovněž si ověřte, že zkoušená látka není v kontrolních nádobách detekovatelná v koncentracích vyšších, než je mez kvantifikace. V případě potřeby upravte nominální koncentrace s ohledem na výtěžky ze vzorků sedimentu s přidanou chemickou látkou sloužících ke kontrole kvality (např. když výtěžky leží mimo rozmezí 80–120 % přidaného množství). Se všemi vzorky během zkoušky nakládejte tak, aby se minimalizovala kontaminace a ztráty (např. v důsledku adsorpce zkoušené chemické látky zařízením pro odběr vzorků).

59. Výtěžek zkoušené chemické látky, mez kvantifikace a mez detekce v sedimentu a vodě by se měly zaznamenat a uvést v závěrečné zprávě.

ÚDAJE A PŘEDKLÁDÁNÍ ZPRÁV

Zpracování výsledků

60. Hlavní povinné proměnné odezvy ve zkoušce, které se mají statisticky vyhodnotit, jsou biomasa a celkový počet jedinců v každém opakování. Případně je možné rovněž vyhodnotit reprodukci (zvýšení počtu červů) a růst (jako přírůstek suché biomasy). V takovém případě je třeba získat odhad hmotnosti sušiny organismů na začátku expozice např. měřením hmotnosti sušiny v reprezentativním dílčím vzorku skupiny synchronizovaných jedinců, kteří se mají použít ve zkoušce.

▼M6

61. Přestože mortalita není cílovým ukazatelem této zkoušky, měly by se údaje o mortalitě vyhodnotit v co největší možné míře. Pro odhad mortality by se měli mezi mrtvé jedince započítat jedinci, kteří nereagují na jemný mechanický stimul nebo vykazují známky rozkladu, a rovněž chybějící jedinci. Údaje o mortalitě by se měly přinejmenším zaznamenat a vzít v úvahu při interpretaci výsledků zkoušky.

62. Účinné koncentrace by se měly vyjádřit v mg/kg hmotnosti sušiny sedimentu. Pokud výtěžek zkoušené chemické látky naměřený v sedimentu nebo v sedimentu a vodě nad sedimentem na začátku expozice leží v rozmezí 80 až 120 % nominálních koncentrací, je možné vyjádřit účinné koncentrace (EC_x, NOEC, LOEC) na základě nominálních koncentrací. Pokud se výtěžek od nominálních koncentrací odchyluje o více než ± 20 % nominálních koncentrací, měly by účinné koncentrace (EC_x, NOEC, LOEC) vycházet z koncentrací naměřených na začátku expozice, např. se zohledněním hmotnostní bilance zkoušené chemické látky ve zkušebním systému (viz odstavec 30). V takových případech je možné získat další informace z analýzy zásobního a/nebo aplikačního roztoku, aby se potvrdilo, že byly zkušební sedimenty připraveny správně.

EC_x

63. Hodnoty EC_x pro parametry popisované v odstavci 60 se vypočítají pomocí vhodných statistických metod (např. probitové analýzy, logistické nebo Weibullovy funkce, upravené Spearman-Karberovy metody nebo jednoduché interpolace). Pokyny k statistickému vyhodnocení jsou uvedeny v literatuře (15) a (50). Hodnota EC_x se získá vložením hodnoty odpovídající x % kontrolního průměru do nalezené rovnice. Pro výpočet hodnoty EC_{50} či jakékoli jiné EC_x je třeba podrobit průměry pro každou expozici ($\overline{X}$) regresní analýze.

NOEC/LOEC

64. Pokud je statistická analýza určena ke stanovení hodnoty NOEC/LOEC, jsou zapotřebí statistiky pro každou nádobu (jednotlivé nádoby se považují za opakování). Je třeba použít vhodné statistické metody. Obecně se porovnávají nežádoucí účinky zkoušené položky s kontrolou pomocí testování jednostranné hypotézy při $p \leq 0{,}05$. V následujících odstavcích jsou uvedeny příklady. Pokyny k výběru vhodných statistických metod jsou uvedeny v literatuře (15) a (50).

65. Normální rozdělení dat lze testovat např. pomocí Kolmogorov-Smirnovova testu dobré shody (goodness-of-fit), testu poměru rozpětí k směrodatné odchylce (R/s test) nebo Shapiro-Wilkova testu (dvoustranný, $p \leq 0{,}05$). Cochranův test, Levenův test nebo Bartlettův test (dvoustranný, $p \leq 0{,}05$) lze použít k testování homogenity rozptylu. Jsou-li splněny nezbytné předpoklady pro použití parametrických testů (normalita, homogenita rozptylu), je možné provést jednostupňovou analýzu rozptylu (ANOVA) a následné testy vícenásobného porovnávání. Párová porovnávání (např. Dunnettův t-test) nebo testy sestupného trendu (např. Williamsův test) lze použít k výpočtu, zda jsou mezi kontrolami a různými koncentracemi zkoušené položky významné rozdíly ($p \leq 0{,}05$). Jinak by se ke stanovení hodnoty NOEC a LOEC měly použít neparametrické metody (např. Bonferroniho U-test podle Holma nebo Jonckheere-Terpstrův test trendu).

Limitní zkouška

66. Pokud byla provedena limitní zkouška (pouze porovnání kontroly a jedné expozice) a jsou splněny nezbytné předpoklady pro použití parametrických testů (normalita, homogenita), lze metrické proměnné (celkový počet jedinců a biomasu vyjádřenou jako hmotnost sušiny zkušebních organismů) vyhodnotit Studentovým testem (t-test). Pokud tyto požadavky splněny nejsou, lze použít t-test upravený pro nerovnost rozptylů (Welchův t-test) nebo neparametrický test, jako je například Mann-Whitneyův U-test. V dodatku 6 je uvedeno několik informací o statistické síle zjištěné během testování hypotézy v okružním testu této metody.

▼M6

67. Pro stanovení významných rozdílů mezi kontrolami (kontrola a kontrola s rozpouštědlem), lze testovat opakování každé kontroly způsobem popsaným pro limitní zkoušku. Pokud se v těchto testech nezjistí významné rozdíly, lze všechna opakování kontroly a kontroly s rozpouštědlem sloučit. Jinak by se měly všechny expozice porovnávat s kontrolou s rozpouštědlem.

Interpretace výsledků

68. Výsledky je třeba interpretovat opatrně, pokud došlo k odchylkám od této zkušební metody a v případě, kdy se naměřené koncentrace zkušebních koncentrací nacházejí blízko meze detekce použité analytické metody. Všechny odchylky od této zkušební metody se musí zaznamenat.

Závěrečná zpráva

69. Závěrečná zpráva by měla obsahovat minimálně tyto informace:

— *Zkoušená chemická látka:*

— chemické identifikační údaje (obecný název, chemický název, strukturní vzorec, číslo CAS atd.) včetně čistoty a analytické metody použité ke kvantifikaci zkoušené chemické látky; zdroj zkoušené chemické látky, identita a koncentrace jakéhokoli použitého rozpouštědla,

— jakékoli dostupné informace o fyzikální povaze a fyzikálně-chemických vlastnostech získané před zahájením zkoušky (např rozpustnost ve vodě, tlak par, rozdělovací koeficient v půdě (nebo v sedimentu, je-li k dispozici), log K_{ow}, stálost ve vodě atd.).

— *Zkušební druh:*

— vědecký název, zdroj, případné předběžné ošetření, aklimatizace, kultivační podmínky atd.

— *Zkušební podmínky:*

— použitý zkušební postup (např. statický, semistatický nebo průtokový),

— uspořádání zkoušky (např. počet, materiál a velikost zkušebních komor, objem vody v nádobě, hmotnost a objem sedimentu v nádobě, (u semistatických a průtokových postupů: frekvence výměny objemu vody), jakékoli provzdušňování použité před zkouškou a během ní, počet opakování, počet jedinců v každém opakování na začátku expozice, počet zkušebních koncentrací, délka úpravy, doba dosažení rovnováhy a expozice, frekvence odběru vzorků),

— hloubka sedimentu a vody nad sedimentem,

— metoda předběžného ošetření zkoušené chemické látky a přidání/aplikace látky do sedimentu,

— nominální zkušební koncentrace, podrobnosti o odběrech vzorků pro chemickou analýzu a analytické metody, pomocí nichž byly stanoveny koncentrace zkoušené chemické látky,

— charakteristiky sedimentu, jak jsou popsány v odstavcích 24–25 a jakákoli další provedená měření; příprava uměle vytvořeného sedimentu,

— příprava zkušební vody (pokud se používá rekonstituovaná voda) a její charakteristiky (koncentrace kyslíku, pH, vodivost, tvrdost a jakákoli další provedená měření) před zahájením zkoušky,

— podrobné informace o krmení včetně typu krmiva, přípravy, množství a režimu krmení,

▼**M6**

— intenzita osvětlení a fotoperioda(y),

— metody použité ke stanovení všech biologických parametrů (např. odběr vzorků, pozorování, vážení zkušebních organismů) a všech abiotických parametrů (např. parametry kvality vody a sedimentu),

— objemy a/nebo hmotnosti všech vzorků pro chemickou analýzu,

— podrobné informace o expozici všech vzorků pro chemickou analýzu, včetně podrobností o přípravě, uchovávání, postupech přidání zkoušené chemické látky, extrakci a analytických postupech (a přesnosti), pokud jde o zkoušenou chemickou látku a její výtěžky.

— *Výsledky:*

— kvalita vody ve zkušebních nádobách (pH, teplota, koncentrace rozpuštěného kyslíku, tvrdost, koncentrace amoniaku a jakákoli další provedená měření),

— celkový obsah organického uhlíku (TOC), poměr hmotnosti sušiny k mokré hmotnosti, pH sedimentu a jakákoli další provedená měření,

— celkový počet a – pokud se stanovuje – také počet úplných a neúplných jedinců v každé zkušební komoře na konci zkoušky,

— hmotnost sušiny zkušebních organismů v každé zkušební komoře na konci zkoušky, a měří-li se, také hmotnost sušiny dílčího vzorku organismů na začátku zkoušky,

— jakékoli zpozorované abnormální chování v porovnání s kontrolami (např. vyhýbání se sedimentu, přítomnost nebo nepřítomnost pelet trusu),

— jakákoli pozorovaná mortalita,

— odhady cílových ukazatelů toxicity (např. EC_x, NOEC a/nebo LOEC) a statistické metody použité k jejich stanovení,

— nominální zkušební koncentrace, naměřené zkušební koncentrace a výsledky všech analýz pro stanovení koncentrace zkoušené chemické látky ve zkušebních nádobách,

— jakékoli odchylky od kritérií platnosti.

— *Vyhodnocení výsledků:*

— soulad výsledků s kritérii platnosti uvedenými v odstavci 13,

— diskuse o výsledcích včetně případného vlivu na výsledek zkoušky v důsledku odchylek od této zkušební metody.

LITERATURA

1) EC (2003). Technical Guidance Document in support of Commission Directive 93/67/EEC on Risk Assessment for new notified substances, Commission Regulation (EC) No 1488/94 on Risk Assessment for existing substances and Directive 98/8/EC of the European Parliament and of the Council concerning the placing of biocidal products on the market; Part I – IV. Office for Official Publications of the EC (European Commission), Luxembourg.

2) OECD (1992a). Report of the OECD workshop on effects assessment of chemicals in sediment. OECD Monographs No. 60. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), Paris.

▼**M6**

3) ASTM International (2000). Standard guide for the determination of the bioaccumulation of sediment-associated contaminants by benthic invertebrates, E 1688-00a. In ASTM International 2004 Annual Book of Standards. Volume 11.05. Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides. ASTM International, West Conshohocken, PA.

4) ASTM International (2002). Standard Test Method for Measuring the Toxicity of Sediment-Associated Contaminants with Freshwater Invertebrates, E1706-00. In ASTM International 2004 Annual Book of Standards. Volume 11.05. Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides. ASTM International, West Conshohocken, PA.

5) Phipps, G.L., Ankley, G.T., Benoit, D.A. and Mattson, V.R. (1993). Use of the aquatic Oligochaete *Lumbriculus variegatus* for assessing the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants. Environ.Toxicol. Chem. 12, 269-279.

6) Kapitola C.27 této přílohy, „Zkouška toxicity pro chironomidy v systému sediment-voda za použití sedimentu se známým přídavkem zkoušené chemické látky“.

7) US EPA (2000). Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates. Second Edition. EPA 600/R-99/064, U.S. Environmental Protection Agency, Duluth, MN, March 2000.

8) Environment Canada (1997). Test for Growth and Survival in Sediment using Larvae of Freshwater Midges (*Chironomus tentans* or *Chironomus riparius*). Biological Test Method. Report SPE 1/RM/32. December 1997.

9) Hill, I.R., Matthiessen, P., Heimbach, F. (eds), 1993, Guidance document on Sediment Toxicity Tests and Bioassays for freshwater and Marine Environments, From the SETAC-Europe Workshop On Sediment Toxicity Assessment, 8-10 November 1993, Renesse (NL).

10) BBA (1995). Long-term toxicity test with *Chironomus riparius*: Development and validation of a new test system. Edited by M. Streloke and H.Köpp. Berlin 1995.

11) Riedhammer C. & B. Schwarz-Schulz (2001). The Newly Proposed EU Risk Assessment Concept for the Sediment Compartment. J. Soils Sediments 1(2), 105-110.

12) ASTM International (2004). Standard guide for collection, storage, characterisation, and manipulation of sediment for toxicological testing and for selection of samplers used to collect benthic invertebrates. American Society for Testing and Materials, E 1391-03.

13) Egeler, Ph., Meller, M., Schallnaß, H.J. & Gilberg, D. (2005). Validation of a sediment toxicity test with the endobenthic aquatic oligochaete *Lumbriculus variegatus* by an international ring test. In co-operation with R. Nagel and B. Karaoglan. Report to the Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Berlin), R&D No.: 202 67 429.

14) OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 23.

15) Environment Canada (2003). Guidance Document on Statistical Methods for Environmental Toxicity Tests; fifth draft, March 2003; Report EPS 1/RM/___

16) Nikkilä A., Halme A., Kukkonen J.V.K. (2003). Toxicokinetics, toxicity and lethal body residues of two chlorophenols in the oligochaete worm, *Lumbriculus variegatus*, in different sediments. Chemosphere 51: 35-46.

17) Baily H.C., & Liu D.H.W. (1980). *Lumbriculus variegatus*, a Benthic Oligochaete, as a Bioassay Organism. p. 205-215. In J.C. Eaton, P.R. Parrish, and A.C. Hendricks (eds). Aquatic Toxicology, ASTM STP 707. American Society for Testing and Materials.

▼**M6**

18) Chapman K. K., Benton M. J., Brinkhurst R. O. & Scheuerman P. R. (1999). Use of the aquatic oligochaetes *Lumbriculus variegatus* and *Tubifex tubifex* for assessing the toxicity of copper and cadmium in a spiked-artificial-sediment toxicity test. Environmental Toxicology. 14(2): 271-278.

19) Meyer J.S., Boese C.J. & Collyard S.A. (2002). Whole-body accumulation of copper predicts acute toxicity to an aquatic oligochaete (*Lumbriculus variegatus*) as pH and calcium are varied. Comp. Biochem. Physiol. Part C 133:99-109.

20) Schubauer-Berigan M.K., Dierkes J.R., Monson P.D. & Ankley G.T. (1993). pH-dependent toxicity of cadmium, copper, nickel, lead and zinc to *Ceriodaphnia dubia*, *Pimephales promelas*, *Hyalella azteca* and *Lumbriculus variegatus*. Environ. Toxciol. Chem. 12(7):1261-1266.

21) West, C.W., V.R. Mattson, E.N. Leonard, G.L. Phipps & G.T. Ankley (1993). Comparison of the relative sensitivity of three benthic invertebrates to copper-contaminated sediments from the Keweenaw Waterway. Hydrobiol. 262:57-63.

22) Ingersoll, C.G., Ankley, G.T., Benoit D.A., Brunson, E.L., Burton, G.A., Dwyer, F.J., Hoke, R.A., Landrum, P. F., Norberg-King, T. J. and Winger, P.V. (1995). Toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants using freshwater invertebrates: A review of methods and applications. Environ. Toxicol. Chem. 14, 1885-1894.

23) Kukkonen, J. and Landrum, P.F. (1994). Toxicokinetics and toxicity of sediment-associated Pyrene to *Lumbriculus variegatus* (Oligochaeta). Environ. Toxicol. Chem. 13, 1457-1468.

24) Leppänen, M.T. & Kukkonen, J.V.K. (1998a). Relationship between reproduction, sediment type and feeding activity of *Lumbriculus variegatus* (Müller): Implications for sediment toxicity testing. Environ. Toxicol. Chem. 17: 2196-2202.

25) Leppänen, M.T. & Kukkonen, J.V.K. (1998b). Factors affecting feeding rate, reproduction and growth of an oligochaete *Lumbriculus variegatus* (Müller). Hydrobiologia 377: 183-194.

26) Landrum, P.F., Gedeon, M.L., Burton, G.A., Greenberg. M.S., & Rowland, C.D. (2002). Biological Responses of *Lumbriculus variegatus* Exposed to Fluoranthene-Spiked Sediment. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 42: 292-302.

27) Brunson, E.L., Canfield, T.J., Ingersoll, C.J. & Kemble, N.E. (1998). Assessing the bioaccumulation of contaminants from sediments of the Upper Mississippi river using field-collected oligochaetes and laboratory-exposed *Lumbriculus variegatus*. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 35, 191-201.

28) Ingersoll, C.G., Brunson, E.L., Wang N., Dwyer, F.J., Ankley, G.T., Mount D.R., Huckins J., Petty. J. and Landrum, P. F. (2003). Uptake and depuration of non-ionic organic contaminants from sediment by the oligochaete, *Lumbriculus variegatus*. Environmental Toxicology and Chemistry 22, 872-885.

29) Rodriguez, P. & Reynoldson, T.B. (1999). Laboratory methods and criteria for sediment bioassessment. In: A. Mudroch, J.M. Azcue & P. Mudroch (eds.): Manual of Bioassessment of aquatic sediment quality. Lewis Publishers, Boca Raton, CRC Press LLC.

30) Liebig, M., Egeler, Ph. Oehlmann, J., & Knacker, Th. (2005). Bioaccumulation of ^{14}C-17α-ethinylestradiol by the oligochaete *Lumbriculus variegatus* in artificial sediment. Chemosphere 59, 271-280.

31) Brust, K., O. Licht, V. Hultsch, D. Jungmann & R. Nagel (2001). Effects of Terbutryn on Aufwuchs and *Lumbriculus variegatus* in Artificial Indoor Streams. Environ. Toxicol. Chemistry, Vol. 20, pp. 2000–2007.

32) Oetken, M., K.-U. Ludwichowski & R. Nagel (2000). Sediment tests with *Lumbriculus variegatus* and *Chironomus riparius* and 3,4-dichloroaniline (3,4-DCA) within the scope of EG-AltstoffV. By order of the Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Berlin), FKZ 360 12 001, March 2000.

▼**M6**

33) Leppänen M.T. & Kukkonen J.V.K. (1998). Relative importance of ingested sediment and porewater as bioaccumulation routes for pyrene to oligochaete (*Lumbriculus variegatus*, Müller). Environ. Sci. Toxicol. 32, 1503-1508.

34) Dermott R. & Munawar M. (1992). A simple and sensitive assay for evaluation of sediment toxicity using *Lumbriculus variegatus* (Müller). Hydrobiologia 235/236: 407-414.

35) Drewes C.D. & Fourtner C.R. (1990). Morphallaxis in an aquatic oligochaete, *Lumbriculus variegatus*: Reorganisation of escape reflexes in regenerating body fragments. Develop. Biol. 138: 94-103.

36) Brinkhurst, R.O. (1971). A guide for the identification of British aquatic oligochaeta. Freshw. Biol. Assoc., Sci. Publ. No. 22.

37) Kapitola C.1 této přílohy, Zkouška akutní toxicity pro ryby.

38) OECD (1992c). Guidelines for Testing of Chemicals No. 210. Fish, Early-life Stage Toxicity Test. OECD, Paris.

39) Egeler, Ph., Römbke, J., Meller, M., Knacker, Th., Franke, C., Studinger, G. & Nagel, R. (1997). Bioaccumulation of lindane and hexachlorobenzene by tubificid sludgeworms (Oligochaeta) under standardised laboratory conditions. Chemosphere 35, 835-852.

40) Meller, M., P. Egeler, J. Roembke, H. Schallnass, R. Nagel and B. Streit. (1998). Short-term Toxicity of Lindane, Hexachlorobenzene and Copper Sulphate on Tubificid Sludgeworms (Oligochaeta) in Artificial Media. Ecotox. and Environ. Safety, 39, 10-20.

41) Egeler, Ph., Römbke, J., Knacker, Th., Franke, C. & Studinger, G. (1999). Workshop on „Bioaccumulation: Sediment test using benthic oligochaetes“, 26.-27.04.1999, Hochheim/Main, Germany. Report on the R+D-project No. 298 67 419, Umweltbundesamt, Berlin.

42) Suedel, B.C. and Rodgers, J.H. (1993). Development of formulated reference sediments for freshwater and estuarine sediment testing. Environ. Toxicol. Chem. 13, 1163-1175.

43) Naylor, C. and C. Rodrigues. (1995). Development of a test method for *Chironomus riparius* using a formulated sediment. Chemosphere 31: 3291-3303.

44) Kaster, J.L., Klump, J.V., Meyer, J., Krezoski, J. & Smith, M.E. (1984). Comparison of defecation rates of *Limnodrilus hoffmeisteri* using two different methods. Hydrobiologia 11, 181-184.

45) Martinez-Madrid, M., Rodriguez, P., Perez-Iglesias, J.I. & Navarro, E. (1999). Sediment toxicity bioassays for assessment of contaminated sites in the Nervion river (Northern Spain). 2. *Tubifex tubifex* (Müller) reproduction sediment bioassay. Ecotoxicology 8, 111-124.

46) Environment Canada (1995). Guidance document on measurement of toxicity test precision using control sediments spiked with a reference toxicant. Environmental Protection Series Report EPS 1/RM/30.

47) Landrum, P.F. (1989). Bioavailability and toxicokinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons sorbed to sediments for the amphipod *Pontoporeia hoyi*. Environ. Sci. Technol. 23, 588-595.

48) Brooke, L.T., Ankley, G.T., Call, D.J. & Cook, P.M. (1996). Gut content and clearance for three species of freshwater invertebrates. Environ. Toxicol. Chem. 15, 223-228.

49) Mount, D.R., Dawson, T.D. & Burkhard, L.P. (1999). Implications of gut purging for tissue residues determined in bioaccumulation testing of sediment with *Lumbriculus variegatus*. Environ. Toxicol. Chem. 18, 1244-1249.

▼**M6**

50) OECD 2006. Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: A guidance to application. OECD Series on Testing and Assessment No. 54, OECD, Paris, France.

51) Liebig M., Meller M. & Egeler P. (2004). Sedimenttoxizitätstests mit aquatischen Oligochaeten – Einfluss verschiedener Futterquellen im künstlichen Sediment auf Reproduktion und Biomasse von *Lumbriculus variegatus*. Proceedings 5/2004: Statusseminar Sedimentkontakttests. March 24-25, 2004. BfG (Bundesanstalt für Gewässerkunde), Koblenz, Germany. pp. 107-119.

Další literatura o statistických postupech:

Dunnett,C.W. (1955). A multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control. Amer. Statist. Ass. J. 50, 1096-1121.

Dunnett,C.W. (1964). New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics 20, 482-491.

Finney, D.J. (1971). Probit Analysis (3rd ed.), pp. 19-76. Cambridge Univ. Press.

Finney, D.J. (1978). Statistical Method in Biological Assay. Charles Griffin & Company Ltd, London.

Hamilton, M.A., R.C. Russo and R.V. Thurston. (1977). Trimmed Spearman-Karber Method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. Environ. Sci. Technol. 11(7), 714-719; Correction: Environ. Sci. Technol. 12 (1998), 417.

Holm, S. (1979). A simple sequentially rejective multiple test procedure. Scand. J. Statist. 6, 65-70.

Sokal, R.R. and F.J. Rohlf. (1981) Biometry. The principles and practice of statistics in biological research. 2nd edition. W.H. Freeman and Company. New York.

Miller, R.G., Jr. (1986). Beyond ANOVA, basics of applied statistics. John Wiley & Sons. New York.

Shapiro S.S. & Wilk M.B (1965). An analysis of variance test for normality (complete samples). Biometrika 52: 591-611.

Williams, D.A. (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics 27, 103-117.

Williams, D.A. (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics 28, 519-531.

▼M6

Dodatek 1

Definice

Pro účely této zkušební metody se použijí tyto definice:

Chemickou látkou se rozumí látka nebo směs.

Období stabilizace se používá k ustálení mikrobiální složky sedimentu a k odstranění např. amoniaku pocházejícího ze složek sedimentu. Probíhá před přidáním zkoušené chemické látky do sedimentu. Po uplynutí období stabilizace se voda nad sedimentem obvykle zlikviduje.

EC_x je koncentrace zkoušené chemické látky v sedimentu, která vede k x % (např. 50 %) účinku na biologický parametr během stanoveného období expozice.

Období dosahování rovnováhy (ekvilibrace) slouží k tomu, aby se zkoušená chemická látka mohla rozdělit mezi pevnou fázi, kapilární vodu a vodu nad sedimentem. Probíhá po přidání zkoušené chemické látky do sedimentu a před přidáním zkušebních organismů.

Fáze expozice je doba, během níž jsou zkušební organismy vystaveny zkoušené chemické látce.

Uměle vytvořený sediment neboli rekonstituovaný, umělý či syntetický sediment je směs materiálů použitá k napodobení fyzických složek přírodního sedimentu.

Nejnižší koncentrace s pozorovaným účinkem (LOEC) je nejnižší zkušební koncentrace zkoušené chemické látky, při níž je pozorován významný toxický účinek zkoušené látky ve srovnání s kontrolou (při $p \leq 0,05$). Všechny zkušební koncentrace vyšší než LOEC však musí mít stejný nebo větší účinek, než je účinek pozorovaný při koncentraci LOEC. Nelze-li tyto dvě podmínky splnit, musí být podrobně vysvětleno, jak byla zvolena hodnota LOEC (a tedy i NOEC).

Koncentrace bez pozorovaných účinků (NOEC) je zkušební koncentrace bezprostředně nižší než LOEC, která při srovnání s kontrolou nemá pro danou dobu expozice statisticky významný účinek (při $p \leq 0,05$).

Rozdělovací koeficient oktanol-voda (K_{ow}; někdy se vyjadřuje jako P_{ow}) je poměr rozpustnosti chemické látky v n-oktanolu a vodě v rovnovážném stavu a vyjadřuje lipofilitu chemické látky (kapitola A.24 této přílohy). Hodnota K_{ow} nebo logaritmus K_{ow} (log K_{ow}) se používá jako ukazatel možné bioakumulace dané chemické látky vodními organismy.

Rozdělovací koeficient organický uhlík/voda (K_{oc}) je rovnovážný poměr mezi koncentrací chemické látky v/na frakci organického uhlíku v sedimentu a koncentrací chemické látky ve vodě.

Voda nad sedimentem je voda nacházející se nad sedimentem ve zkušební nádobě.

Kapilární voda nebo intersticiální voda je voda zaplňující prostor mezi částicemi sedimentu či půdy.

Sediment se známým přídavkem chemické látky (spiked sediment) je sediment, do něhož byla přidána zkoušená chemická látka.

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

▼M6

Dodatek 2

SLOŽENÍ DOPORUČENÉ REKONSTITUOVANÉ VODY

(převzato z kapitoly C.1 této přílohy (1))

a) *Roztok chloridu vápenatého dihydrátu*

Rozpusťte 11,76 g $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ v deionizované vodě a doplňte na objem 1 l deionizovanou vodou.

b) *Roztok síranu hořečnatého heptahydrátu*

Rozpusťte 4,93 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ v deionizované vodě a doplňte na objem 1 l deionizovanou vodou.

c) *Roztok hydrogenuhličitanu sodného*

Rozpusťte 2,59 g $NaHCO_3$ v deionizované vodě a doplňte na objem 1 l deionizovanou vodou.

d) *Roztok chloridu draselného*

Rozpusťte 0,23 g KCl v deionizované vodě a doplňte na objem 1 l deionizovanou vodou.

Všechny chemikálie musí být čistoty p.a.

Vodivost destilované nebo deionizované vody by neměla přesahovat 10 μScm^{-1}.

Smísí se 25 ml od každého roztoku a) až d) a celkový objem se doplní na 1 l deionizovanou vodou. Celkové množství iontů vápníku a hořčíku v těchto roztocích činí 2,5 mmol/l.

Poměr iontů Ca:Mg je 4:1 a iontů Na:K je 10:1. Kyselinová neutralizační kapacita $K_{S4.3}$ tohoto roztoku je 0,8 mmol/l.

Provzdušňujte ředicí vodu, dokud nebude saturována kyslíkem, a poté ji před použitím skladujte přibližně dva dny bez dalšího provzdušňování.

LITERATURA

(1) Kapitola C.1 této přílohy, Zkouška akutní toxicity pro ryby.

▼**M6**

Dodatek 3

Fyzikálně-chemické parametry přijatelné ředicí vody

Složka	Koncentrace
Pevné částice	< 20 mg/l
Celkový obsah organického uhlíku	< 2 µg/l
Neionizovaný amoniak	< 1 µg/l
Zbytkový chlor	< 10 µg/l
Celkové organofosforové pesticidy	< 50 ng/l
Celkové organochlorové pesticidy a polychlorované bifenyly	< 50 ng/l
Celkový organický chlor	< 25 ng/l
(převzato z OECD (1992) (1))	

LITERATURA

1) OECD (1992). Guidelines for Testing of Chemicals No. 210. Fish, Early-life Stage Toxicity Test. OECD, Paris.

▼M6

Dodatek 4

Doporučený umělý sediment – pokyny k přípravě a uchovávání

Složky sedimentu

Složka	Vlastnosti	% hmotnosti sušiny sedimentu
Rašelina	Sfagnová rašelina, stupeň rozkladu: „střední“, vysušená na vzduchu, bez viditelných zbytků rostlin, jemně mletá (velikost částic ≤ 0,5 mm)	5 ± 0,5
Křemenný písek	Velikost zrn: ≤ 2 mm, ale > 50 % částic by se mělo nacházet v rozmezí 50–200 µm	75–76
Kaolinitický jíl	Obsah kaolinitu ≥ 30 %	20 ± 1
Zdroj potravy	Např. list kopřivy v prášku (Folia urticae), listy Urtica dioica (kopřiva dvoudomá), jemně mleté (velikost částic ≤ 0,5 mm), v souladu s lékárenskými normami, pro lidskou spotřebu; jako přídavek k suchému sedimentu	0,4–0,5 %
Organický uhlík	Upraven přidáním rašeliny a písku	2 ± 0,5
Uhličitan vápenatý	$CaCO_3$, v práškové formě, chemicky čistý, jako přídavek k suchému sedimentu	0,05–1
Deionizovaná voda	Vodivost ≤ 10 µS/cm, jako přídavek k suchému sedimentu	30–50

Poznámka: Očekávají-li se zvýšené koncentrace amoniaku, např. je-li známo, že zkoušená chemická látka inhibuje nitrifikaci, může být vhodné nahradit 50 % kopřivového prášku bohatého na dusík celulózou (např. práškem α-celulózy, chemicky čistým, s velikostí částic ≤ 0,5 mm; (1) (2)).

Příprava

Rašelina se usuší na vzduchu a rozemele na jemný prášek. Pomocí vysoce výkonného homogenizačního zařízení se připraví suspenze požadovaného množství rašelinného prášku v deionizované vodě. pH této suspenze se upraví na 5,5 ± 0,5 pomocí $CaCO_3$. Suspenze se stabilizuje po dobu nejméně dvou dní za mírného promíchávání při 20 ± 2 °C za účelem ustálení pH a vytvoření stabilní mikrobiální složky. Poté se opět změří pH, které by mělo být 6,0 ± 0,5. Pak se suspenze rašeliny smísí s ostatními složkami (písek a kaolinitický jíl) a s deionizovanou vodou s cílem získat homogenní sediment s obsahem vody v rozmezí 30–50 procent sušiny sedimentu. Znovu se změří pH konečné směsi a v případě nutnosti se opět upraví pomocí $CaCO_3$ na hodnotu 6,5 až 7,5. Pokud se však očekává vznik amoniaku, může být vhodné udržovat pH sedimentu pod hodnotou 7,0 (např. v rozmezí 6,0–6,5). Odeberou se vzorky sedimentu pro stanovení obsahu sušiny a obsahu organického uhlíku. Pokud se předpokládá vznik amoniaku, je možné uměle vytvořený sediment stabilizovat po dobu sedmi dnů za stejných podmínek, jaké převažují v následující zkoušce (např. poměr sediment-voda 1:4, výška vrstvy sedimentu stejná jako ve zkušebních nádobách) před přidáním zkoušené chemické látky, tj. sediment by se měl přelít vodou, která by se měla provzdušňovat. Na konci tohoto období stabilizace by se měla voda nad sedimentem odstranit a zlikvidovat. Poté se do sedimentu vmíchá křemenný písek s přidanou zkoušenou chemickou látkou pro každou úroveň

▼M6

expozice, sediment se rozdělí do zkušebních nádob jednotlivých opakování a přelije se zkušební vodou. Poté se nádoby inkubují za stejných podmínek, jaké budou převládat v následující zkoušce. V tomto okamžiku začíná období dosahování rovnováhy. Voda nad sedimentem by se měla provzdušňovat.

Vybraný zdroj potravy by se měl přidat do sedimentu před přidáním zkoušené chemické látky nebo během něj. Je možné smíchat ho na počátku se suspenzí rašeliny (viz výše). Nicméně je třeba předejít nadměrnému rozkladu zdroje potravy před přidáním zkušebních organismů – např. v případě dlouhého období dosažení rovnováhy – udržováním co možná nejkratší doby od přidání potravy do začátku expozice. Aby se zajistilo, že potrava rovněž obsahuje zkoušenou chemickou látku, měl by se zdroj potravy smísit se sedimentem nejpozději v den přidání zkoušené chemické látky do sedimentu.

Skladování

Suché složky pro přípravu umělého sedimentu lze skladovat na suchém a chladném místě při pokojové teplotě. Připravený sediment s přidanou zkoušenou chemickou látkou by se měl okamžitě použít ve zkoušce. Vzorky sedimentu s přidanou zkoušenou chemickou látkou lze uchovávat za podmínek doporučených pro konkrétní zkoušenou chemickou látku až do provedení analýzy.

LITERATURA

1) Egeler, Ph., Meller, M., Schallnaß, H.J. & Gilberg, D. (2005). Validation of a sediment toxicity test with the endobenthic aquatic oligochaete *Lumbriculus variegatus* by an international ring test. In co-operation with R. Nagel and B. Karaoglan. Report to the Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Berlin), R&D No.: 202 67 429.

2) Liebig M., Meller M. & Egeler P. (2004). Sedimenttoxizitätstests mit aquatischen Oligochaeten – Einfluss verschiedener Futterquellen im künstlichen Sediment auf Reproduktion und Biomasse von *Lumbriculus variegatus*. Proceedings 5/2004: Statusseminar Sedimentkontakttests. March 24-25, 2004. BfG (Bundesanstalt für Gewässerkunde), Koblenz, Germany. pp. 107-119.

▼M6

Dodatek 5

Metody kultivace Lumbriculus variegatus

Druh *Lumbriculus variegatus* (MÜLLER), čeleď Lumbriculidae (žížalicovití), třída Oligochaeta (máloštětinatci) žije ve sladkovodních sedimentech a je široce používán v ekotoxikologických zkouškách. Lze jej snadno kultivovat v laboratorních podmínkách. V následujícím textu je uveden přehled kultivačních metod.

Metody kultivace

Kultivační podmínky *Lumbriculus variegatus* jsou podrobně uvedeny v Phipps et al. (1993) (1), Brunson et al. (1998) (2), ASTM (2000) (3), U.S. EPA (2000) (4). Níže je uveden krátký souhrn těchto podmínek. Hlavní výhodou *L. variegatus* je jeho rychlá reprodukce vedoucí k rychlému nárůstu biomasy v populacích kultivovaných v laboratoři (např. (1), (3), (4), (5)).

Zkušební organismy lze kultivovat ve velkých akváriích (57–80 l) při teplotě 23 °C s fotoperiodou 16 h světlo:8 hodin tma (100–1 000 lx) s použitím každodenně obměňované přírodní vody (45–50 l na akvárium). Substrát se připraví nastříháním nebělených utěrek z hnědého papíru na proužky, které lze několik sekund mixovat s kultivační vodou, aby vznikly malé kousky papírového substrátu. Tento substrát lze poté rovnou použít v kultivačních akváriích pro *Lumbriculus*, jejichž dno se substrátem pokryje, nebo jej lze uchovávat zmrazený v deionizované vodě pro pozdější použití. Nový substrát v nádrži obvykle vydrží přibližně dva měsíce.

Každá kultura se zahajuje na počtu 500–1 000 jedinců a krmí se 10 ml suspenze obsahující 6 g krmiva pro mladé lososovité ryby třikrát týdně za obnovovacích nebo průtokových podmínek. Statické nebo semistatické kultury by měly dostat méně potravy, aby se zabránilo růstu bakterií a hub.

Za těchto podmínek se počet jedinců v kultuře obvykle zdvojnásobí za přibližně 10 až 14 dnů.

Jinak lze *Lumbriculus variegatus* rovněž kultivovat v systému složeném z vrstvy křemenného písku, jaký se používá pro umělý sediment, (hloubka 1–2 cm) a rekonstituované vody. Jako kultivační nádoby lze použít nádoby ze skla nebo nerezové oceli o výšce 12 až 20 cm. Voda nad sedimentem by se měla jemně provzdušňovat (např. 2 bubliny za sekundu) pomocí Pasteurovy pipety umístěné přibližně 2 cm nad povrchem sedimentu. Aby se zabránilo hromadění např. amoniaku, měla by se voda nad sedimentem měnit pomocí průtokového systému nebo alespoň jednou týdně ručně. Máloštětinatce lze chovat při pokojové teplotě s fotoperiodou 16 hodin světla (o intenzitě 100–1 000 lx) a 8 hodin tmy. V semistatické kultuře (výměna vody jednou týdně) se krmí krmivem TetraMin dvakrát týdně (např. 0,6–0,8 mg na jeden cm^2 povrchu sedimentu), které lze aplikovat jako suspenzi 50 mg TetraMin na jeden ml deionizované vody.

Lumbriculus variegatus lze z kultur odebrat např. přenesením substrátu v síti s malými oky nebo přenesením organismů pomocí skleněné pipety s širokou špičkou (přibližně o průměru 5 mm) protažené plamenem do zvláštní kádinky. Pokud se do této kádinky přenese zároveň i nějaký substrát, nechá se kádinka obsahující zkušební organismy a substrát přes noc za průtokových podmínek, čímž se z ní substrát odstraní, zatímco organismy zůstanou na dně nádoby. Poté je lze přenést do nově připravených kultivačních nádrží nebo dále zpracovat pro účely zkoušky, jak je popsáno v (3) a (4) nebo v následujícím textu.

Při použití *L. variegatus* ve zkouškách sedimentu je nutné velmi kriticky pohlížet na jeho způsob rozmnožování (architomie čili morfalaxe, např. (6)). Toto nepohlavní rozmnožování vede ke vzniku dvou fragmentů, které po určitou dobu nepřijímají potravu, dokud nedojde k regeneraci hlavové nebo ocasní části (např. (7), (8)). To znamená, že k expozici *L. variegatus* požíráním kontaminovaného sedimentu nedochází kontinuálně.

▼M6

Proto by se měla provést synchronizace, aby se minimalizovalo nekontrolované rozmnožování a regenerace a následná vysoká variabilita výsledků zkoušky. K této variabilitě může dojít, když jsou někteří jedinci, kteří se rozdělili, a proto po určité časové období nepřijímají potravu, méně vystaveni zkoušené chemické látce než jedinci, u nichž během zkoušky nedošlo k dělení (9), (10), (11). 10 až 14 dní po začátku expozice by se měly organismy uměle fragmentovat (synchronizace). K synchronizaci by se měli vybrat velcí (dospělí) jedinci, kteří pokud možno nevykazují známky nedávné morfalaxe. Tyto jedince je možné umístit na skleněné sklíčko do kapky kultivační vody a poté přeříznout ve střední části těla skalpelem. Je třeba dbát na to, aby zadní konce měly přibližně stejnou délku. Zadní konce se nechají zregenerovat v kultivační nádobě obsahující stejný substrát, který byl použit ke kultivaci, a rekonstituovanou vodu a pak je zahájena expozice. Známkou toho, že došlo k regeneraci nových hlavových částí, je, když se synchronizovaní jedinci zavrtávají do substrátu (přítomnost regenerovaných hlavových částí lze potvrdit prohlédnutím reprezentativního dílčího vzorku pod binokulárním mikroskopem). Očekává se, že se zkušební organismy poté nacházejí v podobném fyziologickém stavu. To znamená, že pokud během zkoušky dojde k rozmnožování synchronizovaných jedinců morfalaxí, očekává se, že budou prakticky všichni živočichové vystaveni sedimentu s přidanou zkoušenou chemickou látkou stejně. Krmení synchronizovaných jedinců by se mělo provést, jakmile se začnou zavrtávat do substrátu, nebo 7 dnů po přeříznutí. Režim krmení by měl být zhruba stejný jako u běžných kultur, ale je vhodné krmit synchronizované jedince stejným zdrojem potravy, jaký se použije ve zkoušce. Zkušební organismy by se měly udržovat při zkušební teplotě 20 ± 2 °C. Po regeneraci by se měli ke zkoušce použít neporušení úplní jedinci, kteří na jemný mechanický stimul reagují aktivním plaváním nebo plazením. Je třeba zabránit poranění nebo oddělení části těla živočichů, např. používáním pipet s otavenými hranami nebo zubních háčků z nerezové oceli při manipulaci s nimi.

Zdroje startovacích kultur *Lumbriculus variegatus* (adresy v USA převzaty z (4))

Evropa

ECT Oekotoxikologie GmbH
Böttgerstr. 2-14
D-65439 Flörsheim/Main
Německo

Bayer Crop Science AG
Development – Ecotoxicology
Alfred-Nobel-Str. 50
D-40789 Monheim
Německo

University of Joensuu
Laboratory of Aquatic Toxicology
Dept. of Biology
Yliopistokatu 7, P.O. Box 111
FIN-80101 Joensuu
Finsko

Dresden University of Technology
Institut für Hydrobiologie
Fakultät für Forst-, Geo- und Hydrowissenschaften
Mommsenstr. 13
D-01062 Dresden
Německo

C.N.R.- I.R.S.A.
Italian National Research Council
Water Research Institute
Via del Mulino 19
I-20047 Brugherio (MB)
Itálie

U.S.A.

U.S. Environmental Protection Agency
Mid-Continent Ecological Division
6201 Congdon Boulevard
Duluth, MN 55804

Michigan State University
Department of Fisheries and Wildlife
No. 13 Natural Resources Building
East Lansing, MI 48824-1222

▼**M6**

U.S. Environmental Protection Agency
Environmental Monitoring System Laboratory
26 W. Martin Luther Dr.
Cincinnati, OH 45244

Wright State University
Institute for Environmental Quality
Dayton, OH 45435

Columbia Environmental Research Center
U.S. Geological Survey
4200 New Haven Road
Columbia, MO 65201

Great Lakes Environmental Research Laboratory, NOAA
2205 Commonwealth Boulevard
Ann Arbor, MI 48105-1593

LITERATURA

1) Phipps, G.L., Ankley, G.T., Benoit, D.A. and Mattson, V.R. (1993). Use of the aquatic Oligochaete *Lumbriculus variegatus* for assessing the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants. Environ.Toxicol. Chem. 12, 269-279.

2) Brunson, E.L., Canfield, T.J., Ingersoll, C.J. & Kemble, N.E. (1998). Assessing the bioaccumulation of contaminants from sediments of the Upper Mississippi river using field-collected oligochaetes and laboratory-exposed *Lumbriculus variegatus*. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 35, 191-201.

3) ASTM International (2000). Standard guide for the determination of the bioaccumulation of sediment-associated contaminants by benthic invertebrates, E 1688-00a. In ASTM International 2004 Annual Book of Standards. Volume 11.05. Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides. ASTM International, West Conshohocken, PA.

4) US EPA (2000). Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates. Second Edition. EPA 600/R-99/064, U.S. Environmental Protection Agency, Duluth, MN, March 2000.

5) Kukkonen, J. and Landrum, P.F. (1994). Toxicokinetics and toxicity of sediment-associated Pyrene to Lumbriculus variegatus (Oligochaeta). Environ. Toxicol. Chem. 13, 1457-1468.

6) Drewes C.D. & Fourtner C.R. (1990). Morphallaxis in an aquatic oligochaete, Lumbriculus variegatus: Reorganisation of escape reflexes in regenerating body fragments. Develop. Biol. 138: 94-103.

7) Leppänen, M.T. & Kukkonen, J.V.K. (1998a). Relationship between reproduction, sediment type and feeding activity of Lumbriculus variegatus (Müller): Implications for sediment toxicity testing. Environ. Toxicol. Chem. 17: 2196-2202.

8) Leppänen, M.T. & Kukkonen, J.V.K. (1998b). Factors affecting feeding rate, reproduction and growth of an oligochaete Lumbriculus variegatus (Müller). Hydrobiologia 377: 183-194.

9) Brust, K., O. Licht, V. Hultsch, D. Jungmann & R. Nagel (2001). Effects of Terbutryn on Aufwuchs and Lumbriculus variegatus in Artificial Indoor Streams. Environ. Toxicol. Chemistry, Vol. 20, pp. 2000–2007.

10) Oetken, M., K.-U. Ludwichowski & R. Nagel (2000). Sediment tests with Lumbriculus variegatus and Chironomus riparius and 3,4-dichloroaniline (3,4-DCA) within the scope of EG-AltstoffV. By order of the Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Berlin), FKZ 360 12 001, March 2000.

11) Leppänen M.T. & Kukkonen J.V.K. (1998). Relative importance of ingested sediment and porewater as bioaccumulation routes for pyrene to oligochaete (*Lumbriculus variegatus*, Müller). Environ. Sci. Toxicol. 32, 1503-1508.

▼M6

Dodatek 6

Souhrn výsledků okružního testu

„Zkouška toxicity sedimentu s *Lumbriculus variegatus*“

Tabulka 1

Výsledky jednotlivých sérií okružního testu: Průměrný počet jedinců v kontrolách a kontrolách s rozpouštědlem na konci testu; SD = směrodatná odchylka; CV = variační koeficient.

	průměrný počet jedinců v kontrolách	SD	CV (%)	n	průměrný počet jedinců v kontrolách s rozpouštědlem	SD	CV (%)	n
	32,3	7,37	22,80	3	**39,0**	3,61	9,25	3
	40,8	6,55	16,05	6	**36,0**	5,29	14,70	3
	41,5	3,54	8,52	2	**38,5**	7,05	18,31	4
	16,3	5,99	36,67	6	**30,8**	6,70	21,80	4
	24,3	10,6-9	43,94	3	**26,3**	3,06	11,60	3
	28,5	8,29	29,08	4	**30,7**	1,15	3,77	3
	28,3	3,72	13,14	6	**28,8**	2,56	8,89	6
	25,3	5,51	21,74	3	**27,7**	1,53	5,52	3
	23,8	2,99	12,57	4	**21,3**	1,71	8,04	4
	36,8	8,80	23,88	6	**35,0**	4,20	11,99	6
	33,0	3,58	10,84	6	**33,5**	1,73	5,17	4
	20,7	2,73	13,22	6	**15,0**	6,68	44,56	4
	42,0	7,07	16,84	6	**43,7**	0,58	1,32	3
	18,2	3,60	19,82	6	**21,7**	4,04	18,65	3
	32,0	3,95	12,34	6	**31,3**	4,79	15,32	4
mezilaboratorní průměr	**29,59**		**20,10**		**30,61**		**13,26**	
SD	**8,32**		**10,03**		**7,57**		**10,48**	
n	**15**				**15**			
min	**16,3**				**15,0**			
max	**42,0**				**43,7**			
CV (%)	**28,1**				**24,7**			

▼M6

Tabulka 2

Výsledky jednotlivých sérií okružního testu: Průměrná celková hmotnost sušiny organismů na opakování v kontrolách a kontrolách s rozpouštědlem na konci testu; SD = směrodatná odchylka; CV = variační koeficient.

	celková hmotnost sušiny organismů na opakování (kontroly)	SD	CV (%)	n	celková hmotnost sušiny organismů na opakování (kontroly s rozpouštědlem)	SD	CV (%)	n
	24,72	6,31	25,51	3	27,35	4,08	14,93	3
	30,17	2,04	6,75	6	33,83	10,40	30,73	3
	23,65	3,61	15,25	2	28,78	4,68	16,28	4
	12,92	6,83	52,91	6	24,90	6,84	27,47	4
	21,31	4,17	19,57	3	25,87	5,30	20,49	3
	22,99	4,86	21,16	4	24,64	5,09	20,67	3
	18,91	1,91	10,09	6	19,89	1,77	8,89	6
	24,13	1,63	6,75	3	25,83	2,17	8,41	3
	22,15	3,18	14,34	4	22,80	2,60	11,40	4
	35,20	8,12	23,07	6	31,42	8,45	26,90	6
	41,28	5,79	14,02	6	41,42	4,37	10,55	4
	15,17	5,78	38,09	6	10,50	3,42	32,53	4
	35,69	8,55	23,94	6	38,22	1,23	3,21	3
	19,57	5,21	26,65	6	28,58	6,23	21,81	3
	29,40	2,16	7,34	6	31,15	2,70	8,67	4
mezilaboratorní průměr	**25,15**		**20,36**		**27,68**		**17,53**	
SD	**7,87**		**12,56**		**7,41**		**9,10**	
n	**15**				**15**			
min	**12,9**				**10,5**			
max	**41,3**				**41,4**			
CV (%)	**31,3**				**26,8**			

▼M6

Tabulka 3

Toxicita PCP: Souhrn cílových ukazatelů v okružním testu; mezilaboratorní průměry pro EC_{50}, NOEC a LOEC; SD = směrodatná odchylka; CV = variační koeficient.

biologický parametr		mezilaboratorní průměr (mg/kg)	min	max	mezilaboratorní faktor	SD	CV (%)	geometr. průměr (mg/kg)
celkový počet jedinců	**EC_{50}**	**23,0**	4,0	37,9	9,4	10,7	46,3	19,9
	NOEC	**9,9**	2,1	22,7	10,7	7,2	72,3	7,6
	LOEC	**27,9**	4,7	66,7	14,2	19,4	69,4	20,9
	MDD (%)	**22,5**	7,1	39,1				
celková hmotnost sušiny organismů	**EC_{50}**	**20,4**	7,3	39,9	5,5	9,1	44,5	18,2
	NOEC	**9,3**	2,1	20,0	9,4	6,6	70,4	7,4
	LOEC	**25,7**	2,1	50,0	23,5	16,8	65,5	19,4
	MDD (%)	**24,8**	10,9	44,7				
mortalita/ přežití	**LC_{50}**	**25,3**	6,5	37,2	5,7	9,4	37,4	23,1
	NOEC	**16,5**	2,1	40,0	18,8	10,3	62,4	12,8
	LOEC	**39,1**	4,7	66,7	14,2	18,1	46,2	32,6
reprodukce (zvýšení počtu jedinců na opakování)	**EC_{50}**	**20,0**	6,7	28,9	4,3	7,6	37,9	18,3
	NOEC	**7,9**	2,1	20,0	9,4	5,2	66,0	6,4
	LOEC	**22,5**	2,1	50,0	23,5	15,4	68,6	16,0
	MDD (%)	**29,7**	13,9	47,9				
růst (zvýšení biomasy na opakování)	**EC_{50}**	**15,3**	5,7	29,9	5,2	7,1	46,5	13,7
	NOEC	**8,7**	2,1	20,0	9,4	6,0	68,1	6,9
	LOEC	**24,0**	2,1	50,0	23,5	15,7	65,5	17,3
	MDD (%)	**32,2**	13,6	65,2				

MDD (minimum detectable difference): minimální detekovatelný rozdíl kontrolních hodnot během testování hypotézy; použit jako měřítko statistické síly

LITERATURA

Egeler, Ph., Meller, M., Schallnaß, H.J. & Gilberg, D. (2005). Validation of a sediment toxicity test with the endobenthic aquatic oligochaete *Lumbriculus variegatus* by an international ring test. In co-operation with R. Nagel and B. Karaoglan. Report to the Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Berlin), R&D No.: 202 67 429.

▼M6

C.36. DRAVÍ ROZTOČI (*HYPOASPIS (GEOLAELAPS) ACULEIFER*): ZKOUŠKA TOXICITY PRO REPRODUKCI V PŮDĚ

ÚVOD

1. Tato zkušební metoda je rovnocenná Pokynu OECD pro zkoušení 226 (2008). Je určena k použití při hodnocení účinků chemických látek v půdě na reprodukční schopnost druhu půdního roztoče Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer Canestrini (infratřída Acari: čeleď Laelapidae), což umožňuje odhadnout inhibici specifické rychlosti růstu populace (1,2). Reprodukční schopnost zde znamená počet mláďat na konci zkušebního období. H. aculeifer představuje další trofickou úroveň k druhu, pro nějž jsou zkušební metody již dostupné. Zkouška toxicity pro reprodukci bez rozlišování a kvantifikace různých stupňů reprodukčního cyklu je považována za adekvátní pro účel této zkušební metody. V případě chemických látek s jiným expozičním scénářem než prostřednictvím půdy mohou být vhodné jiné přístupy (3).

2. Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer je považován za vhodného zástupce půdní fauny, a dravých roztočů zejména. Je celosvětově rozšířený (5) a dá se snadno shromáždit a chovat v laboratoři. Souhrn biologie H. aculeifer je uveden v dodatku 7. Podrobné informace o ekologii druhu roztoče a použití v ekotoxikologické zkoušce jsou dostupné v literatuře (4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12).

PODSTATA ZKOUŠKY

3. Dospělé samičky se vystaví rozpětí koncentrací zkoušené chemické látky vmíchané do půdy. Zkouška se zahájí s 10 dospělými samičkami na nádobu k opakování. Samečci se při zkoušce nevkládají, protože zkušenost ukázala, že samičky se páří okamžitě nebo krátce po vylíhnutí ze stupně deutonymfy, jestliže jsou samečci přítomni. Kromě toho by vložení samečků prodloužilo zkoušku tak, že by bylo nezbytné náročně rozlišovat stupně stáří. Páření jako takové tedy není součástí zkoušky. Samičky se vkládají do zkoušky 28–35 dní po začátku období kladení vajíček v synchronizaci (viz dodatek 4), jelikož o samičkách je pak možné usuzovat, že se již spářily a že již prošly stupněm před kladením vajíček. Při 20 °C zkouška končí 14. den od vložení samiček (den 0), což umožňuje, aby první kontrolní potomci dosáhli stupně deutonymfy (viz dodatek 4). Jako hlavní měřená proměnná se stanoví počet mláďat na zkušební nádoby a navíc počet přeživších samiček. Reprodukční schopnost roztočů vystavených zkoušené chemické látce se srovná se schopností kontrolní skupiny a stanoví se ECx (např. EC10, EC50) nebo koncentrace bez pozorovaných účinků (NOEC) (definice – viz dodatek 1) v závislosti na experimentálním uspořádání (viz odstavec 29). Přehled časového sledu zkoušky je uveden v dodatku 8.

INFORMACE O ZKOUŠENÉ CHEMICKÉ LÁTCE

4. Především by měly být známy rozpustnost ve vodě, log K_{ow}, rozdělovací koeficient půda/ voda a tlak par zkoušené chemické látky. Žádoucí jsou také další informace o osudu zkoušené chemické látky v půdě, jako jsou rychlosti biotického a abiotického rozkladu.

5. Tato zkušební metoda se dá použít pro chemické látky ve vodě rozpustné nebo nerozpustné. Režim aplikace zkoušené chemické látky se však bude příslušně lišit. Zkušební metoda se nedá použít pro těkavé chemické látky, tj. látky, jejichž Henryho konstanta nebo rozdělovací koeficient vzduch-voda je větší než jedna, nebo chemické látky, jejichž tlak par překročí 0,0133 Pa při 25 °C.

▼M6

PLATNOST ZKOUŠKY

6. Následující kritéria je třeba splnit v neexponovaných kontrolních vzorcích, aby výsledek zkoušky bylo možno považovat za platný:

— střední mortalita dospělých samiček by na konci zkoušky neměla překročit 20 %,

— střední počet mláďat na opakování (s 10 vloženými dospělými samičkami) by na konci zkoušky měl být alespoň 50,

— variační koeficient vypočítaný pro počet mláďat roztočů na opakování by na konci hlavní zkoušky neměl být vyšší než 30 %.

REFERENČNÍ CHEMICKÁ LÁTKA

7. Je třeba stanovit ECx anebo NOEC referenční chemické látky, aby se získala záruka, že laboratorní zkušební podmínky jsou vyhovující, a aby se ověřilo, že odezva zkušebních organismů se časem nemění. Dimethoát (CAS 60-51-5) je vhodná referenční chemická látka, u níž bylo zjištěno ovlivnění velikosti populace (4). Kyselinu boritou (CAS 10043-35-3) je možno použít jako alternativní referenční chemickou látku. S touto látkou bylo však získáno méně zkušeností. Existují dvě možná uspořádání:

— Referenční chemická látka se může zkoušet paralelně se stanovením toxicity každé zkoušené chemické látky při jedné koncentraci, kterou je třeba předem prokázat ve studii dávka-odezva, jejímž výsledkem je účinek > 50 % snížení počtu potomků. V tomto případě by počet opakování měl být stejný jako v kontrolních vzorcích (viz odstavec 29).

— Druhou možností je, že se referenční chemická látka zkouší 1–2krát ročně zkouškou dávka-odezva. V závislosti na vybraném uspořádání se počet koncentrací a opakování a koeficient rozložení liší (viz odstavec 29), ale mělo by se dosáhnout odezvy 10– 90 % účinku (koeficient rozložení 1,8). Hodnota EC_{50} pro dimethoát stanovená na základě počtu mláďat by měla být v rozmezí 3,0 až 7,0 mg účinné látky/kg půdy (sušina). Na základě výsledků doposud získaných s kyselinou boritou by hodnota EC_{50} založená na počtu mláďat měla být v rozmezí 100 až 500 mg/kg půdy (sušina).

POPIS ZKOUŠKY

Zkušební nádoby a vybavení

8. Měly by se používat zkušební nádoby o průměru 3–5 cm (výška půdy ≥ 1,5 cm), vyrobené ze skla nebo jiného chemicky inertního materiálu a vybavené těsně přiléhajícím víčkem. Přednost se dává šroubovacím víčkům a v tom případě by nádoby mohly být provzdušňovány dvakrát týdně. Alternativně je možné použít kryty, které dovolují přímou výměnu plynů mezi substrátem a atmosférou (např. gáza). Jelikož je během zkoušky třeba udržovat obsah vlhkosti dostatečně vysoký, je zásadně třeba kontrolovat hmotnost každé experimentální nádoby během zkoušky a podle potřeby doplnit vodu. To může být zvlášť důležité, jestliže nejsou k dispozici šroubovací víčka. Jestliže se použijí neprůhledné zkušební nádoby, kryt by měl být vyroben z materiálu, který umožňuje přístup světla (např. děrované průhledné víčko) a zároveň brání roztočům v úniku. Velikost a typ zkušební nádoby závisí na extrakční metodě (podrobnosti – viz dodatek 5). Jestliže se tepelná extrakce aplikuje přímo na zkušební nádobu, pak je možné přidat na dno síto o vhodné velikosti ok (utěsněné až do extrakce); hloubka půdy by měla být dostatečná, aby byl zajištěn gradient teploty a vlhkosti.

▼M6

9. Je třeba použít standardní laboratorní vybavení, zejména následující:

— přednostně skleněné nádoby se šroubovacími víčky,

— sušárna,

— stereomikroskop,

— štětce pro přemístění roztočů,

— pH-metr a luxmetr,

— vhodné přesné váhy,

— odpovídající vybavení pro regulaci teploty,

— odpovídající vybavení pro regulaci vlhkosti vzduchu (není nezbytné, jestliže expoziční nádoby jsou kryty víčky),

— inkubátor nebo malá místnost s řízenou teplotou,

— zařízení pro extrakci (viz dodatek 5) (13),

— horní osvětlovací panel s řízenou intenzitou světla,

— sklenice pro shromáždění extrahovaných (vyjmutých) roztočů.

Příprava umělé půdy

10. Při této zkoušce se používá umělá půda. Umělá půda se skládá z následujících složek (všechny hodnoty jsou vztaženy na hmotnost sušiny):

— 5 % sfagnové rašeliny, přijatelná je na vzduchu sušená a jemně mletá (velikost částic 2 ± 1 mm),

— 20 % kaolinitického jílu (obsah kaolinitu přednostně vyšší než 30 %),

— přibližně 74 % na vzduchu sušeného průmyslového písku (v závislosti na potřebném množství $CaCO_3$); převážně jemný písek s více než 50 % částic mezi 50 a 200 mikrometry. Přesné množství písku závisí na množství $CaCO_3$ (viz níže), společně by měly tvořit 75 %.

— < 1,0 % uhličitanu vápenatého ($CaCO_3$, práškový, analyticky čistý) k dosažení pH 6,0 ± 0,5; množství přidaného uhličitanu vápenatého může v zásadě záviset na kvalitě/ charakteru rašeliny (viz poznámka 1).

Poznámka 1: Požadované množství $CaCO_3$ bude záviset na složkách půdního substrátu a mělo by se stanovit měřením pH dílčích vzorků půdy bezprostředně před zkouškou (14).

Poznámka 2: Obsah rašeliny v umělé půdě se odchyluje od jiných zkušebních metod na půdních organismech, kde se ve většině případů používá 10 % rašeliny (např. (15)). Avšak podle EPPO (16) neobsahuje typická zemědělská půda více než 5 % organické hmoty, a snížení obsahu rašeliny se tak odráží ve snížené možnosti přírodní půdy sorbovat zkoušenou chemickou látku na organický uhlík.

Poznámka 3: Jestliže je to potřeba, např. pro specifické zkušební účely, mohou jako zkušební anebo kultivační substrát rovněž sloužit přírodní půdy z nekontaminovaných míst. Avšak jestliže se přírodní půda použije, měla by být charakterizována alespoň původem (místem odběru), pH, texturou (rozložení velikosti částic) a obsahem organické hmoty. Jestliže jsou dostupné, je třeba uvést typ a název půdy podle klasifikace půd; půda

▼M6

by neměla být ničím kontaminována. V případě, že zkoušená chemická látka je kov nebo organo-kovová sloučenina, je třeba rovněž stanovit kapacitu výměny kationtů (CEC) přírodní půdy. Zvláštní pozornost je třeba věnovat splnění kritérií platnosti, jelikož podrobné informace o přírodních půdách jsou obvykle vzácné.

11. Suché složky půdy se důkladně promíchají (např. ve velké laboratorní míchačce). Pro stanovení pH se použije směs půdy a 1 M roztoku chloridu draselného (KCl) nebo 0,01 M chloridu vápenatého ($CaCl_2$) v poměru 1:5 (viz (14) a dodatek 3). Jestliže je půda kyselejší, nežli je požadované rozpětí (viz odstavec 10), může se upravit přidáním vhodného množství $CaCO_3$. Jestliže je půda příliš alkalická, upraví se přidáním více směsi zahrnující první tři složky popsané v odstavci 10, ale s vyloučením $CaCO_3$.

12. Maximální retenční vodní kapacita (RVKmax) umělé půdy se stanoví ve shodě s postupy popsanými v dodatku 2. Dva až sedm dní před zahájením zkoušky se suchá umělá půda zvlhčí přidáním dostatečného množství destilované nebo deionizované vody, aby se dosáhlo přibližně poloviny konečného obsahu vody, který je 40 až 60 % RVKmax. Obsah vlhkosti se nastaví na 40–60 % RVKmax přidáním roztoku zkoušené chemické látky a/nebo přidáním destilované nebo deionizované vody (viz odstavce 16–18). Dodatečná hrubá kontrola obsahu vlhkosti v půdě se provede mírným stisknutím půdy v ruce; jestliže je obsah vlhkosti správný, objeví se mezi prsty malé kapky vody.

13. Obsah vlhkosti půdy se stanoví na začátku a na konci zkoušky sušením na konstantní hmotnost při 105 °C ve shodě s ISO 11465 (17); pH půdy se stanoví ve shodě s dodatkem 3 nebo ISO 10390 (14). Tato měření je třeba provádět na dodatečných vzorcích bez roztočů, jak z kontrolní půdy, tak z půdy o každé zkoušené koncentraci. Hodnota pH půdy by se neměla upravovat, jestliže se zkoušejí kyselé nebo bazické chemické látky. Obsah vlhkosti je třeba sledovat během zkoušky pravidelným vážením nádob (viz odstavce 20 a 24).

Výběr a příprava zkušebních živočichů

14. Druh použitý ve zkoušce je Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer (Canestrini, 1883). Pro zahájení zkoušky jsou vyžadovány dospělé samičky roztočů získané ze synchronizované skupiny. Roztoči se vkládají asi 7–14 dní po dosažení dospělosti, 28–35 dní po zahájení kladení vajíček v synchronizaci (viz odstavec 3 a dodatek 4). Je třeba zaznamenat zdroj roztočů nebo dodavatele a udržování laboratorní kultury. Jestliže se laboratorní kultura udržuje, doporučuje se, aby identita druhu byla potvrzena alespoň jednou ročně. Identifikační list je uveden v dodatku 6.

Příprava zkušebních koncentrací

15. Zkoušená chemická látka se zamíchá do půdy. Organická rozpouštědla použitá při zapracování zkoušené chemické látky do exponované půdy je třeba volit s ohledem na jejich nízkou toxicitu pro roztoče a v uspořádání zkoušky musí být zahrnuta kontrola s rozpouštědlem (viz odstavec 29).

Zkoušená chemická látka rozpustná ve vodě

16. Připraví se roztok zkoušené chemické látky v deionizované vodě v množství dostatečném pro všechna opakování jedné zkušební koncentrace. Doporučuje se použít vhodné množství vody, aby byl získán požadovaný obsah vlhkosti, tj. 40–60 % RVKmax (viz odstavec 12). Každý roztok zkoušené chemické látky se důkladně promíchá s jednou várkou zvlhčené půdy, která se pak vloží do zkušební nádoby.

▼M6

Zkoušená chemická látka nerozpustná ve vodě

17. V případě chemických látek nerozpustných ve vodě, ale rozpustných v organických rozpouštědlech se zkoušená chemická látka může rozpustit v co nejmenším objemu vhodného nosiče (např. acetonu). Měla by se použít pouze těkavá rozpouštědla. Při použití takových nosičů by všechny zkušební koncentrace a kontrolní vzorky měly obsahovat stejné minimální množství nosiče. Nosič se nastříkne na malé množství, například 10 g, jemného křemenného písku, nebo se s ním smíchá. Celkový obsah písku v substrátu by měl být korigován na toto množství. Nosič se odstraní odpařením v digestoři po dobu alespoň jedné hodiny. Tato směs křemenného písku a zkoušené chemické látky se přidá do zvlhčené půdy a důkladně s ní promíchá, přičemž se přidá vhodné množství deionizované vody, aby se dosáhlo požadované vlhkosti. Konečná směs se vkládá do zkušebních nádob. Uvědomte si, že některá rozpouštědla mohou být toxická pro roztoče. Proto se doporučuje použít kontrolní vzorek s přidanou vodou bez nosiče, jestliže toxicita rozpouštědla pro roztoče není známá. Jestliže je dostatečně prokázáno, že rozpouštědlo (v koncentracích, které mají být aplikovány) nemá žádné účinky, lze kontrolní vzorek s vodou vynechat.

Zkoušené chemické látky špatně rozpustné ve vodě i organických rozpouštědlech

18. V případě chemických látek, které jsou špatně rozpustné ve vodě a v organických rozpouštědlech, se ekvivalentní množství 2,5 g jemně mletého křemenného písku na zkušební nádobu (například 10 g jemného křemenného písku na čtyři opakování) smíchá s příslušným množstvím zkoušené chemické látky, aby se získala požadovaná zkušební koncentrace. Celkový obsah písku v substrátu je pak třeba korigovat na toto množství. Tato směs křemenného písku a zkoušené chemické látky se přidá do zvlhčené půdy a důkladně promíchá; přidá se vhodné množství deionizované vody, aby se získal požadovaný obsah vlhkosti. Konečná směs se rozdělí mezi zkušební nádoby. Postup se opakuje pro každou zkušební koncentraci a připraví se rovněž příslušné kontrolní vzorky.

POSTUP

Zkušební skupiny a kontroly

19. Pro každou kontrolní a exponovanou nádobu se doporučuje deset dospělých samiček na 20 g sušiny umělé půdy. Zkušební organismy je třeba vložit během dvou hodin po přípravě konečného zkušebního substrátu (tj. po aplikaci zkoušené látky). Ve zvláštních případech (např. když je stárnutí považováno za určující faktor) je možné čas mezi přípravou konečného zkušebního substrátu a přidáním roztočů prodloužit (podrobnosti takového stárnutí viz (18)). Avšak v takových případech musí být uvedeno vědecké odůvodnění.

20. Po přidání roztočů do půdy se jim dodá krmivo a změří se počáteční hmotnost každé zkušební nádoby, která se použije jako reference při sledování obsahu vlhkosti v půdě během zkoušky, jak je popsáno v odstavci 24. Zkušební nádoby se pak zakryjí, jak je popsáno v odstavci 8, a umístí se do zkušební komory.

21. Pro každou z metod aplikace zkoušené chemické látky popsaných v odstavcích 15 až 18 se připraví příslušné kontrolní nádoby. Je třeba dodržovat popsané příslušné postupy přípravy kontrol s výjimkou, že není přidána zkoušená chemická látka. Tam, kde je to potřebné, se tak do kontrolních vzorků přidají organická rozpouštědla, křemenný písek nebo jiné nosiče v koncentracích/množstvích jako u exponovaných nádob. Tam, kde se pro přidání zkoušené chemické látky použije rozpouštědlo nebo jiný nosič, by se rovněž měla připravit dodatečná kontrola bez nosiče nebo zkoušené chemické látky a zkoušet v případě, že toxicita rozpouštědla není známá (viz odstavec 17).

▼M6

Zkušební podmínky

22. Zkušební teplota by měla být 20 ± 2 °C. Teplota by se měla zaznamenávat alespoň jednou za den a podle potřeby upravit. Zkouška se provádí za podmínek řízených cyklů světlo-tma (přednostně 16 hodin světla a 8 hodin tmy) s osvětlením 400 až 800 luxů v blízkosti zkušebních nádob. Z důvodů srovnatelnosti jsou tyto podmínky stejné jako u jiných ekotoxikologických zkoušek půdy (např. (15)).

23. Výměnu plynů je třeba zajistit provzdušňováním zkušebních nádob alespoň dvakrát za týden v případě, že se používají šroubovací víka. Jestliže se používají kryty z gázy, je třeba věnovat zvláštní pozornost udržování obsahu vlhkosti v půdě (viz odstavce 8 a 24).

24. Obsah vody v půdním substrátu ve zkušebních nádobách se během zkoušky udržuje vážením a podle potřeby pravidelným přidáváním vody do zkušebních nádob (např. jednou za týden). Ztráty se doplňují podle potřeby deionizovanou vodou. Obsah vlhkosti by se během zkoušky neměl od počáteční hodnoty lišit o více než 10 %.

Krmení

25. Ukázalo se, že vhodným zdrojem krmiva jsou sýrohubi zhoubní (Tyrophagus putrescentiae (Schrank, 1781)). Vhodní mohou být rovněž malí chvostoskoci (např. mláďata Folsomia candida Willem, 1902 nebo Onychiurus fimatus (19, 20), roupice (např. Enchytraeus crypticus Westheide a Graefe, 1992) nebo hlístice (např. Turbatrix silusiae de Man, 1913)) (21). Doporučuje se krmivo před použitím ve zkoušce kontrolovat. Druh a množství krmiva by měly zaručit adekvátní počet mláďat, aby byla splněna kritéria platnosti (odstavec 6). Při výběru kořisti je třeba brát v úvahu režim působení zkoušené látky (např. akaricid může být pro potravinové roztoče rovněž toxický, viz odstavec 26).

26. Krmivo se dodává ad libitum (tj. pokaždé malé množství (špička špachtle)). Pro tento účel je rovněž možné použít odsávač se slabým sáním, jak je navrženo ve zkoušce s chvostoskoky, nebo jemný štěteček. Postačující obvykle bude podávat krmivo na začátku zkoušky a dvakrát až třikrát týdně. Jestliže se ukáže, že zkoušená látka je pro organismy sloužící jako krmivo toxická, je třeba zvážit zvýšenou rychlost krmení anebo alternativní zdroj krmiva.

Výběr zkoušených koncentrací

27. Předchozí znalost toxicity zkoušené chemické látky by měla pomoci při výběru vhodných zkušebních koncentrací, např. z orientačních studií. V případě potřeby se provede orientační zkouška s pěti koncentracemi zkoušené chemické látky v rozpětí 0,1–1 000 mg/kg sušiny půdy, s alespoň jedním opakováním pro exponované a kontrolní nádoby. Orientační zkouška trvá 14 dní; pak se stanoví mortalita dospělých roztočů a počet mláďat. Rozpětí koncentrací se v hlavní zkoušce přednostně zvolí tak, aby zahrnovalo koncentrace, při nichž je počet mláďat ovlivněn, zatímco přežití mateřské generace ovlivněno není. To však nemusí být možné v případě chemických látek, které mají smrtelné a téměř smrtelné účinky při skoro podobných koncentracích. Účinná koncentrace (např. EC_{50} EC_{25}, EC_{10}) a rozpětí koncentrací, ve kterém je účinek zkoušené chemické látky předmětem zájmu, by měly být zahrnuty mezi koncentracemi použitými ve zkoušce. Extrapolace hluboko pod nejnižší koncentraci ovlivňující zkušební organismy nebo vysoko nad nejvyšší zkoušenou koncentraci by se měla provádět pouze ve výjimečných případech a v takovém případě je třeba uvést úplné vysvětlení v závěrečné zprávě.

Uspořádání experimentu

Zkoušky dávka-odezva

28. Jsou navrženy tři uspořádání zkoušky na základě doporučení vyplývajících z jiného okružního testu (zkouška toxicity pro reprodukci s roupicovitými

▼M6

(22)). Všeobecná vhodnost všech těchto návrhů byla potvrzena závěry validace u H. aculeifer.

29. Při určování rozpětí koncentrací je třeba brát v úvahu následující:

— Pro stanovení EC_x (např. EC_{10}, EC_{50}) je třeba zkoušet dvanáct koncentrací. Doporučují se alespoň dvě opakování pro každou zkoušenou koncentraci a šest kontrolních opakování. Koeficient rozložení koncentrací se může lišit, tj. být menší nebo rovný 1,8 v rozmezí očekávaného účinku a vyšší než 1,8 při vyšších a nižších koncentracích.

— Pro stanovení NOEC je třeba zkoušet alespoň pět koncentrací v geometrické posloupnosti. Doporučují se čtyři opakování pro každou zkoušenou koncentraci plus osm kontrolních vzorků. Koncentrace by měly být rozloženy s faktorem nepřekračujícím 2,0.

— Kombinovaný přístup umožňuje stanovení jak NOEC, tak EC_x. Použije se osm exponovaných koncentrací v geometrické řadě. Doporučují se čtyři opakování pro každou exponovanou koncentraci plus osm pro kontrolní vzorky. Koncentrace by měly být rozloženy s faktorem nepřekračujícím 1,8.

Limitní zkouška

30. Jestliže v orientační zkoušce nejsou pozorovány žádné účinky při nejvyšší koncentraci (tj. 1 000 mg/kg sušiny půdy), může být hlavní zkouška toxicity pro reprodukci provedena jako limitní zkouška s použitím zkoušené koncentrace 1 000 mg/kg sušiny půdy. Limitní zkouška poskytne možnost prokázat, že hodnota NOEC nebo EC_{10} u reprodukce je větší než mezní koncentrace, přičemž je minimalizován počet roztočů použitých při zkoušce. Použije se osm opakování jak pro exponovanou půdu, tak pro kontrolu.

Doba trvání zkoušky a měření

31. Všechny pozorované rozdíly mezi chováním a morfologií roztočů v kontrolních a exponovaných nádobách je třeba zaznamenat.

32. V den 14 se přeživší roztoči vyjmou z půdy pomocí tepelné/světelné extrakce nebo jiné vhodné metody (viz dodatek 5). Odděleně se spočítá počet mláďat (tj. larvy, protonymfy a deutonymfy) a dospělých jedinců. Všichni dospělí roztoči v tuto chvíli nenalezení se zaznamenají jako mrtví, přičemž se předpokládá, že takoví roztoči uhynuli a rozložili se před vyhodnocením. Účinnost extrakce se musí potvrdit jednou nebo dvakrát ročně na kontrolních vzorcích se známými počty dospělých a mláďat. Účinnost by měla být vyšší než 90 % v průměru kombinovaném pro všechna vývojová stádia (viz dodatek 5). Počty dospělých a mláďat se pro účinnost neupravují.

ÚDAJE A PŘEDKLÁDÁNÍ ZPRÁV

Zpracování výsledků

33. Informace o statistických metodách, které je možné použít pro analyzování výsledků zkoušek, jsou uvedeny v odstavcích 36 až 41. Kromě toho je třeba brát v úvahu dokument OECD č. 54 „Současné přístupy ve statistické analýze údajů o ekotoxicitě: Pokyny pro aplikaci“ (Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: a Guidance to Application) (31).

34. Hlavní cílovým ukazatelem je reprodukční schopnost, v tomto případě počet zplozených mláďat na zkušební nádobu určenou k opakování (s vloženými 10 dospělými samičkami). Pro statistickou analýzu je třeba spočítat u exponovaných a kontrolních nádob aritmetický průměr (X) a rozptyl (s^2) reprodukční schopnosti. X a s^2 se použijí pro postupy ANOVA, jako je např.

▼M6

Studentův t-test, Dunnettův test nebo Williamsův test a rovněž pro výpočet 95 % intervalů spolehlivosti.

Poznámka: Tento hlavní cílový ukazatel je rovnocenný plodnosti měřené jako počet živých mláďat zplozených během zkoušky dělený počtem rodičovských samiček vložených na začátku zkoušky.

35. Počet přeživších samiček v neexponovaných kontrolních vzorcích je hlavním kritériem platnosti a musí být dokumentován. Stejně jako při orientační zkoušce je třeba i v závěrečné zprávě z hlavního testu zaznamenat další škodlivé znaky.

ECx

36. Hodnoty ECx, včetně s nimi spojené dolní a horní 95 % meze spolehlivosti pro parametr popsaný v odstavci 34, se vypočítají použitím vhodných statistických metod (např. probitové analýzy, logistické nebo Weibullovy funkce, upravené Spearman-Karberovy metody nebo jednoduché interpolace). ECx se získá dosazením hodnot odpovídajících x % kontrolního průměru do nalezené rovnice. Pro výpočet EC50 nebo jakékoli jiné EC_x je třeba průměry pro exponované vzorky (X) podrobit regresní analýze.

NOEC/LOEC

37. Jestliže se při statistické analýze očekává stanovení NOEC/LOEC, je nezbytné zpracovat statistiku na nádobu (jednotlivé nádoby se považují za opakování). Je třeba použít vhodné statistické metody (podle dokumentu OECD č. 54 – Současné přístupy ve statistické analýze údajů o ekotoxicitě: Pokyny pro aplikaci). Obecně se nepříznivé účinky zkoušené látky ve srovnání s kontrolou zkoumají použitím jednostranného (menšího) testu hypotézy pro $p \leq 0,05$. Příklady jsou uvedeny v následujících odstavcích.

38. Normální rozložení dat lze testovat použitím např. Kolmogorov-Smirnovova testu dobré shody, testu poměru rozpětí ke směrodatné odchylce (R/s-test) nebo Shapiro-Wilkova testu (dvoustranný, $p \leq 0,05$). Cochranův test, Levenův test nebo Bartlettův test (dvoustranný, $p \leq 0,05$) lze použít k testování homogenity rozptylu. Jestliže jsou splněny předpoklady pro použití parametrických testů (normalita, homogenita rozptylu), lze provést jednostupňovou analýzu rozptylu (ANOVA) a následné testy vícenásobného porovnávání. Vícenásobná porovnání (např. Dunnettův t-test) nebo testy sestupného trendu (např. Williamsův test v případě monotónního vztahu dávka-odezva) se mohou použít pro výpočet, zda existují významné rozdíly ($p \leq 0,05$) mezi kontrolními vzorky a různými koncentracemi zkoušené látky (výběr doporučené zkoušky podle dokumentu č. 54 OECD – Současné přístupy ve statistické analýze údajů o ekotoxicitě: Pokyny pro aplikaci). Jinak je třeba pro stanovení NOEC a LOEC použít neparametrické metody (např. Bonferroniho U-test podle Holma nebo Jonckheere-Terpstrův test trendu).

Limitní zkouška

39. Jestliže byla provedena limitní zkouška (pouze srovnání kontrolního a jednoho exponovaného vzorku) a jsou splněny předpoklady pro použití parametrických testů (normalita, homogenita), mohou být metrické proměnné vyhodnoceny použitím Studentova testu (t-test). Jestliže tyto požadavky nejsou splněny, je možné použít t-test upravený pro nerovnost rozptylů (Welchův t-test) nebo neparametrický test, jako je Mann-Whitneyův U-test.

40. Pro stanovení významných rozdílů mezi kontrolami (kontrolní vzorek a kontrolní vzorek s rozpouštědlem) je možné zkoušet opakování každého kontrolního vzorku, jak je popsáno pro limitní zkoušku. Jestliže se těmito zkouškami nezjistí významné rozdíly, je možné všechna opakování kontrol

▼M6

a kontrol s rozpouštědlem sloučit. Jinak by se všechny exponované nádoby měly srovnávat s kontrolou s rozpouštědlem.

Závěrečná zpráva

41. Závěrečná zpráva by měla obsahovat alespoň následující informace:

— *Zkoušená chemická látka*

— identita zkoušené chemické látky, název, šarže, dávka a číslo CAS, čistota,

— fyzikálně-chemické vlastnosti zkoušené chemické látky (např. log K_{ow}, rozpustnost ve vodě, tlak par, Henryho konstanta (H) a informace o osudu zkoušené chemické látky v půdě).

— *Zkušební organismy*

— identifikace a dodavatel zkušebních organismů, popis kultivačních podmínek,

— věkové rozpětí zkušebních organismů.

— *Zkušební podmínky*

— popis experimentálního uspořádání a postupu,

— podrobnosti přípravy zkušební půdy; podrobná specifikace, jestliže se používá přírodní půda (původ, historie, rozložení velikosti částic, pH, obsah organické hmoty a klasifikace půdy, jestliže je dostupná),

— maximální retenční vodní kapacita půdy,

— popis techniky použité pro aplikaci zkoušené chemické látky do půdy,

— podrobnosti o pomocných chemikáliích použitých pro aplikaci zkoušené chemické látky,

— velikost zkušebních nádob a hmotnost sušiny zkušební půdy na nádobu,

— zkušební podmínky: intenzita světla, trvání cyklů světlo-tma, teplota,

— popis režimu krmení, typ a množství krmiva použitého ve zkoušce, datum krmení,

— pH a obsah vody v půdě na začátku a během zkoušky (kontrolní vzorek a všechny exponované vzorky),

— podrobný popis extrakční metody a účinnost extrakce.

— *Výsledky zkoušky*

— počet mláďat stanovený v každé zkušební nádobě na konci zkoušky,

— počet dospělých samiček a mortalita dospělých jedinců (%) v každé zkušební nádobě na konci zkoušky,

— popis zjevných symptomů nebo výrazných změn v chování,

— výsledky získané s referenční zkoušenou chemickou látkou,

— souhrn statistického zpracování (EC_x anebo NOEC), včetně 95 % mezí spolehlivosti, a popis metody výpočtu,

▼**M6**

— graf vztahu koncentrace-odezva,

— odchylky od postupů popsaných v této zkušební metodě a jakékoli neobvyklé jevy během zkoušky.

LITERATURA

1) Casanueva, M.E. (1993). Phylogenetic studies of the free-living and arthropod associated Laelapidae (Acari: Mesostigmata). Gayana Zool. 57, 21-46.

2) Tenorio, J. M. (1982). Hypoaspidinae (Acari: Gamasida: Laelapidae) of the Hawaiian Islands. Pacific Insects 24, 259-274.

3) Bakker, F.M., Feije, R., Grove, A. J., Hoogendorn, G., Jacobs, G., Loose, E.D. and van Stratum, P. (2003). A laboratory test protocol to evaluate effects of plant protection products on mortality and reproduction of the predatory mite *Hypoaspis aculeifer* Canestrini (Acari: Laelapidae) in standard soil. JSS – Journal of Soils and Sediments 3, 73-77.

4) Karg, W. (1993). Die freilebenden Gamasina (Gamasides), Raubmilben. 2nd edition In: Dahl, F. (Hrsg.): Die Tierwelt Deutschlands 59. Teil, G. Fischer, Jena, 523 pp.

5) Ruf, A. (1991). Do females eat males?: Laboratory studies on the population development of *Hypoaspis aculeifer* (Acari: Parasitiformes). In: F. Dusbabek & V. Bukva (eds.): Modern Acarology. Academia Prague & SPD Academic Publishing bv, The Hague, Vol. 2, 487-492.

6) Ruf, A. (1995). Sex ratio and clutch size control in the soil inhabiting predatory mite *Hypoaspis aculeifer* (Canestrini 1883) (Mesostigmata, Dermanyssidae). Proc. 2nd Symp. EURAAC: p 241-249.

7) Ruf, A. (1996). Life-history patterns in soil-inhabiting mesostigmatid mites. Proc. IXth Internat. Congr. Acarol. 1994, Columbus, Ohio: p 621-628.

8) Krogh, P.H. and Axelsen, J.A. (1998). Test on the predatory mite *Hypoaspis aculeifer* preying on the collembolan *Folsomia fimetaria*. In: Lokke, H. and van Gestel, C.A.M.: Handbook of soil invertebrate toxicity tests. John Wiley Sons, Chichester, p 239-251.

9) Løkke, H., Janssen, C.R., Lanno, R.P., Römbke, J., Rundgren, S. and Van Straalen, N.M. (2002). Soil Toxicity Tests – Invertebrates. In: Test Methods to Determine Hazards of Sparingly Soluble Metal Compounds in Soils. Fairbrother, A., Glazebrook, P.W., Van Straalen, N.M. and Tarazona, J.V. (eds.). SETAC Press, Pensacola, USA. 128 pp.

10) Schlosser, H.-J. and Riepert, F. (1991/92). Entwicklung eines Prüfverfahrens für Chemikalien an Bodenraubmilben (Gamasina). Teil 1: Biologie der Bodenraubmilbe Hypoaspis aculeifer Canestrini, 1883 (Gamasina) unter Laborbedingungen. Zool. Beiträge, 34, 395-433.

11) Schlosser, H.-J. and Riepert, F. (1992). Entwicklung eines Prüfverfahrens für Chemikalien an Boden-raubmilben (Gamasina). Teil 2: Erste Ergebnisse mit Lindan und Kaliumdichromat in subletaler Dosierung. Zool. Beitr. N.F. 34, 413-433.

12) Heckmann, L.-H., Maraldo, K. and Krogh, P. H. (2005). Life stage specific impact of dimethoate on the predatory mite *Hypoaspis aculeifer* Canestrini (Gamasida: Laelapidae). Environmental Science & Technology 39, 7154-7157.

13) Petersen, H. (1978). Some properties of two high-gradient extractors for soil microarthropods, and an attempt to evaluate their extraction efficiency. Natura Jutlandica 20, 95-122.

14) ISO (International Organization for Standardization) (1994). Soil Quality – Determination of pH, No. 10390. ISO, Geneve.

▼**M6**

15) Kapitola C.8 této přílohy – Zkouška toxicity pro reprodukci žížal.

16) EPPO (2003): EPPO Standards. Environmental risk assessment scheme for plant protection products. Chapter 8. Soil Organisms and Functions. Bull. OEPP/EPPO Bull. 33, 195-209.

17) ISO (International Organization for Standardization) (1993). Soil Quality –Determination of dry matter and water content on a mass basis – Gravimetric method, No. 11465. ISO, Geneve.

18) Fairbrother, A., Glazebrock, P.W., Van Straalen, N.M. and Tarazona, J.V. 2002. Test methods to determine hazards of sparingly soluble metal compounds in soils. SETAC Press, Pensacola, FL, USA.

19) Chi, H. 1981. Die Vermehrungsrate von *Hypoaspis aculeifer* Canestrini (Acarina, Laelapidae) bei Ernährung mit Onychiurus fimatus Gisin (Collenbola). Ges.allg..angew. Ent. 3:122-125.

20) Schlosser, H.J., und Riepert, F. 1992. Entwicklung eines Prüfverfahrens für Chemikalien an Bodenraubmilden (Gamasina). Zool.Beitr. N.F. 34(3):395-433.

21) Heckmann, L.-H., Ruf, A., Nienstedt, K. M. and Krogh, P. H. 2007. Reproductive performance of the generalist predator *Hypoaspis aculeifer* (Acari: Gamasida) when foraging on different invertebrate prey. Applied Soil Ecology 36, 130-135.

22) Kapitola C.32 této přílohy – Zkouška toxicity pro reprodukci roupicovitých.

23) ISO (International Organization for Standardization) (1994). Soil Quality – Effects of pollutants on earthworms (Eisenia fetida). Part 2: Determination of effects on reproduction, No. 11268-2. ISO, Geneve.

24) Southwood, T.R.E. (1991). Ecological methods. With particular reference to the study of insect populations. (2nd ed.). Chapman & Hall, London, 524 pp.

25) Dunger, W. and Fiedler, H.J. (1997). Methoden der Bodenbiologie (2nd ed.). G. Fischer, Jena, 539 pp.

26) Lesna, I. and Sabelis, M.W. (1999). Diet-dependent female choice for males with „good genes“ in a soil predatory mite. Nature 401, 581-583.

27) Ruf, A. (1989). Die Bedeutung von Arrhenotokie und Kannibalismus für die Populationsentwicklung von *Hypoaspis aculeifer* (Canestrini 1883) (Acari, Gamasina). Mitt. Deut. Ges. Allg. Angew. Ent. 7, 103-107.

28) Ruf, A. (1993). Die morphologische Variabilität und Fortpflanzungsbiologie der Raubmilbe *Hypoaspis aculeifer* (Canestrini 1883) (Mesostigmata, Dermanyssidae). Dissertation, Universität Bremen.

29) Ignatowicz, S. (1974). Observations on the biology and development of *Hypoaspis aculeifer* Canestrini, 1885 (Acarina, Gamasides). Zoologica Poloniae 24, 11-59.

30) Kevan, D.K. McE. and Sharma, G.D. (1964). Observations on the biology of *Hypoaspis aculeifer* (Canestrini, 1884), apparently new to North America (Acarina: Mesostigmata: Laelaptidae). Acarologia 6, 647-658.

31) OECD (2006c). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. OECD environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.54. ENV/JM/MONO(2006)18.

▼**M6**

Dodatek 1

Definice

V této zkušební metodě se používají následující definice (v této zkoušce jsou všechny účinné koncentrace vyjádřeny jako hmotnost zkoušené chemické látky na hmotnost sušiny zkušební půdy):

Chemická látka je látka nebo směs.

Koncentrace bez pozorovaných účinků (NOEC) je koncentrace zkoušené chemické látky, při které není pozorován žádný účinek. V této zkoušce koncentrace odpovídající NOEC nemá statisticky významný účinek ($p < 0,05$) během dané expoziční doby ve srovnání s kontrolou.

Nejnižší koncentrace s pozorovaným účinkem (LOEC) je nejnižší koncentrace zkoušené chemické látky, která má statisticky významný účinek ($p < 0,05$) během dané expoziční doby ve srovnání s kontrolou.

ECx (účinná koncentrace pro x % účinek) je koncentrace, která má x % účinek na zkušební organismy během dané expoziční doby ve srovnání s kontrolou. Například EC_{50} je koncentrace, u níž se odhadne, že způsobí zkoumaný účinek u cílového ukazatele u 50 % vystavené populace během definované expoziční doby.

Zkoušená chemická látka je jakákoli látka nebo směs zkoušená použitím této zkušební metody.

▼M6

Dodatek 2

Stanovení maximální retenční vodní kapacity půdy

Následující metoda stanovení maximální retenční vodní kapacity půdy je považována za vhodnou. Je popsána v příloze C ISO DIS 11268-2 (Kvalita půdy – Účinky znečišťujících látek na žížaly (*Eisenia fetida*). Část 2: Stanovení účinků na reprodukci (23)).

Shromáždí se definované množství (např. 5 g) zkušebního půdního substrátu použitím vhodného nástroje na odběr vzorků (spirálový trubkový vzorkovač atd.). Dno trubky se zakryje kusem filtračního papíru, trubka se naplní vodou a umístí na stojan ve vodní lázni. Trubka se postupně ponořuje, až je vodní hladina nad povrchem půdy. Pak se ponechá ve vodě přibližně tři hodiny. Jelikož ne všechna voda absorbovaná půdními kapilárami může být zadržena, měl by se vzorek půdy ponechat okapat dvě hodiny tak, že se trubka umístí na lůžko z velmi mokrého, jemně mletého křemenného písku v uzavřené nádobě (aby se zabránilo vysušení). Vzorek se pak zváží a vysuší do konstantní hmotnosti při 105 °C. Retenční vodní kapacita (RVK) se pak vypočítá podle následujícího vzorce:

$$\mathrm{RVK}(\text{v\% sušiny}) = \frac{S - T - D}{D} \times 100$$

Kde:

S = vodou nasycený substrát + hmotnost trubky + hmotnost filtračního papíru

T = tára (hmotnost trubky + hmotnost filtračního papíru)

D = hmotnost sušiny substrátu

▼**M6**

Dodatek 3

Stanovení pH půdy

Následující metoda stanovení pH půdy vychází z popisu uvedeného v ISO DIS 10390: Kvalita půdy – Stanovení pH (16).

Definované množství půdy se suší při laboratorní teplotě po dobu alespoň 12 hodin. Suspenze půdy (obsahující alespoň 5 gramů půdy) se pak doplní do 5násobného objemu buď 1 M roztoku analyticky čistého chloridu draselného (KCl) nebo 0,01 M roztoku analyticky čistého chloridu vápenatého ($CaCl_2$). Suspenze se pak důkladně protřepává po dobu 5 minut. Po protřepání se suspenze ponechá usadit alespoň 2 hodiny, ale ne déle než 24 hodin. Pak se změří pH kapalné fáze použitím pH-metru kalibrovaného před každým měřením pomocí vhodné řady pufračních roztoků (např. pH 4,0 a 7,0).

▼M6

Dodatek 4

Chov dravých roztočů druhu *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer*, potravinoví roztoči a synchronizace kultury

Chov druhu *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer*:

Kultury mohou být udržovány v plastových nádobách nebo sklenicích naplněných směsí pálené sádry a mletého dřevěného uhlí (9:1). Sádru je možné udržovat vlhkou přidáním několika kapek destilované nebo deionizované vody podle potřeby. Teplota chovu je optimálně mezi 20 ± 2 °C, režim světlo/tma není pro tento druh důležitý. Kořistí mohou být roztoči druhu *Typrophagus putrescentiae* nebo *Caloglyphus* (s potravinovými roztoči se musí zacházet opatrně, neboť by u člověka mohli způsobit alergickou reakci), ale hlístice, roupicovití a chvostoskoci jsou rovněž vhodní jako kořist. Jejich zdroj je třeba zaznamenat. Vývoj populace může být zahájen s jednou samičkou, protože samečci se vyvíjejí z neoplodněných vajíček. Generace se široce překrývají. Samička může žít alespoň 100 dní a může během svého života naklást přibližně 100 vajíček. Maximální rychlost kladení vajíček je mezi 10 a 40 dny (po dosažení dospělosti) a představuje 2,2 vajíčka na samičku a den. Doba vývoje od vajíčka k dospělé samičce je přibližně 20 dní při 20 °C. Předem je třeba udržovat a přechovávat více než jednu kulturu.

Chov druhu *Typrophagus putrescentiae*:

Roztoči jsou přechováváni ve skleněné nádobě naplněné jemným práškem z pivovarských kvasnic, která je umístěna v plastovém kbelíku naplněném roztokem KNO_3, aby se zabránilo jejich úniku. Potravinoví roztoči se umístí na povrch tohoto prášku. Pak se pečlivě použitím špachtle promíchají s práškem (který se musí měnit dvakrát týdně).

Synchronizace kultury:

Jedinci, kteří se použijí při zkoušce, by měli být podobně staří (cca 7 dní po dosažení stupně dospělosti). Při chovné teplotě 20 °C se toho dosáhne takto:

Samičky se přemístí do čisté chovné nádoby a přidá se dostatek krmiva

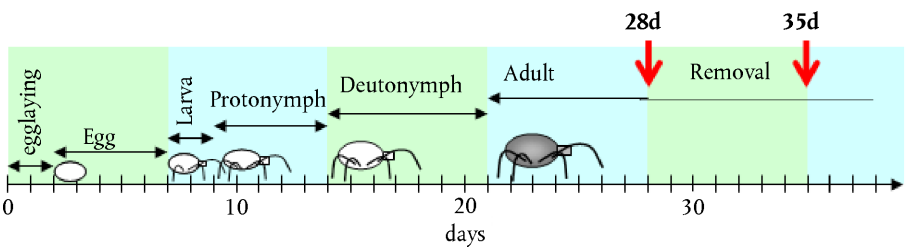
— Dva až tři dny se samičky ponechají pro nakladení vajíček, pak se vyjmou.

— Dospělé samičky se odeberou pro zkoušku mezi 28. a 35. dnem od začátku jejich umístění do čistých chovných nádob.

Dospělé samičky lze snadno odlišit od samečků a jiných vývojových stupňů díky jejich větší velikosti, vykrmenému tvaru a hnědému hřbetnímu štítu (samečci jsou útlejší a placatí), nedospělé mají bílou až krémovou barvu. Vývoj roztočů pokračuje přibližně podle modelu popsaného níže při 20 °C (obrázek): vajíčko 5 dní, larva 2 dny, protonymfa 5 dní, deutonymfa 7 dní, období před kladením vajíček u samiček 2 dny. Pak jsou roztoči dospělí.

Obrázek

Vývoj roztočů druhu *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer* při 20 °C. (odebrání = samičky použité pro zkoušku)



▼**M6**

Dospělí zkušební živočichové se odeberou ze synchronizované kultury a vloží do zkušebních nádob mezi 28. a 35. dnem poté, co rodičovské samičky zahájily kladení vajíček (tj. 7–14 dní po dosažení dospělosti). Tím se zaručí, že zkušební samičky již prošly obdobím před kladením vajíček a spářily se se samečky, kteří jsou rovněž přítomni v kultivační nádobě. Pozorováním kultur v laboratoři se zjistilo, že samičky se páří okamžitě nebo krátce po dosažení dospělosti, jestliže jsou samečci přítomni (Ruf, Vaninnen, osobní sdělení). Období sedmi dní je zvoleno, aby se usnadnila integrace do laboratorních podmínek a byl poskytnut čas pro vyrovnání individuální vývojové variability mezi roztoči. Kladení vajíček by mělo být zahájeno alespoň se stejným počtem samiček, jaký bude nakonec potřebný při zkoušce. Jestliže je například při zkoušce potřeba 400 samiček, musí být alespoň 400 samičkám umožněno naklást vajíčka během dvou až tří dní. Alespoň 1 200 vajíček by měl být startovní bod pro synchronizovanou populaci (poměr pohlaví cca 0,5; mortalita cca 0,2). Aby se předešlo kanibalismu, je vhodnější nedržet v jedné nádobě více než 20–30 samiček kladoucích vajíčka.

▼M6

Dodatek 5

Extrakční metody

Pro mikročlenovce je tepelná extrakce vhodnou metodou vyjmutí zkušebních jedinců z půdy/substrátu (viz obrázek níže). Metoda je založena na aktivitě organismů, takže pouze pohybliví jedinci budou mít šanci být zaznamenáni. Podstatou tepelné extrakce je vytvořit pro organismy ve vzorku postupně horší a horší podmínky, až pak opustí substrát a spadnou do fixační kapaliny (např. ethanolu). Klíčovými body jsou trvání extrakce a gradient zhoršování podmínek pro organismy, od dobrých přes středně dobré až po špatné. Extrakce pro ekotoxikologické zkoušky musí být co možná nejkratší, protože jakýkoli populační růst během doby extrakce by zkreslil výsledky. Na druhé straně musí být podmínky teploty a vlhkosti ve vzorku vždy v rozmezí, které umožňuje pohyb roztočů. Zahřívání vzorku půdy vede k vysušování substrátu. Jestliže je vysychání příliš rychlé, někteří roztoči by sami mohli vyschnout dříve, než by se jim podařilo uniknout.

Proto je navržen následující postup (24, 25):

Přístroj: Tullgrenova nálevka nebo srovnatelné metody, např. McFadyenova (vrchní zahřívání, vzorek je vkládán přes nálevku).

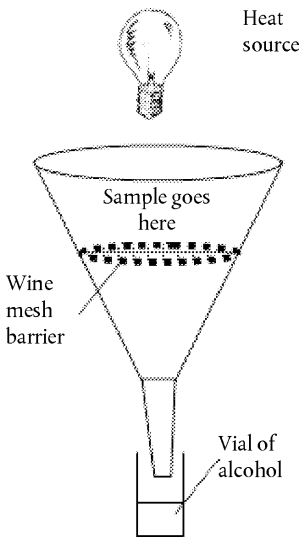
Režim zahřívání: 25 °C po dobu 12 h, 35 °C po dobu 12 h, 45 °C po dobu 24 hodin (celkem 48 h). Teplota se musí měřit v substrátu.

Fixační kapalina: 70 % ethanol.

Podrobnosti: Ze skleněné lahvičky použité pro zkoušku se sundá víčko a okolo hrdla se ováže kus síťoviny nebo tkaniny. Tkanina by měla mít velikost ok 1,0 až 1,5 mm. Tkanina se připevní gumičkou. Lahvička se opatrně otočí dnem vzhůru a umístí do extrakčního zařízení. Tkanina brání, aby substrát vypadával do fixační kapaliny, ale umožňuje roztočům opustit vzorek. Když jsou všechny lahvičky vloženy, spustí se režim zahřívání. Extrakce se ukončí po 48 hodinách. Fixační lahvičky se vyjmou a roztoči se spočítají pomocí mikroskopu s malým zvětšením.

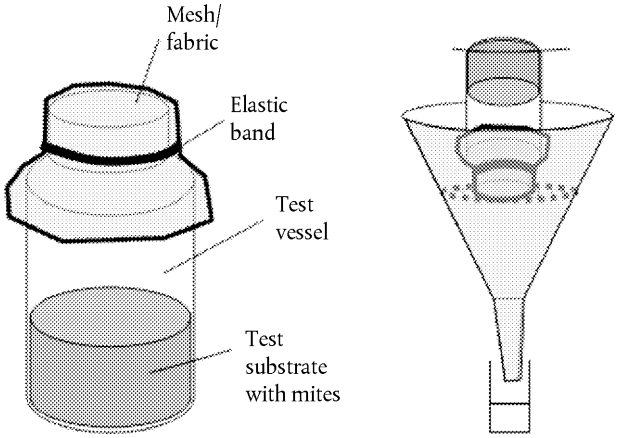
Účinnost extrakce vybranou metodou se musí prověřovat jednou nebo dvakrát ročně za použití nádob obsahujících známý počet mláďat a dospělých roztočů držených v neexponovaném zkušebním substrátu. Účinnost by měla být ≥ 90 % v průměru kombinovaném pro všechna vývojová stadia.

Extrakční zařízení Tullgrenova typu



▼**M6**

Jak se připraví zkušební ampulka po skončení zkoušky před extrakcí.



▼**M6**

Dodatek 6

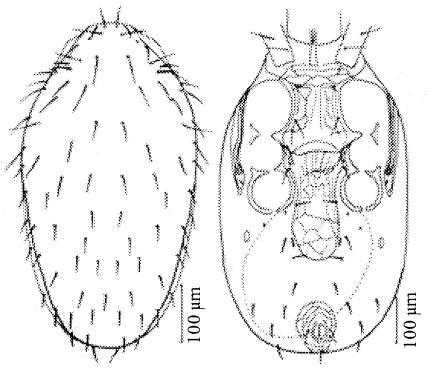
Identifikace *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer*

Podtřída/řád/podřád:	Čeleď:	Rod/podrod/druh:
Acari/Parasitiformes/Gamasida	Laelapidae	*Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer*

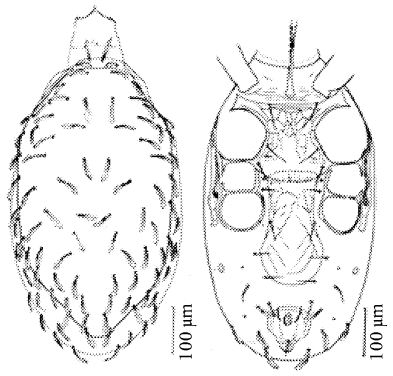
Autor a datum:	F. Faraji, Ph.D. (MITOX), 23. ledna 2007

Použitá literatura:	Karg, W. (1993). Die freilebenden Gamasina (Gamasides), Raubmilben. Tierwelt Deutschlands 59, 2. upravené vydání: 1-523. Hughes, A.M. (1976). The mites of stored food a houses. Ministry of Agriculture, Fisheries a Food, Technical Bulletin 9: 400pp. Krantz, G.W. (1978). A manual of Acarology. Oregon State University Book Stores, Inc., 509 pp.

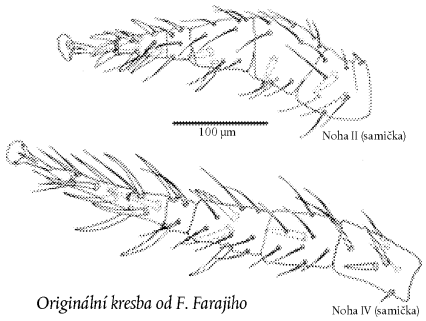
Plánovaně řízené charakteristiky:	Tectum se zaobleným pilovitým okrajem; hypostomální rýhy s více než 6 zoubky; kaudální dorsální sety Z4 nepříliš dlouhé; dorsální sety štětinovité; normální štít genitálií, nepříliš zvětšený a nedosahující k análnímu štítu; zadní polovina dorsálního štítu bez nepárových set; nohy II a IV s několika silnými makrosetami; dorsální seta Z5 asi dvakrát delší než J5; pevný článek chelicer s 12–14 zoubky a pohyblivý článek s 2 zoubky; délka idiosomy 520–685 μm. Roztoči *Hypoaspis miles* se rovněž používají při biologické kontrole a mohou se splést s *H. aculeifer*. Hlavní rozdíl je: *H. miles* náleží k podrodu *Cosmolaelaps* a mají nožovité dorsální sety, zatímco *H. aculeifer* náleží k podrodu *Geolaelaps* a mají štětinovité dorsální sety.



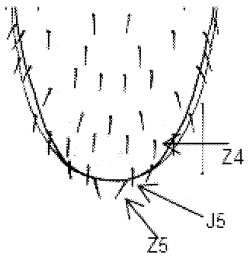
Hypoaspis aculeifer dle Hughes, 1976



Hypoaspis miles dle Hughes, 1976



Originální kresba od F. Farajiho



Hypoaspis aculeifer,
Hřbetní štít s charakteristickými sety

▼M6

Dodatek 7

Základní informace o biologii roztočů *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer*

Roztoči *Hypoaspis aculeifer* náleží do čeledi *Lealapidae*, řádu *Acari* (roztoči), třídy *Arachnida*, kmenu *Arthropoda*. Žijí ve všech druzích půdy a živí se jinými roztoči, hlísticemi, roupicovitými a chvostoskoky (26). V případě nedostatku potravy se uchylují ke kanibalismu (27). Těla dravých roztočů se člení na idiosomu a gnathosomu. Jasné dělení idiosomy na prosomu (hlavohruď) a opistosomu (zadeček) nemají. Gnathosoma (hlavový štít) nese orgány pro příjem potravy, jako jsou palpy (makadla) a chelicery (klepítka). Chelicery jsou tříčlánkové a opatřené zoubky různého tvaru. Kromě požírání používají samečci své chelicery zejména k přenosu spermatofor na samičky. Dorsální štít kryje téměř celou idiosomu. Velkou část idiosomy samičky zabírají rozmnožovací orgány, které jsou zvláště výrazné krátce před kladením vajíček. Na ventrální straně lze nalézt dva štíty, hrudní a genitální štít. Všechny nohy jsou vybaveny chlupy a trny. Chlupy se používají jako opora při zavrtávání do půdy nebo při pohybu na jejím povrchu. První pár nohou se používá hlavně jako tykadla. Druhý pár nohou se používá nejen k pohybu, ale rovněž k sevření kořisti. Trny čtvrtého páru nohou mohou sloužit k obraně a také k pohybu (28). Samečci jsou dlouzí 0,55–0,65 mm a váží 10–15 μg. Samičky jsou dlouhé 0,8–0,9 mm a váží 50–60 μg (8, 28) (obrázek 1).

Obr. 1

Samička, sameček, protonymfa a larva *H. aculeifer*.



Při 23 °C dosahují roztoči sexuální zralosti po 16 dnech (samičky) a 18 dnech (samečci) (6). Samičky přenášejí spermie pomocí solenostomu, odkud se pak přemístí do vaječníku. Spermie ve vaječníku dospějí a ukládají se. K oplodnění dochází pouze po dozrání spermií ve vaječníku. Oplodněná nebo neoplodněná vajíčka samičky kladou ve shlucích nebo odděleně, především do puklin nebo děr. Spářené samičky mohou plodit mláďata obou pohlaví, zatímco z vajíček nespářených samiček se vylíhnou pouze mláďata samečků. Během vývoje k dospělosti procházejí roztoči čtyřmi vývojovými fázemi (vajíčko–larva, larva–protonymfa, protonymfa–deutonymfa, deutonymfa–dospělý jedinec).

Vajíčka jsou mléčně bílá, sklovitá, eliptická a přibližně 0,37 mm dlouhá s pevným pláštěm. Podle (8) jsou larvy 0,42 až 0,45 mm veliké. Mají pouze tři páry nohou. V oblasti hlavy jsou vyvinuty palpy a chelicery. Chelicery opatřené několika malými zoubky slouží k vyklubání z vajíčka. Po prvním svlékání, 1–2 dny po vylíhnutí, se vyvinou protonymfy. Ty jsou rovněž bílé, o velikosti 0,45–0,62 mm (8) a mají čtyři páry nohou. Chelicery jsou kompletně vybaveny zoubky. Počínaje tímto stadiem začínají roztoči shánět potravu. Z tohoto důvodu je kutikula kořisti proražena chelicerami a do jejího těla je vypuštěn sekret pro mimostřevní trávení. Roztoč pak nasaje potravu ve formě

▼**M6**

kaše. Chelicery mohou rovněž sloužit k vytrhnutí větších částí z hrudek potravy (28). Po dalším svlékání se vyvinou deutonymfy. Ty jsou velké 0,60–0,80 mm (8) a mají žlutou až světle hnědou barvu. Počínaje tímto stadiem vývoje se dělí na samičky a samečky. Po další ekdyzi, během níž jsou živočichové neaktivní a vytváří se jim hnědý štít (po cca 14 dnech), jsou roztoči dospělí (28, 29, 30). Při teplotě 25 °C žijí 48 až 100 dní (27).

▼**M6**

Dodatek 8

Souhrn a harmonogram hlavních činností, které je třeba podniknout k provedení zkoušky s roztoči *Hypoaspis*

Doba (dny) začátek zkoušky = den 0	Činnost/úkol
Den – 35 až – 28	Samičky se přemístí ze zásobní kultury do čistých nádob pro zahájení synchronizace Po 2 dnech: samičky se vyjmou Dvakrát až třikrát za týden: dodá se dostatek krmiva
Den – 5 (± 2)	Příprava umělé půdy
Den – 4 (± 2)	Stanovení RVK umělé půdy Vysušení přes noc Následující den: vzorky se zváží a vypočítá se RVK
Den – 4 (± 2)	Zvlhčí se umělá půda, aby se dosáhlo 20–30 % RVK
Den 0	Zahájení zkoušky: do umělé půdy se přidá zkoušená chemická látka Do každého opakování se vloží 10 samiček Každé opakování se zváží Příprava abiotických kontrolních vzorků pro obsah vlhkosti a pH, 2 opakování pro každou expozici Přes noc se vysuší vlhké kontrolní vzorky Následující den: zváží se vlhké kontrolní vzorky Následující den: změří se pH vysušených abiotických kontrolních vzorků
Den 3, 6, 9, 12 (přibl.)	Do každého opakování se dodá dostatečné množství kořisti Každé opakování se zváží a nakonec se doplní odpařená voda
Den 14	Ukončení zkoušky, připraví se extrakce se všemi opakováními plus kontrolní vzorky účinnosti extrakce Přes noc se vysuší voda z kontrolních vzorků Následující den: zjistí se obsah vody v kontrolních vzorcích Následující den: změří se pH sušených kontrolních vzorků
Den 16	Ukončení extrakce
Den 16 +	Zaznamená se počet dospělých jedinců a mláďat v extrahovaném materiálu Výsledky se zpracují do vzorových tabulek Zkušební postup se uvede v listech závěrečné zprávy.

▼M6

C.37. 21DENNÍ ZKOUŠKA NA RYBÁCH: KRÁTKODOBÝ SCREENING ESTROGENNÍ A ANDROGENNÍ AKTIVITY A INHIBICE AROMATÁZY

ÚVOD

1. Tato zkušební metoda je rovnocenná Pokynu OECD pro zkoušení (TG) 230 (2009). Potřeba vyvinout a validovat zkoušku na rybách, která umožní zjistit určité chemické látky ovlivňující funkce endokrinního systému, pramení z obavy, že přítomnost chemických látek v životním prostředí může vyvolávat nepříznivé účinky na lidi i volně žijící zvířata, způsobené interakcí těchto chemických látek s endokrinním systémem. Organizace OECD v roce 1998 zahájila činnost s vysokou prioritou zaměřenou na revizi stávajících pokynů a vypracování nových pokynů pro zjišťování a zkoušení látek, které mohou narušovat činnost endokrinních žláz. Součástí této činnosti bylo vypracování zkušebních metod pro zjišťování chemických látek ovlivňujících endokrinní systém druhů ryb. Tato 21denní screeningová zkouška endokrinního působení na ryby prošla rozsáhlým validačním programem, který sestával z mezilaboratorních studií s vybranými chemickými látkami a jehož cílem bylo prokázat relevanci a spolehlivost této zkoušky pro zjišťování chemických látek způsobujících narušení endokrinního systému a inhibici aromatázy (1)(2)(3)(4)(5) u tří zkoumaných druhů ryb (jeleček velkohlavý, halančík japonský a danio pruhované). Zjistit androgenní aktivitu lze u jelečka velkohlavého a halančíka japonského, u dania pruhovaného to však možné není. Zjištění antiandrogenních chemických látek tato zkušební metoda neumožňuje. Validační studie byly podrobeny odborné revizi, kterou provedla komise složená z odborníků jmenovaných národními koordinátory programu zkušebních pokynů OECD (6). Tato zkouška není určena k identifikaci konkrétních mechanismů poškození hormonálního systému, protože pokusná zvířata mají intaktní hypothalamo-hypofýzo-gonadální (HPG) osu, která může reagovat na chemické látky, jež mají vliv na HPG osu na různých úrovních. Krátkodobá zkouška působení na reprodukci ryb (OECD TG 229) zahrnuje plodnost a případně histopatologii gonád u jelečka velkohlavého a rovněž všechny vlastnosti, které sleduje tato zkušební metoda. Pokyn OECD TG 229 umožňuje screening chemických látek, které ovlivňují reprodukci prostřednictvím různých mechanismů, včetně působení na endokrinní systém. Před volbou nejvhodnější zkušební metody je třeba to vzít v úvahu.

2. Tato zkušební metoda popisuje screeningovou zkoušku *in vivo*, kdy jsou pohlavně zralí rybí samečkové a třoucí se samičky drženi pohromadě a po určitou omezenou část svého životního cyklu (21 dnů) jsou vystaveni působení chemické látky. Po ukončení 21denní doby expozice – v závislosti na použitém druhu – se u samečků a samiček změří jeden nebo dva biomarkerové ukazatele jakožto indikátory estrogenní či androgenní aktivity zkoušené chemické látky nebo jejího působení jako inhibitoru aromatázy; těmito ukazateli jsou vitelogenin a druhotné pohlavní znaky. Vitelogenin se měří u jelečka velkohlavého, halančíka japonského a dania pruhovaného, zatímco druhotné pohlavní znaky se měří pouze u jelečka velkohlavého a halančíka japonského.

3. Tato biologická zkouška slouží jako screeningová zkouška pro určité typy působení na endokrinní systém a na její provádění je třeba pohlížet v kontextu „Koncepčního rámce OECD pro zkoušky a posuzování chemických látek narušujících činnost endokrinních žláz“ (28).

VÝCHOZÍ ÚVAHY A OMEZENÍ

4. Vitelogenin (VTG) obvykle vzniká v játrech samiček vejcorodých obratlovců v reakci na endogenní estrogen v krevním oběhu. Je to prekurzor žloutkových proteinů a poté, co vznikne v játrech, putuje krevním řečištěm do vaječníku, kde je spotřebováván a modifikován vyvíjejícími se jikrami. V plazmě nedospělých rybích samiček a samečků vitelogenin téměř není možné detekovat, protože v krevním oběhu nemají dostatek estrogenu. Játra jsou však schopna vitelogenin syntetizovat a vylučovat jej v reakci na stimulaci exogenním estrogenem.

▼M6

5. Měření vitelogeninu slouží k zjištění chemických látek s různými mechanismy estrogenního působení. Zjistit přítomnost estrogenních chemických látek je možné pomocí měření indukce vitelogeninu u samečků ryb, které bylo obsáhle zdokumentováno v recenzované vědecké literatuře (např. (7)). Indukce vitelogeninu byla rovněž prokázána na základě expozice aromatizovatelným androgenům (8)(9). Pokles úrovně estrogenu v krevním oběhu u samiček, například prostřednictvím inhibice aromatázy, která endogenní androgen přeměňuje v přírodní estrogen 17-beta-estradiol, způsobuje snížení hladiny vitelogeninu, což se použije ke zjištění chemických látek s vlastnostmi způsobujícími inhibici aromatázy (10)(11). Biologický význam odezvy v podobě produkce vitelogeninu po inhibici estrogenu/aromatázy byl potvrzen a široce zdokumentován. Je však možné, že tvorba VTG u samiček může být ovlivněna také obecnou toxicitou a toxickými účinky jiného než endokrinního charakteru, např. toxickými účinky na játra.

6. Podařilo se úspěšně vyvinout několik metod měření, následně standardizovaných pro rutinní používání. Jedná se například o metody enzymové imunosorpční analýzy (ELISA) specifické pro jednotlivé druhy, kdy se pro stanovení hladiny vzniklého vitelogeninu v malých vzorcích krve nebo jater odebraných z jednotlivých ryb používá imunochemie (12)(13)(14)(15)(16)(17)(18). Pro měření VTG se odebírají vzorky krve jelečka velkohlavého, krve nebo homogenátu hlavy/ocasu dania pruhovaného a jater halančíka japonského. U halančíka japonského existuje dobrá korelace mezi VTG měřeným z krve a z jater (19). Doporučené postupy pro odběr vzorků pro účely analýzy vitelogeninu jsou uvedeny v dodatku 6. Soupravy pro měření vitelogeninu jsou široce dostupné; takovéto soupravy by měly být založeny na validované metodě zkoušky ELISA specifické pro jednotlivé druhy.

7. Druhotné pohlavní znaky samečků ryb určitých druhů jsou zvenku viditelné, kvantifikovatelné a odrážejí hladiny endogenních androgenů. Je tomu tak v případě jelečka velkohlavého a halančíka japonského, avšak nikoli u dania pruhovaného, které kvantifikovatelné druhotné pohlavní znaky nemá. U samiček se zachovává schopnost vyvinout samčí druhotné pohlavní znaky, jsou-li exponovány androgenním chemickým látkám ve vodě. Ve vědecké literatuře je k dispozici několik studií, které dokumentují tento typ reakce u jelečka velkohlavého (20) a halančíka japonského (21). Snížený výskyt druhotných pohlavních znaků u samečků by vzhledem k nízké statistické průkaznosti měl být interpretován s opatrností a měl by být založen na odborném posouzení a na závažnosti důkazů. Pro použití dania pruhovaného v této zkoušce existují omezení v důsledku neexistence kvantifikovatelných druhotných pohlavních znaků, které by reagovaly na chemické látky s androgenním působením.

8. U jelečka velkohlavého je hlavním indikátorem expozice exogennímu androgenu počet pářicích hrbolků, které se nacházejí na tlamě samičky. U halančíka japonského představuje hlavní marker exogenní expozice androgenním chemickým látkám počet bradavkovitých výběžků u samiček. Doporučené postupy, kterými je třeba se řídit při hodnocení pohlavních znaků, jsou pro jelečka velkohlavého uvedeny v dodatku 5A a pro halančíka japonského v dodatku 5B.

9. Definice použité v této zkušební metodě jsou uvedeny v dodatku 1.

PODSTATA ZKOUŠKY

10. Při zkoušce jsou ve zkušebních nádržích společně exponováni samečci a samičky ryb v reprodukčním stavu. Jejich dospělost a reprodukční stav umožňují jasné rozlišení pohlaví, a tím i analýzu jednotlivých ukazatelů v závislosti na pohlaví, a zajišťuje jejich citlivost vůči exogenním chemickým látkám. Při ukončení zkoušky se pohlaví ověří makroskopickým vyšetřením gonád po ventrálním otevření břicha nůžkami. Přehled příslušných podmínek pro provedení biologické zkoušky je uveden v dodatku 2. Zkouška obvykle začíná se vzorky ryb odebranými z populace, která je

▼M6

schopna tření; zestárlé ryby by se používat neměly. Pokyny ohledně stáří ryb a jejich reprodukčního stavu jsou uvedeny v oddíle „Výběr ryb“. Ve zkoušce se použijí tři expoziční koncentrace chemické látky a kontrola s vodou, a je-li to nezbytné, kontrola s rozpouštědlem. U halančíka japonského a dania pruhovaného se použijí dvě nádrže či opakování pro každou expozici (přičemž každá nádrž obsahuje 5 samečků a 5 samiček), zatímco u jelečka velkohlavého se použijí čtyři nádrže či opakování pro každou expozici (přičemž každá nádrž obsahuje 2 samečky a 4 samičky). Účelem je zohlednit teritoriální chování samečků jelečka velkohlavého a současně zachovat dostatečnou průkaznost zkoušky. Expozice trvá 21 dnů a v den 21 expozice se u ryb odeberou vzorky.

11. Při odběru vzorků v den 21 se všechny ryby humánně usmrtí. U jelečka velkohlavého a halančíka japonského se změří druhotné pohlavní znaky (viz dodatek 5A a dodatek 5B); u dania pruhovaného a jelečka velkohlavého se odeberou vzorky krve pro stanovení vitelogeninu, alternativně lze pro stanovení vitelogeninu u dania pruhovaného odebrat hlavu/ocas (dodatek 6); u halančíka japonského se pro analýzu VTG odeberou játra (dodatek 6).

KRITÉRIA PŘIJATELNOSTI ZKOUŠKY

12. Aby byly výsledky zkoušky přijatelné, musí být splněny tyto podmínky:

— mortalita v kontrolách s vodou (nebo s rozpouštědlem) na konci doby expozice by neměla být větší než 10 %,

— koncentrace rozpuštěného kyslíku by měla dosahovat alespoň 60 % hodnoty nasycení vzduchem (ASV) po celou dobu expozice,

— teplota vody ve zkušebních nádržích by se v kterémkoli čase během doby expozice neměla lišit o více než ± 1,5 °C a měla by být udržována v rozpětí 2 °C v teplotních rozmezích stanovených pro jednotlivé zkušební druhy (dodatek 2),

— měly by být k dispozici důkazy pro prokázání toho, že koncentrace zkoušené chemické látky v roztoku byly uspokojivě udržovány v rozmezí ± 20 % od středních naměřených hodnot.

POPIS METODY

Přístroje a pomůcky

13. Normální laboratorní vybavení a zejména:

a) oximetr a pH-metr;

b) vybavení pro stanovení tvrdosti a alkality vody;

c) vhodné zařízení pro regulaci teploty a pro její pokud možno nepřetržité sledování;

d) nádrže z chemicky inertního materiálu o vhodném objemu vzhledem k doporučené velikosti násady a hustotě obsádky (viz dodatek 2);

e) třecí podklad pro jelečka velkohlavého a danio pruhované, potřebné podrobnosti jsou uvedeny v dodatku 4;

f) dostatečně přesné váhy (tj. vážící s přesností na ± 0,5 mg).

▼M6

Voda

14. Jako zkušební voda může být použita jakákoli voda, v níž zkušební druh dlouhodobě přežívá a roste. Po celou dobu zkoušky by měla mít stejnou kvalitu. Hodnota pH by měla být v rozmezí 6,5 až 8,5, avšak během zkoušky by se pH nemělo lišit o více než ± 0,5. S cílem zajistit, aby ředicí voda neměla nadměrný vliv na výsledek zkoušky (například v důsledku tvorby komplexů zkoušené chemické látky), by v určitých intervalech měly být odebírány vzorky k analýze. Je-li kvalita ředicí vody relativně stálá, mělo by se např. každé tři měsíce provádět stanovení těžkých kovů (např. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd a Ni), hlavních aniontů a kationtů (např. Ca^{2+}, Mg^{2+}, Na^{+}, K^{+}, Cl^{-} a SO_4^{2-}), pesticidů (např. celkový obsah organických fosforových a chlorových pesticidů) a celkového obsahu organického uhlíku a suspendovaných látek. Je-li prokázáno, že kvalita vody je konstantní po dobu alespoň jednoho roku, mohou být stanovení méně častá a intervaly lze prodloužit (např. každých šest měsíců). Některé chemické charakteristiky přijatelné ředicí vody jsou uvedeny v dodatku 3.

Zkušební roztoky

15. Zkušební roztoky o zvolených koncentracích se připraví ředěním zásobního roztoku. Zásobní roztok se připraví přednostně jednoduchým mechanickým mícháním nebo protřepáváním zkoušené chemické látky v ředicí vodě (např. mechanickým mícháním nebo pomocí ultrazvuku). Pro dosažení vhodné koncentrace zásobního roztoku mohou být použity sytící kolony. Použití nosného rozpouštědla se nedoporučuje. Pokud je však rozpouštědlo nezbytné, měla by být souběžně nasazena kontrola s rozpouštědlem při stejné koncentraci rozpouštědla jako při expozicích chemické látce. U chemických látek, jejichž zkoušení je obtížné, může být rozpouštědlo technicky nejlepším řešením; měl by být konzultován dokument OECD ke zkoušení toxicity obtížných látek a směsí ve vodním prostředí (22). Volba rozpouštědla se řídí chemickými vlastnostmi dané chemické látky. Dokument OECD doporučuje maximální koncentraci 100 µl/l, což by mělo být dodrženo. Nedávno provedený přezkum (23) však poukázal na další problémy při používání rozpouštědel ke zkoušení působení na endokrinní systém. Proto se doporučuje, aby byla koncentrace rozpouštědla – je-li nezbytné – snížena na co nejnižší úroveň, kdykoli je to technicky proveditelné (v závislosti na fyzikálně-chemických vlastnostech zkoušené chemické látky).

16. Použije se průtokový zkušební systém. Takový systém nepřetržitě dávkuje a ředí zásobní roztok zkoušené látky (např. pomocí dávkovacího čerpadla, zařízení pro proporcionální ředění či syticího systému), aby byla zajištěna série koncentrací ve zkušebních komorách. Průtok zásobních roztoků a ředicí vody by měl být během zkoušky kontrolován v určitých intervalech, nejlépe denně, a neměl by se v průběhu zkoušky měnit o více než 10 %. Je třeba zajistit, aby se nepoužívaly trubky z plastů nízké kvality nebo jiných materiálů, jež mohou obsahovat biologicky aktivní chemické látky. Při výběru materiálu pro průtokový systém by měla být vzata v úvahu možná adsorpce zkoušené chemické látky na tento materiál.

Chov ryb

17. Zkušební ryby by měly pocházet z laboratorní populace, přednostně z jednoho chovu, která byla alespoň dva týdny před zkouškou udržována v podmínkách kvality vody a osvětlení podobných podmínkám použitým ve zkoušce. Je důležité, aby velikost násady a hustota obsádky (viz definice v dodatku 1) vyhovovaly použitému testovacímu druhu (viz dodatek 2).

18. Po 48hodinové aklimatizaci se zaznamená mortalita a uplatní se tato kritéria:

▼M6

— mortalita vyšší než 10 % populace za sedm dnů: vyměnit celou obsádku,

— mortalita od 5 % do 10 % populace: aklimatizace dalších sedm dnů; je-li mortalita během následujících sedmi dnů vyšší než 5 %, vymění se celá obsádka,

— mortalita nižší než 5 % populace za sedm dnů: obsádka se přijme.

19. Během aklimatizačního období, v předexpozičním období nebo během expozice nesmí být u ryb léčeny žádné nemoci.

Předexpozice a výběr ryb

20. Doporučuje se jednotýdenní předexpoziční období, kdy jsou ryby umístěny do podobných nádrží jako při skutečné zkoušce. V průběhu chovu a ve fázi expozice se rybám podává strava *ad libitum*. Fáze expozice začíná s pohlavně dimorfními dospělými rybami z laboratorní dodávky reprodukčně zralých zvířat (např. s jasně viditelnými druhotnými pohlavními znaky, pokud jde o jelečka velkohlavého a halančíka japonského), kteří se aktivně třou. Jako obecné vodítko lze uvést, že jelečci velkohlaví by měli být ve věku přibližně 20 (± 2) týdnů za předpokladu, že byli po celou délku svého života chováni při teplotě 25 ± 2 °C (nelze to však posuzovat odděleně od pozorování skutečného reprodukčního stavu dané skupiny ryb). Halančíci japonští by měli být přibližně ve věku 16 (± 2) týdnů za předpokladu, že byli po celou dobu svého života chováni při teplotě 25 ± 2 °C. Dania pruhovaná by měla být přibližně ve věku 16 (± 2) týdnů za předpokladu, že po celou dobu svého života byla chována při teplotě 26 ± 2 °C.

USPOŘÁDÁNÍ ZKOUŠKY

21. Použijí se tři koncentrace zkoušené chemické látky, jedna kontrola (s vodou) a v případě potřeby jedna kontrola s rozpouštědlem. Údaje lze analyzovat, aby se určily statisticky významné rozdíly mezi reakcí na expozici a reakcí kontrolní skupiny. Tyto analýzy ukážou, zda je nezbytné chemickou látku dále dlouhodoběji testovat na nepříznivé účinky (totiž na přežití, rozvoj, růst a reprodukci) a nepoužívat ji při posuzování rizik (24).

22. U dania pruhovaného a halančíka japonského se v den 21 experimentu odebere vzorek samečků a samiček pro každou úroveň expozice (5 samečků a 5 samiček z každé ze dvou duplikátních nádrží) a z kontroly (kontrol) za účelem změření vitelogeninu a popřípadě druhotných pohlavních znaků. U jelečka velkohlavého se v den 21 expozice odebere vzorek samečků a samiček (2 samečci a 4 samičky z každé ze čtyř duplikátních nádrží) a z kontroly (kontrol) za účelem změření vitelogeninu a druhotných pohlavních znaků.

Výběr zkušebních koncentrací

23. Pro účely této zkoušky by nejvyšší zkušební koncentrace měla být stanovena na úrovni maximální tolerované koncentrace (MTC) určené na základě zkoušky ke zjištění rozsahu či jiných údajů o toxicitě, na úrovni 10 mg/l nebo na úrovni maximální rozpustnosti ve vodě, podle toho, která z hodnot je nejnižší. Maximální tolerovaná koncentrace je definována jako nejvyšší zkušební koncentrace chemické látky, která vede k nižší než 10 % mortalitě. Použití tohoto přístupu předpokládá, že existují empirické údaje o akutní toxicitě nebo jiné údaje o toxicitě, z nichž je možné maximální tolerovanou koncentraci odhadnout. Odhad maximální tolerované koncentrace může být nepřesný a obvykle je nezbytný odborný úsudek.

▼M6

24. Vyžadují se tři zkušební koncentrace odstupňované podle konstantního faktoru, který nepřekračuje 10, a kontrola s ředicí vodou (a v případě potřeby kontrola s rozpouštědlem). Doporučené rozmezí faktorů odstupňování je mezi 3,2 a 10.

POSTUP

Výběr a vážení zkušebních ryb

25. Je důležité minimalizovat rozdíly v hmotnostech ryb na začátku zkoušky. Vhodná rozpětí velikostí ryb různých druhů doporučených pro tuto zkoušku jsou uvedena v dodatku 2. Rozpětí individuálních hmotností samečků a samiček na začátku zkoušky by pro celou násadu ryb použitých ve zkoušce mělo být pokud možno ± 20 % aritmetického průměru hmotností stejného pohlaví. Aby bylo možné odhadnout střední hodnotu hmotnosti, doporučuje se před zkouškou zvážit dílčí vzorek rybí populace.

Podmínky expozice

Doba trvání

26. Doba trvání zkoušky je 21 dnů po předexpozičním období. Doporučené předexpoziční období je jeden týden.

Krmení

27. Ryby by měly být krmeny *ad libitum* dostatečným množstvím vhodného krmiva (dodatek 2), aby si udržely tělesnou kondici. Je třeba dbát na to, aby nedošlo k růstu mikroorganismů a k zakalení vody. Obecně lze říci, že denní množství krmiva by mělo být rozděleno na dva nebo tři stejné díly a podáváno několikrát za den s odstupem alespoň tří hodin mezi dvěma krmeními. Podávání v jedné větší porci je přijatelné zejména o víkendech. 12 hodin před odběrem vzorků / pitvou se ryby přestanou krmit.

28. Rybí potrava by měla být vyhodnocena z hlediska přítomnosti kontaminantů, např. organochlorových pesticidů, polycyklických aromatických uhlovodíků (PAH) a polychlorovaných bifenylů (PCB). Měla by být vyloučena potrava se zvýšenou hladinou fytoestrogenů, která by zpochybnila reakci na známého agonistu estrogenu (např. 17-beta-estradiol) při zkoušce.

29. Nespotřebovaná potrava a výkaly se ze zkušebních nádrží odstraňují alespoň dvakrát týdně, např. opatrným odsátím ze dna jednotlivých nádrží pomocí odsávačky.

Světlo a teplota

30. Fotoperioda a teplota vody by měly vyhovovat zkušebním druhům (viz dodatek 2).

Četnost analytických stanovení a měření

31. Před započetím předexpoziční doby je třeba zajistit řádné fungování systému dávkování chemických látek. Měly by se stanovit všechny analytické metody, které budou zapotřebí, včetně dostatečných znalostí o stálosti chemických látek ve zkušebním systému. Během zkoušky se koncentrace zkoušené látky stanovují v pravidelných intervalech následujícím způsobem: průtok zásobních roztoků toxické látky a ředicí vody se během zkoušky kontroluje nejlépe denně, avšak minimálně dvakrát týdně, a neměl by se v průběhu zkoušky měnit o více než 10 %. Doporučuje se na počátku zkoušky a poté v týdenních intervalech měřit skutečné koncentrace zkoušené chemické látky ve všech nádržích.

32. Doporučuje se zakládat výsledky na naměřených koncentracích. Udržela-li se však koncentrace zkoušené chemické látky v roztoku během celé zkoušky uspokojivě v rozmezí ± 20 % jmenovité koncentrace, lze výsledky zakládat na jmenovitých nebo změřených hodnotách.

33. Může být nezbytné vzorky filtrovat (např. přes filtr s průměrem pórů 0,45 μm) nebo je odstředit. Bude-li toho zapotřebí, doporučuje se odstřeďování. Neadsorbuje-li se zkoušená látka na filtry, je filtrace přijatelná.

▼M6

34. V průběhu zkoušky se alespoň jednou týdně v každé zkušební nádrži měří množství rozpuštěného kyslíku, teplota a pH. Nejméně jednou týdně se měří celková tvrdost a alkalita vody v kontrolních nádržích a v jedné nádrži s nejvyšší koncentrací. Teplota se měří pokud možno nepřetržitě alespoň v jedné zkušební nádrži.

Pozorování

35. V celém průběhu zkoušky nebo při jejím ukončení se posuzuje počet obecných reakcí (např. přežití) a základních biologických reakcí (např. hladiny vitelogeninu). Měření a hodnocení těchto ukazatelů a jejich využití jsou popsány níže.

Přežití

36. Ryby se v průběhu zkoušky prohlížejí denně, každý úhyn se zaznamená a uhynulé ryby se co nejdříve odstraní. Uhynulé ryby v kontrolních ani v exponovaných nádržích se nenahrazují. Makroskopickým hodnocením gonád se určí pohlaví ryb, které uhynuly v průběhu zkoušky.

Chování a vzhled

37. Jakékoli neobvyklé chování (v porovnání s kontrolními skupinami) se zaznamená. Může se jednat o příznaky obecné toxicity včetně hyperventilace, nekoordinovaného plavání, ztráty rovnováhy a netypické nečinnosti nebo netypického příjmu potravy. Zaznamenají se rovněž vnější abnormality (např. krvácení, ztráta zbarvení). Takovéto příznaky toxicity by měly být při interpretaci údajů pečlivě zváženy, neboť mohou ukazovat na koncentrace, při kterých biologické markery endokrinní aktivity nejsou spolehlivé. Pozorované změny chování mohou rovněž poskytnout užitečné kvalitativní informace, které se mohou stát podnětem pro možné budoucí požadavky na zkoušky s rybami. Například u jelečka velkohlavého byla pozorována teritoriální agresivita u normálních samečků nebo maskulinizovaných samiček exponovaných androgenním látkám; u dania pruhovaného se v důsledku expozice estrogenním nebo antiandrogenním látkám omezí nebo utlumí typické chování při páření a tření.

38. Některé vzhledové charakteristiky (především zbarvení) se během manipulace mohou rychle měnit, a proto je důležité provádět kvalitativní pozorování ještě před odstraněním ryb ze zkušebního systému. Dosavadní zkušenosti s jelečkem velkohlavým naznačují, že některé chemické látky s endokrinním působením mohou zpočátku vyvolat změny těchto vnějších znaků: zbarvení těla (světlé nebo tmavé), forma zbarvení (přítomnost svislých pruhů) a tvar těla (hlavy a hrudní oblasti). Proto by pozorování fyzického vzhledu ryb měla být prováděna jak v průběhu zkoušky, tak na konci studie.

Humánní usmrcení ryb

39. V den 21, tj. při ukončení expozice, se ryby usmrtí přiměřeným množstvím trikainu (trikain methan sulfonát, Metacain, MS-222 (číslo CAS 886-86-2)), pufrovaného na koncentraci 100–500 mg/l roztokem $NaHCO_3$ (hydrogenuhličitan sodný, číslo CAS 144-55-8) v koncentraci 300 mg/l, aby se snížilo podráždění sliznice; poté se odeberou vzorky krve nebo tkání za účelem stanovení vitelogeninu, jak je vysvětleno v části týkající se vitelogeninu.

▼M6

Pozorování druhotných pohlavních znaků

40. Některé chemické látky s endokrinním působením mohou vyvolat změny v druhotných pohlavních znacích specifických pro jednotlivé druhy (např. počet pářicích hrbolků u samečků jelečka velkohlavého a bradavkovitých výběžků u samečků halančíka japonského). Chemické látky s určitými účinky pak mohou způsobit abnormální výskyt druhotných pohlavních znaků u zvířat opačného pohlaví; např. agonisté androgenního receptoru, jako je trenbolon, methyltestosteron a dihydrotestosteron, mohou způsobit, že se u samiček jelečka vyvinou výrazné pářicí hrbolky nebo že se u samiček halančíka japonského vyvinou bradavkovité výběžky (11)(20)(21). Bylo také zaznamenáno, že agonisté receptoru estrogenu mohou způsobit snížení počtu pářicích hrbolků a velikost dorzálních týlních polštářků u dospělých samečků (25)(26). Takováto obecná morfologická pozorování mohou poskytnout užitečné kvalitativní a kvantitativní informace, které se mohou stát podnětem pro možné budoucí požadavky na zkoušky s rybami. Počet a velikost pářicích hrbolků u jelečka velkohlavého a bradavkovitých výběžků u halančíka japonského lze kvantifikovat buď přímo, anebo pomocí uchovávaných vzorků, což je praktičtější. Doporučené postupy pro hodnocení druhotných pohlavních znaků u jelečka velkohlavého jsou k dispozici v dodatku 5A a u halančíka japonského v dodatku 5B.

Vitelogenin (VTG)

41. Pomocí heparinizované mikrohematokritové kapiláry nebo alternativně srdeční punkcí pomocí injekční stříkačky se odebere krev z ocasní tepny/žíly. V závislosti na velikosti ryb se objem krve, který lze odebrat, zpravidla nachází v rozmezí 5–60 µl u jednoho jelečka velkohlavého a 5–15 µl u jednoho dania pruhovaného. Odstředěním se z krve oddělí plazma a uskladní se s inhibitory proteázy při teplotě – 80 °C do doby, než je analyzována na vitelogenin. Alternativně lze jako zdroj tkáně pro stanovení vitelogeninu u halančíka japonského použít játra a u dania pruhovaného homogenát hlavy/ocasu (dodatek 6). Měření VTG by mělo být založeno na validované homologované metodě ELISA s použitím homologovaného standardu VTG a homologovaných protilátek. Doporučuje se použít metodu schopnou odhalit tak nízké hladiny VTG, jako je několik málo ng na ml plazmy (nebo ng na mg tkáně, což je základní hladina u neexponovaných samečků ryb).

42. Kontrola kvality analýzy vitelogeninu bude provedena za použití standardů, provedením slepých zkoušek a analýzou alespoň dvou duplikátních vzorků. U každé metody ELISA by měla být provedena zkouška na vliv matrice (účinek ředění vzorku) s cílem určit minimální faktor ředění vzorku. Každá destička pro analýzu metodou ELISA, která se používá pro zkoušky VTG, by měla zahrnovat tyto vzorky pro kontrolu kvality: alespoň 6 kalibračních standardů pokrývajících rozmezí očekávaných koncentrací vitelogeninu a alespoň jednu slepou zkoušku nespecifické vazby (analyzované na dvou duplikátních vzorcích). Absorbance při těchto slepých zkouškách by neměla přesahovat 5 % maximální absorbance kalibrovaných standardů. Analyzovat se budou alespoň dva alikvotní vzorky (duplikátní jamky) každého ředění. Duplikátní jamky, které se liší o více než 20 %, by měly být analyzovány znovu.

43. Korelační koeficient (R^2) u kalibračních křivek by měl být větší než 0,99. Vysoká korelace však nepostačuje k tomu, aby zaručila odpovídající prognózu koncentrace ve všech rozmezích. Kromě dostatečně vysoké korelace u kalibrační křivky by koncentrace všech standardů vypočtené z kalibrační křivky měly ležet mezi 70 a 120 % jejich jmenovité koncentrace. Pokud se jmenovité koncentrace od kalibrační regresní křivky odchylují (např. při nízkých koncentracích), může být pro adekvátní vyjádření údajů

▼M6

o absorbanci nezbytné rozdělit kalibrační křivku na nízké a vysoké rozpětí nebo použít nelineární model. Je-li křivka rozdělena, oba segmenty křivky by měly mít $R^2 > 0,99$.

44. Mez detekce (LOD) je definována jako koncentrace nejnižšího analytického standardu a mez stanovitelnosti (LOQ) je definována jako koncentrace nejnižšího analytického standardu vynásobená nejnižším faktorem ředění.

45. Každý den, kdy se provádějí zkoušky vitelogeninu, se analyzuje obohacený vzorek vytvořený pomocí referenčního standardu pro opakovatelnost (dodatek 7). Poměr mezi očekávanou koncentrací a naměřenou koncentrací se zaznamená spolu s výsledky všech souborů zkoušek provedených v týž den.

ÚDAJE A JEJICH PŘEDKLÁDÁNÍ

Hodnocení reakcí biologických markerů pomocí analýzy rozptylu (ANOVA)

46. Pro zjištění potenciálního endokrinního působení chemické látky se pomocí analýzy rozptylu (ANOVA) porovnávají reakce mezi exponovanými a kontrolními skupinami. Je-li nasazena kontrola s rozpouštědlem, provede se pro každý ukazatel vhodné statistické porovnání mezi kontrolami s ředicí vodou a kontrolami s rozpouštědlem. Návod k tomu, jak při následné statistické analýze zacházet s údaji o kontrolách s ředicí vodou a kontrolách s rozpouštědlem, lze najít v dokumentu OECD, 2006c (27). Veškeré údaje o biologických reakcích se analyzují a zaznamenají se za každé pohlaví zvlášť. Nejsou-li splněny předpoklady pro použití parametrických metod kvůli nenormálnímu rozdělení (např. Shapirův-Wilkův test) nebo heterogennímu rozptylu (Bartlettův test nebo Lewenův test), měla by být před provedením ANOVA zvážena transformace údajů za účelem homogenizace rozptylů nebo by měla být provedena vážená ANOVA. V případě nemonotónní závislosti dávka-odezva lze použit Dunnettův test (parametrický) vícenásobných párových porovnávání nebo Mannův-Whitneyův test s Bonferroniho korekcí (neparametrický). Je-li závislost dávka-odezva přibližně monotónní, lze použít jiné statistické testy (např. Jonckheerův-Terpstrův test nebo Williamsův test). V dodatku 8 je uvedeno statistické schéma, které může pomoci při rozhodování o tom, jaký statistický test je nejvhodnější použít. Další informace lze získat rovněž v dokumentu OECD o současných přístupech ke statistické analýze údajů o ekotoxicitě (27).

Zpráva o výsledcích zkoušky

47. Údaje o studii by měly zahrnovat:

Zkušební zařízení:

— odpovědní pracovníci a jejich odpovědnost v rámci studie,

— každá laboratoř by měla prokázat svoji způsobilost testováním škály reprezentativních chemických látek.

Zkoušená látka:

— charakterizace zkoušených chemických látek,

— fyzikální povaha a relevantní fyzikálně-chemické vlastnosti,

▼**M6**

— metoda a frekvence přípravy zkušebních koncentrací,

— informace o stabilitě a biologické rozložitelnosti.

Rozpouštědlo:

— charakterizace rozpouštědla (povaha, použitá koncentrace),

— zdůvodnění výběru rozpouštědla (není-li použita voda).

Pokusná zvířata:

— druh a kmen,

— dodavatel a konkrétní zařízení dodavatele,

— věk ryb na počátku zkoušky a reprodukční stav/stav z hlediska tření,

— podrobnosti o postupu aklimatizace ryb,

— tělesná hmotnost ryb na počátku expozice (z dílčího vzorku rybí populace).

Zkušební podmínky:

— použitý zkušební postup (druh zkoušky, velikost nasazení, hustota obsádky atd.),

— metoda přípravy zásobních roztoků a průtok,

— jmenovité zkušební koncentrace, týdně naměřené koncentrace zkušebních roztoků a použitá analytická metoda, střední hodnoty koncentrací naměřených ve zkušebních nádržích a směrodatné odchylky a důkazy toho, že naměřené hodnoty odpovídají koncentracím zkoušené chemické látky v pravém roztoku,

— charakteristiky ředicí vody (včetně pH, tvrdosti, alkality, teploty, koncentrace rozpuštěného kyslíku, koncentrace zbytkového chloru, celkového obsahu organického uhlíku, obsahu suspendovaných látek a výsledků jakýchkoli jiných provedených měření),

— kvalita vody ve zkušebních nádržích: pH, tvrdost, teplota a koncentrace rozpuštěného kyslíku,

— podrobné informace o krmení (např. druh krmiva/krmiv, původ, podávané množství a frekvence krmení), a jsou-li k dispozici, analýzy na přítomnost příslušných kontaminujících látek (např. polychlorovaných bifenylů, polyaromatických uhlovodíků a organochlorových pesticidů).

Výsledky

— důkazy o tom, že kontrolní skupiny vyhověly kritériím přijatelnosti zkoušky,

— údaje o mortalitě pro každou zkušební koncentraci a kontrolní skupinu,

— použité metody statistické analýzy, zpracování údajů a zdůvodnění použitých metod,

— údaje o biologických pozorováních celkové morfologie včetně druhotných pohlavních znaků a vitelogeninu,

▼M6

— výsledky analýz údajů, přednostně ve formě tabulek a grafů,

— výskyt jakýchkoli neobvyklých reakcí ryb a viditelné účinky vyvolané zkoušenou chemickou látkou.

POKYNY K INTERPRETACI A PŘIJETÍ VÝSLEDKŮ

48. Tento oddíl obsahuje některé aspekty, které je třeba vzít v úvahu při interpretaci výsledků zkoušky pro různé měřené ukazatele. K výsledkům zkoušky je třeba přistupovat s opatrností, pokud se zdá, že zkoušená chemická látka způsobuje zjevnou toxicitu nebo ovlivňuje celkový stav zkušebního zvířete.

49. Při stanovování rozmezí zkušebních koncentrací by se mělo dbát na to, aby nebyla překročena maximální tolerovaná koncentrace a byla tak umožněna smysluplná interpretace údajů. Je důležité, aby existovala alespoň jedna koncentrace, při které se neprojevují žádné příznaky toxických účinků. Příznaky onemocnění a příznaky toxických účinků se pečlivě posoudí a zaznamenají. Je například možné, že tvorba VTG u samiček může být ovlivněna také obecnou toxicitou a toxickými účinky jiného než endokrinního charakteru, např. toxickými účinky na játra. Interpretace účinků však může být podpořena na jiných úrovních expozice, které nejsou zkresleny systémovou toxicitou.

50. Existuje několik aspektů, které je třeba zvážit pro přijetí výsledků zkoušky. Obecně vzato by hladiny VTG v kontrolních skupinách samečků a samiček měly být odlišné – u jelečka velkohlavého a dania pruhovaného by se měly lišit přibližně o tři řády a u halančíka japonského přibližně o jeden řád. Příklady rozmezí hodnot zjištěných v kontrolních a exponovaných skupinách jsou dostupné ve validačních zprávách (1)(2)(3)(4). Vysoké hodnoty VTG u samečků v kontrolních skupinách by mohly zpochybnit citlivost zkoušky a její schopnost odhalit slabé agonisty estrogenu. Nízké hodnoty VTG u samiček v kontrolních skupinách by mohly zpochybnit citlivost zkoušky a její schopnost detekovat inhibitory aromatázy a antagonisty estrogenu. Při vypracování tohoto návodu byly použity validační studie.

51. Pokud laboratoř dříve tuto zkoušku neprováděla nebo došlo k podstatným změnám (např. změna rybího kmene nebo dodavatele), lze doporučit provedení studie odborné způsobilosti. Doporučuje se použít k tomuto účelu chemické látky pokrývající širší spektrum účinků nebo dopadů na několik ukazatelů zkoušky. V praxi se doporučuje, aby každá laboratoř shromáždila své vlastní historické kontrolní údaje pro samečky a samičky v kontrolních skupinách a pro pozitivní kontrolu estrogenního působení chemické látky (např. 17-beta-estradiolu při koncentraci 100 ng/l nebo dobře známého slabého agonisty), jež vede ke zvýšené hodnotě VTG u samečků ryb, pozitivní kontrolu inhibice aromatázy chemické látky (např. fadrozolu nebo prochlorazu při koncentraci 300 µg/l), jež vede ke zvýšené hodnotě VTG u samiček ryb, a pozitivní kontrolu androgenního působení chemické látky (např. 17-beta-trenbolonu při koncentraci 5 µg/l), jež vede k indukci druhotných pohlavních znaků u samiček jelečka velkohlavého a halančíka japonského. Pro zajištění způsobilosti laboratoře lze všechny tyto údaje porovnat s dostupnými údaji (1)(2)(3).

52. Obecně lze říci, že měření vitelogeninu se považuje za pozitivní, dojde-li v porovnání s kontrolní skupinou ke statisticky významnému nárůstu VTG u samečků ($p < 0,05$) nebo ke statisticky významnému poklesu u samiček ($p < 0,05$) alespoň při nejvyšší koncentraci zkoušené látky a za nepřítomnosti příznaků obecné toxicity. Pozitivní výsledek se dále podpoří prokázáním biologicky možné závislosti mezi dávkou a odezvou. Jak bylo uvedeno výše, pokles hodnoty vitelogeninu nemusí být zcela endokrinního původu; avšak pozitivní výsledek by měl být obecně interpretován jako důkaz endokrinního působení *in vivo* a měl by být obvykle podnětem ke krokům za účelem dalšího vyjasnění.

▼**M6**

LITERATURA

1) OECD (2006a) Report of the Initial Work Towards the Validation of the 21-Day Fish Screening Assay for the Detection of Endocrine active Substances (Phase 1A). OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 60, ENV/JM/MONO(2006)27.

2) OECD (2006b) Report of the Initial Work Towards the Validation of the 21-Day Fish Screening Assay for the Detection of Endocrine active Substances (Phase 1B). OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 61, ENV/JM/MONO(2006)29.

3) OECD (2007) Final report of the Validation of the 21-day Fish Screening Assay for the Detection of Endocrine Active Substances. Phase 2: Testing Negative Substances. OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 78, ENV/JM/MONO(2007)25.

4) Owens, J. W. (2007) Phase 3 report of the validation of the OECD Fish Screening Assay. CEFIC LRI Project, Endocrine. http://www.cefic-lri.org/index.php?page=projects (accessed 18/09/08).

5) US EPA (2007) Validation of the Fish Short-Term Reproduction Assay: Integrated Summary Report. Unpublished report dated 15 December 2007. US Environmental Protection Agency, Washington, DC, pp. 104.

6) OECD (2008) Report of the Validation Peer Review for the 21-Day Fish Endocrine Screening Assay and Agreement of the Working Group of the National Coordinators of the Test Guidelines Programme on the Follow-up of this Report. OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 94, ENV/JM/MONO(2008)21.

7) Sumpter and Jobling (1995) Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment. Environmental Health Perspectives;103 Suppl 7:173-8 Review.

8) Pawlowski, S., Sauer, A., Shears, J. A., Tyler, C. R., Braunbeck, T. (2004) Androgenic and estrogenic effects of the synthetic androgen 17alpha-methyltestosterone on sexual development and reproductive performance in the fathead minnow (*Pimephales promelas*) determined using the gonadal recrudescence assay. Aquatic Toxicology; 68(3), pp. 277–91.

9) Andersen, L., Goto-Kazato, R., Trant, J. M., Nash, J. P., Korsgaard, B., Bjerregaard, P. (2006) Short-term exposure to low concentrations of the synthetic androgen methyltestosterone affects vitellogenin and steroid levels in adult male zebrafish (Danio rerio). Aquatic Toxicology; 76(3-4), pp. 343–52.

10) Ankley, G. T., Kahl, M. D., Jensen, K. M., Hornung, M. W., Korte, J. J., Makynen, E. A., Leino, R. L. (2002) Evaluation of the aromatase inhibitor fadrozole in a short-term reproduction assay with the fathead minnow (Pimephales promelas). Toxicological Sciences;67(1), pp. 121–30.

11) Panter, G. H., Hutchinson, T. H., Hurd, K. S., Sherren, A., Stanley, R. D., Tyler, C. R. (2004) Successful detection of (anti-)androgenic and aromatase inhibitors in pre-spawning adult fathead minnows (Pimephales promelas) using easily measured endpoints of sexual development. Aquatic Toxicology; 70(1), pp. 11–21.

12) Parks, L. G., Cheek, A. O., Denslow, N. D., Heppell, S. A., McLachlan, J. A., LeBlanc, G. A., Sullivan, C. V. (1999) Fathead minnow (Pimephales promelas) vitellogenin: purification, characterization and quantitative immunoassay for the detection of estrogenic compounds. Comparative Biochemistry and Physiology. Part C Pharmacology, toxicology and endocrinology; 123(2), pp. 113–25.

▼**M6**

13) Panter, G. H., Tyler, C. R., Maddix, S., Campbell, P. M., Hutchinson, T. H., Länge, R., Lye, C., Sumpter, J. P. (1999) Application of an ELISA to quantify vitellogenin concentrations in fathead minnows (Pimephales promelas) exposed to endocrine disrupting chemicals. CEFIC-EMSG research report reference AQ001. CEFIC, Brussels, Belgium.

14) Fenske, M., van Aerle, R. B., Brack, S. C., Tyler, C. R., Segner, H. (2001) Development and validation of a homologous zebrafish (Danio rerio Hamilton-Buchanan) vitellogenin enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and its application for studies on estrogenic chemicals. Comp. Biochem. Phys. C 129 (3), pp. 217–232.

15) Holbech, H., Andersen, L., Petersen, G. I., Korsgaard, B., Pedersen, K. L., Bjerregaard, P. (2001) Development of an ELISA for vitellogenin in whole body homogenate of zebrafish (Danio rerio). Comparative Biochemistry and Physiology. Part C Pharmacology, toxicology and endocrinology; 130, pp. 119–131.

16) Rose, J., Holbech, H., Lindholst, C., Noerum, U., Povlsen, A., Korsgaard, B., Bjerregaard, P. (2002) Vitellogenin induction by 17ß-estradiol and 17ß-ethinylestradiol in male zebrafish (Danio rerio). Comp. Biochem. Physiol. C. 131, pp. 531–539.

17) Brion, F., Nilsen, B. M., Eidem, J. K., Goksoyr, A., Porcher, J. M. Development and validation of an enzyme-linked immunosorbent assay to measure vitellogenin in the zebrafish (Danio rerio). Environmental Toxicology and Chemistry; vol. 21, pp. 1699–1708.

18) Yokota, H., Morita, H., Nakano, N., Kang, I. J., Tadokoro, H., Oshima, Y., Honjo, T., Kobayashi, K. (2001) Development of an ELISA for determination of the hepatic vitellogenin in Medaka (Oryzias latipes). Jpn J Environ Toxicol 4, pp. 87–98.

19) Tatarazako, N., Koshio, M., Hori, H., Morita, M. and Iguchi, T. (2004) Validation of an enzyme-linked immunosorbent assay method for vitellogenin in the Medaka. Journal of Health Science 50, pp. 301–308.

20) Ankley, G. T., Jensen, K. M., Makynen, E. A., Kahl, M. D., Korte, J. J., Homung, M. W., Henry, T. R., Denny, J. S., Leino, R. L., Wilson, V. S., Cardon, M. C., Hartig, P. C., Gray, L. E. (2003) Effects of the androgenic growth promoter 17-beta-trenbolone on fecundity and reproductive endocrinology of the fathead minnow. Environmental Toxicology and Chemistry; 22(6), pp. 1350–60.

21) Seki, M., Yokota, H., Matsubara, H., Maeda, M., Tadokoro, H., Kobayashi, K. (2004) Fish full life-cycle testing for androgen methyltestosterone on medaka (Oryzias latipes). Environmental Toxicology and Chemistry; 23(3), pp. 774–81.

22) OECD (2000) Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment. No. 23. Paris.

23) Hutchinson, T. H., Shillabeer, N., Winter, M. J., Pickford, D. B. (2006a) Acute and chronic effects of carrier solvents in aquatic organisms: A critical review. Review. Aquatic Toxicology, 76, pp. 69–92.

24) Hutchinson, T. H., Ankley, G. T., Segner, H., Tyler, C. R. (2006b) Screening and testing for endocrine disruption in fish-biomarkers as „signposts," not „traffic lights," in risk assessment. Environmental Health Perspectives; 114 Suppl 1, pp. 106–14.

25) Miles-Richardson, S. R., Kramer, V. J., Fitzgerald, S. D., Render, J. A., Yamini, B., Barbee, S. J., Giesy, J. P. (1999) Effects of waterborne exposure to 17B-estradiol on secondary sex characteristics and gonads of the fathead minnow (Pimephales promelas). Aquat. Toxicol. 47, pp. 129–145.

▼**M6**

26) Martinovic, D., Blake, L. S., Durhan, E. J., Greene, K. J., Kahl, M. D., Jensen, K. M., Makynen, E. A., Villeneuve, D. L. and Ankley, G. T. (2008) Characterization of reproductive toxicity of vinclozolin in the fathead minnow and co-treatment with an androgen to confirm an anti-androgenic mode of action. Environ. Toxicol. Chem. 27, pp. 478–488.

27) OECD (2006c). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. OECD environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 54. ENV/JM/MONO(2006)18.

28) OECD (2012) OECD Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupters (revised). Annex I to Draft Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption. Series on Testing and Assessment No. 150. ENV/JM/MONO(2012)22.

▼M6

Dodatek 1

Zkratky a definice

Chemická látka: látka nebo směs.

CV: variační koeficient.

ELISA: enzymová imunosorpční analýza.

Velikost násady: živá hmotnost ryb na jednotku objemu vody.

Hustota obsádky: počet ryb na jednotku objemu vody.

VTG (Vitelogenin): fosfolipoglykoprotein, prekurzor proteinů vaječného žloutku, který se obvykle vyskytuje u sexuálně aktivních samiček všech vejcorodých druhů.

Osa HPG: hypothalamo-hypofýzo-gonadální osa.

MTC: maximální tolerovaná koncentrace; představuje přibližně 10 % mediánu letální koncentrace (LC_{50}).

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

▼M6

Dodatek 2

Experimentální podmínky pro screeningovou zkoušku endokrinního působení na rybách

1. Doporučený druh	**Jeleček velkohlavý** (*Pimephales promelas*)	**Halančík japonský** (*Oryzias latipes*)	**Danio pruhované** (*Danio rerio*)
2. Typ zkoušky	průtoková	průtoková	průtoková
3. Teplota vody	25 ± 2 °C	25 ± 2 °C	26 ± 2 °C
4. Kvalita osvětlení	Fluorescenční zářivky (širokospektrální)	Fluorescenční zářivky (širokospektrální)	Fluorescenční zářivky (širokospektrální)
5. Intenzita osvětlení	10–20 μE/m^2/s, 540–1 000 luxů nebo 50–100 ft-c (okolní laboratorní hodnoty)	10–20 μE/m^2/s, 540–1 000 luxů nebo 50–100 ft-c (okolní laboratorní hodnoty)	10–20 μE/m^2/s, 540–1 000 luxů nebo 50–100 ft-c (okolní laboratorní hodnoty)
6. Fotoperioda (přechody ve formě svítání/stmívání jsou volitelné, nejsou však považovány za nezbytné)	16 h světlo, 8 h tma	12–16 h světlo, 12–8 h tma	12–16 h světlo, 12–8 h tma
7. Velikost násady	< 5 g na l	< 5 g na l	< 5 g na l
8. Velikost zkušební komory	10 l (minimálně)	2 l (minimálně)	5 l (minimálně)
9. Objem zkušebního roztoku	8 l (minimálně)	1,5 l (minimálně)	4 l (minimálně)
10. Výměny objemu zkušebního roztoku	Nejméně 6krát denně	Nejméně 5krát denně	Nejméně 5krát denně
11. Stáří zkušebních organismů	Viz odstavec 20	Viz odstavec 20	Viz odstavec 20
12. Přibližná živá hmotnost dospělých ryb (v g)	Samičky: 1,5 ± 20 % Samečci: 2,5 ± 20 %	Samičky: 0,35 ± 20 % Samečci: 0,35 ± 20 %	Samičky: 0,65 ± 20 % Samečci: 0,4 ± 20 %
13. Počet ryb v každé zkušební nádrži	6 (2 samečci a 4 samičky)	10 (5 samečků a 5 samiček)	10 (5 samečků a 5 samiček)
14. Počet expozic	= 3 (plus příslušné kontrolní skupiny)	= 3 (plus příslušné kontrolní skupiny)	= 3 (plus příslušné kontrolní skupiny)
15. Počet nádrží pro každou expozici	minimálně 4	minimálně 2	minimálně 2
16. Počet ryb pro každou zkušební koncentraci	16 dospělých samiček a 8 samečků (4 samičky a 2 samečci v každé duplikátní nádrži)	10 dospělých samiček a 10 samečků (5 samiček a 5 samečků v každé duplikátní nádrži)	10 dospělých samiček a 10 samečků (5 samiček a 5 samečků v každé duplikátní nádrži)
17. Krmný režim	Živé nebo zmrazené dospělé nebo larvy (nauplia) žábronožky solné dvakrát nebo třikrát denně (*ad libitum*), komerčně dostupná potrava nebo kombinace výše uvedeného	Larvy (nauplia) žábronožky solné dvakrát nebo třikrát denně (*ad libitum*), komerčně dostupná potrava nebo kombinace výše uvedeného	Larvy (nauplia) žábronožky solné dvakrát nebo třikrát denně (*ad libitum*), komerčně dostupná potrava nebo kombinace výše uvedeného

▼**M6**

18. Provzdušňování	Žádné, dokud koncentrace rozpuštěného kyslíku neklesne pod 60 % nasycení vzduchem	Žádné, dokud koncentrace rozpuštěného kyslíku neklesne pod 60 % nasycení vzduchem	Žádné, dokud koncentrace rozpuštěného kyslíku neklesne pod 60 % nasycení vzduchem
19. Ředicí voda	Čistá povrchová, studniční nebo rekonstituovaná voda nebo odchlorovaná vodovodní voda	Čistá povrchová, studniční nebo rekonstituovaná voda nebo odchlorovaná vodovodní voda	Čistá povrchová, studniční nebo rekonstituovaná voda nebo odchlorovaná vodovodní voda
20. Předexpoziční období	doporučeno 7 dnů	doporučeno 7 dnů	doporučeno 7 dnů
21. Trvání expozice chemické látce	21 dnů	21 dnů	21 dnů
22. Biologické ukazatele	přežití chování druhotné pohlavní znaky VTG	přežití chování druhotné pohlavní znaky VTG	přežití chování VTG
23. Přijatelnost zkoušky	Obsah rozpuštěného kyslíku > 60 % nasycení; střední teplota 25 ± 2 °C; 90 % přežití ryb v kontrolních skupinách; naměřené zkušební koncentrace v rozmezí 20 % středních naměřených hodnot pro každou úroveň expozice.	Obsah rozpuštěného kyslíku > 60 % nasycení; střední teplota 24 ± 2 °C; 90 % přežití ryb v kontrolních skupinách; naměřené zkušební koncentrace v rozmezí 20 % středních naměřených hodnot pro každou úroveň expozice.	Obsah rozpuštěného kyslíku > 60 % nasycení; střední teplota 26 ± 2 °C; 90 % přežití ryb v kontrolních skupinách; naměřené zkušební koncentrace v rozmezí 20 % středních naměřených hodnot pro každou úroveň expozice.

▼**M6**

Dodatek 3

Některé chemické charakteristiky přijatelné ředicí vody

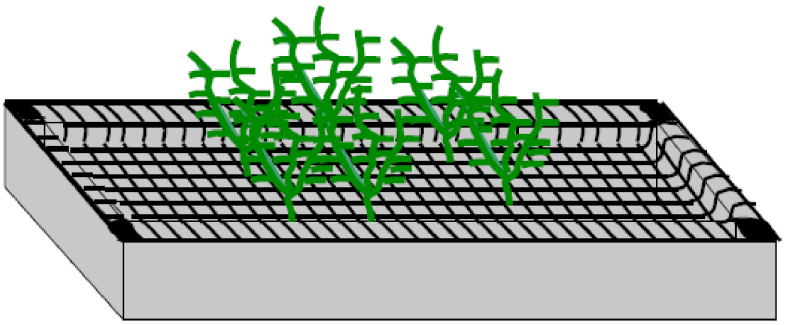
Složka	Koncentrace
Pevné částice	< 20 mg/l
Celkový obsah organického uhlíku	< 2 mg/l
Neionizovaný amoniak	< 1 µg/l
Zbytkový chlor	< 10 µg/l
Celkový obsah organofosforových pesticidů	< 50 ng/l
Celkový obsah organochlorových pesticidů a polychlorovaných bifenylů	< 50 ng/l
Celkový obsah organického chloru	< 25 ng/l

▼M6

Dodatek 4A

Třecí podklad pro danio pruhované

Vytírací rošt: celoskleněná miska na nástroje, např. o rozměrech (d × š × v) 22 × 15 × 5,5 cm, pokrytá snímatelnou drátěnou mřížkou z nerezové oceli (šířka otvorů 2 mm). Mřížka by měla pokrývat misku na nástroje v místech pod úrovní okraje.



Na mřížku se připevní třecí podklad. Měl by vytvořit strukturu, do které budou ryby vplouvat. Vhodné jsou například umělé akvarijní rostliny vyrobené ze zeleného plastového materiálu (poznámka: je třeba vzít v potaz možnou adsorpci zkoušené chemické látky na plastový materiál). Plastový materiál se dostatečně dlouho proplachuje v dostatečném objemu horké vody, aby se zajistilo, že se do zkušební vody nedostanou žádné chemické látky. Při použití skleněných materiálů je třeba zajistit, aby se ryby při prudkých pohybech neporanily a netísnily.

Vzdálenost mezi roštem a skleněnými tabulemi by měla být alespoň 3 cm, aby se zajistilo, že ke tření nebude docházet mimo rošt. Jikry vytřené do roštu propadávají mřížkou a 45–60 minut od začátku osvětlení je lze odebírat. Průsvitné jikry nejsou přilnavé a lze je snadno spočítat pomocí bočního světla. Při použití pěti samiček v každé nádrži se počet jiker do 20 za den považuje za nízký, do 100 za den za středně vysoký a více než 100 jiker za den za vysoký. Třecí rošt se odstraní, odeberou se jikry a třecí rošt se poté opět vsadí do zkušební nádrže, a to co nejpozději večer nebo velmi časně zrána. Doba do opětovného vsazení by neměla překročit jednu hodinu, protože jinak může pod vlivem třecího podkladu dojít k individuálnímu páření a tření v neobvyklé době. Pokud situace vyžaduje pozdější vsazení třecího roštu, mělo by se tak stát alespoň 9 hodin po začátku osvětlení. V tuto pozdní denní dobu již tření vyvoláno nebývá.

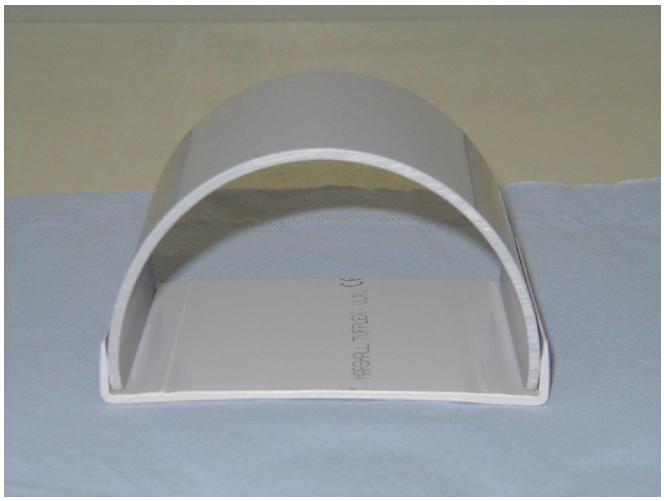
▼**M6**

Dodatek 4B

Třecí podklad pro jelečka velkohlavého

Do jedné zkušební komory se umístí dvě nebo tři kombinované třecí roury a plastové/keramické/skleněné rošty nebo rošty z nerezové oceli (např. šedý žlábek polokruhového tvaru o délce 80 mm uložený na podložce se zvednutými okraji o délce 130 mm) (viz obrázek). Bylo prokázáno, že pro třecí podklad jsou vhodné starší roury z PVC nebo keramiky (Thorpe a kol., 2007).

Roury se doporučuje obrousit, aby se zlepšila přilnavost. Rošt by rovněž měl být odstíněn, aby se rybám zabránilo v přístupu k vypadlým jikrám, pokud u použitého třecího podkladu nebylo prokázáno, že na něm jikry dobře ulpívají.



Účelem základny je pojmout veškeré jikry, které neulpěly na povrchu roury a které by tak spadly na dno nádrže (nebo jikry, které jsou kladeny přímo na plochou plastovou základnu). Všechny třecí podklady by se před použitím měly nejméně 12 hodin proplachovat v ředicí vodě.

ODKAZY

Thorpe, K. L., Benstead, R., Hutchinson, T. H., Tylerm, C. R. (2007) An optimised experimental test procedure for measuring chemical effects on reproduction in the fathead minnow, *Pimephales promelas*. Aquatic Toxicology, 81, pp. 90–98.

▼M6

Dodatek 5A

Posuzování druhotných pohlavních znaků u jelečka velkohlavého za účelem zjištění určitých chemických látek s endokrinním působením

Přehled

Mezi potenciálně důležité charakteristiky tělesného vzhledu dospělých jelečků velkohlavých při zkouškách endokrinních disruptorů patří zbarvení těla (tj. světlé/tmavé), forma zbarvení (tj. přítomnost či nepřítomnost svislých pruhů), tvar těla (tj. tvar hlavy a hrudní oblasti, rozšíření břicha) a druhotné pohlavní znaky specifické pro tento druh (tj. počet a velikost pářicích hrbolků, velikost dorzálního polštářku a kladélka).

Pářicí hrbolky se nacházejí na hlavě (dorzální polštářek) reprodukčně aktivních jelečků velkohlavých a obvykle jsou uspořádány symetricky po obou stranách (Jensen a kol., 2001). U samiček v kontrolních skupinách a u nedospělých samečků a samiček nebyl vývoj hrbolků zaznamenán (Jensen a kol., 2001). Samečci mohou mít až osm jednotlivých hrbolků kolem očí a mezi nosními dírkami. Nejvíce hrbolků největší velikosti se nachází ve dvou souběžných řadách bezprostředně pod nosními dírkami a nad tlamou. Ryby často mají také skupiny hrbolků pod dolní čelistí. Ty, které jsou nejblíže k tlamě, se zpravidla vyskytují v jednom páru, zatímco více ventrálně se mohou nacházet i po čtyřech. Skutečný počet hrbolků je zřídka větší než 30 (v rozmezí 18–28; Jensen a kol., 2001). Nejvíce hrbolků má podobu jednotlivých, zaoblených struktur, jejichž výška se přibližně rovná jejich poloměru. Většina reprodukčně aktivních samečků má rovněž alespoň některé hrbolky zvětšené a vystouplé do té míry, že je nelze odlišit jako jednotlivé struktury.

Některé druhy chemických látek narušujících činnost endokrinních žláz mohou způsobit abnormální výskyt určitých druhotných pohlavních znaků u opačného pohlaví. Například agonisté androgenního receptoru, jako je 17-beta-methyltestosteron nebo 17-beta-trenbolon, mohou způsobit, že se pářicí hrbolky vyvinou u samiček jelečka velkohlavého (Smith, 1974; Ankley a kol., 2001; 2003), a agonisté estrogenního receptoru mohou způsobit snížení počtu nebo velikosti pářicích hrbolků u samečků (Miles-Richardson a kol., 1999; Harries a kol., 2000).

Následuje popis, jak charakterizovat pářicí hrbolky u jelečka velkohlavého, založený na postupech používaných v laboratoři americké Agentury na ochranu životního prostředí (EPA) v Duluthu ve státě Minnesota. Specifické produkty a/nebo vybavení lze nahradit srovnatelnými materiály, které jsou k dispozici.

Prohlídka se nejlépe provádí pomocí lupy s osvětlením nebo pomocí preparačního mikroskopu s osvětlením a s objektivem 3X. Ryby se prohlížejí z dorzálního směru a anteriorní stranou dopředu (hlavou k pozorovateli).

a) Ryba se vloží do malé Petriho misky (např. o průměru 100 mm), anteriorní stranou dopředu a ventrální stranou dolů. Hledáček se zaostří tak, aby bylo možné identifikovat hrbolky. Ryba se jemně a pomalu obrací z boku na bok, aby bylo možné identifikovat oblasti s hrbolky. Hrbolky se spočítají a zaznamená se jejich hodnocení.

b) Pozorování se opakuje na ventrálním povrchu hlavy tak, že se ryba položí na Petriho misku dorzálně, anteriorní stranou dopředu.

c) Pozorování by u každé ryby měla být dokončena do 2 min.

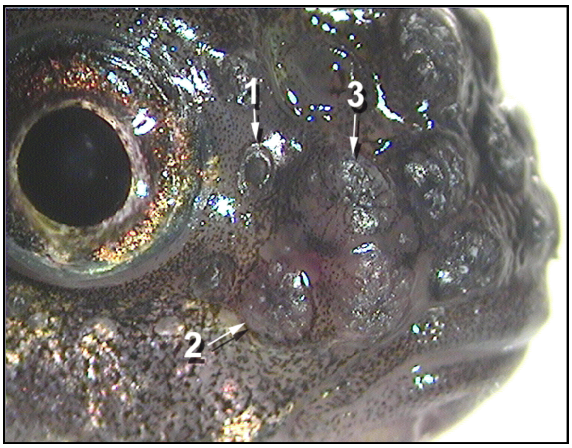
▼M6

Počítání hrbolků a jejich klasifikace

Bylo zjištěno šest specifických oblastí pro posuzování přítomnosti a vývoje hrbolků u dospělých jelečků velkohlavých. Ke zmapování umístění a množství přítomných hrbolků byla vytvořena šablona (viz konec tohoto dodatku). U každého organismu se zaznamená počet hrbolků a jejich velikost pak lze kvantitativně seřadit takto: 0 – nevyskytují se, 1 – přítomné, 2 – zvětšené a 3 – výrazně zvětšené (obrázek 1).

Stupeň 0 – žádné hrbolky se nevyskytují. Stupněm 1 (přítomné) se označí všechny hrbolky s jedním vrcholem, jejichž výška se přibližně rovná jejich poloměru (průměru). Stupeň 2 (zvětšené) se projevuje tkání v hvězdicovitém tvaru, který má obvykle velkou radiální základnu s rýhami nebo brázdami směřujícími od středu. Horní část hrbolku je často spíše rozeklaná, ale může být i poněkud zaoblená. Při stupni 3 (výrazně zvětšené) jsou hrbolky obvykle poměrně velké a zaoblené, s málo rozlišenou strukturou. Někdy se hrbolky mohou vyskytovat společně a vytvářet jednolitou strukturu v určité oblasti nebo v několika oblastech najednou (B, C a D, jak jsou popsány níže). Zbarvení a tvar jsou podobné jako u stupně 2, ale někdy je obtížné je navzájem rozlišit. Použití tohoto klasifikačního systému zpravidla vede k celkovému hodnocení hrbolků nižšímu než 50 u normálních samečků v kontrolních skupinách, kteří mají 18–20 hrbolků (Jensen a kol., 2001).

Obrázek 1



Skutečný počet hrbolků u některých ryb může být v konkrétní oblasti klasifikace větší, než je počet políček v šabloně (dodatek A). Nastane-li tento případ, lze vpravo nebo vlevo od daného políčka vepsat další klasifikační čísla. Šablona proto nemusí vykazovat symetrii. Další způsob zmapování hrbolků, které jsou párové nebo spojené vertikálně podél horizontální roviny tlamy, lze provést tak, že se do jednoho políčka uvedou klasifikační body dvou hrbolků.

Oblasti mapování:

A – hrbolky nacházející se kolem oka. Mapují se od dorzálních po ventrální kolem anteriorního okraje oka. U dospělých samečků v kontrolních skupinách jsou obvykle početné, u samiček v kontrolních skupinách se nevyskytují, zpravidla jsou párové (po jednom u každého oka), u samiček exponovaných androgenům může být pouze jeden.

B – hrbolky nacházející se mezi nosními dírkami (póry senzorických kanálků). U samečků v kontrolní skupině jsou obvykle párové a vyššího stupně (2 – zvětšené nebo 3 – výrazně zvětšené). U samiček v kontrolní skupině se nevyskytují, do určité míry se mohou vyskytnout a vyvinout u samiček exponovaných androgenům.

C – hrbolky nacházející se bezprostředně anteriorně před nosními dírkami, souběžně s tlamou. U zralých samečků v kontrolních skupinách jsou zpravidla zvětšené nebo výrazně zvětšené. U méně vyvinutých samečků nebo u samiček exponovaných androgenům bývají stupně 1 (přítomné) nebo zvětšené.

▼M6

D – hrbolky nacházející se souběžně s linií tlamy. Zpravidla jsou klasifikovány u samečků v kontrolních skupinách. U samiček z kontrolních skupin se nevyskytují, ale bývají přítomné u samiček exponovaných androgenům.

E – hrbolky nacházející se na dolní čelisti, poblíž tlamy; obvykle jsou malé a většinou párové. U samečků v kontrolních skupinách nebo u exponovaných samečků bývají různé, stejně tak u exponovaných samiček.

F – hrbolky nacházející se ventrálně k poloze E. Obvykle jsou malé a párové. Bývají přítomné u samečků v kontrolní skupině a samiček exponovaných androgenům.

ODKAZY

1) Ankley, G. T., Jensen, K. M., Kahl, M. D., Korte, J. J., Makynen, M. E. (2001) Description and evaluation of a short-term reproduction test with the fathead minnow (*Pimephales promelas*). Environ Toxicol Chem 20, pp. 1276–1290.

2) Ankley, G. T., Jensen, K. M., Makynen, E. A., Kahl, M. D., Korte, J. J., Hornung, M. W., Henry, T. R., Denny, J. S., Leino, R. L., Wilson, V. S., Cardon, M. C., Hartig, P. C., Gray, E. L. (2003) Effects of the androgenic growth promoter 17-β trenbolone on fecundity and reproductive endocrinology of the fathead minnow. Environ Toxicol Chem 22, pp. 1350–1360.

3) Harries, J. E., Runnalls, T., Hill, E., Harris, C. A., Maddix, S., Sumpter, J. P., Tyler, C. R. (2000) Development of a reproductive performance test for endocrine disrupting chemicals using pair-breeding fathead minnows (Pimephales promelas). Environ Sci Technol 34, pp. 3003–3011.

4) Jensen, K. M., Korte, J. J., Kahl, M. D., Pasha, M. S., Ankley, G. T. (2001) Aspects of basic reproductive biology and endocrinology in the fathead minnow (Pimephales promelas). Comp Biochem Physiol C 128, pp. 127–141.

5) Kahl, M. D., Jensen, K. M., Korte, J. J., Ankley, G. T. (2001) Effects of handling on endocrinology and reproductive performance of the fathead minnow. J Fish Biol 59, pp. 515–523.

6) Miles-Richardson, S. R., Kramer, V. J., Fitzgerald, S. D., Render, J. A., Yamini, B., Barbee, S. J., Giesy, J. P. (1999) Effects of waterborne exposure of 17-estradiol on secondary sex characteristics and gonads of fathead minnows (Pimephales promelas). Aquat Toxicol 47, pp. 129–145.

7) Smith, R. J. F. (1974) Effects of 17-methyltestosterone on the dorsal pad and tubercles of fathead minnows (Pimephales promelas). Can J Zool 52, pp. 1031–1038.

Šablona pro pářicí hrbolky

Identifikační číslo _____

Datum _____

Celkové hodnocení _____

Číselná klasifikace

1 – přítomné

2 – zvětšené

3 – výrazně zvětšené

	A	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**					
	B	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**					
	C	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**
	D	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**
				E	**X1**	**X1**				
	F	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**					

▼M6

Dodatek 5B

Posuzování druhotných pohlavních znaků u halančíka japonského za účelem zjištění určitých chemických látek s endokrinním působením

Následuje popis měření bradavkovitých výběžků (*), které jsou druhotným pohlavním znakem u halančíka japonského (*Oryzias latipes*).

(*) Bradavkovité výběžky se obvykle objevují pouze u dospělých samečků a nacházejí se na paprscích ploutví, a to od druhého do sedmého nebo osmého paprsku od posteriorního konce řitní ploutve (obrázek 1 a 2). Na prvním ploutevním paprsku od posteriorního konce řitní ploutve se výběžky vyskytují jen zřídka. Uvedené standardní operační postupy zahrnují měření výběžků na prvním ploutevním paprsku (pořadové číslo ploutevního paprsku v tomto standardním operačním postupu označuje pořadí od posteriorního konce řitní ploutve).

1) Po vyříznutí jater (dodatek 6) se mrtvé tělo vloží do kónické zkumavky, která obsahuje asi 10 ml 10 % neutrálního pufrovaného formalínu (hlavou nahoru, ocasem dolů). Fixuje-li se gonáda v jiném roztoku než v 10 % neutrálním pufrovaném formalínu, provede se příčný řez skalpelem přes celé mrtvé tělo mezi anteriorní oblastí řitní ploutve a řitním otvorem, přičemž je nutno dbát na to, aby nedošlo k poškození vývodu pohlavních žláz a samotné gonády (obrázek 3). Kraniální část rybího těla se vloží do fixačního roztoku, aby se zachovala gonáda, a ocasní část rybího těla do 10 % neutrálního pufrovaného formalínu, jak bylo popsáno výše.

2) Po uložení rybího těla do 10 % neutrálního pufrovaného formalínu se anteriorní oblast řitní ploutve uchopí pinzetou a stiskne se asi na 30 vteřin tak, aby řitní ploutev zůstala otevřená. Při uchopení řitní ploutve pinzetou se opatrně uchopí několik ploutevních paprsků v anteriorní oblasti tak, aby se nepoškrábaly bradavkovité výběžky.

3) Poté, co řitní ploutev zůstala asi po 30 vteřin otevřená, se rybí tělo uloží do 10 % neutrálního pufrovaného formalínu při pokojové teplotě až do změření bradavkovitých výběžků (měření se provádí po fixaci trvající alespoň 24 hodin).

Měření

1) Po fixaci rybího těla v 10 % neutrálním pufrovaném formalínu po dobu alespoň 24 hodin se mrtvé tělo ryby vyjme z kónické zkumavky a formalín se otře do filtračního papíru (nebo papírového ubrousku).

2) Ryba se položí břichem nahoru. Poté se malými preparačními nůžkami opatrně odstřihne řitní ploutev (upřednostňuje se řitní ploutev odstřihnout s malým množstvím interneurálních trnů (pterygioforů).

3) Anteriorní oblast oddělené řitní ploutve se uchopí pinzetou a položí na skleněné podložní sklíčko spolu s několika kapkami vody. Poté se řitní ploutev překryje krycím sklíčkem. Je třeba dát pozor, aby se při uchopení řitní ploutve pinzetou nepoškrábaly bradavkovité výběžky.

4) Pod biologickým mikroskopem (vzpřímený mikroskop nebo inverzní mikroskop) se pomocí počítadla stanoví počet článků s bradavkovitými výběžky. Bradavkovité výběžky se započítají, pokud je na posteriorním okraji článku viditelná malá formace výběžků. Počet článků s bradavkovitými výběžky na každé řitní ploutvi se zaznamená v pracovním listu (např. první ploutevní paprsek: 0, druhý ploutevní paprsek: 10, třetí ploutevní

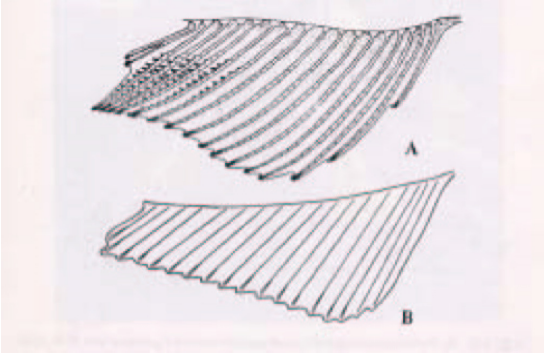
▼**M6**

paprsek: 12 atd.) a součet těchto čísel u jednotlivých ryb se zanese do excelové tabulky. V případě potřeby se řitní ploutev vyfotografuje a počet článků s bradavkovitými výběžky se spočítá na fotografii.

5) Po ukončení měření se řitní ploutev vloží do kónické zkumavky popsané v bodě 1) a uskladní se.

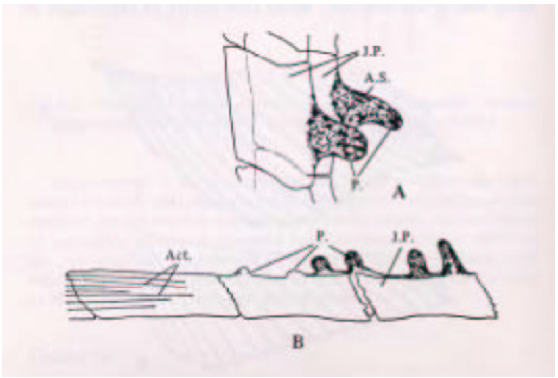
Obrázek 1.

Schéma znázorňující rozdíl mezi pohlavími v tvaru a velikosti řitní ploutve – A sameček, B samička. Oka, T. B. (1931) On the processes on the fin rays of the male of *Oryzias latipes* and other sex characters of this fish. J. Fac. Sci., Tokyo Univ., IV, 2, pp. 209–218.



Obrázek 2.

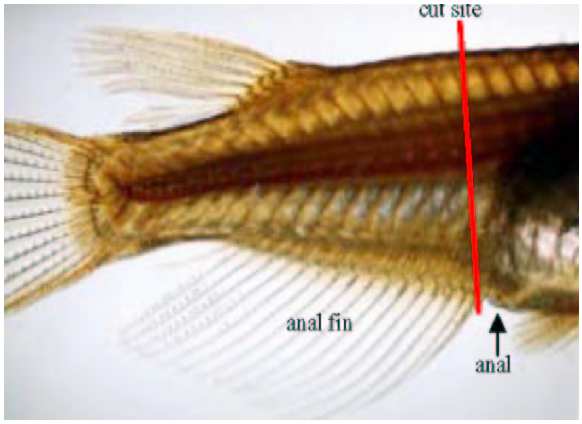
A – výběžky na článcích paprsků řitní ploutve. J. P. – článek, A. S. – osová vzdálenost, P. – výběžek. B – distální konec ploutvového paprsku. Na hrotu paprsku se nacházejí actinotrichia (Act.). Oka, T. B. (1931) On the processes on the fin rays of the male of *Oryzias latipes* and other sex characters of this fish. J. Fac. Sci., Tokyo Univ., IV, 2, pp. 209–218.



▼M6

Obrázek 3.

Fotografie rybího těla, na které je znázorněno místo řezu při fixaci gonád ve fixačním roztoku, nejedná-li se o 10 % neutrální pufrovaný formalín. V takovém případě se zbývající část těla pomocí břitvy odřízne mezi anteriorní oblastí řitní ploutve a řitním otvorem (červená čára), hlavová část rybího těla se uloží do fixačního roztoku pro gonády a ocasní část se uloží do 10 % neutrálního pufrovaného formalínu.



▼M6

Dodatek 6

Doporučené postupy pro odběr vzorků za účelem analýzy vitelogeninu

Je třeba dbát na to, aby nedošlo ke vzájemné kontaminaci mezi vzorky VTG samečků a samiček.

Postup 1A: Jeleček velkohlavý, odběr krve z ocasní žíly/tepny

Po anestetizaci se skalpelem částečně oddělí ocasní stopka a heparinizovanou mikrohematokritovou kapilárou se odebere krev z ocasní žíly/tepny. Po odebrání krve se rychle izoluje plazma, a to odstředěním po dobu 3 minut při zrychlení 15 000 g (nebo alternativně po dobu 10 minut při zrychlení 15 000 g a při teplotě 4 °C). Je-li to požadováno, lze po odstředění stanovit procento hematokritu. Část plazmy se poté přenese z mikrohematokritové kapiláry a uloží se do odstředivkové zkumavky s 0,13 jednotkami aprotininu (inhibitor proteázy) při teplotě – 80 °C do doby, než bude možné provést stanovení vitelogeninu. Podle velikosti jelečka velkohlavého (závisející na pohlaví) se objem plazmy, kterou lze odebrat, zpravidla nachází v rozmezí od 5 do 60 mikrolitrů z každé ryby (Jensen a kol., 2001).

Postup 1B: Jeleček velkohlavý, odběr krve ze srdce

Alternativně lze krev odebrat také srdeční punkcí pomocí heparinizované injekční stříkačky (1 000 jednotek heparinu na ml). Krev se přenese do Eppendorfových zkumavek (uložených na ledu) a poté odstředí (po dobu 5 minut při zrychlení 7 000 g a pokojové teplotě). Plazma se přenese do čistých Eppendorfových zkumavek (v poměrných částech, pokud je to s ohledem na objem plazmy proveditelné), urychleně se zmrazí při teplotě – 80 °C a takto se ponechá až do analýzy (Panter a kol., 1998).

Postup 2A: Halančík japonský, vyříznutí jater

Vyjmutí testované ryby ze zkušební komory

1) Testovaná ryba se pomocí malého čeřenu vyjme ze zkušební komory. Je třeba dát pozor a neupustit testovanou rybu do jiné zkušební komory.

2) V zásadě by se testované ryby měly vyjímat v tomto pořadí: kontrolní skupina, kontrola s rozpouštědlem (existuje-li), skupina s nejnižší koncentrací, skupina se střední koncentrací, skupina s nejvyšší koncentrací a pozitivní kontrola. Všichni samečkové se ze zkušební komory vyjmou dříve než zbývající samičky.

3) Pohlaví každé testované ryby se zjistí na základě vnějších druhotných pohlavních znaků (např. tvaru řitní ploutve).

4) Zkušební ryby se umístí do přepravní nádrže a dopraví se na pracoviště, kde se provádí vyříznutí jater. Etikety ze zkušební komory a přepravní nádrže se zkontrolují kvůli přesnosti a pro ověření, zda se počet ryb, jež byly vyjmuty ze zkušební komory, a počet ryb, které ve zkušební komoře zůstávají, shodují s očekáváním.

5) Nelze-li pohlaví ryb zjistit podle jejich vnějšího vzhledu, vyjmou se ze zkušební komory všechny ryby. V takovém případě se pohlaví zjistí vyšetřením gonád nebo druhotných pohlavních znaků pod stereoskopickým mikroskopem.

▼**M6**

Vyříznutí jater

1) Zkušební ryba se pomocí malého čeřenu přenese z nádrže pro přepravu do anestetického roztoku.

2) Po anestetizaci se ryba přenese pinzetou na filtrační papír (nebo na papírový ubrousek). Ryba se uchopí pinzetou za hlavu z obou stran, aby nedošlo k porušení ocasu.

3) Voda na povrchu těla ryby se otře filtračním papírem (nebo papírovým ubrouskem).

4) Ryba se položí břichem nahoru. Poté se pomocí preparačních nůžek provede malý příčný řez v polovině vzdálenosti mezi ventrální hřbetní oblastí a střední břišní oblastí.

5) Do tohoto malého řezu se vloží preparační nůžky a rozstřihne se břicho podél střední linie břicha od bodu ležícího kaudálně od žaberního krytu až po kraniální stranu řitního otvoru. Je třeba dát pozor, aby preparační nůžky nepronikly příliš hluboko a aby nedošlo k poškození jater a gonád.

6) Následující kroky se provedou pod stereoskopickým mikroskopem.

7) Testovací ryba se položí břichem nahoru na papírový ubrousek (použít lze rovněž skleněnou Petriho misku nebo podložní sklíčko mikroskopu).

8) Stěny břišní dutiny se roztáhnou jemnou pinzetou a odkryjí se tak vnitřní orgány. V případě potřeby je rovněž přijatelné odkrýt vnitřní orgány tak, že se odstraní jedna strana stěny břišní dutiny.

9) Pomocí druhé jemné pinzety se odhalí přirostlá část jater a žlučový měchýř. Poté se uchopí žlučovod a odřízne se žlučový měchýř. Je třeba dbát na to, aby se žlučový měchýř neprotrhl.

10) Stejným způsobem se uchopí jícen a od jater se odřízne gastrointestinální trakt. Je třeba dát pozor, aby obsah trávicí soustavy nevytekl. Kaudální část gastrointestinálního traktu se odřízne od řitního otvoru a gastrointestinální trakt se vyjme z břišní dutiny.

11) Od periferie jater se ořízne tuková hmota a jiné tkáně. Je třeba dát pozor, aby se játra nepoškrábala.

12) Oblast jaterního portálu se uchopí jemnou pinzetou a játra se vyjmou z břišní dutiny.

13) Játra se umístí na podložní sklíčko. V případě potřeby se pomocí jemné pinzety z povrchu jater odstraní veškerý zbývající tuk a vnější tkáně (např. břišní výstelka).

14) Na elektronických analytických vahách se změří hmotnost jater s mikrozkumavkou o objemu 1,5 ml jako vahou obalu. Hodnota se zaznamená v pracovním listu (s přesností na 0,1 mg). Na etiketě mikrozkumavky se ověří identifikační údaje.

15) Mikrozkumavka s játry se zazátkuje. Skladuje se v chladicím (nebo mrazicím) stojánku.

16) Po odříznutí jedněch jater se preparační nástroje vyčistí nebo nahradí čistými.

▼**M6**

17) Výše popsaným způsobem se vyjmou játra u všech ryb v přepravní nádrži.

18) Po vyříznutí jater ze všech ryb v přepravní nádrži (tj. všech samečků nebo samiček ze zkušební komory) se všechny vzorky jater umístí do stojánku na zkumavky s etiketou kvůli identifikaci a uskladní se v mrazničce. Jsou-li játra krátce po vyříznutí dodána k předběžné úpravě, vzorky se na další pracoviště přenesou v chladicím (nebo mrazicím) stojánku.

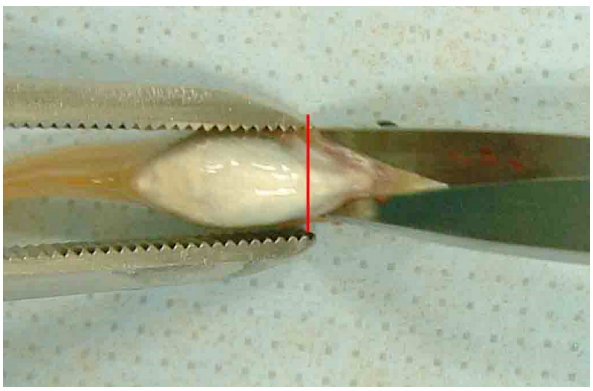
Po odnětí jater je mrtvé tělo ryby k dispozici pro měření druhotných pohlavních znaků.

Vzorek

Pokud se vzorky jater odebrané u testovacích ryb krátce po vyříznutí nepoužijí pro předběžnou úpravu, skladují se při teplotě ≤ – 70 °C.

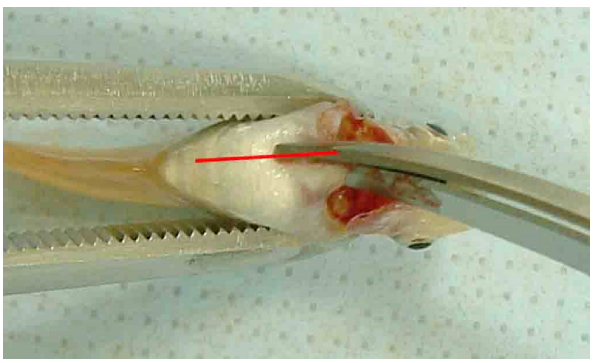
Obrázek 1.

Nůžkami se vede řez těsně před prsními ploutvemi.



Obrázek 2.

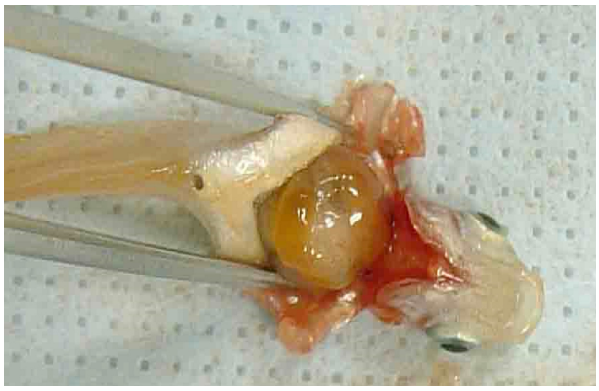
Pomocí nůžek se rozstřihne střední linie břicha až k bodu, který se nachází přibližně 2 mm kraniálně od řitního otvoru.



▼M6

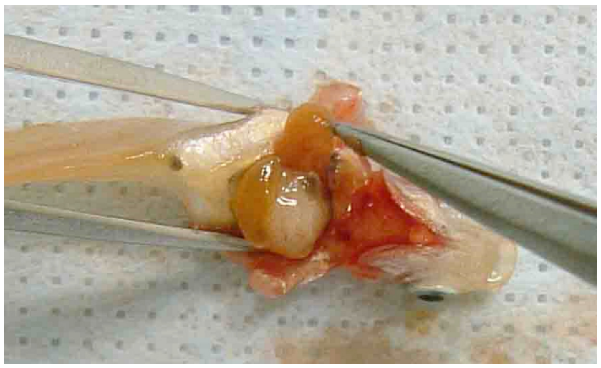
Obrázek 3.

Pinzetou se rozevřou břišní stěny, aby se odkryla játra a další vnitřní orgány. (Alternativně lze břišní stěny laterálně přišpendlit.) Šipka označuje játra.



Obrázek 4.

Játra se pomocí pinzety vypreparují a vyříznou.



Obrázek 5.

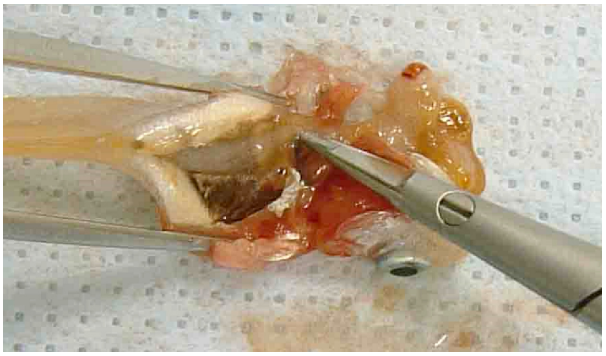
Pinzetou se jemně odtáhnou střeva.



▼M6

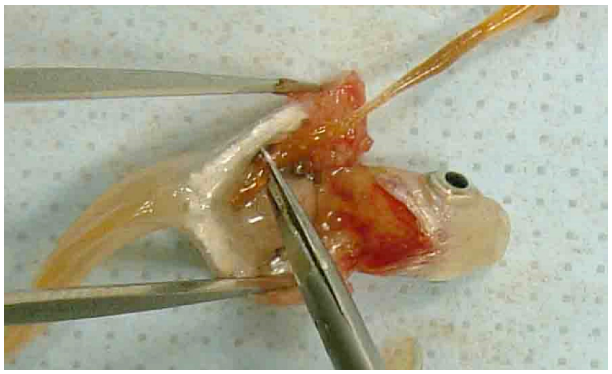
Obrázek 6.

Oba konce střev a veškeré střevní okruží se oddělí nůžkami.



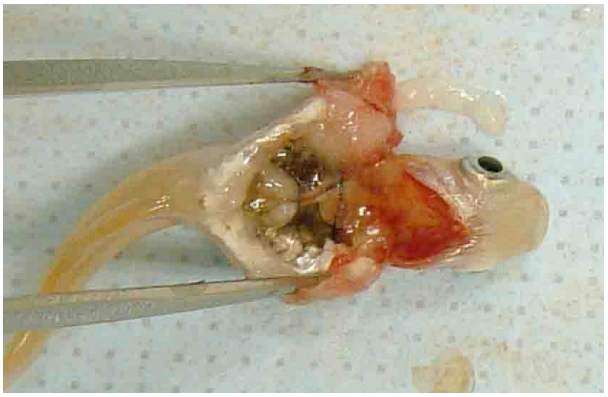
Obrázek 7 (samička).

U samiček je postup stejný.



Obrázek 8.

Dokončený postup.



Postup 2B: Halančík japonský (*Oryzias latipes*), předúprava jater pro analýzu vitelogeninu

Ze soupravy pro analýzu ELISA se vezme lahev s homogenizačním pufrem a ochladí se v ledové tříšti (teplota roztoku ≤ 4 °C). Je-li použit homogenizační pufr ze systému ELISA EnBio, roztok se rozmrazí při pokojové teplotě a poté se lahev ochladí v ledové tříšti.

▼**M6**

Objem pufru pro homogenizaci jater se vypočítá na základě jejich hmotnosti (pro přípravu homogenátu se přidá 50 µl homogenizačního pufru na mg hmotnosti jater). Například je-li hmotnost jater 4,5 mg, objem pufru pro homogenizaci jater je 225 µl. Připraví se seznam objemů homogenizačního pufru pro všechna játra.

Příprava jater pro předúpravu

1) Mikrozkumavka o objemu 1,5 ml obsahující játra se vyjme z mrazničky těsně před předúpravou.

2) Předúprava samčích jater by se měla provádět dříve než předúprava samičích jater, aby se předešlo kontaminaci vitelogeninem. U zkušebních skupin by se kromě toho předúprava měla provádět v tomto pořadí: kontrolní skupina, kontrola s rozpouštědlem (existuje-li), skupina s nejnižší koncentrací, skupina se střední koncentrací, skupina s nejvyšší koncentrací a pozitivní kontrola.

3) Počet mikrozkumavek o objemu 1,5 ml obsahujících vzorky jater, které se vyjmou z mrazničky v daný čas, by neměl být větší než počet zkumavek, které lze současně odstředit.

4) Mikrozkumavky o objemu 1,5 ml s jaterními vzorky se uspořádají na mrazicím stojánku podle pořadových čísel (játra není třeba rozmrazovat).

Provedení předúpravy

1. Přidání homogenizačního pufru

   1) Kontrolou seznamu se zjistí, jaký objem homogenizačního pufru má být přidán pro daný konkrétní vzorek jater, a mikropipeta (rozmezí objemů 100–1 000 µl) se nastaví na příslušný objem. Na mikropipetu se nasadí čistý hrot.

   2) Z lahve s činidlem se nabere homogenizační pufr a přidá se do zkumavky o objemu 1,5 ml obsahující játra.

   3) Podle výše uvedeného postupu se homogenizační pufr přidá do všech mikrozkumavek o objemu 1,5 ml obsahujících játra. Hrot mikropipety není třeba měnit za nový. Je-li hrot kontaminován nebo existuje-li podezření, že je kontaminován, musí se vyměnit.

2. Homogenizace jater

   1) Vezme se nový homogenizační tlouček pro homogenizátor pro mikrozkumavky.

   2) Tlouček se vloží do mikrozkumavky o objemu 1,5 ml. Homogenizátor se uchopí tak, aby tlačil na játra mezi povrchem tloučku a vnitřní stěnou mikrozkumavky o objemu 1,5 ml.

   3) Homogenizátor pro mikrozkumavky se ponechá v činnosti 10–20 sekund. Mikrozkumavka o objemu 1,5 ml se během této činnosti chladí ledovou tříští.

   4) Tlouček se vyjme z mikrozkumavky o objemu 1,5 ml a ponechá se asi na 10 sekund v nečinnosti. Poté se provede vizuální kontrola stavu suspenze.

   5) Jsou-li v suspenzi patrné kousky jater, kroky 3) a 4) se opakují, aby se připravil uspokojivý homogenát jater.

▼**M6**

6) Suspendovaný homogenát jater se chladí v chladicím stojánku až do odstřeďování.

7) Pro každý homogenát se tlouček vymění za nový.

8) Podle výše popsaného postupu se všechna játra homogenizují za pomoci homogenizačního pufru.

3. Odstředění suspendovaného homogenátu jater

1) Ověří se, že teplota v komoře chlazené odstředivky není vyšší než 5 °C.

2) Mikrozkumavky o objemu 1,5 ml obsahující suspendovaný homogenát jater se vloží do chlazené odstředivky (v případě potřeby se provede vyvážení).

3) Suspendovaný homogenát jater se 10 minut odstřeďuje při zrychlení 13 000 g a při teplotě ≤ 5 °C. Je-li však supernatant dostatečně oddělený, lze sílu a dobu odstředění upravit podle potřeby.

4) Po odstředění se zkontroluje, zda je supernatant náležitě oddělený (na povrchu: tuk, uprostřed: supernatant, spodní vrstva: jaterní tkáň). Není-li odstředění dostatečné, suspenze se odstředí znovu za stejných podmínek.

5) Všechny vzorky se vyjmou z chlazené odstředivky a uspořádají se na mrazicím stojánku podle pořadových čísel vzorků. Je třeba dát pozor, aby oddělené vrstvy po odstředění opět nesuspendovaly.

4. Odběr supernatantu

1) Do stojánku na zkumavky se vloží čtyři mikrozkumavky o objemu 0,5 ml pro uchovávání supernatantu.

2) Pomocí mikropipety se z každého supernatantu (odděleného jako prostřední vrstva) odebere 30 µl a vloží se do jedné mikrozkumavky o objemu 0,5 ml. Je třeba dát pozor, aby nebyl odebrán tuk z povrchu nebo jaterní tkáň ze spodní vrstvy.

3) Stejným způsobem se supernatant odebere a vloží do dalších dvou mikrozkumavek o objemu 0,5 ml.

4) Pomocí mikropipety se odebere zbytek supernatantu (nejméně 100 µl, je-li to proveditelné). Tento supernatant se poté vloží do zbývající mikrozkumavky o objemu 0,5 ml. Je třeba dát pozor, aby nebyl odebrán tuk z povrchu nebo jaterní tkáň ze spodní vrstvy.

5) Mikrozkumavka o objemu 0,5 ml se uzavře zátkou a objem supernatantu se zapíše na etiketu. Poté se mikrozkumavky ihned ochladí v mrazicím stojánku.

6) Pro každý supernatant se použije nový hrot mikropipety. Ulpí-li na hrotu větší množství tuku, je třeba ho ihned nahradit novým hrotem, aby nedošlo ke kontaminaci jaterního extraktu tukem.

7) Podle postupu popsaného výše se všechen odstředěný supernatant vloží do čtyř mikrozkumavek o objemu 0,5 ml.

▼M6

8) Po vložení supernatantu do mikrozkumavek o objemu 0,5 ml se všechny mikrozkumavky s identifikačními etiketami uloží do stojánku na zkumavky a ihned poté se zmrazí v mrazničce. Měří-li se koncentrace VTG okamžitě po předúpravě, zkumavka o objemu 0,5 ml (obsahující 30 µl supernatantu) se uchová v chladu ve stojánku na zkumavky a přenese se na pracoviště, kde se provádí analýza ELISA. V takovém případě se ostatní mikrozkumavky vloží do stojánků na zkumavky a zmrazí se v mrazničce.

9) Po odběru supernatantu se reziduum vhodným způsobem odstraní.

Skladování vzorku

Mikrozkumavky o objemu 0,5 ml obsahující supernatant homogenátu jater se skladují při teplotě ≤ – 70 °C do doby, než jsou použity pro analýzu ELISA.

Postup 3A: Danio pruhované, odběr krve z ocasní žíly/tepny

Ihned po anestetizaci se příčně oddělí ocasní stopka a z ocasní tepny/žíly se odebere krev pomocí heparinizované mikrohematokritové kapiláry. Objemy krve se nacházejí v rozmezí od 5 do 15 µl v závislosti od velikosti ryby. Do mikrokapiláry se přidá stejný objem pufru s aprotininem (6 µg aprotininu na ml fosfátového pufru (PBS)) a plazma se od krve oddělí odstředěním (po dobu 5 minut při zrychlení 600 g). Plazma se shromáždí do zkušebních zkumavek a uskladní se při teplotě – 20 °C do doby, než se analyzuje na vitelogenin nebo na jiné proteiny, jež jsou předmětem zájmu.

Postup 3B: Danio pruhované, odběr krve srdeční punkcí

Aby nedošlo ke koagulaci krve a rozložení proteinu, vzorky se odebírají ve fosfátovém pufru (PBS) obsahujícím heparin (1 000 jednotek/ml) a inhibitor proteázy aprotinin (2 TIU/ml). Jako složky pro přípravu tohoto pufru se doporučuje použít heparin, amonnou sůl a lyofilizovaný aprotinin. Odběr krve se doporučuje provést injekční stříkačkou (o objemu 1 ml) s fixovanou tenkou jehlou (např. značky Braun Omnikan-F). Injekční stříkačka se předem naplní pufrem (přibližně 100 µl) tak, aby malé objemy krve z každé ryby byly plně eluovány. Vzorky krve se odeberou srdeční punkcí. Ryba se nejprve anestetizuje roztokem MS-222 (v koncentraci 100 mg/l). Správný režim anestezie umožní uživateli rozeznat srdeční tep dania pruhovaného. Při provádění srdeční punkce se píst injekční stříkačky udržuje pod slabým tlakem. Množství krve, která lze odebrat, se nacházejí v rozmezí 20–40 mikrolitrů. Po srdeční punkci se směs krve/pufru vloží do zkušební zkumavky. Plazma se oddělí od krve odstředěním (po dobu 20 minut při 5 000 g) a uskladní se při teplotě – 80 °C do doby, než bude použita pro analýzu.

Postup 3C: Standardní operační postup: danio pruhované, homogenizace hlavy a ocasu

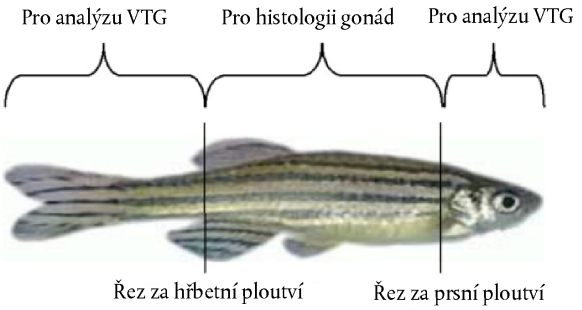
1) Ryba se anestetizuje a usmrtí v souladu s popisem zkoušky.

2) Odřízne se hlava a ocas, jak znázorňuje obrázek 1.

Pozor: veškeré preparační nástroje a pracovní stůl je třeba mezi zpracováním každé jednotlivé ryby řádně omýt a vyčistit (např. 96 % ethanolem), aby se zabránilo „znečištění vitelogeninem“ v důsledku přenosu ze samiček nebo ze samečků, u kterých byly vyvolány účinky, na samečky, u kterých účinky vyvolány nebyly.

▼**M6**

Obrázek 1



1) Stanoví se společná hmotnost hlavy a ocasu každé ryby se zaokrouhlením na mg.

2) Po zvážení se části vloží do vhodných zkumavek (např. Eppendorfovy zkumavky o objemu 1,5 ml) a zmrazí se při teplotě – 80 °C až do homogenizace nebo se přímo homogenizují na ledu pomocí dvou plastových paliček. (Lze užít i jiných metod, jsou-li prováděny na ledu a je-li výsledkem homogenní hmota.) Důležité: Zkumavky je třeba řádně očíslovat, aby bylo možné hlavu a ocas z určité ryby porovnat s příslušným řezem těla, který se použije pro histologii gonád.

3) Když je dosaženo homogenní hmoty, přidá se homogenizační pufr (*) chlazený na ledu v množství čtyřnásobně větším než hmotnost tkáně. Pokračuje se v práci s paličkami, dokud směs není homogenní. Důležitá poznámka: na každou rybu se použijí nové paličky.

4) Vzorky se uloží na led až do odstřeďování při teplotě 4 °C po dobu 30 minut při zrychlení 50 000 g.

5) Pomocí pipety se části supernatantu o objemu 20 µl přenesou do nejméně dvou zkumavek tak, že se špička pipety ponoří pod tukovou vrstvu na hladině a opatrně se nasaje supernatant bez frakcí tuku nebo sedimentu.

6) Zkumavky se uskladní při teplotě – 80 °C až do použití.

(*) **Homogenizační pufr:**

— (50 mM Tris-HCl pH 7,4; 1 % koktejl inhibitoru proteázy (Sigma)): 12 ml Tris-HCl pH 7,4 + 120 µl koktejlu inhibitoru proteázy.

— TRIS: TRIS-ULTRA PURE (ICN), např. od výrobce Bie & Berntsen, Dánsko.

— Koktejl inhibitoru proteázy: od výrobce Sigma (pro tkáně savců), produktové číslo P 8340.

— *Poznámka:* Homogenizační pufr by měl být použit ve stejný den, kdy byl vyroben. Během použití se má uchovávat na ledu.

▼**M6**

Dodatek 7

Vzorky obohacené vitelogeninem a referenční standard pro opakovatelnost

Každý den provádění zkoušek na vitelogenin se analyzuje obohacený vzorek vytvořený pomocí referenčního standardu pro opakovatelnost. Pro přípravu referenčního standardu pro opakovatelnost se použije vitelogenin z jiné šarže, než jaká byla použita pro přípravu kalibračních standardů pro zkoušku, která se nyní provádí.

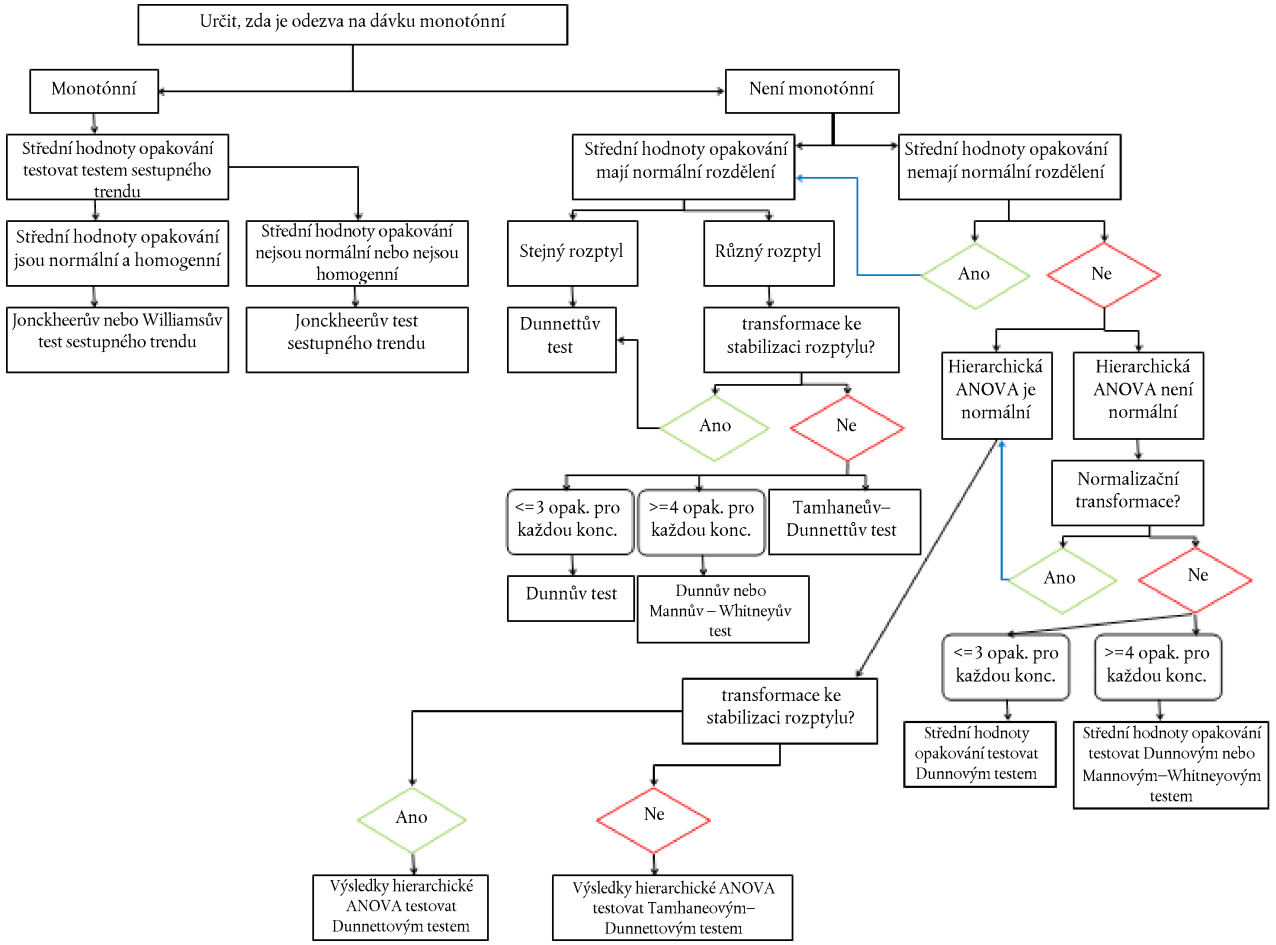
Obohacený vzorek se připraví tak, že se známé množství standardu přidá do vzorku plazmy samečků z kontrolní skupiny. Vzorek se obohatí tak, aby se dosáhlo koncentrace vitelogeninu 10krát až 100krát vyšší než očekávaná koncentrace vitelogeninu u samečků ryb z kontrolní skupiny. Vzorek plazmy samečků z kontrolní skupiny, který se obohacuje, může pocházet z jedné ryby nebo to může být směsný vzorek z několika ryb.

Dílčí vzorek neobohacené plazmy samečků z kontrolní skupiny se bude analyzovat alespoň ve dvou duplikátních jamkách. Rovněž obohacený vzorek se bude analyzovat alespoň ve dvou duplikátních jamkách. Za účelem stanovení očekávané koncentrace se střední hodnota množství vitelogeninu z obou neobohacených vzorků plazmy samečků z kontrolní skupiny přičte k vypočtenému množství vitelogeninu přidaného za účelem obohacení vzorků. Poměr mezi touto očekávanou koncentrací a naměřenou koncentrací se zaznamená spolu s výsledky všech souborů zkoušek provedených v týž den.

▼M6

Dodatek 8

Schéma rozhodování pro statistickou analýzu



▼**M6**

C.38. ZKOUŠKA METAMORFÓZY OBOJŽIVELNÍKŮ

ÚVOD

1. Tato zkušební metoda je rovnocenná Pokynu OECD pro zkoušení č. 231 (2009). Potřeba vyvinout a ověřit zkoušku schopnou zjistit chemické látky působící v systému štítné žlázy druhů obratlovců vyplývá z obavy, že úrovně chemických látek v životním prostředí mohou mít nepříznivé účinky na lidi i volně žijící živočichy. V roce 1998 zahájila OECD činnost s vysokou prioritou, a sice revizi stávajících pokynů pro zkoušení a vývoj nových pokynů pro zkoušení určených ke screeningu a zkouškám potenciálních endokrinních disruptorů. Součástí této činnosti bylo vyvinout Pokyn pro zkoušení určený pro screening chemických látek působících na systém štítné žlázy druhů obratlovců. Bylo navrženo rozšíření Studie orální toxicity u hlodavců s opakovaným podáváním dávky v 28denním cyklu (kapitola B.7 této přílohy) a Zkouška metamorfózy obojživelníků (AMA). Rozšířená zkušební metoda B.7 prošla validací a revidovaná zkušební metoda byla vydána. Zkouška metamorfózy obojživelníků (AMA) prošla rozsáhlým validačním programem, který zahrnoval vnitrolaboratotní i mezilaboratorní studie prokazující vhodnost a spolehlivost této zkoušky (1)(2). Následně byla validace zkoušky podrobena hloubkovému hodnocení, které provedla komise složená z nezávislých odborníků (3). Tato zkušební metoda je výsledkem zkušeností získaných v průběhu validačních studií se zjišťováním chemických látek ovlivňujících činnost štítné žlázy a práce provedené jinde v členských zemích OECD.

PODSTATA ZKOUŠKY

2. Zkouška metamorfózy obojživelníků (AMA) je screeningová zkouška sloužící k empirickému zjištění chemických látek, které mohou narušovat normální funkci osy hypotalamus-hypofýza-štítná žláza (HPT). Zkouška metamorfózy obojživelníků představuje zobecněný model obratlovců do té míry, do jaké je založena na zachovaných strukturách a funkcích osy hypotalamus-hypofýza-štítná žláza (HPT). Je to důležitá zkouška, protože metamorfóza obojživelníků je dobře popsaný proces závislý na funkci štítné žlázy, který reaguje na chemické látky působící v ose hypotalamus-hypofýza-štítná žláza, a je to jediná stávající zkouška, která zjišťuje činnost štítné žlázy u živočichů procházejících morfologickým vývojem.

3. Celkové experimentální uspořádání zahrnuje expozici pulců *Xenopus laevis* ve stadiu 51 nejméně třem různým koncentracím zkoušené chemické látky a kontrolní experiment s ředicí vodou po dobu 21 dnů. Každá zkušební expozice má čtyři opakování. Hustota larev na začátku zkoušky je 20 pulců v každé zkušební nádrži pro každou exponovanou skupinu. Sledovanými ukazateli jsou délka zadní končetiny, délka těla od tlamy po kloaku (SVL), stadium vývoje, hmotnost ve vlhkém stavu, histologie štítné žlázy a každodenní pozorování mortality.

POPIS METODY

Zkušební druh

4. *Xenopus laevis* se běžně kultivuje v laboratořích celého světa a lze jej jednoduše získat prostřednictvím komerčních dodavatelů. Reprodukci u tohoto druhu lze snadno vyvolat po celý rok dodáním lidského chorionového gonadotropinu (hCG) a výsledné larvy lze běžně odchovat do zvolených stadií vývoje ve velkých počtech, což umožňuje používat protokoly o zkoušce specifické pro každé stadium. Upřednostňuje se,

▼M6

aby larvy použité ve zkoušce pocházely od domácích dospělých jedinců. Jako alternativu, i když se tento postup neupřednostňuje, lze do laboratoře provádějící zkoušku dodat vajíčka nebo embrya a nechat je aklimatizovat; dodávka vývojových stadií larvy pro použití ve zkoušce je nepřijatelná.

Vybavení a potřeby

5. Pro provedení této zkoušky je potřebné toto vybavení a tyto potřeby:

a) systém expozice (viz popis níže);

b) akvária skleněná nebo z nerezové oceli (viz popis níže);

c) chovné nádrže;

d) zařízení řídící teplotu (např. ohřívače nebo chladiče (nastavitelné na 22° ± 1 °C));

e) teploměr;

f) binokulární preparační mikroskop;

g) digitální fotoaparát s rozlišením minimálně 4 megapixelů a s mikro funkcí;

h) počítačový software pro digitalizaci snímků;

i) Petriho miska (např. 100 × 15 mm) nebo průhledná plastová komora srovnatelné velikosti;

j) analytické váhy s přesností měření na tři desetinná místa (v mg);

k) oximetr;

l) pH-metr;

m) luxmetr (měřič intenzity osvětlení) s přesností měření na jednotky luxů;

n) různé laboratorní sklo a nástroje;

o) nastavitelné pipety (10 až 5 000 µl) nebo sada pipet odpovídajících velikostí;

p) zkoušená chemická látka v množství dostatečném pro provedení zkoušky, pokud možno z jedné šarže;

q) analytické pomůcky vhodné pro zkoušenou chemickou látku nebo smluvně zajištěné analytické služby.

Chemická testovatelnost

6. Zkouška metamorfózy obojživelníků je založena na protokolu expozice ve vodním prostředí, přičemž zkoušená chemická látka se do zkušebních komor zavádí průtokovým systémem. Průtokové metody však představují omezení, pokud jde o typy chemických látek, které lze zkoušet, vyplývající z fyzikálně-chemických vlastností dané chemické látky. Před použitím

▼M6

tohoto protokolu by proto měly být získány základní informace o chemické látce, které jsou důležité pro určení testovatelnosti, a mělo by se nahlédnout do Metodického dokumentu OECD ke zkouškám toxicity složitých látek a směsí pro vodní organismy (4). To, že daná chemická látka může být obtížně testovatelná ve vodním prostředí, naznačují mimo jiné tyto vlastnosti: vysoký rozdělovací koeficient oktanol/voda (log K_{ow}), vysoká těkavost, citlivost k hydrolýze a citlivost k fotolýze v podmínkách okolního laboratorního osvětlení. Pro stanovení toho, zda je látka testovatelná, mají význam i další faktory, které by měly být určeny v každém jednotlivém případě. Jestliže danou chemickou látku není možné úspěšně zkoušet v průtokovém zkušebním systému, lze použít statický systém s obnovováním média. Pokud zkoušené chemické látce nevyhovuje žádný z obou uvedených systémů, obvyklým postupem je, nezkoušet ji podle tohoto protokolu.

Systém expozice

7. Upřednostňuje se pokud možno průtokový ředicí systém před statickým systémem s obnovováním média. Pokud fyzikální a/nebo chemické vlastnosti jakékoli zkoušené chemické látky nejsou vhodné pro použití průtokového ředicího systému, může být použit alternativní systém expozice (např. statický systém s obnovováním média). Složky systému, které přicházejí do styku s vodou, by měly být vyrobeny ze skla, nerezové oceli a/nebo polytetrafluorethylenu (PTFE). Mohou však být využity i vhodné plasty, pokud nezpochybní studii. Jako expoziční nádrže by měla sloužit akvária ze skla nebo nerezové oceli vybavená trubicovými stavoznaky, které pomáhají udržovat přibližný objem nádržky mezi 4,0 a 10,0 l a minimální hloubku vody 10 až 15 cm. Systém by měl být schopen podporovat všechny zkušební koncentrace a kontrolní měření, se čtyřmi opakováními při každé expozici. Průtoková rychlost by měla být u všech nádob stejná a neměnná, jednak kvůli zachování biologických podmínek, jednak kvůli expozici chemické látce (např. 25 ml/min). Expoziční nádrže by k určité pozici v systému expozice měly být přiřazeny náhodně, aby se snížily potenciální poziční vlivy, včetně mírných rozdílů v teplotě, intenzitě osvětlení apod. Mělo by být použito fluoroscenční osvětlení zajišťující fotoperiodu 12 hodin světla: 12 hodin tmy při intenzitě osvětlení mezi 600 a 2 000 luxy (lumen/m^2) na povrchu vody. Teplotu vody je třeba udržovat na 22° ± 1 °C, hodnotu pH mezi 6,5 a 8,5 a koncentraci rozpuštěného kyslíku (DO) > 3,5 mg/l (> 40 % nasycení vzduchem) v každé zkušební nádrži. Teplota vody, hodnota pH a rozpuštěný kyslík by měly být měřeny minimálně jednou za týden; alespoň v jedné zkušební nádobě by se teplota měla pokud možno měřit průběžně. Podmínky, za kterých by tento protokol měl být prováděn, jsou nastíněny v dodatku 1. Pro další informace o nastavení průtokových systémů expozice a/nebo statických systémů s obnovováním média se odkazuje na publikaci *Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests on Test Materials with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians* (5), vydanou Americkou společností pro zkoušení a materiály (ASTM), a obecné toxikologické zkoušky ve vodním prostředí.

Kvalita vody

8. Použít lze jakoukoli vodu, která je místně dostupná (např. pramenitou vodu nebo vodu z kohoutku filtrovanou přes aktivní uhlí) a umožňuje normální růst a vývoj pulců *X. laevis*. Jelikož kvalita místní vody se může v různých oblastech podstatně lišit, je třeba provést analýzu kvality vody, zejména pokud nejsou dostupné historické údaje o používání této vody pro chov druhu *Xenopus*. Zvláštní pozornost je třeba věnovat tomu, aby voda neobsahovala měď, chlor a chloraminy, které všechny jsou pro žáby a pulce toxické. Dále se doporučuje analyzovat vodu na koncentraci fluoridů, chloristanů a chlorečnanů (vedlejší produkty dezinfekce pitné vody) v pozadí, neboť všechny tyto anionty jsou substráty transportního

▼M6

systému jódu ze štítné žlázy a zvýšená úroveň každého z těchto aniontů může zkreslit výsledek studie. Analýzu je třeba provést před zahájením zkoušení a zkušební voda by obvykle neměla tyto anionty obsahovat.

Koncentrace jódu ve zkušební vodě

9. K tomu, aby mohla štítná žláza syntetizovat thyroidální hormony, musí mít larvy k dispozici dostatek jodidu podávaného současně vodou i potravou. V současnosti neexistují žádné empiricky podložené pokyny ohledně minimální koncentrace jodidu. Dostupnost jodidu však může ovlivnit schopnost tyreoidálního systému reagovat na činitele ovlivňující činnost štítné žlázy, a jak známo, moduluje bazální aktivitu štítné žlázy, což je aspekt, který zasluhuje pozornost při interpretaci výsledků provedené histopatologie štítné žlázy. Proto je třeba zaznamenávat koncentrace jodidu ve zkušební vodě. Na základě dostupných údajů validačních studií bylo prokázáno, že se tento protokol dobře osvědčil při koncentraci jodidu (I), která se ve zkušební vodě pohybovala mezi 0,5 a 10 μg/l. Optimální hodnota minimální koncentrace jodidu ve zkušební vodě by měla činit 0,5 μg/l. Pokud je zkušební voda rekonstituována z deionizované vody, měl by se přidat jód v minimální koncentraci 0,5 μg/l. Jakékoli další doplnění jódu nebo jeho solí do zkušební vody je třeba uvést ve zprávě.

Chov zvířat

Péče o dospělé jedince a množení

10. Péče o dospělé jedince a množení se provádí v souladu se standardními pokyny a čtenář se odkazuje na standardní příručku pro provádění zkoušky teratogeneze embryí žab (FETAX) (6), kde získá podrobnější informace. Tyto standardní pokyny poskytují příklad vhodných metod péče a množení, avšak jejich striktní dodržování se nevyžaduje. Množení se provádí tak, že se párům (3–5) dospělých samiček a samečků vstřikuje lidský choriogonadotropin (hCG). Samičkám ve vzorku se vstříkne přibližně 800–1 000 IU a samečkům 600–800 IU hCG rozpuštěných v 0,6–0,9 % solném roztoku. Chovné páry jsou drženy ve velkých nádržích, v klidu a ve statických podmínkách, aby se podpořil amplexus. Na dně každé množicí nádrže by mělo být nepravé dno z nerezové oceli nebo plastového pletiva, které umožní propadnutí shluků vajíček na dno nádrže. Žáby, kterým se vstříkne hCG pozdě odpoledne, obvykle nakladou většinu vajíček do druhého dne dopoledne. Po uvolnění a oplodnění dostatečného množství vajíček by dospělí jedinci měli být z množicích nádrží odstraněni.

Péče o larvy a jejich výběr

11. Po odstranění dospělých jedinců z množicích nádrží se odeberou vajíčka a zhodnotí se jejich životaschopnost na reprezentativním podsouboru embryí ze všech chovných nádrží. Nejlepší jednotlivé snůšky (pro vyhodnocení kvality tření se doporučují 2 až 3 snůšky) by měly být ponechány na základě životaschopnosti embryí a přítomnosti dostatečného počtu (minimálně 1 500) embryí. Všechny organismy použité ve studii by měly pocházet z jednoho tření (tj. snůšky by se neměly mísit navzájem). Embrya se přenesou na velkou plochou pánev nebo mísu a všechna očividně mrtvá nebo nenormální vajíčka (viz definice v (5)) se pipetou nebo kapátkem odstraní. Zdravá embrya z každé ze tří snůšek se přenesou do tří oddělených líhní. Po čtyřech dnech od umístění do líhní se vybere nejlepší snůška na základě životaschopnosti a úspěšného vylíhnutí a larvy se přemístí do vhodného počtu chovných nádrží s teplotou vody 22° ± 1 °C. Kromě toho se některé další larvy přemístí do samostatných nádrží jako rezerva pro případ, že během prvního týdne dojde v chovných nádržích k úhynu. Tento postup zachovává jednotnou hustotu organismů, a snižuje tak vývojové rozdíly v rámci kohorty jedné snůšky. Všechny

▼M6

chovné nádrže je třeba denně čistit odsátím. V rámci prevence se upřednostňují vinylové nebo nitrilové rukavice před latexovými. Uhynulé jedince je třeba během prvního týdne každodenně odstraňovat a nahrazovat larvami z rezervy, aby byla zachována hustota organismů. Krmit je třeba minimálně dvakrát za den.

12. V adaptační fázi se pulci aklimatizují na podmínky skutečné expoziční fáze, včetně typu potravy, teploty, cyklu světlo – tma a kultivačního média. Proto se doporučuje, aby během adaptační fáze a expoziční fáze byla použita stejná kultivační/ředicí voda. Pokud je pro uchovávání pulců během adaptační fáze používán statický kultivační systém, je třeba kultivační médium zcela vyměnit nejméně dvakrát týdně. V adaptační fázi je nutné předejít nakupením vyvolaným vysokou hustotou larev, protože takové vlivy by mohly znatelně ovlivnit vývoj pulců v následné experimentální fázi. Hustota chovu by neměla být větší než přibližně čtyři pulci na litr kultivačního média (ve statickém systému expozice) nebo 10 pulců na litr kultivačního média (např. s průtokem 50 ml/min v adaptačním nebo kultivačním systému). Za těchto podmínek by se pulci ze stadia 45/46 do stadia 51 měli vyvinout do dvanácti dnů. Reprezentativní pulce z této kmenové populace je třeba denně kontrolovat z hlediska jejich vývojové fáze, aby bylo možno odhadnout vhodný čas pro zahájení expozice. Je nutné dbát na minimalizaci stresu a traumat u pulců, zejména během přemisťování, čištění akvárií a manipulace s larvami. Je třeba se vyvarovat stresových podmínek/činností, jakými jsou hlasitý a/nebo nepřetržitý hluk, klepání na akvária, vibrace v akváriích, nadměrná aktivita v laboratoři a rychlé změny ve složkách životního prostředí (dostupnost světla, teplota, pH, rozpuštěný kyslík, rychlosti průtoku vody apod.). Pokud se pulci nevyvinou do stadia 51 během 17 dní po oplodnění, za potenciální důvod této skutečnosti je třeba považovat nadměrný stres.

Kultivace larev a jejich krmení

13. Pulci se v době před expozicí (po stadiu 45/46 podle Nieuwkoopa a Fabera (NF) (8)) a během celé 21denní zkoušky krmí např. komerčně dostupným krmivem pro pulce používaným ve validačních studiích (viz též dodatek 1) nebo jinou stravou, u níž bylo prokázáno, že umožňuje stejnou účinnost zkoušky metamorfózy obojživelníků. Krmný režim v období před expozicí je třeba pečlivě upravit tak, aby splňoval požadavky vyvíjejících se pulců. To znamená, že nově vylíhnutým pulcům by měly být podávány malé porce potravy několikrát (minimálně dvakrát) za den. Je třeba zamezit přebytku potravy, aby *i)* byla zachována kvalita vody a *ii)* se zabránilo zanesení žaberních filtrů částicemi potravy a zbytky. Pokud jde o krmivo pro pulce používané ve validačních studiích, spolu s růstem pulců je nutno zvyšovat denní porce potravy až na přibližně 30 mg na jedince a den krátce před začátkem zkoušky. Jak ukázaly validační studie, toto krmivo dostupné na trhu podporuje řádný růst a vývoj pulců *X. laevis*; jedná se o jemné částice, které zůstávají suspendované ve vodním sloupci po dlouhé časové období a lze je spláchnout proudem vody. Celkové denní množství potravy je proto třeba rozdělit do menších porcí a podávat minimálně dvakrát denně. Krmný režim pro toto krmivo je nastíněn v tabulce

▼M6

1. Krmné dávky je třeba zaznamenávat. Může být podáváno v suchém stavu nebo jako zásobní roztok připravený v ředicí vodě. Tento zásobní roztok je nutno připravovat obden čerstvý, a není-li použit, musí se uchovávat při teplotě 4 °C.

Tabulka 1.

Krmný režim s komerčně dostupným krmivem pro pulce, které bylo použito ve validačních studiích pro pulce *X. laevis* v životní části zkoušky metamorfózyobojživelníků v průtokových podmínkách.

Den studie	Přísun potravy (mg potravy na jedince a den)
0–4	30
5–7	40
8–10	50
11–14	70
15–21	80

Analytická chemie

14. Před provedením studie je třeba vyhodnotit stabilitu zkoušené chemické látky na základě existujících informací o její rozpustnosti, rozložitelnosti a těkavosti. Na začátku zkoušky (den 0) a poté jednou týdně po dobu zkoušky je třeba z každé nádrže (opakování) při každé koncentraci odebrat vzorky zkušebních roztoků pro analytickou chemickou analýzu, tedy minimálně čtyři vzorky. Analýzu každé zkušební koncentrace se doporučuje provést rovněž během přípravy systému, před zahájením zkoušky, aby se ověřila účinnost systému. Dále se doporučuje analyzovat zásobní roztoky při jejich výměně, zejména pokud objem zásobního roztoku neposkytuje dostatečné množství chemické látky, aby pokrylo období běžných odběrů vzorků. V případě chemických látek, které při některých nebo všech koncentracích používaných při zkoušce není možné zjistit, je třeba měřit zásobní roztoky a zaznamenávat průtoky v rámci systému, aby bylo možno vypočítat nominální koncentrace.

Dávkování chemické látky

15. Zkoušenou chemickou látku je možné zavést do systému různým způsobem, v závislosti na jejích fyzikálně-chemických vlastnostech. Chemické látky rozpustné ve vodě mohou být rozpuštěny v přiměřeném množství zkušební vody v koncentraci, která umožňuje dávkování v cílové zkušební koncentraci v průtokovém systému. Chemické látky, které jsou kapalné při pokojové teplotě a těžko rozpustné ve vodě, mohou být zavedeny pomocí metod sycení kapaliny kapalinou. Chemické látky, které jsou pevné při pokojové teplotě a jsou těžko rozpustné ve vodě, mohou být zavedeny pomocí syticích kolon ze skelné vaty (7). Upřednostňuje se použití zkušebního systému bez nosičů, avšak různé zkoušené chemické látky budou mít rozličné fyzikálně-chemické vlastnosti, které mohou vyžadovat různé přístupy při přípravě vody pro expozici chemické látce. Upřednostňuje se obejít se bez rozpouštědel nebo nosičů, protože: *i)* určitá rozpouštědla sama o sobě mohou způsobit toxicitu a/nebo vyvolat nežádoucí či neočekávané endokrinologické reakce, *ii)* zkoušené chemické látky v množstvích přesahujících jejich rozpustnost ve vodě (což může často nastat při použití

▼M6

rozpouštědel) mohou vést k nepřesnému určení účinných koncentrací a *iii)* použití rozpouštědel při déle trvajících zkouškách může vést k významnému rozvoji „biofilmů“ spojených s činností mikrobů. V případě chemických látek, jejichž zkoušení je obtížné, lze použít rozpouštědlo jako poslední řešení, a určení, jaká metoda je nejvhodnější, by mělo vycházet z Metodického dokumentu OECD ke zkouškám toxicity složitých látek a směsí pro vodní organismy (4). Volba rozpouštědla se bude řídit chemickými vlastnostmi dané chemické látky. Bylo zjištěno, že v případech zkoušení toxicity ve vodním prostředí účinně působí rozpouštědla jako aceton, ethanol, methanol, dimethylformamid a triethylenglykol. V případě, že je použito nosné rozpouštědlo, musí být koncentrace rozpouštědla nižší než stálá koncentrace bez pozorovaných účinků (NOEC); pokyny OECD doporučují maximálně 100 µl/l; nedávný přezkum doporučuje používat koncentrace rozpouštědla pouze 20 µl/l ředicí vody (12). Jsou-li použita jako nosiče rozpouštědla, je nutné vyhodnotit kontrolní měření nejen při použití vhodného rozpouštědla, ale i v pro případ, kdy se rozpouštědlo nepoužije (čistá voda). Pokud není možné dodat chemickou látku s vodou, buď kvůli fyzikálně-chemickým vlastnostem (nízká rozpustnost), nebo z důvodu omezené dostupnosti chemické látky, je možné zvážit její podání prostřednictvím potravy. Byla provedena předběžná práce týkající se expozic ve stravě, avšak expozice touto cestou se běžně nepoužívá. Volbu metody je nutné zdokumentovat a analyticky ověřit.

Výběr zkušebních koncentrací

Stanovení nejvyšší zkušební koncentrace

16. Pro účely této zkoušky by měla být nejvyšší zkušební koncentrace rovna mezi rozpustnosti zkoušené chemické látky; v případě akutně toxické chemické látky maximální tolerované koncentraci (MTC); nebo 100 mg/l podle toho, která z těchto hodnot je nejnižší.

17. Maximální tolerovaná koncentrace je definována jako nejvyšší zkušební koncentrace chemické látky, která vede k nižší akutní mortalitě než 10 %. Použití tohoto přístupu předpokládá, že existují empirické údaje o akutní mortalitě, z nichž je možné maximální tolerovanou koncentraci odhadnout. Odhad maximální tolerované koncentrace může být nepřesný a obvykle se požaduje nějaký odborný posudek. I když technicky nejspolehlivější metodou pro odhad maximální tolerované koncentrace je použití regresních modelů, užitečnou aproximaci maximální tolerované koncentrace lze odvodit z existujících údajů o akutní toxicitě pomocí 1/3 akutní hodnoty LC_{50}. Údaje o akutní toxicitě pro testovaný druh však mohou chybět. Pokud údaje o akutní toxicitě pro konkrétní druh nejsou k dispozici, lze provést 96hodinovou zkoušku LC_{50} s pulci, kteří jsou reprezentativním (tj. ve stejném stadiu) vzorkem pulců ze zkoušky metamorfózy obojživelníků. Volitelně, jsou-li dostupné údaje týkající se jiných druhů vodních živočichů (např. studie LC_{50} na rybách nebo na jiných druzích obojživelníků), je možné pravděpodobnou maximální tolerovanou koncentraci odhadnout mezidruhovou extrapolací na základě odborného posudku.

18. Alternativně, pokud chemická látka není akutně toxická a je rozpustná v koncentraci vyšší než 100 mg/l, měla by být za nejvyšší zkoušenou koncentraci (HTC) považována hodnota 100 mg/l, neboť tato koncentrace se obvykle považuje za „prakticky netoxickou“.

▼M6

19. Ačkoli statické metody s obnovováním média nejsou doporučeným postupem, mohou být použity, pokud průtokové metody nepostačují k dosažení maximální tolerované koncentrace. Použijí-li se statické metody s obnovováním média, je třeba zdokumentovat stabilitu koncentrace zkoušené chemické látky, která by měla zůstat v mezích kritérií provedení zkoušky. Médium se doporučuje obnovovat každých 24 hodin. Obnovení po více než 72 hodinách je nepřijatelné. Kromě toho je třeba vždy, bezprostředně před každým obnovením, změřit parametry kvality vody (např. rozpuštěný kyslík, teplotu, pH atd.).

Rozpětí zkušebních koncentrací

20. Požadovány jsou *minimálně* tři zkušební koncentrace a kontrola s čistou vodou (a v případě nutnosti kontrola s vehikulem). Mezi nejvyšší a nejnižší zkušební koncentrací by měl rozdíl minimálně jednoho řádu. Maximální odstupňování dávek je o 0,1 a minimální odstupňování je o 0,33.

POSTUP

Zahájení a provádění zkoušky

Den 0

21. Expozice by měla být zahájena, jakmile dostatečný počet pulců v předexpoziční kmenové populaci, kteří jsou ve věku 17 dnů po oplodnění nebo mladší, dosáhne vývojového stadia 51 podle Nieuwkoopa a Fabera (8). Pro výběr zkušebních zvířat je třeba zdravé a normálně vyhlížející pulce z kmenové populace shromáždit do jediné nádoby s přiměřeným množství ředicí vody. Pro určení stadia vývoje je třeba pulce jednotlivě vyjmout ze sběrné nádrže síťkou nebo odfiltrováním a přemístit do průhledné měřicí komory (např. Petriho misky o průměru 100 mm) s ředicí vodou. Při určování stadia se doporučuje pokud možno nepoužívat anestezii, avšak pulce je možné jednotlivě znecitlivět roztokem trikain–methan–sulfonátu v koncentraci 100 mg/l (např. MS-222), před manipulací vhodně pufrovaným hydrouhličitanem sodným. Použije-li se tento postup, měla by být metodika pro vhodné použití k anestezii, např. MS-222, získána z laboratoří, které s ní mají zkušenosti, a popsána ve zprávě o výsledcích zkoušky. Se zvířaty je třeba při tomto přemístění zacházet opatrně, aby se minimalizoval manipulační stres a předešlo jakémukoli poranění.

22. Stadium vývoje zvířat se určí pomocí binokulárního preparačního mikroskopu. Aby se snížila konečná variabilita v rámci jednoho vývojového stadia, je důležité určení stadia provést co nejpřesněji. Podle Nieuwkoopa a Fabera (8) je hlavním vývojovým znakem při výběru organismů ve stadiu 51 morfologie zadní končetiny. Morfologické znaky zadních končetin je třeba zkoumat pod mikroskopem. Pro získání komplexních informací o určení stadií u pulců je třeba si pročíst celý návod Nieuwkoopa a Fabera (8), avšak stadium vývoje lze spolehlivě určit pomocí výrazných morfologických znaků. Pro zjednodušení a standardizaci procesu určení stadií během celé studie pomocí identifikace těchto výrazných morfologických znaků spojených s jednotlivými stadii za předpokladu, že vývoj je normální, je možné použít následující tabulku.

▼**M6**

Tabulka 2.

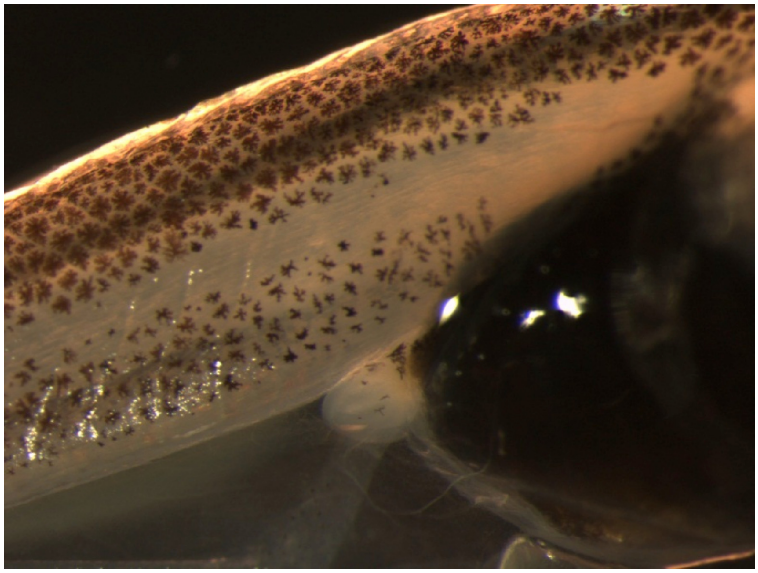
Výrazné morfologické znaky pro určení stadií vývoje podle Neuwkoopa a Fabera.

Výrazné morfologické znaky	Stadium vývoje															
	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66
Zadní končetina	X	X	X	X	X	X	X									
Přední končetina						X	X	X	X	X						
Kraniofaciální struktura										X	X	X	X			
Morfologie čichového nervu											X	X	X			
Délka ocasu													X	X	X	X

23. Pro zahájení zkoušky by všichni pulci měli být ve stadiu 51. Nejvýraznějším morfologickým znakem pro určení stadia je v tomto stadiu morfologie zadní končetiny, což je zobrazeno na obrázku 1.

Obrázek 1.

Morfologie zadní končetiny ve stadiu 51 pulce *X. laevis*.



24. Kromě výběru podle stadia vývoje je volitelně možné použít výběr podle velikosti zkušebních zvířat. Za tímto účelem je třeba změřit délku celého těla (nikoli délku těla od tlamy po kloaku (SVL)) v den 0 z dílčího vzorku přibližně 20 pulců ve stadiu 51 podle Nieuwkoopa a Fabera. Po výpočtu střední délky celého těla pro tuto skupinu pulců je možné stanovit minimální a maximální meze délky celého těla zkušebních zvířat tak, že se povolí rozpětí střední hodnoty ± 3 mm (střední hodnota délky celého těla u pulců ve stadiu 51 je mezi 24,0 a 28,1 mm). Hlavním parametrem při určování připravenosti každého zkušebního zvířete je však stanovení stadia vývoje. Pulce, kteří vykazují viditelné malformace nebo poranění, je třeba ze zkoušky vyloučit.

▼M6

25. Pulci, kteří splňují výše popsaná kritéria stadia, jsou uchováváni v nádržce s čistou kultivační vodou, dokud postup určení stadia není dokončen. Jakmile se určení stadia dokončí, larvy se náhodně rozdělí do expozičních nádrží tak, aby každá nádrž obsahovala 20 larev. Každá expoziční nádrž se pak zkontroluje, zda neobsahuje zvířata s abnormálním vzhledem (např. poraněním, nestandardním plaváním atd.). Pulci, kteří vypadají zjevně nezdravě, by měli být z expozičních nádrží odstraněni a nahrazeni larvami nově vybranými ze sběrné nádrže.

Poznámky

26. Podrobnější informace ohledně postupů ukončení zkoušky a výběru pulců viz Metodický dokument OECD pro histologii štítné žlázy u obojživelníků (OECD Guidance Document on Amphibian Thyroid Histology (9)).

Měření v den 7.

27. V den 7 se z každé zkušební nádrže (opakování) vyjme pět náhodně zvolených pulců. Použitý postup náhodného výběru by každému organismu ve zkoušce měl poskytnout stejnou pravděpodobnost, že bude vybrán. Toho lze dosáhnout použitím jakékoli metody náhodného výběru, avšak vyžaduje se, aby každý pulec byl očištěn. Pulci, kteří nebyli vybráni, se vrátí do své původní nádrže a pulci, kteří vybráni byli, se humánně usmrtí v roztoku o koncentraci 150 až 200 mg/l, např. MS-222, vhodně pufrovaném hydrouhličitanem sodným tak, aby bylo dosaženo pH 7,0. Utracení pulci se opláchnou ve vodě a osuší, poté se stanoví jejich tělesná hmotnost se zaokrouhlením na miligramy. U každého pulce se stanoví (pomocí binokulárního preparačního mikroskopu) délka zadní končetiny, délka těla od tlamy po kloaku a stadium vývoje.

Měření v den 21. (při ukončení zkoušky)

28. Při ukončení zkoušky (den 21) se zbývající pulci vyjmou ze zkušebních nádrží a humánně usmrtí v roztoku o koncentraci 150 až 200 mg/l, např. MS-222, vhodně pufrovaném hydrouhličitanem sodným, jak uvedeno výše. Pulci se opláchnou ve vodě a osuší, poté se stanoví jejich tělesná hmotnost se zaokrouhlením na miligramy. U každého pulce se změří stadium vývoje, délka těla od tlamy po kloaku a délka zadní končetiny.

29. Všechny larvy se na 48 až 72 hodin ponoří do Davidsonova fixačního média buď jako vzorky celého těla, nebo jako tkáňové vzorky odříznuté hlavy se spodní čelistí pro histologická vyšetření. Pro histopatologii by z každé nádrže (opakování) mělo být odebráno celkem pět pulců. Jelikož výška folikulární buňky závisí na stadiu vývoje (10), nejvhodnější metodou pro odběr vzorků pro účely histologických analýz je použít pokud možno jedince ve stejném stadiu. Aby bylo možno vybrat jedince ve stejném stadiu, je třeba před výběrem a následným zpracováním za účelem sběru a uchování údajů provést u všech larev určení stadia vývoje. Je to nezbytné, protože běžná odchylka ve vývoji bude mít za následek rozdílnou distribuci stadií v každé nádrži (opakování).

30. Pulce vybrané pro histopatologii (n = 5 z každé nádrže k opakování) je třeba pokud možno porovnávat se střední hodnotou stadia kontrolních vzorků (ze spojených replik/opakování). Pokud existují nádrže (opakování) s více než pěti larvami v odpovídajícím stadiu, náhodně se vybere pět larev.

▼M6

31. Pokud existují nádrže (opakování) s méně než pěti larvami v odpovídajícím stadiu, je třeba odebrat vzorek náhodně vybraných jedinců v nejbližším nižším nebo vyšším stadiu vývoje tak, aby celková velikost vzorku dosáhla pěti larev pro každé opakování. Rozhodnutí, zda odebrat tyto další larvy v nejbližším vyšším, anebo nejbližším nižším stadiu vývoje, by mělo být učiněno na základě celkového hodnocení distribuce stadií v rámci kontroly a v rámci expozic chemické látce. Tzn. je-li expozice dané chemické látce spojena se zpomalením vývoje, pak by vzorek dalších larev měl být odebrán v nejbližším nižším stadiu. A naopak, je-li expozice dané chemické látce spojena s urychlením vývoje, pak by vzorek dalších larev měl být odebrán v nejbližším vyšším stadiu.

32. V případech s prudkými změnami vývoje pulců v důsledku expozice určité zkoušené chemické látce může dojít k tomu, že distribuce stadií ve skupinách exponovaných chemické látce se nebude překrývat s vypočtenou mediánovou hodnotou stadia vývoje kontrolní skupiny. Pouze v těchto případech by postup výběru měl být pozměněn tak, že se použije stadium odlišné od mediánové hodnoty stadia kontroly, aby se dosáhlo odběru vzorků larev odpovídajícího stadia pro histopatologii štítné žlázy. Dále, pokud stadia nejsou stanovena (tj. nejsou synchronizovaná), mělo by pro histologickou analýzu být náhodně vybráno 5 pulců z každého opakování. Důvody, proč byly do vzorku zařazeny jakékoli larvy, které nejsou ve stadiu stejném jako mediánová hodnota stadia vývoje kontroly, je třeba uvést ve zprávě.

Určení biologických ukazatelů

33. Během expoziční fáze, která trvá 21 dnů, se měření hlavních ukazatelů provádí v den 7 a 21, avšak zkušební zvířata je nezbytné pozorovat každodenně. V tabulce 3 je uveden přehled měřených ukazatelů a časů příslušných pozorování. Podrobnější informace o technických postupech pro měření hlavních ukazatelů a histologická vyšetření obsahuje Metodický dokument OECD (9).

Tabulka 3.

Časy pozorování hlavních ukazatelů při zkoušce metamorfózy obojživelníků.

Hlavní ukazatele	Denně	Den 7	Den 21
— Mortalita	•		
— Stadium vývoje		•	•
— Délka zadní končetiny		•	•
— Délka těla od tlamy po kloaku		•	•
— Tělesná hmotnost ve vlhkém stavu		•	•
— Histologie štítné žlázy			•

▼M6

Hlavní ukazatele

34. Stadium vývoje, délka zadní končetiny, délka těla od tlamy po kloaku a hmotnost ve vlhkém stavu jsou hlavními sledovanými ukazateli při zkoušce metamorfózy obojživelníků a o každém z nich je v krátkosti pojednáno níže. Další technické informace o sběru těchto údajů lze najít v referenčních dokumentech, a to včetně postupů pro počítačovou analýzu, které se doporučuje používat.

Stadium vývoje

35. Stadium vývoje pulců *X. laevis* se určí podle kritérií Nieuwkoopa a Fabera (8) pro určování stadií. Údaje o stadiu vývoje se obvykle používají k určení, zda je vývoj zrychlený, asynchronní, opožděný nebo není ovlivněn. Urychlení nebo opoždění vývoje se určuje srovnáním mediánové hodnoty stadia dosažené v kontrolní skupině a mediánové hodnoty stadia v exponovaných skupinách. Asynchronní vývoj se zaznamená, jestliže zkoumané tkáně nevykazují malformace nebo abnormality, ale je porušeno relativní načasování morfogeneze nebo vývoje různých tkání jednotlivých pulců.

Délka zadní končetiny

36. Diferenciace a růst zadních končetin jsou řízeny hormony štítné žlázy a jsou to důležité vývojové znaky, které již byly používány při určování stadia vývoje. Vývoj zadní končetiny je při určení stadia vývoje používán kvalitativně, avšak zde je posuzován jako kvantitativní ukazatel. Proto se měří délka zadní končetiny jako ukazatel, který má odhalit účinky na osu štítné žlázy (obrázek 2). Kvůli jednotnosti se délka zadní končetiny měří na levé zadní končetině. Délka zadní končetiny se hodnotí v den 7 i v den 21 zkoušky. V den 7 je měření délky zadní končetiny jednoduché, jak je znázorněno na obrázku 2. Avšak v den 21 je měření délky zadní končetiny složitější vzhledem k záhybům na končetině. Měření délky zadní končetiny v den 21 by proto mělo začínat od bočního svalstva a sledovat střední linii končetiny přes jakékoli úhlové odchylky. Změny v délce zadní končetiny v den 7, i kdyby nebyly zjevné v den 21, se přesto považují za významné z hlediska potenciálního tyreoidálního působení. Měření délky se provádí z digitálních fotografií pomocí softwaru pro analýzu obrázků, jak je popsáno v Metodickém dokumentu OECD pro histologii štítné žlázy u obojživelníků (9).

Tělesná délka a hmotnost ve vlhkém stavu

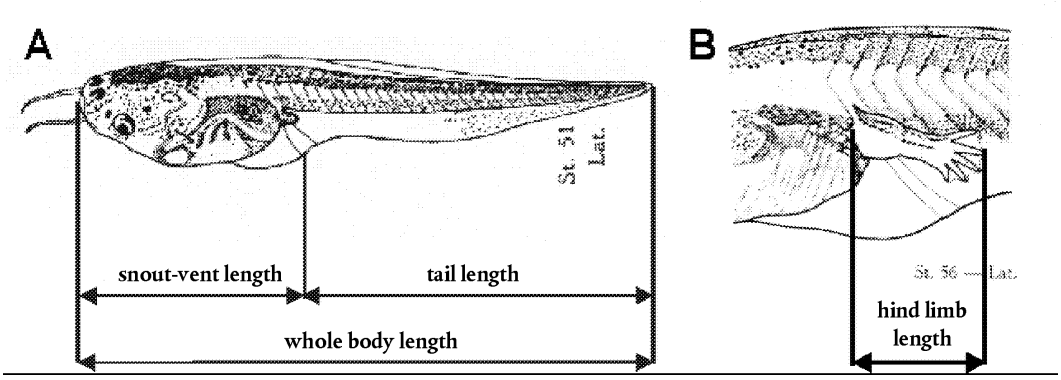
37. Určení délky těla od tlamy po kloaku (SVL) (obrázek 2) a hmotnosti ve vlhkém stavu se uvádí v protokolu o zkoušce, aby bylo možno zhodnotit možné účinky zkoušené chemické látky na tempo růstu pulců ve srovnání s kontrolní skupinou, a tyto hodnoty jsou užitečné při zjišťování obecné toxicity zkoušené chemické látky. Jelikož odstranění ulpělé vody při určování hmotnosti může u pulců vyvolat stresové podmínky a způsobit poškození kůže, provádějí se tato měření v den 7 na pulcích z dílčího vzorku a na všech ostatních pulcích až při ukončení zkoušky (den 21). Kvůli jednotnosti při měření použijte jako kaudální hranici okraj kloakálního otvoru ve směru k hlavě.

38. Délka těla od tlamy po kloaku (SVL) se používá k hodnocení růstu pulců, jak je znázorněno na obrázku 2.

▼M6

Obrázek 2.

(A) Typy měření tělesné délky a (B) měření délky zadní končetiny u pulců *X. laevis* (1).



Histologie štítné žlázy

39. Stadium vývoje a délka zadní končetiny jsou sice důležitými ukazateli pro hodnocení změn v průběhu metamorfózy, avšak opožděný vývoj nelze sám o sobě považovat za diagnostický indikátor antityreoidálního působení. Některé změny mohou být pozorovatelné pouze prostřednictvím běžné histopatologické analýzy. Diagnostickými kritérii jsou mimo jiné hypertrofie/atrofie štítné žlázy, hypertrofie folikulárních buněk, hyperplazie folikulárních buněk a dále pak i jiná kvalitativní kritéria: oblast folikulární dutiny, kvalita koloidu a výška/tvar folikulárních buněk. Ve zprávě je třeba uvést stupeň závažnosti (4 stupně). Informace k získávání a zpracování vzorků pro histologickou analýzu a pro provádění histologických analýz tkáňových vzorků jsou dostupné v literatuře „Amphibian Metamorphosis Assay: Part 1 – Technical guidance for morphologic sampling and histological preparation“ a „Amphibian Metamorphosis Assay: Part 2 – Approach to reading studies, diagnostic criteria, severity grading and atlas“ (9). Laboratoře, které provádějí tuto zkoušku poprvé, by se před provedením histologické analýzy a hodnocení štítné žlázy měly obrátit o radu za účelem školení na zkušené patology. Při zjevných a významných změnách v hlavních ukazatelích nasvědčujících zrychlenému nebo asynchronnímu vývoji nemusí být histopatologická analýza štítné žlázy nezbytná. Avšak nepřítomnost zjevných morfologických změn nebo poznatky o opožděném vývoji vyžadují histologickou analýzu.

Mortalita

40. Všechny zkušební nádrže je třeba denně kontrolovat, zda neobsahují mrtvé pulce, a zaznamenávat počty v každé nádrži. U každého pozorování mortality by mělo být uvedeno datum, koncentrace a číslo nádrže. Mrtvé jedince ihned po jejich zpozorování je třeba ze zkušební nádrže odstranit. Míra mortality vyšší než 10 % může ukazovat na nevhodné zkušební podmínky nebo na toxické účinky zkoušené chemické látky.

Další pozorování

41. Případy nestandardního chování a makroskopicky viditelných malformací a lézí by měly být zaznamenány. U každého pozorování nestandardního chování, makroskopických malformací nebo lézí se uvede datum, koncentrace a číslo nádrže. Pro standardní chování je typické, že pulci při ponoření do vodního sloupce mají ocas zvednutý výše, než je hlava, pravidelně rytmicky mrskají ocasní ploutví, pravidelně vyplouvají k hladině, zavírají žábry a reagují na podnět. Nestandardní chování by zahrnovalo například plavání na hladině, ležení na dně nádrže, obrácené nebo nepravidelné

▼M6

plavání, nepravidelné vyplouvání k hladině a nereagování na podnět. Kromě toho by měly být zaznamenány značné rozdíly ve spotřebě potravy mezi expozicemi. Závažné malformace a léze mohou zahrnovat morfologické abnormality (např. deformace končetin), léze s krvácením, bakteriální a plísňové infekce aj. Tato stanovení jsou kvalitativní, měla by být považována za rovnocenná klinickým příznakům onemocnění/stresu a porovnána s kontrolními zvířaty. Pokud výskyt nebo míra výskytu v exponovaných nádržích je větší než v kontrolních, pak tento výskyt nebo míru výskytu je třeba považovat za důkaz zjevné toxicity.

ÚDAJE A JEJICH PŘEDKLÁDÁNÍ

Sběr údajů

42. Veškeré údaje by měly být shromažďovány pomocí elektronických nebo ručních systémů, které jsou v souladu se zásadami správné laboratorní praxe (SLP). Údaje o studii by měly zahrnovat:

Zkoušená chemická látka:

— charakterizace zkoušené chemické látky: fyzikálně-chemické vlastnosti, údaje o stabilitě a biologické rozložitelnosti,

— chemické informace a údaje: metoda a frekvence přípravy roztoků. Informace o zkoušené chemické látce zahrnují skutečné a jmenovité koncentrace zkoušené chemické látky a v některých případech, je-li to vhodné, i dalších (non-parent) chemických látek. Měření zkoušených chemických látek může být nezbytné provádět jak u zásobních roztoků, tak i u zkušebních roztoků,

— rozpouštědlo (pokud není použita voda): zdůvodnění výběru rozpouštědla a charakterizace rozpouštědla (povaha, použitá koncentrace).

Zkušební podmínky:

— provozní záznamy: sem patří pozorování týkající se fungování zkušebního systému a podpůrného prostředí a infrastruktury. Záznamy obvykle obsahují: teplotu okolí, zkušební teplotu, fotoperiodu, stav kritických složek systému expozice (např. čerpadel, počítačů cyklů, tlaky), průtoky, úrovně vody, výměny zásobních lahví a záznamy o krmení. Obecné parametry kvality vody zahrnují: pH, rozpuštěný kyslík, vodivost, celkový jód, zásaditost a tvrdost,

— odchylky od zkušební metody: zde je třeba uvést jakékoli údaje o odchylkách nebo slovní popis odchylek od zkušební metody.

Výsledky:

— biologická pozorování a údaje: zahrnují každodenní pozorování mortality, spotřeby potravy, nestandardního plavání, letargie, ztráty rovnováhy, malformací, lézí atd. Pozorování a údaje shromážděné v předem stanovených intervalech obsahují: stadium vývoje, délku zadní končetiny, délku těla od tlamy po kloaku a hmotnost ve vlhkém stavu,

▼M6

— použití metod statistické analýzy a jejich zdůvodnění; výsledky statistické analýzy pokud možno ve formě tabulky,

— histologické údaje: zahrnují slovní popisy, stupeň závažnosti a míry výskytu konkrétních pozorování, která jsou podrobně uvedena v pokynech pro histopatologii,

— pozorování *ad hoc*: tato pozorování by měla zahrnovat slovní popisy o studii, které nespadají do dříve popsaných kategorií.

Předkládání údajů

43. Dodatek 2 obsahuje tabulky pro každodenní sběr údajů, které mohou být použity jako vodítko pro zápis naměřených údajů a pro výpočty souhrnných statistických údajů. Poskytnuty jsou také vykazovací tabulky, vhodné pro sdělování souhrnných údajů o ukazatelích. Vykazovací tabulky pro histologická hodnocení obsahuje dodatek 2.

Kritéria provedení zkoušky a přijatelnost/validita zkoušky

44. Obecně platí, že větší odchylky od zkušební metody povedou k údajům, které jsou z hlediska interpretace nebo vykazování nepřijatelné. Proto byla vypracována následující kritéria, uvedená v tabulce 4, jako vodítko pro určení kvality provedené zkoušky celkového stavu kontrolních organismů.

Tabulka 4.

Kritéria pro provedení zkoušky metamorfózy obojživelníků.

Kritérium	Přijatelné meze
Zkušební koncentrace	Udržována na ≤ 20 % variačního koeficientu (variabilita naměřené zkušební koncentrace) po celých 21 dnů zkoušky
Mortalita v kontrolních skupinách	≤ 10 % – mortalita v kterémkoli opakování by v kontrolních skupinách neměla být větší než 2 jedinci
Minimální medián stadia vývoje kontrolních skupin na konci zkoušky	57
Rozpětí stadií vývoje v kontrolní skupině	10. a 90. percentil distribuce stadií vývoje by se neměl lišit o více než 4 stadia
Rozpuštěný kyslík	≥ 40 % nasycení vzduchem (*)
pH	Hodnota pH by měla být udržována mezi 6,5–8,5. Rozdíly mezi opakováními/expozicemi by neměly být větší než 0,5
Teplota vody	22° ± 1 °C – rozdíly mezi opakováními/expozicemi by neměly být větší než 0,5 °C
Zkušební koncentrace bez zjevné toxicity	≥ 2
Výsledky při opakováních	≤ 2 opakování po celou dobu zkoušky mohou být zpochybněna

▼M6

Kritérium	Přijatelné meze
Zvláštní podmínky pro použití rozpouštědla	Je-li použito nosné rozpouštědlo, měla by být použita kontrolní skupina s rozpouštědlem a kontrolní skupina s čistou vodou a výsledky by měly být zaznamenány
	Statisticky významné rozdíly mezi kontrolní skupinou s rozpouštědlem a kontrolní skupinou s vodou se posuzují zvlášť. Více informací viz níže
Zvláštní podmínky pro statický systém s obnovováním média	Reprezentativní chemické analýzy před a po obnovení média by měly být zaznamenány
	Úrovně amoniaku by měly být měřeny bezprostředně před obnovením média
	Všechny parametry kvality vody uvedené v tabulce 1 dodatku 1 by měly být měřeny bezprostředně před obnovením média
	Období mezi obnoveními by nemělo být delší než 72 hodin
	Vhodný krmný plán (50 % denní dávky potravy tvoří komerčně dostupné krmivo pro pulce)

(*) Provzdušnění vody lze udržovat prostřednictvím promývaček plynu. Promývačky plynu se doporučuje nastavit na hodnoty, které nebudou pulcům způsobovat přílišný stres.

Validita zkoušky

45. Aby bylo možné považovat zkoušku za přijatelnou/platnou, musí být splněny tyto požadavky:

Experiment při zkoušce, která z hlediska činnosti štítné žlázy byla shledána jako negativní, je považován za platný za těchto podmínek:

1) Při každé dané expozici (včetně kontrolních skupin) nesmí mortalita přesáhnout 10 %. Při každém daném opakování nesmí mortalita postihnout více než tři pulce, jinak je toto opakování považováno za zpochybněné.

2) Alespoň dvě úrovně expozice se všemi čtyřmi nezpochybněnými opakováními musí být dostupné pro analýzu.

3) Alespoň dvě úrovně expozice bez zjevné toxicity musí dostupné pro analýzu.

Platný experiment při zkoušce, která z hlediska činnosti štítné žlázy byla shledána jako pozitivní:

1) Může dojít k mortalitě nejvýše u dvou pulců/opakování v kontrolní skupině.

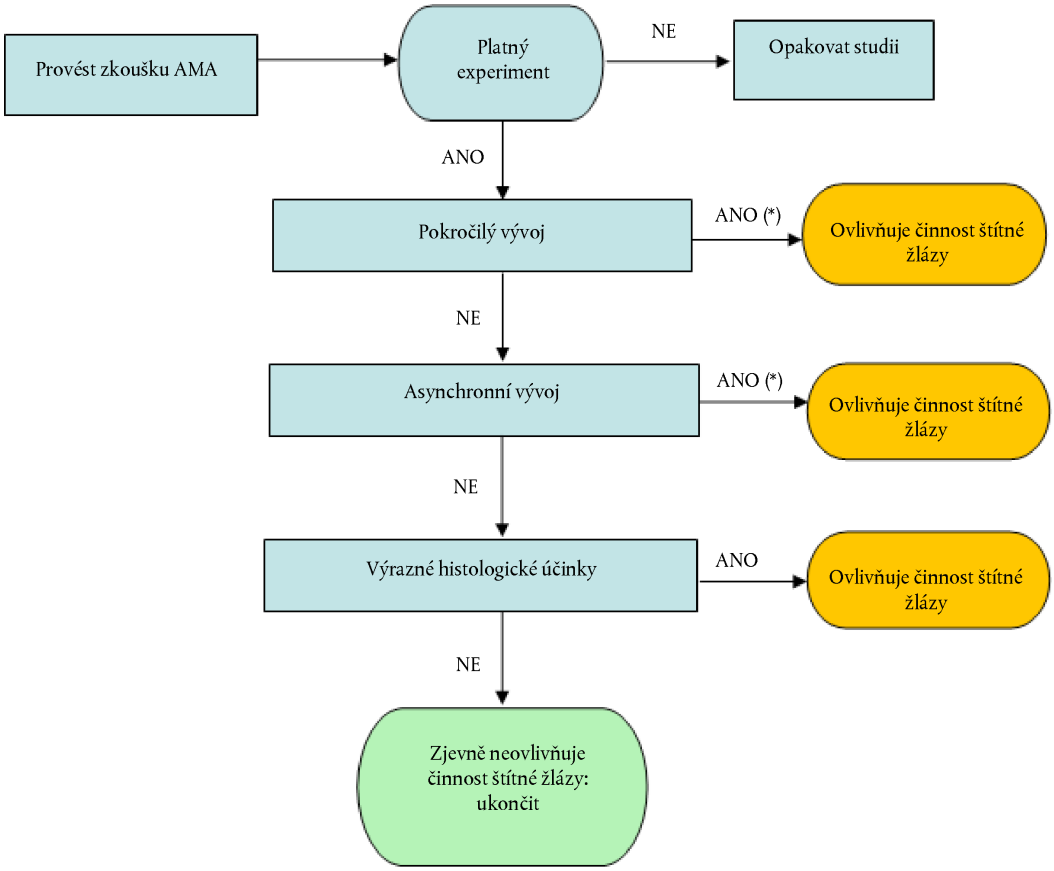
Rozhodovací logika pro provádění zkoušky metamorfózy obojživelníků

46. Pro zkoušku metamorfózy obojživelníků byla vypracována rozhodovací logika s cílem poskytnout logickou pomoc při provádění a interpretaci výsledků této biologické zkoušky (viz vývojový diagram na obrázku 3). Logika rozhodování v podstatě spočívá ve vážení ukazatelů, přičemž pokročilý vývoj, asynchronní vývoj a histopatologie štítné žlázy jsou považovány za závažné, a opožděný vývoj, délka těla od tlamy po kloaku a tělesná hmotnost ve vlhkém stavu, tj. parametry, které potenciálně mohou být ovlivněny obecnou toxicitou, jsou považovány za méně závažné.

▼M6

Obrázek 3.

Rozhodovací logika pro provádění zkoušky metamorfózy obojživelníků.



(*) Některé regulační orgány mohou požadovat histologii i přes značné rozdíly při pokročilém a asynchronním vývoji. Subjektu, který tuto zkoušku provádí, se doporučuje před provedením zkoušky konzultovat s příslušnými orgány, které ukazatele jsou požadovány.

Urychlený vývoj (určený pomocí stadia vývoje, délky od tlamy po kloaku a délky zadní končetiny)

47. Je známo, že urychlený vývoj nastává pouze v důsledku účinků, které souvisí s hormonem štítné žlázy. Může se jednat o účinky na periferních tkáních, jako je přímá interakce s receptorem tyreoidálních hormonů (např. T4), nebo účinky, které mění hladiny cirkulujících hormonů štítné žlázy. V každém z těchto případů je to považováno za dostatečný důkaz toho, že chemická látka ovlivňuje činnost štítné žlázy. Urychlený vývoj se hodnotí jedním ze dvou způsobů. Zaprvé lze hodnotit obecné stadium vývoje pomocí standardizované metody podrobně popsané ve studii Nieuwkoopa a Fabera (8). Zadruhé lze kvantifikovat specifické morfologické rysy, jako je délka zadní končetiny, v den 7 a 21, což pozitivně souvisí s agonistickými účinky na receptor tyreoidálních hormonů. Pokud se vyskytnou statisticky významné pokroky ve vývoji nebo v délce zadních končetin, pak ze zkoušky vyplývá, že chemická látka ovlivňuje činnost štítné žlázy.

▼M6

48. Hodnocení pokusných organismů na přítomnost zrychleného vývoje v porovnání s kontrolní populací bude vycházet z výsledků statistických analýz zaměřených na tyto čtyři ukazatele:

— délka zadní končetiny (normalizovaná podle délky od tlamy po kloaku) v den 7 studie,

— délka zadní končetiny (normalizovaná podle délky od tlamy po kloaku) v den 21 studie,

— stadium vývoje v den 7 studie,

— stadium vývoje v den 21 studie.

49. Statistické analýzy délky zadní končetiny je třeba provádět na základě měření délky levé zadní končetiny. Délka zadní končetiny se normalizuje stanovením poměru mezi délkou zadní končetiny a délkou těla od tlamy po kloaku jedince. Střední hodnoty z těchto normalizovaných hodnot u každé úrovně expozice se poté porovnají. Zrychlení vývoje je pak indikováno významným zvýšením (normalizované) střední hodnoty délky zadní končetiny ve skupině exponované chemické látce v porovnání s kontrolní skupinou v den 7 studie a/nebo v den 21 studie (viz dodatek 3).

50. Statistické analýzy stadia vývoje je třeba provádět na základě určení vývojových stadií podle morfologických kritérií popsaných Nieuwkoopem a Faberem (8). Zrychlení vývoje je indikováno, pokud se multikvantovou analýzou zjistí významné zvýšení hodnot stadií vývoje ve skupině exponované chemické látce v porovnání s kontrolní skupinou v den 7 studie a/nebo v den 21 studie.

51. Významný účinek na kterýkoli ze čtyř výše uvedených ukazatelů je v této zkušební metodě pro zkoušku metamorfózy obojživelníků považován za dostatečný pro potvrzení urychleného vývoje. To znamená, že významné účinky na délku zadní končetiny v určitém čase nevyžadují potvrzení významnými účinky na délku zadní končetiny v alternativním časovém bodu ani významnými účinky na stadium vývoje v tomto určitém čase. A naopak, významné účinky na stadium vývoje v určitém čase nevyžadují potvrzení významnými účinky na stadium vývoje v alternativním časovém bodu ani významnými účinky na délku zadní končetiny v tomto určitém čase. Váha důkazů pro urychlený vývoj nicméně vzroste, jsou-li zjištěny významné účinky na více než jeden ukazatel.

Asynchronní vývoj (určený pomocí kritérií stadia vývoje)

52. Pro asynchronní vývoj je typické narušení relativního načasování morfogeneze nebo vývoj různých tkání u jednotlivých pulců. Není-li možné jasně stanovit stadium vývoje organismu pomocí souboru morfologických ukazatelů, které jsou pro kterékoli dané stadium typické, ukazuje to na to, že tkáně se v průběhu metamorfózy vyvíjejí asynchronně. Asynchronní vývoj je jedním z indikátorů činnosti štítné žlázy. Jedinými známými druhy působení, jež způsobují asynchronní vývoj, jsou buď účinky chemických látek na periferní působení hormonu štítné žlázy a/nebo metabolismus hormonu štítné žlázy ve vyvíjejících se tkáních, např. který lze pozorovat u inhibitorů deiodinasy.

▼**M6**

53. Hodnocení pokusných zvířat na přítomnost asynchronního vývoje v porovnání s kontrolní populací bude založeno na makroskopickém morfologickém posouzení pokusných zvířat v den 7 studie a v den 21 studie.

54. Popis normálního vývoje *Xenopus laevis* u Nieuwkoopa a Fabera (8) poskytuje rámec pro identifikaci postupu normální přestavby tkání. Termínem „asynchronní vývoj“ se označují zvláště ty odchylky v makroskopickém morfologickém vývoji pulců, které znemožňují s konečnou platností určit stadium vývoje podle kritérií Nieuwkoopa a Fabera (8), jelikož klíčové morfologické znaky vykazují význačné rysy různých stadií.

55. Jak vyplývá z pojmu „asynchronní vývoj“, měly by být zohledněny pouze případy vykazující odchylky v průběhu přestavby určitých tkání v porovnání s průběhem přestavby jiných tkání. U některých klasických fenotypů dochází k pozdnímu vývinu nebo nevyvinutí předních končetin, a to i přes normální nebo pokročilý vývoj zadních končetin a ocasních tkání, nebo k předčasné resorpci žaber v porovnání se stadiem morfogeneze zadních končetin a resorpce ocasu. U pokusného organismu se zaznamená, že vykazuje asynchronní vývoj, pokud nemůže být přiřazen ke stadiu, protože nesplňuje většinu kritérií vývojových znaků pro dané stadium podle Nieuwkoopa a Fabera (8), nebo pokud dojde k extrémnímu zpoždění nebo urychlení jednoho nebo více klíčových rysů (např. ocas je zcela resorbován, avšak přední končetiny se nevyvinuly). Toto posouzení se provádí kvalitativně a měl by se vyšetřit celý soubor vývojových znaků uváděných Nieuwkoopem a Faberem (8). Není však nutné zaznamenávat stav vývoje různých vývojových znaků pozorovaných zvířat. Zvířata, o nichž se zaznamená, že vykazují asynchronní vývoj, se nezařadí do stadia vývoje podle Nieuwkoopa a Fabera (8).

56. Rozhodujícím kritériem pro určení případů abnormálního morfologického vývoje jako „asynchronního vývoje“ je tedy to, že je narušeno relativní načasování přestavby tkání a morfogeneze tkání, zatímco morfologie dotčených tkání není zjevně abnormální. Příkladem pro ilustraci této interpretace makroskopických morfologických abnormalit je to, že zaostalá morfogeneze zadních končetin v porovnání s vývojem jiných tkání bude splňovat kritérium „asynchronního vývoje“, naproti tomu případy vykazující chybějící zadní končetiny, jejich abnormální počet (např. ektrodaktylie, polydaktylie) nebo jiné zjevné malformace končetin by za „asynchronní vývoj“ považovány být neměly.

57. V této souvislosti by hlavní morfologické znaky, které je třeba hodnotit z hlediska jejich koordinovaného morfologického pokroku, měly zahrnovat morfogenezi zadních končetin, morfogenezi předních končetin, vývin předních končetin, stadium resorpce ocasu (zejména resorpce konce ocasu) a morfologii hlavy (např. velikost žaber a stadium resorpce žaber, morfologii dolní čelisti, protruzi Meckelovy chrupavky).

58. V závislosti na způsobu chemického působení se mohou vyskytnout různé makroskopické morfologické fenotypy. U některých klasických fenotypů dochází k pozdnímu vývinu nebo nevyvinutí předních končetin, a to i přes normální nebo pokročilý vývoj zadních končetin a ocasních tkání, k předčasné resorpci žaber v porovnání s přetvořením zadních končetin a ocasu.

▼**M6**

Histopatologie

59. Pokud chemická látka nezpůsobuje zjevnou toxicitu a neurychluje vývoj nebo nezpůsobuje asynchronní vývoj, pak se histopatologie štítné žlázy hodnotí podle příslušného Metodického dokumentu OECD (9). Zaostávání ve vývoji v nepřítomnosti toxicity je silným indikátorem antityreoidálního působení, avšak analýza stadií vývoje je méně citlivá a méně diagnosticky významná než histopatologická analýza štítné žlázy. Proto je v tomto případě nezbytné provádět histopatologické analýzy štítné žlázy. Účinky na histologii štítné žlázy byly prokázány v nepřítomnosti vývojových účinků. Dojde-li ke změnám v tyreoidální histopatologii, je chemická látka považována za ovlivňující činnost štítné žlázy. Pokud na štítných žlázách není zpozorován opožděný vývoj nebo histologické léze, má se za to, že chemická látka neovlivňuje činnost štítné žlázy. Zdůvodnění toto rozhodnutí je takové, že štítná žláza je ovlivňována hormonem TSH a jakákoli chemická látka, která dostatečně změní cirkulující tyreoidální hormon tak, že se změní sekrece TSH, povede k histopatologickým změnám na štítné žláze. Cirkulaci tyreoidálních hormonů mohou změnit různé způsoby a mechanismy působení. Hladina tyreoidálních hormonů tedy sice je indikativní pro účinek související se štítnou žlázou, avšak nepostačuje pro určení, který způsob nebo mechanismus působení s touto reakcí souvisí.

60. Z hlediska základních statistických metod není tento ukazatel vhodný, a proto určení účinku souvisejícího s expozicí chemické látce musí být provedeno prostřednictvím znaleckého posudku patologa.

Opožděný vývoj (určený pomocí stadia vývoje, délky zadních končetin, tělesné hmotnosti, délky od tlamy po kloaku)

61. K opožděnému vývoji může dojít působením antityreoidálních mechanismů a prostřednictvím nepřímé toxicity. Mírná zpoždění ve vývoji spolu se zjevnými znaky toxicity pravděpodobně ukazují na nespecifikovaný toxický účinek. Hodnocení netyreoidální toxicity je podstatným prvkem zkoušky, který má snížit pravděpodobnost chybných pozitivních výsledků. Nadměrná mortalita očividně znamená, že působí jiné toxické mechanismy. Podobně i mírné zpomalení růstu, určené podle hmotnosti ve vlhkém stavu a/nebo podle délky těla od tlamy po kloaku, rovněž naznačuje netyreoidální toxicitu. Zjevný rychlejší růst je obvykle zaznamenán v případě chemických látek, které negativně ovlivňují normální růst. Z přítomnosti větších zvířat tedy nutně nevyplývá netyreoidální toxicita. Při určování tyreoidální toxicity by se však nikdy nemělo vycházet pouze z růstu. Růst spolu se stadiem vývoje a histopatologií štítné žlázy by měl být spíše používán k určení tyreoidálního působení. Při určování zjevné toxicity by měly být posuzovány i jiné ukazatele včetně edémů, krvácejících lézí, letargie, snížené spotřeby potravy, chybného/změněného plavání atd. Pokud všechny zkušební koncentrace vykazují zjevnou toxicitu, měla by zkoušená chemická látka před stanovením, zda potenciálně ovlivňuje či neovlivňuje činnost štítné žlázy, být přehodnocena na nižší zkušební koncentrace.

62. Statisticky významná zpoždění ve vývoji a zároveň nepřítomnost jiných příznaků zjevné toxicity ukazují na to, že chemická látka ovlivňuje činnost štítné žlázy (je antagonistická). V nepřítomnosti statisticky silných odezev může být tento výsledek podpořen výsledky histopatologie štítné žlázy.

▼M6

Statistické analýzy

63. Statistická analýza údajů by se pokud možno měla řídit postupy, které jsou popsány v dokumentu Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application (11). Pro všechny spojité kvantitativní ukazatele (délka zadních končetin, délka těla od tlamy po kloaku, hmotnost ve vlhkém stavu), které odpovídají monotónní závislosti dávka-odezva, by se ke stanovení významného účinku expozice měl použít test sestupného trendu Jonckheere-Terpstry.

64. Pro kontinuální ukazatele, které nejsou v souladu s monotónní závislostí dávka-odezva, by údaje měly být posouzeny z hlediska normality rozdělení (pokud možno Shapiro-Wilkovým nebo Anderson-Darlingovým testem) a homogenity rozptylu (pokud možno Levenovým testem). Oba testy se provádějí na základě reziduálních hodnot získaných z jednostranné analýzy rozptylu (ANOVA). Místo těchto formálních testů na normalitu rozdělení a homogenitu rozptylu lze použit odborný posudek, ovšem formální testy se upřednostňují. Pokud je zjištěno nenormální rozdělení nebo heterogenní rozptyl, je třeba usilovat o normalizační transformaci ke stabilizaci rozptylu. Jsou-li údaje (případně i po transformaci) rozděleny normálně s homogenním rozptylem, stanoví se významný účinek expozice Dunnettovým testem. Jsou-li údaje (případně po transformaci) rozděleny normálně s heterogenním rozptylem, stanoví se významný účinek expozice Tamhaneovým-Dunnettovým testem nebo testem T3 nebo Mannovým-Whitneyovým-Wilcoxonovým U-testem. Pokud není možné nalézt normalizační transformaci, stanoví se významný účinek expozice Mannovým-Whitneyovým-Wilcoxonovým U-testem s Bonferroni-Holmovou korekcí hodnot p. Dunnettův test se použije nezávisle na jakémkoli F-testu ANOVA a Mannův-Whitneyův test se provede nezávisle na jakémkoli celkovém Kruskallově-Wallisově testu.

65. Významná mortalita se nepředpokládá, ale měla by být posouzena pomocí Cochranova-Armitageova testu sestupného trendu, pokud údaje odpovídají monotónní závislosti dávka-odezva, a pokud neodpovídají, pomocí Fisherova exaktního testu s Bonferroni-Holmovou korekcí.

66. Významný účinek expozice pro stadium vývoje se stanoví pomocí Jonckheerova-Terpstrova testu sestupného trendu aplikovaného na mediánové hodnoty opakování. Alternativně a přednostně by pro stanovení účinku od 20. do 80. percentilu měl být použit Jonckheerův multikvantový test, jelikož zohledňuje změny v profilu distribuce.

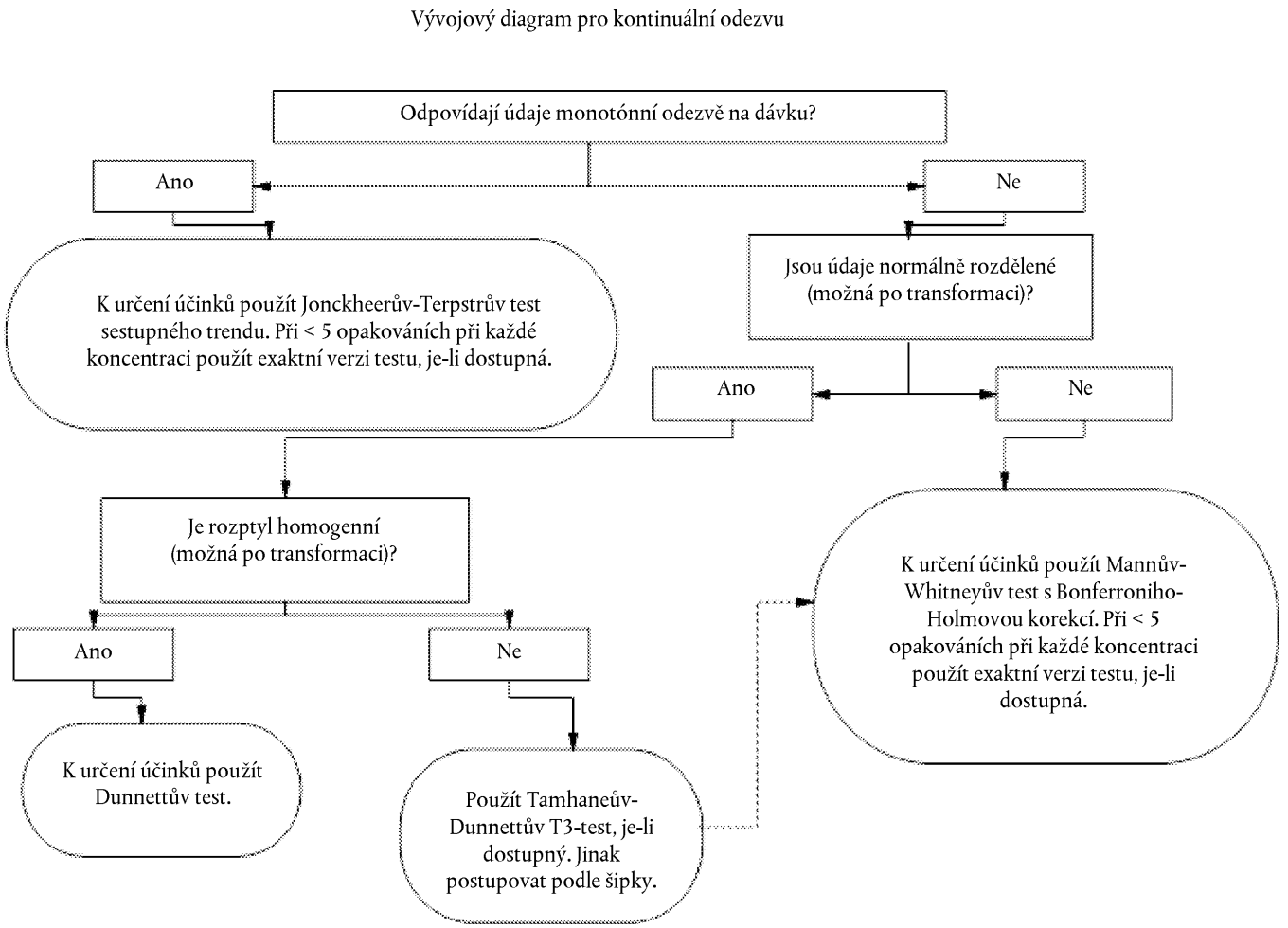
67. Vhodnou jednotkou analýzy je opakování, takže údaje sestávají z mediánových hodnot opakování, použije-li se Jonckheerův-Terpstrův test nebo Mannův-Whitneyův U-test, nebo ze středních hodnot opakování, použije-li se Dunnettův test. Monotónnost závislosti dávka-odezva lze posoudit vizuálně na základě středních či mediánových hodnot opakování a expozic nebo na základě formálních testů, jak byly popsány dříve (11). Při méně než pěti opakováních při každé expozici nebo kontrole by měly být použity exaktní permutační verze Jonckheerova-Terpstrova testu a Mannova-Whitneyova testu, jsou-li dostupné. Statistický význam všech uvedených testů se posoudí při hladině významnosti 0,05.

68. Na obrázku 4 je vývojový diagram pro provádění statistických testů kontinuálních údajů.

▼M6

Obrázek 4.

Vývojový diagram pro statistické metody zpracování údajů o kontinuální odezvě.



▼M6

Úvahy o analýze zvláštních dat

Použití zpochybněných úrovní expozice

69. Při určování toho, zda opakování nebo celá expozice vykazují zjevnou toxicitu a měly by být z analýzy vyřazeny, se zvažuje několik faktorů. Zjevná toxicita je definována jako > 2 úhyny v každém opakování, které lze vysvětlit pouze toxicitou, a nikoli technickou chybou. Jiné příznaky zjevné toxicity zahrnují krvácení, nestandardní chování, nestandardní plavání, anorexii a jakékoli jiné klinické příznaky choroby. Při subletálních příznacích toxicity mohou být nezbytná kvalitativní hodnocení, která by měla být vždy prováděna ve srovnání s kontrolní skupinou v čisté vodě.

Kontroly s rozpouštědlem

70. Použití rozpouštědla by mělo být zvažováno pouze jako poslední možnost, když byly uváženy všechny ostatní možnosti dávkování chemické látky. Je-li použito rozpouštědlo, měla by být souběžně provedena u kontrolní skupiny zkouška s čistou vodou. Při ukončení zkoušky je třeba provést hodnocení případných účinků rozpouštědla. To se provede pomocí statistického srovnání kontrolní skupiny s rozpouštědlem a kontrolní skupiny s čistou vodou. Nejdůležitějšími ukazateli, které je třeba při této analýze posoudit, jsou stadium vývoje, délka těla od tlamy po kloaku a hmotnost ve vlhkém stavu, jelikož tyto ukazatele mohou být ovlivněny netyreoidální toxicitou. Jsou-li zaznamenány statisticky významné rozdíly v těchto ukazatelích mezi kontrolní skupinou s čistou vodou a kontrolní skupinou s rozpouštědlem, stanovte ukazatele studie pro měření odezev pomocí kontrolní skupiny s čistou vodou. Pokud neexistují žádné statisticky významné rozdíly mezi kontrolní skupinou s čistou vodou a kontrolní skupinou s rozpouštědlem pro všechny měřené proměnné odezvy, stanovte ukazatele studie pro měření odezev pomocí sloučené kontrolní skupiny s ředicí vodou a kontrolní skupiny s rozpouštědlem.

Exponované skupiny dosahující vývojového stadia 60 a vyšších

71. Po stadiu 60 dochází u pulců ke snížení velikosti a hmotnosti v důsledku resorpce tkání a snížení absolutního obsahu vody. Měření hmotnosti ve vlhkém stavu a délky těla od tlamy po kloaku tak nemohou být vhodně použita při statistických analýzách tempa růstu. Údaje o hmotnosti ve vlhkém stavu a délce organismů > NF60 by proto měly být omezeny a nelze je použít při analýzách středních nebo mediánových hodnot duplikátních vzorků. Tyto růstové parametry lze analyzovat dvěma různými metodami.

72. Jedna metoda spočívá v tom, že pro statistické analýzy hmotnosti ve vlhkém stavu a/nebo délky těla od tlamy po kloaku se posoudí pouze pulci ve stadiu vývoje, které je nižší nebo rovno stadiu 60. Má se za to, že tato metoda poskytuje dostatečně průkazné údaje o závažnosti možných růstových účinků, pokud se z analýzy vyloučí pouze malá část (≤ 20 %) pokusných organismů. Pokud stadium vývoje vyšší než stadium 60 vykazuje vyšší počet pulců (≥ 20 %) při jedné nebo více nominálních koncentracích, pak by měla být u všech pulců provedena dvoufaktorová hierarchická analýza rozptylu (ANOVA), což umožní posoudit růstové účinky vyvolané expozicí chemické látce při zohlednění účinku pozdního stadia vývoje na růst. Pokyny týkající se dvoufaktorové analýzy ANOVA hmotnosti a délky obsahuje dodatek 3.

LITERATURA

1) OECD (2004) Report of the Validation of the Amphibian Metamorphosis Assay for the detection of thyroid active substances: Phase 1 – Optimisation of the Test Protocol. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment. No. 77, Paris.

▼**M6**

2) OECD (2007) Final Report of the Validation of the Amphibian Metamorphosis Assay: Phase 2 – Multi-chemical Interlaboratory Study. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment. No. 76, Paris.

3) OECD (2008) Report of the Validation Peer Review for the Amphibian Metamorphosis Assay and Agreement of the Working Group of the National Coordinators of the Test Guidelines Programme on the Follow-up of this Report. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment. No. 92, Paris.

4) OECD (2000) Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment. No. 23, Paris.

5) ASTM (2002) Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests on Test Materials with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians. American Society for Testing and Materials, ASTM E729-96(2002), Philadelphia, PA.

6) ASTM (2004) Standard Guide for Conducting the Frog Embryo Teratogenesis Assay – Xenopus (FETAX). E 1439-98.

7) Kahl, M. D., Russom, C. L., DeFoe, D. L. & Hammermeister, D. E. (1999) Saturation units for use in aquatic bioassays. Chemosphere 39, pp. 539–551.

8) Nieuwkoop, P. D. & Faber, J. (1994) Normal Table of Xenopus laevis. Garland Publishing, New York.

9) OECD (2007) Guidance Document on Amphibian Thyroid Histology. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment. No. 82. Paris.

10) Dodd, M. H. I. & Dodd, J. M. (1976) Physiology of Amphibia. Lofts, B. (ed.), Academic Press, New York, pp. 467–599.

11) OECD (2006) Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment. No. 54, Paris.

12) Hutchinson, T. H., Shillabeer, N., Winter, M. J., Pickford, D. B. (2006) Acute and chronic effects of carrier solvents in aquatic organisms: A critical review. Review. Aquatic Toxicology, 76; pp. 69–92.

▼**M6**

Dodatek 1

Tabulka 1

Experimentální podmínky pro 21denní zkoušku metamorfózy obojživelníků

Pokusné zvíře		Larvy *Xenopus laevis*	
Výchozí stadium larev		Stadium 51 podle Nieuwkoopa a Fabera	
Doba expozice		21 dnů	
Kritéria pro výběr larev		Stadium vývoje a celková délka (volitelné)	
Zkušební koncentrace		Minimálně 3 koncentrace přibližně v rozmezí jednoho řádu	
Režim expozice		Průtokový (upřednostňuje se) a/nebo statický s obnovováním média	
Průtok zkušebního systému		25 ml/min (výměna celého objemu přibližně každých 2,7 h)	
Hlavní ukazatele / dny určování		Mortalita	Denně
		Stadium vývoje	D 7 a 21
		Délka zadních končetin	D 7 a 21
		Délka těla od tlamy po kloaku	D 7 a 21
		Tělesná hmotnost ve vlhkém stavu	D 7 a 21
		Histologie štítné žlázy	D 21
Ředicí voda / laboratorní kontrola		Dechlorovaná vodovodní voda (filtrovaná přes aktivní uhlí) nebo rovnocenný laboratorní zdroj	
Hustota larev		20 larev / zkušební nádoba (5 / l)	
Zkušební roztok / zkušební nádoba		4–10 l (minimální obsah vody 10–15 cm) / zkušební nádoba skleněná nebo z nerezové oceli (např. 22,5 cm × 14 cm × 16,5 cm)	
Opakování		4 zkušební nádoby k opakování / zkušební koncentrace a kontrola	
Přijatelná mortalita v kontrolních skupinách		≤ 10 % v každé zkušební nádobě k opakování	
Fixace štítné žlázy	Počet fixovaných	Všichni pulci (zpočátku se hodnotí 5/opakování)	
	Oblast	Hlava nebo celé tělo	
	Fixační kapalina	Davidsonovo fixační médium	
Krmení	Potrava	Sera Micron® nebo rovnocenné	
	Množství/frekvence	Režim krmení při použití Sera Micron® viz tabulka 1	
Osvětlení	Fotoperioda	12 h světla: 12 h tmy	

▼**M6**

	Intenzita	600 až 2 000 luxů (měřeno na povrchu vody)
Teplota vody		22° ± 1 °C
pH		6,5 – 8,5
Koncentrace rozpuštěného kyslíku (DO)		> 3,5 mg/l (> 40 % nasycení vzduchem)
Rozvrh odběru vzorků pro analytickou chemii		Jednou/týden (4 případy odběru vzorků / zkouška)

▼M6

Dodatek 2

Vykazovací tabulka pro naměřené údaje a souhrnné údaje

Tabulka 1

Chemické informace o hlavní zkoušce

Chemické informace			
	Uveďte zkoušenou chemickou látku, jednotky koncentrace a expozice		
	Zkoušená chemická látka:		
	Jednotky koncentrace		
	Expozice 1		
	Expozice 2		
	Expozice 3		
	Expozice 4		
	Datum (den 0):		Uveďte datum (mm/dd/rr)
	Datum (den 7):		Uveďte datum (mm/dd/rr)
	Datum (den 21):		Uveďte datum (mm/dd/rr)

Tabulka 2:

Formuláře pro sběr údajů naměřených v den 7 a 21

DEN X
DATUM 00/00/00

	Koncentrace	Číslo expozice	Číslo opakování	Číslo jedince	Identifikátor jedince	Stadium vývoje	Délka těla od tlamy po kloaku (mm)	Délka zadní končetiny (mm)	Hmotnost celého organismu ve vlhkém stavu (mg)
ŘADA	CONC	EXP#	REP	IND	ID#	STAGE	BL	HLL	WEIGHT
1	0,00	1							
2	0,00	1							
3	0,00	1							
4	0,00	1							
5	0,00	1							
6	0,00	1							
7	0,00	1							
8	0,00	1							

▼**M6**

	Koncentrace	Číslo expozice	Číslo opakování	Číslo jedince	Identifikátor jedince	Stadium vývoje	Délka těla od tlamy po kloaku (mm)	Délka zadní končetiny (mm)	Hmotnost celého organismu ve vlhkém stavu (mg)
ŘADA	CONC	EXP#	REP	IND	ID#	STAGE	BL	HLL	WEIGHT
9	0,00	1							
10	0,00	1							
11	0,00	1							
12	0,00	1							
13	0,00	1							
14	0,00	1							
15	0,00	1							
16	0,00	1							
17	0,00	1							
18	0,00	1							
19	0,00	1							
20	0,00	1							
21	0,00	2							
22	0,00	2							
23	0,00	2							
24	0,00	2							
25	0,00	2							
26	0,00	2							
27	0,00	2							
28	0,00	2							
29	0,00	2							
30	0,00	2							
31	0,00	2							
32	0,00	2							
33	0,00	2							

▼**M6**

	Koncentrace	Číslo expozice	Číslo opakování	Číslo jedince	Identifikátor jedince	Stadium vývoje	Délka těla od tlamy po kloaku (mm)	Délka zadní končetiny (mm)	Hmotnost celého organismu ve vlhkém stavu (mg)
ŘADA	CONC	EXP#	REP	IND	ID#	STAGE	BL	HLL	WEIGHT
34	0,00	2							
35	0,00	2							
36	0,00	2							
37	0,00	2							
38	0,00	2							
39	0,00	2							
40	0,00	2							
41	0,00	3							
42	0,00	3							
43	0,00	3							
44	0,00	3							
45	0,00	3							
46	0,00	3							
47	0,00	3							
48	0,00	3							
49	0,00	3							
50	0,00	3							
51	0,00	3							
52	0,00	3							
53	0,00	3							
54	0,00	3							
55	0,00	3							
56	0,00	3							
57	0,00	3							
58	0,00	3							

▼**M6**

	Koncentrace	Číslo expozice	Číslo opakování	Číslo jedince	Identifikátor jedince	Stadium vývoje	Délka těla od tlamy po kloaku (mm)	Délka zadní končetiny (mm)	Hmotnost celého organismu ve vlhkém stavu (mg)
ŘADA	CONC	EXP#	REP	IND	ID#	STAGE	BL	HLL	WEIGHT
59	0,00	3							
60	0,00	3							
61	0,00	4							
62	0,00	4							
63	0,00	4							
64	0,00	4							
65	0,00	4							
66	0,00	4							
67	0,00	4							
68	0,00	4							
69	0,00	4							
70	0,00	4							
71	0,00	4							
72	0,00	4							
73	0,00	4							
74	0,00	4							
75	0,00	4							
76	0,00	4							
77	0,00	4							
78	0,00	4							
79	0,00	4							
80	0,00	4							

▼**M6**

Tabulka 3

Vypočtené souhrnné údaje k ukazatelům ze dne 7 a 21

		Stadium vývoje			Délka těla od tlamy po kloaku (mm)		Délka zadní končetiny (mm)		Hmotnost (mg)	
EXP	REP	MIN	MEDI	MAX	STŘED	SD	STŘED	SD	STŘED	SD
1	1	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
1	2	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
1	3	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
1	4	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
2	1	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
2	2	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
2	3	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
2	4	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
3	1	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
3	2	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
3	3	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
3	4	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
4	1	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
4	2	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
4	3	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
4	4	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!

Poznámka: Výpočty v buňkách jsou propojeny s údaji zadanými v tabulce 2.

SD = směrodatná odchylka

Tabulka 4

Údaje o denní mortalitě

Den zkoušky	Datum	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
0	00/00/00																
1	#Value!																
2	#Value!																
3	#Value!																
4	#Value!																
5	#Value!																

▼**M6**

Den zkoušky	Datum	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
6	#Value!																
7	#Value!																
8	#Value!																
9	#Value!																
10	#Value!																
11	#Value!																
12	#Value!																
13	#Value!																
14	#Value!																
15	#Value!																
16	#Value!																
17	#Value!																
18	#Value!																
19	#Value!																
20	#Value!																
21	#Value!																
Počet opakování		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Počet expozic		0				0				0				0			

Poznámka: Výpočty v buňkách jsou propojeny s údaji zadanými v tabulce 1.

Tabulka 5

Kritéria pro kvalitu vody

Expoziční systém (průtokový / statický s obnovováním média):
Teplota:
Intenzita světla:
Cyklus světlo-tma:
Potrava:
Množství krmiva:
pH vody:
Koncentrace jódu ve zkušební vodě:

▼**M6**

Tabulka 6

Souhrn údajů o chemickém vyšetření

Chemický název																					
Číslo CAS:																					
Den zkoušky	Datum	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
0	00/00/00																				
1	#Value!																				
2	#Value!																				
3	#Value!																				
4	#Value!																				
5	#Value!																				
6	#Value!																				
7	#Value!																				
8	#Value!																				
9	#Value!																				
10	#Value!																				
11	#Value!																				
12	#Value!																				
13	#Value!																				
14	#Value!																				
15	#Value!																				
16	#Value!																				
17	#Value!																				
18	#Value!																				
19	#Value!																				
20	#Value!																				
21	#Value!																				

Poznámka: Výpočty v buňkách jsou propojeny s údaji zadanými v tabulce 1.

▼**M6**

Tabulka 7

Vykazovací tabulky pro hlavní histopatologická kritéria

Datum: Chemická látka: Patolog:

ID kontrolního zvířete – opakování 1	ID kontrolního zvířete – opakování 2	Hypertrofie štítné žlázy	Atrofie štítné žlázy	Hypertrofie folikulárních buněk	Hyperplazie folikulárních buněk
Celkem:					

ID exponovaného zvířete – opakování 1	ID exponovaného zvířete – opakování 2	Hypertrofie štítné žlázy	Atrofie štítné žlázy	Hypertrofie folikulárních buněk	Hyperplazie folikulárních buněk
Celkem:					

ID exponovaného zvířete – opakování 1	ID exponovaného zvířete – opakování 2	Hypertrofie štítné žlázy	Atrofie štítné žlázy	Hypertrofie folikulárních buněk	Hyperplazie folikulárních buněk
Celkem					

▼**M6**

Tabulka 8

Další histopatologická kritéria

Datum: Chemická látka: Patolog:

ID kontrolního zvířete – opakování 1	ID kontrolního zvířete – opakování 2	Zvětšení oblasti folikulárních dutin	Zmenšení oblasti folikulárních dutin
Celkem:			

ID exponovaného zvířete – opakování 1	ID exponovaného zvířete – opakování 2	Zvětšení oblasti folikulárních dutin	Zmenšení oblasti folikulárních dutin
Celkem:			

ID exponovaného zvířete – opakování 1	ID exponovaného zvířete – opakování 2	Zvětšení oblasti folikulárních buněk	Zmenšení oblasti folikulárních buněk
Celkem:			

ID exponovaného zvířete – opakování 1	ID exponovaného zvířete – opakování 2	Zvětšení oblasti folikulárních buněk	Zmenšení oblasti folikulárních buněk
Celkem:			

▼**M6**

Tabulka 9

Slovní popis histopatologických nálezů

Datum:

Chemická látka:

Patolog:

		Slovní popis
ID kontrolního zvířete – opakování 1		
ID kontrolního zvířete – opakování 2		
ID exponovaného zvířete – opakování 1		
ID exponovaného zvířete – opakování 2		

▼**M6**

ID exponovaného zvířete – opakování 1		
ID exponovaného zvířete – opakování 2		
ID exponovaného zvířete – opakování 1		
ID exponovaného zvířete – opakování 2		

▼M6

Tabulka 10

Šablona souhrnné vykazovací tabulky za den × (7 nebo 21) zkoušky metamorfózy obojživelníků

		Kontrola				Dávka 1					Dávka 2					Dávka 3				
Ukazatel	REP	Střed	SD	CV	N	Střed	SD	CV	N	ph	Střed	SD	CV	N	ph	Střed	SD	CV	N	ph
Délka zadní končetiny (mm)	1																			
	2																			
	3																			
	4																			
	Střed:																			
Délka těla od tlamy po kloaku (mm)	1																			
	2																			
	3																			
	4																			
	Střed:																			
Tělesná hmotnost za vlhka (mg)	1																			
	2																			
	3																			
	4																			
	Střed:																			

▼M6

Tabulka 11

Šablona souhrnné vykazovací tabulky údajů o stadiu vývoje za den × (7 nebo 21) zkoušky metamorfózy obojživelníků

		Kontrola				Dávka 1					Dávka 2					Dávka 3				
	REP	Medián	Min	Max	N	Medián	Min	Max	N	ph	Medián	Min	Max	N	ph	Medián	Min	Max	Medián	ph
Stadium vývoje	1																			
	2																			
	3																			
	4																			
	Střed:																			

02008R0440 — CS — 16.10.2019 — 008.001 — 2239

▼M6

Dodatek 3

Alternativní analýza hmotnosti a délky v případě pozdních stadií vývoje zahrnujících více než 20 % pulců při jedné nebo více koncentracích

Pokud stadium vývoje vyšší než stadium 60 vykazuje vyšší počet pulců (≥ 20 %) při jedné nebo více nominálních koncentracích, pak by měla být u všech pulců provedena dvoufaktorová hierarchická analýza rozptylu (ANOVA), což umožní posoudit růstové účinky vyvolané expozicí chemické látce při zohlednění účinku pozdního stadia vývoje na růst.

Navrhuje se použít všechny údaje, avšak zohlednit účinek pozdního stadia vývoje. Toho lze dosáhnout dvoufaktorovou hierarchickou analýzou rozptylu ANOVA. Definujte pozdní stadium =„Ano“ pro pulce, je-li jeho stadium vývoje 61 nebo vyšší. Jinak definujte pozdní stadium = „Ne“. Poté lze provést dvoufaktorovou hierarchickou analýzu rozptylu ANOVA s koncentrací a pozdním stadiem a jejich interakcí, přičemž opakování(koncentrace) je účinek náhodného faktoru a pulec(opakování) je účinek jiného náhodného faktoru. Tím se i nadále opakování považuje za jednotku analýzy a přináší v zásadě stejné výsledky jako vážená analýza středních hodnot opakování*pozdní stadium, která se váží počtem pulců v každé střední hodnotě. Pokud tyto údaje porušují požadavky ANOVA na normalitu rozdělení nebo homogenitu rozptylu, pak pro odstranění této námitky lze provést transformaci normalizovaného pořadí.

Kromě běžných ANOVA F-testů pro účinky koncentrace, pozdní stadium a jejich interakci je možné F-test interakce „rozdělit“ na dva doplňkové ANOVA F-testy, z nichž jeden se použije na střední hodnoty odezvy při všech koncentracích pro pozdní stadium = „Ne“ a druhý na střední hodnoty odezev při všech koncentracích pro pozdní stadium = „Ano“. Další porovnání středních hodnot expozic oproti kontrole se provede na každé úrovni pozdního stadia. Pokud existují důkazy o nemonotónní závislosti dávka-odezva na úrovni proměnné „pozdní stadium“, lze provést analýzu trendů pomocí vhodných kontrastů nebo lze provést jednoduchá párová srovnání. Bonferroni-Holmova korekce hodnot p se provede pouze tehdy, jestliže příslušný dílčí F-test není významný. To lze provést v rámci systému statistické analýzy (SAS) a pravděpodobně i jiných sad statistického softwaru. Komplikace mohou vzniknout, pokud při některých koncentracích neexistují žádní pulci v pozdním stadiu, avšak tyto situace lze jednoduchým způsobem řešit.

▼**M6**

Dodatek 4

Definice

Chemická látka: látka nebo směs

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

▼M6

C.39. ZKOUŠKA TOXICITY PRO REPRODUKCI CHVOSTOSKOKŮ V PŮDĚ

ÚVOD

1. Tato zkušební metoda je rovnocenná Pokynu OECD pro zkoušení č. 232 (2009). Tato zkušební metoda je určena pro posouzení účinků chemických látek na reprodukční schopnost chvostoskoků v půdě. Je založena na stávajících postupech (1)(2). Partenogenetický *Folsomia candida* a pohlavně se rozmnožující *Folsomia fimetaria* jsou dva z nejdostupnějších druhů chvostoskoků, lze je kultivovat a jsou komerčně dostupné. Je-li nutné posoudit specifická prostředí, kde se uvedené dva druhy nevyskytují, lze tento postup rozšířit i na jiné druhy chvostoskoků, pokud jsou schopny splnit kritéria platnosti zkoušky.

2. Chvostoskoci žijící v půdě jsou ekologicky důležité druhy pro ekotoxikologické zkoušení. Chvostoskoci jsou šestinohý hmyz s exoskeletem vysoce propustným pro vzduch a vodu a představují druh členovců s odlišnou cestou expozice a odlišnou mírou expozice, než mají žížaly a roupice.

3. Hustota populací chvostoskoků obvykle dosahuje 10^5 m^{-2} ve vrstvách půdy a spadaného listí v mnoha terestrických ekosystémech (3)(4). Dospělí jedinci obvykle měří 0,5–5 mm, jejich příspěvek k celkové živočišné biomase v půdě a k půdní respiraci je nízký, odhaduje se mezi 1 % a 5 % (5). Nejdůležitější úlohu proto mohou sehrávat jako potenciální činitelé regulačních procesů díky tomu, že jsou mikrobivorní a likvidují mikrofaunu. Chvostoskoci slouží jako kořist mnohým endogeickým a epigeickým bezobratlým, jako jsou roztoči, stonožky, pavouci, střevlíkovití a drapčíci. Přispívají k rozkladným procesům v kyselých půdách, kde jsou vedle roupic možná nejdůležitějšími půdními bezobratlými, neboť žížaly a mnohonožky se tam obvykle nevyskytují.

4. *F. fimetaria* je celosvětově rozšířen a běžně se vyskytuje v některých typech půdy od písčitých až po hlinité a od mulových po humusové půdy. Je to bezoký chvostoskok, bez pigmentu. Zaznamenán byl v zemědělských půdách celé Evropy (6). Je omnivorní, živí se mimo jiné houbovými vlákny, bakteriemi, prvoky a zbytky. Prostřednictvím příjmu potravy interaguje s infekcemi působenými patogenními plísněmi rostlin (7) a může ovlivňovat mykorhizu, stejně jako je to známo o *F. candida*. Rozmnožuje se jako většina druhů chvostoskoků pohlavně, přičemž pro oplodnění vajíček je nezbytná stálá přítomnost samečků.

5. *F. candida* je rovněž celosvětové rozšířen. Ve většině přírodních půd není běžný, ale často se ve velmi hojných počtech vyskytuje na místech bohatých na humus. Je to bezoký chvostoskok, bez pigmentu. Má dobře vyvinutou furcu (skákací orgán), je běhavý a je-li vyrušen, rychle skáče. Z ekologického hlediska plní druh *F. candida* podobnou úlohu jako *F. fimetaria*, ale obývá organicky bohatší půdy. Rozmnožuje se partenogenezí. Samečci se mohou vyskytovat v počtu menším než 1 z tisíce.

PODSTATA ZKOUŠKY

6. Synchronizovaní dospělí (*F. fimetaria*) nebo nedospělí (*F. candida*) chvostoskoci se exponují různým koncentracím zkoušené chemické látky smíchané s upravenou umělou půdou (8) s 5 % obsahem organických látek (nebo alternativní půdou). Scénář zkoušky lze rozdělit do dvou kroků:

— Test pro stanovení rozmezí dávek, v případě, že nejsou dostupné dostatečné údaje o toxicitě, kde hlavními ukazateli jsou mortalita a reprodukce,

▼M6

které se vyhodnotí po 2 týdnech pro *F. fimetaria* a po 3 týdnech pro *F. candida*.

— Hlavní zkouška toxicity pro reprodukci, při níž se posoudí celkový počet nedospělých potomků pocházejících z dospělých organismů a přežití dospělých organismů. Hlavní zkouška trvá 3 týdny pro *F. fimetaria* nebo 4 týdny pro *F. candida*.

Toxický účinek zkoušené chemické látky na mortalitu a schopnost reprodukce dospělých chvostoskoků se vyjadřuje jako LC_x a EC_x, přičemž údaje se zanášejí do vhodného modelu nelineární regresí s cílem odhadnout koncentraci, která by způsobila mortalitu nebo snížení reprodukční schopnosti ve výši x %, nebo alternativně jako hodnota NOEC/LOEC (9).

INFORMACE O ZKOUŠENÉ LÁTCE

7. Měly by být pokud možno známy fyzické vlastnosti, rozpustnost ve vodě, log K_{ow}, rozdělovací koeficient půda-voda a tlak par zkoušené chemické látky. Žádoucí jsou i další informace o osudu zkoušené chemické látky v půdě, jako např. míra fotolýzy a hydrolýzy a biotický rozklad. Je třeba zdokumentovat chemickou identifikaci zkoušené chemické látky podle nomenklatury IUPAC, číslo CAS, sadu, šarži, strukturní vzorec a čistotu, jsou-li dostupné.

8. Tuto zkušební metodu lze použít pro chemické látky rozpustné nebo nerozpustné ve vodě. Způsob aplikace zkoušené chemické látky se však bude odpovídajícím způsobem lišit. Tuto zkušební metodu nelze použít pro těkavé chemické látky, tj. chemické látky, u nichž Henryho konstanta nebo rozdělovací koeficient vzduch-voda je větší než jedna, nebo chemické látky, u nichž tlak par je vyšší než 0,0133 Pa při 25 °C.

VALIDITA ZKOUŠKY

9. Aby mohly být výsledky zkoušky uznány za platné, měla by být v neexponovaných kontrolních skupinách splněna tato kritéria:

— střední mortalita dospělých jedinců na konci zkoušky by neměla přesahovat 20 %;

— střední počet nedospělých jedinců na konci zkoušky by měl být minimálně 100 v každé nádobě;

— variační koeficient vypočtený pro počet nedospělých jedinců na konci hlavní zkoušky by měl být menší než 30 %.

REFERENČNÍ CHEMICKÁ LÁTKA

10. Referenční chemická látka by měla být zkoušena při její koncentraci EC_{50} pro zvolený druh zkušební půdy buď v pravidelných intervalech, nebo se může zařadit do každého provedení zkoušky, s cílem ověřit, že reakce pokusných organismů ve zkušebním systému jsou v mezích normy. Vhodnou referenční chemickou látkou je kyselina boritá, která by měla snížit reprodukci o 50 % (10)(11) při dávce přibližně 100 mg/kg půdy v suchém stavu pro oba druhy.

POPIS ZKOUŠKY

Zkušební nádoby a zařízení

11. Jako zkušební nádoby je vhodné použít nádoby schopné pojmout 30 g vlhké půdy. Měly by být buď skleněné, nebo z inertního plastu (netoxického). Pokud se však expozice zkoušené chemické látce v důsledku sorpce snižuje, plastové nádoby by používány být neměly. Zkušební nádoby by měly mít

▼M6

průřezovou plochu umožňující dosáhnout v nich skutečné hloubky půdy 2–4 cm. Nádoby by měly mít víčka (např. skleněná nebo polyethylenová), konstruovaná tak, aby se snížilo vypařování vody a současně byla umožněna výměna plynů mezi půdou a ovzduším. Nádoba by měla být alespoň částečně průhledná, aby propouštěla světlo.

12. Vyžaduje se běžné laboratorní zařízení, a sice:

— sušárna,

— stereomikroskop,

— pH-metr, měřič osvětlení,

— vhodné přesné váhy,

— odpovídající zařízení pro řízení teploty,

— odpovídající zařízení pro řízení vlhkosti vzduchu (není nutné, pokud jsou expoziční nádoby zakryty víčkem),

— inkubátor nebo malá místnost s řízenou teplotou,

— pinzeta nebo odsávačka s nízkým výkonem.

Příprava zkušební půdy

13. Používá se upravená umělá půda (8) s obsahem organických látek 5 %. Alternativně lze použít přírodní půdu, jelikož umělá půda se nepodobá přírodním půdám. Doporučuje se toto složení umělé půdy (na základě hmotností v suchém stavu, složky vysušené na konstantní hmotnost při 105 °C):

— 5 % sfagnové rašeliny, vysušené vzduchem a jemně rozemleté (přijatelná je velikost částic 2 ± 1 mm),

— 20 % kaolinitického jílu (obsah kaolinitu pokud možno vyšší než 30 %),

— asi 74 % průmyslového písku, vysušeného vzduchem (k dosažení potřebného množství $CaCO_3$), pokud možno jemného písku s více než 50 % částic mezi 50 a 200 mikrony. Přesné množství písku závisí na množství $CaCO_3$ (viz níže), celkem by mělo tvořit do 75 %,

— 1,0 % uhličitanu vápenatého ($CaCO_3$, práškového, čistoty p.a.) pro získání pH 6,0 ± 0,5; množství uhličitanu vápenatého, které se má přidat, může záviset především na kvalitě/povaze rašeliny (viz poznámka 1).

Poznámka 1: Požadované množství $CaCO_3$ bude záviset na složkách půdního substrátu a mělo by být stanoveno změřením pH dílčích vzorků preinkubované vlhké půdy bezprostředně před zkouškou.

Poznámka 2: Doporučuje se změřit pH a volitelně poměr C/N, kationtovou výměnnou kapacitu (CEC) a obsah organických látek v půdě, což umožní její pozdější normalizaci a lepší interpretaci výsledků.

Poznámka 3: V případě potřeby, například pro specifické zkušební účely, mohou jako zkušební a/nebo kultivační substrát posloužit přírodní půdy z neznečištěných lokalit. Avšak je-li použita přírodní půda, je nutno ji charakterizovat přinejmenším z hlediska jejího původu (místa odběru), pH, půdní struktury (distribuce velikosti částic), CEC (kationtové výměnné kapacity) a obsahu organických látek a neměla by být nijak kontaminovaná. U přírodní půdy se doporučuje před použitím půdy v hlavní zkoušce prokázat její vhodnost pro tuto zkoušku a pro dosažení kritérií platnosti zkoušky.

▼M6

14. Suché složky půdy se důkladně promíchají (např. ve velké laboratorní míchačce). V souladu s postupy popsanými v dodatku 5 se určí maximální vodní kapacita (RVK) umělé půdy. Vlhkost zkušební půdy by měla být optimalizována tak, aby se dosáhlo volné pórovitě struktury půdy umožňující vstup chvostoskoků do pórů. Je to obvykle mezi 40–60 % maximální RVK.

15. Suchá umělá půda se předem zvlhčí přidáním dostatečného množství deionizované vody, aby bylo dosaženo přibližně poloviny konečného obsahu vody 2–7 dní před začátkem zkoušky, s cílem vyrovnat/stabilizovat kyselost. Pro určení pH se použije směs půdy a roztoku 1 M chloridu draselného (KCl) nebo 0,01 M chloridu vápenatého ($CaCl_2$) v poměru 1:5 (podle dodatku 6). Je-li půda kyselejší než požadované rozmezí, lze ji upravit přidáním vhodného množství $CaCO_3$. Je-li půda příliš alkalická, lze ji upravit přidáním anorganické kyseliny neškodné pro chvostoskoky.

16. Navlhčená půda se rozdělí na části odpovídající počtu zkušebních koncentrací (a případně referenční chemické látky) a kontrol, které budou při zkoušce použity. Přidají se zkoušené chemické látky a obsah vody se reguluje podle odstavce 24.

Výběr a příprava pokusných organismů

17. Doporučeným druhem je *F. candida*, jelikož při okružním testu zkušební metody (11) tento druh splnil kritéria platnosti pro přežití častěji než *F. fimetaria*. Je-li použit alternativní druh, měl by splňovat kritéria platnosti uvedená v odstavci 9. Na začátku zkoušky by organismy měly být dobře vykrmeny a ve věku 23–26 dnů pro *F. fimetaria* a 9–12 dnů pro *F. candida*. Do každého opakování by mělo být zařazeno 10 samečků a 10 samiček *F. fimetaria*, v případě *F. candida* se použije 10 samiček (viz dodatek 2 a dodatek 3). Z misek se náhodně vyjmou synchronizovaní chvostoskoci a u každé sady zařazené do jednotlivých opakování se zkontroluje zdravotní a fyzický stav chvostoskoků. Každá skupina složená z 10/20 jedinců se vloží do náhodně zvolené zkušební nádoby; u *F. fimetaria* se vyberou velké samičky, aby se zajistilo náležité odlišení od samečků.

Příprava zkušebních koncentrací

18. Zkoušenou chemickou látku je možné aplikovat čtyřmi způsoby: 1) smísit zkoušenou chemickou látku s půdou, přičemž nosičem bude voda, 2) smísit zkoušenou chemickou látku s půdou, přičemž nosičem bude organické rozpouštědlo, 3) smísit zkoušenou chemickou látku s půdou, přičemž nosičem bude písek, nebo 4) aplikovat zkoušenou chemickou látku na povrch půdy. Výběr vhodné metody závisí na charakteristice chemické látky a na účelu zkoušky. Obecně se doporučuje smísení zkoušené chemické látky s půdou. Mohou být však vyžadovány aplikační postupy, které odpovídají praktickému využití zkoušené chemické látky (např. nastříkání látky v kapalném stavu nebo použití zvláštních pesticidních přípravků, např. v granulích nebo jako mořená semena). Půda se exponuje před umístěním chvostoskoků, kromě případů, kdy se zkoušená chemická látka nanáší na povrch půdy a chvostoskoky je třeba vložit do půdy ještě předtím.

Zkoušená chemická látka rozpustná ve vodě

19. Připraví se roztok zkoušené chemické látky v deionizované vodě v množství dostatečném pro všechna opakování s jednou zkušební koncentrací. Každý roztok zkoušené chemické látky se před zavedením do zkušební nádoby pečlivě smísí s jednou sadou navlhčené půdy.

Zkoušená chemická látka nerozpustná ve vodě

20. V případě chemických látek nerozpustných ve vodě, ale rozpustných v organických rozpouštědlech lze chemickou látku rozpustit v co nejmenším objemu příslušného rozpouštědla (např. acetonu), které ještě zajišťuje řádné smísení chemické látky s půdou a její smísení s částí požadovaného křemenného písku. Je třeba používat pouze těkavá rozpouštědla. Použije-li se organické rozpouštědlo, všechny zkušební koncentrace a doplňková negativní

▼M6

kontrola rozpouštědla by měly obsahovat stejné minimální množství rozpouštědla. Aplikační nádoby by měly být ponechány po určitou dobu neuzavřeny, aby se umožnilo vypaření rozpouštědla použitého k aplikaci zkoušené chemické látky, a musí se zajistit, aby v této době nedošlo k rozptylu toxické chemické látky.

Zkušební chemická látka špatně rozpustná ve vodě a organických rozpouštědlech

21. V případě chemických látek, které jsou špatně rozpustné ve vodě a organických rozpouštědlech, se křemenný písek, který by měl být součástí celkového písku přidaného do půdy, smísí s množstvím zkoušené chemické látky, aby se dosáhlo žádoucí zkušební koncentrace. Tato směs křemenného písku a zkoušené chemické látky se přidá do navlhčené půdy a důkladně se promísí s příslušným množstvím deionizované vody, aby bylo dosaženo požadované vlhkosti. Konečná směs se rozdělí do zkušebních nádob. Tento postup se opakuje pro každou zkušební koncentraci a připraví se rovněž příslušná kontrola.

Aplikace zkoušené chemické látky na povrch půdy

22. Je-li zkoušenou chemickou látkou pesticid, může být vhodné jej aplikovat na povrch půdy nástřikem. Půda se exponuje poté, co jsou do ní umístěni chvostoskoci. Zkušební nádoby se nejdříve naplní navlhčeným půdním substrátem, vloží se organismy a zkušební nádržky se poté zváží. Aby se zabránilo přímé expozici organismů zkoušené chemické látce přímým kontaktem, aplikuje se zkoušená chemická látka nejdříve půl hodiny po zavedení chvostoskoků. Zkoušená chemická látka by se měla aplikovat na povrch půdy pokud možno rovnoměrně rozprašovačem a za použití laboratorních vah, s cílem simulovat aplikaci postřikem na poli. Aplikace by měla být provedena v teplotním rozmezí ± 2 °C a v případě vodních roztoků, emulzí nebo disperzí s dávkováním vody podle doporučení obsažených v posouzení rizik. Dávkování je třeba ověřit pomocí vhodné kalibrační techniky. Zvláštní formy jako granule nebo mořená semena lze aplikovat způsobem odpovídajícím jejich použití v zemědělství. Potrava se podává po nástřiku.

POSTUP

Zkušební podmínky

23. Střední zkušební teplota by měla být 20 ± 1 °C s teplotním rozmezím 20 ± 2 °C. Zkouška se provádí v řízených cyklech světlo-tma (pokud možno 12 hodin světla a 12 hodin tmy) s osvětlením 400 až 800 luxů v oblasti zkušebních nádob.

24. Aby bylo možné kontrolovat vlhkost půdy, nádobky se začátku, uprostřed a na konci zkoušky zváží. Ztráta hmotnosti > 2 % se nahradí přidáním deionizované vody. Je třeba podotknout, že ztrátu hmotnosti vody lze snížit udržováním vysoké vlhkosti vzduchu (> 80 %) ve zkušebním inkubátoru.

25. Na začátku a na konci zkoušky ke stanovení rozsahu i hlavní zkoušky je třeba změřit pH. Měření se provede také v jednom dodatečném kontrolním vzorku a jednom dodatečném vzorku s upravenou půdou (pro každou koncentraci), připravených a uchovávaných stejným způsobem jako zkušební kultury, avšak bez přítomnosti chvostoskoků.

Zkušební postup a měření

26. Pro každou koncentraci se do zkušební nádoby vloží množství zkušební půdy odpovídající 30 g čerstvé hmotnosti. Připraví se rovněž kontrolní vzorky bez zkoušené chemické látky. Aplikuje-li se zkoušená chemická látka pomocí vehikula, je třeba kromě zkušebních sérií provést také jednu

▼M6

řadu kontrol pouze s vehikulem. Koncentrace rozpouštědla nebo dispergátoru má být stejná jako jejich koncentrace použitá ve zkušebních nádobách se zkoušenou chemickou látkou.

27. Jednotliví chvostoskoci se pečlivě přemístí do každé zkušební nádoby (do zkušebních nádob se přidělí náhodným výběrem) a umístí se na povrch půdy. Pro účinné přemístění organismů lze použít odsávačku s nízkým výkonem. Počet opakování pro zkušební koncentrace a kontroly závisí na použitém uspořádání zkoušky. Zkušební nádoby se do zkušebního inkubátoru umístí náhodně a jejich poloha se každý týden náhodně mění.

28. Pro zkoušku s *F. fimetaria* by mělo být použito 20 dospělých jedinců, 10 samečků a 10 samiček ve věku 23–26 dnů v každé zkušební nádobě. V den 21 se chvostoskoci vyjmou z půdy a spočítají se. U *F. fimetaria* se pohlaví rozliší podle velikosti v synchronizované sadě chvostoskoků, která je ve zkoušce použita. Samičky jsou výrazně větší než samečci (viz dodatek 3).

29. Pro zkoušku s *F. candida* by mělo být použito 10 nedospělých jedinců ve věku 9–12 dnů v každé zkušební nádobě. V den 28 se chvostoskoci vyjmou z půdy a spočítají se.

30. Jako vhodný zdroj potravy se na začátku zkoušky a poté po přibližně dvou týdnech do každé nádoby přidá dostatečné množství, např. 2–10 mg, granulovaných sušených pekařských kvasnic, komerčně dostupných pro použití v domácnostech.

31. Na konci zkoušky se vyhodnotí mortalita a reprodukce. Chvostoskoci se po 3 týdnech (*F. fimetaria*) nebo po 4 týdnech (*F. candida*) vyjmou ze zkušební půdy (viz dodatek 4) a spočítají se (12). Nejsou-li v extraktu nalezeni chvostoskoci, považují se za mrtvé. Metodu extrakce a počítání je třeba validovat. Validací se ověřuje účinnost extrakce nedospělých jedinců větší než 95 %, např. vložením jejich známého počtu do půdy.

32. Praktické shrnutí a časový rozvrh zkušebního postupu jsou popsány v dodatku 2.

Uspořádání zkoušky

Zkouška pro stanovení rozmezí dávek

33. Je-li to nezbytné, provede se zkouška pro stanovení rozmezí dávek například s pěti koncentracemi zkoušené chemické látky ve výši 0,1, 1,0, 10, 100 a 1 000 mg/kg suché hmotnosti půdy a s dvěma opakováními každé expozice a kontroly. Při rozhodování o rozmezí koncentrací, které ve zkoušce ke stanovení rozsahu mají být použity, mohou být užitečné i další informace o mortalitě nebo reprodukci chvostoskoků, získané při zkouškách s obdobnými chemickými látkami nebo z literatury.

34. Zkouška pro stanovení rozmezí dávek trvá pro *F. fimetaria* 2 týdny a pro *F. candida* 3 týdny, aby bylo zajištěno vylíhnutí jedné generace nedospělých jedinců. Na konci zkoušky se vyhodnotí mortalita a reprodukce chvostoskoků. Počet dospělých a výskyt nedospělých jedinců je třeba zaznamenat.

Hlavní zkouška

35. K určení EC_x (např. EC_{10}, EC_{50}) by mělo být zkoušeno dvanáct koncentrací. Doporučují se alespoň dvě opakování expozice každé zkušební koncentraci a šest opakování kontroly. Faktor odstupňování koncentrací může být různý v závislosti na vztahu mezi dávkou a odezvou.

▼M6

36. K určení NOEC/LOEC je třeba zkoušet alespoň pět koncentrací v geometrické řadě. Doporučují se čtyři opakování expozice v každé zkušební koncentraci a osm kontrolních skupin. Koncentrace by měly být odstupňovány podle faktoru, který nebude vyšší než 1,8.

37. K určení NOEC/LOEC i EC_x se dospěje kombinovanou metodou. Při této kombinované metodě je třeba použít osm expozičních koncentrací v geometrické řadě. Doporučují se čtyři opakování každé expozice a osm kontrolních skupin. Koncentrace by měly být odstupňovány podle faktoru, který nebude vyšší než 1,8.

38. Nejsou-li při zkoušce ke stanovení rozsahu zaznamenány žádné účinky při nejvyšší koncentraci (tj. 1 000 mg/kg), je možné zkoušku toxicity pro reprodukci provést jako limitní zkoušku s použitím zkušební koncentrace 1 000 mg/kg a kontroly. Limitní zkouška umožní prokázat, že při limitní koncentraci neexistuje žádný statisticky významný účinek. Mělo by se provést osm opakování s exponovanou půdou a osm s kontrolou.

ÚDAJE A JEJICH PŘEDKLÁDÁNÍ

Zpracování výsledků

39. Hlavním ukazatelem je reprodukční schopnost (např. počet nedospělých jedinců vylíhnutých v jedné zkušební nádobce). Při statistické analýze, provedené např. pomocí postupů analýzy rozptylu (ANOVA), se expozice porovnají Studentovým t-testem, Dunnettovým testem nebo Williamsovým testem. Pro střední hodnoty jednotlivých koncentrací se vypočtou 95 % intervaly spolehlivosti.

40. Počet přeživších dospělých jedinců v neexponovaných kontrolních skupinách je důležitým kritériem platnosti zkoušky a je třeba jej zdokumentovat. Stejně jako při zkoušce pro stanovení rozsahu dávek je třeba také v závěrečné zprávě uvést i všechny ostatní škodlivé příznaky.

LC_x a EC_x

41. Hodnoty EC_x včetně s nimi souvisejících nižších a vyšších hladin 95 % intervalu spolehlivosti tohoto parametru se vypočítají vhodnou statistickou metodou (např. pomocí logistické neboli Weibullovy funkce, zkrácenou Spearman-Karberovou metodou nebo prostou interpolací). EC_x získáme tak, že se do příslušné rovnice vloží hodnoty odpovídající x % střední hodnoty kontrolní skupiny. Pro výpočet EC_{50} nebo kterékoli jiné hodnoty EC_x se úplný soubor údajů podrobí regresní analýze. LC_{50} se obvykle odhadne pomocí probitové analýzy nebo obdobné analýzy, která zohlední binomicky rozdělené údaje o mortalitě.

NOEC/LOEC

42. Má-li statistická analýza určit NOEC/LOEC, jsou k tomu nezbytné statistické údaje o každé nádobě (jednotlivé nádoby se považují za opakování). Měly by být použity vhodné statistické metody podle dokumentu OECD č. 54 o současných přístupech ke statistické analýze dat týkajících se ekotoxicity: pokyny pro aplikaci (9). Nepříznivé účinky zkoušené chemické látky v porovnání s kontrolou se zpravidla zkoumají jednostranným testováním hypotéz při $p \leq 0,05$.

43. Normalitu rozdělení a homogenitu rozptylu lze prověřit vhodným statistickým testem, např. Shapiro-Wilkovým testem, případně Leveneovým testem ($p \leq 0,05$). Je možné provést jednocestnou analýzu rozptylu (ANOVA) a následné mnohonásobné srovnávací testy. Pro výpočet, zda existují významné rozdíly ($p \leq 0,05$) mezi kontrolními skupinami a různými

▼M6

koncentracemi zkoušené chemické látky, je možné použít mnohonásobné srovnávání (např. Dunnettův test) nebo testy sestupného trendu (např. Williamsův test) (výběr doporučeného testu se provede podle dokumentu OECD č. 54 (9)). Nebo lze k určení NOEC a LOEC použít neparametrické metody (např. Bonferroniho U-test podle Holma nebo zkouška trendu Jonckheere-Terpstra).

Limitní zkouška

44. Byla-li provedena limitní zkouška (porovnání kontrolní skupiny a pouze jedné exponované skupiny) a jsou-li splněny podmínky pro parametrické zkušební postupy (normalita rozdělení, homogenita rozptylu), je možné hodnotit spojité proměnné pomocí Studentova testu (t-testu). Pokud tyto požadavky splněny nejsou, lze použít t-test nestejných rozptylů (Welchův t-test) nebo neparametrický test, např. Mannův-Whitneyův U-test.

45. Pro určení významných rozdílů mezi kontrolními skupinami (kontrolní a kontrolní s rozpouštědlem) je možné každou kontrolní skupinu podrobit opakovaným zkouškám, jak bylo popsáno u limitní zkoušky. Pokud tyto zkoušky neodhalí významné rozdíly, údaje ze všech opakování s kontrolou a kontrolou s rozpouštědlem je možné sloučit. V opačném případě by všechny expozice měly být porovnány s kontrolou s rozpouštědlem.

Závěrečná zpráva

46. Závěrečná zpráva by měla obsahovat minimálně tyto údaje:

Zkoušená látka

— identifikace zkoušené chemické látky, sada, šarže a číslo CAS, čistota,

— fyzikálně-chemické vlastnosti zkoušené chemické látky (např. log K_{ow}, rozpustnost ve vodě, tlak par, Henryho konstanta (H) a pokud možno informace o osudu zkoušené chemické látky v půdě), jsou-li dostupné,

— složení zkoušené chemické látky, a pokud se nejedná o čistou chemickou látku, je třeba uvést příměsi.

Pokusné organismy

— identifikace druhů a dodavatele pokusných organismů, popis podmínek chovu a věkové rozpětí pokusných organismů.

Zkušební podmínky

— popis uspořádání zkoušky a jejích postupů,

— podrobnosti o přípravě zkušební půdy; byla-li použita přírodní půda, její podrobná specifikace (původ, historie, distribuce velikosti částic, pH, obsah organických látek),

— retenční vodní kapacita půdy,

— popis techniky použité při aplikaci zkoušené chemické látky na půdu,

— zkušební podmínky: intenzita osvětlení, doba trvání cyklů světlo-tma, teplota,

— popis režimu krmení, typ a množství krmiva použitého při zkoušce, data krmení,

— pH půdy a obsah vody v půdě na začátku a na konci zkoušky (pro kontrolní skupinu a každou expozici),

— podrobný popis metody extrakce a účinnost extrakce.

▼**M6**

Výsledky zkoušek

— počet nedospělých jedinců zjištěných v každé zkušební nádobě na konci zkoušky,

— počet dospělých jedinců a jejich mortalita (v %) v každé zkušební nádobě na konci zkoušky,

— popis zjevných fyziologických nebo patologických symptomů nebo výrazných změn v chování,

— výsledky dosažené s referenční zkoušenou chemickou látkou,

— hodnoty NOEL/LOEC, LC_x pro mortalitu a EC_x pro reprodukci (hlavně LC_{50}, LC_{10}, EC_{50} a EC_{10}) spolu s 95 % intervaly spolehlivosti, graf proloženého modelu použitého pro výpočet, jeho funkční rovnice a jeho parametry (viz (9)),

— veškeré informace a pozorování užitečné pro interpretaci výsledků,

— síla statistického testu, provádí-li se testování hypotéz (9),

— odchylky od postupů popsaných v této zkušební metodě a jakékoli neobvyklé události během zkoušky,

— validita zkoušky,

— minimální zjistitelný rozdíl NOEC, byla-li hodnota NOEC odhadnuta.

LITERATURA

1) Wiles, J. A. and Krogh, P. H. (1998) Testing with the collembolans I. viridis, F. candida and F. fimetaria. In Handbook of soil invertebrate toxicity tests (ed. H Løkke and CAM Van Gestel), pp. 131–156. John Wiley & Sons, Ltd., Chichester.

2) ISO (1999) Soil Quality – Effects of soil pollutants on Collembola (Folsomia candida): Method for determination of effects on reproduction. No. 11267. International Organisation for Standardisation, Geneve.

3) Burges, A. and Raw, F. (Eds.) (1967) Soil Biology. Academic Press. London.

4) Petersen H and Luxton M (1982) A comparative analysis of soil fauna populations and their role in decomposition processes. Oikos 39: 287–388.

5) Petersen, H. (1994) A review of collembolan ecology in ecosystem context. Acta Zoologica Fennica 195: 111–118.

6) Hopkin, S. P. (1997). Biology of the Springtails (Insecta: Collembola). Oxford University Press. pp. 330 (ISBN 0-19-854084-1).

7) Ulber, B. (1983) Einfluss von Onychirurus fimatus Gisin (Collembola, Onychiuridae) und Folsomia fimetaria L. (Collembola, Isotomidae) auf Pythium ultimum Trow. einen Erreger des Wurzelbrandes der Zuckerrübe. In New trends in soil Biology (Lebrun Ph, André HM, De Medts A, Grégoire-Wibo, Wauthy G (Eds.), Proceedings of the VI. international colloquium on soil zoology, Louvain-la-neuve (Belgium), 30 August – 2 September 1982, I Dieu-Brichart, Ottignies-Louvain-la-Neuve, pp. 261–268.

8) Kapitola C.36 této přílohy, Zkouška toxicity pro reprodukci dravých roztočů (Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer) v půdě.

9) OECD (2006), Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: a guidance to application. OECD series on testing and assessment Number 54, ENV/JM/MONO(2006)18, OECD Paris.

10) Scott-Fordsmand, J. J. and Krogh, P. H. (2005) Background report on prevalidation of an OECD springtail test guideline. Environmental Project Nr. 986. Miljøstyrelsen pp. 61. Danish Ministry for the Environment.

▼**M6**

11) Krogh, P. H., 2009. Toxicity testing with the collembolans Folsomia fimetaria and Folsomia candida and the results of a ringtest. Danish Environmental Protection Agency, Environmental Project No. 1256, pp. 66.

12) Krogh, P. H., Johansen, K. and Holmstrup, M. (1998) Automatic counting of collembolans for laboratory experiments. Appl. Soil Ecol. 7, pp. 201–205.

13) Fjellberg, A. (1980) Identification keys to Norwegian collembolans. Norsk Entomologisk Forening.

14) Edwards, C. A. (1955) Simple techniques for rearing Collembola, Symphyla and other small soil inhabiting arthropods. In Soil Zoology (Kevan D.K. McE., Ed.). Butterworths, London, pp. 412–416.

15) Goto, H. E. (1960) Simple techniques for the rearing of Collembola and a not on the use of a fungistatic substance in the cultures. Entomologists' Monthly Magazine 96: pp. 138–140.

▼M6

Dodatek 1

Definice

Pro tuto zkušební metodu jsou použitelné následující definice (v této zkoušce se všechny koncentrace vyvolávající účinek vyjádří v hmotnosti zkoušené chemické látky vztažené na jednotku suché hmotnosti zkušební půdy).

Chemická látka: látka nebo směs.

NOEC (No Observed Effect Concentration) je zkratkou pro koncentraci bez pozorovaných účinků, což je koncentrace zkoušené chemické látky, při níž není pozorován žádný účinek. V této zkoušce koncentrace odpovídající hodnotě NOEC nemá pro danou expoziční dobu žádný statisticky významný účinek (na hladině spolehlivosti $p < 0,05$) ve srovnání s kontrolami.

LOEC (Lowest Observed Effect Concentration) je zkratkou pro nejnižší koncentraci s pozorovanými účinky, což je nejnižší koncentrace zkoušené chemické látky, která má pro danou expoziční dobu statisticky významný účinek (na hladině spolehlivosti $p < 0,05$) ve srovnání s kontrolami.

EC_x (Effect Concentration for x % effect) je koncentrace, která pro danou expoziční dobu vyvolává x % účinek na zkušební organismy ve srovnání s kontrolami. Například EC_{50} je koncentrace odhadnutá pro vyvolání účinku na zkoušený ukazatel u 50 % exponované populace za stanovenou expoziční dobu.

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

▼M6

Dodatek 2

Hlavní úkony a časový harmonogram pro provedení zkoušky s chvostoskoky

Kroky zkoušky lze shrnout takto:

Čas (dny)	Úkon
– 23 až – 26	Připravit synchronizovanou kulturu *F. fimetaria*
– 14	Připravit umělou půdu (smícháním suchých složek) Zkontrolovat pH umělé půdy a odpovídajícím způsobem upravit Změřit maximální vodní kapacitu půdy
– 9 až – 12	Připravit synchronizovanou kulturu *F. candida*
– 2 až – 7–	Navlhčit půdu
– 1	Rozdělit nedospělé jedince do sad Připravit zásobní roztoky a smísit je se zkoušenou chemickou látkou, je-li požadován roztok
0	Připravit zásobní roztoky a smísit je se zkoušenou chemickou látkou, je-li požadována aplikace pevné chemické látky rozpustné ve vodě nebo povrchová aplikace Změřit pH půdy a zvážit nádržky Dodat potravu. Vložit chvostoskoky.
14	Zkouška ke stanovení rozsahu pro *F. fimetaria*: ukončit zkoušku, vyjmout chvostoskoky, změřit pH půdy a ztrátu vody (zvážením) Hlavní zkoušky: změřit vlhkost, doplnit vodu a přidat 2–10 mg kvasnic
21	Hlavní zkouška s *F. fimetaria*: ukončit zkoušku, vyjmout chvostoskoky, změřit pH půdy a ztrátu vody (zvážením) Zkouška ke stanovení rozsahu pro *F. candida*: ukončit zkoušku, vyjmout chvostoskoky, změřit pH půdy a ztrátu vody (zvážením)
28	Hlavní zkouška s *F. candida*: ukončit zkoušku, vyjmout chvostoskoky, změřit pH půdy a ztrátu vody (zvážením)

▼M6

Dodatek 3

Pokyny pro odchov a synchronizaci *F. fimetaria* a *F. candida*

Časy a doby trvání uvedené v těchto pokynech je třeba pro každý konkrétní kmen chvostoskoků ověřit, aby se zajistilo, že načasování umožní získat dostatečně synchronizované nedospělé jedince. Výskyt kladení vajíček poté, co byly dospělé organismy přemístěny do čerstvého substrátu, a vylíhnutí z vajíček v zásadě určují vhodný den pro odběr vajíček a odběr synchronizovaných nedospělých chvostoskoků.

Doporučuje se mít neustále k dispozici kmenovou kulturu sestávající např. z 50 nádržek / Petriho misek. Tuto kmenovou kulturu je třeba udržovat v dobrých životních podmínkách s podáváním potravy, vody a odstraňováním zbývajících částí mrtvých těl jednou týdně. Příliš malý počet chvostoskoků v substrátu může vést k inhibici v důsledku většího růstu plísní. Je-li kmenová kultura používána k produkci vajíček příliš často, může se vyčerpat. Příznaky vyčerpání jsou mrtví dospělí jedinci a plíseň na substrátu. Zbylá vajíčka pocházející ze synchronizovaných chvostoskoků je možné použít na omlazení kultury.

V synchronizované kultuře *F. fimetaria* se samečci odlišují od samiček především velikostí. Samečci jsou jasně menší a pohybují se rychleji než samičky. Správný výběr pohlaví nevyžaduje velkou praxi a je možné ho potvrdit mikroskopickým ohledáním oblasti genitálií (13).

1. **Odchov**

1.a. *Příprava kultivačního substrátu*

Kultivačním substrátem je pálená sádra (síran vápenatý) s aktivovaným aktivním uhlím. To poskytuje vlhký substrát, přičemž funkcí aktivního uhlí je absorbovat odpadní plyny a exkreta (14)(15). K usnadnění pozorování chvostoskoků lze použít různé formy aktivního uhlí. Např. v případě *F. candida* a *F. fimetaria* se používá práškové aktivní uhlí (čímž se získá pálená sádra černé/šedé barvy):

Složky substrátu:

— 20 ml aktivovaného aktivního uhlí

— 200 ml destilované vody

— 200 ml pálené sádry

nebo

— 50 g aktivovaného aktivního uhlí v prášku

— 260–300 ml destilované vody

— 400 g pálené sádry

Směs substrátu se před použitím nechá usadit.

1.b. *Chov*

Chvostoskoci jsou drženi v nádržkách, např. v Petriho miskách (90 mm × 13 mm) s dnem pokrytým 0,5 cm vrstvou substrátu složeného ze sádry a aktivního uhlí. Kultivují se při teplotě 20 ± 1 °C a cyklu 12 hodin světla a 12 hodin tmy (s osvětlením 400–800 luxů). Nádržky se udržují vždy vlhké, aby se zajistila 100 % relativní vlhkost vzduchu v nádržkách. To lze zaručit přítomností volné vody v porézní sádře, je však třeba se vyvarovat vytvoření vodní vrstvy na povrchu sádry. Ztrátě vody lze předejít

▼M6

zajištěním vlhkého okolního vzduchu. Z nádržek je nutné odstranit všechny mrtvé jedince, a stejně tak veškerou potravu napadenou plísní. Aby se stimulovala produkce vajíček, je nezbytné přemístit dospělé chvostoskoky do Petriho misek s nově připraveným substrátem z pálené sádry a aktivního uhlí.

1.c. *Zdroj potravy*

Jako jediné krmivo pro *F. candida* a *F. fimetaria* se používají sušené pekařské kvasnice v granulích. Čerstvé krmivo se podává jednou nebo dvakrát týdně, aby nedocházelo k plesnivění. Klade se v malé hromádce přímo na pálenou sádru. Hmotnost přidaných pekařských kvasnic je třeba upravit podle velikosti populace chvostoskoků, ale zpravidla postačí 2–15 mg.

2. **Synchronizace**

Zkouška by se měla provádět se synchronizovanými chvostoskoky, aby se dosáhlo homogenních zkušebních organismů stejného instaru a stejné velikosti. Synchronizace dále umožňuje rozlišovat mezi samečky a samičkami *F. fimetaria* ve věku od 3 týdnů výše na základě pohlavního dimorfismu, tj. rozdílné velikosti. Níže je uveden doporučený postup, jak získat synchronizované jedince (praktické kroky jsou volitelné):

2.a. *Synchronizace*

— Připravte nádržky s 0,5 cm vrstvou substrátu složeného z pálené sádry a aktivního uhlí.

— Pro kladení vajíček přemístěte 150–200 dospělých *F. fimetaria* a 50–100 *F. candida* z nejlepších 15–20 nádržek s kmenovou kulturou se substrátem starým 4–8 týdnů do nádržek a podejte jim krmivo – 15 mg pekařských kvasnic. Dbejte na to, aby se nedospělí jedinci nesmíchali s dospělými, neboť přítomnost nedospělých chvostoskoků může inhibovat produkci vajíček.

— Při kultivaci udržujte teplotu 20 ± 1 °C (střední hodnota by měla být 20 °C), cyklus 12 hodin světla a 12 hodin tmy (s osvětlením 400–800 luxů). Zabezpečte přísun čerstvé potravy a nasycenost vzduchu vodou. Nedostatek potravy může vést k tomu, že chvostoskoci budou defekovat na vajíčka s následným růstem plísní na vajíčkách, nebo *F. candida* mohou pojídat svá vlastní vajíčka. Po 10 dnech se vajíčka pečlivě odeberou jehlou a stěrkou a přemístí na „vajíčkový papír“ (malé kousky filtračního papíru namočené do suspenze pálené sádry / aktivního uhlí), který se vloží do nádržky s čerstvým substrátem ze sádry a aktivního uhlí. Do substrátu se přidá několik zrnek kvasnic, aby upoutaly pozornost nedospělých chvostoskoků a přiměly je filtrační papír opustit. Je důležité, aby filtrační papír i substrát byly vlhké, jinak vajíčka vyschnou. Alternativně mohou být dospělí jedinci po nakladení vajíček na 2 nebo 3 dny ze synchronizovaných kultivačních schránek vyjmuti.

— Po 3 dnech se z většiny vajíček na filtračním papíru vylíhnou mláďata a pod filtračním papírem bude možné nalézt několik nedospělých jedinců.

— Abychom získali stejně staré nedospělé chvostoskoky, filtrační papír s nevylíhnutými vajíčky se z Petriho misky pinzetou odstraní. Nedospělí chvostoskoci, nyní ve věku 0–3 dnů, v misce zůstanou a nakrmí se pekařskými kvasnicemi. Nevylíhnutá vejce se vyřadí.

— Vajíčka a vylíhnutí nedospělí jedinci se kultivují stejným způsobem jako dospělí. Zejména pro *F. fimetaria* je třeba přijmout tato opatření: zabezpečí se dostatek čerstvé potravy, stará plesnivějící potrava se odstraní a po 1 týdnu se nedospělí jedinci, pokud je jejich hustota vyšší než 200, rozdělí do nových Petriho misek.

▼M6

2.b. *Manipulace s chvostoskoky na začátku zkoušky*

— *F. candida* ve věku 9–12 dnů nebo *F. fimetaria* ve věku 23–26 dnů se odeberou, např. odsátím, a vypustí do malé nádržky s vlhkým substrátem složeným ze sádry a aktivního uhlí a jejich fyzický stav se ověří pod binokulárním mikroskopem (zranění a poškození jedinci se vyřadí). Při všech krocích je třeba udržovat chvostoskoky ve vlhkém prostředí, např. pomocí navlhčených povrchů apod., aby se zabránilo stresu ze sucha.

— Otočte nádržku dnem vzhůru a poklepejte na ni, aby se chvostoskoci přemístili do půdy. Je třeba neutralizovat statickou elektřinu, jinak by chvostoskoci mohli pouze vyletět do vzduchu nebo se přitisknout ke stěně zkušební nádržky a vyschnout. Pro neutralizaci je možné použít ionizátor nebo podložit nádržku kusem vlhké látky.

— Potravu je třeba rozprostřít po celém povrchu půdy a nepodávat ji pouze v jedné hrudce.

— Při přepravě a v době zkoušky by se nemělo klepat na zkušební nádržky nebo s nimi jinak rušivě manipulovat, protože to může zvýšit kompaktnost půdy a narušit interakci mezi chvostoskoky.

3. **Alternativní druhy chvostoskoků**

Pro zkoušení podle této zkušební metody je možné zvolit i jiné druhy chvostoskoků, např. *Proisotoma minuta*, *Isotoma viridis*, *Isotoma anglicana*, *Orchesella cincta*, *Sinella curviseta, Paronychiurus kimi*, *Orthonychiurus folsomi*, *Mesaphorura macrochaeta*. Před použitím alternativních druhů by měly být splněny určité podmínky:

— druhy by měly být jednoznačně identifikovány,

— výběr daného druhu by měl být odůvodněn,

— mělo by se zajistit, aby do zkušební fáze byla zahrnuta reprodukční biologie, takže bude potenciálním cílem během expozice,

— měly by být známy informace o vývoji: věk při dosažení zralosti, doba trvání vývoje vajíček a instary podléhající expozici,

— zkušební substrát a podávání potravy by měly zajistit optimální podmínky pro růst a rozmnožování,

— variabilita by měla být dostatečně nízká pro dosažení precizního a přesného odhadu toxicity.

▼**M6**

Dodatek 4

Extrakce a počítání chvostoskoků

1. **Lze použít dvě metody extrakce.**

1.a. První metoda: je možné použít řízený extraktor s teplotním gradientem, založený za zásadách stanovených MacFadyenem (1). Teplo přichází z topného článku v horní části extrakční nádrže (regulované pomocí termistoru umístěného na povrchu půdního vzorku). Teplota ochlazené kapaliny obklopující sběrnou nádobu se reguluje pomocí termistoru, který se nachází na povrchu sběrné schránky (umístěné pod půdním vzorkem). Termistory jsou připojeny k programovatelné řídící jednotce, která zvyšuje teplotu podle předem naprogramovaného rozvrhu. Chvostoskoci se odeberou do chlazené sběrné schránky (o teplotě 2 °C), na jejímž dně je vrstva pálené sádry / aktivního uhlí. Extrakce začíná při 25 °C, přičemž teplota se každých 12 hodin automaticky zvyšuje o 5 °C, a trvá celkem 48 hodin. Extrakce se ukončí po 12 hodinách při teplotě 40 °C.

1.b. Druhá metoda: Po pokusné inkubační době se počet nedospělých chvostoskoků odhadne pomocí flotace. Pro tento účel se zkouška provádí v nádobách o objemu přibližně 250 ml. Na konci zkoušky se přidá asi 200 ml destilované vody. Půda se jemně zkypří jemným štětečkem, aby se chvostoskokům umožnilo vyplavat na vodní povrch. Do vody je možné přidat malé množství, asi 0,5 ml, černé fotografické barvy značky Kentmere, aby se usnadnilo počítání díky zvýšení kontrastu mezi vodou a bílými chvostoskoky. Tato barva není pro chvostoskoky toxická.

2. **Počítání:**

Určení počtu je možné provést vizuálně nebo pod světelným mikroskopem pomocí síťky umístěné pod flotační nádobou nebo tak, že se povrch každé nádoby vyfotografuje a chvostoskoci se poté spočítají na zvětšených fotografiích nebo promítaných diapozitivech. Počty lze rovněž stanovit pomocí technik digitálního zpracování obrazu (12). Všechny techniky by měly být validovány.

▼M6

Dodatek 5

Určení maximální vodní kapacity půdy

Bylo zjištěno, že pro určení maximální vodní kapacity (RVK) půdy je vhodná následující metoda. Je popsána v příloze C normy ISO DIS 11268-2 (Soil Quality – Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*) (Kvalita půdy – Účinky znečišťujících látek na žížaly. Část 2: Stanovení účinků na reprodukci *Eisenia fetida*/*Eisenia andrei*).

Odeberte stanovené množství (např. 5 g) zkušebního půdního substrátu pomocí vhodného zařízení pro odběr vzorků (spirálové trubice apod.). Dno trubice překryjte kouskem navlhčeného filtračního papíru a poté ji položte na podložku do vodní lázně. Trubici je třeba postupně ponořovat, dokud hladina vody nepřevýší vrchní část půdy. Poté by měla být ponechána asi na tři hodiny ve vodě. Jelikož ne všechna voda absorbovaná půdními kapilárami může být zadržena, vzorek půdy by se měl nechat schnout po dobu dvou hodin tak, že se trubice položí na lože velmi vlhkého jemně rozemletého křemenného písku umístěného v zakryté nádobě (aby se zabránilo vysychání). Vzorek, vysušený na konstantní hmotnost při teplotě 105 °C, je poté třeba zvážit. Retenční vodní kapacita (RVK) se vypočítá takto:

$$\text{RVK (v \% suché hmotnosti)} = \frac{S - T - D}{D} \times 100$$

kde:

S = hmotnost substrátu nasyceného vodou + hmotnost trubice + hmotnost filtračního papíru

T = hmotnost obalu (hmotnost trubice + hmotnost filtračního papíru)

D = suchá hmotnost substrátu

▼**M6**

Dodatek 6

Určení pH půdy

Následující metoda pro určení pH půdy je založena na popisu uvedeném v ČSN ISO 10390: Kvalita půdy – Stanovení pH.

Stanovené množství půdy se suší při pokojové teplotě alespoň 12 hodin. Suspenze půdy (obsahující alespoň 5 gramů půdy) se poté smíchá s pětinásobkem svého objemu 1 M roztoku chloridu draselného (KCl) čistoty p. a. nebo 0,01 M roztoku chloridu vápenatého ($CaCl_2$) čistoty p. a. Suspenze se poté po dobu 5 minut důkladně protřepe a následně se nechá alespoň 2 hodiny, avšak ne déle než 24 hodin, usadit. Poté se změří pH kapalné fáze pH-metrem, který byl před každým měřením kalibrován pomocí vhodné série pufrovaných roztoků (např. pH 4,0 a 7,0).

▼M6

C.40. ZKOUŠKA TOXICITY BĚHEM ŽIVOTNÍHO CYKLU *CHIRONOMIDAE* V SYSTÉMU SEDIMENT-VODA ZA POUŽITÍ OBOHACENÉ VODY NEBO OBOHACENÉHO SEDIMENTU

ÚVOD

1. Tato zkušební metoda odpovídá Pokynu OECD pro zkoušení č. 233 (2010). Je určena k posouzení účinků celoživotní expozice sladkovodních pakomárů čeledi *Chironomus* chemickým látkám, přičemž plně pokrývá první generaci (generaci P) a ranou fázi druhé generace (generace F1). Navazuje na stávající zkušební metodu C.28 (1) používající scénář expozice obohacené vodě nebo metodu C.27 (15) používající scénář s obohaceným sedimentem. Zohledňuje stávající metody zkoušení toxicity pro druhy *Chironomus riparius* a *Chironomus dilutus* (dříve nazývaný *C. tentans* (2)), které byly vyvinuty v Evropě a Severní Americe (3)(4)(5)(6)(7)(8)(9) a následně ověřovány v mezilaboratorních porovnávacích zkouškách (1)(7)(10)(11)(12). Lze užít rovněž další dobře zdokumentované druhy pakomárů, jako např. *Chironomus yoshimatsui* (13)(14). Celková délka trvání expozice je přibližně 44 dnů pro *C. riparius* a *C. yoshimatsui* a přibližně 100 dnů pro *C. dilutus*.

2. V této zkušební metodě jsou popsány scénáře expozice vodě i sedimentu. Výběr vhodného scénáře expozice závisí na zamýšleném použití zkoušky. Účelem scénáře expozice vodě, tj. metoda obohacení vodního sloupce, je simulovat rozprášení pesticidního postřiku a zahrnuje počáteční maximální koncentraci v povrchových vodách. Obohacení vody je užitečné také pro jiné druhy expozic (včetně úniků chemikálií), ale nikoli procesů akumulace v sedimentu, jejichž délka přesahuje trvání zkušebního období. V takovém případě a také tehdy, když se pesticidy dostávají do vodního útvaru především odplavením, může být vhodnější uspořádání s obohaceným sedimentem. Jsou-li předmětem zájmu jiné scénáře expozice, uspořádání zkoušky lze snadno upravit. Například pokud není podstatná distribuce zkoušené chemické látky mezi vodní fází a vrstvou sedimentu a adsorpce do sedimentu musí být minimalizována, lze zvážit použití náhradního umělého sedimentu (např. křemenného písku).

3. Chemické látky, které je třeba testovat na organismech žijících v sedimentu, mohou v sedimentu přetrvávat po dlouhá období. Expozici organismů žijících v sedimentu lze zajistit celou řadou možných cest. Relativní význam jednotlivých cest, jimiž dochází k expozici, a doba nezbytná k tomu, aby každá z nich přispěla k celkovému toxickému účinku, jsou závislé na fyzikálně-chemických vlastnostech chemické látky. V případě silně adsorbujících chemických látek nebo chemických látek s kovalentní vazbou na sediment může být významnou cestou expozice požití kontaminované potravy. Aby nedošlo k podcenění toxicity vysoce lipofilních chemických látek, lze zvážit užití potravy přidané do sedimentu před aplikací zkoušené chemické látky (viz odstavec 31). Je tedy možné zohlednit všechny způsoby expozice a všechna životní stadia.

4. Měřenými ukazateli jsou celkový počet plně vylíhlých, živých dospělců (v první a druhé generaci), rychlost vývoje (v první a druhé generaci), poměr pohlaví u plně vylíhlých, živých dospělců (v první a druhé generaci), počet šňůr vajíček na jednu samičku (pouze v první generaci) a fertilita šňůr vajíček (pouze v první generaci).

5. Důrazně se doporučuje používat připravený sediment. Připravený sediment má oproti přírodním sedimentům několik výhod:

▼M6

— jeho experimentální variabilita je snížena, neboť tvoří reprodukovatelnou „standardizovanou matrici“, a odpadá potřeba hledat zdroje nekontaminovaného čistého sedimentu,

— zkoušky lze zahájit kdykoli, aniž by bylo nutno potýkat se se sezonními výkyvy zkušebního sedimentu, a sediment není třeba předem upravovat, aby se z něj odstranili původní živočichové,

— oproti terénnímu shromažďování dostatečného množství sedimentu pro rutinní testování se sníží náklady,

— připravený sediment umožňuje porovnání toxicity v různých studiích a odpovídající řazení látek (3).

6. Použité definice jsou uvedeny v dodatku 1.

PODSTATA ZKOUŠKY

7. Larvy pakomárů v prvním instaru jsou vystaveny koncentračnímu rozmezí zkoušené chemické látky v systému sediment-voda. Zkouška začíná tím, že se larvy prvního instaru (první generace) umístí do zkušebních kádinek obsahujících obohacený sediment, nebo se zkoušená chemická látka po umístění larev vmíchá do vody. Posuzuje se počet vylíhnutí, čas do vylíhnutí a poměr pohlaví plně vylíhlých, živých pakomárů. Vylíhlí dospělci se přemístí do chovných klecí, aby se usnadnilo rojení, páření a kladení vajíček. Posuzuje se počet nakladených šňůr vajíček a jejich fertilita. Z těchto šňůr vajíček se získají larvy prvního instaru druhé generace. Tyto larvy se vloží do čerstvě připravených zkušebních kádinek (postup expozice je stejný jako pro první generaci), aby bylo možné určit životaschopnost druhé generace pakomárů posouzením jejich vylíhnutí, času do vylíhnutí a poměru pohlaví plně vylíhlých, živých pakomárů (schematický přehled zkoušky toxicity během životního cyklu je uveden v dodatku 5). Všechny údaje se analyzují buď pomocí regresního modelu s cílem odhadnout koncentraci, která by způsobila x % snížení příslušných ukazatelů, nebo s využitím testování hypotéz pro stanovení koncentrace bez pozorovatelných účinků (NOEC). Posledně uvedená metoda vyžaduje srovnání odezvy exponovaných skupin s odpovídajícími odezvami kontrolních skupin pomocí statistických testů. Je třeba poznamenat, že při scénáři s obohacenou vodou by v případě rychle se rozkládajících chemických látek bylo možné pozdnější životní stadia každé generace (např. stadium kukly) vystavit výrazně nižší menší úrovni koncentrace ve vodě nad sedimentem, než tomu bylo v případě larev v prvním instaru. Pokud je to problém a je nutná srovnatelná úroveň expozice pro všechna životní stadia, je možné zvážit tyto změny ve zkušební metodě:

— souběžná provedení s obohacením v různých životních fázích nebo

— opakované obohacení zkušebního systému (nebo obnovení vody nad sedimentem) během obou fází zkoušky (první a druhá generace), přičemž intervaly obohacení (obnovení) by měly být upraveny podle charakteristik rozpadu zkoušené chemické látky.

Takové změny jsou proveditelné pouze při scénáři s obohacenou vodou, nikoli však při scénáři s obohaceným sedimentem.

INFORMACE O ZKOUŠENÉ CHEMICKÉ LÁTCE

8. Měla by být známa rozpustnost zkoušené chemické látky ve vodě, její tlak par a log K_{ow}, naměřená nebo vypočtená distribuce v sedimentu a stabilita ve vodě a v sedimentu. Měla by být k dispozici spolehlivá analytická metoda pro stanovení množství zkoušené chemické látky ve vodě nad sedimentem, kapilární vodě a v sedimentu, a to se známou a doloženou

▼M6

přesností a mezí stanovitelnosti. K užitečným informacím patří strukturní vzorec a čistota zkoušené chemické látky. Užitečný je rovněž chemický osud zkoušené chemické látky (např. zánik, abiotický a biotický rozklad atd.). Další pokyny pro zkoušení látek s fyzikálně-chemickými vlastnostmi, které činí jejich zkoušení obtížným, jsou uvedeny v seznamu literatury (16).

REFERENČNÍ CHEMICKÉ LÁTKY

9. Referenční chemické látky mohou být pravidelně testovány pro ověření toho, že citlivost laboratorní populace se nezměnila. Stejně jako u dafnií je dostačující provést 48hodinovou zkoušku akutní toxicity (podle (17). Dokud však není k dispozici platná metoda OECD pro zkoušky akutní toxicity, lze zvážit provedení zkoušky chronické toxicity podle kapitoly C.28 této přílohy. Příkladem referenčních toxických látek úspěšně použitých v mezilaboratorních zkouškách a validačních studiích jsou: lindan, trifluralin, pentachlorfenol, chlorid kademnatý a chlorid draselný (1)(3)(6)(7)(18).

VALIDITA ZKOUŠKY

10. Aby byla zkouška platná, musí být splněny tyto podmínky:

— střední hodnota vylíhnutí v kontrolní zkoušce by pro obě generace na konci zkušebního období měla být alespoň 70 % (1)(7),

— pro *C. riparius* a *C. yoshimatsui* by k líhnutí 85 % celkového počtu vylíhlých dospělých jedinců z kontrolní zkoušky v obou generacích mělo dojít mezi 12. a 23. dnem po zavedení larev prvního instaru do nádob; pro *C. dilutus* je přijatelná doba 20–65 dnů,

— střední hodnota poměru pohlaví plně vylíhlých, živých dospělců (vyjádřená podílem samiček/samečků) v kontrolní zkoušce v obou generacích by měla být nejméně 0,4, ale ne větší než 0,6,

— v kontrolách první generace by počet šňůr vajíček v každé chovné kleci měl být nejméně 0,6 na jednu samičku nasazenou do chovné klece,

— podíl plodných šňůr vajíček v každé chovné kleci s kontrolou první generace by měl být nejméně 0,6,

— na konci období expozice obou generací se v každé nádobě změří pH a koncentrace rozpuštěného kyslíku. Koncentrace rozpuštěného kyslíku by měla činit alespoň 60 % hodnoty nasycení vzduchem (ASV ([1])) a pH vody nad sedimentem by se ve všech zkušebních nádobách mělo pohybovat mezi 6 a 9,

— teplota vody by se neměla lišit o více než ± 1,0 °C.

POPIS METODY

Zkušební nádoby a chovné klece

11. Larvy jsou vystaveny expozici ve skleněných 600ml kádinkách o průměru přibližně 8,5 cm (viz dodatek 5). Vhodné jsou i jiné nádoby, ale měly by zaručovat odpovídající výšku vody nad sedimentem a hloubku sedimentu. Plocha sedimentu by měla být dostatečná, aby poskytovala 2 až 3 cm^2 na larvu. Poměr hloubky sedimentu k výšce vody nad sedimentem by měl být přibližně 1:4. Měly by být použity chovné klece (minimálně 30 cm ve všech třech rozměrech) s gázou (velikost ok přibližně 1 mm) pokrývající vrchní část klece a nejméně jednu stěnu klece (viz dodatek 5). Do každé klece se umístí dvoulitrová krystalizační miska obsahující zkušební vodu a sediment na kladení vajíček. Také v krystalizační misce by poměr hloubky sedimentu k výšce vody nad sedimentem měl být přibližně 1:4. Poté, co jsou z krystalizační misky odebrány šňůry vajíček, umístí se na mikrotitrační destičky s 12 jamkami (na jednu šňůru v každé jamce

([1]) Při teplotě 20 °C za standardního atmosférického tlaku se ASV sladké vody rovná 9,1 mg/l (60 % se rovná 5,46 mg/l).

▼M6

připadá nejméně 2,5 ml obohacené vody z krystalizační misky) a poté se destičky uzavřou víčkem, aby se zabránilo významnému odpařování. Je možné použít i jiné nádoby vhodné pro uchovávání šňůr vajíček. S výjimkou mikrotitračních destiček by všechny zkušební nádoby a další aparatura, která přichází do styku se zkušebním systémem, měly být celé zhotoveny ze skla nebo z jiného chemicky inertního materiálu (např. z teflonu).

Výběr druhů

12. Při zkoušce má být přednostně užito druhu *Chironomus riparius*. Lze užít rovněž druh *C. yoshimatsui.* Vhodný je i druh *C. dilutus*, avšak hůře se s ním manipuluje a vyžaduje i delší trvání zkoušky. Podrobnosti o kultivačních metodách pro druh *C. riparius* jsou uvedeny v dodatku 2. Informace o kultivačních podmínkách jsou k dispozici také pro druhy *C. dilutus* (5) a *C. yoshimatsui* (14). Identifikace druhu by měla být před zkouškou potvrzena, ale není vyžadována před každou zkouškou, pokud organismy pocházejí z domácí kultury.

Sediment

13. Doporučuje se přednostně užívat připravený sediment (nazývaný rovněž rekonstituovaný, umělý nebo syntetický sediment). Pokud se však použije přírodní sediment, je potřeba ho charakterizovat (alespoň pH a obsah organického uhlíku a doporučuje se i stanovení dalších parametrů, jako je poměr C/N a zrnitost) a měl by být prost veškerého znečištění a dalších organismů, které mohou larvám pakomárů konkurovat nebo je konzumovat. Doporučuje se také sedimenty před zkouškou po dobu sedmi dnů kondicionovat za zkušebních podmínek. Doporučuje se následující připravený sediment (1)(20)(21), popsaný v seznamu literatury (1):

a. 4–5 % (sušiny) rašeliny s pH co nejblíže 5,5 až 6,0; je důležité, aby byla ve formě prášku, jemně namletá (velikost částic ≤ 1 mm) a sušená výhradně na vzduchu;

b. 20 % (sušiny) kaolinitického jílu (pokud možno s více než 30 % kaolinitu);

c. 75–76 % (sušiny) křemenného písku (měl by převažovat jemný písek s více než 50 % částic velikosti 50 až 200 μm);

d. přidá se deionizovaná voda s cílem dosáhnout 30–50 % vlhkosti v konečné směsi;

e. přidá se chemicky čistý uhličitan vápenatý ($CaCO_3$) pro úpravu pH konečné směsi sedimentu na pH 7,0 ± 0,5;

f. obsah organického uhlíku v konečné směsi by měl být 2 % (± 0,5 %) a je třeba jej upravit použitím vhodného množství rašeliny a písku v souladu s písm. a) a c).

14. Rašelina, kaolinitický jíl a písek by měly pocházet ze známého zdroje. Jednotlivé složky sedimentu by měly být kontrolovány z hlediska nepřítomnosti chemické kontaminace (např. těžké kovy, chlorované organické

▼M6

sloučeniny, organofosforové sloučeniny). Příklad přípravy umělého sedimentu je popsán v dodatku 3. Přijatelné je i míchání suchých složek, pokud se prokáže, že po přidání vody nad sedimentem nedochází k separaci složek sedimentu (např. vyplavování částic rašeliny) a že rašelina nebo sediment jsou dostatečně kondicionovány.

Voda

15. Pro tuto zkoušku je vhodná jakákoli voda, která vyhovuje chemickým charakteristikám přípustné ředicí vody uvedeným v dodatcích 2 a 4. Jakákoli vhodná voda, přírodní voda (povrchová nebo podzemní), rekonstituovaná voda (viz dodatek 2) nebo odchlorovaná vodovodní voda je přijatelná jako kultivační a zkušební voda, pokud v ní pakomáři přežijí po dobu kultivace a zkoušení bez známek stresu. Na začátku zkoušky by se hodnota pH zkušební vody měla pohybovat mezi 6 a 9 a její celková tvrdost by neměla být vyšší než 400 mg/l $CaCO_3$. V případě, že je podezření na interakci mezi ionty způsobujícími tvrdost vody a zkoušenou chemickou látkou, měla by být použita voda nižší tvrdosti (proto není vhodné v této situaci používat Elendtovo médium M4). V průběhu celé studie by měl být užíván stejný typ vody. Charakteristiky jakosti vody uvedené v dodatku 4 by měly být měřeny nejméně dvakrát ročně, nebo pokud existuje podezření, že mohlo dojít k podstatné změně těchto vlastností.

Zásobní roztoky – obohacená voda

16. a. Zkušební koncentrace se vypočtou na základě koncentrací ve vodním sloupci, tj. vodě nad sedimentem. Zkušební roztoky zvolené koncentrace jsou obvykle připravovány ředěním zásobního roztoku. Zásobní roztoky by měly být připraveny rozpuštěním zkoušené chemické látky v ředicí vodě. V některých případech může být pro vytvoření zásobního roztoku o vhodné koncentraci nezbytné použití rozpouštědel nebo dispergátorů. Mezi vhodná rozpouštědla patří aceton, ethylenglykol-monoethylether, ethylenglykol-dimethylether, dimethylformamid a triethylenglykol. Jako dispergátor mohou být použity Cremophor RH40, Tween 80, 0,01 % methylcelulosa a HCO-40. Koncentrace solubilizačního činidla v konečném zkušebním médiu by měla být minimální (tj. $\leq$ 0,1 ml/l) a měla by být u všech expozic stejná. Použije-li se solubilizační činidlo, nemělo by mít významné účinky na přežití, což musí být prokázáno na kontrolní skupině vystavené rozpouštědlu ve srovnání s negativní kontrolní skupinou (vystavenou pouze vodě). Měla by však být vynaložena maximální snaha takové chemické látky nepoužívat.

Zásobní roztoky – obohacené sedimenty

16. b. Obohacené sedimenty zvolené koncentrace se obvykle připraví přidáním roztoku zkoušené chemické látky přímo do sedimentu. Zásobní roztok zkoušené chemické látky rozpuštěné v deionizované vodě se smísí s připraveným sedimentem pomocí krouživé míchačky, míchačky krmiv nebo ručním smícháním. Je-li zkoušená chemická látka špatně rozpustná ve vodě, může být rozpuštěna v co nejmenším objemu vhodného organického rozpouštědla (např. hexanu, acetonu nebo chloroformu). Tento roztok se pak smísí s 10 g jemného křemičitého písku na jednu zkušební nádobu. Rozpouštědlo se nechá odpařit a mělo by být z písku zcela odstraněno; písek se pak smísí s vhodným množstvím sedimentu. K rozpuštění, dispergaci nebo emulgaci zkoušené chemické látky mohou být použita pouze činidla, která snadno vytěkají. Je třeba mít na paměti, že při přípravě sedimentu musí být brán v potaz písek ze zkoušené chemické látky a směsi písku (tzn. při přípravě sedimentu by se

▼M6

mělo použít menší množství písku). Je třeba dbát na to, aby zkoušená chemická látka přidaná do sedimentu byla v sedimentu důkladně a rovnoměrně rozložena. Pokud je to nutné, lze za účelem stanovení stupně homogenity analyzovat dílčí vzorky.

USPOŘÁDÁNÍ ZKOUŠKY

17. Uspořádáním zkoušky se rozumí výběr počtu zkušebních koncentrací a jejich odstupňování, počet zkušebních nádob pro každou koncentraci, počet larev v nádobě, počet krystalizačních misek a chovných klecí. Uspořádání pro EC_x, NOEC a limitní zkoušku jsou popsána níže.

Uspořádání pro regresní analýzu

18. Zkouška by měla pokrývat účinnou koncentraci (EC_x,) a rozsah koncentrací, při nichž dochází k účinku zkoušené chemické látky, který je předmětem zájmu, tak aby konečný ukazatel nebyl extrapolován mimo hranice získaných údajů. Je třeba se vyhnout extrapolaci hluboko pod nejnižší koncentrací nebo přesahující nejvyšší koncentraci. Pro výběr vhodného rozsahu zkušebních koncentrací může být užitečná předběžná zkouška ke stanovení rozsahu koncentrací podle zkušební metody C.27 nebo C.28.

19. Pro stanovení EC_x je požadováno nejméně pět koncentrací a osm opakování pro každou koncentraci. Pro každou koncentraci by měly být použity dvě chovné klece (A a B). Osm opakování se rozdělí do dvou skupin po čtyřech opakováních pro každou chovnou klec. Toto sloučení opakování je nezbytné vzhledem k počtu pakomárů, který je v kleci potřebný pro řádné posouzení reprodukce. Druhá generace však má opět osm opakování, jež pocházejí z exponovaných populací v chovných klecích. Faktor mezi koncentracemi nesmí být větší než 2 (výjimku lze učinit v případech, kdy má křivka závislosti odezvy na dávce malý sklon). Počet opakování při každé expozici lze snížit na šest (po třech pro každou chovnou klec), pokud se zvýší počet zkušebních koncentrací s různými odezvami. Zvýšení počtu opakování nebo zúžení rozsahu zkušebních koncentrací obvykle vede k zúžení intervalu spolehlivosti hodnoty EC_x.

Uspořádání odhadu NOEC

20. Pro stanovení NOEC se použije pět zkušebních koncentrací s nejméně osmi opakováními (po čtyřech pro každou chovnou klec, A a B) a faktor mezi koncentracemi by neměl být vyšší než 2. Počet opakování by měl být dostatečný, aby zajistil odpovídající statistickou významnost, s jakou má být rozeznán 20 % rozdíl oproti kontrolnímu vzorku na 5 % hladině významnosti (α = 0,05). Pro rychlost vývoje, reprodukční schopnost a fertilitu je zpravidla vhodné použít analýzu rozptylu (ANOVA) s následným Dunnettovým nebo Williamsovým testem (22)(23)(24)(25). Pro procento vylíhlých jedinců a poměr jejich pohlaví může být vhodný Cochranův-Armitageův test, Fisherův exaktní test (s Bonferroniho korekcí) nebo Mantelův-Haenszelův test.

Limitní zkouška

21. Může být provedena limitní zkouška (jedna zkušební koncentrace a kontrola (kontroly)), pokud nebyly zjištěny žádné účinky až po maximální koncentraci při volitelné předběžné zkoušce ke stanovení rozsahu koncentrací. Účelem limitní zkoušky je určit, že jakékoli toxické účinky zkoušené chemické látky se vyskytují při úrovních vyšších než zkoušený

▼M6

koncentrační limit. Pro zkoušku s vodou se doporučuje 100 mg/l a pro zkoušku se sedimentem 1 000 mg/kg (sušiny). Obvykle je pro expozici i kontrolu zapotřebí alespoň osmi opakování. Počet opakování by měl být dostatečný, aby zajistil odpovídající statistickou významnost, s jakou má být rozeznán 20 % rozdíl oproti kontrolnímu vzorku na 5 % hladině významnosti (α = 0,05). V případě spojité proměnné (např. rychlost vývoje) je t-test vhodnou statistickou metodou, pokud údaje splňují požadavky tohoto testu (normalita rozdělení, homogenní rozptyly). Pokud tyto požadavky splněny nejsou, lze použít t-test nestejných rozptylů nebo neparametrický test, jako je například Wilcoxonův-Mannův-Whitneyův test. Pro procento vylíhlých jedinců je vhodný Fisherův exaktní test.

POSTUP

Podmínky expozice

Příprava systému voda-sediment (obohacení vody)

22. a. Do každé zkušební nádoby a krystalizační misky se přidá připravený sediment (viz odstavce 13–14 a dodatek 3) tak, aby tvořil vrstvu o hloubce nejméně 1,5 cm (v krystalizační misce může být poněkud nižší), avšak nejvýše 3 cm. Přidá se voda (viz odstavec 15) tak, aby poměr hloubky vrstvy sedimentu a výšky vody nepřekročil 1:4. Po přípravě zkušebních nádob se systém sediment-voda před přidáním larev zkušebních organismů v prvním instaru první nebo druhé generace po dobu sedmi dnů mírně provzdušňuje (viz odstavec 14 a dodatek 3). Systém sediment-voda v krystalizačních miskách se během zkoušky neprovzdušňuje, neboť nemusí podporovat přežití larev (šňůry vajíček se odeberou již před vylíhnutím). Aby se zabránilo oddělení složek sedimentu a resuspenzi jemného materiálu v průběhu přidávání zkušební vody ve vodním sloupci, lze sediment přikrýt plastovým diskem, na který se voda nalije. Bezprostředně poté se disk vyjme. Mohou být vhodná i jiná zařízení.

Příprava systému voda-sediment (obohacený sediment)

22. b. Obohacené sedimenty připravené podle odstavce 16.b se umístí do nádob a krystalizační misky a přidá se voda nad sediment tak, aby vznikl objemový poměr sedimentu a vody 1:4. Hloubka vrstvy sedimentu by se měla pohybovat v rozmezí od 1,5 do 3 cm (v krystalizační misce může být poněkud nižší). Aby se zabránilo oddělení složek sedimentu a resuspenzi jemného materiálu v průběhu přidávání zkušební vody ve vodním sloupci, lze sediment přikrýt plastovým diskem, na který se voda nalije, a disk se bezprostředně poté vyjme. Mohou být vhodná i jiná zařízení. Jakmile je obohacený sediment s vodou nad sedimentem připraven, je žádoucí umožnit průnik zkoušené chemické látky ze sedimentu do vodné fáze (4)(5)(7)(18). To by se mělo provádět pokud možno za stejných podmínek z hlediska teploty a provzdušňování, jaké mají být použity při zkoušce. Vhodná doba k dosažení rovnováhy je specifická pro konkrétní sediment a chemickou látku a může se pohybovat v řádu hodin až dní, zřídka až pět týdnů. Vzhledem k tomu, že taková doba by umožnila rozklad mnoha chemických látek, nečeká se na dosažení rovnováhy, ale doporučuje se vyrovnávací doba v trvání 48 hodin. Je-li však známo, že daná chemická látka má dlouhý poločas rozkladu v sedimentu (viz odstavec 8), lze dobu pro ustavení rovnováhy prodloužit. Na konci této prodloužené doby pro ustavení rovnováhy by se měla změřit koncentrace zkoušené chemické látky ve vodě nad sedimentem, v kapilární vodě a v sedimentu, a to alespoň při nejvyšší koncentraci a při jedné nižší koncentraci (viz odstavec 38). Tato analytická stanovení zkoušené chemické látky umožňují vypočítat hmotnostní bilanci a vyjádřit výsledky na základě naměřených koncentrací.

23. Zkušební nádoby se přikryjí (například skleněnými destičkami). Pokud je to nutné, v průběhu studie se hladina vody doplňuje na původní objem s cílem kompenzovat odpařování vody. K tomuto účelu by měla být použita destilovaná nebo deionizovaná voda, aby se zabránilo hromadění

▼M6

solí. Krystalizační misky v chovných klecích se nezakrývají a mohou, ale nemusí být doplňovány, aby se nahradila ztráta vody během zkušební doby, neboť šňůry vajíček jsou ve styku s vodou pouze přibližně jeden den a misky se používají pouze během krátké fáze zkoušky.

Přidání zkušebních organismů

24. Čtyři až pět dnů před přidáním larev v prvním instaru první generace by měly být z kultury odebrány shluky vajíček a měly by být umístěny do malých nádob do kultivačního média. Lze použít starší médium ze zásobní kultury nebo čerstvě připravené médium. V každém případě by mělo být do kultivačního média přidáno malé množství potravy, např. několik kapek filtrátu z jemně mleté suspenze vločkového krmiva pro ryby (viz dodatek 2). Měly by se použít pouze čerstvě nakladené shluky vajíček. Za běžných okolností se larvy začínají líhnout několik dní po nakladení vajíček (2 až 3 dny u *C. riparius* při 20 °C a 1 až 4 dny u *C. dilutus* při 23 °C a *C. yoshimatsui* při 25 °C) a během larválního vývoje se vystřídají čtyři instary, z nichž každý trvá 4–8 dnů. Při zkoušce se použijí larvy prvního instaru (nejvýše 48 h po vylíhnutí). Stadium instaru pakomárů lze případně zkontrolovat pomocí šířky hlavové kapsuly (7).

25. Dvacet larev v prvním instaru první generace se pomocí pipety bez špičky náhodně rozdělí do jednotlivých zkušebních nádob obsahujících systém sediment-voda. Provzdušňování vody se při přidávání larev do zkušebních nádob ukončí a znovu by se mělo zahájit nejdříve po uplynutí 24 hodin od přidání larev (viz odstavec 32). Podle zvoleného uspořádání zkoušky (viz odstavce 19 a 20) je počet larev užitý na jednu koncentraci minimálně 120 pro stanovení EC_x (6 opakování pro každou koncentraci) a 160 pro stanovení NOEC (8 opakování pro každou koncentraci). V uspořádání s obohaceným sedimentem expozice začíná přidáním larev.

Obohacení vody nad sedimentem

26. Po 24 hodinách od přidání larev v prvním instaru první generace se zkoušená chemická látka vmísí do sloupce vody nad sedimentem a znovu se zavede mírné provzdušňování (ohledně možných změn v uspořádání zkoušky viz odstavec 7). Pod hladinou vody se pomocí pipety aplikují malé objemy roztoků zkoušené chemické látky. Voda nad sedimentem se poté opatrně promíchá, aby se sediment nerozrušil. Při uspořádání s obohacenou vodou expozice začíná obohacením vody (tj. jeden den po přidání larev).

Sběr vylíhlých dospělců

27. Vylíhlí pakomáři první generace se nejméně jednou, lépe však dvakrát denně (viz odstavec 36) odebírají ze zkušebních nádob pomocí odsavače, exhaustoru nebo obdobného zařízení (viz dodatek 5). Zvláště je třeba dbát na to, aby se dospělci nepoškodili. Odebraní pakomáři ze čtyř zkušebních nádob v rámci jedné expozice se vypustí do chovné klece, ke které byli předtím přiděleni. V den prvního vylíhnutí (samečka) se do krystalizačních misek pod hladinu vody pipetou přidá malé množství zkoušené chemické látky (uspořádání s obohacenou vodou). Voda nad sedimentem se poté opatrně promíchá, aby se sediment nerozrušil. Koncentrace zkoušené chemické látky v krystalizační misce je stejná jako v expozičních nádobách, které jsou přiděleny k dané konkrétní chovné kleci. Při uspořádání s obohaceným sedimentem se krystalizační misky připraví

▼M6

přibližně v den 11 po zahájení expozice (tj. po zavedení larev první generace) tak, aby mohly být během asi 48 hodin před vložením prvních šňůr vajíček uvedeny do rovnováhy.

28. Šňůry vajíček se odeberou z krystalizační misky v chovné kleci pomocí pinzety nebo pipety bez špičky. Každá šňůra vajíček se z krystalizační misky, z níž byla odebrána, přemístí do nádoby s kultivačním médiem (např. do jamky mikrotitrační destičky s 12 jamkami spolu s nejméně 2,5 ml média). Nádoby se šňůrami vajíček se přikryjí víčky, aby se zabránilo významnému odpařování. Šňůry vajíček se po dobu nejméně šesti dnů od jejich nakladení ponechají za účelem pozorování, aby mohly být vyhodnoceny jako plodné nebo neplodné.

Pro zahájení zkoušky s druhou generací se z každé chovné klece vyberou nejméně tři, lépe však šest plodných šňůr vajíček a spolu s určitým množstvím potravy se nechají vylíhnout. Tyto šňůry s vajíčky by měly být nakladeny ve vrcholné části kladení vajíček, k čemuž obvykle dochází kolem zkušebního dne 19 v kontrolních skupinách. V ideálním případě začne zkouška s druhou generací ve všech expozicích ve stejný den, ale v důsledku účinků té či oné chemické látky na vývoj larev to nemusí být vždy možné. V takovém případě může k vývoji při vyšších koncentracích dojít později než k nižším expozicím a kontrolám (s rozpouštědlem).

29.a. Při uspořádání s obohacenou vodou se systém sediment-voda pro druhou generaci připraví tak, že se zkoušená chemická látka přimísí do vodního sloupce nad sedimentem přibližně 1 hodinu před vložením larev prvního instaru do zkušebních nádob. Pod hladinou vody se pomocí pipety aplikují malé objemy roztoku zkoušené chemické látky. Voda nad sedimentem se poté opatrně promíchá, aby se sediment nerozrušil. Po obohacení se provede mírné provzdušnění.

29.b. Při uspořádání s obohaceným sedimentem se expoziční nádoby obsahující systém sediment-voda pro druhou generaci připraví stejným způsobem jako pro první generaci.

30. 20 larev v prvním instaru (nejvýše 48 h po vylíhnutí) druhé generace se pomocí pipety bez špičky náhodně rozdělí do jednotlivých zkušebních nádob obsahujících systém obohacený sediment-voda. Provzdušňování vody by mělo být při přidání larev prvního instaru do zkušebních nádob ukončeno a mělo by být znovu zahájeno nejdříve po uplynutí dalších 24 hodin od přidání larev. Podle zvoleného uspořádání zkoušky (viz odstavce 19 a 20) je počet larev použitý na jednu koncentraci minimálně 120 pro stanovení EC_x (6 opakování pro každou koncentraci) a 160 pro stanovení NOEC (8 opakování pro každou koncentraci).

Potrava

31. Larvy ve zkušebních nádobách je třeba krmit optimálně denně nebo nejméně třikrát týdně. Jako dostatečná dávka pro mladé larvy po dobu prvních 10 dnů jejich vývoje se jeví krmivo pro ryby (suspenze ve vodě nebo jemně rozmělněné krmivo, např. Tetra-Min nebo Tetra-Phyll, viz podrobnosti v dodatku 2) v množství 0,25 až 0,5 mg (0,35 až 0,5 mg pro *C. yoshimatsui*) na larvu za den. Starší larvy mohou potřebovat o něco větší množství potravy: po zbývající dobu zkoušky by mělo dostačovat 0,5–1,0 mg na larvu denně. Pokud v kontrolních skupinách dojde k růstu plísní nebo je u nich zjištěna mortalita, je nutné přísun potravy u všech expozic snížit a kontrolovat. Pokud není možné růst plísní zastavit, je třeba zkoušku opakovat.

Toxikologický význam expozice požitím je obecně vyšší v případě chemických látek s vysokou afinitou k organickému uhlíku nebo chemických látek s kovalentní vazbou na sediment. Při zkoušení látek s takovýmito vlastnostmi proto lze v závislosti na požadavcích regulačních orgánů

▼M6

dávku potravy nezbytnou pro zajištění přežití a přirozeného růstu larev přidat do připraveného sedimentu před fází stabilizace. Aby se zabránilo zhoršení kvality vody, je nutno místo krmiva pro ryby použít rostlinný materiál, například přídavek 0,5 % (sušiny) jemně mletých listů kopřivy dvoudomé (*Urtica dioica*), morušovníku bílého (*Morus alba*), jetele plazivého (*Trifolium repens*), špenátu setého (*Spinacia oleracea*) nebo jiného rostlinného materiálu (Cerophylu nebo alfa-celulózy). Přidání celé dávky zdroje organické potravy do sedimentu před obohacením není s ohledem na kvalitu vody a biologickou účinnost běžnou praxí (21) a nejedná se ani o standardizovanou metodu, avšak z nedávných studií vyplývá, že tato metoda funguje (19)(26). Dospělí pakomáři v chovné kleci obvykle krmení nepotřebují, avšak reprodukční schopnost a fertilita se posílí, pokud se vylíhlým dospělcům jako zdroj potravy nabídne vata namočená do nasyceného roztoku sacharózy (34).

Inkubační podmínky

32. Voda nad sedimentem ve zkušebních nádobách se 24 hodin po přidání larev prvního instaru obou generací mírně provzdušňuje a v provzdušňování se pokračuje po celou dobu zkoušky (je třeba dbát na to, aby koncentrace rozpuštěného kyslíku neklesla pod 60 procent ASV). Provzdušňování se provádí pomocí skleněné Pasteurovy pipety, jejíž výstupní otvor je upevněn 2–3 cm nad vrstvou sedimentu a která dávkuje několik bublin/s. Při zkoušení těkavých chemických látek by se mělo zvážit neprovzdušňování systému sediment-voda, přičemž je však třeba splnit kritérium nejméně 60 % ASV (odstavec 10). Další pokyny jsou uvedeny v (16).

33. Zkouška s *C. riparius* se provádí při konstantní teplotě 20 °C (± 2 °C). Doporučená teplota pro *C. dilutus* je 23 °C a pro *C. yoshimatui* 25 °C (± 2 °C). Fotoperioda je 16 hodin a intenzita osvětlení by měla být 500 až 1 000 luxů. Pro chovné klece je možné zařadit jednohodinovou fázi úsvitu a šera.

Trvání expozice

34. Uspořádání s obohacenou vodou: Doba expozice první generace začíná v okamžiku vmísení zkoušené chemické látky do vody nad sedimentem ve zkušebních nádobách (tj. jeden den po vložení larev – pro možné změny v uspořádání expozice viz odstavec 7). Expozice druhé generace larev začíná okamžitě, neboť se vkládají do systému sediment-voda, který již byl obohacen. Maximální délka trvání expozice pro *C. riparius* a *C. yoshimatsui* je u první generace 27 dnů a u druhé generace 28 dnů (tj. larvy první generace stráví v nádobách jeden den bez expozice). Vzhledem k překrývání činí celková délka trvání zkoušky přibližně 44 dnů. Pro *C. dilutus* je maximální délka trvání expozice u první generace 64 dnů a u druhé generace 65 dnů. Celková délka trvání je přibližně 100 dnů.

Uspořádání s obohaceným sedimentem: expozice začíná přidáním larev a trvá maximálně 28 dnů pro obě generace *C. riparius* a *C. yoshimatsui* a maximálně 65 dnů pro obě generace *C. dilutus*.

Poznámky

Líhnutí

35. Určí se čas potřebný pro vývoj a celkový počet plně vylíhlých, živých samečků a samiček pakomárů pro obě generace. Samečky lze snadno rozlišit podle vějířovitých tykadel a štíhlého trupu.

▼M6

36. Zkušební nádoby pro obě generace se kontrolují alespoň třikrát týdně s cílem vizuálně posoudit jakékoli neobvyklé chování larev (např. opouštění sedimentu, neobvyklé plavání) ve srovnání s kontrolními nádobami. Během období líhnutí, které začíná asi 12 dnů po vložení larev u *C. riparius* a *C. yoshimatsui* (a po 20 dnech u *C. dilutus*), se vylíhlí pakomáři počítají a rozlišují podle pohlaví alespoň jednou, lépe však dvakrát denně (brzy ráno a pozdě odpoledne). Po identifikaci se pakomáři první generace z nádob opatrně odstraní a přemístí do chovné klece. Pakomáři druhé generace se po identifikaci odstraní a usmrtí. Veškeré šňůry vajíček vložené do zkušebních nádob první generace by měly být jednotlivě odebrány a přeneseny s alespoň 2,5 ml původní vody na mikrotitrační destičky s 12 jamkami (nebo do jiných vhodných nádob), které se přikryjí víčkem s cílem zamezit významnému odpařování. Je třeba rovněž zaznamenat počet mrtvých larev a viditelných kukel, které se dosud nevylíhly. Příklady chovné klece, zkušební nádoby a exhaustoru jsou uvedeny v dodatku 5.

Reprodukce

37. Účinky na reprodukci se posoudí podle počtu šňůr vajíček nakladených první generací pakomárů a podle fertility těchto šňůr vajíček. Jednou denně se šňůry vajíček odeberou z krystalizační misky, která je umístěna v každé chovné kleci. Šňůry vajíček by se měly odebrat a přenést s alespoň 2,5 ml původní vody na mikrotitrační destičku s 12 jamkami (po jedné šňůře vajíček do každé jamky) nebo do jiné vhodné nádoby, která se přikryje víčkem s cílem zamezit silnému odpařování. U každé šňůry vajíček se zdokumentují tyto charakteristiky: den nakladení, velikost (normální, tj. 1,0 ± 0,3 cm, nebo malá, obvykle ≤ 0,5 cm), struktura (normální = ve tvaru banánku se spirálovitě zatočenou nití vajíček, nebo nenormální, např. s nití vajíček, která není spirálovitě zatočená) a fertilita (plodná nebo neplodná). Po uplynutí 6 dní od nakladení šňůry vajíček se posoudí její fertilita. Šňůra vajíček se považuje za plodnou, pokud se vylíhne alespoň jedna třetina vajíček. Celkový počet samiček přidaných do chovné klece se použije k výpočtu počtu šňůr vajíček na jednu samičku a počtu plodných šňůr vajíček na jednu samičku. Je-li to nutné, lze počet vajíček ve šňůře vajíček odhadnout, aniž by došlo k jejich poškození, metodou počtu prstenců (ta je podrobně popsána v (32)(33)).

Analytická měření

Koncentrace zkoušené chemické látky

38. Je třeba analyzovat alespoň vzorky vody nad sedimentem, kapilární vody a sedimentu na počátku expozice (v případě obohacení vody nejlépe hodinu po aplikaci zkoušené chemické látky) a na konci zkoušky při nejvyšší koncentraci a jedné nižší koncentraci. To platí o nádobách pro obě generace. Z krystalizačních misek v chovné kleci se analyzuje pouze voda nad sedimentem, protože právě s ní přišly šňůry vajíček do styku (při uspořádání s obohaceným sedimentem lze zvážit analytické potvrzení koncentrace v sedimentu). Další měření sedimentu, kapilární vody nebo vody nad sedimentem lze provádět během zkoušky, je-li to považováno za nezbytné. Tato stanovení koncentrace zkoušené chemické látky poskytují informace o chování/distribuci zkoušené chemické látky v systému voda-sediment. Odběr vzorků sedimentu a kapilární vody na počátku zkoušky a v jejím průběhu (viz odstavec 39) vyžaduje další zkušební nádoby k provedení analytických určení. Měření v sedimentu při uspořádání s obohacenou vodou nemusí být nutná, pokud distribuce zkoušené chemické látky mezi vodou a sedimentem byla jasně stanovena studií voda/sediment za srovnatelných podmínek (např. poměr sedimentu k vodě, typ aplikace, obsah organického uhlíku v sedimentu), nebo

▼M6

pokud se prokáže, že naměřené koncentrace ve vodě nad sedimentem zůstávají v rozmezí 80 až 120 % nominálních nebo naměřených počátečních koncentrací.

39. Při provádění průběžných měření (např. v den 7 a/nebo den 14) a v případě, že jsou pro analýzu zapotřebí rozsáhlé vzorky, které nelze ze zkušebních nádob odebrat bez dopadu na zkušební systém, je potřeba provést analytická stanovení na vzorcích z dalších zkušebních nádob, s nimiž bylo zacházeno stejným způsobem (včetně přítomnosti zkušebních organismů), ale nebyly použity pro biologická pozorování.

40. Doporučeným postupem izolace intersticiální (= kapilární) vody je odstřeďování např. při odstředivé síle 10 000 g a při 4 °C po dobu 30 minut. Pokud však filtry zkoušenou chemickou látku prokazatelně neadsorbují, je přijatelná i filtrace. V některých případech může být nemožné analýzu koncentrací v kapilární vodě provést kvůli tomu, že vzorek je příliš malý.

Fyzikálně-chemické parametry

41. Hodnotu pH, rozpuštěný kyslík ve zkušební vodě a teplotu vody ve zkušebních nádobách a krystalizačních miskách je nutno měřit vhodným způsobem (viz odstavec 10). Tvrdost a obsah amoniaku by měly být měřeny v kontrolních nádobách a v jedné zkušební nádobě a krystalizační misce při nejvyšší koncentraci na počátku zkoušky a na jejím konci.

ÚDAJE A JEJICH PŘEDKLÁDÁNÍ

Zpracování výsledků

42. Účelem této zkoušky toxicity během životního cyklu je stanovit účinek zkoušené chemické látky na reprodukci a na rychlost vývoje a celkový počet plně vylíhlých, živých samečků a samiček pakomárů po dobu dvou generací. Pro získání údajů o procentu vylíhlých jedinců by údaje o samečcích a samičkách měly být sloučeny. Pokud neexistují statisticky významné rozdíly v citlivosti z hlediska rychlosti vývoje jednotlivých pohlaví, lze výsledky pro samečky a pro samičky sloučit pro účely statistické analýzy.

43. Koncentrace s pozorovanými účinky vyjádřené jako koncentrace ve vodě nad sedimentem (v případě obohacené vody) nebo v sedimentu (v případě obohaceného sedimentu) se obvykle vypočítají na základě koncentrací naměřených na počátku expozice (viz odstavec 38). V případě obohacené vody se proto pro každou expozici stanoví průměrná hodnota koncentrací naměřených obvykle na počátku expozice ve vodě nad sedimentem v nádobách pro obě generace a koncentrací naměřených v krystalizačních miskách. V případě obohaceného sedimentu se pro každou expozici stanoví průměrná hodnota koncentrací naměřených obvykle na počátku expozice v nádobách pro obě generace (a volitelně koncentrací naměřených v krystalizačních miskách).

44. Pro výpočet bodového odhadu, tj. EC_x, lze jako skutečné opakování použít statistiku na jednu nádobu a na jednu chovnou klec. Při výpočtu intervalu spolehlivosti pro každou hodnotu EC_x je nutno zohlednit variabilitu mezi jednotlivými nádobami, případně prokázat, že tato variabilita je tak nízká, že ji lze ignorovat. Je-li u modelu užita metoda nejmenších čtverců, je nutné u statistik jednotlivých nádob uplatnit transformaci za účelem homogenity rozptylu. Hodnoty EC_x je však třeba vypočítat až poté, co byla reakce převedena zpět na původní hodnotu (31).

▼M6

45. Pokud je cílem statistické analýzy stanovení hodnoty NOEC testováním hypotéz, je nutné vzít v úvahu variabilitu mezi nádobami, což zaručí užití metod analýzy rozptylu ANOVA (např. postupy Williamsova a Dunnettova testu). Williamsův test je vhodný, když se teoreticky předpokládá monotónní závislost dávka-odezva, a Dunnettův test je vhodný, pokud hypotéza monotónnosti neplatí. Případně mohou být vhodnější robustnější testy (27), jsou-li porušeny předpoklady obvykle užité při analýze ANOVA (31).

Procento vylíhlých jedinců

46. Procenta vylíhlých jedinců jsou kvantifikovatelné údaje a lze je analyzovat za použití postupně klesajícího Cochranova-Armitageova testu, pokud se předpokládá monotónní závislost dávka-odezva a údaje jsou s tímto očekáváním v souladu. V opačném případě lze použít Fisherův exaktní test nebo Mantelův-Haenszelův test s Bonferroniho-Holmovou korekcí hodnot p. Pokud existují důkazy o větší variabilitě mezi opakováními ve stejné koncentraci, pak by binomické rozdělení (často uváděné jako „extra-binomická“ variabilita) nasvědčovalo tomu, že je nutno použít robustní Cochranův-Armitageův test nebo Fisherův exaktní test, jak je navrhováno v položce seznamu literatury (27).

Určí se součet živých pakomárů (samečků plus samiček) vylíhlých v jedné nádobě, n_e, a ten se vydělí počtem vložených larev, n_a:

$$ER = \frac{n_e}{n_a}$$

kde:

ER = procento vylíhlých jedinců,

n_e = počet živých pakomárů vylíhlých v nádobě,

n_a = počet larev nasazených do nádoby (obvykle 20).

Pokud je n_e větší než n_a (tj. pokud bylo neúmyslně nasazeno více než předpokládaný počet larev), n_a se upraví na hodnotu rovnou n_e.

47. Nejvhodnějším alternativním přístupem pro rozsáhlé vzorky s extra-binomickou variabilitou je zacházet s procentem vylíhlých jedinců jako s kontinuální proměnnou a použít postupy, které jsou konzistentní s těmito údaji *ER*. Rozsáhlý vzorek je zde definován jako situace, při níž jak počet vylíhlých jedinců, tak počet nevylíhlých jedinců přesáhnou v jednom opakování (nádobě) hodnotu pět.

48. Při použití metody ANOVA je nutno hodnoty *ER* nejprve transformovat druhou odmocninou funkce arcsin nebo transformací podle Tukeyho-Freemana s cílem získat přibližné normální rozdělení údajů a vyrovnat odchylky. Při použití absolutních frekvencí lze použít Cochranův-Armitageův test, Fisherův exaktní test (s Bonferroniho korekcí) nebo Mantelův-Haenszelův test. Transformace funkcí √arcsin se vypočte pomocí převrácené hodnoty sinu ($\sin^{-1}$) z odmocniny *ER*.

49. Pro získání procenta vylíhlých jedinců se hodnoty EC_x vypočtou pomocí regresní analýzy (např. pomocí modelu probit, logit nebo Weibullova modelu (28)). V případě selhání regresní analýzy (např. v případě méně než dvou koncentrací s parciálními odezvami) se použijí další neparametrické metody, jako je například klouzavý průměr nebo prostá interpolace.

Rychlost vývoje

50. Střední doba vývoje představuje střední časové rozpětí mezi nasazením larev (den 0 zkoušky) a vylíhnutím experimentální kohorty pakomárů (pro výpočet skutečné doby vývoje by mělo být zohledněno stáří larev

▼M6

v okamžiku zavedení). Rychlost vývoje (jednotka: 1/den) je převrácenou hodnotou doby vývoje a představuje tu část larválního vývoje, která se odehraje za den. Rychlost vývoje je z hlediska hodnocení těchto studií toxicity sedimentů upřednostňována před dobou vývoje vzhledem ke své nižší variabilitě, vyšší homogenitě a vyšší blízkosti normálnímu rozdělení. Mohou být tudíž použity silnější parametrické zkušební postupy pro rychlost vývoje než pro dobu vývoje. Pro rychlost vývoje jako kontinuální odezvu lze hodnoty EC_x stanovit odhadem pomocí regresní analýzy (např. (29)(30)). Hodnotu NOEC pro střední rychlost vývoje lze stanovit metodami analýzy ANOVA, např. Williamsovým nebo Dunnettovým testem. Jelikož se samečci líhnou dříve než samičky, tj. mají vyšší rychlost vývoje, má smysl kromě celkové rychlosti vývoje pakomárů vypočítat i rychlost vývoje pro každé pohlaví zvlášť.

51. Pro účely statistických testů se má za to, že počet pakomárů pozorovaných v den pozorování x se vylíhl uprostřed časového intervalu mezi dnem x a dnem x – 1 (l = délka intervalu mezi pozorováními, obvykle 1 den). Střední rychlost vývoje v nádobě ($\bar{x}$) se vypočte podle vzorce:

$$\bar{x} = \sum_{i=1}^{m} \frac{f_i X_i}{n_e}$$

kde:

$\bar{x}$: střední rychlost vývoje v nádobě,

i: index intervalu mezi pozorováními,

m: počet všech intervalů mezi pozorováními,

f_i: počet vylíhlých jedinců během daného intervalu *i* mezi pozorováními,

n_e: počet vylíhlých jedinců celkem na konci pokusu (Σf_i)

x_i: rychlost vývoje pakomárů vylíhlých v intervalu *i*;

$$x_i = 1/\text{day}_i - \frac{l_i}{2}$$

kde:

day_i: den pozorování (ve dnech od zavedení larev),

l_i: délka intervalu *i* mezi pozorováními (ve dnech, obvykle 1 den).

Poměr pohlaví

52. Poměry pohlaví jsou kvantitativní proměnné, a měly by proto být hodnoceny pomocí Fisherova exaktního testu nebo jiných vhodných metod. Poměr pohlaví u *C. riparius* v přírodě činí jedna, tj. samečci a samičky se vyskytují ve stejných počtech. U obou generací by s údaji o poměru pohlaví mělo být zacházeno stejným způsobem. Jelikož maximální počet pakomárů v nádobě (tj. 20) je příliš nízký pro smysluplnou statistickou

▼M6

analýzu, sloučí se celkový počet plně vylíhlých, živých pakomárů každého pohlaví ze všech nádob při jedné expozici. Tyto netransformované údaje se podrobí testu oproti kontrole (s rozpouštědlem) nebo oproti sloučeným kontrolním údajům v kontingenční tabulce 2 × 2.

Reprodukce

53. Reprodukce, vyjádřená jako reprodukční schopnost, se vypočítá jako počet šňůr vajíček na jednu samičku. Konkrétněji se celkový počet šňůr vajíček nakladených v chovné kleci vydělí celkovým počtem živých a nepoškozených samiček nasazených do této klece. Hodnotu NOEC pro reprodukční schopnost lze stanovit metodami analýzy ANOVA, např. Williamsovým nebo Dunnettovým testem.

54. Fertility šňůr vajíček se užívá ke kvantifikaci počtu plodných šňůr vajíček na jednu samičku. Konkrétněji se celkový počet plodných šňůr vajíček nakladených v chovné kleci vydělí celkovým počtem živých a nepoškozených samiček nasazených do této klece. Hodnotu NOEC pro fertilitu lze stanovit metodami analýzy ANOVA, např. Williamsovým nebo Dunnettovým testem.

Závěrečná zpráva

55. Závěrečná zpráva by měla obsahovat tyto údaje:

Zkoušená chemická látka:

— fyzikální povahu a fyzikálně-chemické vlastnosti (rozpustnost ve vodě, tlak par, log K_{ow}, rozdělovací koeficient v půdě (případně v sedimentu), stabilita ve vodě a v sedimentu atd.),

— chemické identifikační údaje (obecný název, chemický název, strukturní vzorec, číslo CAS atd.) včetně čistoty a analytické metody pro kvantitativní stanovení zkoušené chemické látky.

Testovaný druh:

— užité zkušební organismy: druh, vědecký název, zdroj organismů a podmínky množení,

— informace, jak bylo nakládáno se shluky vajíček a s larvami,

— informace o nakládání s vylíhlými dospělci první generace pomocí exhaustoru atd. (viz dodatek 5),

— stáří zkušebních organismů v době nasazení první a druhé generace do zkušebních nádob.

Zkušební podmínky:

— použitý sediment, tj. přírodní nebo připravený (umělý) sediment,

— u přírodního sedimentu: lokalita a popis místa odběru sedimentu, pokud možno včetně dřívější kontaminace; charakteristika sedimentu: pH, obsah organického uhlíku, poměr C/N a zrnitost (je-li to vhodné),

— u připraveného sedimentu: příprava, složky a charakteristiky (obsah organického uhlíku, pH, vlhkost atd., měřeno na začátku zkoušky),

— příprava zkušební vody (pokud se používá rekonstituovaná voda) a její charakteristiky (koncentrace kyslíku, pH, tvrdost atd. na začátku zkoušky),

▼M6

— hloubka sedimentu a výška vody nad sedimentem ve zkušebních nádobách a v krystalizačních miskách,

— objem vody nad sedimentem a kapilární vody a hmotnost vlhkého sedimentu s kapilární vodou a bez ní ve zkušebních nádobách a v krystalizačních miskách,

— zkušební nádoby (materiál a rozměry),

— krystalizační misky (materiál a rozměry),

— chovné klece (materiál a rozměry),

— metoda přípravy zásobních roztoků a zkušebních koncentrací ve zkušebních nádobách a v krystalizačních miskách,

— aplikace zkoušené chemické látky do zkušebních nádob a krystalizačních misek: zkušební koncentrace, počet opakování a rozpouštědla, jsou-li nutná,

— inkubační podmínky ve zkušebních nádobách: teplota, cyklus a intenzita osvětlení, provzdušňování (bublin za sekundu),

— inkubační podmínky v chovných klecích a v krystalizačních miskách: teplota, cyklus a intenzita osvětlení,

— inkubační podmínky pro šňůry vajíček v mikrotitračních destičkách (nebo v jiných nádobách): teplota, cyklus a intenzita osvětlení,

— podrobné informace o krmení včetně typu krmiva, přípravy, množství a režimu krmení.

Výsledky:

— nominální zkušební koncentrace, naměřené zkušební koncentrace a výsledky všech analýz pro stanovení koncentrace zkoušené chemické látky ve zkušebních nádobách a v krystalizačních miskách,

— kvalita vody ve zkušebních nádobách a v krystalizačních miskách, tj. pH, teplota, rozpuštěný kyslík, tvrdost a obsah amoniaku,

— případné nahrazování odpařené zkušební vody ve zkušebních nádobách,

— počet vylíhlých samečků a samiček pakomárů v první a druhé generaci na nádobu za den,

— poměr pohlaví plně vylíhlých, živých pakomárů v první a druhé generaci při každé expozici,

— počet larev první a druhé generace, z nichž se nevylíhli pakomáři, na nádobu,

— procento vylíhlých jedinců na opakování a zkušební koncentraci (sloučený počet samečků a samiček pakomárů) v první a druhé generaci,

— střední rychlost vývoje plně vylíhlých, živých pakomárů na opakování a aplikované množství (zvlášť pro každé pohlaví a také sloučený počet samečků a samiček pakomárů) v první a druhé generaci,

— počet šňůr vajíček vložených do krystalizačních misek na chovnou klec za den,

▼**M6**

— charakteristika každé šňůry vajíček (velikost, tvar a fertilita);

— reprodukční schopnost – celkový počet šňůr vajíček na celkový počet samiček nasazených do chovné klece,

— fertilita – celkový počet plodných šňůr vajíček na celkový počet samiček nasazených do chovné klece,

— odhady ukazatelů toxicity, např. EC_x (a související intervaly spolehlivosti), NOEC a statistické metody použité k jejímu stanovení,

— diskuse o výsledcích včetně případného ovlivnění výsledku zkoušky v důsledku odchylek od této zkušební metody.

LITERATURA

1) Kapitola C.28 této přílohy, Test toxicity na Chironomidae v systému sediment-voda za použití obohacené vody.

2) Shobanov, N. A., Kiknadze, I. I., and Butler, M. G. (1999) Palearctic and Nearctic Chironomus (Camptochironomus) tentans Fabricius are different species (Diptera: Chironomidae). Entomologica Scandinavica, 30: pp. 311–322.

3) Fleming, R. et al. (1994) Sediment Toxicity Tests for Poorly Water-Soluble Substances, Final Report to the European Commission, Report No: EC 3738. August 1994. WRc, UK.

4) SETAC (1993) Guidance Document on Sediment toxicity Tests and Bioassays for Freshwater and Marine Environments, From the WOSTA Workshop held in the Netherlands.

5) ASTM International (2009) E1706-05E01: Test Method for Measuring the Toxicity of Sediment-Associated Contaminants with Freshwater Invertebrates, In: Annual Book of ASTM Standards, Volume 11.06, Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology. ASTM International, West Conshohocken, PA.

6) Environment Canada (1997) Test for Growth and Survival in Sediment using Larvae of Freshwater Midges (*Chironomus tentans* or *Chironomus riparius*), Biological Test Method, Report SPE 1/RM/32, December 1997.

7) US-EPA (2000) Methods for Measuring the Toxicity and Bioaccumulation of Sediment-associated Contaminants with Freshwater Invertebrates, Second edition, EPA 600/R-99/064, March 2000, Revision to the first edition dated June 1994.

8) US-EPA/OPPTS 850.1735 (1996) Whole Sediment Acute Toxicity Invertebrates.

9) US-EPA/OPPTS 850.1790 (1996) Chironomid Sediment toxicity Test.

10) Milani, D., Day, K.E., McLeay, D.J. and R.S. Kirby (1996) Recent intra- and inter-laboratory studies related to the development and standardisation of Environment Canada's biological test methods for measuring sediment toxicity using freshwater amphipods *(Hyalella azteca)* and midge larvae *(Chironomus riparius),* Technical Report, Environment Canada, National Water Research Institute, Burlington, Ontario, Canada.

11) Norberg-King, T. J., Sibley, P. K., Burton, G. A., Ingersoll, C. G., Kemble, N. E., Ireland, S., Mount, D. R. and Rowland, C. D. (2006) Interlaboratory evaluation of *Hyalella azteca* and *Chironomus tentans* short-term and long-term sediment toxicity tests, Environ. Toxicol. Chem., 25: pp. 2662–2674.

▼**M6**

12) Taenzler, V., Bruns, E., Dorgerloh, M., Pfeifle, V. and Weltje, L. (2007) Chironomids: suitable test organisms for risk assessment investigations on the potential endocrine-disrupting properties of pesticides, Ecotoxicology, 16: pp. 221–230.

13) Sugaya, Y. (1997) Intra-specific variations of the susceptibility of insecticides in *Chironomus yoshimatsui,* Jp. J. Sanit. Zool., 48: pp. 345–350.

14) Kawai, K. (1986) Fundamental studies on chironomid allergy, I. Culture methods of some Japanese chironomids (Chironomidae, Diptera), Jp. J. Sanit. Zool., 37: pp. 47–57.

15) Kapitola C.27 této přílohy, Test toxicity na Chironomidae v systému sediment-voda za použití obohaceného sedimentu.

16) OECD (2000) *Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures*, Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 23, ENV/JM/MONO(2000)6, OECD, Paris.

17) Weltje, L., Rufli, H., Heimbach, F., Wheeler, J., Vervliet-Scheebaum, M. and Hamer, M. (2010) The chironomid acute toxicity test: development of a new test system, Integr. Environ. Assess. Management.

18) Environment Canada (1995) Guidance Document on Measurement of Toxicity Test Precision Using Control Sediments Spiked with a Reference Toxicant, Report EPS 1/RM/30, September 1995.

19) Oetken, M, Nentwig, G., Löffler, D, Ternes, T. and Oehlmann, J. (2005) Effects of pharmaceuticals on aquatic invertebrates, Part I, The antiepileptic drug carbamazepine, Arch. Environ. Contam. Toxicol., 49: pp. 353–361.

20) Suedel, B. C. and Rodgers, J. H. (1994) Development of formulated reference sediments for freshwater and estuarine sediment testing, Environ. Toxicol. Chem., 13: pp. 1163–1175.

21) Naylor, C. and Rodrigues, C. (1995) Development of a test method for *Chironomus riparius* using a formulated sediment, Chemosphere, 31: pp. 3291–3303.

22) Dunnett, C. W. (1964) A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. J. Amer. Statis. Assoc., 50: pp. 1096–1121.

23) Dunnett, C. W. (1964) New tables for multiple comparisons with a control, Biometrics, 20: pp. 482–491.

24) Williams, D. A. (1971) A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics, 27: pp. 103–117.

25) Williams, D. A. (1972) The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics, 28: pp. 510–531.

26) Jungmann, D., Bandow, C., Gildemeister, T., Nagel, R., Preuss, T. G., Ratte, H. T., Shinn, C., Weltje, L. and H. M. Maes (2009) Chronic toxicity of fenoxycarb to the midge *Chironomus riparius* after exposure in sediments of different composition. J Soils Sediments, 9: pp. 94–102.

27) Rao, J. N. K. and Scott, A. J. (1992) A simple method for the analysis of clustered binary data. Biometrics, 48: pp. 577–585.

28) Christensen, E. R. (1984) Dose-response functions in aquatic toxicity testing and the Weibull model, Water Res., 18: pp. 213–221.

▼**M6**

29) Bruce, R. D. and Versteeg, D. J. (1992) A statistical procedure for modelling continuous toxicity data, Environ. Toxicol. Chem., 11: pp. 1485–1494.

30) Slob, W. (2002) Dose-response modelling of continuous endpoints. Toxicol. Sci., 66: pp. 298–312.

31) OECD (2006) Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: a Guidance to Application, OECD Series on Testing and Assessment No. 54, pp. 146, ENV/JM/MONO(2006)18, OECD, Paris.

32) Benoit, D. A., Sibley, P. K., Juenemann, J. L. and Ankley, G. T. (1997) *Chironomus tentans* life-cycle test: design and evaluation for use in assessing toxicity of contaminated sediments, Environ. Toxicol. Chem., 16: pp. 1165–1176.

33) Vogt, C., Belz, D., Galluba, S., Nowak, C., Oetken, M. and Oehlmann, J. (2007) Effects of cadmium and tributyltin on development and reproduction of the non-biting midge *Chironomus riparius* (Diptera) – baseline experiments for future multi-generation studies, J. Environ. Sci. Health Part A, 42: pp. 1–9.

34) OECD (2010) Validation report of the Chironomid full life-cycle toxicity test, Forthcoming publication in the Series on Testing and Assessment, OECD, Paris.

▼**M6**

Dodatek 1

Definice

Pro účely této zkušební metody se použijí tyto definice:

Chemická látka: látka nebo směs.

Připravený sediment nebo rekonstituovaný, umělý nebo syntetický sediment je směs materiálů užitá k napodobení fyzických složek přírodního sedimentu.

Voda nad sedimentem je voda nacházející se nad sedimentem ve zkušební nádobě.

Intersticiální voda nebo kapilární voda je voda zaujímající prostor mezi sedimentem a částicemi půdy.

Obohacená voda je zkušební voda, do níž byla přidána zkoušená chemická látka.

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

▼M6

Dodatek 2

Doporučení pro kultivaci kultury *Chironomus riparius*

1. Larvy rodu *Chironomus* lze chovat v krystalizačních miskách nebo ve větších nádobách. Jemný křemičitý písek se rozprostře po dně nádoby v tenké vrstvě silné 5 až 10 mm. Bylo prokázáno, že substrátem vhodným jako podklad je také křemelina (např. Merck, čl. 8117; dostačující je tenčí vrstva silná jen několik málo mm). Následně se přidá několikacentimetrová vrstva vhodné vody. Objem vody by se měl podle potřeby doplňovat s cílem nahradit ztráty vzniklé odpařováním a zabránit vysychání. Vodu lze v případě potřeby vyměnit. Je třeba zajistit mírné provzdušňování. Nádoby, v nichž jsou larvy chovány, by měly být umístěny ve vhodné kleci, která zabrání úniku líhnoucích se dospělců. Tato klec by měla být dostatečně velká, aby umožňovala rojení vylíhlých dospělců, jinak by nemuselo dojít k páření (minimální rozměry jsou přibližně 30 × 30 × 30 cm).

2. Klece by měly být umístěny při pokojové teplotě nebo v místnosti s konstantní teplotou 20 ± 2 °C s fotoperiodou 16 hodin světlo (intenzita osvětlení přibližně 1 000 luxů) a 8 hodin tma. Bylo zjištěno, že vzdušná vlhkost nižší než 60 % RH může bránit rozmnožování.

Ředicí voda

3. Lze použít jakoukoli vhodnou přírodní nebo syntetickou vodu. Zpravidla se používá studniční voda, odchlorovaná vodovodní voda a umělá média (např. Elendtovo médium „M4“ nebo „M7“, viz níže). Vodu je třeba před použitím provzdušnit. Je-li to nutné, lze kultivační vodu obnovit opatrným odlitím nebo odčerpáním použité vody z kultivačních nádob tak, aby nedošlo k poškození schránek larev.

Krmení larev

4. Larvy rodu *Chironomus* by se měly krmit vločkovým krmivem pro ryby (TetraMin®, Tetra Phyll® nebo jiná podobná značka patentovaného krmiva pro ryby) v množství přibližně 250 mg na nádobu a den. Potravu lze aplikovat v podobě suchého mletého prášku nebo v podobě suspenze ve vodě: 1,0 g vločkového krmiva se přidá do 20 ml ředicí vody a vytvoří se homogenní směs. Tento přípravek lze podávat v množství přibližně 5 ml na nádobu a den (před použitím protřepat). Starším larvám lze přidat více krmiva.

5. Krmení se upraví podle kvality vody. V případě, že se kultivační médium „zakalí“, je třeba krmnou dávku snížit. Přidávání potravy je nutno pečlivě sledovat. Příliš malé množství krmiva způsobí, že larvy opouštějí sediment a vznášejí se ve vodním sloupci, a naopak příliš mnoho krmiva způsobí zvýšenou mikrobiální činnost a pokles koncentrace kyslíku. Obojí může způsobit zpomalení růstu.

6. Do nových kultivačních nádob mohou být přidány i buňky zelených řas (např. *Scenedesmus subspicatus*, *Chlorella vulgaris*).

Krmení vylíhlých dospělců

7. Někteří experimentátoři navrhují, že jako potrava vylíhlých dospělců může sloužit vata namočená do nasyceného roztoku sacharózy.

▼M6

Líhnutí

8. Dospělci se začnou v chovných nádobách líhnout při teplotě 20 ± 2 °C přibližně po 13–15 dnech. Samečky lze snadno odlišit podle vějířovitých tykadel a štíhlého trupu.

Shluky vajíček

9. Jakmile se v chovné kleci nacházejí dospělci, je třeba třikrát týdně kontrolovat všechny reprodukční nádoby, zda se v nich nenacházejí shluky vajíček spojené rosolovitou hmotou. Pokud se zde shluky vajíček nacházejí, je nutno je opatrně odstranit a přemístit do malé misky obsahující vzorek chovného vodního prostředí. Shluky vajíček se použijí pro založení nové kultivační nádoby (např. 2–4 shluky vajíček na nádobu) nebo pro zkoušky toxicity.

10. Larvy prvního instaru by se měly vylíhnout za 2–3 dny.

Zakládání nových kultivačních nádob

11. Jakmile jsou kultury založeny, mělo by být možné s kulturami larev jednou týdně nebo méně často v závislosti na zkušebních požadavcích zakládat nové nádoby a odstraňovat starší nádoby po vylíhnutí dospělců. Pomocí tohoto systému se zajistí pravidelné dodávky dospělců s minimální potřebou dohledu.

Příprava zkušebních roztoků „M4“ a „M7“

12. Médium „M4“ popsal Elendt (1990). Médium „M7“ se připraví obdobně jako médium „M4“ s výjimkou látek uvedených v tabulce 1, u nichž jsou koncentrace u „M7“ čtyřikrát nižší než u „M4“. Podle Elendta a Biase (1990) by se zkušební roztok neměl připravovat, protože pro koncentrace $NaSiO_3 \cdot 5H_2O$, $NaNO_3$, KH_2PO_4 a K_2HPO_4 nejsou pro přípravu zásobních roztoků vhodné.

Příprava média „M7“

13. Každý zásobní roztok (I) se připraví samostatně a z těchto zásobních roztoků (I) se pak připraví kombinovaný zásobní roztok (II) (viz tabulka 1). Médium „M7“ se připraví přidáním 50 ml kombinovaného zásobního roztoku (II) a množství zásobního roztoku jednotlivých makroživin, které jsou uvedeny v tabulce 2, do 1 litru deionizované vody. Vitaminový zásobní roztok se připraví přidáním tří vitaminů do deionizované vody, jak je uvedeno v tabulce 3, a 0,1 ml kombinovaného vitaminového zásobního roztoku se přidá do výsledného média „M7“ krátce před použitím. Vitaminový zásobní roztok se uskladňuje zmrazený v malých stejnoměrných dílech. Médium se provzdušní a stabilizuje.

Tabulka 1

Zásobní roztoky stopových prvků pro médium M4 a M7

Zásobní roztoky (I)	Množství (mg) doplněné na 1 litr deionizované vody	Kombinovaný zásobní roztok (II) se připraví smícháním následujících množství (v ml) zásobních roztoků (I) a doplněním na 1 litr deionizované vody		Konečné koncentrace ve zkušebním roztoku (mg/l)	
		M4	M7	M4	M7
H_3BO_3 [1]	57 190	1,0	0,25	2,86	0,715
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$ [1]	7 210	1,0	0,25	0,361	0,090
LiCl [1]	6 120	1,0	0,25	0,306	0,077

▼**M6**

Zásobní roztoky (I)	Množství (mg) doplněné na 1 litr deionizované vody	Kombinovaný zásobní roztok (II) se připraví smícháním následujících množství (v ml) zásobních roztoků (I) a doplněním na 1 litr deionizované vody		Konečné koncentrace ve zkušebním roztoku (mg/l)	
		M4	M7	M4	M7
RbCl (1)	1 420	1,0	0,25	0,071	0,018
$SrCl_2 \cdot 6H_2O$ (1)	3 040	1,0	0,25	0,152	0,038
NaBr (1)	320	1,0	0,25	0,016	0,004
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ (1)	1 260	1,0	0,25	0,063	0,016
$CuCl_2 \cdot 2H_2O$ (1)	335	1,0	0,25	0,017	0,004
$ZnCl_2$	260	1,0	1,0	0,013	0,013
$CaCl_2 \cdot 6H_2O$	200	1,0	1,0	0,010	0,010
KI	65	1,0	1,0	0,0033	0,0033
Na_2SeO_3	43,8	1,0	1,0	0,0022	0,0022
NH_4VO_3	11,5	1,0	1,0	0,00058	0,00058
$Na_2EDTA \cdot 2H_2O$ (1) (2)	5 000	20,0	5,0	2,5	0,625
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (1) (2)	1 991	20,0	5,0	1,0	0,249

(1) Tyto chemické látky se u M4 a M7 liší, jak je uvedeno výše.
(2) Tyto roztoky se připravují samostatně, spojí se a ihned se zpracují v autoklávu.

Tabulka 2

Zásobní roztoky makroživin pro médium M4 a M7

	Množství doplněné na 1 litr deionizované vody (mg)	Množství zásobních roztoků makroživin přidané za účelem přípravy média M4 a M7 (ml/l)	Konečné koncentrace ve zkušebním roztoku M4 a M7 (mg/l)
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	293 800	1,0	293,8
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	246 600	0,5	123,3
KCl	58 000	0,1	5,8
$NaHCO_3$	64 800	1,0	64,8
$NaSiO_3 \cdot 9H_2O$	50 000	0,2	10,0
$NaNO_3$	2 740	0,1	0,274
KH_2PO_4	1 430	0,1	0,143
K_2HPO_4	1 840	0,1	0,184

▼**M6**

Tabulka 3

Vitaminový zásobní roztok pro médium M4 a M7

Všechny tři vitaminové roztoky se smísí do jediného vitaminového zásobního roztoku.

	Množství doplněné na 1 litr deionizované vody (mg)	Množství vitaminového zásobního roztoku přidané za účelem přípravy média M4 a M7 (ml/l)	Konečné koncentrace ve zkušebním roztoku M4 a M7 (mg/l)
Thiaminhydrochlorid	750	0,1	0,075
Kyanokobalamin (B12)	10	0,1	0,0010
Biotin	7,5	0,1	0,00075

ODKAZY

BBA (1995), Long-term toxicity test with *Chironomus riparius*: Development and validation of a new test system, Edited by M. Streloke and H. Köpp. Berlin.

Elendt, B.P. (1990) Selenium deficiency in Crustacea, Protoplasma, 154: pp. 25–33.

Elendt, B. P. and Bias, W.-R. (1990) Trace nutrient deficiency in *Daphnia magna* cultured in standard medium for toxicity testing, Effects on the optimisation of culture conditions on life history parameters of *D. magna*, Water Research, 24: pp. 1157–1167.

▼M6

Dodatek 3

Příprava umělého sedimentu

SLOŽENÍ SEDIMENTU

Složení připraveného sedimentu by mělo být následující:

Složka	Charakteristika	% sušiny sedimentu
Rašelina	rašeliníková (*Sphagnum*) rašelina s pH co nejblíže 5,5 až 6,0, bez viditelných zbytků rostlin a jemně mletá (velikost částic ≤ 1 mm) a vysušená na vzduchu	4–5
Křemičitý písek	velikost zrn: > 50 % částic musí být v rozpětí 50–200 μm	75–76
Kaolinitický jíl	obsah kaolinitu ≥ 30 %	20
Organický uhlík	upraven přidáním rašeliny a písku	2 (± 0,5)
Uhličitan vápenatý	$CaCO_3$, práškový, chemicky čistý	0,05–0,1
Voda	vodivost ≤ 10 μS/cm	30–50

PŘÍPRAVA

Rašelina se usuší na vzduchu a rozemele se na jemný prášek. Připraví se suspenze požadovaného množství rašelinného prášku v deionizované vodě s použitím vysoce výkonného homogenizačního zařízení. pH této suspenze se pomocí $CaCO_3$ upraví na 5,5 ± 0,5. Suspenze se po dobu nejméně dvou dnů za mírného promíchávání při 20 ± 2 °C kondicionuje za účelem stabilizace pH a vytvoření stabilní mikrobiální složky. Poté se opět změří pH, které by se mělo rovnat 6,0 ± 0,5. Následně se suspenze rašeliny smísí s ostatními složkami (písek a jíl) a s deionizovanou vodou s cílem získat homogenní sediment s obsahem vody v rozmezí 30–50 % sušiny sedimentu. Znovu se změří pH konečné směsi a v případě nutnosti se opět upraví pomocí $CaCO_3$ na hodnotu 6,5 až 7,5. Odeberou se vzorky sedimentu pro stanovení obsahu sušiny a obsahu organického uhlíku. Před použitím pro zkoušku toxicity pro pakomáry se doporučuje připravený sediment kondicionovat po dobu 7 dnů za stejných podmínek, které budou převládat v následné zkoušce.

SKLADOVÁNÍ

Suché složky pro přípravu umělého sedimentu lze skladovat na suchém a chladném místě při pokojové teplotě. Připravený (vlhký) sediment by před použitím ve zkoušce neměl být skladován. Měl by se použít ihned po uplynutí 7denního období kondicionování, kterým končí jeho příprava.

ODKAZY

OECD (1984), *Earthworm, Acute Toxicity Test*, Test Guideline No. 207, Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD, Paris.

Meller, M., Egeler, P., Roembke, J., Schallnass, H., Nagel, R. and Streit, B. (1998) Short-term toxicity of lindane, hexachlorobenzene and copper sulfate on tubificid sludgeworms (Oligochaeta) in artificial media, Ecotox. Environ. Safety, 39: pp. 10–20.

▼**M6**

Dodatek 4

Chemické charakteristiky přípustné ředicí vody

SLOŽKA	KONCENTRACE
Pevné částice	< 20 mg/l
Celkový obsah organického uhlíku	< 2 mg/l
Neionizovaný amoniak	< 1 µg/l
Tvrdost vyjádřená jako obsah $CaCO_3$	< 400 mg/l (*)
Zbytkový chlor	< 10 µg/l
Celkový obsah organofosfátových pesticidů	< 50 ng/l
Celkový obsah organochlorových pesticidů a polychlorovaných bifenylů	< 50 ng/l
Celkový obsah organických sloučenin chloru	< 25 ng/l

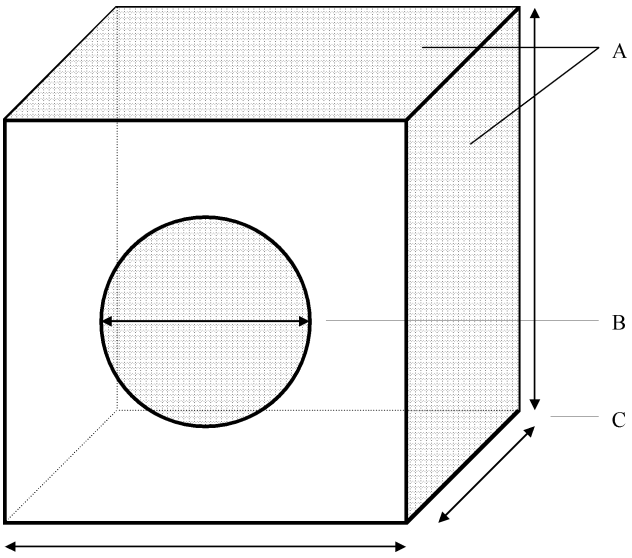
(*) Je však třeba poznamenat, že v případech, kdy existuje podezření na interakci mezi ionty způsobujícími tvrdost vody a zkoušenou látkou, by měla být použita voda nižší tvrdosti (v takovéto situaci by tedy nemělo být použito Elendtovo médium M4).

▼**M6**

Dodatek 5

Pokyny pro provedení zkoušky

Příklad chovné klece:



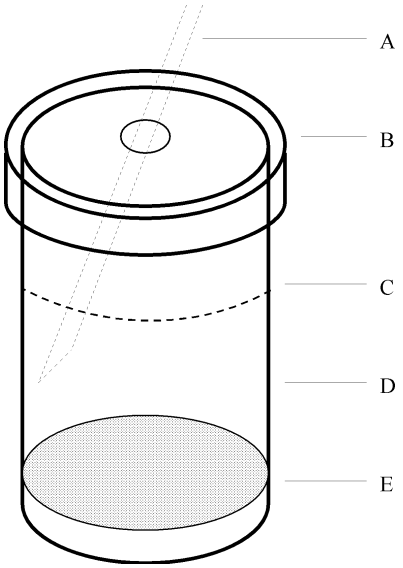
A: gáza pokrývající vrchní část a nejméně jednu stěnu klece (velikost ok přibližně 1 mm)

B: otvor pro vkládání vylíhlých dospělců do chovné klece a odstraňování nakladených šňůr vajíček z krystalizačních misek (na tomto nákresu nejsou zobrazeny)

C: minimální velikost chovné klece: délka 30 cm, výška 30 cm a šířka 30 cm

▼**M6**

Příklad zkušební nádoby:



A: Pasteurova pipeta pro provzdušňování vody nad sedimentem

B: skleněné víčko bránící vylíhlým pakomárům v opuštění nádoby

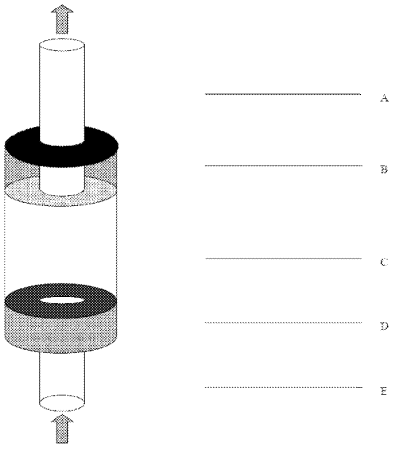
C: hladina vody

D: zkušební nádoba (skleněná kádinka, minimální objem 600 ml)

E: vrstva sedimentu

▼**M6**

Příklad exhaustoru pro odchyt dospělých pakomárů (šipky znázorňují směr proudu vzduchu)



A: skleněná trubice (vnitřní průměr přibližně 5 mm) propojená se samonasávacím čerpadlem

B: zátka z vulkanizované pryže, jíž prochází skleněná trubice (A). Z vnitřní strany je vyústění skleněné trubice (A) obloženo určitým množstvím bavlny a gázou (velikost ok přibližně 1 mm) s cílem zamezit poškození pakomárů, když jsou vtahováni do exhaustoru

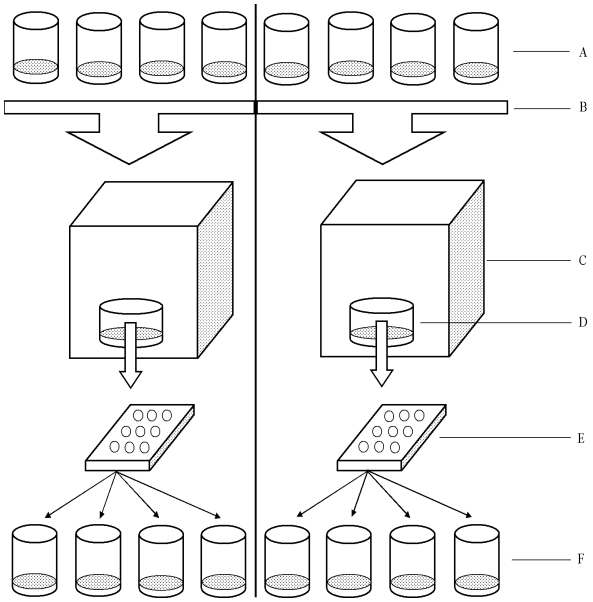
C: průhledná nádržka (plastová nebo skleněná, délka přibližně 15 cm) pro odchycené pakomáry

D: zátka z vulkanizované pryže, jíž prochází skleněná trubice (E). Pro vypuštění do chovné klece se zátka D vyjme z nádoby C

E: trubice (plastová nebo skleněná, vnitřní průměr přibližně 8 mm) k odběru dospělých pakomárů z nádoby

▼**M6**

Schematický přehled zkoušky toxicity během životního cyklu:



A: první generace – zkušební nádoby obsahující systém sediment-voda, osm opakování, 20 larev prvního instaru v každé nádobě

B: čtyři zkušební nádoby pro každou chovnou klec, A a B

C: chovné klece (A a B) pro rojení, páření a kladení vajíček

D: krystalizační misky pro odkládání šňůr vajíček

E: mikrotitrační destičky, jedna jamka na každou šňůru vajíček

F: druhá generace – zkušební nádoby obsahující systém sediment-voda, osm opakování, 20 larev prvního instaru v každé nádobě.

▼M6

C.41. ZKOUŠKA POHLAVNÍHO VÝVOJE RYB

ÚVOD

1. Tato zkušební metoda je rovnocenná Pokynu OECD pro zkoušení č. 234 (2011). Je založena na rozhodnutí přijatém v roce 1998 s cílem vyvinout nové nebo aktualizovat stávající zkušební metody pro screening a zkoušky potenciálních endokrinních disruptorů. Zkouška pohlavního vývoje ryb (FSDT) byla označena za slibnou zkušební metodu zahrnující citlivé životní stadium ryb, kdy reagují na chemické látky typu estrogenů a androgenů. V letech 2006 až 2013 byly k této zkušební metodě provedeny mezilaboratorní validační studie, při kterých byly validovány zkoušky s halančíkem japonským (*Oryzias latipes*), daniem pruhovaným (*Danio rerio*) a koljuškou tříostnou (*Gasterosteus aculeatus*) a částečně validována zkouška s jelečkem velkohlavým (*Pimephales promelas*) (41)(42)(43). Tento pokyn zahrnuje halančíka japonského, koljušku tříostnou a danio pruhované. Pokyn v zásadě navazuje na pokyn OECD TG 210 Zkouška toxicity na raných životních stadiích ryb (1), přičemž expozice pokračuje, dokud nedojde k pohlavní diferenciaci ryb, tj. přibližně 60 dní po vylíhnutí pro halančíka japonského, koljušku tříostnou a dania pruhovaného (u jiných druhů, které budou validovány v budoucnu, může být doba expozice kratší), a je doplněn o ukazatele citlivosti endokrinního systému. Zkouška FSDT hodnotí účinky chemických látek, které by mohly způsobovat poruchy endokrinního systému (např. estrogenů, androgenů a inhibitorů steroidogeneze), v raném životním stadiu a případné nepříznivé důsledky těchto chemických látek pro pohlavní vývoj. Kombinace dvou základních endokrinních ukazatelů, koncentrace vitelogeninu (VTG) a fenotypový poměr pohlaví, umožňuje při této zkoušce prokázat mechanismus působení zkoušené chemické látky. V důsledku změny ve fenotypovém poměru pohlaví, která je významná z hlediska populace, může být zkouška FSDT použita k posouzení nebezpečí a rizik. Nicméně pokud se zkouška použije k posouzení nebezpečí nebo rizik, neměla by být prováděna na koljušce, protože z dosud dostupných validačních údajů vyplývá, že u tohoto druhu nebyly změny ve fenotypovém poměru pohlaví vyvolané zkoušenými chemickými látkami obvykle pozorovány.

2. Metoda je založena na expozici ryb chemickým látkám prostřednictvím vody v pohlavně labilním období, kdy lze očekávat, že ryba je vůči účinkům chemických látek způsobujících poruchy endokrinního systému, které interferují s pohlavním vývojem, nejcitlivější. Jsou měřeny dva základní ukazatele – indikátory vývojových vad souvisejících s endokrinním systémem, a to koncentrace VTG a poměry pohlaví určené histologií pohlavních žláz. Histopatologie pohlavních žláz (hodnocení a určení stadií oocytů a spermatogenetických buněk) je volitelná. Tam, kde je to možné (např. u halančíka japonského a koljušky tříostné) se navíc určí genetické pohlaví. Přítomnost markerů genetického pohlaví je značnou výhodou, neboť zvyšuje průkaznost statistických údajů o poměru pohlaví a umožňuje zjistit fenotypovou změnu pohlaví jedinců. Jinými klíčovými ukazateli, které by měly být měřeny, jsou míra vylíhnutí, přežití, délka a tělesná hmotnost. Tuto zkušební metodu by bylo možno přizpůsobit i pro jiné druhy, než které byly uvedeny výše, a to za předpokladu, že tyto jiné druhy projdou stejnou validací, jako byla validace provedená pro halančíka japonského, koljušku tříostnou a danio pruhované, kontrolní ryby budou na konci zkoušky pohlavně diferencované, úrovně VTG budou dostatečně vysoké, aby bylo možné zjistit významné změny související s chemickou látkou, a citlivost zkušebního systému byla stanovena pomocí referenčních chemických látek ovlivňujících funkci endokrinního systému ((anti)-estrogenů, (anti)-androgenů, inhibitorů aromatázy atd.). Veškeré validační zprávy odkazující na údaje zkoušky FSDT s užitím jiných druhů musí přezkoumat OECD a výsledek validace musí být shledán dostatečným.

▼M6

Výchozí úvahy a omezení

3. VTG obvykle vzniká v játrech samiček vejcorodých obratlovců v reakci na endogenní estrogen v krevním oběhu (2). Je to prekurzor žloutkových proteinů a poté, co vznikne v játrech, putuje krevním řečištěm do vaječníku, kde je spotřebováván a modifikován vyvíjejícími se jikrami. Syntéza VTG je velmi omezená, ale zjistitelná, u nedospělých ryb a dospělých rybích samečků, protože nemají dostatek estrogenu v krevním oběhu. Játra jsou však schopna syntetizovat a vylučovat VTG jako reakci na exogenní stimulaci estrogenem (3)(4)(5).

4. Měření VTG slouží k zjištění chemických látek s estrogenními, antiestrogenními a androgenními účinky a chemických látek, jež interferují se steroidogenezí, jako například s inhibitory aromatázy. Zjišťování estrogenních chemických látek je možné pomocí měření indukce VTG u samečků ryb a bylo rozsáhle zdokumentováno v recenzované vědecké literatuře. Indukce VTG byla rovněž prokázána na základě expozice aromatizovatelným androgenům (6)(7). Pokles úrovně estrogenu v krevním oběhu u samiček, například prostřednictvím inhibice aromatázy, která endogenní androgen přeměňuje v přírodní estrogen 17-beta-estradiol, způsobuje snížení koncentrace VTG, což se používá k zjištění chemických látek s vlastnostmi způsobujícími inhibici aromatázy, nebo obecněji inhibitorů steroidogeneze (33). Biologický význam odezvy v podobě produkce VTG po inhibici estrogenu/aromatázy byl potvrzen a široce zdokumentován (8)(9). Je však možné, že tvorba VTG u samiček může být ovlivněna také obecnou toxicitou a toxickými účinky jiného než endokrinního charakteru.

5. Několik metod měření bylo úspěšně vyvinuto a standardizováno pro běžné použití za účelem stanovení hladiny VTG ve vzorcích krve, jater, celého těla nebo homogenátu hlavy/ocasu. Je tomu tak v případě dania pruhovaného, koljušky tříostné a halančíka japonského a také u částečně validovaného druhu jelečka velkohlavého; k dispozici jsou metody enzymové imunosorpční analýzy (ELISA) specifické pro jednotlivé druhy, které pro stanovení hladiny VTG využívají imunochemie (5)(10)(11)(12)(13)(14)(15)(16). U halančíka japonského a dania pruhovaného je dobrá korelace mezi úrovněmi VTG měřenými z krevní plazmy, jater a vzorků homogenátů, ačkoli homogenáty často vykazují poněkud nižší hodnoty VTG než plazma (17)(18)(19). Doporučené postupy pro odběr vzorků pro účely analýzy VTG jsou uvedeny v dodatku 5.

6. Změna ve fenotypovém poměru pohlaví je ukazatel, který vyjadřuje změnu pohlaví. Poměr pohlaví vyvíjejících se ryb mohou v zásadě ovlivnit estrogeny, antiestrogeny, androgeny, antiandrogeny a chemické látky inhibující steroidogenezi (20). Bylo prokázáno, že u dania pruhovaného je tato změna po expozici chemickým látkám typu estrogenů pohlaví částečně zvratná (21), zatímco změna pohlaví po expozici chemickým látkám typu androgenů je změna pohlaví trvalá (30). Pohlaví jsou definována jako samečci, samičky, intersexuálové (s oocyty i spermatogernetickými buňkami v jedné gonádě) nebo nediferencované a u jednotlivých ryb se určují histologickým vyšetřením gonád. Pokyny jsou obsaženy v dodatku 7 a v pokynu OECD k diagnostice histopatologie pohlavních žláz ryb v souvislosti s endokrinním systémem (22).

7. Genetické pohlaví se vyšetřuje prostřednictvím genetických markerů, pokud existují u daných druhů ryb. U halančíka japonského lze samičí chromozomy XX nebo samčí chromozomy XY zjistit pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR) nebo lze analyzovat geny vázané v DM doméně chromozomu Y (DMY) (DMY negativní nebo pozitivní), jak je popsáno v položkách seznamu literatury (23)(24). Pro určení genetického pohlaví u koljušky

▼M6

tříostné existuje ekvivalentní metoda PCR, popsaná v dodatku 10. Pokud lze genetické pohlaví v jednotlivých případech spojit s fenotypovým pohlavím, průkaznost zkoušky se zvýší, a proto by u druhů se zdokumentovanými markery genetického pohlaví mělo být genetické pohlaví určeno.

8. Dva klíčové endokrinní ukazatele, VTG a poměr pohlaví, mohou v kombinaci prokázat endokrinní účinky chemické látky (tabulka 1). Poměr pohlaví je biologický marker významný z hlediska populace (25)(26) a u některých dobře definovaných účinků mohou být výsledky zkoušky FSDT, bude-li to regulační agentura považovat za vhodné, použity pro účely posouzení nebezpečí a rizik. Mechanismy účinků jsou v současnosti estrogeny, androgeny a inhibitory steroidogeneze.

Tabulka 1

Reakce endokrinních ukazatelů na různé mechanismy účinků chemických látek

↑= vzrůstající, ↓= klesající, — = nebylo zkoumáno

Mechanismus účinku	VTG ♂	VTG ♀	Poměr pohlaví	Odkazy
Slabý agonista estrogenu	↑	↑	↑ ♀ nebo ↑ nedif	(27)(40)
Silný agonista estrogenu	↑	↑	↑ ♀ nebo ↑ nedif, žádný ♂	(28)(40)
Antagonista estrogenu	—	—	↑ ♀ nebo ↑ nedif	(29)
Agonista androgenu	↓ nebo —	↓ nebo —	↑♂, žádný ♀	(28)(30)
Antagonista androgenu	—	—	↑ ♀ ↑ intersex.	(31)
Inhibitor aromatázy	↓	↓	↓ ♀	(33)

9. Zkouška FSDT nepokrývá reprodukční životní stadium ryb a chemické látky, u nichž existuje podezření, že ovlivňují reprodukci při nižších koncentracích, než při jakých ovlivňují pohlavní vývoj, by měly být zkoumány ve zkoušce, která zahrnuje reprodukci.

10. Definice pro účely této zkušební metody jsou uvedeny v dodatku 1.

11. Zkouška FSDT *in vivo* je určena k zjištění chemických látek s androgenními a estrogenními vlastnostmi a rovněž chemických látek s antiandrogenními, antiestrogenními vlastnostmi a vlastnostmi způsobujících inhibici steroidogeneze. Validační fáze zkoušky FSDT (fáze 1 a 2) zahrnovala estrogenní, androgenní chemické látky a inhibitory steroidogeneze. Účinky antagonistů estrogenů a antagonistů androgenů ve zkoušce FSDT lze dohledat v tabulce 1, avšak tyto účinky jsou v současnosti méně zdokumentovány.

PODSTATA ZKOUŠKY

12. Při této zkoušce jsou ryby, počínaje čerstvě oplodněnými jikrami až po ryby s ukončenou diferenciací pohlaví, vystaveny nejméně třem koncentracím zkoušené chemické látky rozpuštěné ve vodě. Zkušební podmínky by měly být průtokové, pokud to není nemožné z důvodu nedostupnosti nebo povahy (tj. omezené rozpustnosti) zkoušené chemické látky. Zkouška začíná nasazením čerstvě oplodněných jiker (před rýhováním blastuly) do zkušebních komor. Obsádka komor je pro každý druh popsána v odstavci 27. U validovaných druhů ryb, halančíka japonského, koljušky tříostné

▼M6

a dania pruhovaného, se zkouška ukončí 60. den po vylíhnutí. Po ukončení zkoušky se všechny ryby humánně usmrtí. Z každé ryby se odebere biologický vzorek (krevní plazma, játra nebo homogenát hlavy/ocasu) pro analýzu VTG a zbytek se fixuje pro histologické hodnocení pohlavních žláz s cílem určit fenotypové pohlaví; volitelně lze provést histopatologii (např. určení stadia gonád, míru výskytu intersexuálů). U druhů s příslušnými markery (dodatky 9 a 10) se odebere biologický vzorek (řitní nebo hřbetní ploutev) pro určení genetického pohlaví.

13. Přehled příslušných zkušebních podmínek specifických pro validované druhy, halančíka japonského, koljušku tříostnou a danio pruhované, je uveden v dodatku 2.

INFORMACE O ZKOUŠENÉ CHEMICKÉ LÁTCE

14. Měly by být dostupné výsledky zkoušky akutní toxicity [např. zkušební metody C.14 (34) a OECD TG 210 (1)], přednostně provedené s druhy zvolenými pro tuto zkoušku. To znamená, že je známa rozpustnost zkoušené látky ve vodě a tlak jejích par a je k dispozici spolehlivá analytická metoda pro stanovení množství látky ve zkušebních komorách, a to se známou a doloženou přesností a známou mezí stanovitelnosti.

15. Dalšími užitečnými informacemi jsou strukturní vzorec, čistota chemické látky, její stálost ve vodě a na světle, pKa, P_{ov} a výsledky zkoušky snadné biologické rozložitelnosti (zkušební metoda C.4) (35).

Kritéria přijatelnosti zkoušky

16. Aby byly výsledky zkoušky přijatelné, musí být splněny tyto podmínky:

— koncentrace rozpuštěného kyslíku by po celou dobu zkoušky měla činit nejméně 60 % hodnoty nasycení vzduchem (ASV),

— teplota vody ve zkušebních komorách by se v kterémkoli čase během doby expozice neměla lišit o více než ± 1,5 °C a měla by být udržována v teplotních rozmezích stanovených pro jednotlivé zkušební druhy (dodatek 2),

— měla by být k dispozici validovaná metoda pro analýzu zkoušené chemické látky s mezí stanovitelnosti výrazně nižší, než je nejnižší jmenovitá koncentrace, a měly by být shromážděny důkazy potvrzující, že koncentrace zkoušené chemické látky v roztoku byly uspokojivě udržovány v rozmezí ± 20 % středních naměřených hodnot,

— celková míra přežití oplodněných jiker v kontrolních skupinách a případně také v kontrolních skupinách s rozpouštědlem by měla být rovna limitům stanoveným v dodatku 2 nebo vyšší,

— kritéria přijatelnosti týkající se růstu a poměru pohlaví při ukončení zkoušky jsou založena na údajích z kontrolních skupin (sloučené kontrolní skupiny s rozpouštědlem a s vodou; pokud se významně neliší, pak pouze kontroly s rozpouštědlem):

▼M6

		Halančík japonský	Danio pruhované	Koljuška tříostná
Růst	Živá hmotnost ryby (po osušení do sucha)	> 150 mg	> 75 mg	> 120 mg
	Délka (standardní délka)	> 20 mm	>14 mm	>20 mm
Poměr pohlaví (% samečků nebo samiček)		30–70 %	30–70 %	30–70 %

— pokud je užito rozpouštědla, nemělo by mít statisticky významný účinek na přežití a nemělo by způsobovat žádné poruchy endokrinního systému nebo mít jiné nepříznivé účinky na raná životní stadia, což bylo potvrzeno kontrolou s rozpouštědlem.

Je-li zjištěno nedodržení kritérií přijatelnosti zkoušky, měly by být zváženy důsledky z hlediska spolehlivosti zkušebních údajů a tyto úvahy by měly být zahrnuty do zpráv.

POPIS ZKUŠEBNÍ METODY

Zkušební komory

17. Lze použít komory ze skla, nerezové oceli nebo z jiného chemicky inertního materiálu. Rozměry komor by měly být dostatečně velké, aby umožňovaly dodržení kritérií obsádky, která jsou uvedena níže. Je žádoucí, aby komory byly umístěny ve zkušebním prostoru náhodně. Pro zcela náhodné uspořádání se upřednostňuje náhodně blokové uspořádání, při kterém je každá koncentrace přítomna v každém bloku. Zkušební komory by měly být chráněny před nežádoucími rušivými vlivy.

Výběr druhů

18. Doporučené druhy ryb jsou uvedeny v dodatku 2. Postupy pro zařazení nových druhů jsou uvedeny v odstavci 2.

Chov matečných ryb

19. Podrobnosti o chovu matečných ryb za uspokojivých podmínek lze nalézt v dokumentu OECD TG 210 (1). Matečné ryby je třeba krmit jednou nebo dvakrát denně vhodným krmivem.

Chov embryí a plůdků

20. Embrya a plůdky mohou být uvnitř hlavní nádrže nejprve exponovány v menších nádobách ze skla nebo nerezové oceli s pletivovými stěnami nebo konci, aby nádobami mohla proudit zkoušená chemická látka. Nevířivého průtoku nádobami lze dosáhnout jejich zavěšením do ramen, pomocí nichž lze pohybovat nádobami nahoru a dolů, přičemž organismy zůstanou stále ponořeny.

21. Jsou-li k odchovu jiker v hlavní nádrži použity nádoby, mřížky nebo pletiva, měly by být po vylíhnutí plůdků odstraněny, pokud ovšem nemají být ponechány k zamezení úniku ryb. Je-li třeba plůdky přemístit, neměly by být vystaveny vzduchu a k jejich vyjmutí z nádob by se neměly používat síťky. Načasování přemístění se liší podle druhu a přemístění nemusí být vždy nutné.

▼M6

Voda

22. Pro tuto zkoušku je vhodná jakákoli voda, ve které zkušební druhy z kontrolních skupin přežívají alespoň tak, jako ve vodě popsané v dodatku 3. Po celou dobu zkoušky by měla mít stejnou kvalitu. Aby bylo zajištěno, že voda neovlivní výsledky zkoušky (například reakcí se zkoušenou chemickou látkou) nebo nebude mít nepříznivý vliv na stav matečných ryb, měly by být v pravidelných intervalech odebírány vzorky na analýzu. Je-li kvalita ředicí vody relativně stálá, měl by se měřit celkový obsah organického uhlíku, vodivost, pH a suspendované látky, například každé tři měsíce. Je-li kvalita vody problematická, měl by být stanoven obsah těžkých kovů (např. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni), hlavních aniontů a kationtů (např. Ca^{2+}, Mg^{2+}, Na^{+}, K^{+}, Cl^{-}, SO_4^{2-}) a pesticidů. Podrobnosti o chemické analýze a odběru vody jsou uvedeny v odstavci 34.

Zkušební roztoky

23. Je-li to proveditelné, měl by být použit průtokový systém. Pro zjištění řady koncentrací při průtokových zkouškách je nezbytný systém, který nepřetržitě dávkuje a ředí zásobní roztok zkoušené chemické látky (např. dávkovací čerpadlo, zařízení pro poměrné ředění a sytící systém). Průtok zásobních roztoků a ředicí vody by měl být při zkoušce v určitých intervalech kontrolován a v jejím průběhu by se neměl měnit o více než 10 %. Jako vhodný byl shledán průtok odpovídající výměně alespoň pětinásobku objemu nádrže za 24 hodin (1). Mělo by se dbát na to, aby nebyly použity trubky z plastu nebo jiné materiály, z nichž některé mohou obsahovat biologicky aktivní látky nebo mohou zkoušenou chemickou látku adsorbovat.

24. Zásobní roztok by měl být připraven pokud možno bez použití rozpouštědel jednoduchým mechanickým mícháním zkoušené chemické látky v ředicí vodě nebo jejím protřepáváním (např. mechanickým čeřením nebo pomocí ultrazvuku). Je-li zkoušená chemická látka obtížně rozpustná ve vodě, měl by se použít postup popsaný v pokynu OECD ke zkouškám toxicity složitých látek a směsí pro vodní organismy (36). Rozpouštědla by se používat neměla, ale v některých případech mohou být pro vytvoření zásobního roztoku o vhodné koncentraci nezbytná. Příklady vhodných rozpouštědel lze nalézt v seznamu literatury (36).

25. Semistatické zkušební podmínky by používány být neměly, pokud pro to nebudou naléhavé důvody související se zkoušenou chemickou látkou (např. stálost, omezená dostupnost, vysoké náklady nebo nebezpečnost). U semistatických technik mohou být použity dva různé výměnné postupy: buď se do čistých nádrží připraví nové zkušební roztoky a přežívající jikry a plůdky se do těchto nových nádrží opatrně přenesou, nebo se zkušební organismy ponechají ve zkušebních nádržích a denně se vymění určitý podíl (alespoň dvě třetiny) zkušební vody.

POSTUP

Podmínky expozice

Sběr jiker a délka expozice

26. Aby nedošlo ke geneticky podmíněnému zkreslení, odeberou se jikry nejméně od třech chovných párů nebo skupin, smíchají se a pro zahájení zkoušky se náhodně vyberou. V případě koljušky tříostné je popis umělého oplodnění uveden v dodatku 11. Zkouška se zahájí co nejdříve po oplodnění jiker, embrya se ponoří do zkušebních roztoků nejlépe ještě před započetím

▼M6

rýhování blastuly nebo co nejdříve po tomto stadiu, avšak nejpozději 12 h po oplodnění. Zkouška by měla pokračovat až do dokončení pohlavní diferenciace v kontrolní skupině (60 dní po vylíhnutí u halančíka japonského, koljušky tříostné a dania pruhovaného).

Nasazování

27. Počet oplodněných jiker na počátku zkoušky by měl být nejméně 120 pro každou koncentraci, rozdělených mezi alespoň 4 opakování (přijatelné je přidělení ke kontrolním skupinám podle druhé odmocniny). Jikry by měly být (pomocí statistických tabulek pro randomizaci) náhodně rozděleny mezi varianty expozice. Velikost násady (pro definici viz dodatek 1) by měla být tak nízká, aby bez přímého provzdušňování nádrží bylo možné udržet koncentrace rozpuštěného kyslíku alespoň na 60 % hodnoty ASV. U průtokových zkoušek se doporučuje nasazování nepřevyšující 0,5 g/l za 24 hodin a v žádném okamžiku nepřekračující 5 g/l roztoku. Nejpozději 28 dnů po oplodnění by počet ryb v jednotlivých opakováních měl být upraven tak, aby každé opakování obsahovalo pokud možno stejný počet ryb. Dojde-li v souvislosti s expozicí k úhynům, počet opakování by měl být vhodně snížen tak, aby bylo možné udržet pokud možno stejnou hustotu ryb mezi úrovněmi expozice.

Světlo a teplota

28. Fotoperioda a teplota vody by měly vyhovovat zkušebním druhům (viz zkušební podmínky pro zkoušku FSDT v dodatku 2).

Krmení

29. Potrava a krmení mají zásadní význam a v každém stadiu je nezbytné poskytovat vhodnou potravu v přiměřených časových intervalech a na úrovni dostatečné k podpoře normálního růstu. Krmit je třeba *ad libitum*, avšak zároveň minimalizovat přebytek potravy. K zajištění dostatečné rychlosti růstu by rybám měla být potrava podávána alespoň dvakrát denně (o víkendech je přijatelné jednou denně), s alespoň tříhodinovým intervalem mezi jednotlivými krmeními. Zbytky potravy a výkaly se, je-li to nutné, odstraní, aby nedošlo k hromadění odpadu. S přibývajícími zkušenostmi se potrava a režimy krmení neustále zdokonalují s cílem zlepšit schopnost přežití a optimalizovat růst. Proto by mělo být dbáno na to, aby byl navrhovaný režim schválen uznávanými odborníky. 24 hodin před ukončením zkoušky by krmení mělo být ukončeno. Příklady vhodné stravy jsou uvedeny v dodatku 2 (viz rovněž pokyn OECD pro testování ryb (39).

Zkušební koncentrace

30. Zkoušené chemické látky by měly být odstupňovány tak, jak je popsáno v dodatku 4. Měly by být užity nejméně tři zkušební koncentrace při alespoň čtyřech opakováních. Při výběru rozsahu zkušebních koncentrací by měla být zohledněna křivka závislosti hodnoty LC_{50} na délce expozice, dostupná ve studiích akutní toxicity. Mají-li být údaje použity pro posouzení rizik, doporučuje se pět zkušebních koncentrací.

31. Koncentrace látky, které jsou vyšší než 10 % hodnoty LC_{50} pro dospělé ryby při zkoušce akutní toxicity nebo vyšší než 10 mg/l, podle toho, co je nižší, nemusí být zkoušeny. Maximální zkušební koncentrace u životního stadia plůdků / nedospělých ryb by měla činit 10 % hodnoty LC_{50}.

▼M6

Kontrolní skupiny

32. Kromě zkušebních koncentrací by měla být nasazena kontrolní skupina v ředicí vodě (≥ 4 opakování) a podle potřeby kontrolní skupina s rozpouštědlem (≥ 4 opakování). Při zkoušce by měla být užita pouze rozpouštědla, u nichž bylo šetřením prokázáno, že nemají statisticky významný vliv na ukazatele zkoušky.

33. Použije-li se rozpouštědlo, neměla by jeho konečná koncentrace být větší než 0,1 ml/l (36) a ve všech zkušebních nádržích s výjimkou kontrolní skupiny s ředicí vodou by měla být stejná koncentrace. Mělo by však být vynaloženo maximální úsilí k tomu, aby se takové rozpouštědlo nepoužívalo, nebo bylo alespoň udržováno v co nejnižší koncentraci.

Četnost analytických stanovení a měření

34. Před zahájením zkoušky by měla být provedena chemická analýza koncentrace zkoušené chemické látky, aby se ověřilo, že odpovídá kritériím přijatelnosti. Všechna opakování by měla být analyzována jednotlivě na začátku zkoušky a při jejím ukončení. V průběhu zkoušky by mělo být alespoň jednou týdně analyzováno jedno opakování pro každou zkušební koncentraci, přičemž opakování je třeba systematicky měnit (1,2,3,4,1,2…). Skladují-li se vzorky pro pozdější analýzu, metoda uskladnění vzorků by měla být předem validována. Vzorky by měly být filtrovány (např. přes filtr s průměrem pórů 0,45 μm) nebo odstředěny, aby se zajistilo, že stanovení budou provedena na chemické látce ve skutečném roztoku).

35. V průběhu zkoušky se měří rozpuštěný kyslík, pH, celková tvrdost, vodivost, salinita (podle potřeby) a teplota. Rozpuštěný kyslík, salinita (podle potřeby) a teplota se měří týdně a pH, vodivost a tvrdost na začátku a na konci zkoušky. Teplota se měří pokud možno nepřetržitě alespoň v jedné zkušební nádrži.

36. Výsledky by měly být založeny na naměřených koncentracích. Udržela-li se však koncentrace zkoušené chemické látky v roztoku během celé zkoušky v rozmezí ± 20 % nominální koncentrace, mohou být výsledky založeny buď na nominálních, nebo na naměřených hodnotách.

Pozorování a měření

Stadia vývoje embrya

37. Expozice by měla být zahájena co nejdříve po oplodnění a před zahájením rýhování blastuly, avšak nejpozději 12 h po oplodnění, aby se zajistilo, že k expozici dojde během raného vývoje embrya.

Líhnutí a přežívání

38. Líhnutí a přežívání se pozoruje alespoň jednou denně a zaznamenávají se počty. Uhynulá embrya, plůdky a nedospělé ryby se odstraní ihned po nalezení, neboť se mohou rychle rozkládat a činností ostatních ryb mohou být porušeny. Při odstraňování uhynulých jedinců se postupuje s mimořádnou opatrností, aby se nenarazilo do sousedních jiker/plůdků nebo aby se fyzicky nepoškodily, neboť jsou mimořádně křehké a citlivé. Kritéria uhynutí se v životních stadiích liší:

— u jiker: zejména v raných stadiích zřetelná ztráta průsvitnosti a změna ve zbarvení vyvolaná koagulací a/nebo vysražením bílkovin, které vedou k bílému zakalení,

▼M6

— u plůdků a nedospělých ryb: nepohyblivost a/nebo absence dýchacích pohybů a/nebo tepu srdce a/nebo bílé neprůsvitné zbarvení centrálního nervového systému a/nebo nereagování na mechanické podněty.

Neobvyklý vzhled

39. Zaznamenává se počet plůdků nebo ryb vykazujících neobvyklý tělesný vzhled a popíše se vzhled a povaha popisované abnormality. Je třeba si uvědomit, že neobvyklá embrya a plůdky se vyskytují přirozeně a u některých druhů jich může být v kontrolních skupinách řádově několik procent. Neobvyklí jedinci by měli být ze zkušební nádrže odstraněni pouze v případě uhynutí. Pokud však – v souladu se směrnicí Evropského parlamentu a Rady 2010/63/EU ze dne 22. září 2010 o ochraně zvířat používaných pro vědecké účely – abnormality způsobují bolest, utrpení a strach nebo trvalé poškození a je možno spolehlivě předpovědět smrt, jedinci by měli být anestetizováni a usmrceni podle popisu v odstavci 44 a pro účely analýzy údajů by s nimi mělo být zacházeno jako s uhynulými.

Neobvyklé chování

40. Abnormality, např. hyperventilace, nekoordinované plavání, netypická nečinnost a netypické chování při krmení, se při zjištění zaznamenají.

Hmotnost

41. Na konci zkoušky se všechny ryby, které přežily, usmrtí (anestetizují, mají-li být odebrány krevní vzorky) a stanoví se živá hmotnost jedinců (po osušení do sucha).

Tělesná délka

42. Na konci zkoušky se změří délka jednotlivých ryb (standardní délka).

43. Tato pozorování poskytnou některé nebo všechny následující údaje, které budou k dispozici pro podání zpráv:

— kumulativní mortalitu,

— počty zdravých ryb na konci zkoušky,

— čas začátku líhnutí a konce líhnutí,

— délku a hmotnost ryb, které přežily,

— počty deformovaných plůdků,

— počty ryb vykazujících neobvyklé chování.

Odběr vzorků ryb

44. Při ukončení zkoušky se provede odebrání vzorků ryb. Ryby určené pro odběr vzorků se usmrtí např. pomocí MS-222 (100–500 mg na litr pufrovaného 200 mg $NaHCO_3$ na litr) nebo FA-100 (4-allyl-2-methoxyfenol: eugenol) a jednotlivě změří a zváží za účelem stanovení hmotnosti (po osušení do sucha) nebo, má-li být odebrán krevní vzorek, anestetizují (viz odstavec 49).

Odběr vzorků pro analýzu VTG a určení pohlaví prostřednictvím histologického hodnocení

45. Ze všech ryb se odeberou vzorky a připraví se na analýzu pohlaví a VTG. Všechny ryby se histologicky analyzují za účelem určení pohlaví. Pro měření VTG je přijatelné použít dílčí vzorek alespoň z 16 ryb z každého

▼M6

opakování. Ukáže-li se, že výsledky získané z dílčího vzorku jsou nejasné, je potřeba analyzovat na VTG více ryb.

46. Postup odběru vzorků na určení VTG a pohlaví závisí na metodě analýzy VTG:

Metoda homogenátu hlavy/ocasu pro analýzu VTG

47. Ryba se usmrtí. Od těla každé ryby se skalpelem oddělí hlava a ocas řezem vedeným těsně za prsními ploutvemi a těsně za hřbetní ploutví (viz obrázek 1). Hlava a ocasní část každé ryby se společně zváží a jednotlivě očíslují, zmrazí v tekutém dusíku a uskladní při teplotě – 70 °C nebo méně pro účely analýzy VTG. Tělo ryby se očísluje a fixuje ve vhodném fixačním médiu za účelem histologického hodnocení (22). Touto metodou se provede hodnocení VTG a histopatologie každého jedince a případnou změnu v hladině VTG tak lze porovnat s fenotypovým pohlavím ryb nebo (u halančíka japonského a koljušky tříostné) s genetickým pohlavím ryb. Pro další informace viz návod k homogenizaci (dodatek 5) a návod ke stanovení hladiny VTG (dodatek 6).

Metoda homogenátu jater pro analýzu VTG

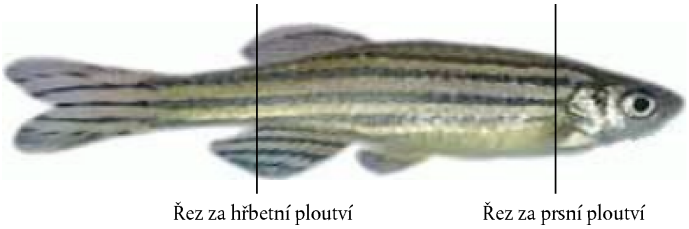
48. Ryba se usmrtí. Játra se vyříznou a uskladní při teplotě – 70 °C nebo nižší. Doporučené postupy pro vyříznutí jater a předúpravu vzorku lze nalézt v pokynu OECD TG 229 (37) nebo v kapitole C.37 této přílohy (38). Játra se poté jednotlivě homogenizují, jak je popsáno v pokynu OECD TG 229 nebo v kapitole C.37 této přílohy. Odebraný supernatant se použije pro měření VTG homologační technikou ELISA (viz dodatek 6 s příkladem kvantifikace u dania pruhovaného nebo pokyn OECD TG 229 (37) pro halančíka japonského). Pomocí tohoto přístupu je rovněž možné získat údaje o jednotlivých rybách týkající se jak VTG, tak histologie pohlavních žláz.

Metoda krevní plazmy pro analýzu VTG

49. Z anestetizované ryby se odebere krev srdeční punkcí, z ocasní žíly nebo řezu v ocasu a odstředí se při 4 °C pro odběr plazmy. Plazma se až do použití skladuje při teplotě – 70 °C nebo nižší. Ryba se usmrtí a fixuje za účelem histologického zkoumání. Vzorky plazmy a ryby se jednotlivě očíslují, aby bylo možné porovnat hladiny VTG s pohlavím ryb.

Obrázek 1

Jak rozříznout rybu pro změření VTG v homogenátu hlavy/ocasu a histologické hodnocení střední části těla



▼M6

Určení genetického pohlaví

50. U druhů, které mají příslušné markery, se z jednotlivých ryb odebere biologický vzorek pro určení genetického pohlaví. U halančíka japonského se odebere řitní ploutev nebo hřbetní ploutev. Podrobný popis, včetně odběru vzorků tkání a určení pohlaví metodou PCR, je uveden v dodatku 9. Pro koljušku tříostnou je popis odběru tkání a metody PCR pro určení pohlaví uveden v dodatku 10.

Měření VTG

51. Měření VTG by mělo být založeno na kvantitativní a analyticky validované metodě. Měly by být k dispozici údaje o mezilaboratorní a vnitrolaboratorní variabilitě metody, která se používá v dané laboratoři. Zdroj mezilaboratorní a vnitrolaboratorní variability je (s největší pravděpodobností) založen na různých stadiích vývoje rybí populace. Pokud jde o variabilitu měření VTG, mělo by se s velkou opatrností přistupovat k hodnotám NOEC založených na tomto ukazateli. Pro hodnocení produkce VTG u druhů ryb posuzovaných v této zkoušce jsou k dispozici různé metody. Poměrně citlivou a specifickou technikou měření je určení koncentrace proteinů pomocí enzymové imunosorpční analýzy (ELISA). Měly by být použity homologické protilátky (vytvořené proti VTG téhož druhu) a nejdůležitější homologické standardy.

Určení pohlaví

52. V závislosti na postupu při odběru vzorků za účelem stanovení VTG se celé ryby nebo zbylá střední část každé ryby vloží do předem označených schránek pro zpracování a fixují se ve vhodném fixačním médiu pro histologické určení pohlaví (volitelně též pro hodnocení stadia vývoje gonád). Pokyny ohledně fixace a zalití do fixátoru obsahuje dodatek 7 a pokyn OECD k diagnostice histopatologie pohlavních žláz ryb v souvislosti s endokrinním systémem (22). Po zpracování se ryby zalijí do parafinových bloků. Jedinci by do parafinového bloku měli být uloženi podélně. Z každého jedince se odebere alespoň šest podélných řezů (o tloušťce 3–5 μm) ve frontální rovině včetně gonadální tkáně z obou gonád. Interval mezi těmito řezy by měl být přibližně 50 μm u samiček a 250 μm u samečků. Každý blok bude často obsahovat samečky i samičky (pokud se do bloku zalije více než jeden jedinec), proto by měl být interval mezi řezy z těchto bloků přibližně 50 μm, dokud se nedocílí alespoň šesti řezů gonád z každého samečka. Poté lze interval mezi řezy zvýšit přibližně na 250 μm u samiček. Řezy se obarví hematoxylinem a eosinem a zkoumají se pomocí světelné mikroskopie se zaměřením na pohlaví (samečci, samičky, intersexuálové nebo nediferencované pohlaví). Intersexualita je definována jako přítomnost více než jednoho oocytu ve varleti na šest analyzovaných řezů nebo spermatogenetických buněk (ano/ne) ve vaječnících. Histopatologie a určení stadia vaječníků a varlat jsou nepovinné, avšak je-li takové vyšetření provedeno, výsledky by měly být podrobeny statistické analýze a uvedeny ve zprávě. Je třeba poznamenat, že některé druhy ryb (např. halančík japonský a někdy danio pruhované) nemají přirozeně plně vyvinutý pár gonád a může být přítomna pouze jedna gonáda. Veškerá taková zjištění se zaznamenají.

53. Určení genetického pohlaví u jedinců halančíka japonského je založeno na přítomnosti nebo nepřítomnosti genu DMY, který určuje samčí pohlaví halančíka a nachází se v chromozomu Y. Genotypové pohlaví u halančíka lze identifikovat sekvenováním genu DMY z DNA extrahované např. z řitní

▼M6

ploutve nebo hřbetní ploutve. Přítomnost DMY indikuje jedince XY (samečka), a to bez ohledu na fenotyp, zatímco nepřítomnost DMY indikuje jedince XX (samičku), a to bez ohledu na fenotyp (23). Návod k přípravě tkání a metodě PCR obsahuje dodatek 9. Také u jedinců koljušky tříostné se určení genetického pohlaví provede metodou PCR, která je popsána v dodatku 10.

54. Zaznamená se výskyt intersexu (viz definici v dodatku 1).

Druhotné pohlavní znaky

55. U druhů jako halančík japonský jsou druhotné pohlavní znaky řízeny endokrinní činností; na konci expozice by proto mělo být pokud možno provedeno pozorování fyzického vzhledu ryb. U samiček halančíka japonského je papilární útvar v posteriorní části řitní ploutve citlivý na androgeny. Kapitola C.37 této přílohy (38) obsahuje příslušné fotografie samčích druhotných pohlavních znaků a samiček vystavených působení androgenu.

ÚDAJE A JEJICH PŘEDKLÁDÁNÍ

Zpracování výsledků

56. Je důležité, aby konečný ukazatel byl potvrzen validním statistickým testem jako co nejprůkaznější. Experimentální jednotkou je opakování, avšak statistické testování by mělo zohlednit variabilitu v rámci opakování. Dodatek 8 obsahuje vývojový diagram pro rozhodování, který pomůže při volbě nejvhodnějšího statistického testu na základě charakteristik údajů, jež byly při zkoušce získány. Úroveň statistické významnosti pro všechny ukazatele zahrnuté do zkoušky činí 0,05.

Poměr pohlaví a genetické pohlaví

57. Je-li závislost dávka-odezva monotónní, měl by být Jonckheerovým-Terpstrovým testem (trend testem) analyzován poměr pohlaví při významném účinku expozice (přístup NOEC/LOEC). Není-li zjištěna monotónnost, měl být použit párový test. Pokud je možné dosáhnout normality rozdělení a homogenity rozptylu, použijte Dunnettův test. Při heterogenním rozptylu použijte Tamhaneův-Dunnettův test. V ostatních případech použijte exaktní Mannův-Whitneyův test s Bonferroniho-Holmovou korekcí. V dodatku 8 je uveden vývojový diagram popisující statistiky poměru pohlaví. Poměr pohlaví by měl být uveden v tabulkách jako podíl samečků, samiček, intersexuálů a nediferencovaných jedinců ± směrodatná odchylka pro každou koncentraci. Měla by být zdůrazněna statistická významnost. Příklady obsahuje validační zpráva pro fázi 2 zkoušky FSDT (42). Genetické pohlaví by mělo být uvedeno jako procentní podíl změny fenotypového pohlaví u samečků, samiček, intersexuálů a nediferencovaných jedinců.

Koncentrace VTG

58. Měly by být analyzovány koncentrace VTG pro zjištění významném účinku expozice (přístup NOEC/LOEC). Před t-testem s Bonferroniho korekcí se upřednostňuje Dunnettův test. Je-li použita Bonferroniho korekce, upřednostňuje se Bonferroniho-Holmova korekce. Měl by být zohledněn logaritmický převod VTG pro dosažení normality rozdělení a homogenity rozptylu. Odpovídá-li reakce při jednotlivých koncentracích monotónní odezvě na dávku, pak se před všemi výše uvedenými upřednostňuje Jonckheerův-Terpstrův test. Použije-li se Dunnettův test, pro další pokračování není třeba provádět ANOVA F-test významnosti. Pro podrobnosti viz schéma v dodatku 8. Výsledky by měly být uvedeny v tabulkách jako střední hodnoty u samečků, samiček, intersexuálů a nediferencovaných

▼M6

jedinců odděleně pro každou koncentraci. Měla by být zdůrazněna statistická významnost u fenotypových samiček a fenotypových samečků. Příklady obsahuje validační zpráva pro fázi 2 zkoušky FSDT (42).

Zkoušená chemická látka: skutečná koncentrace

59. Skutečné koncentrace zkoušené chemické látky v nádržích by měly být analyzovány s četností popsanou v odstavci 34. Výsledky by měly být uvedeny v tabulkách jako střední koncentrace ± směrodatná odchylka na bázi opakování a rovněž i na bázi koncentrací spolu s informací o počtu vzorků a zdůrazní se odlehlé hodnoty od střední zkušební koncentrace ± 20 %. Příklady obsahuje validační zpráva pro fázi 2 zkoušky FSDT (42).

Interpretace výsledků

60. V případě, že se naměřené koncentrace zkoušené chemické látky ve zkušebních roztocích pohybují na úrovních blízkých mezi stanovitelnosti dané analytické metody, by výsledky měly být interpretovány opatrně.

Závěrečná zpráva

61. Závěrečná zpráva by měla obsahovat tyto informace:

Zkoušená chemická látka

— Příslušné fyzikálně-chemické vlastnosti a chemická identifikace včetně údajů o čistotě a metodě kvantitativního stanovení zkoušené chemické látky.

Zkušební podmínky

— Použitý zkušební postup (např. průtokový, semistatický / s obnovováním); uspořádání zkoušky včetně zkušebních koncentrací, metoda přípravy zásobních roztoků (v příloze), četnost obnovování (je-li použito, uvede se solubilizační činidlo a jeho koncentrace),

— nominální zkušební koncentrace, průměry naměřených hodnot v jednotlivých zkušebních nádržích, jejich směrodatné odchylky a metody jejich stanovení (použitá analytická metoda by měla být uvedena v příloze); důkazy o tom, že naměřené hodnoty odpovídají koncentracím zkoušené chemické látky ve skutečném roztoku,

— kvalita vody ve zkušebních nádržích: pH, tvrdost, teplota a koncentrace rozpuštěného kyslíku,

— podrobné informace o krmení (např. druh krmiva/krmiv, původ, podávané množství a frekvence krmení) a podle potřeby analýzy na přítomnost kontaminujících látek (např. polychlorovaných bifenylů, polyaromatických uhlovodíků a organochlorových pesticidů).

Výsledky

— Doklady o tom, že kontrolní skupiny splnily kritéria validity: údaje o míře vylíhnutí by měly být uvedeny v tabulkách jako procentní podíl v každém opakování a pro každou koncentraci. Měly by být zdůrazněny odlehlé hodnoty od kritérií přijatelnosti (v kontrolních skupinách). Údaje o přežití by měly být uvedeny jako procentní podíl v každém opakování a pro každou koncentraci. Měly by být zdůrazněny odlehlé hodnoty od kritérií validity (v kontrolních skupinách),

— jasné uvedení dosažených výsledků v jednotlivých sledovaných ukazatelích: přežití embryí a úspěšnost líhnutí; zevní odchylky; délka a hmotnost; naměřené hodnoty VTG (v ng/g homogenátu,

▼M6

ng/ml plazmy nebo ng/mg jater); histologie gonád, poměr pohlaví, údaje o genetickém pohlaví; výskyt jakýchkoli neobvyklých reakcí ryb a jakékoli viditelné účinky způsobené zkoušenou chemickou látkou.

62. Výsledky by měly být uvedeny jako střední hodnoty ± směrodatná odchylka (SD) nebo střední směrodatná chyba (SE). Statistické údaje by měly být uvedeny minimálně jako NOEC a LOEC a intervaly spolehlivosti. Mělo by se postupovat podle vývojového diagramu pro provedení statistické analýzy (dodatek 8).

LITERATURA

1) OECD (1992), *Fish, Early Life Stage Toxicity Test*, Test Guideline No. 210, Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD, Paris.

2) Jobling, S., Sheahan, D., Osborne, J. A., Matthiessen, P. and Sumpter, J. P. (1996) Inhibition of testicular growth in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) exposed to estrogenic alkylphenolic chemicals, Environmental Toxicology and Chemistry 15, pp. 194–202.

3) Sumpter, J. P. and Jobling, S. (1995) Vitellogenesis As A Biomarker for Estrogenic Contamination of the Aquatic Environment, Environmental Health Perspectives 103, pp. 173–178.

4) Tyler, C. R., van Aerle, R., Hutchinson, T. H., Maddix, S. and Trip, H. (1999) An in vivo testing system for endocrine disruptors in fish early life stages using induction of vitellogenin, Environmental Toxicology and Chemistry 18, pp. 337–347.

5) Holbech, H., Andersen, L., Petersen, G. I., Korsgaard, B., Pedersen, K. L. and Bjerregaard, P. (2001a) Development of an ELISA for vitellogenin in whole body homogenate of zebrafish (Danio rerio), Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology 130, pp. 119–131.

6) Andersen, L., Bjerregaard, P. and Korsgaard, B. (2003) Vitellogenin induction and brain aromatase activity in adult male and female zebrafish exposed to endocrine disrupters, Fish Physiology and Biochemistry 28, pp. 319–321.

7) Orn, S., Holbech, H., Madsen, T. H., Norrgren, L. and Petersen, G. I. (2003) Gonad development and vitellogenin production in zebrafish (Danio rerio) exposed to ethinylestradiol and methyltestosterone, Aquatic Toxicology 65, pp. 397–411.

8) Panter, G. H., Hutchinson, T. H., Lange, R., Lye, C. M., Sumpter, J. P., Zerulla, M. and Tyler, C. R. (2002) Utility of a juvenile fathead minnow screening assay for detecting (anti-)estrogenic substances, Environmental Toxicology and Chemistry 21, pp. 319–326.

9) Sun, L. W., J. M. Zha, P. A. Spear, and Z. J. Wang (2007) Toxicity of the aromatase inhibitor letrozole to Japanese medaka (Oryzias latipes) eggs, larvae and breeding adults, Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology 145, pp. 533–541.

10) Parks, L. G., A. O. Cheek, N. D. Denslow, S. A. Heppell, J. A. McLachlan, G. A. LeBlanc, and C. V. Sullivan (1999) Fathead minnow (Pimephales promelas) vitellogenin: purification, characterization and quantitative immunoassay for the detection of estrogenic compounds, Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology 123, pp. 113–125.

11) Brion, F., B. M. Nilsen, J. K. Eidem, A. Goksoyr, and J. M. Porcher (2002) Development and validation of an enzyme-linked immunosorbent assay to measure vitellogenin in the zebrafish (Danio rerio), Environmental Toxicology and Chemistry 21, pp. 1699–1708.

12) Nishi, K., M. Chikae, Y. Hatano, H. Mizukami, M. Yamashita, R. Sakakibara, and E. Tamiya (2002) Development and application of a monoclonal antibody-based sandwich ELISA for quantification of Japanese medaka (Oryzias latipes) vitellogenin, Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology 132, pp. 161–169.

13) Hahlbeck, E., I. Katsiadaki, I. Mayer, M. Adolfsson-Erici, J. James, and B. E. Bengtsson (2004) The juvenile three-spined stickleback (Gasterosteus aculeatus L.) as a model organism for endocrine disruption – II – kidney

▼M6

hypertrophy, vitellogenin and spiggin induction, Aquatic Toxicology 70, pp. 311–326.

14) Tatarazako, N., M. Koshio, H. Hori, M. Morita, and T. Iguchi (2004) Validation of an enzyme-linked immunosorbent assay method for vitellogenin in the medaka, Journal of Health Science 50, pp. 301–308.

15) Eidem, J. K., H. Kleivdal, K. Kroll, N. Denslow, R. van Aerle, C. Tyler, G. Panter, T. Hutchinson, and A. Goksoyr (2006) Development and validation of a direct homologous quantitative sandwich ELISA for fathead minnow (Pimephales promelas) vitellogenin. Aquatic Toxicology, 78, pp. 202–206.

16) Jensen, K. M. and G. T. Ankley (2006) Evaluation of a commercial kit for measuring vitellogenin in the fathead minnow (Pimephales promelas), Ecotoxicology and Environmental Safety 64, pp. 101–105.

17) Holbech, H., Petersen, G. I., Norman, A., Örn, S, Norrgren, L., and Bjerregaard, P (2001b) Suitability of zebrafish as test organism for detection of endocrine disrupting chemicals. Comparison of vitellogenin in plasma and whole body homogenate from zebrafish (*Danio rerio*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), Nordic Council of Ministers, TemaNord 2001:597, pp. 48–51.

18) Nilsen, B. M., K. Berg, J. K. Eidem, S. I. Kristiansen, F. Brion, J. M. Porcher, and A. Goksoyr (2004) Development of quantitative vitellogenin-ELISAs for fish test species used in endocrine disruptor screening, Analytical and Bioanalytical Chemistry 378, pp. 621–633.

19) Orn, S., S. Yamani, and L. Norrgren (2006) Comparison of vitellogenin induction, sex ratio, and gonad morphology between zebrafish and Japanese medaka after exposure to 17 alpha-ethinylestradiol and 17 beta-trenbolone, Archives of Environmental Contamination and Toxicology 51, pp. 237–243.

20) Scholz, S. and N. Kluver (2009) Effects of Endocrine Disrupters on Sexual, Gonadal Development in Fish, Sexual Development 3, pp. 136–151.

21) Fenske, M., G. Maack, C. Schafers, and H. Segner (2005) An environmentally relevant concentration of estrogen induces arrest of male gonad development in zebrafish, Danio rerio, Environmental Toxicology and Chemistry 24, pp. 1088–1098.

22) OECD (2010), Guidance Document on the Diagnosis of Endocrine-related Histopathology in Fish Gonads, Series on Testing and Assessment No. 123, ENV/JM/MONO(2010)14, OECD, Paris.

23) Kobayashi, T., M. Matsuda, H. Kajiura-Kobayashi, A. Suzuki, N. Saito, M. Nakamoto, N. Shibata, and Y. Nagahama (2004) Two DM domain genes, DMY and DMRT1, involved in testicular differentiation and development in the medaka, Oryzias latipes, Developmental Dynamics 231, pp. 518–526.

24) Shinomiya, A., H. Otake, K. Togashi, S. Hamaguchi, and M. Sakaizumi (2004) Field survey of sex-reversals in the medaka, Oryzias latipes: genotypic sexing of wild populations, Zoological Science 21, pp. 613–619.

25) Kidd, K. A., P. J. Blanchfield, K. H. Mills, V. P. Palace, R. E. Evans, J. M. Lazorchak, and R. W. Flick (2007) Collapse of a fish population after exposure to a synthetic estrogen, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 104, pp. 8897–8901.

26) Palace,V. P., R. E. Evans, K. G. Wautier, K. H. Mills, P. J. Blanchfield, B. J. Park, C. L. Baron, and K. A. Kidd (2009) Interspecies differences in biochemical, histopathological, and population responses in four wild fish species exposed to ethynylestradiol added to a whole lake, Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 66, pp. 1920–1935.

27) Panter, G. H., T. H. Hutchinson, K. S. Hurd, J. Bamforth, R. D. Stanley, S. Duffell, A. Hargreaves, S. Gimeno, and C. R. Tyler (2006) Development of chronic tests for endocrine active chemicals – Part 1. An extended fish early-life stage test for oestrogenic active chemicals in the fathead minnow (Pimephales promelas), Aquatic Toxicology 77, pp. 279–290.

▼**M6**

28) Holbech, H., K. Kinnberg, G. I. Petersen, P. Jackson, K. Hylland, L. Norrgren, and P. Bjerregaard (2006) Detection of endocrine disrupters: Evaluation of a Fish Sexual Development Test (FSDT), Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology 144, pp. 57–66.

29) Andersen, L., K. Kinnberg, H. Holbech, B. Korsgaard, and P. Bjerregaard (2004) Evaluation of a 40 day assay for testing endocrine disrupters: Effects of an anti-estrogen and an aromatase inhibitor on sex ratio and vitellogenin concentrations in juvenile zebrafish (Danio rerio), Fish Physiology and Biochemistry 30, pp. 257–266.

30) Morthorst, J. E., H. Holbech, and P. Bjerregaard (2010) Trenbolone causes irreversible masculinization of zebrafish at environmentally relevant concentrations, Aquatic Toxicology 98, pp. 336–343.

31) Kiparissis,Y., T. L. Metcalfe, G.C. Balch, and C.D. Metcalf (2003) „Effects of the antiandrogens, vinclozolin and cyproterone acetate on gonadal development in the Japanese medaka (Oryzias latipes)“, Aquatic Toxicology 63, pp. 391–403.

32) Panter, G. H., T. H. Hutchinson, K. S. Hurd, A. Sherren, R. D. Stanley, and C. R. Tyler (2004) Successful detection of (anti-) androgenic and aromatase inhibitors in pre-spawning adult fathead minnows (Pimephales promelas) using easily measured endpoints of sexual development, Aquatic Toxicology 70, pp. 11–21.

33) Kinnberg, K., H. Holbech, G. I. Petersen, and P. Bjerregaard (2007) Effects of the fungicide prochloraz on the sexual development of zebrafish (Danio rerio), Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology 145, pp. 165–170.

34) Kapitola C.14 této přílohy, Růstová zkouška na nedospělých rybách.

35) Kapitola C.4 této přílohy, Stanovení snadné biologické rozložitelnosti.

36) OECD (2000), Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures, Series on Testing and Assessment No. 23, OECD, Paris.

37) OECD (2009), Fish Short Term Reproduction Assay, Test Guideline No. 229, Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD, Paris.

38) Kapitola C.37 této přílohy, 21denní zkouška na rybách: krátkodobý screening estrogenní a androgenní aktivity a inhibice aromatázy.

39) OECD (2012), Fish Toxicity Testing Framework, Series on Testing and Assessment No. 171, OECD, Paris.

40) Schäfers, C., Teigeler, M., Wenzel, A., Maack, G., Fenske, M., Segner, H. (2007) Concentration- and time-dependent effects of the synthetic estrogen, 17 alpha-ethinylestradiol, on reproductive capabilities of the zebrafish, Danio rerio, Journal of Toxicology and Environmental Health-Part A, 70, 9–10, pp 768–779.

41) OECD (2011), Validation Report (Phase 1) for the Fish Sexual Development Test, Series on Testing and Assessment No 141, ENV/JM/MONO(2011)22, OECD, Paris.

42) OECD (2011), Validation Report (Phase 2) for the Fish Sexual Development Test, Series on Testing and Assessment No 142, ENV/JM/MONO(2011)23, OECD, Paris.

43) OECD (2011), Peer Review Report of the validation of the Fish Sexual Development Test, Series on Testing and Assessment No 143, ENV/JM/MONO(2011)24, OECD, Paris.

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

▼M6

Dodatek 1

Zkratky a definice

Klíčový ukazatel: způsobuje účinek na úrovni populace

ASV: hodnota nasycení vzduchem

Biomarker: způsobuje účinek na úrovni jedinců

Chemická látka: látka nebo směs

Dph: dnů po vylíhnutí

DMY: gen ležící v DM doméně chromozomu Y, který je nezbytný pro vývoj samečků halančíka japonského

ELISA: enzymová imunosorpční analýza

Hmotnost ryby: hmotnost ryby po osušení do sucha

FSDT: zkouška pohlavního vývoje ryb

Osa HPG: hypothalamo-hypofýzo-gonadální osa

Intersexuální ryba: ryba s více než jedním oocytem ve varleti na 6 analyzovaných řezů nebo se spermatogenetickými buňkami ve vaječnících (ano/ne)

Velikost násady: živá hmotnost ryb na jednotku objemu vody

MOA: mechanismus účinku

RT-PCR: polymerázová řetězová reakce s reverzní transkripcí

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

Nediferencovaná ryba: ryba s gonádami, které nevykazují žádné rozpoznatelné zárodečné buňky

VTG: vitelogenin

▼M6

Dodatek 2

Experimentální podmínky pro zkoušku FSDT (sladkovodní druhy)

1. Doporučené druhy	Halančík japonský (*Oryzias latipes*)	Danio pruhované (*Danio rerio*)	Koljuška tříostná (*Gasterosteus aculeatus*)
2. Typ zkoušky	Průtoková nebo semistatická	Průtoková nebo semistatická	Průtoková nebo semistatická
3. Teplota vody	25 ± 2 °C	27 ± 2 °C	20 ± 2 °C
4. Kvalita osvětlení	Fluorescenční zářivky (širokospektrální)	Fluorescenční zářivky (širokospektrální)	Fluorescenční zářivky (širokospektrální)
5. Intenzita osvětlení	10–20 μE/m^2/s, 540–1 080 luxů nebo 50–100 ft-c (okolní laboratorní hodnoty)	10–20 μE/m^2/s, 540–1 080 luxů nebo 50–100 ft-c (okolní laboratorní hodnoty)	10–20 μE/m^2/s, 540–1 080 luxů nebo 50–100 ft-c (okolní laboratorní hodnoty)
6. Fotoperioda	12–16 h světlo, 8–12 h tma	12–16 h světlo, 8–12 h tma	16 h světlo, 8 h tma
7. Minimální velikost nádrže	Jednotlivé nádrže by měly pojmout nejméně 7 l vody	Jednotlivé nádrže by měly pojmout nejméně 7 l vody	Jednotlivé nádrže by měly pojmout nejméně 7 l vody
8. Výměny objemu zkušebního roztoku	Nejméně 5krát denně	Nejméně 5krát denně	Nejméně 5krát denně
9. Stáří zkušebních organismů na začátku expozice	Čerstvě oplodněné jikry (stadium rané blastuly)	Čerstvě oplodněné jikry (stadium rané blastuly)	Čerstvě oplodněné jikry
10. Počet jiker pro každou expozici	Nejméně 120	Nejméně 120	Nejméně 120
11. Počet expozic	Nejméně 3 (plus příslušné kontrolní skupiny)	Nejméně 3 (plus příslušné kontrolní skupiny)	Nejméně 3 (plus příslušné kontrolní skupiny)
12. Počet opakování pro každou expozici	Nejméně 4 (pokud není přidělení ke kontrolním skupinám podle druhé odmocniny)	Nejméně 4 (pokud není přidělení ke kontrolním skupinám podle druhé odmocniny)	Nejméně 4 (pokud není přidělení ke kontrolním skupinám podle druhé odmocniny)
13. Krmný režim	Živé *Artemia*, zmrazené dospělé žábronožky solné, vločkové krmivo atd. Doporučuje se krmit dvakrát denně	Speciální krmivo pro mladé ryby, živé *Artemia*, zmrazené dospělé žábronožky solné, vločkové krmivo atd. Doporučuje se krmit dvakrát denně	Živé *Artemia*, zmrazené dospělé žábronožky solné, vločkové krmivo atd. Doporučuje se krmit dvakrát denně
14. Provzdušňování	Žádné, dokud koncentrace rozpuštěného kyslíku neklesne pod 60 % nasycení	Žádné, dokud koncentrace rozpuštěného kyslíku neklesne pod 60 % nasycení	Žádné, dokud koncentrace rozpuštěného kyslíku neklesne pod 70 % nasycení

▼**M6**

15. Ředicí voda	Čistá povrchová, studniční nebo rekonstituovaná voda	Čistá povrchová, studniční nebo rekonstituovaná voda	Čistá povrchová, studniční nebo rekonstituovaná voda
16. Trvání expozice zkoušené chemické látce	60 dnů po vylíhnutí	60 dnů po vylíhnutí	60 dnů po vylíhnutí
17. Biologické ukazatele	Úspěšné vylíhnutí, přežití makroskopická morfologie, VTG histologie gonád, genetické pohlaví, poměr pohlaví	Úspěšné vylíhnutí, přežití makroskopická morfologie, VTG histologie gonád, poměr pohlaví	Úspěšné vylíhnutí, přežití makroskopická morfologie, VTG histologie gonád, poměr pohlaví
18. Kritéria přijatelnosti zkoušky pro sloučená opakování kontrolních skupin	Úspěšné vylíhnutí > 80 %	Úspěšné vylíhnutí > 80 %	Úspěšné vylíhnutí > 80 %
	přežití po vylíhnutí ≥ 70 %	přežití po vylíhnutí ≥ 70 %	Přežití po vylíhnutí ≥ 70 %
	růst (živá hmotnost ryby, po osušení do sucha) > 150 mg	růst (živá hmotnost ryby, po osušení do sucha) > 75 mg	růst (živá hmotnost ryby, po osušení do sucha) > 120 mg
	délka (standardní délka) > 20 mm	délka (standardní délka) > 14 mm	délka (standardní délka) > 20 mm
	poměr pohlaví (% samečků nebo samiček) 30 %–70 %	poměr pohlaví (% samečků nebo samiček) 30 %–70 %	poměr pohlaví (% samečků nebo samiček) 30 %–70 %

▼**M6**

Dodatek 3

Chemické charakteristiky vhodné ředicí vody

SLOŽKA	KONCENTRACE
Pevné částice	< 20 mg/l
Celkový organický uhlík	< 2 mg/l
Volný (neiontový) amoniak	< 1 µg/l
Zbytkový chlor	< 10 µg/l
Celkový obsah organofosforových pesticidů	< 50 ng/l
Celkový obsah organochlorových pesticidů a polychlorovaných bifenylů	< 50 ng/l
Celkový obsah organických sloučenin chloru	< 25 ng/l

▼**M6**

Dodatek 4

Ze zkušební metody C.14/Pokyny týkající se zkušebních koncentrací

Sloupec (počet koncentrací mezi 100 a 10, nebo mezi 10 a 1) (*)						
1	2	3	4	5	6	7
100	100	100	100	100	100	100
32	46	56	63	68	72	75
10	22	32	40	46	52	56
3,2	10	18	25	32	37	42
1,0	4,6	10	16	22	27	32
	2,2	5,6	10	15	19	24
	1,0	3,2	6,3	10	14	18
		1,8	4,0	6,8	10	13
		1,0	2,5	4,6	7,2	10
			1,6	3,2	5,2	7,5
			1,0	2,2	3,7	5,6
				1,5	2,7	4,2
				1,0	1,9	3,2
					1,4	2,4
					1,0	1,8
						1,3
						1,0

(*) Ze sloupců může být zvolena řada tří (nebo více) po sobě jdoucích koncentrací. Mezilehlé body pro koncentrace ve sloupci (x) jsou uvedeny ve sloupci (2x + 1). Uvedené hodnoty mohou být koncentracemi vyjádřenými v objemových nebo hmotnostních procentech (mg/l nebo µg/l). Hodnoty mohou být podle potřeby násobeny nebo děleny jakoukoli mocninou 10. Sloupec 1 by se měl použít, pokud je úroveň toxicity značně neurčitá.

▼M6

Dodatek 5

Návod k homogenizaci hlavy a ocasu z nedospělých danií pruhovaných, jelečka velkohlavého, koljušky tříostné a halančíka japonského

Účelem tohoto oddílu je popsat postupy, které je třeba dodržet před stanovením hladiny koncentrace VTG. Lze použít jiné postupy, jež vedou ke srovnatelné kvantifikaci VTG. Namísto užití homogenátu hlavy/ocasu je možné koncentraci VTG určit z krevní plazmy nebo z jater.

Postup

1. Ryba se anestetizuje a usmrtí v souladu s popisem zkoušky.

2. Odřízne se hlava a ocas v souladu s popisem zkoušky. **Důležité:** Veškeré pitevní nástroje a pracovní stůl je třeba mezi zpracováním každé jednotlivé ryby řádně omýt a vyčistit (např. 96 % ethanolem), aby se zabránilo „znečištění VTG“ přenosem ze samiček nebo ze samečků, u kterých byly vyvolány účinky, na samečky, u kterých účinky vyvolány nebyly.

3. Společná hmotnost hlavy a ocasu každé ryby se stanoví se zaokrouhlením na mg.

4. Po zvážení se části vloží do vhodných zkumavek (např. Eppendorfovy zkumavky o objemu 1,5 ml) a zmrazí se při teplotě –80 °C až do homogenizace nebo se přímo homogenizují na ledu pomocí dvou plastových paliček. (Lze užít i jiných metod, jsou-li prováděny na ledu a je-li výsledkem homogenní hmota.) **Důležité:** *Zkumavky je třeba řádně očíslovat, aby bylo možné hlavu a ocas z určité ryby porovnat s příslušným řezem těla, který se použije pro histologii gonád*.

5. Jakmile se dosáhne homogenní hmoty, přidá se ledový **homogenizační pufr** (*) v množství 4–10krát větším než hmotnost tkáně (ředění se zaznamená). V práci s paličkami se pokračuje, dokud není směs homogenní. **Důležitá poznámka:** *Na každou rybu se použijí nové paličky*.

6. Vzorky se položí na led až do odstřeďování při teplotě **4 °C** po dobu 30 min při zrychlení 50 000 g.

7. Pomocí pipety přeneste části o velikosti 20–50 µl (množství zaznamenejte) supernatantu do **nejméně** dvou zkumavek tak, že špičku pipety ponoříte pod tukovou vrstvu na hladině a opatrně nasajete supernatant bez frakcí tuku nebo sedimentu.

8. Zkumavky se až do použití uskladní při teplotě – 80 °C.

(*) *Homogenizační pufr:*

50 mM Tris-HCl pH 7,4; 1 % koktejl inhibitoru proteázy (Sigma): 12 ml Tris-HCl pH 7,4 + 120 µl koktejlu inhibitoru proteázy (nebo rovnocenné koktejly inhibitoru proteázy).

TRIS: TRIS-ULTRA PURE (ICN)

Koktejl inhibitoru proteázy: od výrobce Sigma (pro tkáně savců), produktové číslo **P 8340.**

Poznámka: Homogenizační pufr by měl být použit ve stejný den, kdy byl vyroben. Během použití ho uchovávejte na ledu.

▼M6

Dodatek 6

Návod ke kvantifikaci vitelogeninu z homogenátu hlavy a ocasu dania pruhovaného (Danio rerio) (upraveno z Holbech a další, 2001). lze použít jiné postupy za použití homologických protilátek a standardů

1. Mikrotitrační destičky (certifikované, Maxisorp F96, Nunc, Roskilde Denmark) předem pokryté 5 µg/ml lipovitellinu-IgG se rozmrazí a třikrát promyjí promývacím pufrem (*).

2. Očištěný standard ([1]) dania pruhovaného pro stanovení vitelogeninu se sériově rozředí ředicím pufrem (**) na 0,2, 0,5, 1, 2, 5, 10 a 20 ng/ml, vzorky se zředí nejméně 1/200 ředicím pufrem (s cílem zabránit matricovému efektu) a nanesou se na destičky. V opakování se použije vzorek z kontrolní skupiny. Do každé jamky se vloží 150 µl. Standardy se testují ve dvou opakováních a vzorky ve třech opakováních. Inkubují se přes noc na třepačce při teplotě 4 °C.

3. Destičky se pětkrát promyjí promývacím pufrem (*).

4. Křenová peroxydáza (HRP) sloučená v řetězec dextranu (např. AMDEX A/S, Denmark) a konjugované protilátky se rozředí v promývacím pufru; skutečné zředění se liší podle šarže a stáří. Do každé jamky se vloží 150 µl a destičky se 1 hodinu inkubují na třepačce při pokojové teplotě.

5. Destičky se pětkrát promyjí promývacím pufrem (*) a dno jamek se důkladně vyčistí ethanolem.

6. Do každé jamky se vloží 150 µl TNB plus (***). Destičku je třeba chránit před světlem pomocí staniolu a kontrolovat změnu barvy na třepačce.

7. Jakmile se standardní křivka plně rozvine, činnost enzymů se zastaví přidáním 150 µl 0,2 M H_2SO_4 do každé jamky.

8. Absorbance se měří při 450 nm (např. na analyzátoru destiček Molecular Devices Thermomax). Údaje se analyzují pomocí příslušného softwaru (např. Softmax).

(*) Promývací pufr:

PBS-stock (****)	500,0	ml
BSA	5,0	g
Tween 20	5,0	ml

Hodnota pH se upraví na 7,3 a doplní se do 5 l deionizovanou H_2O (Millipore). Skladuje se při 4 °C.

(**) Ředicí pufr:

PBS-Stock(****)	100,0	ml
BSA	3,0	g
Tween 20	1,0	ml

Hodnota pH se upraví na 7,3 a doplní se do 1 l deionizované H_2O (Millipore). Skladuje se při 4 °C.

(***) TMB plus je substrát „k okamžitému použití“ vyráběný společností KemEnTec (Dánsko). Je citlivý na světlo. Skladuje se při 4 °C.

([1]) Battelle AP4.6.04 (1.18 mg/ml (AAA)), očištěný podle: Denslow, N. D., Chow, M. C., Kroll, K. J., Green, L. (1999). Vitellogenin as a biomarker of exposure for estrogen or estrogen mimics. Ecotoxicology 8: pp. 385–398.

▼**M6**

(****) PBS-stock

NaCl	160,0	g
KH_2PO_4	4,0	g
$Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$	26,6	g
KCl	4,0	g

Hodnota pH se upraví na 6,8 a doplní se do 2 l deionizované H_2O (Millipore). Skladuje se při pokojové teplotě.

▼M6

Dodatek 7

Návod k přípravě tkáňových řezů pro určení pohlaví a určení stadií gonád

Účelem tohoto oddílu je popsat postupy, ke kterým dochází před hodnocením histologických řezů. Mohou být použity jiné postupy, které vedou k obdobnému určení pohlaví a určení stadií gonád.

S několika málo výjimkami jsou tyto postupy obdobné pro halančíka japonského i danio pruhované.

Usmrcení, pitva a fixace tkání

Cíle:

1. Humánní usmrcení ryby.

2. Získání potřebných tělesných hmotností a měření.

3. Vyhodnocení druhotných pohlavních znaků.

4. Disekce tkání pro analýzu VTG.

5. Fixace gonád.

Postupy:

1. Ryba by se měla usmrtit bezprostředně před pitvou. Není-li k dispozici větší počet osob provádějících pitvu, nemělo by proto být usmrcováno více ryb současně.

2. Ryba se pomocí malého podběráku vyjme z experimentální nádrže a přenese se v dopravní nádržce do pitevního prostoru.

3. Vloží se do usmrcujícího roztoku. Poté, co se zastaví dýchání a ryba nereaguje na vnější podněty, z roztoku se vyjme.

4. Ryba se zváží

5. Za účelem přípravy tkání pro analýzu VTG lze rybu na korkové podložce položit na stolek pitevního mikroskopu.

   a. U dania pruhovaného se odřízne hlava těsně za prsní ploutví a ocas těsně za hřbetní ploutví.

   b. U halančíka japonského se opatrně otevře břicho řezem, který je veden po střední linii od hrudního pletence k bodu na kraniálním okraji řitního otvoru. Pomocí malé pinzety a malých nůžek se opatrně vyjmou játra.

6. Vzorek pro analýzu VTG se vloží do Eppedorfových zkumavek a okamžitě zmrazí v tekutém dusíku.

7. Mrtvé tělo včetně gonád se vloží do etiketou předem označené plastové kazety na tkáně, která se přenese do Davidsonova nebo Bouinova fixačního roztoku. Objem fixačního roztoku by měl být alespoň desetinásobkem odhadovaného objemu tkání. Fixační nádrž se po dobu 5 sekund jemně protřepe, aby se z kazety odstranily vzduchové bubliny.

8. a. V Davidsonově fixačním roztoku zůstanou všechny tkáně přes noc a příštího dne se přemístí do individuálních nádrží s 10 % neutrálním pufrovaným formalínem. Nádrže s kazetami se po 5 minut jemně protřepou s cílem zajistit dostatečně proniknutí formalínu do kazet.

▼M6

b. V Bouinově fixačním roztoku zůstanou tkáně po 24 h, poté se přenesou do 70 % ethanolu.

Zpracování tkání

Cíle:

1. Dehydratace tkáně pro dostatečné proniknutí parafínu.

2. Impregnace tkáně parafínem, aby zůstala zachována integrita tkání, a vytvoření pevného povrchu pro mikrotomii.

Postupy:

3. Tkáňové kazety označené etiketou se vyjmou z formalínového/ethylenového uložení a vloží se do koše (košů) ke zpracování. Koš se vloží do tkáňového procesoru.

4. Zvolí se plán zpracování.

5. Poté, co tkáňový procesor dokončí cyklus zpracování, koš (koše) je možné přenést do zalévacího přístroje.

Zalití

Cíl:

Řádná orientace vzorku ve ztuhlém parafínu pro mikrotomii.

Postupy:

1. Koš (koše) s kazetami se vyjme (vyjmou) z procesoru a ponoří se do přední komory termální konzoly zalévacího přístroje naplněné parafínem nebo se kazety přenesou do samostatného ohřívače parafínu.

2. První kazeta, která má být zalita, se vyjme z přední komory termální konzole nebo z ohřívače parafínu. Víčko kazety se sejme a odstraní se a zkontroluje se etiketa na kazetě, zda odpovídá záznamům o zvířeti, aby se případné nesrovnalosti vyřešily ještě před zalitím.

3. Vybere se zalévací forma vhodné velikosti.

4. Formy se podrží pod výtokovým otvorem dávkovací konzoly a naplní se roztaveným parafínem.

5. Z kazety se vyjme vzorek a vloží se do roztaveného parafínu ve formě. To se opakuje se 4–8 vzorky na každou formu s parafínem. Poloha jednotlivých ryb se vyznačí tak, že se ryba č. 1 uloží v úhlu 180 stupňů vůči rybám č. 2–4/8.

6. Přidá se další parafín, aby byl vzorek zakryt.

7. Forma s dnem kazety se vloží na chladicí desku kryokonzole.

8. Po ztuhnutí parafínu se blok (tj. ztuhlý parafín s tkáněmi a dnem kazety) vyjme z formy.

Mikrotomie

Cíl:

Provedení a uložení histologických řezů za účelem zbarvení.

Postupy:

1. Počáteční fáze mikrotomie, která se nazývá „odkrytí“, se provádí takto:

   a) Parafínový blok se vloží do svorky mikrotomu.

   b) Svorka se posune otáčením kolečka mikrotomu a z parafínového povrchu bloku se odřezávají silné plátky, dokud nůž nedosáhne uložených tkání.

▼M6

c) Tloušťka řezů na mikrotomu se nastaví mezi 3–5 mikrony. Svorka se posune a z bloku se několika řezy odstraní jakékoli artefakty, jež vznikly na odříznutém povrchu tkání během hrubých řezů.

d) Blok je možné vyjmout ze svorky a položit jej lícem dolů na led, aby tkáň nabobtnala.

2. Další fází mikrotomie je provedení konečných řezů a umístění tkáně na podložní sklíčka. Tyto postupy se provádějí takto:

a) Pokud byl blok položen na led, z ledu se sejme a znovu se vloží do svorky mikrotomu.

b) Svorka se posunuje otáčením kolečka mikrotomu, přičemž tloušťka řezu je nastavena na 3–5 mikronů. Z bloku se odřezávají řezy, dokud se nezíská „páska“ obsahující alespoň jeden přijatelný řez včetně gonád. (V případě potřeby je možné blok během provádění řezů ze svorky vyjmout, položit na led, aby tkáň nabobtnala, a vrátit do svorky.)

c) Řezy se umístí na hladinu vody ve vodní lázni. Usiluje se o získání alespoň jednoho řezu, který nebude zvrásněný a pod nímž nebudou zachyceny žádné vzduchové bublinky.

d) Podložním sklíčkem mikroskopu se podloží nejlepší řez, který se pomocí sklíčka vyjme z vody. Tento postup se označuje jako „umístění“ řezu na podložní sklíčko.

e) Pro soubor ryb se připraví tři řezy. Druhý a třetí řez se provedou v intervalech 50 mikronů od prvního řezu. Pokud ryba s gonádami nebyla uložena do stejné úrovně provádění řezů, je třeba provést více řezů, aby se zajistilo, že z každé ryby bude získáno alespoň šest řezů obsahujících gonády.

f) Tužkou pro označování sklíček se na sklíčko zaznamená číslo bloku, z něhož byl řez pořízen.

g) Sklíčko se umístí na barvicí stojan.

h) Blok se vyjme ze svorky a uloží se lícem dolů k uskladnění.

Barvení vzorků, překrytí krycím sklíčkem a označování

Cíle:

— Obarvení řezů pro histopatologické vyšetření.

— Trvalé zapečetění zbarvených tkání.

— Trvalá identifikace zbarvených vzorků způsobem, který umožní jejich plnou vysledovatelnost.

Postupy:

1. Barvení

a. Vzorky se přes noc před barvením vysuší na vzduchu.

b. Řezy se obarví hematoxylinem-eosinem.

2. Překrytí krycím sklíčkem

a. Krycí sklíčka lze nasazovat ručně nebo automaticky.

b. Vzorek se ponoří do xylenu nebo do přípravku TissueClear a přebytek xylenu nebo TissueClear se ze vzorku jemně sklepne.

▼**M6**

c. U konce vzorku opačného, než je zmrazený konec, nebo na krycí sklíčko se nanese přibližně 0,1 ml barvicího média.

d. Krycí sklíčko se nakloní v mírném úhlu a položí na vzorek.

3. Označování

a. Každá etiketa na vzorku by měla obsahovat tyto informace:

i. Název laboratoře

ii. Druh zvířete

iii. Č. vzorku / č. podkladového sklíčka

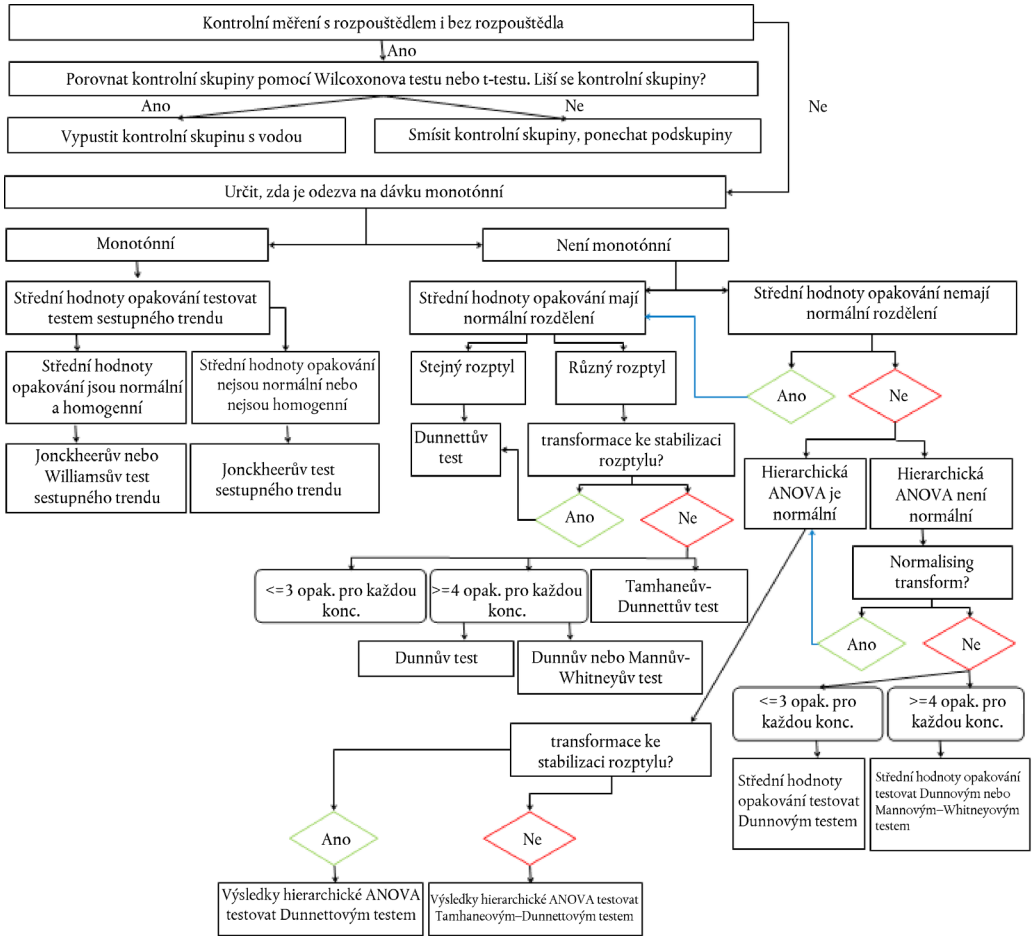
iv. Chemickou látku / expoziční skupinu

v. Datum

▼M6

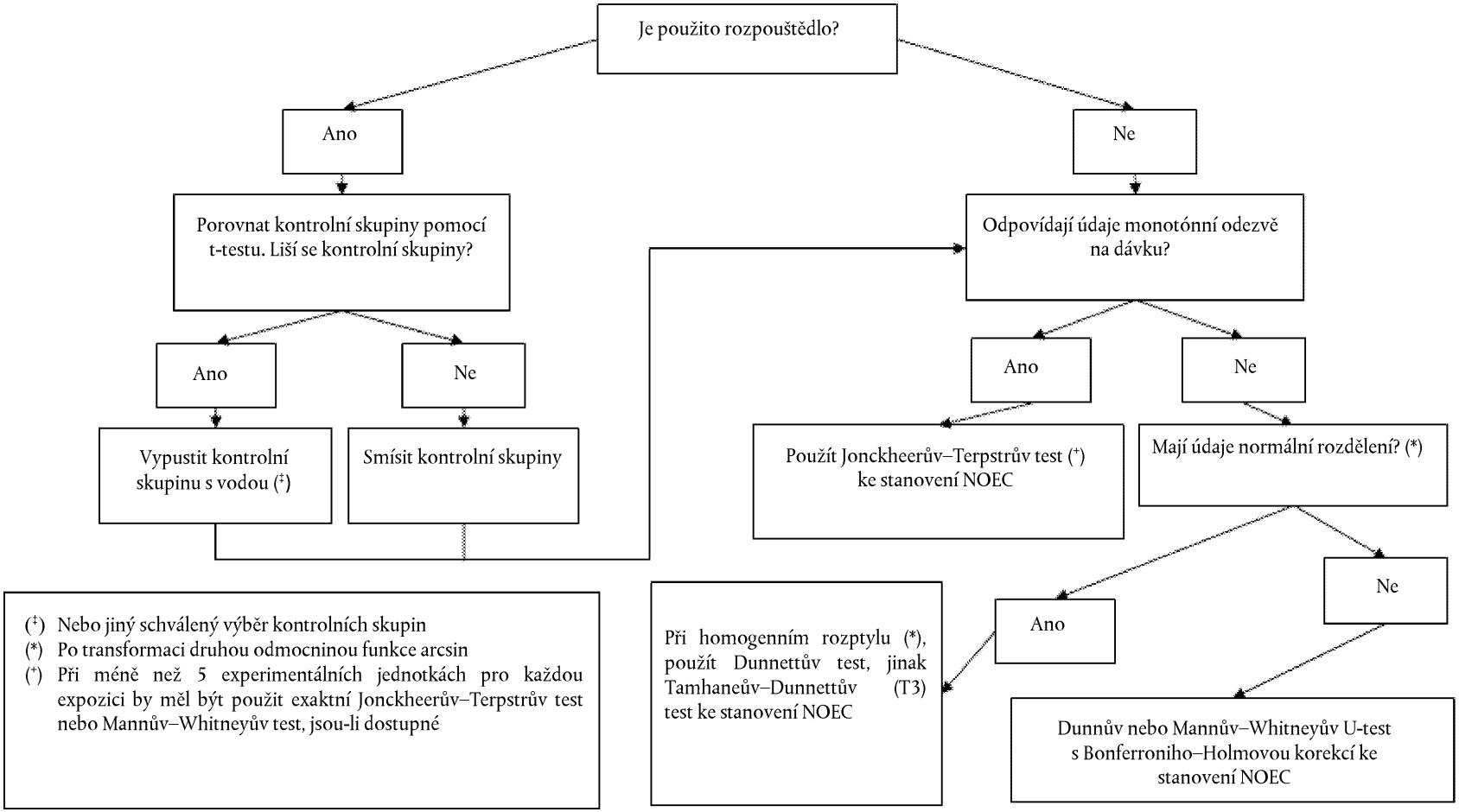
Dodatek 8

Schéma – statistické metody pro analýzu vitelogeninu



▼M6

Schéma – statistické metody pro analýzu poměru pohlaví



▼M6

Dodatek 9

Návod k odběru vzorků pro určení genetického pohlaví a pro určení genetického pohlaví metodou PCR

Odběr, příprava a uskladnění vzorků před určením genetického pohlaví u halančíka japonského metodou PCR (připraveno Laboratoří pro vodní organismy společnosti Bayer CropScience AG)

1. Z každé jednotlivé ryby se jemnými nůžkami odstřihne řitní ploutev nebo hřbetní ploutev a umístí se do zkumavky obsahující 100 µl extrakčního pufru 1 (podrobnosti o přípravě pufru viz níže). Po každé jednotlivé rybě se nůžky očistí v kádince s destilovanou H_2O a osuší se papírovým ubrouskem.

2. Nyní se ploutvové tkáně v mikrozkumavce homogenizují teflonovou tyčinkou pro lýzu buněk. Pro každou zkumavku se použije nová tyčinka, aby se zabránilo jakékoli kontaminaci. Tyčinky se přes noc vloží do roztoku 0,5 M NaOH, po dobu 5 minut oplachují destilovanou H_2O a skladují v etanolu nebo sterilizátoru po ošetření v autoklávu až do použití.

3. Je také možné ploutvové tkáně skladovat bez extrakčního pufru 1 na suchém ledu a poté v mrazničce při teplotě – 80 °C, aby se zabránilo jakékoli degeneraci DNA. Extrakce však probíhá lépe, pokud se současně extrahuje DNA (manipulace viz výše; před přidáním pufru do zkumavky by vzorky po skladování při teplotě – 80 °C měly být rozmrazeny na ledu).

4. Po homogenizaci se všechny zkumavky vloží do vodní lázně a nechají po 15 minut vařit při teplotě 100 °C.

5. Poté se do každé zkumavky pipetou vloží 100 µl extrakčního pufru 2 (podrobnosti o přípravě pufru viz níže). Vzorky se ponechají 15 minut při pokojové teplotě za občasného jemného protřepání v ruce.

6. Poté se všechny zkumavky znovu vloží do vodní lázně a nechají dalších 15 minut vařit při teplotě 100 °C.

7. Až do další analýzy jsou zkumavky zmrazeny při teplotě – 20 °C.

Příprava pufru

Pufr PCR 1:

500 mg N-Lauroylsarcosin (např. Merck KGaA, Darmstadt, Německo)

2 ml 5M NaCl

doplnit destilovanou H_2O do objemu 100 ml

→ autokláv

Pufr PCR 2:

20 g Chelex (např. Biorad, München, Německo)

nechat nabobtnat ve 100 ml destilované H_2O

→ autokláv

Určení genetického pohlaví (metodou PCR) u halančíka japonského (připraveno Laboratoří pro vodní organismy společnosti Bayer CropScience AG a Biocentrem Univerzity ve Würzburgu)

Připravené a zmrazené zkumavky (jak je popsáno v předchozím oddíle) se rozmrazí na ledu. Poté se odstředí odstředivkou Eppendorf (30 sekund při maximální rychlosti, při pokojové teplotě). Pro PCR se použije čistý supernatant oddělený od sraženiny. Je naprosto nezbytné zabránit tomu, aby se do reakce PCR dostaly jakékoli stopy Chelexu (nacházející se ve sraženině), protože by interferoval s působením tzv. Taq-polymerázy. Supernatant se použije přímo nebo ho lze zmrazit (na teplotu – 20 °C) a znovu rozmrazit v několika cyklech bez negativního dopadu na DNA pro pozdější analýzy.

▼**M6**

1. *Příprava „reakční směsi“ (25 µl na každý vzorek):*

	Objem	Konečná koncentrace
Templátová DNA	0,5 µl–2 µl	
10x pufr PCR s $MgCl_2$	2,5 µl	1x
Nukleotidy (každý z dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	4 µl (5mM)	200 µM
Přímý primer (10 µM) (viz níže 3–5)	0,5 µl	200nM
Reverzní primer (10 µM) (viz níže 3-5)	0,5 µl	200 nM
DMSO	1,25 µl	5 %
Voda (PCR grade)	do 25 µl	
Taq-E-polymeráza	0,3 µl	1,5 U
10x pufr PCR s $MgCl_2$: 670 mM Tris/HCl (pH 8,8 při 25 °C), 160 mM $(NH_4)_2SO_4$, 25 mM $MgCl_2$, 0,1 % Tween 20		

Pro každou reakci PCR (viz níže 3–5) je potřeba zvláštní primer jako nová kombinace „reakční směsi“ a příslušného potřebného množství templátové DNA pro každý vzorek (viz výše). Příslušné objemy se pipetami přenesou do nových zkumavek. Poté se všechny zkumavky uzavřou, míchají (asi 10 sekund) a odstředí (10 sekund, při pokojové teplotě). Poté lze zahájit příslušné programy PCR. V každém programu se kromě toho použije jedna pozitivní kontrola (modelový vzorek DNA se známou aktivitou a jasnými výsledky) a jedna negativní kontrola (1 µl dest. H_2O).

2. *Příprava agarózového gelu (1 %) – během probíhajících programů PCR*

— Rozpusťte 3 g agarózy v 300 ml 1 × pufru TAE (1 % agarózový gel).

— Tento roztok by se měl povařit v mikrovlnné troubě (asi 2–3 min).

— Horký roztok přeneste do speciální odlévací schránky, která je položena na ledu.

— Přibližně po 20 minutách je agarózový gel připraven k použití.

— Agarózový gel skladujte v 1 × pufru TAE až do konce programů PCR.

3. *Program PCR s aktinem*

Cílem tohoto programu PCR je prokázat, že DNA ve vzorku není poškozena.

— Speciální primer:

„Mact1(horní/přímý)“ → TTC AAC AGC CCT GCC ATG TA

„Mact2(dolní/reverzní)“ → GCA GCT CAT AGC TCT TCT CCA GGG AG

— Program:

5 min při 95 °C

Cyklus (35krát):

Denaturace → 45 s při 95 °C

Nasedání → 45 s při 56 °C

Prodloužení → 1 min při 68 °C

15 min při 68 °C

▼M6

4. *Program PCR k zjištění genů X a Y*

Při tomto programu se vzorky s nepoškozenou DNA použijí k zjištění genů X a Y. Samčí DNA by se měla projevit jedním dvojitým proužkem a samičí DNA jedním jednoduchým proužkem (po obarvení a gelové elektroforéze). Pro tento program by měla být zařazena jedna pozitivní kontrola pro samčí vzorek (vzorek XY) a jedna pro samičí vzorek (vzorek XX).

— Speciální primer:

„PG 17.5“ (horní/přímý) → CCG GGT GCC CAA GTG CTC CCG CTG

„PG 17.6“ (dolní/reverzní) → GAT CGT CCC TCC ACA GAG AAG AGA

— Program:

5 min při 95 °C

Cyklus (40krát):

Denaturace	→ 45 s při 95 °C
Nasedání	→ 45 s při 55 °C
Prodloužení	→ 1 min 30 s při 68 °C

15 min při 68 °C

5. *Program PCR k zjištění genů Y jako „kontrola“ pro program PCR k zjištění genů X a Y:*

Tento program PCR ověřuje výsledky „programu PCR k zjištění genů X a Y“. „Samčí vzorky“ by měly vykázat jeden proužek a „samičí vzorky“ by neměly vykázat žádný proužek (po obarvení a gelové elektroforéze).

— Speciální primer:

„DMTYa (horní/přímý)“ → GGC CGG GTC CCC GGG TG

„DMTYd (dolní/reverzní)“ → TTT GGG TGA ACT CAC ATG G

— Program:

5 min při 95 °C

Cyklus (40krát):

Denaturace	→ 45 s při 95 °C
Nasedání	→ 45 s při 56 °C
Prodloužení	→ 1 min při 68 °C

15 min při 68 °C

6. *Barvení vzorků PCR:*

Barvicí roztok:

50 % glycerol

100 mM EDTA

1 % SDS

0,25 % bromfenolová modř

0,25 % xylen kyanol

Pomocí pipety se do každé jednotlivé zkumavky přidá 1 µl barvicího roztoku.

7. *Zahájení gelové elektroforézy:*

— Připravený 1 % agarózový gel se přenese do komory pro gelovou elektroforézu naplněné 1 × pufrem TAE.

— 10–15 µl každého obarveného vzorku PCR se pipetou umístí do jamky v agarózovém gelu.

— Do samostatné jamky se pipetou nanese také 5–15 µl velikostního markeru – 1kb žebříku (Invitrogen).

— Zahájí se elektroforéza při 200 V.

— Po 30–45 min se proces ukončí.

▼**M6**

8. *Určení pruhů:*

— Agarózový gel se omyje v destilované H_2O.

— Následně se agarózový gel na 15–30 min umístí do ethidiumbromidu.

— Poté by měl být pořízen snímek agarózového gelu v UV transiluminátoru.

— Nakonec se vzorky analyzují porovnáním s pruhem (nebo pruhy) pozitivní kontroly a s markerem (žebříkem).

▼M6

Dodatek 10

Návod k odběru tkáňových vzorků pro určení genetického pohlaví u koljušky tříostné metodou PCR

Odběr tkáňových vzorků a extrakce DNA

DNA lze extrahovat pomocí různých komerčně dostupných činidel a ručních i automatizovaných extrakčních systémů. Níže je ve stručnosti popsán protokol používaný v laboratoři CEFAS, Weymouth, popřípadě s doplněnými alternativními postupy.

1. Z každé jednotlivé ryby se jemnými nůžkami odstřihne malý kousek tkáně (10–20 mg) z dorzálně laterální oblasti (po odstranění hlavy a ocasu pro analýzu VTG). Tkáň se vloží do zkumavky a ta se buď umístí přímo do kapalného dusíku (pro skladování při teplotě – 80 °C), nebo se naplní 70 % ethanolem (pro přepravu a následné skladování při teplotě 4 °C). Nůžky se po každé jednotlivé rybě očistí v 70 % ethanolu a poté v destilované vodě a osuší se hedvábným papírem.

2. Ethanol (je-li přítomen) se odstraní odsátím a tkáň se nechá přes noc vyluhovat s proteinázou K ve 400 µl pufru ATL (Qiagen). Poměrný podíl (200 µl) výluhu se přemístí do S-bloku s 96 jamkami (Qiagen) a DNA se extrahuje v 96jamkovém formátu za pomoci biorobota Qiagen Universal BioRobot a soupravy QIamp Investigator BioRobot kit. DNA se eluuje v 50 µl vody prosté DNázy a RNázy. Použijí-li se pro extrakci DNA tvrdé tkáně (jako je hřbetní nebo prsní ploutev), může být nezbytné homogenizovat vzorek v lýzovém pufru za pomoci homogenizátoru FastPrep® nebo rovnocenného systému pro narušení tkání.

   Alternativní postup:

   a) Tkáň se nechá přes noc vyluhovat s proteinázou K ve 400 µl lýzového pufru G2 (Qiagen) a DNA se extrahuje z 200 µl výluhu za pomoci buď soupravy EZ-1 DNA easy tissue kit a biorobota EZ-1, nebo soupravy DNA easy tissue mini kit. DNA se eluuje v objemu 50 µl.

   b) Tkáně se zpracují pomocí činidla DNAzol. Vzorky tkání se krátce (10 minut) lýzují v 1 ml DNAzolu v mikrocentrifugační zkumavce o objemu 1,5 ml a poté se odstředí 5 minut při 13 000 ot/min, aby se odstranily veškeré pevné částice. Lýzovaný vzorek se poté přemístí do nové mikrocentrifugační zkumavky o objemu 1,5 ml, která obsahuje 500 µl 100 % ethanolu molekulární kvality, a 10 minut se odstředí při 13 000 ot/min, aby se vysrážela DNA. Ethanol se odstraní a nahradí se 400 µl 70 % ethanolu molekulární kvality, 5 minut se odstředí při 13 000 ot/min a peleta DNA se rozpustí v 50 µl vody s molekulovou kvalitou, prosté DNázy a RNázy. Opět, použijí-li se tvrdé tkáně (prsní ploutev), může být nezbytné před extrakcí DNA homogenizovat vzorek v lýzovém pufru za pomoci homogenizátoru FastPrep® nebo rovnocenného systému pro narušení tkání.

3. DNA se skladuje až do použití při teplotě – 20 °C.

Důležitá poznámka: při těchto postupech se musí používat rukavice.

Analýza pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR)

Byly provedeny amplifikace pomocí 2,5 µl extraktu DNA v 50 µl objemu do reakce za použití primerů Idh locus (popsaných v publikaci Peichel et al., 2004. Current Biology 1:1416–1424):

Přímý primer	5′ GGG ACG AGC AAG ATT TAT TGG 3′
Reverzní primer	5′ TAT AGT TAG CCA GGA GAT GG 3′

▼**M6**

Existuje řada dodavatelů vhodných činidel pro PCR. Níže uvedená metoda se v současnosti používá v Centru pro životní prostředí, rybolov a akvakulturu (CEFAS), v laboratořích ve Weymouthu.

1. *Příprava „reakční směsi“ (50 µl na každý vzorek):*

Pracovní roztok („mastermix“) se připraví následujícím způsobem. Lze jej připravit předem a uskladnit zmrazený při teplotě – 20 °C až do použití. Mastermixu se připraví dostatečné množství i pro negativní kontrolu (použije se pouze voda jakosti pro molekulární biologii).

	Objem (koncentrace zásobního roztoku) na vzorek	Konečná koncentrace
5x reakční pufr GoTaq®	10 µl	1x
$MgCl_2$	5 µl (25 mM)	2,5 mM
Nukleotidy (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	0,5 µl (25 mM každý)	250 µM každý
Přímý primer	0,5 µl (0,1 nmol/µl)	2,0 µM
Reverzní primer	0,5 µl (0,1 nmol/µl)	2,0 µM
Voda jakosti pro molekulární biologii	30,75 µl	
GoTaq polymeráza	0,25 µl	1,25 U

— 47,5 µl se odpipetuje do tenkostěnné zkumavky pro PCR o objemu 0,5 ml, označené etiketou.

— Do vhodně označené zkumavky se přidá 2,5 µl purifikované DNA. Opakuje se pro všechny vzorky a pro negativní kontrolu.

— Pokryje se 2 kapkami minerálního oleje. Alternativně lze použít termocykler s nahřátým víčkem.

— Uzavře se víčky.

— Vzorky se 5 minut denaturují v termocykleru Peltier PTC-225 při teplotě 94 ± 2 °C a následuje 39 cyklů 1 minuta při teplotě 94 ± 2 °C, 1 minuta při teplotě 55 ± 2 °C, 1 minuta při teplotě 72 ± 2 °C a konečná extenze 10 minut při teplotě 72 ± 2 °C.

2. *Příprava agarózového gelu (2 %):*

Produkty PCR se tradičně zpracovávají v 20 % agarózovém gelu, který obsahuje ethidiumbromid.

Lze rovněž použít systémy kapilární elektroforézy.

— Odváží se 2 g agarózy ve 100 ml 1 × pufru TAE

— Ohřeje se v mikrovlnné troubě (asi 2–3 min), aby se agaróza rozpustila.

— Přidají se 2 kapky ethidiumbromidu v konečné koncentraci 0,5 µg/ml.

— Horký roztok se přenese do zařízení na odlévání gelů.

— Gel se nechá ztuhnout.

3. *Gelová elektroforéza:*

— Agarózový gel se přemístí do elektroforézního zařízení a ponoří se do 1 × pufru TAE.

— 20 µl z každého vzorku se naloží do samostatných jamek a do náhradní jamky se přidá marker molekulové hmotnosti (100 bp DNA ladder, Promega).

— Elektroforéza se provádí 30–45 minut při 120 V.

▼**M6**

4. *Vizualizace produktů amplifikace*

Pokud byl do agarózového gelu přidán ethidiumbromid, jak bylo popsáno výše, produkty DNA se vizualizují pod zdrojem UV záření. Alternativně se agarózový gel obarví ponořením do zředěného roztoku ethidiumbromidu (0,5 μg na ml vody) po dobu 30 minut před vizualizací.

▼M6

Dodatek 11

Postup umělého oplodnění u koljušky tříostné

Účelem tohoto oddílu je popsat postup, jak získat oplodněné jikry koljušky tříostné se zřetelem k jejich použití ve zkoušce FSDT.

Postupy

Získání spermatu od samečků

1. Dobře vybarvený sameček z požadované populace se usmrtí.

2. Z obou boků ryby se vyříznou varlata. *Varlata jsou obvykle silně pigmentované struktury tyčinkovitého tvaru, které jsou snadno rozeznatelné v laterální střední linii těla*. Použije se některá z následujících metod:

3. Jemnými nůžkami se vede řez od kloaky v délce 1–1,5 cm jedním střihem přibližně pod úhlem 45 stupňů.

4. Skalpelem se provede malý řez na boku ryby poněkud posteriorně za pánví a přímo ventrálně od laterálních destiček.

5. Varlata se jemnou pinzetou vyjmou a umístí se do Petriho misky.

6. Každé varle se pokryje 100 µl čerstvě připraveného **Hankova konečného roztoku** (*).

7. Varlata se břitvou nebo skalpelem nakrájejí na malé kostičky. Tím se uvolní sperma, které dodá Hankovu roztoku mléčný vzhled.

8. Tekutina obsahující sperma se přidá do zkumavky, přičemž se dbá na to, aby při přenosu pipetou neobsahovala žádné kousky tkáně varlat.

9. Do zkumavky se přidá 800 µl of Hankova konečného roztoku a dobře se promíchá.

10. V případě potřeby lze samečka uchovávat fixací ve 100 % ethanolu nebo v jiném požadovaném fixativu. To je zvlášť důležité, pokud se při studii určuje parentální původ potomků.

Důležitá poznámka: *Většinu požadovaných zásobních roztoků lze připravit předem, avšak* ***zásobní roztok 5*** *a následně* ***konečný roztok*** *by měly být* ***čerstvě*** *připraveny v den použití.*

Zásobní roztok 1

NaCl	8,00 g
KCl	0,40 g
destilovaná voda	100 ml

Zásobní roztok 2

Na_2HPO_4 (bezvodý)	0,358 g
KH_2PO_4	0,60 g
destilovaná voda	100 ml

Zásobní roztok 3

$CaCl_2$	0,72 g
destilovaná voda	50 ml

(*) Hanksův pufrovaný solný roztok (HBSS):

HBSS je potřebný pro zachování spermatu v době, kdy se připravuje k oplodnění.

▼M6

Zásobní roztok 4

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	1,23 g
destilovaná voda	50 ml

Zásobní roztok 5 (čerstvě připravený)

$NaHCO_3$	0,35 g
destilovaná voda	10 ml

Poznámka: Je-li některá z výše uvedených solí již k dispozici, avšak s odlišným obsahem vody (např. $2H_2O$, a nikoli bezvodá), lze ji přesto použít, ale nejprve je třeba upravit její hmotnost na základě molekulové hmotnosti).

Pro získání Hankova konečného roztoku se zkombinují v tomto pořadí:

zásobní roztok 1	1,0 ml
zásobní roztok 2	0,1 ml
zásobní roztok 3	0,1 ml
destilovaná voda	8,6 ml
zásobní roztok 4	0,1 ml
zásobní roztok 5	0,1 ml

Před použitím se dobře promíchá.

Oplodnění

1. Z požadované populace se vyberou velké, gravidní samičky; samičky jsou připraveny k tření teprve tehdy, když jsou vidět jikry vyčnívající z kloaky. Připravené samičky zaujímají typickou polohu „hlavou nahoru“.

2. Prstem se jemně přejede po boku ryby směrem k ocasu, aby se napomohlo vytlačení vaku s jikrami do nové Petriho misky. Totéž se opakuje na druhém boku a ryba se vrátí do nádrže.

3. Jikry lze pomocí jemného štětečku rozptýlit (vytvořit monovrstvu). Je důležité dbát na to, aby spermatu bylo vystaveno co nejvíce jiker, takže je užitečné, aby pokrývaly co největší plochu. Důležitá poznámka: Jikry se udržují vlhké tím, že se obalí navlhčeným hedvábným papírem (je důležité, aby se jikry přímo nedotýkaly vody, neboť to může způsobit předčasně ztuhnutí chorionu a zabránit oplodnění). Počet jiker, které může každá samička produkovat, se velmi liší, ale v průměru by se z jedné gravidní samičky mělo snadno získat přibližně 150 jiker.

4. 25 µl spermatu ve směsi s Hankovým roztokem se štětečkem rovnoměrně nanese na celý povrch jiker. Po začátku oplodnění jikry rychle (během minuty) ztuhnou a změní barvu. Je-li odhadovaný počet jiker větší než 150, postup se opakuje. Obdobně pokud jikry během minuty neztuhnou, přidá se o něco více spermatu. Důležitá poznámka: Přidání většího množství spermatu nemusí nutně zvýšit míru oplodnění.

5. Jikry a roztok se spermatem by měly být ponechány pro „interakci“ nejméně 15 minut a do 1,5 hodiny po oplodnění by oplodněné jikry měly být umístěny do expozičních akvárií.

6. Postup se opakuje s další samičkou, dokud se neodebere požadovaný počet jiker.

7. Několik jiker z poslední sady se dá stranou a zafixují se v 10 % kyselině octové.

▼M6

Počítání jiker a jejich distribuce do zkušebních akvárií

1. Jikry by měly být rovnoměrně distribuovány mezi všechny úrovně expozice, aby nedošlo ke genetickému zkreslení. Každá sada oplodněných jiker by pomocí tupého nástroje (tj. entomologickou pinzetou se širokým břitem nebo pomocí očkovací kličky) měla být rozdělena do stejně velikých skupin (tolika, kolik je úrovní expozice). Mají-li být čtyři opakování pro každou expozici, každé s 20 jikrami, pak se do každého expozičního akvária musí distribuovat 80 jiker. Důležitá poznámka: Pokud není jisté, že bude dosaženo 100 % míry oplodnění, může být užitečné přidat 20 % navíc (tj. 96 jiker na každou úroveň expozice).

2. Vně sítě chráněné otcem jsou jikry koljušky velmi náchylné k plísňovým infekcím. V této souvislosti je velice důležité, aby byly všechny jikry během prvních 5 dnů zkoušky ošetřeny methylenovou modří. Zásobní roztok methylenové modři se připraví s koncentrací 1 mg/ml a přidá se do expozičních akvárií, aby se získala maximální konečná koncentrace 2,125 mg/l. Důležitá poznámka: Po vylíhnutí by koljušky již neměly být methylenové modři vystaveny, systém by proto ode dne 6 zkoušky neměl methylenovou modř již obsahovat.

3. Jikry se denně kontrolují a veškeré uhynulé nebo neoplodněné jikry se jako takové zaznamenají. Důležitá poznámka: Jikry by až do vylíhnutí nikdy neměly opustit vodu, a to ani na sebekratší dobu.

▼M6

C.42. BIOLOGICKÁ ROZLOŽITELNOST V MOŘSKÉ VODĚ

VŠEOBECNÝ ÚVOD

1. Tato zkušební metoda je rovnocenná Pokynu OECD pro zkoušení č. 306 (1992). Když byly vyvíjeny původní zkušební metody, nebylo známo, do jaké míry lze výsledky screeningových zkoušek týkajících se snadné biologické rozložitelnosti za použití sladké vody, splaškových vod nebo aktivovaného odpadu jako inokula uplatnit na mořské prostředí. K této otázce byly uváděny různé výsledky (např. (1)).

2. Mnohé průmyslové odpadní vody, obsahující řadu chemických látek, se dostanou do moře buď přímým vypuštěním, nebo prostřednictvím výtoků a ústí řek, v nichž je doba zdržení krátká v porovnání s obdobím potřebným pro úplné biologické rozložení mnoha chemických látek, které jsou zde přítomny. Vzhledem k rostoucímu povědomí o tom, že je třeba chránit mořské prostředí proti rostoucí zátěži, již chemické látky způsobují, a odhadnout pravděpodobnou koncentraci chemických látek v moři, byly vyvinuty zkušební metody pro zkoušky biologické rozložitelnosti v mořské vodě.

3. Metody zde popsané využívají přírodní mořské vody jako vodní fáze i jako zdroje mikroorganismů. Ve snaze splnit požadavky metod pro snadnou biologickou rozložitelnost ve sladké vodě bylo zkoumáno použití vysoce filtrované a odstředěné mořské vody a rovněž užití mořských sedimentů jako inokula. Tato šetření nebyla úspěšná. Zkušebním médiem je proto přírodní mořská voda upravená tak, aby se odstranily hrubé částice.

4. Aby bylo možné posoudit konečnou biologickou rozložitelnost metodou třepací lahve, musí se použít poměrně vysoké koncentrace zkoušené látky vzhledem k nízké citlivosti analytické metody rozpuštěného organického uhlíku (DOC). To na druhé straně vyžaduje, aby byly do mořské vody přidány minerální živiny (N a P), jejichž nízké koncentrace by jinak odstraňování DOC omezily. Tyto živiny je z důvodu koncentrace přidané zkoušené látky nezbytné přidat také při použití metody uzavřených lahviček.

5. Tyto metody tudíž nejsou zkouškami snadné biologické rozložitelnosti, jelikož se nepřidává žádné inokulum kromě mikroorganismů, které jsou v mořské vodě již přítomny. Tyto zkoušky rovněž nesimulují mořské prostředí, protože se přidávají živiny a koncentrace zkoušených látek je mnohem vyšší, než v jaké by byly přítomny v moři. Z těchto důvodů se tyto metody navrhují v rámci nového pododdílu „Biologická rozložitelnost v mořské vodě“.

UPLATNĚNÍ

6. Výsledky zkoušek aplikované s ohledem na způsob použití a likvidace příslušné látky, u níž se ukáže, že se dostává do moře, dávají první představu o biologické rozložitelnosti v mořské vodě. Je-li výsledek pozitivní (odstranění DOC > 70 %; teoretická spotřeba kyslíku (TSK) > 60 %), lze učinit závěr, že existuje potenciál pro biologickou rozložitelnost v mořském prostředí. Ani negativní výsledek takový potenciál nevylučuje, naznačuje však, že je nezbytné další studium, např. s použitím co nejnižší koncentrace zkoušené látky.

▼M6

7. V každém případě platí, že požaduje-li se stanovení míry nebo stupně biologického rozkladu v mořské vodě v té či oné lokalitě v konkrétnějších hodnotách, budou zřejmě muset být použity jiné, složitější a propracovanější, a tudíž i nákladnější metody. Například by bylo možné provést simulační zkoušku s koncentrací zkoušené látky, která se více přibližuje pravděpodobné koncentraci v životním prostředí. Bylo by rovněž možné použít neobohacenou, neupravenou mořskou vodu ze zájmové lokality a na primární biologický rozklad by mohla navázat specifická chemická analýza. Pro úplnou biologickou rozložitelnost by byly zapotřebí látky značené ^{14}C, aby bylo možné měřit míry vymizení rozpustného organického ^{14}C a produkce $^{14}CO_2$ v koncentracích reálných v životním prostředí.

VOLBA METOD

8. Výběr metody, která má být použita, závisí na řadě faktorů; jako pomůcka při výběru poslouží následující tabulka. Látky s rozpustností ve vodě nižší, než je ekvivalent přibližně 5 mg C/l, není možné zkoušet metodou třepací lahve, avšak špatně rozpustné látky v zásadě lze testovat metodou uzavřených lahviček.

Tabulka

Výhody a nevýhody zkoušky s třepací lahví a zkoušky v uzavřených lahvičkách

METODA	VÝHODY	NEVÝHODY
TŘEPACÍ LAHEV	— jednoduchá aparatura s výjimkou analyzátoru C — doba trvání 60 d není problémem — žádný vliv nitrifikace — lze přizpůsobit pro těkavé látky	— vyžaduje analyzátor C — používá se 5–40 mg DOC/l, může být inhibující — stanovení DOC je obtížné při nízkých koncentracích v mořské vodě (vliv chloridů) — DOC v mořské vodě je někdy vysoký
UZAVŘENÉ LAHVIČKY	— jednoduchá aparatura — jednoduché konečné stanovení — užívá se nízkých koncentrací zkušebních látek (2 mg/l), tudíž menší pravděpodobnost inhibice — lze snadno přizpůsobit pro těkavé látky	— může být obtížné zachovat vzduchotěsnost lahviček — růst bakterií na stěnách může vést k nesprávným hodnotám — hodnoty příjmu O_2 v slepých zkouškách mohou být vysoké, zejména po 28 dnech; to lze vyřešit odstátím mořské vody — možný vliv příjmu O_2 v důsledku nitrifikace

METODA TŘEPACÍ LAHVE

ÚVOD

1. Tato metoda je variantou modifikované screeningové zkoušky OECD, která je popsána v kapitole C.4–B této přílohy (2), prováděnou v mořské vodě. Byla dokončena jako výsledek mezilaboratorní porovnávací zkoušky, kterou pro Evropskou komisi (EK) zorganizoval dánský Institut pro kvalitu vody (3).

2. Podobně jako u doprovodné metody uzavřených lahviček pro mořské prostředí nelze výsledky této zkoušky považovat za indikátory snadné biologické rozložitelnosti, nýbrž mají být využívány výlučně pro získání informací o biologické rozložitelnosti látek v mořském prostředí.

▼M6

PODSTATA METODY

3. Předem určené množství zkoušené látky se rozpustí ve zkušebním médiu tak, aby se získala koncentrace 5–40 mg rozpuštěného organického uhlíku (DOC)/l. Zlepší-li se meze citlivosti analýz organického uhlíku, může být výhodné použití nižších koncentrací zkoušené látky, zejména v případě inhibujících látek. Roztok zkoušené látky ve zkušebním médiu se za protřepávání inkubuje v temnu nebo v rozptýleném světle v aerobních podmínkách při stálé teplotě (udržované v toleranci ± 2 °C), která se obvykle bude pohybovat v rozmezí 15–20 °C. V případech, kdy je cílem studie simulovat situace v životním prostředí, mohou být prováděny i zkoušky mimo toto obvyklé teplotní rozmezí. Doporučené maximální trvání zkoušky je přibližně 60 dnů. Rozklad se sleduje pomocí měření DOC (úplný rozklad) a v některých případech pomocí specifické analýzy (primární rozklad).

INFORMACE O ZKOUŠENÉ LÁTCE

4. Aby bylo možné poznat, zda lze zkoušku aplikovat na konkrétní látku, musí být známy některé její vlastnosti. Musí být stanoven obsah organického uhlíku v látce, její těkavost musí být taková, aby v průběhu zkoušky nedocházelo k významným ztrátám, a její rozpustnost ve vodě by měla být větší než ekvivalent 25–40 mg C/l. Zkoušená látka by rovněž neměla významně adsorbovat na povrchu skla. Pro interpretaci získaných výsledků, zejména pokud se tyto výsledky pohybují kolem „ještě vyhovujících“ hodnot, jsou vyžadovány informace o čistotě nebo relativních podílech hlavních složek zkoušené látky.

5. Pro volbu vhodných zkušebních koncentrací mohou být užitečné informace o toxicitě zkoušené látky pro bakterie, například o toxicitě naměřené při krátkodobých testech rychlosti dýchání (4); tyto informace mohou být důležité pro správnou interpretaci nízkých hodnot biologického rozkladu. Takové informace však nemusí být vždy dostatečné pro interpretaci výsledků získaných ve zkoušce biologické rozložitelnosti a vhodnější je postup popsaný v odstavci 18.

REFERENČNÍ LÁTKY

6. Musí být použity vhodné referenční látky, aby se prověřila mikrobiální aktivita daného vzorku mořské vody. Za tímto účelem lze použít látky jako např. benzoan sodný, octan sodný nebo anilin. Referenční látky se musí rozložit v přiměřeně krátkém časovém intervalu, jinak se doporučuje zkoušku opakovat s použitím jiného vzorku mořské vody.

7. V mezilaboratorní porovnávací zkoušce EK, kdy byly vzorky mořské vody odebrány v různých lokalitách a v různých ročních obdobích (3), činila u benzoanu sodného fáze iniciace (t_L) 1 až 4 dny a doba potřebná k dosažení 50 % rozkladu (t_{50}) činila bez fáze iniciace 1 až 7 dnů. U anilinu se t_L pohybovala od 0 do 10 dnů a t_{50} od 1 do 10 dnů.

REPRODUKOVATELNOST A CITLIVOST METODY

8. Reprodukovatelnost této metody byla stanovena mezilaboratorní porovnávací zkouškou (3). Nejnižší koncentrace zkoušené látky, při níž může být tato metoda při analýze DOC použita, je značně závislá na mezi stanovitelnosti analýzy organického uhlíku (v současnosti přibližně 0,5 mg C/l) a na koncentraci rozpuštěného organického uhlíku v užité mořské vodě (obvykle v řádu 3–5 mg/l pro vodu z otevřeného moře). Koncentrace DOC v pozadí

▼M6

by neměla být větší než přibližně 20 % celkové koncentrace DOC po přidání zkoušené látky. Není-li to možné, může být koncentrace DOC v pozadí někdy snížena odstátím mořské vody před zkoušením. Je-li tato metoda použita pouze při specifické chemické analýze (při které se měří primární rozklad), musí experimentátor s uvedením doplňujících informací zdokumentovat, zda lze očekávat úplnou rozložitelnost. Tyto doplňující informace mohou sestávat z výsledků jiných zkoušek snadné biologické rozložitelnosti nebo vlastní biologické rozložitelnosti.

POPIS METODY

Přístroje a pomůcky

9. Běžné laboratorní vybavení a dále:

   a. třepačka upravená pro umístění Erlenmeyerových baněk o objemu 0,5–2 litrů, buď s automatickou regulací teploty, nebo používaná v prostoru s konstantní teplotou 15–20 °C udržovanou s tolerancí ± 2 °C;

   b. Erlenmeyerovy baňky o objemu 0,5–2 litrů s úzkým hrdlem;

   c. membránový filtrační přístroj nebo odstředivka;

   d. membránové filtry, velikost pórů 0,2–0,45 μm;

   e. analyzátor uhlíku;

   f. vybavení pro specifickou analýzu (volitelné).

Mořská voda

10. Do důkladně vyčištěného zásobníku se odebere vzorek mořské vody a dopraví se do laboratoře, pokud možno během jednoho nebo dvou dnů po odběru. Během dopravy nesmí dojít k tomu, aby teplota vzorku byla výrazně vyšší než teplota, která bude použita při zkoušce. Přesně se identifikuje lokalita odběru vzorků a popíše se její stav znečištění a živin. Zejména u pobřežních vod se v této charakteristice uvede také počet kolonií heterotrofních mikroorganismů a stanovení koncentrací rozpuštěných dusičnanů, amoniaku a fosfátů.

11. O samotném vzorku mořské vody se uvedou tyto informace:

   — datum odběru,

   — hloubka odběru,

   — vzhled vzorku – zakalený atd.,

   — teplota v době odběru,

   — salinita,

   — DOC,

   — zpoždění mezi odběrem a použitím ve zkoušce.

12. Zjistí-li se, že obsah DOC ve vzorku mořské vody je příliš vysoký (odstavec 8), doporučuje se nechat mořskou vodu přibližně jeden týden před použitím odstát. To se děje za umístění v aerobních podmínkách při zkušební teplotě, v temnu nebo v rozptýleném světle. Je-li to nezbytné, aerobní podmínky se udržují jemným provzdušňováním. Během odstátí se sníží obsah snadno rozložitelného organického materiálu. Při mezilaboratorní porovnávací zkoušce (3) nebyl zjištěn žádný rozdíl mezi potenciálem rozkladu vzorků odstáté mořské vody a nově odebrané mořské vody. Před použitím se mořská voda upraví tak, aby se odstranily hrubé částice, např.

▼M6

filtrací přes nylonový filtr nebo přes hrubý papírový filtr (nikoli membránový nebo GF/C filtr), případně sedimentací a dekantací. Užitý postup musí být zaznamenán. Případná předúprava se provede po odstátí.

Zásobní roztoky pro minerální živné médium

13. Za použití reakčních činidel čistoty p.a. se připraví tyto zásobní roztoky:

a) Dihydrogenfosforečnan draselný, KH_2PO_4 8,50 g

Hydrogenfosforečnan didraselný, K_2HPO_4 21,75 g

Dihydrát hydrogenfosforečnanu sodného, $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ 33,30 g

Chlorid amonný, NH_4Cl 0,50 g

Rozpustí se a doplní na 1 litr destilovanou vodou.

b) Chlorid vápenatý, $CaCl_2$ 27,50 g

Rozpustí se a doplní na 1 litr destilovanou vodou.

c) Heptahydrát síranu hořečnatého, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 22,50 g

Rozpustí se a doplní na 1 litr destilovanou vodou.

d) Hexahydrát chloridu železitého, $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 0,25 g

Rozpustí se a doplní na 1 litr destilovanou vodou.

Srážení v roztoku d) lze předejít přidáním jedné kapky koncentrované kyseliny chlorovodíkové nebo 0,4 g disodné soli kyseliny ethylendiamintetraoctové (EDTA) na 1 litr. Vytvoří-li se v zásobním roztoku sraženina, nahraďte ho nově připraveným roztokem.

Příprava zkušebního média

14. Na litr předupravené mořské vody se přidá 1 ml každého z výše uvedených zásobních roztoků.

Inokulum

15. Kromě mikroorganismů, které jsou v mořské vodě již přítomny, se žádné specifické inokulum nepřidává. Určete (volitelně) počet heterotrofních organismů tvořících kolonie ve zkušebním médiu s mořskou vodou (a pokud možno také v původních vzorcích mořské vody), např. určením počtů na misce pomocí mořského agaru. To je zvlášť žádoucí u vzorků z pobřežních nebo znečištěných lokalit. Zkontroluje se aktivita heterotrofních mikroorganismů v mořské vodě provedením testu s referenční látkou.

▼M6

Příprava baněk

16. Zajistěte, aby veškeré sklo bylo před použitím absolutně čisté, ne nutně sterilní (např. pomocí alkoholového roztoku kyseliny chlorovodíkové), opláchnuté a vysušené, aby nedošlo ke kontaminaci zbytky dřívějších zkoušek. Baňky se před prvním použitím musí také vyčistit.

17. Zkoušené látky se hodnotí ve dvou stejných baňkách současně, spolu s jednou baňkou pro zkoušku s referenční látkou. Provede se slepá zkouška ve dvou opakováních bez zkoušené a bez referenční látky s cílem stanovit analytické údaje slepých zkoušek. Zkoušené látky se rozpustí ve zkušebním médiu – mohou být snadno přidány prostřednictvím koncentrovaného zásobního roztoku – aby se dosáhlo žádoucích výchozích koncentrací, obvykle 5–40 mg DOC/l. Referenční látka se testuje obvykle při výchozí koncentraci odpovídající 20 mg DOC/l. Jsou-li použity zásobní roztoky zkoušené a/nebo referenční látky, zajistí se, aby se u média s mořskou vodou výrazně nezměnila salinita.

18. Pokud lze předpokládat toxické účinky nebo je nelze vyloučit, lze doporučit zařazení zkoušky na inhibici, ve dvou opakováních, do zkušebního uspořádání. Zkoušená a referenční látka se přidají do téže nádoby, přičemž koncentrace referenční látky je obvykle stejná jako při kontrolní zkoušce (tj. 20 mg DOC/l), aby se umožnilo srovnání.

19. Přiměřené množství zkušebních roztoků se nalije do Erlenmeyerových baněk (vhodné množství je přibližně do poloviny objemu baňky) a každá baňka se poté opatří volným uzávěrem (např. hliníkovou fólií), který umožní výměnu plynů mezi baňkou a okolním ovzduším. (Zátky z vaty nejsou vhodné, provádí-li se analýza DOC). Nádoby se umístí do třepačky a protřepávají nepřetržitě mírným tempem (např. 100 rpm) po celou dobu zkoušky. Teplota je řízena (v rozmezí 15–20 °C, s tolerancí ± 2 °C) a nádoby se chrání před světlem, aby se zamezilo růstu řas. Je nutno zajistit, aby vzduch neobsahoval toxické materiály.

Fyzikálně-chemická kontrolní zkouška (volitelná)

20. Existuje-li podezření na abiotický rozklad nebo jiné ztrátové mechanismy, jako je hydrolýza (problém, který vzniká pouze při specifické analýze), těkání nebo adsorpce, lze doporučit provedení fyzikálně-chemického kontrolního experimentu. Ten lze provést tak, že do nádob se zkoušenou látkou se přidá chlorid rtuťnatý ($HgCl_2$) ([1]) (v koncentraci 50–100 mg/l) k zastavení mikrobiální aktivity. Významné snížení DOC nebo koncentrace konkrétní látky při fyzikálně-chemické zkoušce nasvědčuje mechanismům abiotického odstraňování. (Je-li užito chloridu rtuťnatého, je třeba při analýze DOC věnovat pozornost tomu, aby nedošlo k interferencím nebo otravě katalyzátoru.)

Počet nasazených baněk

21. V typické zkoušce se použijí tyto baňky:

Baňka 1 a 2 – obsahující zkoušenou látku (zkušební suspenze);

Baňka 3 a 4 – obsahující pouze mořskou vodu (slepá zkouška);

Baňka 5 – obsahující referenční látku (kontrolní zkouška postupu);

Baňka 6 – obsahující zkoušenou a referenční látku (kontrola toxicity) – volitelná;

Baňka 7 – obsahující zkoušenou látku a sterilizační činidlo (abiotická sterilní kontrola) – volitelná.

([1]) Chlorid rtuťnatý ($HgCl_2$) je velmi toxická látka, s níž je třeba zacházet s náležitou obezřetností. Vodné odpady obsahující tuto chemickou látku by měly být likvidovány vhodným způsobem; neměly by se vypouštět do systému odpadních vod.

▼M6

Analýza DOC

22. V průběhu zkoušky se ve vhodných intervalech odeberou vzorky pro analýzu DOC (dodatek 1). Vzorky je třeba vždy odebrat na počátku zkoušky (den 0) a v den 60. Pro popis průběhu rozkladu v čase se požaduje minimálně pět vzorků. Pro odběr vzorků nelze stanovit žádný časový harmonogram, protože rychlost biologického rozkladu se v jednotlivých případech liší. Stanovení DOC se provede ve dvou opakováních na každém vzorku.

Odběr vzorků

23. Požadovaný objem vzorků závisí na analytické metodě (specifická analýza), na použitém analyzátoru uhlíku a na postupu (membránová filtrace nebo odstředění) zvoleném pro zpracování vzorku před stanovením uhlíku (odstavce 25 a 26). Před odběrem vzorků se zajistí, aby zkušební médium bylo dobře promícháno a aby veškerý materiál ulpívající na stěně baňky byl rozpuštěn nebo suspendován.

24. Membránová filtrace nebo odstředění se provede ihned po odběru vzorků. Je-li to nezbytné, filtrované nebo odstředěné vzorky se skladují při teplotě 2–4 °C pro dobu do 48 hodin nebo při teplotě nižší než – 18 °C pro delší období (je-li známo, že nedojde k ovlivnění látky, před skladováním se okyselí na pH 2).

25. Membránové filtry (velikost pórů 0,2–0,45 μm) jsou vhodné, je-li zajištěno, že při kroku filtrace neuvolňují uhlík ani neadsorbují látku, např. polykarbonátové membránové filtry. Některé membránové filtry jsou impregnovány povrchově aktivními látkami za účelem jejich hydrofilizace a mohou uvolňovat značné množství rozpuštěného uhlíku. Takové filtry se připraví tak, že se třikrát po sobě vyvaří jednu hodinu v deionizované vodě. Po vyvaření se filtry skladují v deionizované vodě. Prvních 20 ml filtrátu se vylije.

26. Alternativně lze k membránové filtraci zvolit odstředění vzorků. Odstřeďuje se rychlostí 40 000 $m.s^{-2}$ (~ 4 000 g) po dobu 15 minut, přednostně v chlazené odstředivce.

Poznámka: Rozlišení celkového množství organického uhlíku (TOC) od DOC (TOC/DOC) pomocí odstředění při velmi nízkých koncentracích, jak se zdá, není možné, protože buď nelze odstranit všechny bakterie, nebo se zpětně rozpouští uhlík, který je součástí bakteriální plazmy. Při vyšších zkušebních koncentracích (> 10 mg C na litr) je chyba při odstředění zřejmě poměrně malá.

Četnost odběru vzorků

27. Provádějí-li se analýzy ihned po odběru vzorků, doba příštího odběru vzorků se posoudí podle zvážení výsledku analytického stanovení.

28. Pokud se vzorky uchovávají pro pozdější analýzu (odstavec 24), odebere se více vzorků, než je požadovaný minimální počet pěti vzorků. Nejprve se analyzují nejnovější vzorky a postupným výběrem vhodných vzorků pro analýzu „v opačném pořadí“ lze s poměrně malým počtem analytických stanovení získat dobrý popis křivky biologického rozkladu. Pokud do ukončení zkoušky nedojde k žádnému rozkladu, nemusejí se žádné další vzorky analyzovat a výběr vzorků „v opačném pořadí“ může za této situace uspořit značné náklady na analýzu.

▼M6

29. Je-li plató na křivce rozkladu zaznamenáno před 60. dnem zkoušky, zkouška se ukončí. Pokud k 60. dni rozklad zjevně začal, ale plató nebylo ještě dosaženo, experiment se prodlouží o další období.

ÚDAJE A JEJICH PŘEDKLÁDÁNÍ

Zpracování výsledků

30. Výsledky analýz se zaznamenají do přiloženého přehledu dat (dodatek 2) a vypočítají se hodnoty biologického rozkladu pro zkoušené a referenční látky podle této rovnice:

$$D_t = \left[1 - \frac{C_t - C_{bl(t)}}{C_0 - C_{bl(0)}}\right] \times 100$$

kde:

D_t = rozklad v procentech odstranění DOC nebo konkrétní látky v čase t,

C_o = výchozí koncentrace DOC nebo konkrétní látky ve zkušebním médiu,

C_t = koncentrace DOC nebo konkrétní látky ve zkušebním médiu v čase t,

$C_{bl(0)}$ = výchozí koncentrace DOC nebo konkrétní látky při slepé zkoušce,

$C_{bl(t)}$ = koncentrace DOC nebo konkrétní látky při slepé zkoušce v čase t.

31. Rozklad se uvede jako procento odstranění DOC (konečný rozklad) nebo odstranění konkrétní látky (primární degradace) v čase t. Koncentrace DOC se vypočítají s přesností na 0,1 mg/l a střední hodnoty D_t se zaokrouhlí na celá procenta.

32. Průběh rozkladu se graficky znázorní pomocí diagramu, jak je uvedeno na obrázku v oddíle „Platnost a interpretace výsledků“. Je-li údajů dostatek, z křivky se vypočítá fáze iniciace (t_L) a doba potřebná k dosažení 50 % odstranění po ukončení fáze iniciace (t_{50}).

Závěrečná zpráva

33. Závěrečná zpráva musí obsahovat tyto informace:

Zkoušená látka:

— fyzikální povaha a, je-li to podstatné, fyzikálně-chemické vlastnosti,

— identifikační údaje.

Zkušební podmínky:

— lokalita a popis místa odběru vzorku; stav znečištění a živin (počet kolonií, dusičnany, amoniak, případně fosfáty),

— charakteristiky vzorku (datum odběru, hloubka, vzhled, teplota, salinita, DOC (volitelné), zpoždění mezi odběrem a použitím ve zkoušce,

▼M6

— metoda použitá pro případné odstátí mořské vody,

— metoda použitá pro předúpravu (filtraci/sedimentaci) mořské vody,

— metoda použitá pro stanovení DOC,

— metoda použitá pro specifickou analýzu (volitelné),

— metoda použitá pro určení počtu heterotrofních organismů v mořské vodě (metoda určení počtů na misce nebo alternativní postup) (volitelné),

— jiné metody (volitelné) použité k určení charakteristik mořské vody (měření obsahu ATP atd.).

Výsledky:

— analytické údaje uvedené v přehledu dat (dodatek 2),

— postup rozkladu se graficky znázorní pomocí diagramu s vyznačením fáze iniciace (t_L), směrnice a doby (od ukončení fáze iniciace) do dosažení 50 % odstranění (t_{50}). Fázi iniciace lze odhadnout graficky, jak je uvedeno na obrázku v oddíle „Platnost a interpretace výsledků“, nebo snadno zaznamenat jako dobu nezbytnou pro dosažení 10 % rozkladu,

— stupeň rozkladu vyjádřený v procentech, dosažený po 60 dnech nebo na konci zkoušky.

Rozbor výsledků.

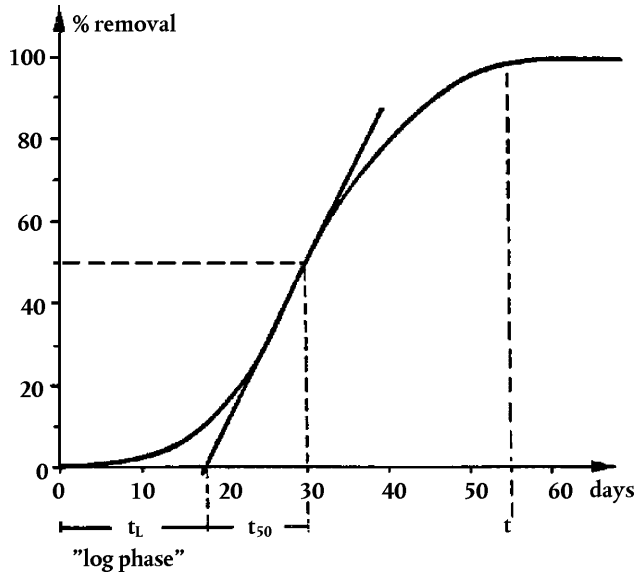
Platnost a interpretace výsledků

34. Výsledky získané s referenčními látkami, např. benzoanem sodným, octanem sodným nebo anilinem, by měly být srovnatelné s výsledky získanými při mezilaboratorní porovnávací zkoušce (3) (viz oddíl „Referenční látky“, odstavec 7). Pokud jsou výsledky získané s referenční látkou atypické, zkouška by měla být opakována s jiným vzorkem mořské vody. I přesto, že výsledky zkoušek inhibice nemusí vždy být snadné interpretovat kvůli příspěvku DOC ze zkušební látky, významné snížení rychlosti celkového odstraňování DOC v porovnání s rychlostí celkového odstranění DOC u kontrolního vzorku je příznakem toxických účinků.

35. Vzhledem k poměrně vysokým zkušebním koncentracím použitým v porovnání s většinou přírodních systémů (a následně nepříznivému poměru mezi koncentracemi zkoušených látek a jiných zdrojů uhlíku) je třeba tuto metodu považovat za předběžnou zkoušku, kterou lze použít k indikaci toho, zda určitá látka je, či není snadno biologicky rozložitelná. Nízká hodnota výsledku tudíž nutně neznamená, že zkoušená látka není biologicky rozložitelná v mořském prostředí, avšak naznačuje, že ke stanovení biologické rozložitelnosti bude zapotřebí další práce.

Na obrázku níže je uveden příklad teoretického experimentu rozkladu, který ukazuje proveditelný způsob odhadu hodnot t_L (délka „fáze iniciace“) a t_{50} (časový interval začínající v bodě t_L, nezbytný pro dosažení 50 % odstranění).

▼M6



METODA UZAVŘENÝCH LAHVIČEK

ÚVOD

1. Tato metoda je variantou zkoušky v uzavřených lahvičkách (5), prováděnou s mořskou vodou, a byla dokončena jako výsledek mezilaboratorní porovnávací zkoušky, kterou pro Evropskou komisi zorganizoval dánský Institut pro kvalitu vody (3).

2. Stejně jako u doprovodné metody třepací lahve pro mořské prostředí nelze výsledky této zkoušky považovat za indikaci snadné biologické rozložitelnosti, nýbrž mají být využívány výlučně pro získání informací o biologické rozložitelnosti látek v mořském prostředí.

PODSTATA METODY

3. Předem určené množství zkoušené látky se rozpustí ve zkušebním médiu v koncentraci obvykle 2–10 mg zkoušené látky na litr (lze použít jednu nebo více koncentrací). Roztok se uchovává v zaplněné a uzavřené lahvi v temnu v lázni nebo obalu s konstantní teplotou udržovanou v rozmezí 15–20 °C s tolerancí ± 1 °C. V případech, kdy je cílem studie simulovat situace v životním prostředí, mohou být prováděny zkoušky přesahující toto obvyklé teplotní rozmezí za předpokladu, že budou provedeny vhodné úpravy v regulaci teploty. Rozložitelnost se zkoumá pomocí analýz kyslíku po dobu 28 dnů.

4. Z mezilaboratorní porovnávací zkoušky vyplynulo, že při prodloužení zkoušky na více než 28 dnů nebylo ve většině případů kvůli silným interferencím možné získat žádné užitečné informace. Hodnoty biologické spotřeby kyslíku (BSK) při slepých zkouškách byly nadměrně vysoké, snad v důsledku růstu řas na stěnách vyvolaného nedostatečným protřepáváním a v důsledku nitrifikace. Doporučená doba trvání je tedy 28 dnů, avšak pokud hodnota BSK při slepé zkoušce nepřekročí hranici 30 % (odstavec 15 a 40), zkoušku lze prodloužit.

INFORMACE O ZKOUŠENÉ LÁTCE

5. Aby bylo možné poznat, zda lze zkoušku aplikovat na konkrétní látku, musí být známy některé její vlastnosti. K tomu, aby bylo možné vypočítat teoretickou spotřebu kyslíku (TSK) (viz dodatek 3), je zapotřebí empirický vzorec; jinak musí být stanovena chemická spotřeba kyslíku (CHSK) dané látky, která pak bude sloužit jako referenční hodnota. Použití CHSK je méně uspokojivé, protože některé látky nejsou při zkoušce CHSK plně zoxidovány.

▼M6

6. Rozpustnost látky by měla být alespoň 2 mg/l, i když v zásadě lze testovat i méně rozpustné látky (např. pomocí ultrazvuku), a stejně tak i těkavé látky. Pro interpretaci získaných výsledků, zejména pokud se tyto výsledky pohybují okolo „ještě vyhovujících“ hodnot, jsou vyžadovány informace o čistotě nebo relativních podílech hlavních složek zkoušené látky.

7. Pro volbu vhodných zkušebních koncentrací mohou být velmi užitečné informace o toxicitě dané látky pro bakterie, například o toxicitě naměřené při krátkodobých testech rychlosti dýchání (4); tyto informace mohou být důležité pro správnou interpretaci nízkých hodnot biologického rozkladu. Takové informace však pro interpretaci výsledků získaných ve zkoušce biologické rozložitelnosti ne vždy postačují a vhodnější je postup popsaný v odstavci 27.

REFERENČNÍ LÁTKY

8. Musí být použity vhodné referenční látky, aby se prověřila mikrobiální aktivita daného vzorku mořské vody. Za tímto účelem lze použít (například) anilin, octan sodný nebo benzoan sodný. V přiměřeně krátké době musí dojít k rozkladu těchto látek alespoň v rozsahu 60 % (jejich TSK); v opačném případě se doporučuje zkoušku zopakovat s jiným vzorkem mořské vody.

9. V mezilaboratorní porovnávací zkoušce EK, kdy byly vzorky mořské vody odebrány v různých lokalitách a v různých ročních obdobích, při použití benzoanu sodného činila fáze iniciace (t_L) 0 až 2 dny a doba nezbytná pro dosažení 50 % rozkladu (t_{50}) činila bez fáze iniciace 1 až 4 dny. Při použití anilinu byla hodnota t_L 0 až 7 dnů a hodnota t_{50} činila 2 až 12 dnů.

REPRODUKOVATELNOST

10. Reprodukovatelnost metod byla stanovena mezilaboratorní porovnávací zkouškou EK (3).

POPIS METODY

Přístroje a pomůcky

11. Běžné laboratorní vybavení a dále:

a) lahve pro analýzu BSK o objemu 250–300 ml se skleněnými zátkami, nebo lze použít lahve s úzkým hrdlem o objemu 250 ml se skleněnými zátkami;

b) několik lahví o objemu 2, 3 a 4 litry s označením litrů pro přípravu experimentu a pro naplnění lahviček pro analýzu BSK;

c) vodní lázeň nebo prostor s konstantní teplotou pro udržování lahviček při konstantní teplotě (tolerance ± 1 °C) v temnu;

d) vybavení pro analýzu rozpuštěného kyslíku;

e) membránové filtry, velikost pórů 0,2–0,45 μm (volitelné);

f) vybavení pro specifickou analýzu (volitelné).

Mořská voda

12. Vzorek mořské vody se odebere do důkladně vyčištěného zásobníku a dopraví se do laboratoře, pokud možno během jednoho nebo dvou dnů po odběru. Během dopravy nesmí dojít k tomu, aby teplota vzorku byla značně vyšší než teplota, která bude použita při zkoušce.

▼**M6**

13. Přesně se identifikuje lokalita odběru vzorků a popíše se stav znečištění a živin. Zejména u pobřežních vod nebo znečištěných vod se v této charakteristice uvede také počet kolonií heterotrofních mikroorganismů a stanovení koncentrací rozpuštěných dusičnanů, amoniaku a fosfátů.

14. O samotném vzorku mořské vody se uvedou tyto informace:

— datum odběru,

— hloubka odběru,

— vzhled vzorku – zakalený atd.,

— teplota v době odběru,

— salinita,

— rozpuštěný organický uhlík (DOC),

— zpoždění mezi odběrem a použitím ve zkoušce.

15. Zjistí-li se, že obsah DOC ve vzorku je vyšší, nebo existuje-li domněnka, že obsah BSK při slepé zkoušce po 28 dnech bude vyšší než 30 % obsahu BSK v referenčních látkách, doporučuje se před použitím mořské vody ve zkoušce nechat vodu přibližně jeden týden odstát.

16. Vzorek se nechá odstát umístěný v aerobních podmínkách při zkušební teplotě, v temnu nebo v rozptýleném světle. Je-li to nezbytné, aerobní podmínky se udržují jemným provzdušňováním. Během odstátí se sníží obsah snadno rozložitelného organického materiálu. Při mezilaboratorní porovnávací zkoušce (3) nebyl zjištěn žádný rozdíl mezi potenciálem rozkladu vzorků odstáté mořské vody a nově odebrané mořské vody.

17. Před použitím se mořská voda upraví tak, aby se odstranily hrubé částice, např. filtrací přes nylonový filtr nebo přes hrubý papírový filtr (nikoli přes membránový nebo GF/C filtr), případně sedimentací a dekantací. Použitý postup se zaznamená. Případná předúprava se provede po odstátí.

Zásobní roztoky pro minerální živné médium

18. Za použití reakčních činidel čistoty p.a. se připraví tyto zásobní roztoky:

a)	dihydrogenfosforečnan draselný, KH_2PO_4	8,50 g
	Hydrogenfosforečnan didraselný, K_2HPO_4	21,75 g
	Dihydrát hydrogenfosforečnanu sodného, $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$	33,30 g
	Chlorid amonný, NH_4Cl	0,50 g
	Rozpustí se a doplní na 1 litr destilovanou vodou.	
b)	Chlorid vápenatý, $CaCl_2$	27,50 g
	Rozpustí se a doplní na 1 litr destilovanou vodou.	
c)	Heptahydrát síranu hořečnatého, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$	22,50 g
	Rozpustí se a doplní na 1 litr destilovanou vodou.	
d)	Hexahydrát chloridu železitého, $FeCl_3 \cdot 6H_2O$	0,25 g
	Rozpustí se a doplní na 1 litr destilovanou vodou.	

▼M6

Srážení v roztoku d) lze předejít přidáním jedné kapky koncentrované kyseliny chlorovodíkové nebo 0,4 g disodné soli kyseliny ethylendiamintetraoctové (EDTA) na 1 litr. Vytvoří-li se v zásobním roztoku sraženina, nahradí se nově připraveným roztokem.

Příprava zkušebního média

19. Na litr upravené mořské vody se přidá 1 ml každého z výše uvedených zásobních roztoků. Zkušební médium se při zkušební teplotě nasytí vzduchem provzdušněním čistým, stlačeným vzduchem po dobu přibližně 20 minut. Stanoví se koncentrace rozpuštěného kyslíku pro účely kontroly. Koncentraci rozpuštěného kyslíku v nasyceném stavu jako funkci salinity a teploty lze zjistit z nomogramu, který je uveden v příloze k této zkušební metodě (dodatek 4).

Inokulum

20. Kromě mikroorganismů, které jsou v mořské vodě již přítomny, se žádné specifické inokulum nepřidává. Určí se (volitelně) počet heterotrofních organismů tvořících kolonie ve zkušebním médiu s mořskou vodou (a pokud možno také v původním vzorku mořské vody), např. určením počtů na misce za použití mořského agaru. To je zvlášť žádoucí u vzorků z pobřežních nebo znečištěných lokalit. Zkontroluje se aktivita heterotrofních mikroorganismů v mořské vodě provedením testu s referenční látkou.

Příprava zkušebních lahviček

21. Provedou se všechny nezbytné manipulace včetně odstátí a předúpravy mořské vody za zvolené zkušební teploty mezi 15 až 20 °C, přičemž se zajistí čistota, avšak nikoli sterilita veškerého skla.

22. Připraví se skupiny lahviček pro analýzu BSK pro stanovení BSK zkoušené látky a referenční látky v souběžných sériích experimentů. Všechny analýzy se provádějí v duplicitních lahvičkách (pro slepé zkoušky, s referenční a se zkoušenou látkou), tj. pro každé stanovení se připraví dvě lahvičky. Analýzy se provedou alespoň v den 0, 5, 15 a 28 (čtyři stanovení). Pro analýzy kyslíku jsou pro čtyři stanovení zapotřebí celkem $3 \times 2 \times 4 = 24$ lahvičky (pro slepé zkoušky, s referenční a se zkoušenou látkou), a tudíž přibližně osm litrů zkušebního média (pro jednu koncentraci zkušební látky).

23. Do velkých lahví o dostatečném objemu (odstavec 11) se odděleně připraví roztoky zkoušené a referenční látky tak, že nejprve se do částečně zaplněných velkých lahví přidá zkoušená nebo referenční látka buď přímo, nebo pomocí koncentrovaného zásobního roztoku. Přidá se další zkušební médium, aby se dosáhlo konečných požadovaných koncentrací. Jsou-li použity zásobní roztoky zkoušené a/nebo referenční látky, je třeba zajistit, aby se u média s mořskou vodou výrazně nezměnila salinita.

24. Koncentrace zkoušené a referenční látky se zvolí s ohledem na:

a) rozpustnost rozpuštěného kyslíku v mořské vodě při převládající zkušební teplotě a salinitě (viz připojený nomogram – dodatek 4);

b) BSK mořské vody při slepé zkoušce a

c) předpokládanou biologickou rozložitelnost zkoušené látky.

▼M6

25. Rozpustnost rozpuštěného kyslíku při teplotě 15 °C a salinitě 32 promile (oceánská voda) činí přibližně 8,1 mg/l a při teplotě 20 °C a salinitě 32 promile činí přibližně 7,4 mg/l. Nebyla-li mořská voda ponechána k odstátí, může spotřeba kyslíku samotné mořské vody (respirace při slepé zkoušce) dosáhnout 2 mg O_2/l i více. Aby se zajistilo, že po oxidaci zkoušené látky zůstane dostatečná koncentrace kyslíku, použije se proto u látek, u nichž se předpokládá, že se v podmínkách zkoušky zcela rozloží (jako jsou referenční látky), výchozí koncentrace zkoušené látky přibližně 2–3 mg/l (v závislosti na TSK). Látky s menší rozložitelností se testují při vyšších koncentracích až do přibližně 10 mg/l, za podmínky, že nenastanou toxické účinky. Může být výhodné provádět souběžné zkoušky s nízkou (přibližně 2 mg/l) a vysokou (přibližně 10 mg/l) koncentrací zkoušené látky.

26. Souběžně musí být obsah kyslíku stanoven ve slepé zkoušce, v lahvičkách, které neobsahují ani zkoušenou, ani referenční látku.

27. Mají-li být stanoveny inhibiční účinky, do jednotlivých velkých lahví (odstavec 13) se zvlášť připraví tato série roztoků:

a) snadno rozložitelné látky, např. kterékoli z uvedených referenčních látek, v koncentraci 2 mg/l;

b) zkoušené látky v koncentraci x mg/l (x se obvykle rovná 2);

c) snadno rozložitelné látky v koncentraci 2 mg/l plus zkoušené látky v koncentraci x mg/l.

Fyzikálně-chemická kontrolní zkouška (volitelná)

28. Je-li využito možnosti provedení specifických analýz, může se provést fyzikálně-chemická zkouška k ověření toho, zda zkušební látka nebyla odstraněna abiotickými mechanismy, jako je hydrolýza nebo adsorpce. Fyzikálně-chemickou kontrolní zkoušku lze provést tak, že do duplicitních lahviček se zkušební látkou se přidá chlorid rtuťnatý ($HgCl_2$) ([1]) (v koncentraci 50-100 mg/l) k zastavení mikrobiální aktivity. Významné snížení koncentrace konkrétní látky během zkoušky nasvědčuje mechanismům abiotického odstraňování.

Počet lahviček pro analýzu BSK v typické zkoušce

29. V typické zkoušce se použijí tyto lahvičky:

— nejméně 8 lahviček se zkoušenou látkou,

— nejméně 8 lahviček pouze s živinami obohacenou mořskou vodou,

— nejméně 8 lahviček s referenční látkou, a

— je-li to nezbytné, 6 lahviček se zkoušenou a referenční látkou (kontrola toxicity).

POSTUP

30. Ihned po přípravě se každý roztok odsaje ze spodní čtvrtiny (nikoli ode dna) příslušné velké lahve a naplní se jím příslušná skupina lahviček pro analýzu BSK. Ihned (v čase nula) se provede stanovení obsahu rozpuštěného kyslíku (odstavec 33) v kontrolních vzorcích, nebo se uchovají pro pozdější chemickou analýzu srážením s $MnCl_2$ (chloridem manganatým) a NaOH (hydroxidem sodným).

([1]) Chlorid rtuťnatý ($HgCl_2$) je velmi toxická látka, s níž je třeba zacházet s náležitou obezřetností. Vodné odpady obsahující tuto chemickou látku by měly být likvidovány vhodným způsobem; neměly by se přímo vypouštět do systému odpadních vod.

▼M6

31. Zbylé lahvičky pro souběžnou analýzu BSK se inkubují při zkušební teplotě (15–20 °C), uchovávají v temnu a ve vhodných časových intervalech (například minimálně po 5, 15 a 28 dnech) se z inkubačního prostoru odstraní a analyzuje se obsah rozpuštěného kyslíku v nich (odstavec 33).

32. Pro (volitelnou) specifickou analýzu se vzorky filtrují pomocí membránového filtru (velikost pórů 0,2–0,45 μm) nebo se odstředí po dobu 15 minut. Pokud nejsou analyzovány ihned, skladují se do 48 hodin při teplotě 2-4 °C nebo na delší období při teplotě – 18 °C (je-li známo, že nedojde k ovlivnění zkoušené látky, zkoušená látka se před uskladněním okyselí na pH 2).

Stanovení rozpuštěného kyslíku

33. Koncentrace rozpuštěného kyslíku se stanoví vnitrostátně nebo mezinárodně uznávanou chemickou nebo elektrochemickou metodou.

ÚDAJE A JEJICH PŘEDKLÁDÁNÍ

Zpracování výsledků

34. Výsledky analýz se zaznamenají do přiložených přehledů dat (dodatek 5).

35. Vypočítá se BSK jako rozdíl v úbytku kyslíku mezi slepou zkouškou a roztokem zkoušené látky za podmínek zkoušky. Čistý úbytek kyslíku se vydělí koncentrací objemové hmotnosti látky, aby bylo možno vyjádřit BSK jako mg BSK na mg zkoušené látky. Rozklad je definován jako poměr mezi biochemickou spotřebou kyslíku a, přednostně, teoretickou spotřebou kyslíku (TSK), anebo chemickou spotřebou kyslíku (CHSK), vyjádřený v procentech (viz odstavec 36).

36. Hodnoty biologického rozkladu zkoušené látky a referenční látky pro každý čas odběru vzorku se vypočítají za pomoci jedné z těchto dvou rovnic:

$$\%\ biol.\ rozkladu = \frac{mg\ O_2/mg\ zkoušené\ látky}{mg\ TSK/mg\ zkoušené\ látky} \times 100$$

$$\%\ biol.\ rozkladu = \frac{mg\ O_2/mg\ zkoušené\ látky}{mg\ CHSK/mg\ zkoušené\ látky} \times 100$$

kde:

TSK = teoretická spotřeba kyslíku (výpočet viz dodatek 3),

CHSK = chemická spotřeba kyslíku, stanovená experimentálně.

Poznámka: Uvedené dva způsoby výpočtu (procentní podíl TSK nebo procentní podíl CHSK) někdy nevedou ke stejným výsledkům; přednostně se použije TSK, protože u některých látek ve zkoušce CHSK nedochází k úplné oxidaci.

37. Průběh rozkladu se graficky znázorní pomocí diagramu (viz příklad v oddíle „Platnost a interpretace výsledků“). Je-li údajů dostatek, z křivky biologického rozkladu se vypočítá fáze iniciace (t_L) a doba (t_{50}) potřebná k dosažení 50 % odstranění po ukončení fáze iniciace.

38. Pokud se provádí specifická analýza (volitelná), uvede se procento primárního rozkladu jako procento odstranění konkrétní látky za dobu zkoušky (korigované o analytické údaje slepých zkoušek).

▼M6

Závěrečná zpráva

39. Závěrečná zpráva musí obsahovat tyto informace:

Zkoušená látka:

— fyzikální povaha a, je-li to podstatné, fyzikálně-chemické vlastnosti,

— identifikační údaje.

Zkušební podmínky:

— lokalita a popis místa odběru vzorku: stav znečištění a živin (počet kolonií, dusičnany, amoniak, případně fosfáty),

— charakteristiky vzorku (datum odběru, hloubka odběru, vzhled, teplota, salinita, DOC (volitelné), zpoždění mezi odběrem a použitím ve zkoušce),

— metoda použitá pro odstátí mořské vody (bylo-li použito),

— metoda použitá pro předúpravu (filtraci/sedimentaci) mořské vody,

— metoda použitá pro stanovení CHSK (bylo-li provedeno),

— metoda použitá pro měření kyslíku,

— postup rozptýlení u látek, které jsou za zkušebních podmínek špatně rozpustné,

— metoda použitá pro určení počtu heterotrofních organismů v mořské vodě (metoda určení počtů na misce nebo alternativní postup),

— metoda použitá pro stanovení DOC v mořské vodě (volitelné),

— metoda použitá pro specifickou analýzu (volitelné),

— jiné volitelné metody použité k určení charakteristik mořské vody (měření obsahu ATP atd.).

Výsledky:

— analytické údaje uvedené v přehledu dat (viz příloha, dodatek 5),

— postup rozkladu se graficky znázorní pomocí diagramu s vyznačením fáze iniciace (t_L), směrnice a času (od ukončení fáze iniciace) do dosažení 50 % celkové spotřeby kyslíku vyvolané oxidací zkoušené látky (t_{50}). Fázi iniciace lze odhadnout graficky, jak je uvedeno na připojeném obrázku, nebo snadno zaznamenat jako dobu nezbytnou pro dosažení 10 % rozkladu,

— procento rozkladu naměřené po 28 dnech.

Rozbor výsledků.

Platnost a interpretace výsledků

40. Respirace při slepé zkoušce by neměla přesahovat 30 % spotřeby kyslíku ve zkušební lahvičce. Není-li možné toto kritérium splnit pomocí čerstvě odebrané mořské vody, musí se mořská voda před použitím nechat odstát (stabilizovat).

41. Je třeba zvážit možnost, že látky obsahující dusík mohou ovlivnit výsledky.

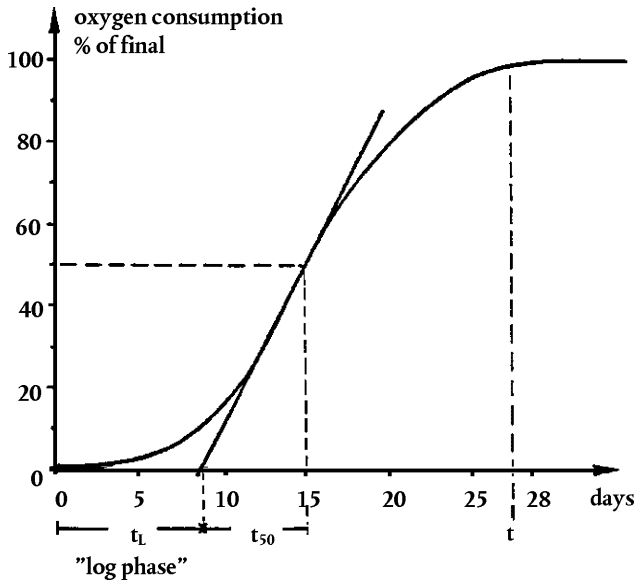
▼M6

42. Výsledky získané s referenčními látkami benzoanem sodným a anilinem by měly být srovnatelné s výsledky získanými v mezilaboratorní porovnávací zkoušce (3) (odstavec 9). Pokud jsou výsledky získané s referenčními látkami atypické, zkouška by měla být opakována s jiným vzorkem mořské vody.

43. Zkušební látku lze považovat za inhibiční pro bakterie (při použité koncentraci), je-li hodnota BSK směsi referenční a zkušební látky nižší než součet hodnot BSK samostatných roztoků těchto dvou látek.

44. Vzhledem k poměrně vysokým zkušebním koncentracím v porovnání s většinou přírodních systémů a následkem toho k nepříznivému poměru mezi koncentracemi zkoušené látky a jiných zdrojů uhlíku je třeba tuto metodu považovat za předběžnou zkoušku, kterou lze použít k indikaci toho, zda určitá látka je, či není snadno biologicky rozložitelná. Nízká hodnota výsledku tudíž nutně neznamená, že zkoušená látka není biologicky rozložitelná v mořském prostředí, avšak naznačuje, že pro stanovení biologické rozložitelnosti bude zapotřebí další práce.

Na obrázku níže je uveden příklad teoretického experimentu s rozkladem, který ukazuje proveditelný způsob odhadu hodnot t_L (délka „fáze iniciace“) a t_{50}, časového intervalu (začínajícího v bodě t_L) potřebného pro dosažení 50 % celkové spotřeby kyslíku vyvolané oxidací zkušební látky:



LITERATURA

1) de Kreuk, J. F. and Hanstveit, A. O. (1981) Determination of the biodegradability of the organic fraction of chemical wastes. Chemosphere, 10 (6); pp. 561-573.

2) Kapitola C.4–B této přílohy: Stanovení „snadné“ biologické rozložitelnosti, Část III. Modifikovaná screeningová zkouška OECD.

3) Nyholm, N. and Kristensen, P. (1987) Screening Test Methods for Assessment of Biodegradability of Chemical Substances in Seawater. Final Report of the ring test programme 1984-1985, March 1987, Commission of the European Communities.

4) Kapitola C.11 této přílohy: Biologická rozložitelnost – Zkouška na inhibici dýchání aktivovaného kalu.

5) Kapitola C.4–E této přílohy: Stanovení „snadné“ biologické rozložitelnosti, Část VI. Zkouška v uzavřených lahvičkách.

▼M6

Dodatek 1

Stanovení organického uhlíku v mořské vodě

METODA TŘEPACÍ LAHVE

Pro stanovení organického uhlíku ze vzorku vody se organické složky ve vzorku nechají zoxidovat na oxid uhličitý, zpravidla za použití jedné z těchto tří technik:

— mokrá oxidace persíranem s UV zářením,

— mokrá oxidace persíranem za zvýšené teploty (116–130 °C),

— spalování.

Uvolněný CO_2 se kvantifikuje pomocí infračervené spektrometrie nebo titrační metodou. Alternativně se CO_2 redukuje na metan, který se kvantifikuje pomocí plamenoionizačního detektoru (FID).

Metoda persíranu s UV zářením se běžně užívá pro analýzu „čisté“ vody s nízkým obsahem pevných částic. Další dvě metody lze použít na většinu druhů vodních vzorků, přičemž oxidace persíranem za zvýšené teploty je nejvhodnější pro vzorky s nízkým obsahem a technika spalování je použitelná na vzorky s obsahem netěkavého organického uhlíku (NVOC) značně převyšujícím 1 mg C/l.

Interference

Všechny tři metody jsou závislé na eliminaci nebo kompenzaci anorganického uhlíku (IC), který je přítomen ve vzorku. Nejčastěji používanou metodou eliminace IC je vymývání CO_2 z okyseleného vzorku, ačkoli to současně vede ke ztrátě těkavých organických složek (1). U každé vzorkovací matice musí být zaručena úplná eliminace nebo kompenzace IC a kromě NVOC musí být, v závislosti na typu vzorku, stanoven i obsah těkavého organického uhlíku (VOC).

Vysoké koncentrace chloridů vedou ke snížené účinnosti oxidace pomocí metody persíranu s UV zářením (2). Tuto interferenci však může odstranit použití oxidačního činidla upraveného přidáním dusičnanu rtuťnatého. Pro vyhodnocení každého typu vzorků obsahujícího chloridy se doporučuje použít maximální tolerovaný objem vzorku. Vysoké koncentrace solí ve vzorku analyzovaném metodou spalování mohou způsobit usazení solí na katalyzátoru a nadměrnou korozi spalovací trubice. Měla by být přijata preventivní opatření podle příručky výrobce.

U vysoce zakalených vzorků a u vzorků obsahujících pevné částice nemusí při použití metody persíranu s UV zářením dojít k úplně oxidaci.

Příklad vhodné metody

Netěkavý organický uhlík se stanoví oxidací s persíranem a UV zářením a následnou kvantifikací uvolněného CO_2 pomocí nedisperzní infračervené spektrometrie.

Oxidační činidlo se upraví v souladu s doporučeními uvedenými v položce seznamu literatury (2) a podle toho, jak uvádí příručka výrobce:

a) 8,2 g $HgCl_2$ a 9,6 g $Hg(NO_3)_2 \cdot H_2O$ se rozpustí v několika stech mililitrech reagenční vody s nízkou koncentrací uhlíku;

b) 20 g $K_2S_2O_8$ se rozpustí v roztoku obsahujícím rtuťnaté soli;

▼**M6**

c) do směsi se přidá 5 ml HNO_3 (koncentrované);

d) činidlo se zředí na 1 000 ml.

Interference způsobené chloridy se odstraní použitím 40 µl objemu vzorku na 10 % chloridů a 200 µl objemu vzorku na 1,9 % chloridů. Vzorky s vysokými koncentracemi chloridů a/nebo vzorky o větším objemu lze podle této metody analyzovat za podmínky, že se zabrání hromadění chloridů v oxidační nádobě. Následně lze u příslušných typů vzorků podle potřeby provádět stanovení těkavého organického uhlíku.

LITERATURA

1) ISO, Water quality – determination of total organic carbon. Draft International Standard ISO/DIS 8245, January 16, 1986.

2) American Public Health Association, Standard Methods for the Estimation of Water and Wastewater. American Water Works Association & Water Pollution Control Federation, 16th edition, 1985.

Zajímavá je rovněž (podává popis automatizovaného analytického systému):

3) Schreurs, W. (1978) An automated colorimetric method for the determination of dissolved organic carbon in seawater by UV destruction. Hydrobiological Bulletin 12, pp. 137–142.

▼M6

Dodatek 2

Biologická rozložitelnost v mořské vodě

METODA TŘEPACÍ LAHVE

PŘEHLED DAT

1. **LABORATOŘ:**

2. **DATUM POČÁTKU ZKOUŠKY:**

3. **ZKOUŠENÁ LÁTKA:**

Název:

Koncentrace chemické látky v zásobním roztoku: mg/l

Počáteční koncentrace chemické látky v médiu v čase t_0: mg/l

: v mg DOC/l

4. **MOŘSKÁ VODA:**

Zdroj:

Datum odběru:

Hloubka odběru:

Vzhled v době odběru (např. zakalení atd.):

Salinita při odběru: ‰

Teplota při odběru: °C

DOC „x“ hodin po odběru: mg/l

Úprava před zkouškou (např. filtrace, sedimentace, odstátí atd.):

Počet kolonií mikroorganismů — původní vzorek: kolonií na ml

— na počátku zkoušky: kolonií na ml

Ostatní charakteristiky:

5. **STANOVENÍ UHLÍKU:**

Analyzátor uhlíku:

	Baňka č.		DOC po n dnech (mg/l)				
			0	n_1	n_2	n_3	n_x
Zkouška: živinami obohacená mořská voda se zkoušenou látkou	1	a_1					
		a_2					
		střední hodnota, $C_{a(t)}$					
	2	b_1					
		b_2					
		střední hodnota, $C_{b(t)}$					

▼**M6**

	Baňka č.		DOC po n dnech (mg/l)				
			0	n_1	n_2	n_3	n_x
Slepá zkouška: živinami obohacená mořská voda bez zkoušené látky	1	c_1					
		c_2					
		střední hodnota, $C_{c(t)}$					
	2	d_1					
		d_2					
		střední hodnota, $C_{d(t)}$					
	střední hodnota, $C_{bl(t)} = \frac{C_{c(t)} + C_{d(t)}}{2}$						

6. **VYHODNOCENÍ NAMĚŘENÝCH DAT:**

Baňka č.	Výpočet výsledků	Rozklad v % po n dnech				
		0	n_1	n_2	n_3	n_x
1	$D_1 = 1 - \frac{C_{a(t)} - C_{bl(t)}}{C_0 - C_{bl(0)}} \times 100$	0				
2	$D_2 = 1 - \frac{C_{b(t)} - C_{bl(t)}}{C_0 - C_{bl(0)}} \times 100$	0				
Střední hodnota (*)	$D_t = \frac{D_1 + D_2}{2}$	0				

(*) Hodnoty D_1 a D_2 by neměly být průměrovány, pokud je mezi nimi významný rozdíl.

Poznámka: Podobné formuláře lze použít, když po rozkladu následuje specifická analýza, a pro referenční látku a kontrolu toxicity.

7. **ABIOTICKÝ ROZKLAD (volitelné)**

	Čas (dny)	
	0	t
DOC (mg/l) ve sterilní kontrole	$C_{s(o)}$	$C_{s(t)}$

$$\% \text{ abiotický rozklad} = \frac{C_{s(0)} - C_{s(t)}}{C_{s(o)}} \times 100$$

▼**M6**

Dodatek 3

Výpočet teoretické biochemické spotřeby kyslíku

METODA UZAVŘENÝCH LAHVIČEK

TSK látky $C_cH_hCl_{cl}N_nNa_{na}O_oP_pS_s$ o molekulové hmotnosti MW se vypočítá podle vzorce:

$$TSK_{NH3} = \frac{16\left[2c + \frac{1}{2}(h - cl - 3n) + 3s + \frac{5}{2^p} + \frac{1}{2^{na}} - o\right]}{MW}$$

Z tohoto výpočtu vyplývá, že C se mineralizuje naCO_2, H na H_2O, P na P_2O_5 a Na na Na_2O. Halogeny se eliminují jako halogenovodíky a dusík jako amoniak.

Například:

glukóza $C_6H_{12}O_6$, MW = 180

$$TSK = \frac{16\left(2 \times 6 + \frac{1}{2} \times 12 - 6\right)}{180} = 1{,}07 mg\ O_2/mg glukózy$$

Molekulové hmotnosti jiných solí než solí alkalických kovů se vypočítají s tím, že se předpokládá, že došlo k hydrolýze těchto solí.

Předpokládá se, že síra oxiduje do stavu + 6.

Například:

dodecylbenzensulfonan sodný $C_{18}H_{29}SO_3Na$, MW = 348

$$TSK = \frac{16\left(36 + \frac{29}{2} + 3 + \frac{1}{2} - 3\right)}{348} = 2{,}34 mg\ O_2/mg látky$$

V případě látek, jež obsahují dusík, může být dusík eliminován jako amoniak, dusitany nebo dusičnany, což odpovídá různé teoretické biochemické spotřebě kyslíku.

$$TSK_{NO2} = \frac{16\left[2c + \frac{1}{2}(h - cl) + 3s + \frac{3}{2^n} + \frac{5}{2_p} + \frac{1}{2^{na}} - o\right]}{MW}$$

$$TSK_{NO3} = \frac{16\left[2c + \frac{1}{2}(h - cl) + 3s + \frac{5}{2^n} + \frac{5}{2^p} + \frac{1}{2^{na}} - o\right]}{MW}$$

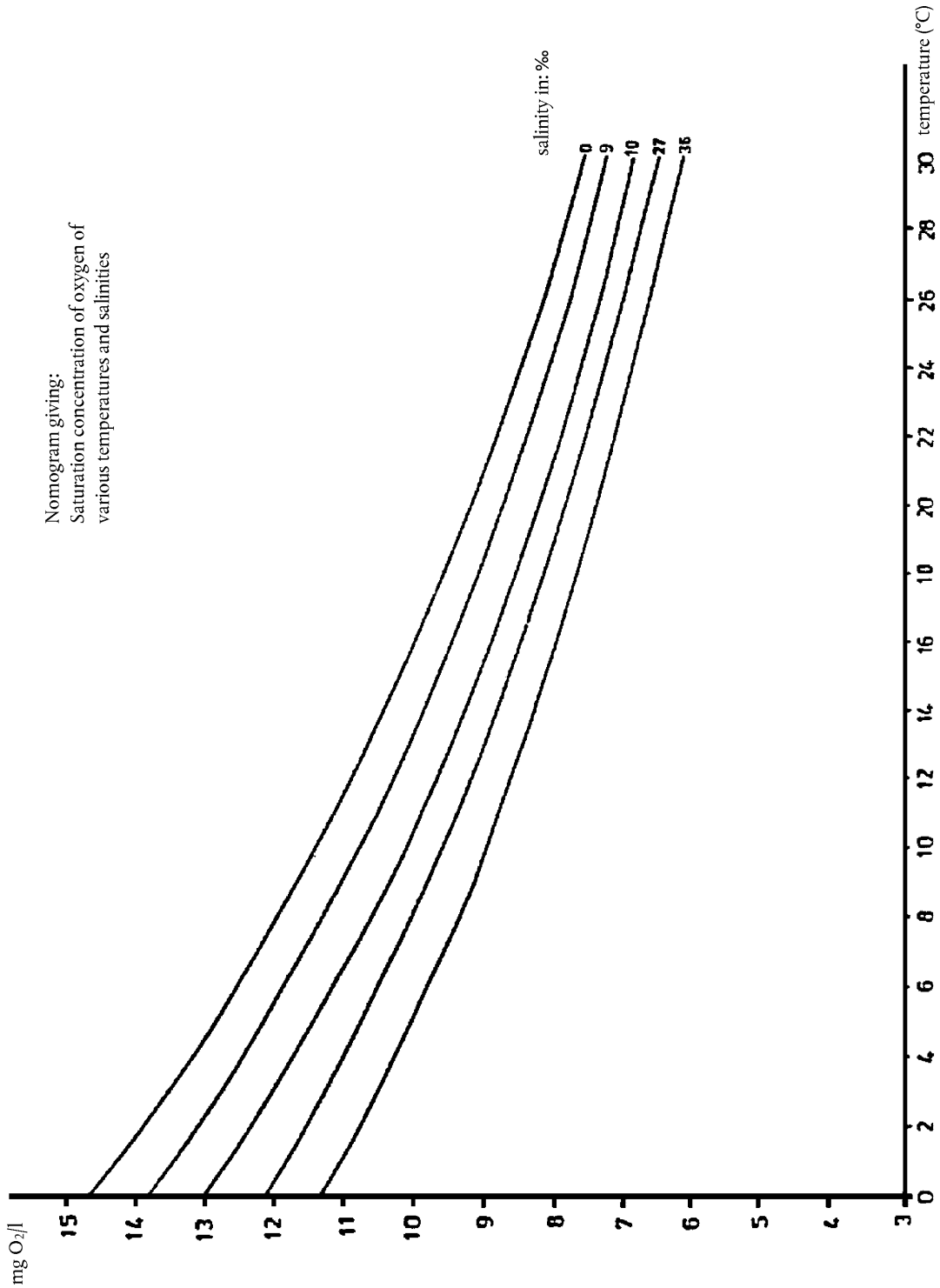
V případě sekundárních aminů se předpokládá, že analýzou byla zjištěna úplná tvorba dusičnanů:

$(C_{12}H_{25})_2$ NH, MW = 353

$$TSK_{NO3} = \frac{16\left(48 + \frac{51}{2} + \frac{5}{2}\right)}{353} = 3{,}44 mg\ O_2/mg látky$$

▼**M6**

Dodatek 4


Nomogram giving:
Saturation concentration of oxygen of various temperatures and salinities
salinity in: ‰
0
9
10
27
36
mg O2/l
15
14
13
12
11
10
9
8
7
6
5
4
3
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
20
22
24
26
28
30
temperature (°C)

▼M6

Dodatek 5

Biologická rozložitelnost v mořské vodě

METODA UZAVŘENÝCH LAHVIČEK

PŘEHLED DAT

1. **LABORATOŘ:**

2. **DATUM POČÁTKU ZKOUŠKY:**

3. **ZKOUŠENÁ LÁTKA:**

Název:

Koncentrace zásobního roztoku:	mg/l
Počáteční koncentrace v médiu s mořskou vodou:	mg/l
TSK nebo CHSK:	mg O_2 na mg zkoušené látky

4. **MOŘSKÁ VODA:**

Zdroj:

Datum odběru:

Hloubka odběru:

Vzhled v době odběru (např. zakalený, atd.):

Salinita při odběru:	‰
Teplota při odběru:	°C
DOC „x“ hodin po odběru:	mg/l

Úprava před zkouškou (např. filtrace, sedimentace, odstátí atd.):

Počet kolonií mikroorganismů:	— původní vzorek:	kolonií na ml
	— na počátku zkoušky:	kolonií na ml

Ostatní charakteristiky:

5. **ZKUŠEBNÍ MEDIUM:**

Teplota po provzdušnění:	°C
Koncentrace O_2 po provzdušnění: Stav před počátkem zkoušky:	mg O_2 na litr

6. **STANOVENÍ ROZPUŠTĚNÉHO KYSLÍKU:**

Metoda: Winklerova metoda/oximetr

	Baňka č.		mg O_2 na litr po n dnech			
			0	5	15	28
Zkouška: živinami obohacená mořská voda se zkoušenou látkou	1	a_1				
	2	a_2				
	Střední hodnota při zkoušce	$m_t = \frac{a_1 + a_2}{2}$				

▼**M6**

	Baňka č.		mg O_2 na litr po n dnech			
			0	5	15	28
Slepá zkouška: živinami obohacená mořská voda, avšak bez zkoušené látky	1	c_1				
	2	c_2				
	Střední hodnota při slepé zkoušce	$m_b = \frac{c_1 + c_2}{2}$				

Poznámka: Podobný formulář lze použít i pro referenční látku a pro kontroly toxicity.

7. **ÚBYTEK ROZPUŠTĚNÉHO KYSLÍKU: ROZKLAD V PROCENTECH (%D):**

	Úbytek rozpuštěného kyslíku po n dnech		
	5	15	28
$(m_b - m_t)$ (1)			
$\%D = \frac{(m_b - m_t)(1)}{zkoušená\ \ látka(mg/l) \times TSK} \times 100$			

(1) Předpokládá se, že $m_{b(o)} = m_{t(o)}$, kde
$m_{b(o)}$ = hodnota při slepé zkoušce v den 0,
$m_{t(o)}$ = hodnota ve zkoušené látce v den 0.
Jestliže $m_{b(o)}$ se nerovná $m_{t(o)}$, použije se $(m_{t(o)} - m_{t(x)}) - (m_{b(o)} - m_{b(x)})$, kde
$m_{b(x)}$ = hodnota při slepé zkoušce v den x,
$m_{t(x)}$ = hodnota ve zkoušené látce v den x.

▼M6

C.43. ANAEROBNÍ BIOLOGICKÁ ROZLOŽITELNOST ORGANICKÝCH LÁTEK VE VYHNILÉM KALU MĚŘENÍM PRODUKCE PLYNU

ÚVOD

1. Tato zkušební metoda je rovnocenná Pokynu OECD pro zkoušení č. 311 (2006). Existuje řada screeningových zkoušek pro posuzování aerobní biologické rozložitelnosti organických látek (zkušební metody C.4, C.9, C.10, a C.11 (1) a OECD TG 302C (2)) a výsledky jejich aplikace jsou úspěšně využívány pro předpovídání osudu látek v aerobním prostředí, zejména v aerobních fázích čištění odpadních vod. Aerobně se odstraňují i různé podíly látek, které jsou ve vodě nerozpustné, a také látek, které adsorbují do odpadních pevných látek, neboť jsou přítomny v usazeném kalu. Větší frakce těchto látek jsou však vázány na primárně usazený kal, který se odděluje od nevyčištěných odpadních vod v usazovacích nádržích předtím, než se usazená odpadní voda nebo supernatant čistí aerobně. Kal, který obsahuje některé rozpustné látky v intersticiální tekutině, poté postupuje do vyhřívaných vyhnívacích nádrží k anaerobnímu čištění. V této sérii dosud neexistují žádné zkoušky pro posuzování anaerobní biologické rozložitelnosti v anaerobních vyhnívacích nádržích a tato zkouška má sloužit k vyplnění této mezery; nemusí být použitelná pro jiné anoxické složky životního prostředí.

2. Pro posuzování anaerobní biologické rozložitelnosti byly úspěšně využívány respirometrické metody, které měří množství plynu, hlavně metanu (CH_4) a oxidu uhličitého (CO_2) vzniklého za anaerobních podmínek. Birch a kol. (3) tyto postupy podrobili revizi a dospěli k závěru, že nejkomplexnější je práce Sheltona a Tiedjeho (4), založená na dřívějších studiích (5)(6)(7). Metoda (4), kterou dále rozvinuli jiní (8) a stala se součástí amerických norem (9)(10), neřešila problémy spojené s rozdílnou rozpustností CO_2 a CH_4 ve zkušebním médiu a s výpočtem teoretické produkce plynů vyprodukovaných zkoušenou látkou. Zpráva ECETOX (3) doporučila další měření obsahu rozpuštěného anorganického uhlíku (DIC) v supernatantu, což zvýšilo použitelnost této metody. Metoda ECETOX byla podrobena mezinárodní kalibrační zkoušce (mezilaboratorní porovnávací zkoušce) a stala se normou ISO – ISO 11734 (11).

3. Tato zkušební metoda, která je založena na normě ISO 11734 (11), popisuje screeningovou metodu pro hodnocení potenciální anaerobní biologické rozložitelnosti organických látek za specifických podmínek (tj. v anaerobní vyhnívací nádrži v daném čase a v daném rozmezí koncentrace mikroorganismů). Jelikož se používá zředěný kal s poměrně vysokou koncentrací zkoušené látky a trvání zkoušky je typicky delší než doba zdržení kalu v anaerobních vyhnívacích nádržích, nemusí podmínky zkoušky nutně odpovídat podmínkám v anaerobních vyhnívacích nádržích a nejsou použitelné ani pro posuzování biologické rozložitelnosti organických látek za odlišných environmentálních podmínek. Kal se exponuje zkoušené látce až 60 dní, tj. déle, než je doba zdržení běžného kalu v anaerobních vyhnívacích nádržích (25–30 dnů), ačkoli v průmyslových lokalitách může doba zdržení kalu být mnohem delší. Předpovědi založené na výsledcích této zkoušky nemohou být tak přesvědčivé jako v případě aerobní biologické rozložitelnosti, jelikož důkazy shromážděné na základě chování zkoušených látek v „hotových“ aerobních zkouškách a v simulačních zkouškách a v aerobním prostředí jsou dostatečné, abychom si mohli být jisti, že zde existuje souvislost, zatímco pro anaerobní prostředí existuje podobných důkazů málo. Lze předpokládat, že k úplnému anaerobnímu biologickému rozkladu dojde tehdy, je-li dosaženo 75–80 % teoretické produkce plynu. Vysoký poměr mezi látkou a biomasou použitý v těchto zkouškách znamená, že látka, která je zkoušena, se v anaerobní vyhnívací nádrži rozloží s větší pravděpodobností. Navíc látky, které se při zkoušce nepřemění na plyn, nemusí nutně přetrvávat

▼M6

při poměrech mezi látkou a biomasou, které jsou v životním prostředí reálnější. Dochází také k jiným anaerobním reakcím, při kterých se látky mohou alespoň částečně rozkládat, např. k dechloraci, avšak tato zkouška takové reakce nezjišťuje. Při použití specifických analytických metod ke stanovení zkoušené látky může být nicméně sledován její úbytek (viz odstavce 6, 30, 44 a 53).

PODSTATA ZKOUŠKY

4. Promytý vyhnilý kal ([1]), který obsahuje nízké (< 10 mg/l) koncentrace anorganického uhlíku (IC), se rozředí asi desetinásobně na celkovou koncentraci pevných látek 1 g/l až 3 g/l a inkubuje při teplotě 35 °C ± 2 °C v uzavřených nádobách se zkoušenou látkou v koncentraci 20 až 100 mg C/l po dobu až 60 dnů. Měření aktivity kalu se zohlední provedením souběžné slepé zkoušky s inokulem kalu v médiu, ale bez zkoušené látky.

5. Měří se zvýšení tlaku ve volném prostoru pod víkem nádob, který je výsledkem produkce oxidu uhličitého a metanu. Značná část vyprodukovaného CO_2 se za podmínek zkoušky rozpustí v kapalné fázi nebo se přemění na uhličitany nebo hydrogenuhličitany. Tento anorganický uhlík se měří na konci zkoušky.

6. Množství uhlíku (anorganického a v metanu) vzniklého biologickým rozkladem zkoušené látky se vypočítá z čisté produkce plynu a čisté tvorby IC v kapalné fázi po odečtení hodnot slepých zkoušek. Rozsah biologického rozkladu se vypočítá z celkového vyprodukovaného IC a C v metanu jako procentní podíl naměřeného nebo vypočítaného množství přidaného uhlíku ve zkoušené látce. Průběh biologického rozkladu lze sledovat pouze průběžným měřením produkce plynu. Pomocí specifických analýz na počátku a na konci zkoušky lze rovněž stanovit primární biologický rozklad.

INFORMACE O ZKOUŠENÉ LÁTCE

7. Pro správnou interpretaci výsledků by měla být známa čistota zkoušené látky, její rozpustnost ve vodě, těkavost a adsorpční vlastnosti. Musí být znám obsah organického uhlíku (v % hmot.) ve zkoušené látce, a to buď na základě její chemické struktury, nebo na základě měření. U těkavých zkoušených látek je pro rozhodnutí, zda je tato zkouška použitelná, vhodné použít změřenou nebo vypočítanou Henryho konstantu. Informace o toxicitě zkoušené látky pro anaerobní bakterie jsou užitečné při výběru vhodné zkušební koncentrace a při interpretaci výsledků, které ukazují na špatnou biologickou rozložitelnost. Doporučuje se zařadit kontrolu inhibice s výjimkou případů, kdy je známo, že zkoušená látka nepůsobí inhibičně na aktivity anaerobních mikroorganismů (viz odstavec 21 a norma ISO 13641-1 (12)).

([1]) Vyhnilý kal je směs usazených fází odpadních vod a aktivovaného kalu, která byla inkubována v anaerobní vyhnívací nádrži při teplotě kolem 35 °C, aby se snížil obsah biomasy a problém zápachu a aby se zlepšila odvodnitelnost kalu. Obsahuje soubor anaerobních fermentačních a metanogenních bakterií, které produkují oxid uhličitý a metan (11).

▼M6

POUŽITELNOST ZKUŠEBNÍ METODY

8. Tuto zkušební metodu lze použít na látky rozpustné ve vodě; lze ji rovněž použít na špatně rozpustné a nerozpustné látky za předpokladu použití metody přesného dávkování, viz např. norma ISO 10634 (13). V případě těkavých látek je obecně nutné rozhodovat v jednotlivých případech. Mohou být nezbytné zvláštní kroky, například neuvolňování plynu během zkoušky.

REFERENČNÍ LÁTKY

9. Pro ověření postupu se v rámci zkoušky souběžně ve vhodných nádobách testuje referenční látka. Vhodný je například fenol, benzoan sodný nebo polyethylenglykol 400 a lze očekávat, že se při více než 60 % teoretické produkce plynu (tj. metanu a anorganického uhlíku) rozloží do 60 dnů (3)(14).

REPRODUKOVATELNOST VÝSLEDKŮ ZKOUŠKY

10. Při mezinárodní mezilaboratorní porovnávací zkoušce (14) bylo dobře reprodukovatelné měření tlaku plynu ve třech nádobách. Relativní směrodatná odchylka (variační koeficient, CV) byla převážně nižší než 20 %, avšak za přítomnosti toxických látek nebo ke konci 60denní inkubační doby tato hodnota často vzrostla nad 20 %. Vyšší odchylky byly zjištěny také v nádobách o objemu nižším než 150 ml. Konečné hodnoty pH zkušebního média byly v rozmezí 6,5–7,0.

11. Při mezilaboratorní porovnávací zkoušce byly získány tyto výsledky:

Zkoušená látka	Celkové údaje n_1	Střední hodnota rozkladu (z celkových údajů) (v %)	Relativní směrodatná odchylka (z celkových údajů) (v %)	n_2	Střední hodnota rozkladu (z ověřených údajů (v %)	Relativní směrodatná odchylka (z ověřených údajů (v %)	Údaje > 60 % rozkladu v ověřených zkouškách n_3
Kyselina palmitová	36	68,7 + 30,7	45	27	72,2 + 18,8	26	19 = 70 % (*)
Polyethylenglykol 400	38	79,8 + 28,0	35	29	77,7 + 17,8	23	24 = 83 % (*)

(*) Podíl n_2

12. Variační koeficient středních hodnot vypočtených ze všech získaných hodnot činil u kyseliny palmitové celých 45 % (n = 36) a u polyethylenglykolu 400 činil 35 % (n = 38). Po vyloučení hodnot < 40 % a > 100 % (první z nich byly zřejmě důsledkem horších zkušebních podmínek, druhé vznikly z neznámých důvodů) se CV snížil u kyseliny palmitové na 26 % a u ethylenglykolu 400 na 23 %. Podíl „platných“ hodnot, kdy bylo dosaženo nejméně 60 % rozkladu, činil u kyseliny palmitové 70 % a u polyethylenglykolu 400 dosáhl 83 %. Podíly biologické rozložitelnosti v % odvozené z měření rozpuštěného IC byly poměrně malé, avšak kolísaly. U kyseliny palmitové činilo rozmezí 0–35 % a střední hodnota 12 % při CV 92 % a u polyethylenglykolu 400 bylo rozmezí 0–40 % a střední hodnota 24 % při CV 54 %.

POPIS ZKUŠEBNÍ METODY

Přístroje a pomůcky

13. Potřebné je obvyklé laboratorní vybavení a dále:

a) inkubátor – jiskrově bezpečný, umožňující udržovat teplotu 35 °C ± 2 °C,

▼M6

b) skleněné zkušební nádoby odolné vůči tlaku o vhodné jmenovité velikosti ([1]), každá vybavená plynotěsným septem schopným odolat tlaku přibližně 2 bar. Objem volného prostoru pod víkem by měl činit přibližně 10 % až 30 % celkového objemu. Uvolňuje-li se bioplyn pravidelně, je vhodný objem prostoru pod víkem přibližně 10 %, avšak dojde-li k uvolnění plynu až na konci zkoušky, je vhodný objem prostoru pod víkem 30 %. Skleněné lahvičky na sérum o jmenovitém objemu 125 ml, celkovém objemu kolem 160 ml, uzavřené sérovými septy ([2]), a dochází-li k uvolňování tlaku při každém odběru vzorku, doporučují se tvarované hliníkové uzávěry,

c) měřidlo tlaku ([3]) upravené tak, aby umožňovalo měření a odvod vyprodukovaného plynu, například ruční přesný tlakoměr připojený ke vhodné injekční jehle; třícestný plynotěsný ventil usnadňuje uvolnění přebytečného tlaku (dodatek 1). Vnitřní objem trubky čidla tlaku a ventilu je nezbytné udržovat co nejmenší, tak aby chyby v důsledku zanedbání objemu tohoto vybavení nebyly významné.

Poznámka – odečty tlaku se použijí přímo pro výpočet množství uhlíku vyprodukovaného ve volném prostoru pod víkem (odstavce 42 až 44). Alternativně lze údaje o tlaku pomocí převodního grafu převést na objemy (při teplotě 35 °C, atmosférickém tlaku) vyprodukovaného plynu. Tento graf se sestaví na základě údajů získaných vstříknutím známých objemů plynného dusíku do série zkušebních nádob (např. lahviček na sérum) při teplotě 35 °C +/– 2 °C a zaznamenání výsledných stabilizovaných odečtů tlaku (viz dodatek 2). Výpočet je uveden v poznámce v odstavci 44.

Upozornění – je třeba dbát na to, aby při použití mikrostříkaček nedošlo k poranění jehlou,

d) analyzátor uhlíku, vhodný pro přímé stanovení anorganického uhlíku v rozmezí koncentrací 1 mg/l až 200 mg/l,

e) injekční stříkačky s vysokou přesností pro plynné a vodné vzorky,

f) magnetické míchačky a dotykové hroty (volitelné),

g) suchá skříň (doporučeno).

Činidla

14. Je nutno používat pouze chemikálie zaručené analytické jakosti.

([1]) Doporučená velikost je 0,1 litru až 1 litr.

([2]) Doporučuje se použít plynotěsná silikonová septa. Dále se doporučuje přezkoušet plynotěsnost uzávěrů, zejména sept z butylové pryže, protože některá komerčně dostupná septa nejsou dostatečně plynotěsná vůči metanu a některá septa netěsní, když jsou propíchnuta jehlou za podmínek zkoušky.

([3]) Přístroj by měl být používán a v pravidelných intervalech kalibrován podle pokynů výrobce. Je-li použit tlakoměr předepsané kvality, tj. se zapouzdřenou pružinou a ocelovou membránou, není kalibrace v laboratoři nutná. Přesnost kalibrace lze ověřit v laboratoři jednobodovým měřením při tlaku 1×10^5 Pa oproti tlakoměru s mechanickým displejem. Když se tento bod změří správně, nezmění se ani linearita. Jsou-li použita jiná měřidla (bez kalibrace certifikované výrobcem), doporučuje se v pravidelných intervalech provádět kalibraci v celém rozpětí.

▼M6

Voda

15. Destilovaná nebo deionizovaná voda (odkysličená probubláváním plynného dusíku a s obsahem méně než 5 µl kyslíku na litr vody), obsahující méně než 2 mg rozpuštěného organického uhlíku na litr vody.

Zkušební médium

16. Ředicí médium se musí připravit tak, aby obsahovalo následující složky v uvedených množstvích:

Bezvodý dihydrogenfosforečnan draselný (KH_2PO_4)	0,27 g
Dodekahydrát hydrogenfosforečnanu sodného ($Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$)	1,12 g
Chlorid amonný (NH_4Cl)	0,53 g
Dihydrát chloridu vápenatého ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$)	0,075 g
Hexahydrát chloridu hořečnatého ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$)	0,10 g
Tetrahydrát chloridu železnatého ($FeCl_2 \cdot 4H_2O$)	0,02 g
Resazurin (indikátor kyslíku)	0,001 g
Nonahydrát sulfidu sodného ($Na_2S \cdot 9H_2O$)	0,10 g
Zásobní roztok stopových prvků (volitelné, viz odstavec 18)	10 ml
Doplní se odkysličenou vodou (odstavec 15)	na 1 litr

Poznámka: Sulfid sodný by se měl použít čerstvě dodaný nebo by se měl před použitím promýt a vysušit, aby se zajistila dostatečná redukční schopnost. Zkoušku lze provést bez použití suché skříně (viz odstavec 26). V tom případě by konečná koncentrace sulfidu sodného měla být zvýšena na 0,20 g $Na_2S \cdot 9H_2O$ na litr. Sulfid sodný lze také dodat z vhodného anaerobního zásobního roztoku přes septum uzavřených zkušebních nádob, jelikož tento postup sníží riziko oxidace. Sulfid sodný lze nahradit citronanem titanitým, který se dodá přes septum uzavřených zkušebních nádob do konečné koncentrace 0,8 až 1,0 mmol/l. Citronan titanitý je vysoce účinný redukční činitel s nízkou toxicitou, který se připraví takto: 2,94 g dihydrátu citronanu sodného se rozpustí v 50 ml odkysličené vody (takže vznikne roztok o koncentraci 200 mmol/l) a přidá se 5 ml 15 % (m/V) roztoku chloridu titanitého. Neutralizuje se minerálními alkáliemi na pH 7 ± 0,2 a pod proudem dusíku se odpipetuje do vhodné nádoby. Koncentrace citronanu titanitého v tomto zásobním roztoku činí 164 mmol/l.

17. Složky zkušebního média kromě redukčního činitele (sulfidu sodného / citronanu titanitého) se smíchají a roztok se bezprostředně před užitím po dobu asi 20 minut nechá probublávat plynným dusíkem, aby se odstranil kyslík. Poté se těsně před použitím přidá příslušný objem čerstvě připraveného roztoku redukčního činitele (připraveného v odkysličené vodě). Hodnota pH média se, je-li to nezbytné, upraví rozředěnou minerální kyselinou nebo alkálií na hodnotu 7 ± 0,2.

▼M6

Zásobní roztok stopových prvků (volitelné)

18. Doporučuje se, aby pro zlepšení procesů anaerobního rozkladu zkušební médium obsahovalo následující stopové prvky, zejména pokud se použijí nízké koncentrace inokula (např. 1 g/l) (11):

Tetrahydrát chloridu manganatého ($MnCl_2 \cdot 4H_2O$)	50 mg
Kyselina boritá (H_3BO_3).	5 mg
Chlorid zinečnatý ($ZnCl_2$)	5 mg
Chlorid měďnatý ($CuCl_2$)	3 mg
Dihydrát molybdenanu sodného ($Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$)	1 mg
Hexahydrát chloridu kobaltnatého ($CoCl_2 \cdot 6H_2O$)	100 mg
Hexahydrát chloridu nikelnatého ($NiCl_2 \cdot 6H_2O$)	10 mg
Seleničitan sodný (Na_2SeO_3)	5 mg
Doplní se odkysličenou vodou (odstavec 15)	na 1 litr

Zkoušená látka

19. Přidá se zkoušená látka ve formě roztoku, suspenze, emulze nebo přímo jako pevná látka či kapalina nebo adsorbovaná na filtru ze skleněných vláken, aby se získala koncentrace organického uhlíku nejvýše 100 mg/l. Použijí-li se zásobní roztoky, připraví se příslušný roztok s vodou (odstavec 15) (předtím odkysličenou probubláváním plynného dusíku) v takové koncentraci, aby přidaný objem byl menší než 5 % celkového objemu reakční směsi. Hodnota pH zásobního roztoku se, je-li to nutné, upraví na hodnotu 7 ± 0,2. V případě zkoušených látek, které jsou nedostatečně rozpustné ve vodě, lze postupovat viz norma ISO 10634 (13). Je-li užito rozpouštědlo, připraví se další kontrolní vzorek, ve kterém se do média s inokulem přidá pouze rozpouštědlo. Neměla by se používat organická rozpouštědla, o nichž je známo, že inhibují produkci metanu, jako např. chloroform a chlorid uhličitý.

Upozornění – s toxickými zkušebními látkami se musí zacházet opatrně, stejně jako s látkami, jejichž vlastnosti nejsou známy.

Referenční látky

20. K ověření postupu byly úspěšně použity referenční látky jako např. benzoan sodný, fenoly a polyethylenglykol 400, které se během 60 dnů biologicky rozložily z více než 60 %. Zásobní roztok zvolené referenční látky (v odkysličené vodě) se připraví stejně jako v případě zkoušené látky, a je-li to nezbytné, upraví se pH na hodnotu 7 ± 0,2.

Kontrola inhibice (podmíněně)

21. Pro získání informací o toxicitě zkoušené látky pro anaerobní mikroorganismy a pro nalezení nejvhodnější zkušební koncentrace se zkoušená látka a referenční látka přidají do nádoby se zkušebním médiem (viz odstavec 16), každá ve stejné koncentraci (viz odstavec 19 a 20 a viz také normu ISO 13641-1 (12)).

▼M6

Vyhnilý kal

22. Odeberte vyhnilý kal z vyhnívací nádrže v čistírně odpadních vod, kde jsou čištěny převážně domovní odpadní vody. Kal by měl být plně charakterizován a základní informace o něm by měly být uvedeny ve zprávě (viz odstavec 54). Má-li se použít upravené inokulum, lze zvážit odběr vyhnilého kalu z čistírny průmyslových odpadních vod. Pro odběr vyhnilého kalu se použijí lahve se širokým hrdlem vyrobené z polyethylenu s vysokou hustotou nebo z podobného materiálu, které mohou zvětšovat svůj objem. Lahve se naplní kalem do výše asi 1 cm od horního okraje a pevně se uzavřou, nejlépe víkem s bezpečnostním ventilem. Po dopravě do laboratoře může být odebraný kal použit buď přímo, nebo může být umístěn do laboratorní vyhnívací nádrže. Opatrným otevřením lahví s kalem se uvolní přebytečný bioplyn. Alternativně lze jako zdroj inokula použít laboratorně získaný anaerobní kal, mohlo však dojít k narušení spektra jeho aktivity.

Upozornění – vyhnilý kal produkuje hořlavé plyny, které představují riziko požáru a výbuchu; obsahuje rovněž potenciálně patogenní organismy, takže při manipulaci je třeba přijmout příslušná preventivní opatření. Z důvodů bezpečnosti nepoužívejte pro odběr kalu skleněné nádoby.

23. Pro omezení základní produkce plynu a pro snížení vlivu slepých zkoušek lze zvážit předběžné vyhnití kalu. Je-li nutné předběžné vyhnití, kal by se měl nechat vyhnít až 7 dnů při teplotě 35 °C ± 2 °C, a to bez přidání jakýchkoli živin nebo substrátů. Bylo zjištěno, že předběžné vyhnití kalu přibližně po dobu 5 dnů obvykle vede k optimálnímu snížení produkce plynu ve slepé zkoušce, aniž by došlo k nepřijatelnému nárůstu ve fázi iniciace nebo v inkubační době.

24. U zkoušených látek, které jsou (nebo se předpokládá, že jsou) špatně biologicky rozložitelné, je třeba zvážit předběžnou expozici kalu zkoušené látce pro získání inokula, které je lépe přizpůsobené. V takovém případě se do vyhnilého kalu přidá zkoušená látka při koncentraci organického uhlíku 5 mg/l až 20 mg/l a inkubuje se až 2 týdny. Předexponovaný kal se před použitím pečlivě promyje (viz odstavec 25) a v závěrečné zprávě se uvedou podmínky předběžné expozice.

Inokulum

25. Kal se těsně před použitím promyje (viz odstavce 22 až 24) pro snížení koncentrace IC v konečné zkušební suspenzi na méně než 10 mg/l. Kal v uzavřených zkumavkách se odstředí (např. při 3 000 g po dobu 5 min) a supernatant se odstraní. Výsledná peleta se suspenduje v odkysličeném médiu (odstavec 16 a 17), suspenze se znovu odstředí a supernatant se odstraní. Pokud nedojde k dostatečnému snížení obsahu IC, lze postup promytí kalu nejvýše dvakrát opakovat. To by nemělo nepříznivě ovlivnit mikroorganismy. Nakonec se peleta suspenduje v potřebném objemu zkušebního média a stanoví se koncentrace celkového obsahu pevných látek (např. podle normy ISO 11923 (15)). Konečná koncentrace celkového obsahu pevných látek ve zkušebních nádobách by měla být v rozmezí od 1 g/l do 3 g/l (nebo asi 10 % celkového obsahu pevných látek v nezředěném vyhnilém kalu). Výše uvedené postupy musí být provedeny tak, aby se kal v co nejmenší míře dostal do styku s kyslíkem (např. za použití dusíkové atmosféry).

▼M6

POSTUP ZKOUŠKY

26. Následující úvodní postupy provádějte pomocí takových technik, aby byl kontakt vyhnilého kalu s kyslíkem na co možná nejnižší míře, například může být nezbytné pracovat v suché skříni v dusíkové atmosféře a/nebo vyplachovat lahve dusíkem (4).

Příprava zkoušky a zkoušky s kontrolními vzorky

27. Připraví se zkušební nádoby nejméně ve třech opakováních (viz odstavec 13b) pro zkoušenou látku, slepé zkoušky, referenční látku, kontroly inhibice (podmíněné) a komory pro kontrolu tlaku (volitelný postup) (viz odstavec 7, 19 až 21). Připravit lze také další nádoby za účelem hodnocení primárního biologického rozkladu specifickými analýzami zkoušené látky. Stejný soubor slepých zkoušek lze použít pro několik zkoušených látek v rámci téže zkoušky, jsou-li objemy volného prostoru pod víkem shodné.

28. Připraví se naředěné inokulum a vloží se do nádob, např. pomocí široké pipety. Přidají se poměrné podíly dobře promíchaného inokula (odstavec 25) tak, aby koncentrace celkového obsahu pevných látek byla ve všech nádobách stejná (mezi 1 g/l a 3 g/l). Přidají se zásobní roztoky zkoušené a referenční látky, poté co jejich pH bylo v případě potřeby upraveno na hodnotu 7 ± 0,2. Zkoušená látka a referenční látka by měly být přidány nejvhodnějším způsobem (odstavec 19).

29. Zkušební koncentrace organického uhlíku by se obvykle měly pohybovat mezi 20 a 100 mg/l (odstavec 4). Je-li zkoušená látka toxická, měla by se zkušební koncentrace snížit na 20 mg C/l nebo i na nižší hodnotu, má-li se měřit pouze primární biologický rozklad pomocí specifických analýz. Je třeba poznamenat, že při nižších zkušebních koncentracích se zvyšuje variabilita výsledků zkoušky.

30. Ve slepých zkouškách se namísto zásobního roztoku, suspenze nebo emulze zkoušené látky přidá odpovídající množství nosiče používaného pro dávkování zkoušené látky. Byla-li zkoušená látka podána za použití filtrů ze skleněných vláken nebo organických rozpouštědel, zařadí se do slepých zkoušek filtr nebo odpovídající objem rozpouštědla, které se vypaří. Pro měření hodnoty pH se připraví jedno další opakování se zkoušenou látkou. Hodnota pH se, je-li to nezbytné, pomocí malých množství zředěné minerální kyseliny nebo alkálie upraví na hodnotu 7 ± 0,2. Do všech zkušebních nádob by se měla přidat stejná množství neutralizačních činitelů. Tyto látky by se v optimálním případě přidávat nemusely, jelikož hodnota pH zásobních roztoků zkoušené látky a referenční látky již byla upravena (viz odstavec 19 a 20). Má-li se měřit primární biologický rozklad, měl by se z nádoby pro kontrolu pH nebo z další zkušební nádoby odebrat vhodný vzorek a koncentrace zkoušené látky by měla být změřena pomocí specifických analýz. Mají-li se reakční směsi míchat, lze do všech nádob umístit kryté magnety (volitelné).

31. Je třeba zajistit, aby celkový objem kapaliny V_l a objem volného prostoru pod víkem V_h byly ve všech nádobách stejné; hodnoty V_l a V_h se zaznamenají a uvedou v protokolu. Každá nádoba by měla být uzavřena plynovým septem a přenesena ze suché skříně (viz odstavec 26) do inkubátoru (viz odstavec 13-a).

▼M6

Nerozpustné zkoušené látky

32. Odvážené množství látek, které jsou špatně rozpustné ve vodě, se přidá přímo do připravených nádob. Musí-li se použít rozpouštědlo (viz odstavec 19), roztok nebo suspenze zkoušené látky se přemístí do prázdných nádob. Tam, kde je to možné, se rozpouštědlo odpaří propláchnutím nádob plynným dusíkem a poté se přidají ostatní složky, a sice naředěný kal (odstavec 25) a odkysličená voda podle potřeby. Měla by se připravit také další kontrola s rozpouštědlem (viz odstavec 19). Pro další metody přidávání nerozpustných látek viz norma ISO 10634 (13). Kapalné zkoušené látky lze dávkovat stříkačkou do zcela připravených uzavřených nádob, pokud lze očekávat, že počáteční pH nepřekročí hodnotu 7 ± 1, jinak se dávkuje tak, jak uvedeno výše (viz odstavec 19).

Inkubace a měření tlaku plynů

33. Připravené nádoby se přibližně 1 hodinu inkubují při teplotě 35 °C ± 2 °C, aby se umožnilo ustavení rovnováhy a uvolnění přebytku plynu do ovzduší, například tak, že každá nádoba se postupně protřepe, jehlou tlakoměru (odstavec 13-c) se propíchne uzávěr a otevře se ventil, dokud tlakoměr nevykáže nulovou hodnotu. Je-li v této fázi nebo při provádění průběžných měření tlak ve volném prostoru pod víkem nižší než atmosférický tlak, měl by být zaveden plynný dusík pro opětovné nastolení atmosférického tlaku. Ventil se uzavře (viz odstavec 13-c) a pokračuje inkubace v temnu, přičemž se zajistí, aby všechny části nádob byly udržovány při teplotě rozkladu. Po inkubaci v trvání 24 až 48 hodin se nádoby vizuálně zkontrolují. Pokud se supernatant zřetelné zbarvil do růžova, tj. pokud Resazurin (viz odstavec 16) změnil barvu a ukázal na přítomnost kyslíku (viz odstavec 50), tyto nádoby se ze zkoušky vyřadí. Malá množství kyslíku může systém tolerovat, avšak vyšší koncentrace mohou průběh anaerobního biologického rozkladu výrazně ztlumit. Výjimečné vyřazení jedné nádoby ze souboru tří opakování lze akceptovat, avšak výskyt více takových selhání musí vést k prošetření experimentálních postupů a k opakování zkoušky.

34. Obsah každé nádoby se opatrně smísí mícháním nebo protřepáním po dobu několika minut nejméně dvakrát nebo třikrát týdně a krátce před každým měřením tlaku. Protřepání opětovně suspenduje inokulum a zajistí plynovou rovnováhu. Veškerá měření tlaku by měla být prováděna rychle, jelikož ve zkušebních nádobách by mohlo dojít ke snížení teploty, což vede k falešným údajům. Při měření tlaku by celá zkušební nádoba včetně volného prostoru pod víkem měla být udržována při teplotě rozkladu. Změří se tlak plynu, například propíchnutím septa injekční jehlou (odstavec 13-c) napojenou na tlakoměr. Mělo by se dbát na to, aby se do jehly nedostala voda; pokud k tomu dojde, mokré části by měly být vysušeny a měla by se použít nová jehla. Tlak by měl být měřen v milibarech (viz odstavec 42). Tlak plynu v nádobě lze měřit periodicky, např. týdně, a přebytek plynu volitelně vypouštět do ovzduší. Alternativně se tlak měří pouze na konci zkoušky, aby se stanovilo množství vyprodukovaného bioplynu.

35. Odečty tlaku plynu se doporučuje provádět průběžně, protože nárůst tlaku poskytuje vodítko ohledně toho, kdy lze zkoušku ukončit, a umožňuje sledovat kinetiku (viz odstavec 6).

▼M6

36. Zkouška se obvykle ukončí po uplynutí inkubační doby 60 dnů, pokud křivka biologického rozkladu získaná z měření nedosáhne dříve fáze plató; to je fáze, kdy bylo dosaženo maximálního rozkladu a křivka biologického rozkladu se vyrovná. Je-li hodnota plató nižší než 60 %, interpretace je problematická, protože to naznačuje, že se mineralizovala pouze část molekuly nebo že došlo k chybě. Pokud byl na konci obvyklé inkubační doby vyprodukován plyn, avšak zjevně nebylo dosaženo fáze plató, mělo by se zvážit prodloužení zkoušky, aby se ověřilo, zda plató (> 60 %) bude dosaženo.

Měření anorganického uhlíku

37. Na konci zkoušky, po posledním měření tlaku plynu, se kal nechá usadit. Všechny nádoby se postupně otevřou a ihned se odebere vzorek pro stanovení koncentrace (mg/l) anorganického uhlíku (IC) v supernatantu. Supernatant by se neměl odstřeďovat ani filtrovat, protože by došlo k nepřijatelné ztrátě rozpuštěného oxidu uhličitého. Nemůže-li být kapalina analyzována při odběru vzorků, skladuje se v uzavřené zkumavce bez volného prostoru nad kapalinou, ochlazená přibližně na 4 °C až po dobu 2 dnů. Po změření IC se změří hodnota pH a zaznamená se.

38. Alternativně lze IC v supernatantu stanovit nepřímo pomocí uvolnění rozpuštěného IC jako oxidu uhličitého, který lze změřit ve volném prostoru pod víkem. Po posledním měření tlaku plynu se tlak ve všech zkušebních nádobách upraví na atmosférický tlak. Obsah každé nádoby se okyselí přibližně na pH 1 přidáním koncentrované minerální kyseliny (např. H_2SO_4) přes septum uzavřených nádob. Protřepané nádoby se asi 24 hodin inkubují při teplotě 35 °C ± 2 °C a pomocí tlakoměru se změří tlak plynu vzniklý v důsledku uvolňování oxidu uhličitého.

39. Podobné odečty se provedou u odpovídající slepé zkoušky, referenční látky a u nádob pro kontrolu inhibice, byla-li zařazena (viz odstavec 21).

40. V některých případech, zejména jsou-li tytéž kontrolní nádoby použity pro několik zkoušených látek, by případně měla být zvážena měření průběžných koncentrací IC ve zkušebních a kontrolních nádobách. V takovém případě by měl být připraven dostatečný počet nádob pro všechna průběžná měření. Tento postup se upřednostňuje před odběrem všech vzorků pouze z jedné nádoby. Odběr všech vzorků z jedné nádoby lze provádět pouze tehdy, není-li požadovaný objem pro analýzu rozpuštěného IC považován za příliš vysoký. Měření rozpuštěného IC by se mělo provádět po změření tlaku plynu bez uvolnění přebytku plynu, jak je popsáno níže:

— pomocí injekční jehly se přes septum bez otevření nádob odebere co možná nejmenší objem vzorků supernatantu a stanoví se obsah IC ve vzorku,

— po odebrání vzorku se uvolní nebo neuvolní přebytek plynu,

— mělo by se vzít v úvahu, že i malý pokles objemu supernatantu (např. kolem 1 %) může vést ke značnému nárůstu objemu plynu v prostoru pod víkem (V_h),

— rovnice (viz odstavec 44) se zkorigují zvýšením hodnoty V_h v rovnici 3 podle potřeby.

▼M6

Specifické analýzy

41. Má-li být stanovován primární anaerobní rozklad (viz odstavec 30), z nádob se zkoušenou látkou se na počátku a na konci zkoušky odeberou vzorky v přiměřeném objemu pro specifické analýzy. Je-li to provedeno, je třeba si uvědomit, že objemy volného prostoru pod víkem (V_h) a objemy kapaliny (V_l) se změní, a vzít to v úvahu při výpočtu výsledků produkce plynu. Alternativně lze vzorky pro specifické analýzy odebrat z dalších směsí, které byly pro tento účel dříve připraveny (odstavec 30).

ÚDAJE A JEJICH PŘEDKLÁDÁNÍ

Zpracování výsledků

42. Z praktických důvodů se tlak plynu měří v milibarech (1 mbar = 1h Pa = 10^2 Pa; 1 Pa = 1 N/m^2), objem v litrech a teplota ve stupních Celsia.

Uhlík ve volném prostoru pod víkem

43. Jelikož 1 mol metanu a 1 mol oxidu uhličitého obsahují shodně 12 g uhlíku, lze hmotnost uhlíku v daném objemu uvolněného plynu vyjádřit jako:

$$m = 12 \times 10^3 \times n \quad \text{rovnice [1]}$$

kde:

m = hmotnost uhlíku (v mg) v daném objemu uvolněného plynu,

12 = relativní atomová hmotnost uhlíku,

n = počet molů plynu v daném objemu.

Vyprodukuje-li se jiný plyn než metan nebo oxid uhličitý (např. N_2O) ve významných množstvích, vzorec [1] by měl být doplněn tak, aby popisoval možnost účinků vyvolaných vyprodukovanými plyny.

44. Podle zákonů o plynu lze *n* vyjádřit jako:

$$n = \frac{pV}{RT} \quad \text{rovnice [2]}$$

kde:

p = tlak plynu (v pascalech),

V = objem plynu (v m^3),

R = molární plynová konstanta [8,314 J/(mol K)],

T = inkubační teplota (v kelvinech).

Kombinací rovnic [1] a [2] a racionalizací se získá produkce plynu ve slepé zkoušce:

$$m_h = \frac{12\,000 \times 0{,}1(\Delta p \cdot V_h)}{RT} \quad \text{rovnice [3]}$$

kde:

m_h = hmotnost čistého uhlíku vyprodukovaného jako plyn ve volném prostoru pod víkem (v mg),

Δp = střední hodnota rozdílu mezi počátečním a konečným tlakem ve zkušebních nádobách po odečtení odpovídající střední hodnoty ve slepých zkouškách (v milibarech),

▼**M6**

V_h = objem volného prostoru pod víkem nádoby (v l),

0,1 = faktor pro přepočet z newtonů/m^2 na milibary a z m^3 na litry.

Rovnice [4] by měla být použita pro běžnou inkubační teplotu 35 °C (308 K):

$$m_h = 0{,}468(\Delta p \cdot V_h) \qquad \text{rovnice [4]}$$

Poznámka: Alternativní výpočet objemu: Údaje tlakoměru se přepočtou na ml vyprodukovaného plynu pomocí standardní křivky, která se vytvoří vynesením vstříknutého objemu (v ml) v závislosti na údajích měřiče (dodatek 2). Počet molů (n) plynu v prostoru pod víkem každé nádoby se vypočítá vydělením kumulativní produkce plynu (v ml) hodnotou 25 286 ml/mol, což je objem, který zaujímá jeden mol plynu při teplotě 35 °C a standardním atmosférickém tlaku. Jelikož 1 mol CH_4 a 1 mol CO_2 shodně obsahují 12 g uhlíku, množství uhlíku (v mg) ve volném prostoru pod víkem (m_h) je dáno rovnicí [5]:

$$m_h = 12 \times 10^3 \times n \qquad \text{rovnice [5]}$$

Racionalizace umožňující získat produkci plynu ve slepé zkoušce:

$$m_h = \frac{12\,000 \times \Delta V}{25\,286} = 0{,}475\Delta V \qquad \text{rovnice [6]}$$

kde:

m_h = hmotnost čistého uhlíku vyprodukovaného jako plyn ve volném prostoru pod víkem (v mg),

ΔV = střední hodnota rozdílu mezi objemem plynu vyprodukovaného ve volném prostoru pod víkem zkušebních nádob a nádob pro slepou zkoušku,

25286 = objem, který zaujímá 1 mol plynu při teplotě 35 °C a tlaku 1 atmosféry.

45. Průběh biologického rozkladu lze případně sledovat vynesením kumulovaného přírůstku tlaku Δp (v milibarech) v závislosti na čase. Z této křivky se zjistí fáze iniciace (ve dnech) a zaznamená se. Fáze iniciace je doba od počátku zkoušky do začátku významného rozkladu (viz například dodatek 3). Pokud byly odebírány a analyzovány průběžné vzorky supernatantu (viz odstavec 40, 46 a 47), lze vynést celkový vyprodukovaný C (v plynu plus v kapalině), a nikoli pouze kumulovaný tlak.

Uhlík v kapalině

46. Množství metanu v kapalině se zanedbá, jelikož je známo, že jeho rozpustnost ve vodě je velmi nízká. Hmotnost anorganického uhlíku v kapalině ve zkušebních nádobách se vypočítá pomocí rovnice [7]:

$$m_l = C_{net} \times V_l \qquad \text{rovnice [7]}$$

kde:

m_l = hmotnost anorganického uhlíku v kapalině (v mg),

C_{net} = koncentrace anorganického uhlíku ve zkušebních nádobách po odečtení anorganického uhlíku v kontrolních nádobách na konci zkoušky (v mg/l),

V_l = objem kapaliny v nádobě (v l).

▼M6

Celkové množství zplynovaného uhlíku

47. Celková hmotnost zplynovaného uhlíku v nádobě se vypočítá pomocí rovnice [8]:

$$m_t = m_h + m_l \qquad \text{rovnice [8]}$$

kde:

m_t = celková hmotnost zplynovaného uhlíku (v mg),

m_h a m_l, jak jsou definovány výše.

Uhlík ze zkoušené látky

48. Hmotnost uhlíku ve zkušebních nádobách získaného z přidané zkoušené látky se vypočítá pomocí rovnice [9]:

$$m_v = C_c \times V_l \qquad \text{rovnice [9]}$$

kde:

m_v = hmotnost uhlíku ze zkoušené látky (v mg),

C_c = koncentrace uhlíku ze zkoušené látky ve zkušební nádobě (v mg/l),

V_l = objem kapaliny ve zkušební nádobě (v l).

Rozsah biologického rozkladu

49. Biologický rozklad v procentech se vypočítá z plynu pod víkem pomocí rovnice [10] a celkový biologický rozklad v procentech se vypočítá pomocí rovnice [11]:

$$D_h = (m_h/m_v) \times 100 \qquad \text{rovnice [10]}$$

$$D_t = (m_t/m_v) \times 100 \qquad \text{rovnice [11]}$$

kde:

D_h = biologický rozklad vypočtený z plynu v prostoru pod víkem (v %),

D_t = celkový biologický rozklad (v %),

m_h, m_v a m_t, jak jsou definovány výše.

Stupeň primárního biologického rozkladu se vypočítá z (volitelných) měření koncentrace zkoušené látky na počátku a na konci inkubace pomocí rovnice [12]:

$$D_p = (1 - S_e/S_i) \times 100 \qquad \text{rovnice [12]}$$

kde:

D_p = primární rozklad zkoušené látky (v %),

S_i = počáteční koncentrace zkoušené látky (v mg/l),

S_e = koncentrace zkoušené látky na konci (v mg/l).

Pokud jsou na základě analytické metody stanoveny významné koncentrace zkoušené látky v neexponovaném inokulu anaerobního kalu, použije se rovnice [13]:

▼M6

$$D_p^{\,1} = [1 - (S_e - S_{eb})/(S_i - S_{ib})] \times 100 \quad \text{rovnice [13]}$$

kde:

$D_p^{\,1}$ = korigovaný primární rozklad zkoušené látky (v %),

S_{ib} = počáteční „zjevná“ koncentrace zkoušené látky ve slepých zkouškách (v mg/l),

S_{eb} = „zjevná“ koncentrace zkoušené látky ve slepých zkouškách na konci (v mg/l).

Platnost výsledků

50. Údaje o tlaku by měly být použity pouze z nádob, které nevykazují růžové zbarvení (viz odstavec 33). Kontaminace kyslíkem se minimalizuje použitím vhodných anaerobních manipulačních postupů.

51. Je třeba mít na paměti, že zkouška je platná, pokud referenční látka dosáhne plató, které představuje více než 60 % biologického rozkladu ([1]).

52. Překročí-li pH na konci zkoušky rozmezí 7 ± 1 a došlo k nedostatečnému biologickému rozkladu, zkouška se opakuje se zvýšenou pufrační kapacitou média.

Inhibice rozkladu

53. Produkce plynu v nádobách obsahujících jak zkoušenou, tak referenční látku by měla být přinejmenším stejná jako produkce plynu v nádobách pouze s referenční látkou; v opačném případě je indikována inhibice produkce plynu. V některých případech bude produkce plynu v nádobách obsahujících zkoušenou látku bez referenční látky nižší než produkce plynu ve slepých zkouškách, což naznačuje, že zkoušená látka působí inhibičně.

Závěrečná zpráva

54. Závěrečná zpráva musí obsahovat tyto údaje:

Zkoušená látka:

— obecný název, chemický název, číslo CAS, strukturní vzorec a relevantní fyzikálně-chemické vlastnosti,

— čistota (nečistoty) zkoušené chemické látky.

Zkušební podmínky:

— objem naředěné směsi ve vyhnívací nádrži (V_l) a objem volného prostoru pod víkem (V_h) nádoby,

— popis zkušebních nádob, hlavní charakteristiky měření bioplynu (např. druh tlakoměru) a analyzátoru IC,

— aplikace zkoušené látky a referenční látky do zkušebního systému: použitá zkušební koncentrace a jakékoli použití rozpouštědel,

— podrobnosti o použitém inokulu: název čistírny odpadních vod, popis zdroje čištěné odpadní vody (např. provozní teplota, doba zdržení kalu, zda je převážně domovní apod.), koncentrace, veškeré informace potřebné k odůvodnění výběru a informace o jakékoli předúpravě inokula (např. předběžné vyhnití, předběžná expozice);

— inkubační teplota,

— počet opakování.

([1]) Je třeba přehodnotit, pokud jsou zařazeny adsorpční a nerozpustné referenční chemické látky.

▼M6

Výsledky:

— hodnoty pH a IC na konci zkoušky,

— bylo-li provedeno měření pro specifické analýzy, koncentrace zkoušené látky na počátku a na konci zkoušky,

— veškeré naměřené údaje získané z nádob používaných během zkoušky a slepé zkoušky, z nádob s referenční látkou a případně z nádob pro kontrolu inhibice (např. tlak v milibarech, koncentrace anorganického uhlíku (v mg/l)) ve formě tabulky (naměřené údaje o volném prostoru pod víkem a o kapalině by měly být uvedeny zvlášť),

— statistické zpracování údajů, doba trvání zkoušky a diagram biologického rozkladu zkoušené látky, referenční látky a kontroly inhibice,

— procento biologického rozkladu zkoušené látky a referenční látky,

— odůvodnění případného odmítnutí výsledků zkoušky,

— diskuze výsledků.

LITERATURA

1) Následující kapitoly této přílohy:

C.4, Stanovení snadné biologické rozložitelnosti;

C.9, Biologická rozložitelnost – Zahn-Wellensova zkouška;

C.10, Simulační zkouška aerobního čištění odpadních vod:

A: Jednotky aktivovaného kalu, B: Biofilmy

C.11, Biologická rozložitelnost – Zkouška na inhibici dýchání aktivovaného kalu

2) OECD (2009) Inherent Biodegradability: Modified MITI Test (II), OECD Guideline for Testing of Chemicals, No. 302C, OECD, Paris.

3) Birch, R. R., Biver, C., Campagna, R., Gledhill, W. E., Pagga,U., Steber, J., Reust, H. and Bontinck, W. J. (1989) Screening of chemicals for anaerobic biodegradation. Chemosphere 19, pp. 1527–1550. (Also published as ECETOC Technical Report No. 28, June 1988).

4) Shelton, D. R. and Tiedje, J. M. (1984) General method for determining anaerobic biodegradation potential. Appl. Environ. Mircobiology, 47, pp. 850–857.

5) Owen, W. F., Stuckey, D. C., Healy, J. B., Jr., Young, L. Y. and McCarty, P. L. (1979) Bioassay for monitoring biochemical methane potential and anaerobic toxicity. Water Res. 13, pp. 485–492.

6) Healy, J. B., Jr. and Young, L. Y. (1979) Anaerobic biodegradation of eleven aromatic compounds to methane. Appl. Environ. Microbiol. 38, pp. 84–89.

7) Gledhill, W. E. (1979) Proposed standard practice for the determination of the anaerobic biodegradation of organic chemicals. Working document. Draft 2 no.35.24. American Society for Testing Materials, Philadelphia.

8) Battersby, N. S. and Wilson, V. (1988) Evaluation of a serum bottle technique for assessing the anaerobic biodegradability of organic chemicals under methanogenic conditions. Chemosphere, 17, pp. 2441–2460.

9) E1192-92. Standard Test Method for Determining the Anaerobic Biodegradation Potential of Organic Chemicals. ASTM, Philadelphia.

▼**M6**

10) US-EPA (1998) Fate, Transport and Transformation Test Guidelines OPPTS 835.3400 Anaerobic Biodegradability of Organic Chemicals.

11) International Organization for Standardization (1995) ISO 11 734 Water Quality – Evaluation of the ultimate anaerobic biodegradation of organic compounds in digested sludge – Method by measurement of the biogas production.

12) International Organization for Standardization (2003) ISO 13 641-1 Water Quality – Determination of inhibition of gas production of anaerobic bacteria – Part 1 General Test.

13) International Organization for Standardization (1995) ISO 10 634 Water Quality – Guidance for the preparation and treatment of poorly water-soluble organic compounds for the subsequent evaluation of their biodegradability in an aqueous medium.

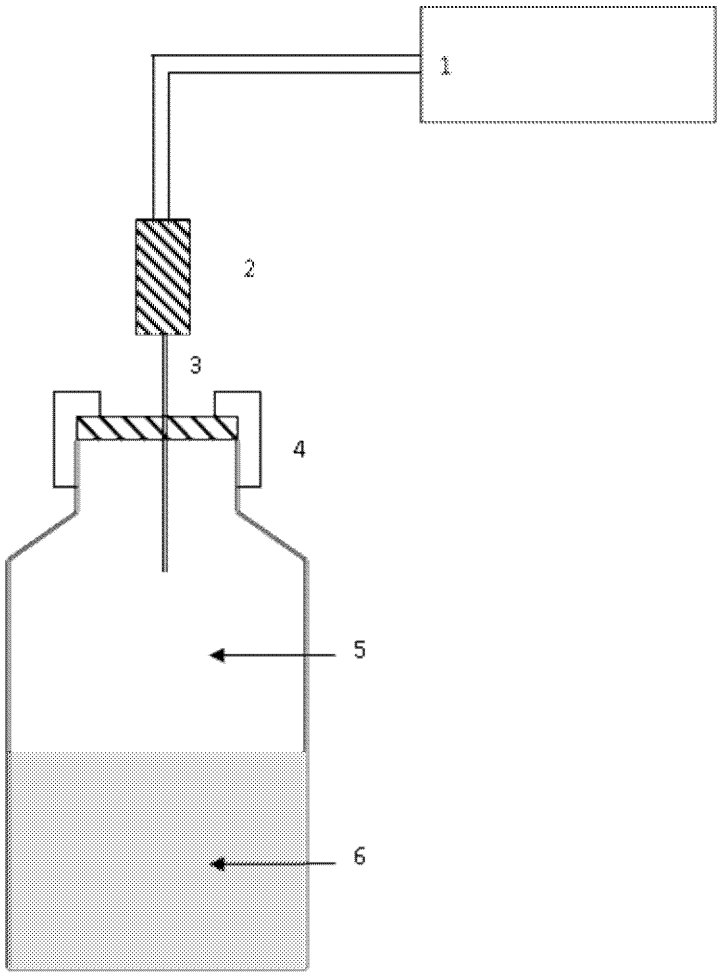
14) Pagga, U. and Beimborn, D. B. (1993) Anaerobic biodegradation test for organic compounds. Chemosphere, 27, pp. 1499–1509.

15) International Organization for Standardization (1997) ISO 11 923 Water Quality – Determination of suspended solids by filtration through glass-fibre filters.

▼**M6**

Dodatek 1

Příklad zařízení k měření produkce bioplynu pomocí tlaku plynu



Vysvětlivky:

1 – Tlakoměr

2 – Třícestný plynotěsný ventil

3 – Injekční jehla

4 – Plynotěsný uzávěr (tvarovaný uzávěr a septum)

5 – Volný prostor pod víkem (V_h)

6 – Inokulum vyhnilého kalu (V_I)

Zkušební nádoby v prostředí o teplotě 35 °C ± 2 °C

▼M6

Dodatek 2

Převod údajů tlakoměru

Údaje tlakoměru lze převést na objemy plynu pomocí standardní křivky získané nástřikem známých objemů vzduchu o teplotě 35 °C ± 2 °C do lahviček na sérum, které obsahují vodu ve stejném objemu, jako je objem reakční směsi, V_R:

— do pěti lahviček na sérum se rozdělí poměrné části vody odpovídající objemu V_R v ml, udržované o teplotě 35 ± 2 °C. Lahvičky se uzavřou a vloží se na 1 hodinu do vodní lázně o teplotě 35 °C pro dosažení rovnováhy,

— zapne se tlakoměr, nechá se ustálit a vynuluje se,

— injekční jehlou se propíchne víčko jedné z lahviček, otevře se ventil, dokud tlakoměr neukáže nulovou hodnotu, a ventil se uzavře,

— tento postup se opakuje s ostatními lahvičkami,

— do každé lahvičky se nastříkne 1 ml vzduchu o teplotě 35 °C ± 2 °C. Jehlou (napojenou na tlakoměr) se propíchne víčko jedné z lahviček a údaj o tlaku se nechá stabilizovat. Tlak se zaznamená, otevře se ventil, dokud tlak nevykáže nulovou hodnotu, a poté se ventil uzavře,

— tento postup se opakuje s ostatními lahvičkami,

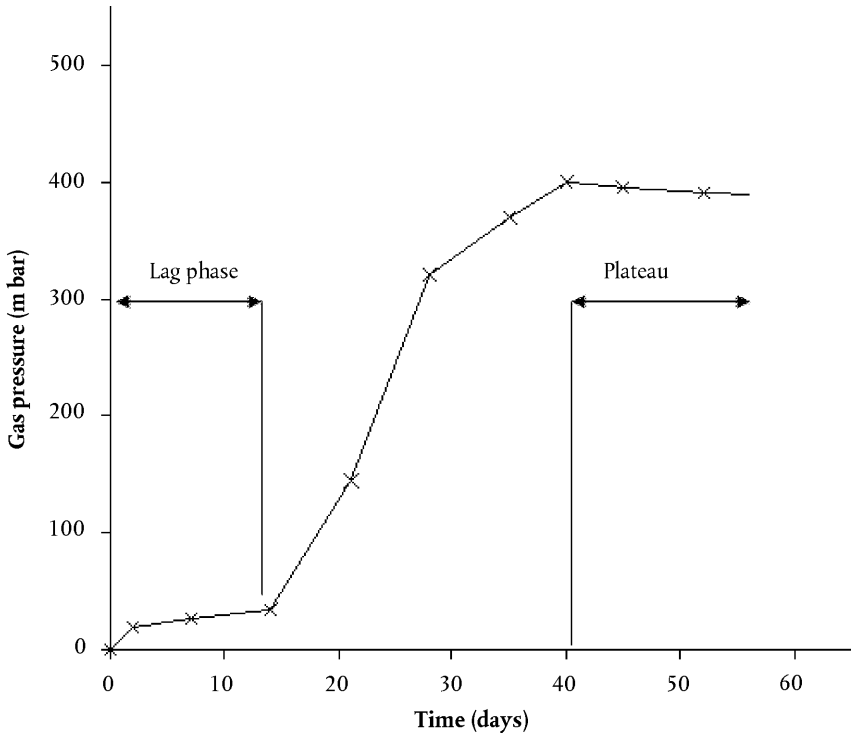
— výše uvedený postup se opakuje s 2 ml, 3 ml, 4 ml, 5 ml, 6 ml, 8 ml, 10 ml, 12 ml, 16 ml, 20 ml a 50 ml vzduchu,

— vynese se převodní křivka tlaku (Pa) v závislosti na objemu vstříknutého plynu Vb (v ml). V rozmezí 0 Pa až 70 000 Pa a v rozmezí 0 ml až 50 ml produkce plynu je odezva přístroje lineární.

▼**M6**

Dodatek 3

Příklad křivky rozkladu (přírůstek kumulovaného čistého tlaku)



▼M6

Dodatek 4

Příklad přehledu dat pro zkoušku anaerobního biologického rozkladu – Přehled dat o zkoušené látce

Laboratoř: ..... Zkoušená látka: ..... Zkouška č.: .....

Zkušební teplota: (°C) ..... Objem volného prostoru pod víkem (V_h): .....(l)..... Objem kapaliny (V_l): .....l)

Množství uhlíku ve zkoušené látce $C_{c,v}$: .....(mg/l) m_v ([1]): .....(mg)

Den	p_1 (zkouška) (v mbar)	p_2 (zkouška) (v mbar)	p_3 (zkouška) (v mbar)	p (zkouška) střední hodnota (v mbar)	p_4 (slepá zkouška) (v mbar)	p_5 (slepá zkouška) (v mbar)	p_6 (slepá zkouška) (v mbar)	p (slepá zkouška) střední hodnota (v mbar)	p (čisté množství) zkouška *minus* slepá zkouška střední hodnota (v mbar)	Δp (čisté množství) kumulované (v mbar)	m_h C pod víkem ([2]) (v mg)	D_h Biologický rozklad ([3]) (v %)

	$C_{IC,\ 1}$ zkouška (v mg)	$C_{IC,\ 2}$ zkouška (v mg)	$C_{IC,\ 3}$ zkouška (v mg)	C_{IC} zkouška, střední hodnota (v mg)	$C_{IC,\ 4}$ slepá zkouška (v mg)	$C_{IC,\ 5}$ slepá zkouška (v mg)	$C_{IC,\ 6}$ slepá zkouška (v mg)	C_{IC} slepá zkouška, střední hodnota (v mg)	$C_{IC,\ net}$ zkouška *minus* slepá zkouška střední hodnota (v mg)	m_l C v kapalině ([4]) (v mg)	m_t Celkový C ([5]) (v mg)	D_t Biologický rozklad ([6]) (v %)
IC (na konci)												
pH (na konci)												

([1]) Množství uhlíku ve zkušební nádobě, m_v (v mg): $m_v = C_{C,v} \times V_l$

([2]) Množství uhlíku ve volném prostoru pod víkem, m_h (v mg) při běžné inkubační teplotě (35 °C): $m_h = 0{,}468\ \Delta p \times V_h$

([3]) Biologický rozpad vypočtený z plynu ve volném prostoru pod víkem, D_h (v %): $D_h = (m_h \times 100) / m_v$

([4]) Množství uhlíku v kapalině, m_l *(v mg):* $m_l = C_{IC,net} \times V_l$

([5]) Celkové množství zplynovaného uhlíku, m_t *(v mg):* $m_t = m_h + m_l$

([6]) Celkový biologický rozklad, D_t (v %): $D_t = (m_t \times 100) / m_v$

▼M6

Laboratoř: ..... Referenční látka: ..... Zkouška č.: .....

Zkušební teplota: (°C) ..... Objem volného prostoru pod víkem (V_h) (v l): ..... Objem kapaliny (V_l) (v l): .....

Množství uhlíku v referenční látce $C_{c,v:}$ (mg/l)..... m_v [1] (v mg): .....

Den	p_1 (referenční) (v mbar)	p_2 (referenční) (v mbar)	p_3 (referenční) (v mbar)	p (referenční) střední hodnota (v mbar)	p_4 (kontrola inhibice) (v mbar)	p_5 (kontrola inhibice) (v mbar)	p_6 (kontrola inhibice) (v mbar)	p (kontrola inhibice) střední hodnota (v mbar)	p (referenční) ref. *minus* slepá zkouška (v mbar)	Δp (referenční) kumulovaný (v mbar)	m_h C pod víkem [2] (v mg)	D_h Biologický rozklad [3] (v %)
	$C_{IC,\ 1}$ referenční (v mg)	$C_{IC,\ 2}$ referenční (v mg)	$C_{IC,\ 3}$ referenční (v mg)	C_{IC} referenční, střední hodnota (v mg)	$C_{IC,\ 4}$ kontrola inhibice (v mg)	$C_{IC,\ 5}$ kontrola inhibice (v mg)	$C_{IC,\ 6}$ kontrola inhibice (v mg)	C_{IC} kontrola inhibice, střední hodnota (v mg)	$C_{IC,\ net}$ referenční *minus* kontrola inhibice (v mg)	m_l C v kapalině [4] (v mg)	m_t Celkový C [5] (v mg)	D_t Biologický rozklad [6] (v %)
IC (na konci)												
pH (na konci)												

([1]) Množství uhlíku ve zkušební nádobě, m_v (v mg): $m_v = C_{C,v} \times V_l$
([2]) Množství uhlíku ve volném prostoru pod víkem, m_h (v mg) při běžné inkubační teplotě (35 °C): $m_h = 0{,}468\ \Delta p \times V_h$
([3]) Biologický rozpad vypočtený z plynu ve volném prostoru pod víkem, D_h (v %): $D_h = (m_h \times 100) / m_v$
([4]) Množství uhlíku v kapalině, m_l (v mg): $m_l = C_{IC,net} \times V_l$
([5]) Celkové množství zplynovaného uhlíku, m_t (v mg): $m_t = m_h + m_l$
([6]) Celkový biologický rozklad, D_t (v %): $D_t = (m_t \times 100) / m_v$

▼M6

C.44. VYPLAVOVÁNÍ V PŮDNÍCH SLOUPCÍCH

ÚVOD

1. Tato zkušební metoda je rovnocenná Pokynu OECD pro zkoušení č. 312 (2004). Chemické látky vznikající v důsledku lidské činnosti se mohou dostat do půdy buď přímo úmyslnou aplikací (např. chemické látky používané v zemědělství), nebo nepřímými cestami (např. prostřednictvím odpadních vod do čistírenských kalů a z nich skrze mokré/suché depozice do půdy nebo vzduchu). Aby bylo možné posoudit rizika spojená s těmito chemickými látkami, je důležité odhadnout jejich potenciál pro transformaci v půdě a pro pohyb (vyplavování) do hlubších půdních vrstev a následně do podzemních vod.

2. Pro změření potenciálu vyplavování chemických látek v půdě za řízených laboratorních podmínek existuje několik metod, a to chromatografie na tenké vrstvě půdy, chromatografie na silné vrstvě půdy, kolonová chromatografie půd a měření adsorpce/desorpce (1)(2). U nedisociovaných chemických látek umožňuje předběžný odhad jejich adsorpce a potenciálu vyplavování rozdělovací koeficient n-oktanol/voda (P_{ow}) (3)(4)(5).

3. Postup popsaný v této zkušební metodě je založen na kolonové chromatografii půd v porušené půdě (viz definice v dodatku 1). Provádějí se dva druhy experimentů za účelem zjištění i) potenciálu vyplavování zkoušené chemické látky a ii) potenciálu vyplavování transformačních produktů (studie vyplavování tzv. vyzrálých reziduí) v půdách za řízených laboratorních podmínek ([1]). Tato zkušební metoda je založena na stávajících postupech (6)(7)(8)(9)(10)(11).

4. Na semináři OECD o výběru půd/sedimentů, který se konal v roce 1995 v italském Belgiratu (12), bylo dosaženo shody na počtu a druzích půd, které mají být v této zkušební metodě používány. Vzešla odtud rovněž doporučení ohledně odběru půdních vzorků, manipulace s nimi a jejich skladování pro experimenty s vyplavováním.

PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

5. Kolony vyrobené z vhodného inertního materiálu (např. skla, nerezové oceli, hliníku, teflonu, PVC apod.) se naplní půdou, která se poté nasytí a uvede do rovnováhy roztokem „umělého deště“ (viz definici v dodatku 1) a ten se nechá odtéct. Povrch každého půdního sloupce se exponuje zkoušené chemické látce a/nebo vyzrálým reziduím zkoušené chemické látky. Na půdní sloupce se poté aplikuje umělý déšť a odebere se výluh. Po ukončení vyplachovacího procesu se půda vyjme z kolon a rozdělí na vhodný počet segmentů v závislosti informacích, které mají být výsledkem studie. Každý půdní segment a každý výluh se poté analyzuje na zkoušenou chemickou látku a případně na transformační produkty nebo na jiné relevantní chemické látky.

POUŽITELNOST ZKUŠEBNÍ METODY

6. Tato zkušební metoda je použitelná na zkoušené chemické látky (radioizotopově neznačené nebo značené, např. ^{14}C), pro které je k dispozici analytická metoda s dostatečnou přesností a citlivostí. Neměla by se používat na chemické látky, které z půdy a z vody těkají, nezůstávají tedy v půdě a/nebo ve výluhu za experimentálních podmínek této zkušební metody.

INFORMACE O ZKOUŠENÉ LÁTCE

7. Pro měření chování látek z hlediska vyplavování v půdních sloupcích lze použít radioizotopově neznačené nebo značené zkoušené chemické látky. Pro studium vyplavování transformačních produktů (vyzrálých reziduí zkoušené

([1]) Studie vyplavování na kolonách s přípravky na ochranu plodin mohou poskytnout informace o pohybu zkoušené chemické látky a jejích transformačních produktů a mohou doplnit studie sorpce při dávkové metodě.

▼M6

chemické látky) a pro stanovení hmotnostní bilance je nezbytná radioizotopově značená látka. Doporučuje se radioizotopové značení ^{14}C, vhodné však může být použití i jiných izotopů jako ^{13}C, ^{15}N, ^{3}H či ^{32}P. Značení by se mělo pokud možno nacházet v nejstabilnější části molekuly. Čistota zkoušené chemické látky by měla být alespoň 95 %.

8. Většina chemických látek by měla být použita jako samostatné látky. V případě účinných látek v přípravcích na ochranu rostlin však lze pro studium vyplavování výchozí zkoušené látky použít výrobky ve směsi, avšak jejich zkoušení je nezbytné zejména tehdy, je-li pravděpodobné, že směs ovlivní rychlost uvolňování (např. látky ve formě granulí nebo látky s řízeným uvolňováním). Pokud jde o požadavky na uspořádání zkoušky specifické pro danou směs, může být užitečné je před provedením zkoušky konzultovat s regulačním orgánem. Ve studiích vyplavování vyzrálých reziduí by měla být použita čistá výchozí zkoušená látka.

9. Před prováděním zkoušek vyplavování v půdních sloupcích by měly být o zkoušené chemické látce známy pokud možno tyto informace:

   1) rozpustnost ve vodě (zkušební metoda A.6) (13);

   2) rozpustnost v organických rozpouštědlech;

   3) tlak par (zkušební metoda A.4) (13) a Henryho konstanta;

   4) rozdělovací koeficient n-oktanol/voda (zkušební metody A.8 a A.24) (13);

   5) adsorpční koeficient (K_d, K_f nebo K_{OU}) (zkušební metody C.18 a/nebo C.19) (13);

   6) hydrolýza (zkušební metoda C.7) (13);

   7) disociační konstanta (pK_a) (OECD TG 112) (25);

   8) aerobní a anaerobní transformace v půdě (zkušební metoda C.23) (13).

   Poznámka: Teplota, při níž byla tato měření prováděna, by měla být uvedena v příslušných závěrečných zprávách.

10. Množství zkoušené chemické látky aplikované na půdní sloupce by mělo být dostatečné, aby umožnilo zjištění alespoň 0,5 % aplikované dávky v každém jednotlivém segmentu. V případě účinných chemických látek v přípravcích na ochranu rostlin může aplikované množství zkoušené chemické látky odpovídat maximální doporučené dávce (při jedné aplikaci).

11. K dispozici musí být vhodná analytická metoda o známé správnosti, přesnosti a citlivosti pro stanovení obsahu zkoušené chemické látky a případně jejích transformačních produktů v půdě a ve výluhu. Měly by být také známy meze detekce zkoušené chemické látky a jejích významných transformačních produktů (obvykle alespoň všech transformačních produktů v množství $\geq$ 10 % aplikované dávky zjištěných ve studiích způsobu transformace, ale nejlépe všech příslušných transformačních produktů) (viz odstavec 17).

▼M6

REFERENČNÍ CHEMICKÉ LÁTKY

12. Pro hodnocení relativní mobility zkoušené chemické látky v půdě by měly být použity referenční chemické látky se známým chováním z hlediska vyplavování, např. atrazin nebo monuron, které lze považovat za látky s mírným vyplavováním z půdy (1)(8)(11). Pro potvrzení hydrodynamických vlastností půdního sloupce může být rovněž užitečná nesorbující a nerozložitelná polární referenční chemická látka (např. tritium, bromidy, fluorescein, eosin), jež umožní sledování pohybu vody v koloně.

13. Užitečné mohou být i standardní analytické chemikálie pro charakteristiku a/nebo identifikaci transformačních produktů zjištěných v segmentech půdy a ve výluzích pomocí chromatografických, spektroskopických nebo jiných příslušných metod.

DEFINICE A JEDNOTKY

14. Viz dodatek 1.

KRITÉRIA JAKOSTI

Výtěžnost

15. Výtěžnost experimentu s vyplavováním se získá součtem procent zkoušené chemické látky zjištěných v segmentech půdy a ve výluhu z kolony po vyplavování. Výtěžnost by se měla pohybovat v rozmezí 90 % až 110 % u značených chemických látek (11) a v rozmezí 70 % až 110 % u neznačených chemických látek (8).

Opakovatelnost a citlivost analytické metody

16. Opakovatelnost analytické metody pro kvantifikaci zkoušené chemické látky a transformačních produktů lze ověřit provedením analýzy duplikátních vzorků stejných extraktů ze segmentu půdy nebo z výluhu (viz odstavec 11).

17. Mez detekce (LOD) analytické metody pro zkoušenou chemickou látku a pro transformační produkty by měla být alespoň 0,01 mg na kg každého segmentu půdy nebo výluhu (pro zkoušenou chemickou látku) nebo 0,5 % aplikované dávky v každém jednotlivém segmentu, podle toho, která z hodnot je nižší. Rovněž by měla být specifikována mez stanovitelnosti (LOQ).

POPIS ZKUŠEBNÍ METODY

Zkušební zařízení

18. Pro zkoušku se použijí vyplavovací kolony (dělitelné nebo nedělitelné) z vhodného inertního materiálu (např. skla, nerezové oceli, hliníku, teflonu, PVC apod.) o vnitřním průměru nejméně 4 cm a minimální výšce 35 cm. Materiál kolon by měl být testován na možné interakce se zkoušenou chemickou látkou a/nebo jejími transformačními produkty. Příklady vhodných dělitelných a nedělitelných kolon jsou uvedeny v dodatku 2.

19. Pro plnění půdy do kolon se použije lžíce, plunžrový píst a vibrační zařízení.

20. Pro aplikaci umělého deště na půdní sloupce lze použít pístová nebo peristaltická čerpadla, sprchové hlavice, Mariottovy lahve nebo jednoduché přikapávací nálevky.

▼M6

Laboratorní vybavení a chemikálie

21. Pro zkoušku je zapotřebí standardní laboratorní vybavení, zejména:

1) analytické přístroje jako zařízení pro plynovou chromatografii (GLC), vysoce účinnou kapalinovou chromatografii (HPLC) a chromatografii na tenké vrstvě (TLC), včetně odpovídajících detekčních systémů pro analýzu značených a neznačených látek nebo pro inverzní izotopovou zřeďovací analýzu;

2) přístroje pro účely identifikace (např. pro hmotnostní spektrometrii (MS), plynovou chromatografii-hmotnostní spektrometrii (GC-MS), vysoce účinnou kapalinovou chromatografii-hmotnostní spektrometrii (HPLC-MS), nukleární magnetickou rezonanci (NMR) atd.);

3) kapalinový scintilační spektrometr pro radioizotopově značené zkoušené chemické látky;

4) oxidační zařízení pro spalování značeného materiálu;

5) extrakční aparatura (např. centrifugační zkumavky pro extrakci za studena a Soxhletův přístroj pro kontinuální extrakci s refluxem);

6) zařízení pro zkoncentrování roztoků a extraktů (např. rotační odparka).

22. Použijí se tyto chemické látky: organická rozpouštědla čistoty p. a., např. aceton, methanol atd.; kapalný scintilátor; 0,01 M roztok $CaCl_2$ v destilované nebo deionizované vodě (= umělý déšť).

Zkoušená chemická látka

23. Pro aplikaci zkoušené chemické látky na půdní sloupec by tato látka měla být rozpuštěná ve vodě (deionizované nebo destilované). Je-li zkoušená chemická látka ve vodě špatně rozpustná, lze ji aplikovat buď ve formě produktu (je-li to nezbytné, po suspendování nebo emulgaci ve vodě), nebo rozpuštěnou v jakémkoli organickém rozpouštědle. V případě použití organického rozpouštědla by jeho množství mělo být omezeno na minimum a mělo by být z povrchu sloupce půdy odpařeno ještě před zahájením vyplavování. Látky v pevné formě, např. granule, by měly být použity v pevné formě bez vody; aby se umožnilo lepší rozptýlení po povrchu půdního sloupce, lze výrobek ve směsi před použitím smísit s malým množstvím (např. 1 g) křemenného písku.

24. Množství zkoušené chemické látky aplikované na půdní sloupce by mělo být dostatečné, aby umožnilo zjištění alespoň 0,5 % aplikované dávky v každém jednotlivém segmentu. V případě účinných chemických látek v přípravcích na ochranu rostlin může jejich množství být založeno na maximální doporučené dávce (jednorázově aplikované dávce) a při vyplavování výchozí chemické látky a vyzrálých reziduí by se mělo odvíjet od velikosti povrchu použitého půdního sloupce ([1]).

Referenční chemická látka

25. Při experimentech s vyplavováním by měla být použita referenční chemická látka (viz odstavec 12). Měla by se aplikovat na povrch půdního sloupce podobným způsobem jako zkoušená chemická látka a v přiměřené dávce, která umožní její zjištění, a to buď jako vnitřní standard spolu se zkoušenou

([1]) Množství, které se má použít pro sloupce půdy válcovitého tvaru, lze vypočítat pomocí tohoto vzorce:

$$M[\mu g] = \frac{A[kg/ha] \cdot 10^9[\mu g/kg] \cdot d^2[cm^2] \cdot \pi}{10^8[cm^2/ha] \cdot 4}$$

kde:
M = množství aplikované na jeden sloupec [v µg]
A = aplikační dávka [v kg na ha^{-1}]
d = průměr půdního sloupce [v cm]
π = 3,14

▼M6

chemickou látkou v témž půdním sloupci, nebo samostatně ve zvláštním půdním sloupci. Upřednostňuje se zkoušet obě chemické látky v téže koloně, kromě případů, kdy jsou obě chemické látky podobně radioizotopově značeny.

Půdy

Výběr půd

26. Pro studie vyplavování s výchozí zkoušenou chemickou látkou by měly být použity tři až čtyři půdy s různým pH, různým obsahem organického uhlíku a různou půdní strukturou (12). Pokyny pro výběr půd pro experimenty s vyplavováním jsou uvedeny níže v tabulce 1. U disociovatelných zkoušených chemických látek by vybrané půdy měly zahrnovat široké rozmezí pH, aby bylo možné vyhodnotit mobilitu chemické látky v její disociované a nedisociované formě; alespoň tři půdy by měly mít pH, při kterém je zkoušená chemická látka ve své mobilní formě.

Tabulka 1

Návod pro výběr půd pro studie vyplavování

Půda č.	Hodnota pH	Organický uhlík (v %)	Obsah jílu (v %)	Struktura (*)
1	> 7,5	3,5–5,0	20–40	jílovitohlinitá
2	5,5–7,0	1,5–3,0	15–25	prachovitohlinitá
3	4,0–5,5	3,0–4,0	15–30	hlinitá
4	< 4,0–6,0 §	< 0,5–1,5 § ‡	< 10–15 §	hlinitopísčitá
5	< 4,5	> 10 #	< 10	hlinitopísčitá/písek

(*) Podle FAO a amerického systému (14).

§ Příslušné hodnoty parametrů by se měly přednostně nacházet v uvedeném rozmezí. Vyskytnou-li se však při hledání vhodného půdního materiálu obtíže, jsou přijatelné i hodnoty nacházející se pod uvedeným minimem.

‡ U půd s obsahem organického uhlíku nižším než 0,3 % může být porušena korelace mezi obsahem organických látek a adsorpcí. Doporučuje se proto používat půdy s minimálním obsahem organického uhlíku 0,3 %.

Půdy s velmi vysokým obsahem uhlíku (např. > 10 %) nemusejí být právně přijatelné např. pro účely registrace pesticidů.

27. Někdy mohou být nezbytné jiné druhy půd, aby byly zastoupeny podmínky chladnějších, mírných a tropických oblastí. Jsou-li upřednostněny jiné druhy půd, měly by být charakterizovány stejnými parametry a jejich vlastnosti by se měly nacházet v podobných rozmezích, jako jsou rozmezí uvedená v pokynech pro výběr půd pro studie vyplavování (viz tabulka 1 výše), a to i v případě, že těmto kritériím přesně neodpovídají.

28. Pro studie vyplavování vyzrálých reziduí by měla být použita jedna půda (12). Měla by mít obsah písku > 70 % a obsah organického uhlíku v rozmezí 0,5–1,5 % (viz půda č. 4 v tabulce 1). Je-li důležité získat údaje o transformačních produktech, může být nezbytné použít více druhů půd.

29. Všechny půdy by měly být charakterizovány alespoň strukturou (% písku, % prachu, % jílu podle klasifikačních systémů FAO a USDA (14)), pH, kationtovou výměnnou kapacitou, obsahem organického uhlíku, sypnou hustotou (u porušené půdy) a retenční vodní kapacitou. Měření mikrobiální biomasy se požaduje pouze u půdy, která je použita v době stárnutí/inkubace prováděné před experimentem s vyplavováním vyzrálých reziduí. Pro

▼M6

interpretaci výsledků této studie mohou být užitečné informace o dalších vlastnostech půdy (např. klasifikace půd, mineralogie jílu, specifická velikost povrchu). Pro stanovení půdních charakteristik lze použít metody, které jsou doporučeny v odkazech (15)(16)(17)(18)(19).

Sběr a uchovávání půd

30. Půdy by měly být odebrány z horní vrstvy (z horizontu A) do maximální hloubky 20 cm. Odstraní se zbytky vegetace, makrofauna a kameny. Půdy (kromě těch, které se použijí pro vyzrání zkoušené chemické látky) se vysuší na vzduchu při pokojové teplotě (přednostně v rozmezí 20–25 °C). Rozrušení půd se provede minimální silou, aby se původní struktura půdy změnila co nejméně. Půdy se prosejí na sítu o velikosti ok ≤ 2 mm. Doporučuje se opatrná homogenizace, neboť se tak zvýší reprodukovatelnost výsledků. Před použitím mohou být půdy uchovávány při teplotě okolí a sušeny na vzduchu (12). Pro dobu uchovávání neexistuje žádný doporučený limit, ale půdy uchovávané déle než tři roky by měly být před použitím znovu analyzovány na obsah organického uhlíku a pH.

31. K dispozici by měly být podrobné informace o historii lokalit, ze kterých jsou půdy odebírány. Těmito informacemi jsou přesná poloha (přesně definovaná souřadnicemi UTM (Universal Transversal Mercator-Projection/European Horizontal Datum) nebo zeměpisnými souřadnicemi), vegetační kryt, údaje o ošetřování přípravky na ochranu rostlin, použití organických a minerálních hnojiv a přídavcích biologického materiálu nebo informace o náhodné kontaminaci (12). Pokud byla půda v předchozích čtyřech letech ošetřena zkoušenou chemickou látkou nebo látkami s analogickou strukturou, neměla by se pro studie vyplavování používat.

Zkušební podmínky

32. V průběhu zkoušky by kolony pro vyplavování z půdy měly být uchovávány v temnu při teplotě okolí, pokud je tato teplota udržována v rozmezí ± 2 °C. Doporučené teploty jsou mezi 18 a 25 °C.

33. Umělý déšť (0,01 M roztok $CaCl_2$) by měl být aplikován na povrch půdních sloupců nepřetržitě tempem 200 mm za 48 hodin ([1]); toto množství odpovídá aplikaci 251 ml na kolonu o vnitřním průměru 4 cm. Je-li to pro účel zkoušky potřeba, mohou být doplňkově použita jiná tempa umělých dešťových srážek a v delším trvání.

Provedení zkoušky

Vyplavování s výchozí zkoušenou chemickou látkou

34. Nejméně dvě duplikátní vyplavovací kolony se naplní neupravenou půdou, vysušenou na vzduchu a prosátou (< 2 mm), až do výše přibližně 30 cm. Pro dosažení jednotného plnění se půda do kolon přidává lžící po malých dávkách a pěchuje se plunžrovým pístem za současné jemné vibrace kolony,

([1]) To simuluje mimořádně vysoké dešťové srážky. Průměrné roční dešťové srážky například ve střední Evropě činí řádově 800–1 000 mm.

▼M6

dokud horní část půdního sloupce neklesne. Jednotné plnění je nezbytné pro získání opakovatelných výsledků z vyplavovacích kolon. Podrobnější informace o způsobech plnění kolon lze najít v položkách seznamu literatury (20), (21) a (22). Pro ověření opakovatelnosti postupu plnění se stanoví celková hmotnost půdy naplněné do kolon ([1]); hmotnosti duplikátních kolon by měly být podobné.

35. Po naplnění se sloupce půdy předběžně navlhčí umělým deštěm (0,01 M roztok $CaCl_2$) ode dna až po povrch, aby voda vytěsnila vzduch v půdních pórech. Sloupce půdy se poté nechají ustálit do vyváženého stavu a přebytek vody se nechá odtéct působením gravitace. Přehled metod nasycení sloupců je uveden v položce seznamu literatury (23).

36. Na půdní sloupce se poté aplikuje zkoušená chemická látka nebo referenční chemická látka (viz též odstavce 23–25). Pro dosažení homogenního rozptýlení by se roztoky, suspenze nebo emulze zkoušené a/nebo referenční látky měly aplikovat na povrch půdních sloupců rovnoměrně. Je-li za účelem aplikace zkoušené chemické látky doporučeno ji vpravit do půdy, měla by se smísit s malým množstvím (např. 20 g) půdy a přidat na povrch půdního sloupce.

37. Povrch sloupců půdy se poté přikryje skleněným sintrem, skleněnými kuličkami, filtrem ze skleněných vláken nebo kolečkem filtračního papíru, aby se umělý déšť rozptýlil rovnoměrně na celou plochu a aby nedošlo k narušení půdního povrchu kapkami deště. Čím větší je průměr kolony, tím větší opatrnost je při aplikaci umělého deště na půdní sloupce nezbytná, aby se zajistilo stejnoměrné rozptýlení umělého deště na celý povrch půdy. Poté se umělý déšť do půdních sloupců přidává po kapkách pomocí pístového nebo peristaltického čerpadla nebo přikapávací nálevky. Výluhy by přednostně měly být shromažďovány ve frakcích a jejich objemy se zaznamenají ([2]).

38. Po vyplavování a poté, co se kolony nechají odkapat, se půdní sloupce rozdělí na vhodný počet segmentů v závislosti na informacích, které má studie poskytnout, segmenty se extrahují pomocí vhodných rozpouštědel nebo směsí a analyzují se na zkoušenou chemickou látku a případně na transformační produkty, na celkovou radioaktivitu a na referenční chemickou látku. Výluhy nebo frakce výluhů se analyzují – přímo nebo po extrakci – na tytéž látky/produkty. Byla-li použita radioizotopově značená chemická látka, měly by být identifikovány všechny frakce obsahující ≥ 10 % aplikované radioaktivity.

Vyplavování vyzrálých rezidui

39. Čerstvá půda (která nebyla vysušena na vzduchu) se exponuje radioizotopově značené zkoušené chemické látce v míře odpovídající velikosti povrchu půdních sloupců (viz odstavec 24) a inkubuje se za aerobních podmínek podle zkušební metody C.23 (13). Doba inkubace (stárnutí) by měla být

([1]) Příklady sypné hustoty u porušených půd:pro písčitou půdu 1,66 g na ml^{-1},
pro hlinitou půdu 1,17 g na ml^{-1},
pro hlinitopísčitou půdu 1,58 g na ml^{-1},
pro prachovitou půdu 1,11 na g ml^{-1}.

([2]) Při použití půdních sloupců o průměru 4 cm a délce 30 cm se typický objem výluhu pohybuje v rozmezí 230–260 ml, což odpovídá přibližně 92–104 % celkového objemu umělého deště (251 ml).

▼M6

dostatečně dlouhá, aby se získalo významné množství transformačních produktů; doporučuje se doba stárnutí v délce jednoho poločasu eliminace zkoušené chemické látky ([1]), ale neměla by být delší než 120 dnů. Před vyplavováním se vyzrálá půda analyzuje na zkoušenou chemickou látku a na její transformační produkty.

40. Vyplavovací kolony se naplní až do výše 28 cm stejnou půdou (ale vysušenou na vzduchu), jako byla půda použitá v experimentu s vyzrálými rezidui, jak bylo popsáno v odstavci 34, a stanoví se rovněž celková hmotnost naplněných půdních sloupců. Sloupce půdy se posléze předběžně navlhčí, jak bylo popsáno v odstavci 35.

41. Zkoušená chemická látka a její transformační produkty se poté aplikují na povrch půdních sloupců ve formě vyzrálých půdních reziduí (viz odstavec 39) jako segment půdy o výšce 2 cm. Celková výška sloupců půdy (neošetřená půda + vyzrálá půda) by pokud možno neměla přesahovat 30 cm (viz odstavec 34).

42. Provede se vyplavování, jak bylo popsáno v odstavci 37.

43. Po vyplavování se segmenty půdy a výluhy analyzují, jak je uvedeno v odstavci 38, na zkoušenou chemickou látku, na její transformační produkty a na neextrahovanou radioaktivitu. Pro stanovení, kolik vyzrálého rezidua zůstalo ve vrchní 2cm vrstvě po vyplavení, by se tento segment měl analyzovat zvlášť.

ÚDAJE A JEJICH PŘEDKLÁDÁNÍ

Zpracování výsledků

44. Pro každý segment a každou frakci výluhu se uvede množství zkoušené chemické látky, transformačních produktů, neextrahovatelných látek a, je-li zařazena, referenční chemické látky v procentech výchozí aplikované dávky. Pro každou kolonu by mělo být vytvořeno grafické znázornění s vynesením zjištěných procent jako funkce hloubky půdy.

45. Je-li ve studii vyplavování na kolonách použita referenční chemická látka, lze vyplavování určité chemické látky hodnotit jako relativní veličinu pomocí faktorů relativní mobility (RMF, viz definici v dodatku 3) (1)(11), což umožní porovnávat údaje o vyplavování různých chemických látek získané s různými druhy půdy. Příklady hodnot RMF pro různé přípravky na ochranu rostlin jsou uvedeny v dodatku 3.

46. Odhady K_{ou} (adsorpční koeficient normalizovaný na organický uhlík) a K_{om} (distribuční koeficient normalizovaný na obsah organických látek) lze z výsledků vyplavování na kolonách získat také pomocí průměrné vzdálenosti vyplavování nebo zjištěných korelací mezi RMF a K_{om}, případně K_{ou} (4) nebo za využití jednoduché chromatografické teorie (24). Posledně uvedená metoda by však měla být používána opatrně, zejména s ohledem na to, že postup vyplavování nezahrnuje pouze podmínky nasyceného toku, nýbrž spíše nenasycené systémy.

([1]) V půdě se může vytvořit více než jeden hlavní transformační produkt, který se může objevit v různých časových bodech v průběhu transformační studie. V takových případech může být nezbytné provést studie vyplavování s vyzrálými rezidui o různém stáří.

▼M6

Interpretace výsledků

47. Studie vyplavování na kolonách popsané v této metodě umožňují určit potenciál vyplavování nebo mobility zkoušené chemické látky v půdě (ve studii vyplavování výchozí chemické látky) a/nebo jejích transformačních produktů (ve studii vyplavování vyzrálých reziduí). Tyto zkoušky kvantitativně nepředpovídají chování z hlediska vyplavování v terénu, ale lze je použít pro porovnání „vyplavitelnosti“ jedné chemické látky s jinými chemickými látkami, jejichž chování při vyplavování může být známo (24). Stejně tak neměří ani to, jak velké procento aplikované chemické látky by mohlo dosáhnout pozemních vod (11). Výsledky studií vyplavování na kolonách však mohou pomoci při rozhodování, zda je třeba provést další částečně terénní a terénní zkoušky chemických látek, které v laboratorních zkouškách vykazují vysoký potenciál mobility.

Závěrečná zpráva

48. Závěrečná zpráva musí obsahovat:

Zkoušená chemická látka a referenční chemická látka (byla-li použita):

— obecný název, chemický název (podle nomenklatury IUPAC a CAS), číslo CAS, chemická struktura (s uvedením polohy značícího atomu při použití radionuklidů) a relevantní fyzikálně-chemické vlastnosti,

— čistota zkoušené chemické látky (obsah nečistot),

— popřípadě radiochemická čistota značené chemické látky a specifická aktivita.

Zkušební půdy:

— podrobné údaje o místě odběru,

— vlastnosti půdy, např. pH, obsah organického uhlíku a obsah jílu, struktura a sypná hustota (u porušené půdy),

— aktivita půdních mikroorganismů (pouze u půd použitých pro vyzrání zkoušené chemické látky),

— doba skladování půdy a podmínky skladování.

Zkušební podmínky:

— datum provedení studií,

— délka a průměr vyplavovacích kolon,

— celková hmotnost půdy v půdních sloupcích,

— množství aplikované zkoušené chemické látky a případně referenční chemické látky,

— množství, četnost a délka aplikace umělého deště,

— zkušební teplota,

— počet duplikátních vzorků (alespoň dva),

— metody analýzy zkoušené chemické látky, transformačních produktů a případně referenční chemické látky v různých segmentech půdy a ve výluzích,

— metody charakterizace a identifikace transformačních produktů v segmentech půdy a ve výluzích.

▼**M6**

Výsledky zkoušek:

— tabulky s výsledky vyjádřenými v koncentracích a v procentech aplikované dávky v segmentech půdy a ve výluzích,

— případně hmotnostní bilance,

— objemy výluhů,

— vzdálenosti vyplavování a případně faktory relativní mobility,

— grafické vynesení procentních podílů zjištěných v segmentech půdy oproti hloubce segmentu půdy,

— rozbor a interpretace výsledků.

LITERATURA

1) Guth, J. A., Burkhard, N. and Eberle, D. O. (1976) Experimental Models for Studying the Persistence of Pesticides in Soil. Proc. BCPC Symposium: Persistence of Insecticides and Herbicides.

2) Russel, M. H. (1995) Recommended approaches to assess pesticide mobility in soil. In progress in Pesticide Biochemistry and Toxicology, Vol. 9 (Environmental Behaviour of Agrochemicals – T. R. Roberts and P. C. Kearney, Eds.). J. Wiley & Sons.

3) Briggs, G. G. (1981) Theoretical and experimental relationships between soil adsorption, octanol-water partition coefficient, water solubilities, bioconcentration factors, and the parachor. J.Agric. Food Chem. 29, pp. 1050–1059.

4) Chiou, C. T., Porter, P. E. and Schmedding, D. W. (1983) Partition equilibria of non-ionic organic compounds between soil organic matter and water. Environ. Sci. Technol. 17, pp. 227–231.

5) Guth, J. A. (1983) Untersuchungen zum Verhalten von Pflanzenschutzmitteln im Boden. Bull. Bodenkundliche Gesellschaft Schweiz 7, pp. 26–33.

6) US-Environmental Protection Agency (1982) Pesticide Assessment Guidelines, Subdivision N. Chemistry: Environmental Fate.

7) Agriculture Canada (1987) Environmental Chemistry and Fate Guidelines for registration of pesticides in Canada.

8) Příloha 1 směrnice Komise 95/36/ES ze dne 14. července 1995, kterou se mění směrnice Rady 91/414/EHS o uvádění přípravků na ochranu rostlin na trh, Úř. věst. L 172, 22.7.1995, s. 8.

9) Dutch Commission for Registration of Pesticides (1991) Application for registration of a pesticide. Section G: Behaviour of the product and its metabolites in soil, water and air.

10) BBA (1986) Richtlinie für die amtliche Prüfung von Pflanzenschutzmitteln, Teil IV, 4-2. Versickerungsverhalten von Pflanzenschutzmitteln.

11) SETAC (1995) Procedures for Assessing the Environmental Fate and Ecotoxicity of Pesticides. Mark R. Lynch, Ed.

12) OECD (1995) Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments. Belgirate, Italy, 18–20 January 1995.

13) Následující kapitoly v této příloze:

Kapitola A.4, Tlak par

Kapitola A.6, Rozpustnost ve vodě

▼**M6**

Kapitola A.8, Rozdělovací koeficient, metoda třepací lahve

Kapitola A.24, Rozdělovací koeficient, metoda HPLC

Kapitola C.7, Abiotický rozklad – Hydrolýza jako funkce pH

Kapitola C.18, Stanovení adsorpce/desorpce dávkovou rovnovážnou metodou

Kapitola C.23, Aerobní a anaerobní transformace v půdě

14) Soil Texture Classification (US and FAO systems). Weed Science, 33, Suppl. 1 (1985) and Soil Sci. Soc. Amer. Proc. 26, 305 (1962).

15) Methods of Soil Analysis (1986). Part 1, Physical and Mineralogical Methods (A. Klute, Ed.). Agronomy Series No. 9, 2nd Edition.

16) Methods of Soil Analysis (1982) Part 2, Chemical and Microbiological Properties (A. L. Page, R. H. Miller and D. R. Kelney, Eds.). Agronomy Series No. 9, 2nd Edition.

17) ISO Standard Compendium Environment (1994) Soil Quality – General aspects; chemical and physical methods of analysis; biological methods of analysis. First Edition.

18) Mückenhausen, E. (1975) Die Bodenkunde und ihre geologischen, geomorphologischen, mineralogischen und petrologischen Grundlagen. DLG-Verlag, Frankfurt/Main.

19) Scheffer, F. and Schachtschabel, P. (1998) Lehrbuch der Bodenkunde. F. Enke Verlag, Stuttgart.

20) Weber, J. B. and Peeper, T. F. (1977) In: Research Methods in Weed Science, 2nd Edition (B. Truelove, Ed.). Soc. Weed Sci., Auburn, Alabama, pp. 73–78.

21) Weber, J. B., Swain, L. R., Strek, H. J. and Sartori, J. L. (1986) In: Research Methods in Weed Science, 3rd Edition (N.D. Camper, Ed.). Soc. Weed Sci., Champaign, IL, pp. 190–200.

22) Oliveira, et al. (1996) Packing of sands for the production of homogeneous porous media. Soil Sci. Soc. Amer. J. 60(1): pp. 49–53.

23) Shackelford, C. D. (1991) Laboratory diffusion testing for waste disposal. – A review. J. Contam. Hydrol. 7, pp. 177–217.

24) Hamaker, J. W. (1975) Interpretation of soil leaching experiments. In Environmental Dynamics of Pesticides (R. Haque, V. H. Freed, Eds.), pp. 115–133. Plenum Press, New York.

25) OECD (1981) Dissociation constants in water. OECD Guideline for Testing of Chemicals, No. 4112, OECD, Paris

▼M6

Dodatek 1

Definice a jednotky

Vyzrálé půdní reziduum: Zkoušená chemická látka a transformační produkty přítomné v půdě po aplikaci a po uplynutí dostatečně dlouhé doby umožňující, aby procesy dopravy, adsorpce, metabolismu a zániku změnily distribuci a chemickou povahu některých z aplikovaných chemických látek (1).

Umělý déšť: 0,01 M roztok $CaCl_2$ v destilované nebo deionizované vodě.

Průměrná vzdálenost vyplavování: Dno půdní sekce, kde se kumulovaná výtěžnost chemické látky = 50 % celkové výtěžnosti chemické látky (při normálním experimentu s vyplavováním) nebo dno půdní sekce, kde se kumulovaná výtěžnost chemické látky = 50 % celkové výtěžnosti zkušební chemické látky po odečtení tloušťky vrstvy vyzrálého rezidua vydělené 2 (ve studii vyplavování vyzrálých reziduí).

Chemická látka: látka nebo směs.

Výluh: Vodná fáze, která prosákla půdním profilem nebo půdním sloupcem (1).

Vyplavování: Proces, při kterém se chemická látka pohybuje půdním profilem nebo půdním sloupcem směrem dolů (1).

Vzdálenost vyplavování: Nejhlubší segment půdy, v němž bylo po ukončení postupu vyplavování zjištěno $\geq$ 0,5 % aplikované zkoušené chemické látky nebo vyzrálého rezidua (odpovídá hloubce proniknutí).

Mez detekce (LOD) a **mez stanovitelnosti (LOQ)**: Mez detekce (LOD) je koncentrace chemické látky, pod níž nelze odlišit identitu této chemické látky od analytických artefaktů. Mez stanovitelnosti (LOQ) je koncentrace chemické látky, pod níž nelze určit koncentraci s přijatelnou přesností.

Faktor relativní mobility (RMF): Vzdálenost vyplavování zkoušené chemické látky (v cm) vydělená vzdáleností vyplavování referenční chemické látky (v cm).

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

Transformační produkt: Veškeré chemické látky, které jsou výsledkem biotických nebo abiotických transformačních reakcí zkoušené chemické látky, včetně CO_2 a produktů, jež jsou vázány v reziduích.

Půda: Směs minerálních a organických chemických složek obývaná malými organismy (většinou mikroorganismy), jejíž organické složky obsahují sloučeniny s vysokým obsahem uhlíku a dusíku a vysokou molekulovou hmotností. Lze pracovat s dvěma formami půdy:

— s neporušenou půdou, jak v průběhu času vznikla, s charakteristickými vrstvami různých druhů půdy,

— s porušenou půdou, která se obvykle vyskytuje na obdělávaných polích v případě, že se vzorky odebírají vyrýváním a používají se v této zkušební metodě (2).

1) Holland, P. T. (1996) Glossary of Terms Relating to Pesticides. IUPAC Reports on Pesticide (36). Pure & Appl. Chem. 68, pp. 1167–1193.

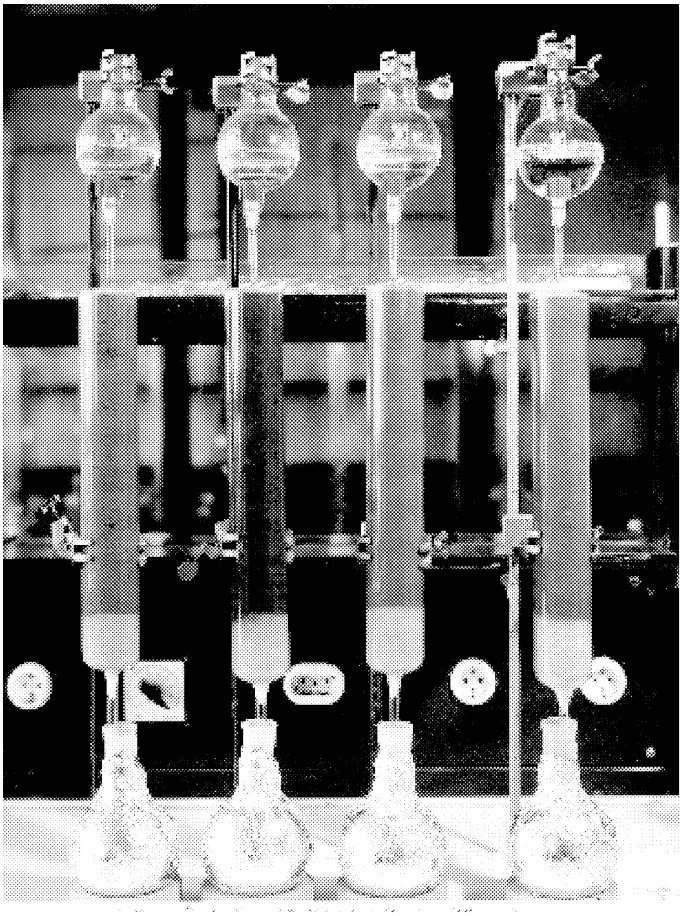
2) OECD Test Guideline 304 A: Inherent Biodegradability in Soil (adopted 12 May 1981).

▼M6

Dodatek 2

Obrázek 1

Příklad nedělitelných vyplavovacích kolon vyrobených ze skla s délkou 35 cm a vnitřním průměrem 5 cm (1)



← Přikapávací nálevky pro aplikaci umělého deště

← Kotouč ze skleněného sintru pro zamezení narušování půdy a pro rovnoměrné rozptýlení umělého deště

← Skleněná kolona naplněná zkušební půdou (při zkoušení produktů, které jsou na světle nestálé, by kolony měly být obaleny hliníkovou fólií)

← Vrstva křemenného písku

← Zátka ze skelné vaty pro udržení půdy v koloně

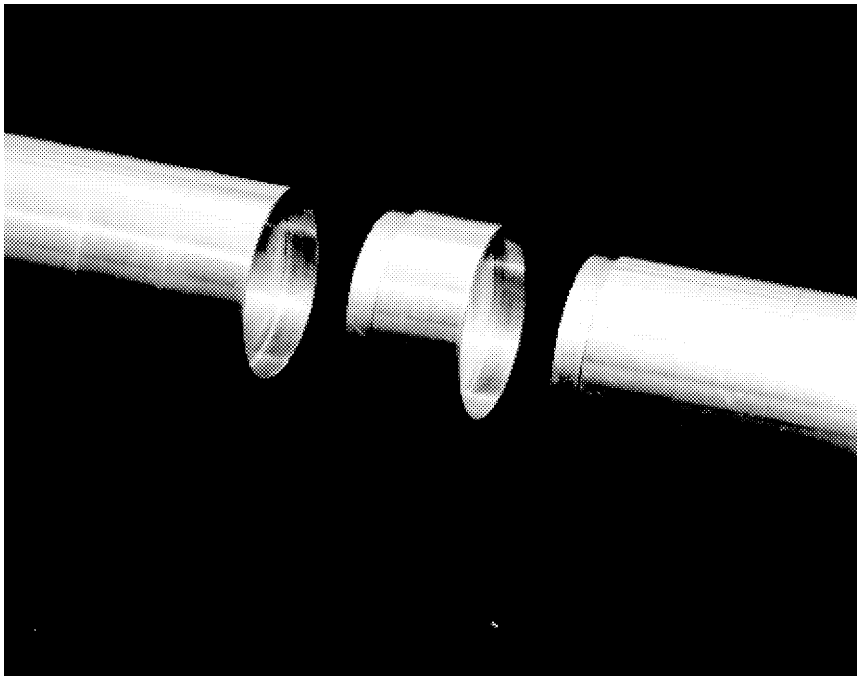
← Baňka s kulatým dnem pro sběr výluhu, obalená hliníkovou fólií pro vyloučení fotolýzy

1) Drescher, N. (1985) Moderner Acker- und Pflanzenbau aus Sicht der Pflanzenschutzmittelindustrie. In Unser Boden – 70 Jahre Agrarforschung der BASF AG, pp. 225–236. Verlag Wissenschaft und Politik, Köln.

▼**M6**

Obrázek 2

Příklad dělitelné kovové kolony s vnitřním průměrem 4 cm (1)



1) Burkhard, N., Eberle D. O. and Guth, J. A. (1975) Model systems for studying the environmental behaviour of pesticides. Environmental Quality and Safety, Suppl. Vol. III, pp. 203–213.

▼M6

Dodatek 3

Příklady faktorů relativní mobility (*) (RMF) pro různé přípravky na ochranu rostlin (1)(2) a odpovídající třídy mobility (+)

Rozmezí RMF	Chemická látka (RMF)	Třída mobility
≤ 0,15	parathion (< 0,15), fluorodifen (0.15)	Iimobilní
0,15–0,8	profenofos (0,18), propikonazol (0,23), diazinon (0,28), diuron (0,38), terbuthylazin (0,52), methidathion (0,56), prometryn (0,59), propazin (0,64), alachlor (0,66), metolachlor (0,68)	II málo mobilní
0,8–1,3	monuron (**) (1,00), atrazin (1,03), simazin (1,04), fluometuron (1,18)	III mírně mobilní
1,3–2,5	prometon (1,67), kyanazin (1,85), bromacil (1,91), karbutilát (1,98)	IV dosti mobilní
2,5–5,0	karbofuran (3,00), dioxakarb (4,33)	V mobilní
> 5,0	monokrotofos (> 5,0), dikrotofos (> 5,0)	VI velmi mobilní

(*) Faktor relativní mobility lze odvodit takto (3):

$$\text{RMF} = \frac{\text{vzdálenost vyplavování zkoušené chemické látky(vcm)}}{\text{vzdálenost vyplavování referenční chemické látky(vcm)}}$$

(**) Referenční chemická látka.

\+ Jiné systémy klasifikace mobility chemické látky v půdě jsou založeny na hodnotách R_f získaných pomocí chromatografie na tenké vrstvě půdy (4) a na hodnotách K_{ou} (5)(6).

1) Guth, J. A. (1985) Adsorption/desorption. In: Joint International Symposium „Physicochemical Properties and their Role in Environmental Hazard Assessment.“ Canterbury, UK, 1–3 July 1985.

2) Guth, J. A. and Hörmann, W. D. (1987) Problematik und Relevanz von Pflanzenschutzmittel-Spuren im Grund (Trink-) Wasser. Schr. Reihe Verein WaBoLu, 68, pp. 91–106.

3) Harris, C. I. (1967) Movement of herbicides in soil. Weeds 15, pp. 214–216.

4) Helling, C. S. (1971) Pesticide mobility in soils. Soil Sci. Soc. Am. Proc. 35, pp. 743–748.

5) McCall, P. J., Laskowski, D. A., Swann, R. L. and Dishburger, H. J. (1981) Measurements of sorption coefficients of organic chemicals and their use in environmental fate analysis. In Test Protocols for Environmental Fate and Movement of Toxicants. Proceedings of AOAC Symposium, AOAC, Washington D.C.

6) Hollis, J. M. (1991) Mapping the vulnerability of aquifers and surface waters to pesticide contamination at the national/regional scale. BCPC Monograph No. 47 Pesticides in Soil and Water, pp. 165–174.

▼M6

C.45. ODHAD EMISÍ ZE DŘEVA OŠETŘENÉHO KONZERVAČNÍMI PŘÍPRAVKY DO ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ: LABORATORNÍ METODA PRO VÝROBKY ZE DŘEVA, KTERÉ NEJSOU ZAKRYTÉ A JSOU V KONTAKTU SE SLADKOU NEBO SLANOU VODOU

ÚVOD

1. Tato zkušební metoda je rovnocenná Pokynu OECD pro zkoušení 313 (2007). Emise ze dřeva ošetřeného konzervačními přípravky do životního prostředí je třeba kvantifikovat, aby bylo možno posoudit rizika pro životní prostředí plynoucí z dřeva ošetřeného konzervačními přípravky. Tato zkušební metoda popisuje laboratorní metodu odhadu emisí ze dřeva ošetřeného konzervačními přípravky ve dvou situacích, kdy by emise mohly vstupovat do životního prostředí:

— Emise z ošetřeného dřeva v kontaktu se sladkou vodou. Emise z povrchu ošetřeného dřeva by mohly vstupovat do vody.

— Emise z ošetřeného dřeva v kontaktu s mořskou vodou. Emise z povrchu ošetřeného dřeva by mohly vstupovat do mořské vody.

2. Tato zkušební metoda je určena pro zkoušení emisí ze dřeva a dřevěných produktů, které nejsou zakryté a jsou v kontaktu se sladkou vodou nebo slanou vodou. Mezinárodně používané třídy použití kategorizují biologické riziko, kterému budou ošetřené produkty vystaveny. Třídy použití rovněž definují situaci, ve které se ošetřený produkt používá, a stanovují složky životního prostředí (vzduch, voda, půda), které jsou potenciálně ohroženy dřevem ošetřeným konzervačními přípravky.

3. Zkušební metoda je laboratorní postup získávání vzorků („emisátů“) z vody použité k ponoření ošetřeného dřeva při vzrůstajícím časovém odstupu od expozice. Odhadovaný tok emisí v $mg/m^2/dny$ je množství emisí v emisátu vztažené k ploše povrchu dřeva a délce jeho expozice. Tak je možné odhadnout tok (rychlost vyluhování) při vzrůstajících dobách expozice.

4. Množství emisí se dá použít k posouzení rizik pro životní prostření z ošetřeného dřeva.

VÝCHOZÍ ÚVAHY

5. Předpokládá se, že mechanismus vylouhování z povrchu dřeva sladkou vodou není svou povahou ani závažností shodný s vylouhováním z povrchu dřeva mořskou vodou. Proto pro přípravky nebo směsi na ochranu dřeva používané k ošetření dřeva používaného v prostředí mořské vody je třeba studie louhování dřeva v mořské vodě.

6. Dřevo, míníme tím ošetřené přípravkem na ochranu dřeva, by mělo reprezentovat komerčně používané dřevo. Mělo by být ošetřeno v souladu s instrukcemi výrobce konzervačního přípravku a ve shodě s příslušnými normami a požadavky. Je třeba uvést parametry kondicionování dřeva po ošetření před zahájením zkoušky.

7. Použité vzorky dřeva by měly reprezentovat použité výrobky (např. pokud jde o druh, hustotu a další typické znaky).

▼M6

8. Zkoušku je možné aplikovat na dřevo použitím penetračního procesu nebo povrchové aplikace nebo na ošetřené dřevo, u kterého se provádí dodatečné povinné ošetření povrchu (např. barva, která se aplikuje na základě požadavku na komerční použití).

9. Složení, množství, pH a skupenství vody jsou důležité při stanovení množství, obsahu a povahy emisí ze dřeva.

PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

10. Zkušební vzorky dřeva ošetřeného konzervačními přípravky se ponoří do vody. Voda (emisát) se shromáždí a chemicky analyzuje několikrát během expoziční doby dostatečné pro provedení statistických výpočtů. Rychlosti (toky) emisí v $mg/m^2/dny$ se vypočítají z analytických výsledků. Zaznamenají se doby vzorkování. Zkoušky s neošetřenými vzorky mohou být přerušeny, jestliže se při prvních třech měřeních nedetekuje žádné pozadí.

11. Zahrnutí vzorků neošetřeného dřeva do zkoušky umožňuje stanovit základní úroveň (úroveň pozadí) pro emisáty ze dřeva jiného než s použitým konzervačním přípravkem.

KRITÉRIA JAKOSTI

Přesnost

12. Přesnost zkušební metody při odhadu emisí závisí na tom, zda zkušební vzorky jsou reprezentanty komerčně ošetřeného dřeva, nakolik voda reprezentuje reálnou vodu a jak dalece režim expozice odpovídá přírodním podmínkám.

13. Přesnost, správnost a opakovatelnost analytické metody je třeba stanovit před provedením zkoušky.

Reprodukovatelnost

14. Tři vzorky vody se shromáždí a analyzují a střední hodnota se bere jako hodnota emisí. Reprodukovatelnost výsledků v rámci jedné laboratoře a mezi různými laboratořemi závisí na režimu ponoření a dřevu použitém na zkušební vzorky.

Přijatelný rozsah výsledků

15. Rozpětí výsledků této zkoušky, při kterém se horní a dolní hodnoty liší o méně než jeden řád, je přijatelné.

ZKUŠEBNÍ PODMÍNKY

Voda

16. Scénáře vylouhování sladkou vodou: deionizovaná voda (např. ASTM D 1193 Typ II) se doporučuje pro použití ve zkoušce vylouhování, když se má vyhodnotit dřevo vystavené sladké vodě. Teplota vody by měla být 20 °C ± 2 °C; změřené hodnoty pH a teploty vody musejí být uvedeny v závěrečné zprávě. Analýza vzorků použité vody odebraných před ponořením ošetřených vzorků umožňuje odhad analyzovaných chemických látek ve vodě. Toto je kontrola ke stanovení základní úrovně chemických látek, které se pak chemicky analyzují.

▼M6

17. Scénáře vylouhování mořskou vodou: syntetická mořská voda (např. ASTM D 1141 náhradní mořská voda, bez těžkých kovů) se doporučuje pro použití ve zkoušce louhování, když se má vyhodnotit dřevo vystavené mořské vodě. Teplota vody by měla být 20 °C ± 2 °C; změřené hodnoty pH a teploty vody musejí být uvedeny v závěrečné zprávě. Analýza vzorků použité vody odebraných před ponořením ošetřených vzorků umožňuje odhad analyzovaných chemických látek ve vodě. Toto je kontrola ke stanovení základních úrovní důležitých chemických látek.

Zkušební vzorky dřeva

18. Druh dřeva musí být typický druh dřeva používaný pro zkoušení účinnosti přípravků na ochranu dřeva. Doporučené druhy jsou *Pinus sylvestris L.* (borovice lesní), *Pinus resinosa Ait*. (borovice smolná) nebo *Pinus spp* (další druhy tvrdých borovic). Dodatečné zkoušky je možné provést použitím jiných druhů.

19. Je třeba použít dřevo s rovnými vlákny bez suků. Materiál se smolným vzhledem se musí vyřadit. Dřevo musí být typické komerčně dostupné dřevo. Je třeba zaznamenat jeho zdroj a hustotu a počet letokruhů na 10 mm.

20. Doporučuje se, aby zkušební vzorky dřeva tvořily sady po pěti s velikostí bloků 25 × 50 × 15 mm odpovídající normě EN 113 s podélnými plochami rovnoběžnými s vlákny dřeva, nicméně lze použít i jiné rozměry, např. 50 × 150 × 10 mm. Zkušební vzorek musí být úplně ponořen do vody. Zkušební vzorky musejí sestávat ze 100 % bělového dřeva. Každý vzorek má jedinečné označení, aby bylo možno ho identifikovat kdykoli v průběhu zkoušky.

21. Všechny zkušební vzorky musejí být ohoblované nebo hladce uříznuté a povrchy se nesmějí brousit skelným papírem.

22. Počet souborů zkušebních vzorků dřeva použitých pro analýzu je alespoň pět: tři sady vzorků se ošetří konzervačním přípravkem, jedna sada vzorků se neošetří a jedna sada vzorků se použije pro odhad obsahu vlhkosti zkušebních vzorků vysušených v sušárně před ošetřením. Připraví se dostatečný počet zkušebních vzorků, aby bylo možno ze zásoby zkušebních vzorků vybrat tři sady, které se neodchýlí o více než 5 % od střední hodnoty retence konzervačního přípravku.

23. Všechny zkušební vzorky mají konce zatmelené, aby se zabránilo penetraci konzervačního přípravku do konce vláken vzorků nebo vylouhování přípravku ze vzorků skrz konce vláken. Při aplikaci koncové tmelící látky je nezbytné rozlišovat mezi vzorky použitými pro povrchovou aplikaci a penetrační procesy. Koncová tmelící látka se musí aplikovat před ošetřením pouze v případě povrchové aplikace.

24. Koncová vlákna musejí být otevřená pro ošetření penetračními procesy. Proto vzorky musejí být na koncích zatmelené až na konci doby kondicionování. Emise se odhadují pouze pro podélnou plochu povrchu. Tmel je třeba kontrolovat a podle potřeby znovu aplikovat před zahájením louhování a nesmí se znovu aplikovat po zahájení louhování.

▼M6

Ponořovací nádoba

25. Nádoba je vyrobena z inertního materiálu a je dostatečně velká, aby se do ní vešlo 5 vzorků dřeva dle normy EN113 ponořených do 500 ml vody, což znamená poměr plochy povrchu k objemu vody 0,4 cm^2/ml.

Zkušební sestava vzorků

26. Zkušební vzorky jsou ve vodě podepřeny tak, aby všechny exponované povrchy vzorků byly v kontaktu s vodou.

POSTUP OŠETŘENÍ KONZERVAČNÍM PŘÍPRAVKEM

Příprava ošetřených zkušebních vzorků

27. Zkušební vzorek dřeva, který má být ošetřen konzervačním přípravkem v rámci zkoušky, je ošetřen metodou určenou pro daný konzervační přípravek, což může být buď penetrace, nebo povrchová aplikace ponořením, postřikem nebo štětcem.

Konzervační přípravky aplikované procesem penetrace

28. Připraví se roztok konzervačního přípravku, kterým se dosáhne určené absorpce nebo retence při aplikaci penetrací. Zkušební vzorek dřeva se zváží a změří se jeho rozměry. Penetrace se provede postupem určeným pro aplikaci konzervačního přípravku na dřevo podle třídy použití 4 nebo 5. Vzorek se opět zváží po ošetření a množství zadrženého konzervačního přípravku (kg/m^3) se vypočítá podle rovnice:

$$\frac{\text{Hmotnost po ošetření (kg)} - \text{Hmotnost před ošetřením (kg)}}{\text{Objem zkušebního vzorku } (m^3)} \times \frac{\text{Koncentrace roztoku (\% hm./hm.)}}{100}$$

29. Řezivo ošetřené v průmyslových úpravnách (např. vakuovou impregnací) lze rovněž při této zkoušce použít. Zaznamenají se použité postupy a retenční schopnost materiálu ošetřeného tímto způsobem se musí analyzovat a zaznamenat.

Konzervační přípravky aplikované procesy povrchové aplikace

30. Povrchová aplikace se provádí namáčením, postřikem nebo nanášením prostřednictvím štětce na zkušební vzorek dřeva. Proces a rychlost aplikace (např. litry/m^2) musí odpovídat předpisu pro povrchovou aplikaci konzervačního přípravku.

31. V tomto případě je také možné použít řezivo ošetřené v průmyslových úpravnách. Zaznamenají se použité postupy a retenční schopnost materiálu ošetřeného tímto způsobem se musí analyzovat a zaznamenat.

Kondicionování zkušebních vzorků po ošetření

32. Po ošetření se ošetřené zkušební vzorky musejí kondicionovat v souladu s doporučeními dodavatele zkouseného konzervačního přípravku podle požadavků na štítku konzervačního přípravku nebo v souladu s praxí komerčního ošetření anebo v souladu s normou EN 252.

▼M6

Příprava a výběr zkušebních vzorků

33. Po kondicionování po ošetření se pro skupinu zkušebních vzorků vypočítá střední hodnota retence přípravku a pro měření louhování se náhodně vyberou tři reprezentativní sady vzorků s retencí do 5 % střední hodnoty pro danou skupinu.

POSTUP MĚŘENÍ EMISÍ KONZERVAČNÍCH PŘÍPRAVKŮ

Metoda ponoření

34. Zkušební vzorky se zváží, následně zcela ponoří do vody a zaznamená se datum a čas. Nádoba se zakryje, aby se snížilo odpařování.

35. Voda se vymění v následujících intervalech: 6 hodin, 1 den, 2 dny, 4 dny, 8 dní, 15 dní, 22 dní, 29 dní (poznámka: toto jsou celkové časy, ne časové intervaly). Zaznamenají se čas a datum výměny vody a hmotnost vody získané zpět z nádoby.

36. Po každé výměně vody se vzorek vody, ve kterém byl soubor zkušebních vzorků ponořen, uchová pro následnou chemickou analýzu.

37. Postup vzorkování umožňuje výpočet profilu množství emisí jako funkce času. Vzorky se musejí skladovat za podmínek, které uchovají analyt, např. v chladničce v temnu pro snížení mikrobiálního růstu ve vzorku před analýzou.

MĚŘENÍ EMISÍ

Ošetřené vzorky

38. Shromážděná voda se chemicky analyzuje na obsah účinné látky a/nebo odpovídajících produktů rozkladu/transformace, je-li to náležité.

Neošetřené vzorky

39. Shromáždění vody (emisátu) v tomto systému a následná analýza chemických látek, které se vylouhovaly ze vzorků neošetřeného dřeva, umožňují odhadnout možnou rychlost emisí konzervačního přípravku z neošetřeného dřeva. Shromáždění a analýza emisátu po stále delší době expozice umožňují odhadnout rychlost změny rychlosti emisí s časem. Tato analýza představuje kontrolní postup ke stanovení základní úrovně zkoušené chemické látky v neošetřeném dřevu pro potvrzení, že dřevo použité jako zdroj vzorků nebylo dříve ošetřeno konzervačním přípravkem.

ÚDAJE A JEJICH PŘEDKLÁDÁNÍ

Chemická analýza

40. Shromážděná voda se chemicky analyzuje a výsledek analýzy vody se vyjádří ve vhodných jednotkách, např. µg/l.

Předkládání údajů

41. Všechny výsledky se zaznamenají. V dodatku je uveden příklad doporučeného formuláře pro jeden soubor ošetřených zkušebních vzorků a souhrnná tabulka pro střední hodnoty emisí pro každý interval vzorkování.

42. Denní tok emisí v mg/m^2/den se vypočítá tak, že se střední hodnota tří měření ze tří opakování vydělí počtem dní ponoření.

▼M6

Závěrečná zpráva

43. V závěrečné zprávě musejí být uvedeny alespoň následující informace:

— název dodavatele zkoušeného konzervačního přípravku,

— specifický a jednoznačný název nebo kód zkoušeného konzervačního přípravku,

— obchodní nebo obecný název účinné složky (složek) s generickým popisem formulačních přísad (např. pomocné rozpouštědlo, pryskyřice) a složení v % hmot. složek,

— odpovídající retence nebo dávkování (v kg/m^3 nebo l/m^2) určené pro dřevo používané v kontaktu s vodou,

— druh použitého dřeva s jeho hustotou a růstovou rychlostí v letokruzích na 10 mm,

— dávkování nebo retence zkoušeného konzervačního přípravku a vzorec použitý k výpočtu retence vyjádřené v l/m^2nebo kg/m^3,

— metoda aplikace konzervačního přípravku se specifikací harmonogramu ošetření použitého pro penetrační proces a metoda aplikace, jde-li o povrchové ošetření,

— datum aplikace konzervačního přípravku a odhadnutý obsah vlhkosti ve zkušebních vzorcích vyjádřený v procentech,

— použité postupy kondicionování se specifikací typu, podmínek a trvání,

— přesný popis použitého koncového tmelu a počet aplikací,

— přesný popis jakéhokoli následného ošetření dřeva, např. specifikace dodavatele, typu, typické znaky a dávkování barvy,

— čas a datum každého ponoření, množství vody použité pro ponoření zkušebních vzorků při každém úkonu a množství vody absorbované dřevem během ponoření,

— jakákoli odchylka od popsané metody a jakékoli faktory, které mohly ovlivnit výsledky.

LITERATURA

1) Evropská norma, EN 84 – 1997. Wood preservatives. Accelerated ageing of treated wood prior to biological testing. Leaching procedure.

2) Evropská norma, EN 113/A1 – 2004. Wood preservatives. Test method for determining the protective effectiveness against wood destroying basidiomycetes. Determination of the toxic values.

3) Evropská norma, EN 252 – 1989. Field test method for testing the relative protective effectiveness of a wood preservative in ground contact.

4) Evropská norma, EN 335 – Part 1: 2006. Durability of wood and wood-based products – Definition of use classes – Part1: General.

5) American Society for Testing and Materials Standards, ASTM D 1141 – 1998. Standard Practice for the Preparation of Substitute Ocean Water, Without Heavy Metals. *Annual Book of ASTM Standards*, Volume 11.02.

6) American Society for Testing and Materials Standards, ASTM D 1193-77 Type II – 1983. Specifications for Reagent Water. *Annual Book of ASTM Standards*, Volume 11.01.

▼M6

Dodatek 1

Záznamový formulář pro zkušební metodu

Odhad emisí ze dřeva ošetřeného konzervačním přípravkem do životního prostředí: laboratorní metoda pro dřevěné produkty, které jsou v kontaktu se sladkou nebo slanou vodou

Zkušební budova	

Konzervační přípravky pro dřevo

Dodavatel konzervačního přípravku	
Specifický a jednoznačný název nebo kód konzervačního přípravku	
Obchodní nebo obecný název konzervačního přípravku	
Formulační přísady	
Odpovídající retence dřeva použité v kontaktu s vodou	

Aplikace

Metoda aplikace	
Datum aplikace	
Vzorec použitý pro výpočet retence:	
Postup kondicionování	
Trvání kondicionování	
Koncový tmel / počet aplikací	
Další ošetření	Případně dále:

Zkušební vzorky

Druh dřeva	
Hustota dřeva	(minimální … střední … maximální)
Růstová rychlost (letokruhy na 10 mm)	(minimální … střední … maximální)
Obsah vlhkosti	

▼M6

Zkušební sestavy (*)	**Retence (např. kg/m^3)**
Ošetřeno „x“	Střední hodnota a směrodatná odchylka nebo rozpětí pro 5 vzorků
Ošetřeno „y“	Střední hodnota a směrodatná odchylka nebo rozpětí pro 5 vzorků
Ošetřeno „z“	Střední hodnota a směrodatná odchylka nebo rozpětí pro 5 vzorků
Neošetřeno	
Odchylky parametrů zkušební metody	např. kvalita vody, rozměr zkušebních vzorků atd.

(*) x, y, z představují tři opakované vzorky

▼M6

Čas	Výměna vody	Hmotnost vzorku		Absorpce vody		Vzorek vody				
		Ošetřeno (střední hodnota)	Neošetřeno	Ošetřeno (střední hodnota)	Neošetřeno		Zkouška vody	x	y	z
	Datum	g	g	g	g	č.	pH	pH	pH	pH
začátek:										
6 h						1				
24 h						2				
2 d						3				
4 d						4				
8 d						5				
15 d						6				
22 d						7				
29 d						8				

▼M6

Připravte samostatné tabulky pro každou účinnou složku

Čas	Výměna vody	Výsledky analýzy															
		Neošetřené vzorky			Ošetřené vzorky												
					Koncentrace ú.s. ve vodě				Emitované množství				Rychlost emisí			
		Koncentrace ú.s. ve vodě mg/l	Emitované množství mg/m^2	Rychlost emisí $mg/m^2/d$	x	y	z	Průměr	x	y	z	Průměr	x	y	z	Průměr
	Datum				mg/l	mg/l	mg/l	mg/l	mg/m^2	mg/m^2	mg/m^2	mg/m^2	$mg/m^2/d$	$mg/m^2/d$	$mg/m^2/d$	$mg/m^2/d$
6 h																
24 h																
2 d																
4 d																
8 d																
15 d																
22 d																
29 d																

Poznámka: Jelikož výsledky z neošetřených vzorků mohou být použity ke korekci rychlostí emisí z ošetřených vzorků, výsledky pro neošetřené vzorky je třeba uvést první a všechny hodnoty pro ošetřené vzorky pak budou „korigovanými hodnotami“. Také je možné provést korekci počáteční analýzy vody.

02008R0440 — CS — 16.10.2019 — 008.001 — 2400

▼**M6**

Dodatek 2

Definice

Chemická látka: látka nebo směs.

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

▼M6

C.46. BIOAKUMULACE V BENTICKÝCH MÁLOŠTĚTINATCÍCH PŘEBÝVAJÍCÍCH V SEDIMENTECH

ÚVOD

1. Tato zkušební metoda je rovnocenná Pokynu OECD pro zkoušení 315 (2008). Endobentičtí živočichové živící se sedimenty mohou být vystaveni látkám vázaným na sediment (1). Mezi těmito konzumenty sedimentů na dně vodních systémů hrají důležitou úlohu vodní máloštětinatci. Žijí v sedimentu a často představují nejpočetnější druh, zejména v přirozeném prostředí s životními podmínkami nepříznivými pro jiné živočichy. Bioturbací sedimentu a tím, že slouží jako kořist, mohou mít tito živočichové silný vliv na biodostupnost těchto látek pro jiné organismy, např. ryby živící se bentickými živočichy. Na rozdíl od epibentických organismů se endobentičtí vodní máloštětinatci zahrabávají do sedimentu a pojídají sedimentové částice pod povrchem sedimentu. Proto jsou tyto organismy vystaveny působení látek prostřednictvím řady absorpčních cest, včetně přímého kontaktu, pozření kontaminovaných částic sedimentu, kapilární vody a vody nad sedimentem. Některé druhy terestrických máloštětinatců, které jsou v současné době využívány pro ekotoxikologické zkoušky, jsou popsány v dodatku 6.

2. Mezi parametry, které charakterizují bioakumulaci zkoušené chemické látky, patří bioakumulační faktor (BAF), rychlostní konstanta příjmu (k_s), rychlostní konstanta vylučování (k_e). Podrobné definice těchto parametrů jsou uvedeny v dodatku 1.

3. Pro obecné posouzení bioakumulačního potenciálu látek a pro zkoumání bioakumulace látek, které mají tendenci se rozdělovat do sedimentů nebo na ně, je zapotřebí zkušební metoda specifická pro určité prostředí (1)(2)(3)(4).

4. Tato zkušební metoda je určena k posouzení bioakumulace látek vázaných na sediment u endobentických máloštětinatců. Zkoušená chemická látka se přidá do sedimentu. Obohacený sediment je modelem kontaminovaného sedimentu.

5. Tato metoda je založena na stávajících zkušebních metodách toxicity sedimentu a bioakumulace (1)(4)(5)(6)(7)(8)(9). Dalšími užitečnými dokumenty jsou diskuse a výsledky mezinárodních seminářů (11) a výsledky mezinárodního okružního testu (12).

6. Tato zkouška se aplikuje na stabilní, neutrální organické látky, které mají tendenci se vázat na sedimenty. Touto metodou se rovněž může měřit bioakumulace na sediment vázaných, stabilních organo-kovových sloučenin (12). Bez modifikace zkušebního postupu s přihlédnutím k objemům substrátu a vody a velikosti možných vzorků tkání se tato metoda nedá se použít na kovy a jiné stopové prvky (11).

PŘEDPOKLADY A INFORMACE O ZKOUŠENÉ LÁTCE

7.

Pokud jde o bioakumulační procesy, existuje pouze několik dobře zavedených, v současnosti dostupných kvantitativních vztahů struktura-aktivita (QSAR) (14). Nejpoužívanějším vztahem je korelace mezi bioakumulací a biokoncentrací stabilních organických látek a jejich lipofilností (vyjádřená jako logaritmus rozdělovacího koeficientu oktanol-voda (log K_{ow}); viz definice v dodatku 1), který byl vyvinut pro popis rozdělování chemické látky

▼M6

mezi vodu a ryby. Korelace pro prostředí sedimentu byla rovněž stanovena za použití tohoto vztahu (15)(16)(17)(18). Korelace log K_{ow-log} BCF jako hlavní QSAR může být prospěšná pro první předběžný odhad bioakumulačního potenciálu látek vázaných na sediment. Avšak BAF může být ovlivněn obsahem lipidů ve zkušebním organismu a obsahem organického uhlíku v sedimentu. Proto je rovněž možné použít rozdělovací koeficient organický uhlík-voda (K_{ou}) jako hlavní určující faktor bioakumulace organických látek vázaných na sediment.

8. Tato zkouška se aplikuje na:

— stabilní organické látky s hodnotami log K_{ow} mezi 3,0 a 6,0 (5)(19) a superlipofilní látky, které vykazují log K_{ow} vyšší než 6,0 (5),

— látky patřící do třídy organických látek známých pro jejich bioakumulační potenciál v živých organismech, např. povrchově aktivní látky nebo vysoce adsorbující látky (např. vysoký K_{ou}).

9. Informace o zkoušené chemické látce, jako jsou bezpečnostní opatření, náležité podmínky skladování a stabilita nebo analytické metody, musejí být zajištěny před zahájením studie. Pokyny pro zkoušení látek s fyzikálně-chemickými vlastnostmi, které činí jejich zkoušení obtížné, jsou uvedeny v (20) a (21). Před provedením zkoušky bioakumulace s vodními máloštětinatci je třeba získat o zkoušené látce následující informace:

— obecný název, chemický název (přednostně název IUPAC), strukturní vzorec, číslo CAS, čistota,

— rozpustnost ve vodě [zkušební metoda A.6 (22)],

— rozdělovací koeficient oktanol-voda K_{ow} [zkušební metody A.8, A.24 (22)],

— rozdělovací koeficient sediment-voda vyjádřený jako K_d nebo K_{ou} [zkušební metoda C.19 (22)],

— hydrolýza [zkušební metoda C.7 (22)],

— fototransformace ve vodě (23),

— tlak par [zkušební metoda A.4 (22)],

— přímá biologická rozložitelnost [zkušební metody C.4 a C.29 (22)],

— povrchové napětí [zkušební metoda A.5 (22)],

— kritická koncentrace micel (24).

Kromě toho by byly relevantní následující informace – pokud budou dostupné:

— biologický rozklad ve vodním prostředí [zkušební metody C.24 a C.25 (22)],

— Henryho konstanta

10. Radioizotopově značené zkoušené látky mohou usnadnit analýzu vody, sedimentu a biologických vzorků a mohou být použity ke stanovení, zda by se měla provést identifikace a kvantifikace produktů rozkladu. Zde popsaná metoda byla validována v mezinárodním okružním testu (12) pro látky značené pomocí ^{14}C. Jestliže se měří celková zbytková radioaktivita, je bioakumulační faktor (BAF) založen na mateřské látce, včetně jakýkoli zadržených produktů rozkladu. Je rovněž možné kombinovat metabolickou studii se studií bioakumulace analýzou a kvantifikací procentních podílů

▼M6

mateřské látky a jejích produktů rozkladu ve vzorcích odebraných na konci fáze příjmu nebo při maximální úrovni bioakumulace. V každém případě se doporučuje, aby výpočet BAF byl založen na koncentraci mateřské látky v organismech, a ne pouze na celkové zbytkové radioaktivitě.

11. Kromě vlastností zkoušené chemické látky je další požadovanou informací toxicita pro druhy máloštětinatců používané ve zkoušce, např. medián letální koncentrace (LC_{50}) za dobu nezbytnou pro fázi příjmu, aby se zajistilo, že vybrané expoziční koncentrace budou daleko nižší než toxické úrovně. Pokud je to možné, měla by být dána přednost hodnotám toxicity odvozeným z dlouhodobých studií o subletálních koncových bodech (51)(52). Jestliže takové údaje nejsou dostupné, mohou poskytnout užitečné informace zkouška akutní toxicity za podmínek shodných s podmínkami bioakumulační zkoušky nebo údaje o toxicitě dalších náhradních druhů.

12. K dispozici musí být vhodná analytická metoda o známé správnosti, přesnosti a citlivosti pro kvantitativní stanovení chemické látky ve zkušebních roztocích, v půdě a v biologickém materiálu a dále podrobnosti o přípravě a uchovávání vzorků a bezpečnostní listy. Musí být rovněž známy analytické detekční meze zkoušené chemické látky ve vodě, sedimentu a tkáni máloštětinatců. Je-li použita radioizotopově značená zkoušená látka, je třeba rovněž znát specifickou radioaktivitu (tj. $Bq.mol^{-1}$), polohu radioizotopově značeného atomu a procentní podíl radioaktivity spojené s nečistotami. Specifická radioaktivita zkoušené chemické látky by měla být co největší, aby bylo možno zaznamenat co nejmenší koncentrace zkoušené látky (11).

13. Informace o typických znacích sedimentu, který má být použit (např. původ sedimentu nebo jeho složek, pH a koncentrace amoniaku v kapilární vodě (polní sedimenty), obsah organického uhlíku (TOC), rozložení velikosti částic (procentní podíl písku, naplavenin a jílu) a procentní podíl sušiny) by rovněž měly být dostupné (6).

PODSTATA ZKOUŠKY

14. Zkouška sestává ze dvou fází – fáze příjmu (expozice) a fáze vylučování (po expozici). Během fáze příjmu jsou organismy vystaveny sedimentu s přidanou zkoušenou látkou, který je překryt rekonstituovanou vodou a příslušně ekvilibrován (11). Skupina kontrolních organismů je držena za shodných podmínek, ale bez zkoušené látky.

15. Pro fázi vylučování se organismy přemístí do systému sediment-voda neobsahujícího zkoušenou chemickou látku. Fáze vylučování je nezbytná pro získání informací o rychlosti, jakou je zkoušená látka vylučována zkušebním organismem (19)(25). Fáze vylučování je požadována vždy, pokud příjem zkoušené látky během fáze expozice nebyl nevýznamný (např. pokud není žádný statistický rozdíl mezi koncentrací zkoušené látky ve zkušebních a kontrolních organismech). Jestliže nebylo dosaženo rovnovážného stavu během fáze příjmu, kinetiku – BAF_k, rychlostní konstanta(y) příjmu a vylučování – lze určit prostřednictvím výsledků fáze vylučování. Koncentrace zkoušené chemické látky v organismech a na nich je sledována v průběhu obou fází zkoušky.

16. Během fáze příjmu se provádí měření, až se dosáhne BAF plató nebo rovnovážného stavu. Standardně by fáze příjmu měla trvat 28 dní. Praktická zkušenost ukázala, že dvanácti- až čtrnáctidenní fáze příjmu je pro dosažení rovnovážného stavu u řady stabilních neutrálních organických látek dostatečná (6)(8)(9).

▼M6

17. Avšak jestliže se rovnovážného stavu nedosáhne během 28 dní, zahájí se fáze vylučování přenesením exponovaných máloštětinatců do nádob obsahujících stejné médium bez zkoušené chemické látky. Fáze vylučování se ukončí, buď když se dosáhne 10 % úrovně koncentrace měřené počtem jedinců v 28. dni fáze příjmu, nebo po maximální době trvání v délce 10 dnů. Zbytková úroveň vyjádřená počtem jedinců na konci fáze vylučování se uvádí jako dodatečný koncový bod, např. jako neeliminované zbytky (NER). Bioakumulační faktor (BAF_{ss}) se vypočítá přednostně jednak jako poměr koncentrace vyjádřené počtem jedinců (C_a) ke koncentraci v sedimentu (C_s) při zřetelném rovnovážném stavu, jednak jako kinetický bioakumulační faktor BAF_K jako poměr rychlostní konstanty příjmu ze sedimentu (k_s) a vylučovací rychlostní konstanty (k_e) za předpokladu kinetiky prvního řádu. Jestliže se rovnovážného stavu nedosáhne během 28 dní, vypočítá se BAF_K z rychlostní konstanty příjmu a rychlostní konstanty vylučování. Výpočet viz dodatek 2. Jestliže se kinetika prvního řádu nedá použít, je třeba aplikovat složitější modely (dodatek 2 a odkaz (25).

18. Jestliže se rovnovážného stavu nedosáhne během 28 dní, je možné fázi příjmu volitelně prodloužit tím, že se skupina exponovaných červů – je-li dostupná – podrobí dalším měřením, až je dosaženo rovnovážného stavu; nicméně souběžně se musí zahájit fáze vylučování v den 28 fáze příjmu.

19. Rychlostní konstanta příjmu, rychlostní konstanta (nebo konstanty, jsou-li použity složitější modely) vylučování, kinetický bioakumulační faktor (BAF_K), a je-li to možné, intervaly spolehlivosti každého z těchto parametrů se vypočítají z modelových rovnic za použití počítače (modely viz dodatek 2). Míru shody jakéhokoli modelu lze určit např. z korelačního koeficientu nebo z koeficientu určení (koeficienty, jejichž hodnota se blíží jedné, indikují dobrou kvalitu proložení).

20. Pro snížení variability výsledků zkoušky pro organické látky s vysokou lipofilitou je třeba bioakumulační faktory vyjádřit dodatečně ve vztahu k obsahu lipidů ve zkušebních organismech a k obsahu organického uhlíku (TOC) v sedimentu (akumulační faktor bioty sedimentu nebo BSAF v kg sedimentu TOC kg_{-1} obsahu lipidů v organismech). Tento přístup je založen na zkušenostech a teoretických korelacích pro vodní prostředí, kde – pro některé třídy chemických látek – existuje jasný vztah mezi schopností látky bioakumulovat a jejím lipofilním charakterem, což bylo dobře stanoveno pro ryby jako modelové organismy (14)(25)(27). Existuje rovněž vztah mezi obsahem lipidů ve zkušebních rybách a pozorovanou bioakumulací takových látek. U bentických organismů byly nalezeny podobné korelace (15)(16)(17)(18). Pokud je k dispozici dostatečné množství tkání organismů, lze stanovit obsah lipidů u pokusných živočichů na stejném biologickém materiálu, který byl použit ke stanovení koncentrace zkoušené chemické látky. Je však praktické použít aklimatizované kontrolní živočichy alespoň na začátku nebo – přednostně – na konci fáze příjmu pro měření obsahu lipidů, který se pak může použít k normalizaci BAF hodnot.

VALIDITA ZKOUŠKY

21. Má-li být zkouška platná, musí být splněny tyto podmínky:

— kumulativní mortalita organismů (kontrolních a exponovaných) do konce zkoušky by neměla překročit 20 % počáteční hodnoty,

— kromě toho je třeba ukázat, že se organismy zavrtávají do sedimentu, aby se počítalo s maximální expozicí. Podrobnosti viz odstavec 28.

▼M6

POPIS METODY

Zkušební druh

22. Pro zkoušky se dá použít několik druhů vodních máloštětinatců. Nejběžněji používané druhy jsou uvedeny v dodatku 6.

23. Zkoušky toxicity (96 h, pouze ve vodě) je třeba provádět v pravidelných intervalech (např. každý měsíc) s referenční toxickou látkou, jako např. chloridem draselným (KCl) nebo síranem měďnatým ($CuSO_4$) (1), aby byly ukázány zdravotní podmínky zkušebních živočichů (1)(6). Jestliže se zkoušky toxicity s referenční látkou neprovádějí v pravidelných intervalech, musí se populace organismů použitých ve zkoušce bioakumulace sedimentu kontrolovat za použití referenční toxické látky. Měření obsahu lipidů by mohlo rovněž poskytnout užitečné informace o stavu živočichů.

Kultivace zkušebních organismů

24. Aby byl k dispozici dostatečný počet jedinců pro provedení zkoušek bioakumulace, je možné živočichy uchovávat v permanentní jednodruhové laboratorní kultuře. Metody s laboratorními kulturami pro vybrané zkušební druhy jsou shrnuty v dodatku 6. Podrobnosti jsou uvedeny v odkazech (8)(9)(10)(18)(28)(29)(30)(31)(32).

Přístroje a pomůcky

25. U všech částí zařízení je nutno nepoužívat takové materiály, které se mohou rozpouštět, adsorbovat zkoušenou chemickou látku nebo se z nich mohou vylouhovat jiné chemické látky a mají nepříznivý účinek na pokusné živočichy. Doporučuje se použít standardní pravoúhlé nebo válcové nádoby vyrobené z chemicky inertního materiálu o vhodném objemu s ohledem na náplň, tj. počet zkušebních jedinců. Použití měkkého plastového potrubí pro dodávku vody nebo vzduchu je třeba vyloučit. Jakékoli zařízení přicházející do kontaktu se zkušebními médii by mělo být vyrobeno z polytetrafluoretylenu, nerezové oceli anebo skla. Pro látky s vysokými adsorpčními koeficienty, jako jsou syntetické pyrethroidy, je nutné použít silanizované sklo. V těchto případech musí být zařízení po použití zlikvidováno (5). U radioizotopově značených zkoušených látek a u těkavých látek je třeba dávat pozor na to, aby nedošlo k odstranění a úniku odstraněné zkoušené látky. Je třeba použít lapače (např. skleněné láhve na promývání plynů) obsahující vhodné absorbenty pro zachycení jakýchkoli zbytků odpařených ze zkušebních komor (11).

Voda

26. Voda nad sedimentem musí mít kvalitu umožňující přežití zvoleného zkušebního druhu po dobu aklimatizace a během zkoušky, aniž by vykazoval abnormální vzhled nebo chování. Doporučuje se použít rekonstituovanou vodu podle zkušební metody C.1 (25) jako vodu nad sedimentem, a to ve zkouškách i v laboratorních kulturách pro živočichy. Bylo prokázáno, že v této vodě může přežít, růst a rozmnožovat se řada zkušebních druhů (8), a při tom je zajištěna maximální standardizace podmínek zkoušky a kultur. Voda musí být popsána alespoň hodnotami pH, vodivosti a tvrdosti. Užitečné informace může před použitím poskytnout analýza vody na mikropolutanty (dodatek 4).

27. Voda by měla mít po celou dobu zkoušky stejnou kvalitu. Hodnota pH vody nad sedimentem by měla být mezi 6 a 9. Celková tvrdost má být na začátku

▼M6

zkoušky mezi 90 a 400 mg $CaCO_3$ na litr (7). Rozsahy pro pH a tvrdost ve výše uvedené rekonstituované vodě jsou uvedeny ve zkušební metodě C.1 (25). Jestliže existuje podezření na interakci mezi ionty tvrdosti a zkoušenou chemickou látkou, je třeba použít vodu o nižší tvrdosti. Dodatek 4 shrnuje doporučená kritéria přijatelné ředicí vody podle Pokynu OECD pro zkoušení č. 210 (34).

Sedimenty

28. Sediment by měl mít takovou kvalitu, aby umožnila přežití zkušebních organismů a pokud možno jejich rozmnožování po dobu aklimatizace a během zkoušky, aniž by vykazovaly abnormální vzhled nebo chování. Organismy by se měly zavrtat do sedimentu. Zavrtávání může mít vliv na expozici a v důsledku toho na BAF. Proto je třeba zaznamenat vyhýbání se sedimentu nebo zavrtávání zkušebních organismů tam, kde taková pozorování umožní zákal vody nad sedimentem. Jedinci (kontrolní a exponovaní) by se měli zavrtat do sedimentu během 24 hodin po vložení do zkušebních nádob. Jestliže se organismy odmítají zavrtávat nebo se sedimentu vyhýbají (např. více než 20 % po dobu delší než polovina fáze příjmu), pak nejsou zkušební podmínky vhodné nebo nejsou zkušební organismy zdravé anebo toto chování vyvolává koncentrace zkoušené chemické látky. V takovém případě se zkouška musí zastavit a opakovat za zlepšených podmínek. Další informace o pojídání sedimentu lze získat použitím metod popsaných v (35)(36), které specifikují pojídání sedimentu nebo výběr částic u zkušebních organismů. Jestliže je možné je pozorovat, zaznamenává se alespoň přítomnost nebo nepřítomnost vloček výkalů na povrchu sedimentu, které indikují pojídání sedimentu zkušebními organismy, a toto zohlednit to při interpretaci výsledků zkoušky v souvislosti se způsobem expozice.

29. Pro zkoušky i pro laboratorní kultury organismů (dodatek 5) se doporučuje použít umělý sediment na základě umělé půdy popsaný ve zkušební metodě C.8 (40), neboť přírodní sedimenty příslušné kvality nemusejí být během roku dostupné. Zkoušku by kromě toho mohly ovlivnit i autochtonní organismy stejně jako možná přítomnost mikropolutantů v přírodních sedimentech. V umělém sedimentu může přežít, růst a rozmnožovat se řada zkušebních druhů (8).

30. Umělý sediment by měl být charakterizován alespoň z hlediska původu složek, rozložení velikosti zrn (procentní podíl písku, naplavenin a jílu), obsahu organického uhlíku (TOC), obsahu vody a pH. Volitelné je měření redox potenciálu. Jako zkušební a/nebo kultivační sedimenty však mohou sloužit přírodní sedimenty z neznečištěných míst (1). Přírodní sedimenty by měly být popsány alespoň původem (místo sběru), pH a obsahem amoniaku v kapilární vodě, obsahem organického uhlíku (TOC), rozložením velikosti částic (procentní podíl písku, naplavenin a jílu) a procentním podílem vody (6). Jestliže se očekává vznik amoniaku, doporučuje se, aby před přidáním zkoušené látky byl přírodní sediment kondicionován po dobu sedmi dní za stejných podmínek, jaké budou převládat v následné zkoušce. Na konci této doby kondicionování se voda, která je nad sedimentem, odstraní a vylije. Užitečné informace by měla poskytnout analýza půdy nebo jejích složek na mikroskopické znečišťující látky před použitím.

Příprava

31. Zacházení s přírodními sedimenty před jejich použitím v laboratoři je popsáno v (1)(6)(44). Příprava umělého sedimentu je popsána v dodatku 5.

▼M6

Skladování

32. Skladování přírodních sedimentů v laboratoři by mělo být co možná nejkratší. U.S. EPA (6) doporučuje maximální dobu skladování 8 týdnů při 4 ± 2 °C v temnu. Nad sedimentem ve skladovacích nádobách nesmí být žádný volný prostor. Doporučení pro skladování umělého sedimentu jsou uvedena v dodatku 5.

Aplikace zkoušené látky

33. Do sedimentu se přidá zkoušená chemická látka. Postup přidávání spočívá v pokrytí jedné nebo více složek sedimentu zkoušenou látkou. Například křemenný písek nebo jeho část (např. 10 g křemenného písku na zkušební nádobu) se může nechat nasáknout roztokem zkoušené chemické látky ve vhodném rozpouštědle, které se pak pomalu odpaří do sucha. Pokrytou část lze následně promíchat s vlhkou půdou. Při přípravě sedimentu je třeba brát v úvahu množství písku obohaceného směsí zkoušené chemické látky, tj. sediment se tak musí připravit s menším množstvím písku (6).

34. Do přírodního sedimentu se může zkoušená látka přidat obohacením vysušeného dílu sedimentu, jak je popsáno výše pro umělý sediment, nebo zamícháním zkoušené látky do mokrého sedimentu a následným odpařením použitých solubilizačních činidel. Vhodnými rozpouštědly pro přidání do mokrého sedimentu jsou etanol, metanol, etylenglykol monometyléter, etylenglykol dimetyléter, dimetylformamid a trietylenglykol (5)(34). Hlavním kritériem pro výběr vhodného solubilizačního činidla by měla být toxicita a těkavost rozpouštědla a rozpustnost zkoušené látky ve zvoleném rozpouštědle. Další pokyny týkající se postupů přidávání jsou uvedeny v Environment Canada (1995)(41). Je třeba dbát na to, aby zkoušená látka přidaná do sedimentu byla v sedimentu důkladně a rovnoměrně rozptýlena. Opakované dílčí vzorky obohaceného sedimentu je třeba analyzovat pro ověření koncentrací zkoušené chemické látky v sedimentu a stanovení stupně homogenity rozložení zkoušené látky.

35. Poté, co byl obohacený sediment s překrývající vodou připraven, je žádoucí umožnit rozdělení zkoušené látky mezi sediment a vodnou fázi. To by se mělo provádět pokud možno za stejných podmínek z hlediska teploty a provzdušňování použité při zkoušce. Vhodná doba pro ustavení rovnováhy je specifická pro konkrétní sediment a chemickou látku a může se pohybovat v řádu hodin až dní, zřídka až několika týdnů (4–5 týdnů) (28)(42). Při této zkoušce se neočekává dosažení rovnováhy, ale doporučuje se doba ekvilibrace 48 hodin až 7 dní. V závislosti na účelu studie, např. když se napodobují podmínky životního prostředí, se může obohacený sediment ekvilibrovat nebo nechat vyzrát po delší dobu (11).

PROVEDENÍ ZKOUŠKY

Předběžná zkouška

36. V zájmu optimalizace zkušebních podmínek konečné zkoušky může být užitečné provést předběžný experiment, např. výběr koncentrace (koncentrací) zkoušené látky, délka fáze příjmu a fáze vylučování. Během předběžné zkoušky se musí pozorovat a zaznamenat chování organismů, například

▼M6

vyhýbání se sedimentu, tj. že unikají ze sedimentu, což může být způsobeno zkoušenou látkou anebo samotným sedimentem. Vyhýbání se sedimentu se může rovněž použít jako subletální parametr v předběžné zkoušce pro odhad koncentrace(í) zkoušené chemické látky, která se použije ve zkoušce bioakumulace.

Podmínky expozice

Délka fáze příjmu

37. Zkušební organismy se vystavují zkoušené látce během fáze příjmu. První vzorek se odebere mezi 4 a 24 h od začátku fáze příjmu. Fáze příjmu trvá 28 dnů (1)(6)(11), není-li prokázáno, že je rovnováhy dosaženo dříve. Rovnovážný stav nastane, jestliže: i) závislost bioakumulačních faktorů na čase je při každé době vzorkování popsána přímkou rovnoběžnou s časovou osou; ii) tři následné analýzy BAF provedené na vzorcích odebraných v intervalech alespoň dvou dní se navzájem neliší o více než ± 20 % a iii) nejsou žádné významné rozdíly mezi třemi dobami vzorkování (na základě statistického srovnání, např. analýzou rozptylu a regresní analýzou). Jestliže se nedosáhlo rovnovážného stavu během 28 dní, fáze příjmu se může ukončit zahájením fáze vylučování; BAF_K se může vypočítat z rychlostních konstant příjmu a vylučování (viz rovněž odstavce 16 až 18).

Trvání fáze vylučování

38. První vzorek se odebere mezi 4 a 24 h od začátku fáze vylučování, neboť během počátečního období se mohou vyskytnout rychlé změny ve zbytcích tkání. Doporučuje se ukončit fázi vylučování, buď když koncentrace zkoušené chemické látky je nižší než 10 % koncentrace v rovnovážném stavu, nebo po maximální době trvání 10 dní. Zbytková úroveň v organismech na konci fáze vylučování se uvede v protokolu jako sekundární koncový bod. Délka fáze však může být určena dobou, po kterou zůstává koncentrace zkoušené látky v organismech nad mezí detekce analytické metody.

Zkušební organismy

Počet zkušebních jedinců

39. Počet jedinců na vzorek musí představovat takovou hmotnost tkáně organismů, aby hmotnost zkoušené látky na vzorek při zahájení fáze příjmu a na konci fáze vylučování byla významně vyšší než detekční mez pro zkoušenou chemickou látku v biologickém materiálu. V uvedených stadiích příjmu a vylučování je koncentrace ve zkušebních živočiších obvykle relativně nízká (6)(8)(18). Jelikož individuální hmotnost u mnoha druhů vodních máloštětinatců je velmi nízká (5–10 mg mokré hmotnosti na jedince *Lumbriculus variegatus* a *Tubifex tubifex*), je možné organismy z dané paralelní zkušební komory sloučit pro účely vážení a chemické analýzy zkoušky. Pro zkušební druh s vyšší individuální hmotností (např. *Branchiura sowerbyi*) lze použít opakované pokusy obsahující jednoho jedince, ale v takových případech je třeba počet opakování zvýšit na pět na odběr (11). Je však třeba poznamenat, že *B. sowerbyi* nebyl zahrnut do okružního testu (12), a proto není pro tuto metodu doporučen jako vhodnější druh.

40. Měli by se použít jedinci podobné velikosti (*L. variegatus* viz dodatek 6). Musí pocházet ze stejného zdroje a musí se jednat o dospělé nebo velké živočichy stejné třídy, pokud jde o věk (viz dodatek 6). Hmotnost a stáří živočicha může mít významný vliv na hodnoty BAF (např. kvůli různému obsahu lipidů anebo přítomnosti vajíček); tyto parametry je třeba přesně zaznamenat. Při měření průměrné mokré a suché hmotnosti se dílčí vzorky zkušebních organismů před začátkem zkoušky zváží.

▼M6

41. U *Tubifex tubifex a Lumbriculus variegatus* se během zkoušky očekává rozmnožování. Absence rozmnožování při zkoušce bioakumulace se zaznamená a bere v úvahu při interpretaci výsledků zkoušky.

Zatížení

42. Je třeba použít vysoké poměry sediment-organismy a voda-organismy, aby se minimalizovalo snížení koncentrace zkoušené chemické látky v sedimentu během fáze příjmu a aby se zabránilo poklesu koncentrace rozpuštěného kyslíku. Zvolená rychlost nasazování by měla rovněž odpovídat v přírodě se vyskytujícím hustotám populace vybraného druhu (43). Například pro *Tubifex tubifex* se doporučuje rychlost nasazování 1–4 mg tkáně organismů (mokrá hmotnost) na gram mokrého sedimentu (8)(11). V odkazech (1) a (6) se pro *L. variegatus* doporučuje rychlost nasazování ≤ 1 g sušiny tkáně organismů na 50 g organického uhlíku sedimentu.

43. Organismy pro použití ve zkoušce se vyjmou z kultury prosátím sedimentu kultury. Živočichové (dospělí nebo velcí jedinci bez známek nedávného dělení) se přemístí do skleněných misek (např. Petriho misek) obsahujících čistou vodu. Jestliže se zkušební podmínky liší od kultivačních podmínek, měla by být aklimatizační fáze v délce 24 h dostatečná. Před vážením se z organismů odstraní přebytek vody. To se může provést tak, že se organismy opatrně umístí na předem zvlhčený hedvábný papír. Pro vysušení organismů se nedoporučuje použít absorpční papír, neboť to může způsobit stres nebo poškození organismů. Brunson a kol. (1998) doporučují použít neosušené organismy o hmotnosti rovné přibližně 1,33násobku cílové biomasy. Těchto dodatečných 33 % odpovídá rozdílu mezi osušenými a neosušenými organismy (28).

44. Na začátku fáze příjmu (den 0 zkoušky) se zkušební organismy vyjmou z aklimatizační komory a rozdělí náhodně do nádob (např. Petriho misek) obsahujících rekonstituovanou vodu tak, že se přidají skupiny po dvou jedincích do každé nádoby, až každá nádoba obsahuje deset jedinců. Každá z těchto skupin se pak náhodně přemístí do samostatné zkušební nádoby, např. použitím měkké ocelové pinzety. Zkušební nádoby se následně inkubují za zkušebních podmínek.

Krmení

45. Vzhledem k nízkému obsahu živin v umělém sedimentu se musí sediment doplnit o zdroj potravy. Aby se nepodcenila expozice zkušebních organismů, např. selektivním krmením nekontaminovanou potravou, potrava nezbytná pro rozmnožování a růst zkušebních organismů se musí přidávat do sedimentu jednou před aplikací zkoušené chemické látky nebo během ní (viz dodatek 5).

Poměr sediment-voda

46. Doporučený poměr sediment-voda je 1:4 (45). Tento poměr je považován za vhodný pro udržení koncentrací kyslíku na příslušných úrovních a pro zabránění zvyšování obsahu amoniaku ve vodě nad sedimentem. Obsah kyslíku v této vodě by se měl udržet na úrovni ≥ 40 % nasycení. Voda nad sedimentem ve zkušebních nádobách by měla být mírně provzdušňována (např. 2–4 bubliny za sekundu) prostřednictvím Pasteurovy pipety umístěné přibližně 2 cm nad povrchem sedimentu, aby se minimalizovalo rozrušení sedimentu.

▼M6

Světlo a teplota

47. Fotoperioda v kultuře a při zkoušce je 16 hodin (1)(6). Intenzita světla v místě zkoušky by měla být udržována na hodnotě přibližně 500–1 000 lx. Zkušební teplota by se po celou dobu zkoušky měla udržovat na 20 ± 2 °C.

Zkušební koncentrace

48. Jedna zkušební koncentrace (pokud možno co nejnižší) se použije pro stanovení kinetiky příjmu, ale druhá (vyšší) koncentrace se dá také použít (např. (46)). V tomto případě se vzorky odeberou a analyzují v rovnovážném stavu nebo po 28 dnech pro potvrzení hodnoty BAF měřené při nižší koncentraci (11). Vyšší koncentrace by se měla zvolit tak, aby bylo možné vyloučit nepříznivé vlivy (např. výběrem přibližně 1 % nejnižší známé koncentrace chronického efektu EC_x získané z příslušných studií chronické toxicity). Nižší zkušební koncentrace by měla být významně vyšší než mez stanovitelnosti v sedimentu a biologických vzorcích pro použitou analytickou metodu. Jestliže účinná koncentrace zkoušené chemické látky je blízko analytické mezi stanovitelnosti, doporučuje se použít radioizotopově značenou zkoušenou látku s vysokou specifickou radioaktivitou.

Exponované a kontrolní repliky

49. Minimální počet exponovaných replik pro kinetická měření by měl být tři na odběr (11) během celé fáze příjmu a vylučování. Další repliky je třeba použít např. pro volitelné dodatečné termíny vzorkování. Pro fázi vylučování se připraví odpovídající počet replik s neobohaceným sedimentem a překrývající vodou, aby mohli být na konci fáze příjmu exponovaní jedinci přemístěni z určených exponovaných nádob do neexponovaných nádob. Celkový počet exponovaných replik by měl být dostatečný jak pro fázi příjmu, tak pro fázi vylučování.

50. Alternativě mohou být jedinci určení ke vzorkování během fáze vylučování exponováni v jedné velké nádobě obsahující obohacený sediment ze stejné várky jako ten, který byl použit pro kinetiku příjmu. Je třeba prokázat, že zkušební podmínky (např. hloubka sedimentu, poměr sediment-voda, nasazování, teplota, kvalita vody) jsou srovnatelné s replikami navrženými pro fázi příjmu. Na konci fáze příjmu se z této nádoby odeberou vzorky vody, sedimentu a organismů pro analýzu; dostatečný počet velkých jedinců, kteří nevykazují žádné známky nedávného dělení, se opatrně vyjme a přemístí do paralelních nádob připravených pro fázi vylučování (např. deset organismů na paralelní nádobu).

51. Jestliže se nepoužije jiné rozpouštědlo než voda, je třeba zajistit alespoň 9 replik negativní kontroly (alespoň 3 vzorkování na začátku, 3 na konci příjmu a 3 na konci vylučování) pro biologickou analýzu a analýzu pozadí. Jestliže se použije jakékoli solubilizační činidlo pro aplikaci zkoušené látky, je třeba provést kontrolní měření s rozpouštědlem (alespoň 3 repliky se odeberou na začátku, 3 na konci fáze příjmu a 3 na konci fáze vylučování). V tomto případě je třeba pro vzorkování na konci fáze příjmu zajistit alespoň 4 repliky negativní kontroly (bez rozpouštědla). Tyto paralelní nádoby lze biologicky srovnat s kontrolou obsahující rozpouštědlo s cílem získat informace o možném vlivu rozpouštědla na zkušební organismy. Podrobnosti jsou uvedeny v dodatku 3.

▼M6

Četnost měření kvality vody

52. Jako minimum se změří následující parametry kvality vody nad sedimentem během fází příjmu a vylučování:

Teplota	v jedné nádobě pro každou úroveň expozice v den vzorkování a v jedné kontrolní nádobě jednou týdně a na začátku a na konci fází příjmu a vylučování; teplota v okolním médiu (okolní vzduch nebo vodní lázeň) nebo se rovněž může zaznamenat v jedné reprezentativní zkušební nádobě, např. v souvislých nebo hodinových intervalech
Obsah rozpuštěného kyslíku	v jedné nádobě pro každou úroveň expozice a v jedné kontrolní nádobě v den vzorkování; vyjádřeno jako mg/l a % ASV (hodnota saturace vzduchu)
Přívod vzduchu	kontroluje se alespoň jedenkrát za den (pracovní) a podle potřeby nastaví
pH	v jedné exponované nádobě pro každou úroveň expozice v den vzorkování a v jedné kontrolní nádobě jednou týdně a na začátku a na konci fází příjmu a vylučování
Celková tvrdost vody	alespoň v jedné exponované nádobě a jedné kontrolní zkušební nádobě na začátku a konci fází příjmu a vylučování, vyjádřeno v mg/l $CaCO_3$
Celkový obsah amoniaku	alespoň v jedné exponované nádobě a jedné kontrolní zkušební nádobě na začátku a konci fází příjmu a vylučování, vyjádřeno v mg/l NH_4^+ nebo NH_3 nebo celkový amoniak-N

Vzorkování a analýza organismů, sedimentu a vody

Harmonogram vzorkování

53. Příklady harmonogramů odběru vzorků pro 28denní fázi příjmu a 10denní fázi vylučování jsou uvedeny v dodatku 3.

54. Provede se vzorkování vody a sedimentu ze zkušebních komor pro stanovení koncentrace zkoušené látky před přidáním organismů a během fází příjmu a vylučování. Během zkoušky se stanovují koncentrace zkoušené chemické látky v organismech, sedimentu a vodě pro sledování rozložení zkoušené látky ve složkách zkušebního systému.

55. Vzorkování organismů, sedimentu a vody se provede během fází příjmu a vylučování alespoň šestkrát.

56. Vzorkování pokračuje, než se dosáhne plató (rovnovážný stav) (viz dodatek 1), nebo po dobu 28 dní. Jestliže se plató nedosáhne do 28 dní, zahájí se fáze vylučování. Při zahájení fáze vylučování se přenesou určení jedinci do paralelních komor obsahujících neexponovaný sediment a vodu (viz rovněž odstavce 17 a 18).

Odběr a příprava vzorků

57. Vzorky vody se získají dekantací, odsátím nebo pipetováním objemu dostatečného pro měření množství zkoušené látky ve vzorku.

58. Zbývající voda nad sedimentem se opatrně dekantuje nebo odsaje ze zkušební komory. Vzorky sedimentu se musejí odebrat opatrně, aby byly organismy rušeny co nejméně.

▼M6

59. V čase vzorkování se vyjmou všechny organismy ze zkušebních opakovaných pokusů např. tak, že se sediment suspenduje ve vodě nad sedimentem, obsah každého opakování se rozprostře na mělký tác a organismy se vyberou použitím měkké ocelové pinzety. Pak se rychle opláchnou vodou v mělkém skleněném nebo ocelovém tácu. Přebytečná voda se vylije. Organismy se opatrně přenesou do předem zvážené nádoby a zváží se. Potom se usmrtí zmražením (např. ≤ – 18 °C). Zaznamená se přítomnost a počet kokonů anebo mláďat.

60. Obecně je třeba organismy zvážit a usmrtit okamžitě po vzorkování bez fáze vyprázdnění střev, aby se získala konzervativní hodnota BAF, která zahrnuje kontaminovaný obsah střev, a aby se zabránilo ztrátám tělesných zbytků během jakékoli doby vyprazdňování střev pouze ve vodě (8). U látek s log K_{ow} vyšší než 5 se neočekává, že budou významně vyloučeny během jakékoli doby vyprazdňování střev pouze ve vodě, zatímco u látek s log K_{ow} nižším než 4 se může ztratit významné množství (47).

61. Během fáze vylučování živočichové vyprazdňují svá střeva do čistého sedimentu. To znamená, že měření bezprostředně před fází vylučování zahrnují kontaminovaný sediment ze střev, zatímco po počátečních 4–24 hodinách fáze vylučování se předpokládá, že se většina kontaminovaného obsahu střev nahradí čistým sedimentem (11)(47). Koncentraci v organismech z tohoto vzorku pak lze považovat za koncentraci tkáně po vyprázdnění střev. Aby se zohlednilo naředění koncentrace zkoušené látky nekontaminovanou půdou v průběhu fáze vylučování, lze odhadnout hmotnost střevního obsahu z poměru hmotnosti organismu ve vlhkém stavu a hmotnosti popela po spálení organismu, případně z poměru suché hmotnosti organismu a hmotnosti popela po spálení organismu.

62. Jestliže je účelem specifické studie měření biologické dostupnosti a zbytků pravé tkáně ve zkušebních organismech, pak je třeba alespoň dílčí vzorek exponovaných živočichů (např. ze tří dodatečných opakovacích nádob), přednostně odebraný během rovnovážného stavu, zvážit, nechat vyprazdňovat v čisté vodě pro dobu 6 hodin (47) a před analýzou opět zvážit. Údaje o hmotnosti živočichů a koncentraci látky v tělech živočichů v tomto dílčím vzorku lze pak srovnat s hodnotami získanými z nevyprázdněných jedinců. Organismy určené pro měření vylučování by se neměly vyprazdňovat před přenosem do čistého sedimentu, aby se minimalizoval další stres.

63. Vzorky vody, sedimentu a živočichů se v optimálním případě analyzují okamžitě (tj. během 1–2 dnů) po vyjmutí, aby se zabránilo rozkladu nebo jiným ztrátám a aby se vypočítaly přibližné rychlosti příjmu a vylučování v dalším průběhu zkoušky. Okamžitá analýza rovněž zabrání opožděnému určení okamžiku, kdy bylo dosaženo plató.

64. Jestliže okamžitou analýzu nelze provést, vzorky je třeba skladovat za vhodných podmínek. Informace o stabilitě a správných podmínkách skladování pro příslušnou zkoušenou látku je třeba získat před zahájením studie (např. trvání a teplota skladování, extrakční postupy atd.). Jestliže takové informace nejsou dostupné a jsou-li považovány za nezbytné, je možné provést souběžný pokus s obohacenými kontrolními tkáněmi pro stanovení stability během skladování.

Kvalita analytické metody

65. Vzhledem k tomu, že celý postup je určen hlavně vhodností, přesností a citlivostí analytické metody použité pro analýzu zkoušené látky, je třeba experimentálně kontrolovat, zda přesnost a reprodukovatelnost chemické analýzy a rovněž výtěžek zkoušené látky jak z vody, tak ze vzorků živočichů jsou pro danou analytickou metodu dostatečné. Rovněž je třeba

▼M6

kontrolovat, zda se zkoušená chemická látka nevyskytuje v kontrolních komorách v koncentracích vyšších než u pozadí. Jestliže je to nezbytné, provede se korekce hodnot C_w, C_s a C_a na hodnoty výtěžku a pozadí v kontrolních vzorcích. V průběhu zkoušky je třeba se všemi vzorky zacházet tak, aby byla minimalizována kontaminace a ztráta (např. v důsledku adsorpce zkoušené látky na vzorkovacích pomůckách).

66. Celkový výtěžek a výtěžek zkoušené látky v organismech, sedimentu, vodě a také v lapačích obsahujících absorbenty pro zadržení odpařené zkoušené chemické látky, jsou-li použity, se musí zaznamenat a uvést ve zprávě.

67. Jelikož se doporučuje používat radioizotopově značené látky, je možné analyzovat celkovou radioaktivitu (tj. mateřské látky a produktů rozkladu). Avšak jestliže je to analyticky proveditelné, může kvantifikace mateřské látky a produktů rozkladu v rovnovážném stavu nebo na konci fáze příjmu poskytnout důležité informace. Jestliže se uvažuje o provedení takových měření, vzorky by pak měly procházet příslušnými extrakčními postupy, aby bylo možné mateřskou látku kvantifikovat samostatně. Tam, kde zaznamenané produkty rozkladu představují významný procentní podíl (např. > 10 %) radioaktivity naměřené ve zkušebních organismech v rovnovážném stavu nebo na konci fáze příjmu, doporučuje se takové produkty rozkladu identifikovat (5).

68. Vzhledem k nízké individuální biomase často není možné stanovit koncentraci zkoušené látky v každém jednotlivci, pokud není jako zkušební druh použit *Branchiura sowerbyi* (40–50 mg mokré hmotnosti na jedince) (11). Proto je přijatelné sloučení vzorkovaných jedinců z dané zkušební nádoby; to však omezuje statistické postupy, které lze aplikovat na data. Pokud jsou podstatnými faktory konkrétní statistický postup a síla, pak je třeba zahrnout do zkoušky odpovídající počet zkušebních živočichů anebo paralelních zkušebních komor, aby byl dostatečný prostor pro žádoucí sloučení, postup a sílu.

69. Doporučuje se, aby BAF byl vyjádřen jako funkce celkové mokré hmotnosti i celkové sušiny, a je-li to požadováno (např. pro vysoce lipofilní látky), jako funkce obsahu lipidů a TOC v sedimentu. Pro stanovení obsahu lipidů by měla být použita vhodná metoda (48)(49). Jako standardní metoda (48) může být doporučena technika extrakce směsí chloroform-metanol (50). Aby se však zabránilo používání chlorovaných rozpouštědel, je možné použít modifikaci metody podle Bligha & Dyera (50) testovanou okružním testem, jak je popsáno v (51). Různé metody neposkytují stejné hodnoty (48), proto je důležité uvést podrobnosti o použité metodě. Je-li to možné, tj. jestliže je k dispozici dostatečné množství tkáně živočichů, změří se obsah lipidů ve stejném vzorku nebo extraktu, jako je ten připravený pro analýzu na zkoušenou látku, neboť lipidy je často třeba odstranit z extraktu před chromatografickou analýzou (5). Je však praktické použít aklimatizované kontrolní živočichy alespoň na začátku nebo – optimálně – na konci fáze příjmu pro měření obsahu lipidů, např. ve třech vzorcích.

ÚDAJE A JEJICH PŘEDKLÁDÁNÍ

Zpracování výsledků

70. Křivka příjmu zkoušené chemické látky se získá vynesením koncentrace zkoušené látky v organismech nebo na nich během fáze příjmu jako funkce

▼M6

času v aritmetické stupnici. Jestliže křivka dosáhla plató, vypočítá se BAF_{ss} v rovnovážném stavu:

$$\frac{C_a \text{v rovnovážném stavu nebo vden 28 (střední hodnota)}}{C_s \text{v rovnovážném stavu nebo vden 28 (střední hodnota)}}$$

71. Stanoví se akumulační faktor (BAF_K) jako poměr k_s/k_e. Rychlostní konstanta vylučování (k_e) se obvykle stanoví z křivky vylučování (tj. grafu poklesu koncentrace zkoušené chemické látky v organismech v průběhu fáze vylučování). Rychlostní konstanta příjmu k_s se pak vypočítá z kinetiky křivky příjmu. Upřednostňovanou metodou získání hodnoty BAF_K a rychlostních konstant k_s a k_e je metoda nelineárního odhadu parametrů s využitím počítače (viz dodatek 2). Není-li zjevně křivka vylučování křivkou prvního řádu, je třeba použít složitější modely (25)(27)(52).

72. Akumulační faktor bioty sedimentu (BSAF) se stanoví normalizováním BAF_K pro obsah lipidů v organismech a obsah celkového organického uhlíku v sedimentu.

Interpretace výsledků

73. Výsledky by měly být interpretovány opatrně v případě, že se naměřené koncentrace zkoušených roztoků pohybují na úrovních blízkých mezi stanovitelnosti analytické metody.

74. Jasně definované křivky příjmu a vylučování jsou ukazatelem dobré kvality údajů o bioakumulaci. Obecně by mez spolehlivosti pro BAF hodnoty z dobře navržených studií neměla překročit 25 % (5).

Závěrečná zpráva

75. Závěrečná zpráva musí obsahovat tyto informace:

Zkoušená látka

— fyzikální povaha a fyzikálně-chemické vlastnosti, např. log K_{ow}, rozpustnost ve vodě,

— údaje o chemické identifikaci; zdroj zkoušené chemické látky, identita a koncentrace jakéhokoli použitého rozpouštědla,

— při použití radioizotopového značení přesná poloha značených atomů, specifická radioaktivita a procentní podíl radioaktivity spojené s nečistotami.

Zkušební druh

— vědecký název, kmen, zdroj, případné předběžná úprava, aklimatizace, věk, rozmezí velikostí atd.

Zkušební podmínky

— použitý zkušební postup (statický, semistatický nebo průtokový),

— typ a charakteristiky použitého osvětlení a fotoperioda (fotoperiody),

— návrh zkoušky (např. počet, materiál a velikost zkušebních komor, objem vody, hmotnost a objem sedimentu, rychlost výměny objemu vody (pro průtočný nebo semistatický postup), jakékoli provzdušňování použité před zkouškou a během ní, počet replik, počet jedinců na repliku, počet zkušebních koncentrací, délka fází příjmu a vylučování, četnost vzorkování),

▼**M6**

— metoda přípravy a aplikace zkoušené látky, důvody pro výběr konkrétní metody,

— nominální zkušební koncentrace,

— zdroj složek umělé vody a sedimentu nebo – jsou-li použita přírodní média – původ vody a sedimentu, popis jakékoli předběžné úpravy, výsledky jakéhokoli předvedení schopnosti zkušebních živočichů žít anebo rozmnožovat se v použitém médiu, typické znaky sedimentu (pH a amoniak v kapilární vodě (přírodní sedimenty), obsah organického uhlíku (TOC), rozložení velikosti částic (procentní podíl písku, naplavenin a jílu), procentní podíl vody a jakákoli jiná provedená měření) a typické znaky vody (pH, tvrdost, vodivost, teplota, koncentrace rozpuštěného kyslíku, úrovně zbytkového chlóru (jsou-li měřené) a jakákoli jiná prováděná měření),

— nominální a měřený obsah sušiny v % mokré hmotnosti (nebo poměr suché k mokré hmotnosti) umělého sedimentu; měření obsahu sušiny v % mokré hmotnosti (nebo poměr suché k mokré hmotnosti) pro terénní sedimenty,

— kvalita vody ve zkušebních komorách charakterizovaná teplotou, pH, obsahem amoniaku, celkovou tvrdostí a koncentrací rozpuštěného kyslíku,

— podrobné informace o expozici vzorků půdy a organismů, včetně podrobností o přípravě, uchovávání, postupech obohacování, extrakci a analytických postupech (a přesnosti), pokud jde o zkoušenou látku v organismech a půdě, obsah lipidů (je-li měřen) a výtěžky zkoušené látky.

Výsledky

— mortalita kontrolních jedinců a jedinců v každé zkušební komoře a jakékoli pozorované subletální vlivy včetně abnormálního chování (např. vyhýbání se sedimentu, přítomnost nebo nepřítomnost vloček výkalů, žádné rozmnožování),

— měřený obsah sušiny v % mokré hmotnosti (nebo poměr suché k mokré hmotnosti) sedimentu a zkušebních organismů (užitečné pro normalizaci),

— obsah lipidů v organismech,

— křivky kinetiky příjmu a vylučování zkoušené chemické látky organismy a doba dosažení rovnovážného stavu,

— hodnoty C_a, C_s a C_w (popřípadě se směrodatnými odchylkami a rozpětím) pro všechny odběry (hodnota C_a se vyjadřuje v g/kg vlhké a suché hmotnosti celého těla, hodnota C_s se vyjadřuje v g/kg mokré a suché hmotnosti půdy a C_w v mg/l). Pokud je vyžadován akumulační faktor půdní bioty (BSAF; definice viz dodatek 1) (například pro porovnání výsledků dvou nebo více zkoušek provedených s živočichy s odlišným obsahem lipidů), lze navíc vyjádřit i hodnotu C_a jako g/kg obsahu lipidů v organismu a hodnotu C_s jako g/kg organického uhlíku (OC) v půdě,

— BAF (vyjádřeno v kg mokrého sedimentu na kg mokrých organismů), rychlostní konstanta příjmu sedimentu k_s (vyjádřená v g mokrého sedimentu na kg mokrých organismů za den) a rychlostní konstanta vylučování k_e (vyjádřená v d^{-1}); BSAF (vyjádřený v kg sedimentu OC na kg obsahu lipidů v organismech) mohou být zapsány do protokolu dodatečně,

▼**M6**

— nevyloučené zbytky (NER) na konci fáze vylučování,

— jsou-li měřeny: procentní podíl mateřské látky, produkty rozkladu a vázané zbytky (tj. procento zkoušené chemické látky, které nelze extrahovat běžnými extrakčními metodami) detekované ve zkušebních organismech,

— metody užívané pro statistické analýzy dat.

Vyhodnocení výsledků

— soulad výsledků s kritérii platnosti uvedenými v odstavci 21,

— neočekávané nebo neobvyklé výsledky, např. nekompletní vylučování zkoušené látky ze zkušebních živočichů; v takových případech mohou výsledky z jakékoli předběžné studie poskytnout užitečné informace.

▼M6

Dodatek 1

Definice a jednotky

Umělý sediment, nebo připravený, rekonstituovaný či syntetický sediment je směs materiálů použitá k napodobení fyzických složek přírodního sedimentu.

Bioakumulace je nárůst koncentrace zkoušené chemické látky v organismu nebo na něm v porovnání s koncentrací zkoušené chemické látky v okolním médiu. Bioakumulace je výsledkem biokoncentračních a bioobohacovacích procesů (viz níže).

Bioakumulační faktor (BAF) v jakémkoli čase během fáze příjmu při této zkoušce bioakumulace představuje koncentraci zkoušené látky ve zkušebním organismu nebo na něm (C_a v $g.kg^{-1}$ mokré nebo suché hmotnosti organismů) dělenou koncentrací látky v okolním médiu (C_s jako $g.kg^{-1}$ mokré nebo suché hmotnosti sedimentu). S odkazem na jednotky C_a a C_s má BAF jednotky kg sedimentu kg^{-1} organismů (15).

Bioakumulační faktory vypočítané přímo z poměru rychlostní konstanty příjmu sedimentu k rychlostní konstantě vylučování (k_s a k_e – viz níže) se nazývají kinetické bioakumulační faktory (BAF_K).

Biokoncentrace je nárůst koncentrace zkoušené látky v organismu nebo na něm pocházející výhradně z příjmu prostřednictvím tělesného povrchu v porovnání s koncentrací zkoušené látky v okolním médiu.

Bioobohacování je nárůst koncentrace zkoušené chemické látky v organismu nebo na něm, hlavně příjmem kontaminované potravy nebo kořisti, v porovnání s koncentrací zkoušené chemické látky v této potravě nebo kořisti. Bioobohacování může vést k přesunu nebo akumulaci zkoušené látky v potravních řetězcích.

Akumulační faktor půdní bioty (BSAF) je koncentrace zkoušené látky ve zkušebním organismu nebo na něm normalizovaná na lipidy, dělená koncentrací zkoušené látky v půdě v rovnovážném stavu normalizované na organický uhlík. C_a je pak vyjádřena jako $g.kg^{-1}$ obsahu lipidů v organismu a C_s jako $g.kg^{-1}$ obsahu organického podílu v sedimentu.

Doba kondicionování se používá ke stabilizaci mikrobiální složky sedimentu a k odstranění např. amoniaku vznikajícího ze sedimentových složek; nastává před přidáním zkoušené látky do sedimentu. Voda nad sedimentem se obvykle po kondicionování vylije.

Vylučování zkoušené chemické látky je úbytek této chemické látky z tkáně zkoušeného organismu na základě aktivních nebo pasivních procesů, ke kterému dochází nezávisle na přítomnosti nebo nepřítomnosti zkoušené látky v okolním médiu.

Vylučovací fáze je časový úsek po přemístění zkušebních organismů z kontaminovaného média do média, které zkoušenou látku neobsahuje, během něhož se studuje vylučování chemické látky ze zkušebních organismů (nebo její čistý úbytek v nich).

Rychlostní konstanta vylučování (k_e) je číselná hodnota definující rychlost poklesu koncentrace zkoušené látky ve zkoušeném organismu nebo na něm po přemístění zkoušených organismů z média obsahujícího zkoušenou látku do média, které neobsahuje chemickou látku; k_e je vyjádřeno jako číselná hodnota za den.

▼M6

Doba ekvilibrace (dosažení rovnováhy) se používá, aby byla umožněna distribuce zkoušené látky mezi pevnou fázi, kapilární vodu a vodu nad sedimentem; nastává po přidání zkoušené látky do sedimentu a před vložením zkušebních organismů.

Rozdělovací koeficient n-oktanol/voda (K_{ow}) je rovnovážný poměr mezi rozpustností chemické látky v n-oktanolu a ve vodě (někdy se označuje také jako P_{ow}). Logaritmus hodnoty K_{ow} (log K_{ow}) se používá jako ukazatel schopnosti bioakumulace chemické látky ve vodních organismech.

Rozdělovací koeficient organický uhlík/voda (K_{ou}) je rovnovážný poměr mezi koncentrací chemické látky ve/na frakci organického uhlíku v půdě a koncentrace chemické látky ve vodě.

Voda nad sedimentem (překrývající voda) je voda ležící navrchu sedimentu ve zkušební nádobě.

Plató nebo **rovnovážný stav** je definován jako rovnováha mezi procesem příjmu a vylučování, ke kterým dochází ve fázi expozice současně. Rovnovážného stavu je dosaženo tehdy, je-li při grafickém znázornění křivka časové závislosti BAF rovnoběžná s časovou osou a tři po sobě jdoucí analýzy BAF vzorků odebraných v intervalech alespoň dvou dnů se neliší více než o ± 20 % a není-li mezi těmito třemi dobami odběru žádný statisticky významný rozdíl. V případě zkoušených látek, jejichž příjem probíhá pomalu, jsou vhodnější sedmidenní intervaly (5).

Intersticiální voda nebo **kapilární voda** je voda zabírající prostor mezi sedimentem a částicemi půdy.

Rychlostní konstanta příjmu ze sedimentu (k_s) je číselná hodnota definující rychlost nárůstu koncentrace zkoušené látky ve zkušebních organismech nebo na nich v důsledku příjmu ze sedimentové fáze. k_s se vyjadřuje v g sedimentu na kg organismů za den.

Obohacený sediment je sediment, do něhož byla přidána zkoušená látka.

Bioakumulační faktor v rovnovážném stavu ($BAF_{SS)}$ je BAF v rovnovážném stavu, který se po dlouhou dobu výrazně nemění; koncentrace zkoušené látky v okolním médiu (C_s jako g/kg suché hmotnosti půdy) je po tuto dobu konstantní.

Fáze expozice nebo příjmu je časový úsek, během něhož jsou zkoušené organismy vystaveny působení zkoušené chemické látky.

▼M6

Dodatek 2

Výpočet parametrů příjmu a vylučování

Hlavním koncovým bodem (parametrem) bioakumulační zkoušky je bioakumulační faktor BAF. Měřený BAF se může vypočítat jako podíl koncentrace zkoušené látky ve zkušebním organismu C_a a koncentrace zkoušené látky v sedimentu C_s v rovnovážném stavu. Jestliže rovnovážného stavu není dosaženo během fáze příjmu, BAF se vypočítá stejným způsobem pro den 28. Je však třeba zjistit, zda BAF je založen na koncentracích v rovnovážném stavu nebo ne.

Upřednostňovaným způsobem, jak získat kinetický bioakumulační faktor (BAF_K), rychlostní konstantu příjmu sedimentu (k_s) a rychlostní konstantu vylučování (k_e), je použití metod odhadu nelineárních parametrů na počítači. Vzhledem k časové řadě průměrných akumulačních faktorů (C_a, střední hodnoty pro každý den vzorkování /C_s, střední hodnoty pro každý den vzorkování = AF) fáze příjmu na základě mokré hmotnosti organismů a sedimentu a modelové rovnici

$$AF(t) = BAF \times (1 - e^{ke \times t}) \qquad \text{[rovnice 1]}$$

kde AF(t) je poměr koncentrace zkoušené látky v organismech a její koncentrace v sedimentu v jakémkoli daném časovém bodě (t) fáze příjmu, tyto počítačové programy vypočítají hodnoty pro BAF_K, k_s a k_e.

Když je rovnovážného stavu dosaženo během fáze příjmu (tj. $t = \infty$), rovnice 1 se může redukovat na:

$$BAF_K = \frac{k_s}{k_e} \qquad \text{[rovnice 2]}$$

kde

k_s je rychlostní konstanta příjmu v tkáni [g půdy na kg organismů za den] a

k_e je rychlostní konstanta vylučování [1/d],

Pak $k_s/k_e \times C_s$ se blíží ke koncentraci zkoušené látky v tkáni organismů v rovnovážném stavu ($C_{a,ss}$).

Akumulační faktor půdní bioty (BSAF) lze vypočítat následovně:

$$BSAF = BAF_K \times \frac{f_{oc}}{f_{lip}}$$

kde f_{oc} je frakce organického uhlíku v sedimentu a f_{lip} je frakce lipidů v organismech, obě vztaženy buď na hmotnost sušiny, nebo na mokrou hmotnost.

Vzhledem k časové řadě hodnot koncentrací může být kinetika vylučování modelována použitím následujících modelových rovnic a metody odhadu nelineárních parametrů na základě počítačového výpočtu.

Střední hodnota měřeného tělesného zbytku na konci fáze příjmu je doporučována jako implicitní počáteční bod. Hodnota modelovaná/odhadnutá z fáze příjmu se použije např. pouze tehdy, jestliže se naměřená hodnota odchyluje významně od modelového tělesného zbytku. Viz rovněž odstavec 50 – alternativní předběžná expozice organismů určených pro vylučování; při tomto přístupu se předpokládá, že vzorky těchto předběžně exponovaných organismů v den 0 fáze vylučování poskytnou realistický tělesný zbytek pro zahájení kinetiky vylučování.

▼M6

Pokud data vynesená do grafu proti času indikují stálý exponenciální pokles koncentrace zkoušené látky u živočichů, lze použít k popisu časového průběhu vylučování model s jedním oddělením (rovnice 4).

$$C_a(t) = C_{a,ss} \times e^{-k_e t} \qquad \text{[rovnice 3]}$$

Procesy vylučování se někdy jeví jako dvoufázové, neboť vykazují rychlý pokles C_a během raných fází, který se v pozdějších fázích vylučování změní na pomalejší úbytek zkoušených látek, např. (8)(19)(25). Tyto dvě fáze mohou být interpretovány na základě předpokladu, že v organismu existují dvě různé oddělené části, z nichž dochází k úbytku zkoušené látky odlišnou rychlostí. V těchto případech je nutno studovat specifickou literaturu, např. (15)(16)(17)(25).

Vylučování ze dvou oddílů je popsáno např. následující rovnicí (25):

$$C_a = A \times e^{-k_a \times t} + B \times e^{k_b \times t} \qquad \text{[rovnice 4]}$$

A a B představují velikost oddílu (v procentním podílu z celkového tkáňového zbytku), kde A je oddíl s rychlou ztrátou látky a B oddíl s pomalou ztrátou zkoušené látky. Součet A + B je roven 100 % celkového objemu živočicha v rovnovážném stavu. k_a a k_b jsou odpovídající vylučovací konstanty [d^{-1}]. Jestliže se model se dvěma oddíly proloží daty týkajícími se vylučování, rychlostní konstanta příjmu k_s se může stanovit následovně (53) (54):

$$k_s = \frac{(A \times k_a + B \times k_b) \times BAF}{A + B} \qquad \text{[rovnice 5]}$$

Nicméně, tyto modelové rovnice by se měly používat s opatrností, zejména když se během zkoušky vyskytnou změny v biologické dostupnosti zkoušené chemické látky (42).

Pomocí výše uvedených modelových rovnic lze také zároveň vypočítat kinetické parametry (k_s a k_e) uplatněním modelu kinetiky prvního řádu na všechna data z fáze příjmu a z fáze vylučování současně. Popis metody, která by mohla umožnit takový kombinovaný výpočet rychlostních konstant příjmu a vylučování, lze nalézt v odkazech (55)(56)(57).

Nevyloučené zbytky (NER) se vypočítají jako sekundární koncový bod násobením poměru průměrné koncentrace vyjádřené počtem jedinců (C_a) v den 10 fáze vylučování k průměrné koncentraci vyjádřené počtem jedinců (C_a) v rovnovážném stavu (den 28 fáze příjmu) hodnotou 100:

$$\boldsymbol{NER_{10d}[\%] = \frac{C_a \text{ na konci vylučování}(\text{průměr}) \times 100}{C_a \text{ rovnovážném stavu}(\text{průměr})}}$$

▼M6

Dodatek 3

Příklad harmonogramu vzorkování pro 28denní zkoušku bioakumulace

a) **Fáze příjmu (včetně 4denní fáze ekvilibrace)**

Den	Činnosti
– 6	Příprava suspenze rašeliny pro sediment; kondicionování suspenze po dobu 48 h
– 4	Přidání chemické látky do sedimentu nebo frakce sedimentu; promíchání všech složek sedimentu; odebrání vzorků z exponovaného sedimentu a z kontrolního sedimentu s rozpouštědlem pro stanovení koncentrace zkoušené látky; přidání vody nad sediment; inkubace za zkušebních podmínek (fáze ekvilibrace)
– 3/– 2	Separace zkušebních organismů z kultury pro aklimatizaci
0	Měření kvality vody (viz odstavec 52); vyjmutí opakovaných pokusů pro odebrání vzorků vody a sedimentu ke stanovení koncentrace zkoušené chemické látky; náhodné rozdělení živočichů do zkušebních komor; ponechání dostatečného počtu dílčích vzorků živočichů pro stanovení hodnot analytického pozadí; kontrola přívodu vzduchu, je-li používán uzavřený zkušební systém
1	Vyjmutí paralelních nádob pro vzorkování; kontrola přívodu vzduchu, chování živočichů, kvality vody (viz odstavec 56); odebrání vzorků vody, sedimentu a živočichů pro stanovení koncentrací zkoušené látky
2	Kontrola přívodu vzduchu, zaznamenání chování živočichů a teploty
3	Stejné jako 1. den
4–6	Stejné jako 2. den
7	Stejné jako 1. den, kompenzace odpařené vody, podle potřeby
8–13	Stejné jako 2. den
14	Stejné jako 1. den; kompenzace odpařené vody, podle potřeby
15–20	Stejné jako 2. den
21	Stejné jako 1. den; kompenzace odpařené vody, podle potřeby
22–27	Stejné jako 2. den
28	Stejné jako 1. den; měření kvality vody (viz odstavec 52); konec fáze příjmu; ponechání dostatečného počtu dílčích vzorků živočichů pro stanovení hodnot analytického pozadí, mokré a suché hmotnosti a obsahu lipidů; přenos živočichů ze zbývajících exponovaných opakovaných nádob do nádob obsahujících čistý sediment pro fázi vylučování (žádné vyprazdňování střev); vzorkování vody, sedimentu a organismů z kontrolních pokusů s rozpouštědlem; vzorkování roztoků v lapačích, jsou-li instalovány.
	Adaptační činnosti (fáze ustavování rovnováhy) by měly být naplánovány s ohledem na vlastnosti zkoušené chemické látky. Jestliže je to požadováno, kondicionování připraveného sedimentu pod překrývající vodou při 20 ± 2 °C po dobu 7 dní; v tomto případě dřívější příprava sedimentu!
	Činnosti popsané pro 2. den by se měly provádět denně (alespoň v pracovní dny)

▼**M6**

b) ***Fáze vylučování***

Den	Činnosti
– 6	Příprava suspenze rašeliny pro sediment; kondicionování suspenze po dobu 48 h
– 4	Smíchání všech složek sedimentu; odebrání vzorků exponovaného sedimentu a kontrolního sedimentu s rozpouštědlem pro stanovení koncentrace zkoušené látky; přidání překrývající vody; inkubace za zkušebních podmínek
0 (den 28 fáze příjmu)	Měření kvality vody (viz odstavec 52); přenos živočichů ze zbývajících exponovaných opakování do nádob obsahujících čistý sediment; po **4–6 h** vyjmutí opakovaných pokusů pro odebrání vzorků vody, sedimentu a živočichů ke stanovení koncentrace zkoušené chemické látky; náhodné rozdělení živočichů do zkušebních komor
1	Vyjmutí opakovaných nádob pro vzorkování; kontrola přívodu vzduchu, chování živočichů, kvality vody (viz odstavec 52); odebrání vzorků vody, sedimentu a živočichů pro stanovení koncentrace zkoušené látky
2	Kontrola přívodu vzduchu, zaznamenání chování živočichů a teploty
3	Stejné jako 1. den
4	Stejné jako 2. den
5	Stejné jako 1. den
6	Stejné jako 2. den
7	Stejné jako 1. den, kompenzace odpařené vody, podle potřeby
8–9	Stejné jako 2. den
10	Stejné jako 1. den; konec fáze vylučování; měření kvality vody (viz odstavec 52); vzorkování vody, sedimentu a živočichů z kontrolních pokusů s rozpouštědlem; vzorkování roztoků v lapačích, jsou-li instalovány.
	Příprava půdy před zahájením fáze vylučování by měla být provedena stejným způsobem jako před fází příjmu.
	Činnosti popsané pro 2. den by se měly provádět denně (alespoň v pracovní dny)

▼M6

Dodatek 4

Některé fyzikálně-chemické typické znaky doporučené ředicí vody

SLOŽKA	KONCENTRACE
Pevné částice	< 20 mg/l
Celkový obsah organického uhlíku	< 2μg/l
Neionizovaný amoniak	< 1 μg/l
Zbytkový chlor	< 10 μg/l
Celkové organofosforové pesticidy	< 50 ng/l
Celkové organochlorové pesticidy, polychlorované bifenyly	< 50 ng/l
Celkový organický chlor	< 25 ng/l

SLOŽENÍ DOPORUČENÉ REKONSTITUOVANÉ VODY

a) Roztok chloridu vápenatého:

Rozpustí se 11,76 g $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ v deionizované vodě; doplní se do 1 l deionizovanou vodou.

b) Roztok síranu hořečnatého:

Rozpustí se 4,93 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ v deionizované vodě; doplní se do 1 l deionizovanou vodou.

c) Roztok hydrogenuhličitanu sodného:

Rozpustí se 2,59 g $NaHCO_3$ v deionizované vodě; doplní se do 1 l deionizovanou vodou.

d) Roztok chloridu draselného:

Rozpustí se 0,23 g KCl v deionizované vodě; doplní se do 1 l deionizovanou vodou.

Všechny chemické látky musí být čistoty p. a.

Vodivost destilované nebo deionizované vody nesmí překročit 10 μScm^{-1}.

25 ml každého z roztoků (a) až (d) se smíchá a celkový objem se doplní do 1 l deionizovanou vodou. Součet obsahu vápenatých a hořečnatých iontů v tomto roztoku je 2,5 mmol/l.

Poměr iontů Ca: Mg je 4: 1 a iontů Na: K je 10: 1; kyselinová (neutralizační) kapacita $K_{S4.3}$ tohoto roztoku je 0,8 mmol/l.

Vodu nad sedimentem je třeba provzdušňovat, až dosáhne saturace kyslíkem; pak se skladuje přibližně dva dny bez dalšího provzdušňování před použitím.

pH přijatelné zřeďovací vody by mělo být v rozsahu 6–9.

▼M6

Dodatek 5

Umělý sediment – doporučení pro přípravu a skladování

Na rozdíl od požadavků ve zkušební metodě C.8 (40) se doporučuje obsah rašeliny v umělém sedimentu 2 % namísto 10 % sušiny tak, aby odpovídal nízkému až střednímu obsahu organického podílu v přírodních sedimentech (58).

Procentní podíl suchých složek umělého sedimentu:

Složka	Vlastnosti	% suchého sedimentu
Rašelina	Sfagnová rašelina, stupeň rozkladu: „střední“, na vzduchu sušená, žádné viditelné zbytky rostlin, jemně mletá (velikost částic ≤ 0,5 mm)	2 ± 0,5
Křemenný písek	Velikost zrn: ≤ 2 mm, ale > 50 % částic by mělo být v rozpětí 50–200 μm	76
Kaolinitický jíl	Obsah kaolinitu ≥ 30 %	22 ± 1
Zdroj potravy	*Folia urticae,* drcené listy *Urtica sp.* (kopřiva dvoudomá), jemně mleté (velikost částic ≤ 0,5 mm), nebo směs drcených listů *Urtica sp.* s alfa-celulózou (1: 1); v souladu s lékárnickými normami, pro lidskou výživu; v přídavku do suchého sedimentu	0,4–0,5 %
Uhličitan vápenatý	$CaCO_3$, práškový, chemicky čistý, v přídavku do suchého sedimentu	0,05–1
Deionizovaná voda	Vodivost ≤ 10 μS/cm, v přídavku do suchého sedimentu	30–50

Jestliže se očekávají zvýšené koncentrace amoniaku, např. je-li o zkoušené látce známo, že inhibuje nitrifikaci, může být užitečné nahradit 50 % prášku kopřivy bohaté na dusík celulózou (např. práškem α-celulózy, chemicky čisté, velikost částic ≤ 0,5 mm).

Příprava

Rašelina se vysuší na vzduchu a umele na jemný prášek (velikost částic ≤ 0,5 mm, žádné viditelné zbytky rostlin). Suspenze požadovaného množství rašelinového prášku se připraví použitím dílu deionizované vody přidaného k suchému sedimentu (zjistilo se, že objem vody 11,5 × sušina rašeliny je schopný vytvořit míchatelnou rašelinovou kaši (8)) použitím vysoce výkonného homogenizátoru.

pH této suspenze se upraví na 5,5 ± 0,5 pomocí $CaCO_3$. Suspenze se kondicionuje po dobu alespoň dvou dní za mírného míchání při 20 ± 2 °C, pro stabilizaci pH a ustavení stabilního mikrobiálního prostředí. Změří se opět pH a podle potřeby nastaví na 6,0 ± 0,5 pomocí $CaCO_3$. Pak se veškerá suspenze smíchá s ostatními suchými složkami, přičemž se bere v úvahu jakýkoli díl použitý pro obohacení. Zbývající deionizovaná voda se přidá a získá se homogenní sediment. Opět se změří pH a podle potřeby upraví na 6,5 až 7,5 pomocí $CaCO_3$. Jestliže se však očekává vývin amoniaku, může být užitečné udržet pH sedimentu pod 7,0 (např. mezi 6,0 a 6,5). Odeberou se vzorky sedimentu pro stanovení obsahu sušiny a obsahu organického uhlíku. Jestliže se očekává tvorba amoniaku, může se umělý sediment kondicionovat po dobu sedmi dní za stejných podmínek, které budou převládat v následné zkoušce (např. poměr sediment – voda 1: 4, výška vrstvy sedimentu jako ve zkušebních nádobách), před přidáním zkoušené látky, tj. měl by být převrstven provzdušněnou vodou. Na konci doby kondicionování se překrývající voda odebere a vylije. Odeberou se vzorky sedimentu pro stanovení obsahu sušiny a celkového organického uhlíku (např. 3 vzorky).

▼M6

Potom se obohacený křemenný písek smíchá se sedimentem pro každou úroveň expozice, sediment se rozdělí do zkušebních nádob opakování a přelije se zkušební vodou (např. poměr sediment – voda 1: 4, výška vrstvy sedimentu jako ve zkušebních nádobách). Nádoby se pak inkubují za stejných podmínek, jaké budou převládat v následné zkoušce. V tomto okamžiku začíná doba ekvilibrace. Voda nad sedimentem musí být provzdušněna.

Vybraný zdroj potravy musí být přidán před přidáním zkoušené látky do sedimentu nebo během něj. Může se na začátku smíchat s rašelinovou suspenzí (viz výše). Avšak nadměrný rozklad zdroje potravy před přidáním zkušebních organismů – např. v případě dlouhé ekvilibrace – se může potlačit tak, že doba mezi přidáním potravy a začátkem expozice se co nejvíce zkrátí. Aby se zajistilo, že potrava bude v dostatečném kontaktu se zkoušenou chemickou látkou, měl by se zdroj potravy smíchat se sedimentem nejpozději v den, kdy je zkoušená látka přidána do sedimentu. Výjimkou může být, když délka ekvilibrační doby vede k nadměrnému mikrobiálnímu rozkladu potravy před vložením zkušebních organismů. Vzorky sedimentu se odeberou pro stanovení obsahu sušiny a celkového organického uhlíku (např. 3 vzorky obohaceného nebo kontrolního sedimentu).

Obsah sušiny složek (rašeliny, písku, kaolinu) se zaznamená do protokolu v g a procentním podílu celkové sušiny.

Objem vody, která se má přidat k suchým složkám během přípravy sedimentu, se rovněž uvede v protokolu jako procentní podíl z celkové sušiny (např. 100 % sušiny + 46 % vody znamená, že k 1 000 g sušiny se přidá celkem 460 ml vody, což ve výsledku dá 1 460 g mokrého sedimentu).

Skladování

Suché složky pro přípravu umělého sedimentu lze skladovat na suchém chladném místě při pokojové teplotě. Připravený mokrý sediment lze skladovat (pro další použití pouze v kultuře) při 4 ± 2 °C v temnu pro dobu 2 až 4 týdnů ode dne přípravy (8).

Sediment obohacený zkoušenou látkou by měl být použit ihned, pokud nejsou k dispozici informace o tom, že tento určitý sediment lze skladovat bez vlivu na toxicitu a biologickou dostupnost zkoušené chemické látky. Vzorky obohaceného sedimentu pak mohou být uchovány za podmínek doporučených pro konkrétní zkoušenou látku až do provedení analýzy.

▼M6

Dodatek 6

Druhy máloštětinatců doporučených pro zkoušení bioakumulace

***Tubifex tubifex* (MÜLLER), nítěnkovití, máloštětinatci**

Nítěnkovití máloštětinatci (*nítěnkovití, máloštětinatci*) *Tubifex tubifex* (Müller) žijí ve sladkovodních sedimentech v trubkách potažených slizem. V těchto trubkách přebývají hlavou dolů, pojídají částice sedimentu, přičemž využívají přidružené mikroorganismy a organické zbytky. Zadní část se jim obvykle vlní ve vodě nad sedimentem a zajišťuje dýchání. Ačkoliv tento druh obývá velký rozsah typů sedimentu po celé severní polokouli, *Tubifex tubifex* preferuje relativně jemné velikosti zrn (59). Vhodnost tohoto druhu pro ekotoxikologické zkoušky je popsána například v (8)(29)(31)(39)(60)(62)(63).

Metody kultivace

Aby bylo možno získat dostatečný počet jedinců *Tubifex tubifex* pro provedení bioakumulačních zkoušek, je třeba organismy udržovat v permanentní laboratorní kultuře. Pro kulturu *T. tubifex* je doporučen systém sestávající z umělého sedimentu na základě umělé půdy podle zkušební metody C.8 (40) a rekonstituované vody podle zkušební metody C.1 (8).

Skleněné nebo nerezové nádoby o výšce 12 až 20 cm lze použít jako kultivační nádoby. Do každé kultivační nádoby je vložena vrstva mokrého umělého sedimentu připraveného podle popisu v dodatku 5. Hloubka vrstvy sedimentu by měla umožnit přirozené chování organismů se zavrtáváním (2 cm minimální hloubka pro *T. tubifex*). Do systému se přidá rekonstituovaná voda. Je třeba dbát na to, aby se minimalizovalo narušení sedimentu. Vodní vrstva se opatrně provzdušňuje (např. 2 bubliny za vteřinu vzduchu filtrovaného přes 0,45 μm) prostřednictvím Pasteurovy pipety umístěné 2 cm nad povrchem sedimentu. Doporučená teplota kultury je 20 ± 2 °C.

Organismy se vloží do kultivačního systému s maximálním počtem 20 000 jedinců/m^2 povrchu sedimentu. Vyšší zátěž by mohla způsobit snížení rychlosti růstu a rozmnožování (43).

V kultuře umělého sedimentu je živočichy třeba krmit. Dieta sestávající z jemně namleté rybí potravy, např. TetraMin®, může sloužit jako dodatečná výživa (8); Klerks 1994, osobní sdělení. Rychlosti krmení by měly zajistit dostatečný růst a rozmnožování a udržet vývoj amoniaku a růst hub v kultuře na minimu. Potrava může být podávána dvakrát týdně (např. 0,6–0,8 mg na cm^2 povrchu sedimentu). Praktické zkušenosti ukázaly, že aplikace potravy suspendované a homogenizované v deionizované vodě může usnadnit homogenní distribuci potravy na povrchu sedimentu v kultivačních nádobách.

Aby se zabránilo akumulaci amoniaku, musí se voda nad sedimentem vyměňovat za použití průtočného systému nebo alespoň jednou týdně manuálně. Sediment by se měl měnit každé tři měsíce v zásobních kulturách.

Vzorkování živočichů z kultury se může provádět prosíváním kultivačního sedimentu přes 1 mm síto, jsou-li požadováni pouze dospělí jedinci. Pro uchování kokonů se používá velikost ok 0,5 mm a pro mláďata 0,25 mm. Síta je možné umístit do rekonstituované vody poté, co skrz ně prošel sediment. Zkušební živočichové opustí pletivo a mohou pak být vybráni z vody použitím měkké ocelové pinzety nebo pipety s hranami vyhlazenými v plamenu.

▼M6

Pouze neporušené a jasně identifikované vzorky *Tubifex tubifex* (např. (64)) se použijí pro začátek zkoušky nebo pro nové kultury. Nemocné nebo zraněné jedince, stejně jako kokony zamořené houbovými vlákny je třeba vyhodit.

Synchronizovaná kultura může poskytnout jedince určitého stáří ve vhodných intervalech podle požadavku. Nádoby s novými kulturami jsou připraveny ve zvolených intervalech (např. každé dva týdny), počínaje živočichy určitého stáří (např. kokony). Za kultivačních podmínek zde popsaných organismy dospějí po 8–10 týdnech. Kultury mohou být sklizeny, když dospělci nakladli nové kokony, např. po deseti týdnech. Vzorky dospělců se mohou použít pro zkoušky a s kokony se mohou zahájit nové kultury.

***Lumbriculus variegatus* (MÜLLER), žížalicovití, máloštětinatci**

Lumbriculus variegatus (žížalicovití, máloštětinatci) jsou rovněž obyvateli sladkovodních sedimentů po celém světě a jsou široce použitelní v ekotoxikologických zkouškách. Informace o biologii, kultivačních podmínkách a citlivosti druhu lze získat v (1)(6)(9)(36). *Lumbriculus variegatus* může být rovněž kultivován v umělém sedimentu doporučeném pro *T. tubifex* podle (8) v rámci určitých omezení. Jelikož *L. variegatus* preferuje v přírodě hrubší sedimenty než *T. tubifex (59)*, laboratorní kultury s umělým sedimentem použité pro *T. tubifex* mohou zaniknout po 4 až 6 měsících. Praktické zkušenosti ukázaly, že *L. variegatus* se dá držet v písečném substrátu (např. křemenný písek, jemný štěrk) v průtočném systému za použití rybí potravy jako nutričního zdroje po řadu let bez obnovování substrátu. Hlavní výhodou *L. variegatus* oproti jiným vodním druhům máloštětinatců je jeho rychlé rozmnožování s následným rychlým nárůstem biomasy u laboratorně kultivovaných populací (1)(6)(9)(10).

Metody kultivace

Kultivační podmínky pro *Lumbriculus variegatus* jsou podrobně uvedeny ve Phipps a kol. (1993) (10), Brunson a kol. (1998) (28), ASTM (2000) (1), U.S. EPA (2000) (6). Krátký souhrn těchto podmínek je uveden dále.

Živočichy lze kultivovat ve velkých akváriích (57–80 l) při 23 °C s fotoperiodou 16 h světlo: 8 h tma (100–1 000 lux) použitím denně vyměňované přírodní vody (45–50 l na akvárium). Substrát se připraví tak, že se nařežou ručníky z neběleného hnědého papíru na proužky, které se pak mohou míchat s kultivační vodou po dobu několika vteřin, čímž se získá papírový substrát s malými kousky. Tento substrát pak lze přímo použít v akváriu s kulturou *Lumbriculus* pokrytím plochy dna nádrže nebo je lze skladovat zmražené v deionizované vodě pro pozdější použití. Nový substrát v nádrži obecně vydrží po dobu přibližně dvou měsíců.

Každá kultura živočichů je zahájena s 500–1 000 jedinci krmenými 10 ml suspenze obsahující 6 g krmiva pro mladé lososovité ryby 3krát týdně za obnovovacích podmínek nebo podmínek průtokové kultivace. V případě statických nebo semistatických kultur se aplikují nižší rychlosti krmení, aby se zabránilo růstu bakterií a hub. Potravu a papírový substrát je třeba analyzovat na látky používané v bioakumulačních zkouškách.

Za těchto podmínek se počet jedinců v kultuře obecně zdvojnásobí během přibližně 10 až 14 dnů.

Lumbriculus variegatus se může vyjmout z kultur, např. přenesením substrátu pomocí sítě s jemnými oky nebo organismů použitím skleněné pipety s širokým ústím protaženým plamenem (přibližně 5 mm v průměru) do samostatné kádinky. Jestliže je substrát rovněž přemístěn do této kádinky, ponechá se kádinka obsahující organismy a substrát přes noc za podmínek průtokové kultivace, čímž

▼M6

se z kádinky vyplaví substrát, zatímco organismy zůstanou na dně nádoby. Pak je možné je vložit do nově připravených kultivačních nádrží nebo je dále zpracovat pro zkoušku, jak je ukázáno v (1) a (6). Při zacházení s těmito jedinci je třeba zabránit zranění nebo oddělení části těla, např. použitím pipet s hranami protaženými plamenem nebo pinzet z nerezové oceli.

Problémem, na který je třeba kriticky pohlížet při použití druhu *L. variegatus* ve zkouškách bioakumulace sedimentů, je jeho způsob rozmnožování (architomie následovaná morfalaxí). Tato nepohlavní rozmnožování vyústí ve dva fragmenty, které nepřijímají potravu po určitou dobu, než zregeneruje hlavová nebo ocasní část (např. (36)(37)). To znamená, že u *L. variegatus* nemusí docházet k příjmu sedimentu a příměsí prostřednictvím pojídání průběžně jako u nítěnkovitých, kteří se nerozmnožují dělením.

Proto je třeba provést synchronizaci, aby se minimalizovalo nekontrolované rozmnožování a regenerace a následné velké odchylky ve výsledcích zkoušky. Takové odchylky mohou nastat, když někteří jedinci, kteří se rozdělili, a proto po určitou dobu nepřijímají potravu, jsou méně vystaveni zkoušené chemické látce než jiní jedinci, kteří se nedělí během zkoušky, např. (38). 10 až 14 dní před začátkem expozice by organismy měly být rozděleny (synchronizace) (65). Použijí se velcí jedinci, kteří přednostně nevykazují známky nedávného dělení. Tito jedinci mohou být umístěni na skleněnou plošku do kapky kultivační vody a rozříznuti v oblasti středu těla pomocí skalpelu. Je třeba dbát na to, aby zadní konce byly podobně veliké. Zadní konce se pak ponechají, aby regenerovaly nové hlavy v kultivační nádobě obsahující stejný substrát, jaký je použitý v kultuře a rekonstituované vodě až do začátku expozice. Regenerace nových hlav je indikována, když se synchronizovaní jedinci zavrtávají do substrátu (přítomnost regenerovaných hlav může být potvrzena pozorováním reprezentativních dílčích vzorků pod binokulárním mikroskopem). Očekává se, že zkušební organismy budou poté v podobném fyziologickém stavu. To znamená, že když k regeneraci morfalaxí dojde u synchronizovaných jedinců během zkoušky, předpokládá se, že v podstatě všichni živočichové budou stejně vystaveni obohacenému sedimentu. Krmení synchronizovaných jedinců je třeba provádět, jakmile se začnou zavrtávat do substrátu, nebo 7 dní po disekci. Krmný režim by měl být srovnatelný se standardními kulturami; dá se však doporučit, aby synchronizovaní jedinci byli krmeni ze stejného zdroje potravy, jaký bude použit při zkoušce. Živočichy je třeba držet při zkušební teplotě při 20 ± 2 °C. Po regeneraci se neporušení kompletní jedinci podobné velikosti, kteří aktivně plavou nebo se plazí při jemném mechanickém podnětu, použijí pro zkoušku. Při zacházení s těmito jedinci je třeba zabránit jejich poranění nebo autotomii, např. použitím pipet s hranami protaženými plamenem nebo pinzet z nerezové oceli.

Při použití *Lumbriculus variegatus* ve zkoušce by vzhledem ke specifickému způsobu rozmnožování tohoto druhu mělo během zkoušky dojít k nárůstu počtu jedinců, jsou-li příslušné podmínky (6). Absence rozmnožování při bioakumulační zkoušce s *L. variegatus* se musí zaznamenat a vzít v úvahu při interpretaci výsledků zkoušky.

***Branchiura sowerbyi* (BEDDARD), nítěnkovití, máloštětinatci (není validována okružním testem)**

Branchiura sowerbyi obývají rozličné typy sedimentů v nádržích, jezerech, rybnících a řekách, původně v tropických oblastech. Lze se s nimi rovněž setkat v teplých vodních plochách severní polokoule. Jsou však početnější v bahnitojílovitých sedimentech s vysokým obsahem organické hmoty. Kromě toho tyto organismy žijí ve vrstvě sedimentu. Dokonce i jejich zadní konec je obvykle zavrtán. Tento druh se dá snadno identifikovat podle žábrových vláken na jejich

▼M6

zadní části. Dospělí jedinci mohou dosáhnout délky 9–11 cm a mokré hmotnosti 40–50 mg. *Branchiura sowerbyi* mají vysokou rychlost rozmnožování, vykazují časy zdvojnásobení populace kratší než 2 týdny a za podmínek teploty a krmení popsaných níže (Aston a kol., 1982, (65)). Druh *B. sowerbyi* byl použit jak ve studiích toxicity, tak bioakumulace (Marchese & Brinkhurst 1996, (31) Roghair a kol. 1996, (67)).

Metody kultivace

Souhrn kultivačních podmínek pro *Branchiura sowerbyi* je uveden níže (poskytnuto Mercedes R. Marchese, INALI, Argentina, a Carla J. Roghair, RIVM, Nizozemsko).

Není požadována žádná jednotlivá technika kultivace zkušebních organismů. Organismy je možné kultivovat použitím nekontaminovaného přírodního sedimentu (31). Praktické zkušenosti ukázaly, že médium sestávající z přírodního sedimentu a písku zlepšuje stav organismů ve srovnání s čistým přírodním sedimentem (32)(67). Pro kultivaci je možné použít 3 l kádinky obsahující 1 500 ml média sediment/voda, sestávající z 375 ml přírodního nekontaminovaného sedimentu (přibližně 10 % celkového organického uhlíku; přibližně 17 % částic ≤ 63 μm), 375 ml čistého písku (M32) a 750 ml rekonstituované nebo dechlorované vodovodní vody (31)(32)(67). Jako substrát pro kultivaci se rovněž dají použít papírové ručníky, ale růst populace je nižší než v přírodním sedimentu. V semistatických systémech se vodní vrstva v kádince pomalu provzdušňuje a překrývající vodu je třeba obnovovat každý týden.

Každá kádinka obsahuje pro začátek 25 mladých jedinců. Po dvou měsících se velcí jedinci vyjmou ze sedimentu pomocí pinzety a vloží do nové kádinky s čerstvě připraveným médiem sediment/voda. Stará kádinka rovněž obsahuje kokony a mladé jedince. Tímto způsobem lze získat až 400 mladých jedinců na kádinku. Dospělci se dají použít pro rozmnožování po dobu alespoň jednoho roku.

Kultury je třeba uchovávat při teplotě 21 až 25 °C. Výchylky teploty by se měly udržovat pod ± 2 °C. Čas potřebný pro vývoj embryí z vajíček nakladených dokud mláďata neopustí kokony, je přibližně tři týdny při 25 °C. Bylo zjištěno, že produkce vajíček získaných na přeživšího dospělce v *B. sowerbyi* je v rozmezí od 6,36 (31) do 11,2 (30) v bahně při 25 °C. Počet vajíček na kokon je v rozmezí od 1,8 do 2,8 (66)(69) nebo až do 8 (68).

Každý týden se musí měřit rozpuštěný kyslík, tvrdost vody, teplota a pH. Rybí potrava (např. TetraMin®) se může podávat jako suspenze dvakrát nebo třikrát týdně *ad libitum*. Živočichové mohou být rovněž krmeni rozmraženým hlávkovým salátem dle libosti.

Hlavní výhodou tohoto druhu je vysoká individuální biomasa (až 40–50 mg mokré hmotnosti na jedince). Proto se tento druh dá použít pro zkoušení bioakumulace radioizotopově neznačených zkoušených látek. Může být exponován v systémech používaných pro *T. tubifex* nebo *L. variegatus* s jedním jedincem na opakování (11). Počet opakování však musí potom být zvýšeno, pokud se nepoužijí větší zkušební komory (11). Pro tento druh je rovněž třeba nastavit kritérium platnosti ve vztahu k chování se zavrtáváním.

▼**M6**

LITERATURA

1) ASTM International (2000). Standard guide for the determination of the bioaccumulation of sediment-associated contaminants by benthic invertebrates, E 1688-00a. In ASTM International 2004 Annual Book of Standards. Volume 11.05. Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides. ASTM International, West Conshohocken, PA.

2) European Commission (EC) (2003). Technical Guidance Document on Risk Assessment in support of Commission Directive 93/67/EEC on Risk Assessment for new notified substances, Commission Regulation (EC) No 1488/94 on Risk Assessment for existing substances and Directive 98/8/EC of the European Parliament and of the Council concerning the placing of biocidal products on the market; Part I – IV. Office for Official Publications of the European Communities, Luxembourg.

3) OECD (1992a). Report of the OECD workshop on effects assessment of chemicals in sediment. OECD Monographs No. 60. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), Paris.

4) Ingersoll, C.G., Ankley, G.T., Benoit D.A., Brunson, E.L., Burton, G.A., Dwyer, F.J., Hoke, R.A., Landrum, P. F., Norberg-King, T. J. and Winger, P.V. (1995). Toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants using freshwater invertebrates: A review of methods and applications. Environ. Toxicol. Chem. 14, 1885-1894.

5) Kapitola C.13 této přílohy, Bioakumulace: Průtoková zkouška na rybách.

6) U.S. EPA (2000). Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates. Second Edition. EPA 600/R-99/064, U.S. Environmental Protection Agency, Duluth, MN, March 2000.

7) Kapitola C.27 této přílohy, Test toxicity na Chironomidae v systému sediment-voda za použití obohaceného sedimentu

8) Egeler, Ph., Römbke, J., Meller, M., Knacker, Th., Franke, C., Studinger, G. & Nagel, R. (1997). Bioaccumulation of lindane and hexachlorobenzene by tubificid sludgeworms (Oligochaeta) under standardised laboratory conditions. Chemosphere 35, 835-852.

9) Ingersoll, C.G., Brunson, E.L., Wang N., Dwyer, F.J., Ankley, G.T., Mount D.R., Huckins J., Petty. J. and Landrum, P. F. (2003). Uptake and depuration of nonionic organic contaminants from sediment by the oligochaete, Lumbriculus variegatus. Environmental Toxicology and Chemistry 22, 872-885.

10) Phipps, G.L., Ankley, G.T., Benoit, D.A. and Mattson, V.R. (1993). Use of the aquatic Oligochaete Lumbriculus variegatus for assessing the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants. Environ.Toxicol. Chem. 12, 269-279.

11) Egeler, Ph., Römbke, J., Knacker, Th., Franke, C. & Studinger, G. (1999). Workshop on „Bioaccumulation: Sediment test using benthic oligochaetes“, 26.-27.04.1999, Hochheim/Main, Germany. Report on the R+D-project No. 298 67 419, Umweltbundesamt, Berlin.

12) Egeler, Ph., Meller, M., Schallnaß, H.J. & Gilberg, D. (2006). Validation of a sediment bioaccumulation test with endobenthic aquatic oligochaetes by an international ring test. Report to the Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Dessau), R&D No.: 202 67 437.

13) Kelly, J.R., Levine, S.N., Buttel, L.A., Kelly, A.C., Rudnick, D.T. & Morton, R.D. (1990). Effects of tributyltin within a Thalassia seagrass ecosystem. Estuaries 13, 301-310.

▼**M6**

14) Nendza, M. (1991). QSARs of bioaccumulation: Validity assessment of log Kow/log BCF correlations. In: R. Nagel and R. Loskill (eds.): Bioaccumulation in aquatic systems. Contributions to the assessment. Proceedings of an international workshop, Berlin 1990. VCH, Weinheim

15) Landrum, P.F., Lee II, H., & Lydy, M.J. (1992). Toxicokinetics in aquatic systems: Model comparisons and use in hazard assessment. Environ. Toxicol. Chem. 11, 1709-1725.

16) Markwell, R.D., Connell, D.W. & Gabric, A.J. (1989). Bioaccumulation of lipophilic compounds from sediments by oligochaetes. Wat. Res. 23, 1443-1450.

17) Gabric, A.J., Connell, D.W. & Bell, P.R.F. (1990). A kinetic model for bioconcentration of lipophilic compounds by oligochaetes. Wat. Res. 24, 1225-1231.

18) Kukkonen, J. and Landrum, P.F. (1994). Toxicokinetics and toxicity of sediment-associated Pyrene to Lumbriculus variegatus (Oligochaeta). Environ. Toxicol. Chem. 13, 1457-1468.

19) Franke, C., Studinger, G., Berger, G., Böhling, S., Bruckmann, U., Cohors-Fresenborg, D. and Jöhncke, U. (1994). The assessment of bioaccumulation. Chemosphere 29, 1501-1514.

20) OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 23.

21) U.S. EPA (1996). Special Considerations for Conducting Aquatic Laboratory Studies. Ecological Effects Test Guidelines. OPPTS 850.1000. Public Draft. EPA 712-C-96-113. U.S. Environmental Protection Agency.

22) Následující kapitoly této přílohy:

Kapitola A.4, Tlak par

Kapitola A.5, Povrchové napětí

Kapitola A.6, Rozpustnost ve vodě

Kapitola A.8, Rozdělovací koeficient, metoda třepací láhve

Kapitola A.24, Rozdělovací koeficient, metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie

Kapitola C.7, Rozklad — Abiotický rozklad – hydrolýza jako funkce pH

Kapitola C.4 A–F Stanovení snadné biologické rozložitelnosti

Kapitola C.19, Odhad adsorpčního koeficientu (K_{OU}) pro půdy a čistírenské kaly pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC)

Kapitola C.29, Hodnocení snadné biologické rozložitelnosti – uvolňování CO_2 v těsně uzavřených lahvičkách

23) OECD (1996). Direct phototransformation of chemicals in water. Environmental Health and Safety Guidance Document Series on Testing and Assessment of Chemicals No. 3. OECD, Paris.

24) Antoine, M.D., Dewanathan, S. & Patonay, G. (1991). Determination of critical micelles concentration of surfactants using a near-infrared hydrophobicity probe. Microchem. J. 43, 165-172.

▼M6

25) Beek, B., S. Boehling, U. Bruckmann, C. Franke, U. Joehncke & G. Studinger (2000). The assessment of bioaccumulation. In Hutzinger, O. (editor), The Handbook of Environmental Chemistry, Vol. 2 Part J (Vol. editor: B. Beek): Bioaccumulation – New Aspects and Developments. Springer-Verlag Berlin Heidelberg: 235-276.

26) Spacie, A. & Hamelink, J.L. (1982). Alternative models for describing the bioconcentration of organics in fish. Environ. Toxicol. Chem. 1, 309-320.

27) Hawker, D.W. & Connell, D.W. (1988). Influence of partition coefficient of lipophilic compounds on bioconcentration kinetics with fish. Wat. Res. 22, 701-707.

28) Brunson, E.L., Canfield, T.J., Ingersoll, C.J. & Kemble, N.E. (1998). Assessing the bioaccumulation of contaminants from sediments of the Upper Mississippi river using field-collected oligochaetes and laboratory-exposed Lumbriculus variegatus. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 35, 191-201.

29) Reynoldson, T.B., Thompson, S.P. and Bamsey, J.L. (1991). A sediment bioassay using the tubificid oligochaete worm Tubifex tubifex. Environ. Toxicol. Chem. 10, 1061-1072.

30) Aston, R.J. & Milner, A.G.P. (1981). Conditions for the culture of Branchiura sowerbyi (Oligochaeta: Tubificidae) in activated sludge. Aquaculture 26, 155-160.

31) Marchese, M.R. & Brinkhurst, R.O. (1996). A comparison of two tubificid species as candidates for sublethal bioassay tests relevant to subtropical and tropical regions. Hydrobiologia 334, 163-168.

32) Roghair, C.J. & Buijze, A. (1994). Development of sediment toxicity tests. IV. A bioassay to determine the toxicity of field sediments to the oligochaete worm Branchiura sowerbyi. RIVM Report 719102027.

33) Kapitola C.1 této přílohy, Akutní toxicita pro ryby.

34) OECD (1992c). Guidelines for Testing of Chemicals No. 210. Fish, Early-life Stage Toxicity Test. OECD, Paris.

35) Kaster, J.L., Klump, J.V., Meyer, J., Krezoski, J. & Smith, M.E. (1984). Comparison of defecation rates of Limnodrilus hoffmeisteri using two different methods. Hydrobiologia 11, 181-184.

36) Leppänen, M.T. & Kukkonen, J.V.K. 1998: Factors affecting feeding rate, reproduction and growth of an oligochaete Lumbriculus variegatus (Müller). Hydrobiologia 377: 183-194.

37) Leppänen, M.T. & Kukkonen, J.V.K. 1998: Relationship between reproduction, sediment type and feeding activity of Lumbriculus variegatus (Müller): Implications for sediment toxicity testing. Environ. Toxicol. Chem. 17: 2196-2202.

38) Leppänen M.T. & Kukkonen J.V.K. (1998). Relative importance of ingested sediment and porewater as bioaccumulation routes for pyrene to oligochaete (Lumbriculus variegatus, Müller). Environ. Sci. Toxicol. 32, 1503-1508.

39) Martinez-Madrid, M., Rodriguez, P., Perez-Iglesias, J.I. & Navarro, E. (1999). Sediment toxicity bioassays for assessment of contaminated sites in the Nervion river (Northern Spain). 2. Tubifex tubifex (Müller) reproduction sediment bioassay. Ecotoxicology 8, 111-124.

▼**M6**

40) Kapitola C.8 této přílohy, Toxicita pro žížaly.

41) Environment Canada (1995). Guidance document on measurement of toxicity test precision using control sediments spiked with a reference toxicant. Environmental Protection Series Report EPS 1/RM/30.

42) Landrum, P.F. (1989). Bioavailability and toxicokinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons sorbed to sediments for the amphipod Pontoporeia hoyi. Environ. Sci. Toxicol. 23, 588-595.

43) Poddubnaya, T.L. (1980). Life cycles of mass species of Tubificidae (Oligochaeta). In: R.O. Brinkhurst and D.G. Cook (eds.): Aquatic Oligochaeta Biology, 175-184. Plenum Press, New York.

44) ASTM (1998). Standard guide for collection, storage, characterisation, and manipulation of sediment for toxicological testing. American Society for Testing and Materials, E 1391-94.

45) Hooftman, R.N., van de Guchte, K. & Roghair, C.J. (1993). Development of ecotoxicological test systems to assess contaminated sediments. Joint report no. 1: Acute and (sub)chronic tests with the model compound chlorpyrifos. RIVM-719102022.

46) Franke, C. (1996). How meaningful is the bioconcentration factor for risk assessment?. Chemosphere 32, 1897-1905.

47) Mount, D.R., Dawson, T.D. & Burkhard, L.P. (1999). Implications of gut purging for tissue residues determined in bioaccumulation testing of sediment with Lumbriculus variegatus. Environ. Toxicol. Chem. 18, 1244-1249.

48) Randall, R.C., Lee II, H., Ozretich, R.J., Lake, J.L. & Pruell, R.J. (1991). Evaluation of selected lipid methods for normalising pollutant bioaccumulation. Environ.Toxicol. Chem. 10, 1431-1436.

49) Gardner, W.S., Frez, W.A., Cichocki, E.A. & Parrish, C.C. (1985). Micromethods for lipids in aquatic invertebrates. Limnology and Oceanography, 30, 1099-1105.

50) Bligh, E.G. & Dyer, W.J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. Can. J. Biochem. Physiol. 37, 911-917.

51) De Boer, J., Smedes, F., Wells, D. & Allan, A. (1999). Report on the QUASH interlaboratory study on the determination of total-lipid in fish and shellfish. Round 1 SBT-2. Exercise 1000. EU, Standards, Measurement and Testing Programme.

52) Kristensen, P. (1991). Bioconcentration in fish: comparison of bioconcentration factors derived from OECD and ASTM testing methods; influence of particulate matter to the bioavailability of chemicals. Water Quality Institute, Denmark.

53) Zok, S., Görge, G., Kalsch, W. & Nagel, R. (1991). Bioconcentration, metabolism and toxicity of substituted anilines in the zebrafish (Brachydanio rerio). Sci. Total Environment 109/110, 411-421

54) Nagel, R. (1988). Umweltchemikalien und Fische – Beiträge zu einer Bewertung. Habilitationsschrift, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, Germany.

55) Janssen, M.P.M., A Bruins, T.H. De Vries & Van Straalen, N.M. (1991). Comparison of cadmium kinetics in four soil arthropod species. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 20: 305-312.

56) Van Brummelen, T.C. & Van Straalen, N.M. (1996). Uptake and elimination of benzo(a)pyrene in the terrestrial isopod Porcellio scaber. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 31: 277-285.

▼**M6**

57) Sterenborg, I., Vork, N.A., Verkade, S.K., Van Gestel, C.A.M. & Van Straalen, N.M. (2003). Dietary zinc reduces uptake but not metallothionein binding and elimination of cadmium in the springtail Orchesella cincta. Environ. Toxicol. Chemistry 22: 1167-1171.

58) Suedel, B.C. and Rodgers, J.H. (1993). Development of formulated reference sediments for freshwater and estuarine sediment testing. Environ. Toxicol. Chem. 13, 1163-1175.

59) Wachs, B. (1967). Die Oligochaeten-Fauna der Fließgewässer unter besonderer Berücksichtigung der Beziehung zwischen der Tubificiden-Besiedlung und dem Substrat. Arch. Hydr. 63, 310-386.

60) Oliver, B. G. (1987). Biouptake of chlorinated hydrocarbons from laboratory-spiked and field sediments by oligochaete worms. Environ. Sci. Technol. 21, 785-790.

61) Chapman, P.M., Farrell, M.A. & Brinkhurst, R.O. (1982a). Relative tolerances of selected aquatic oligochaetes to individual pollutants and environmental factors. Aquatic Toxicology 2, 47-67.

62) Chapman, P.M., Farrell, M.A. & Brinkhurst, R.O. (1982b). Relative tolerances of selected aquatic oligochaetes to combinations of pollutants and environmental factors. Aquatic Toxicology 2, 69-78.

63) Rodriguez, P. & Reynoldson, T.B. (1999). Laboratory methods and criteria for sediment bioassessment. In: A. Mudroch, J.M. Azcue & P. Mudroch (eds.): Manual of Bioassessment of aquatic sediment quality. Lewis Publishers, Boca Raton, CRC Press LLC.

64) Brinkhurst, R.O. (1971). A guide for the identification of British aquatic oligochaeta. Freshw. Biol. Assoc., Sci. Publ. No. 22.

65) Egeler, Ph., Meller, M., Schallnaß, H.J. & Gilberg, D. (2005). Validation of a sediment toxicity test with the endobenthic aquatic oligochaete Lumbriculus variegatus by an international ring test. In co-operation with R. Nagel and B. Karaoglan. Report to the Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Berlin), R&D No.: 202 67 429.

66) Aston, R.J., Sadler, K. & Milner, A.G.P. (1982). The effect of temperature on the culture of Branchiura sowerbyi (Oligochaeta: Tubificidae) on activated sludge. Aquaculture 29, 137-145.

67) Roghair, C.J., Buijze, A., Huys, M.P.A., Wolters-Balk, M.A.H., Yedema, E.S.E. & Hermens, J.L.M. (1996). Toxicity and toxicokinetics for benthic organisms; II: QSAR for base-line toxicity to the midge Chironomus riparius and the tubificid oligochaete worm Branchiura sowerbyi. RIVM Report 719101026.

68) Aston, R.J. (1984). The culture of Branchiura sowerbyi (Tubificidae, Oligochaeta) using cellulose substrate. Aquaculture 40, 89-94.

69) Bonacina, C., Pasteris, A., Bonomi, G. & Marzuoli, D. (1994). Quantitative observations on the population ecology of Branchiura sowerbyi (Oligochaeta, Tubificidae). Hydrobiologia, 278, 267-274.

▼M7

C.47. ZKOUŠKA TOXICITY NA RYBÁCH V RANÉM STADIU ŽIVOTA

ÚVOD

1. Tato zkušební metoda je rovnocenná Pokynu OECD pro zkoušení (TG) č. 210 (2013). Cílem zkoušek s rybami v raném stadiu života je určit letální a subletální účinky chemických látek na zkoušená stadia a druhy. Poskytují cenné informace pro odhad chronických letálních a subletálních účinků dané chemické látky na jiné druhy ryb.

2. Pokyn pro zkoušení č. 210 vychází z návrhu Spojeného království, který byl projednán na schůzce odborníků OECD v listopadu 1988 v Medmenhamu (Spojené království) a dále aktualizován v roce 2013 s cílem zohlednit zkušenosti s používáním této zkoušky a z doporučení ze semináře OECD o zkoušení toxicity na rybách, který se konal v září 2010 (1).

PODSTATA ZKOUŠKY

3. Ryby v raném stadiu života jsou vystaveny různým koncentracím zkoušené chemické látky rozpuštěné ve vodě. Upřednostňují se průtokové podmínky; není-li to možné, přijatelné jsou semistatické podmínky. Pro více podrobností by měl být konzultován dokument OECD ke zkoušení toxicity obtížných látek a směsí ve vodním prostředí (2). Zkouška se zahájí vložením oplodněných jiker do zkušebních komor a pokračuje po určitou dobu specifickou pro jednotlivé druhy ryb, která je nezbytná k tomu, aby ryby v kontrolách dosáhly životního stadia nedospělých ryb. Posoudí se letální a subletální účinky a porovnají se s hodnotami kontroly, aby se stanovila nejnižší koncentrace s pozorovaným účinkem (LOEC) s cílem stanovit i) koncentraci bez pozorovaných účinků (NOEC) a/nebo ii) hodnotu EC_x (např. EC_{10}, EC_{20}) pomocí regresního modelu pro odhadování koncentrace, která by způsobila x % změnu měřeného účinku. Vykazování příslušných koncentrací vyvolávajících účinky a příslušných parametrů může záviset na regulačním rámci. Hodnota ECx by se měla nacházet mezi zkušebními koncentracemi, aby hodnota ECx vycházela spíše z interpolace než extrapolace (definice viz dodatek 1).

INFORMACE O ZKOUŠENÉ CHEMICKÉ LÁTCE

4. Zkoušenou chemickou látkou se rozumí to, co se zkouší. Měly by být známy rozpustnost zkoušené chemické látky ve vodě (viz kapitola A.6 této přílohy) a tlak jejích par a měla by být k dispozici spolehlivá analytická metoda pro stanovení množství chemické látky ve zkušebních roztocích, a to se známou a doloženou přesností a známou mezí stanovitelnosti. Ačkoli pro provedení této zkoušky není nezbytná zkouška akutní toxicity, mohou výsledky zkoušky akutní toxicity (viz kapitoly C.1 nebo C.49 této přílohy), nejlépe vykonané s druhem zvoleným pro tuto zkoušku, poskytnout užitečné informace.

5. Použije-li se tato zkušební metoda ke zkoušení směsi, mělo by být v co možná největší míře charakterizováno její složení, např. chemickou identitou složek, jejich kvantitativním výskytem a vlastnostmi v dané látce (jako jsou vlastnosti uvedené výše). Před použitím zkušební metody na zkoušení směsi pro regulační účely by mělo být zváženo, zda poskytne přijatelné výsledky pro zamýšlený regulační účel.

6. Dalšími užitečnými informacemi jsou strukturní vzorec, čistota chemické látky, její rozpustnost ve vodě, stabilita ve vodě a na světle, hodnoty pK_a, P_{ow} a výsledky zkoušky snadné biologické rozložitelnosti (např. kapitoly C.4 nebo C.29 této přílohy).

▼M7

PLATNOST ZKOUŠKY

7. Má-li být zkouška platná, musí být splněny tyto podmínky:

— koncentrace rozpuštěného kyslíku by po celou dobu zkoušky měla být > 60 % nasycení vzduchem,

— teplota vody by se po celou dobu zkoušky neměla mezi zkušebními nádržemi nebo mezi po sobě jdoucími dny lišit o více než ± 1,5 °C a měla by být udržována v rozpětí teplot stanoveném pro zkušební druh (dodatek 2),

— analytické stanovení zkušebních koncentrací je povinné,

— celková míra přežití oplodněných jiker a zdárný vývoj po vylíhnutí by v kontrolách a případně také v kontrolách s rozpouštědlem měla být rovna limitům stanoveným v dodatku 2 nebo vyšší.

8. Je-li zjištěna menší odchylka od kritérií platnosti, měly by být zváženy důsledky z hlediska spolehlivosti zkušebních údajů a tyto úvahy by měly být zahrnuty do zpráv. Účinky na přežití, na vylíhnutí nebo na růst, které se vyskytnou v kontrole s rozpouštědlem oproti negativní kontrole, by měly být uvedeny ve zprávě a podrobeny rozboru z hlediska spolehlivostí údajů ze zkoušky.

POPIS METODY

Zkušební komory

9. Lze použít nádoby ze skla, nerezové oceli nebo z jiného chemicky inertního materiálu. Jelikož o silikonu je známo, že má silnou schopnost absorbovat lipofilní látky, mělo by být použití silikonových trubek v průtokových studiích a použití silikonového těsnění ve styku s vodou minimalizováno např. použitím monoblokových skleněných akvárií. Rozměry nádob by měly být dostatečně velké, aby umožňovaly řádný růst ryb v kontrolách, udržení koncentrace rozpuštěného kyslíku (např. pro malé druhy ryb se toho dosáhne nádrží o objemu 7 l) a dodržení kritérii obsádky, která jsou uvedena v odstavci 19. Je žádoucí, aby komory byly umístěny ve zkušebním prostoru náhodně. Pro zcela náhodné uspořádání se upřednostňuje náhodně blokové uspořádání, při kterém je každá expozice přítomna v každém bloku. Zkušební komory by měly být chráněny před nežádoucími rušivými vlivy. Před zavedením zkušebních organismů by zkušební systém měl být po dostatečně dlouhou dobu kondicionován s koncentracemi zkoušené chemické látky, aby byly prokázány stálé zkušební koncentrace.

Výběr druhu

10. Doporučené druhy ryb jsou uvedeny v tabulce 1. To nevylučuje použití i jiných druhů, avšak zkušební postup musí být upraven, aby byly vytvořeny vhodné zkušební podmínky. V takovém případě by měly být uvedeny důvody pro výběr druhu a experimentální metoda.

Chov matečných ryb

11. Podrobnosti o chovu matečných ryb za uspokojivých podmínek lze nalézt v dodatku 3 a v citovaných odkazech (3) (4) (5).

Chov oplodněných jiker, embryí a plůdků

12. Oplodněné jikry, embrya a plůdky mohou být uvnitř hlavní nádrže nejprve exponovány v menších nádobách ze skla nebo nerezové oceli s pletivovými stěnami nebo konci, aby nádobami mohl proudit roztok zkoušené chemické

▼M7

látky. Nevířivého průtoku těmito malými nádobami lze dosáhnout jejich zavěšením do ramen, pomocí nichž lze pohybovat nádobami nahoru a dolů, přičemž organismy zůstanou stále ponořeny. Oplodněné jikry lososovitých ryb mohou ležet na podložce nebo pletivu s dostatečně velkými oky, aby jimi mohly plůdky po vylíhnutí propadnout.

13. Jsou-li k odchovu jiker v hlavní nádobě použity nádoby, mřížky nebo pletiva, měly by být po vylíhnutí plůdků odstraněny v souladu s pokyny uvedenými v dodatku 3, pokud ovšem nemají být ponechány k zamezení úniku plůdků. Je-li třeba plůdky přemístit, neměly by být vystaveny vzduchu a k jejich vyjmutí z nádob by se neměly používat síťky. Načasování přemístění se liší podle druhu a mělo by být zdokumentováno ve zprávě. Přemístění však nemusí být vždy nutné.

Voda

14. Jako zkušební voda může být použita jakákoli voda, v níž zkušební druh dlouhodobě přežívá a roste (viz dodatek 4). Po celou dobu zkoušky by měla mít stejnou kvalitu. Pro ujištění, že ředicí voda nebude mít přílišný vliv na výsledky zkoušky (například tvorbou komplexů se zkoušenou látkou) nebo nepříznivý vliv na stav matečných ryb, by měly být odebírány v pravidelných intervalech její vzorky pro analýzu. Je-li kvalita ředicí vody relativně konstantní, mělo by být stanovení těžkých kovů (např. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni), hlavních aniontů a kationtů (např. Ca^{2+}, Mg^{2+}, Na^{+}, K^{+}, Cl^{-}, SO_4^{2-}), amoniaku, celkového obsahu zbytkových chlorových pesticidů, celkového obsahu organického uhlíku a suspendovaných látek provedeno např. s pololetní četností. Je-li voda proměnlivé kvality, musí se měření provádět častěji; četnost závisí na tom, jak proměnlivá je kvalita. Některé chemické charakteristiky doporučené ředicí vody jsou uvedeny v dodatku 4.

Zkušební roztoky

15. Při průtokových zkouškách je pro zajištění řady koncentrací nezbytný systém, který nepřetržitě dávkuje a ředí zásobní roztok zkoušené chemické látky (např. dávkovací čerpadlo, zařízení pro proporcionální ředění, sytící systém). Průtok zásobních roztoků a ředicí vody by měl být při zkoušce v určitých intervalech kontrolován a v jejím průběhu by se neměl měnit o více než 10 %. Jako vhodný byl shledán průtok odpovídající výměně alespoň pětinásobku objemu nádrže za 24 hodin (3). Je-li však dodržena velikost násady stanovená v odstavci 19, je možný menší průtok, např. odpovídající dvoj- až trojnásobku objemu zkušební nádrže, aby se zamezilo rychlému odstranění potravy.

16. Zkušební roztoky o zvolených koncentracích se připraví ředěním zásobního roztoku. Zásobní roztok by měl být připraven přednostně jednoduchým mechanickým mícháním nebo protřepáváním zkoušené chemické látky v ředicí vodě (např. mechanickým mícháním a/nebo pomocí ultrazvuku). Pro dosažení vhodné koncentrace zásobního roztoku mohou být použity sytící kolony nebo metody pasivního dávkování (6). Použití nosného rozpouštědla se nedoporučuje. Pokud je však rozpouštědlo nezbytné, měla by být souběžně nasazena kontrola s rozpouštědlem při stejné koncentraci rozpouštědla jako při expozicích chemické látce; tj. úroveň rozpouštědla by přednostně měla být stejná ve všech koncentracích i v kontrole s rozpouštědlem. U některých ředicích systémů by to mohlo být technicky obtížné, takže zde by koncentrace rozpouštědla v kontrole s rozpouštědlem měla odpovídat nejvyšší koncentraci rozpouštědla ve zkušební skupině. V případě chemických látek, jejichž zkoušení je obtížné, by měl být konzultován

▼M7

Pokyn
OECD (TG) č. 23 pro zkoušení toxicity složitých látek a směsí pro vodní organismy (2). Použije-li se rozpouštědlo, jeho volba se bude řídit chemickými vlastnostmi dané látky. Pokyn OECD (TG) č. 23 doporučuje maximální koncentraci 100 µl/l. Aby se zamezilo potenciálnímu účinku rozpouštědla na měřené ukazatele (7), doporučuje se udržovat koncentraci rozpouštědla co nejnižší.

17. Při semistatické zkoušce mohou být použity dva různé výměnné postupy: Buď se do čistých nádrží připraví nové zkušební roztoky a přežívající jikry a plůdky se do těchto nových nádrží opatrně přenesou, nebo se zkušební organismy ponechají ve zkušebních nádržích a vymění se určitý podíl (alespoň dvě třetiny) zkušebního roztoku v každé kontrolní nádrži.

POSTUP

Podmínky expozice

Doba trvání zkoušky

18. Zkouška se zahájí co nejdříve po oplodnění jiker, které se ponoří do zkušebních roztoků nejlépe ještě před započetím rýhování blastuly nebo co nejdříve po tomto stadiu. Doba trvání zkoušky bude záviset na použitém druhu. Některé doporučené doby trvání zkoušky jsou uvedeny v dodatku 2.

Nasazování

19. Počet oplodněných jiker na začátku zkoušky by měl dostatečný ke splnění statistických požadavků. Jikry by měly být náhodně rozděleny mezi varianty expozice a na každou koncentraci by mělo být použito nejméně 80 jiker, rovnoměrně rozdělených alespoň do čtyř paralelních zkušebních komor. Velikost násady (množství biomasy na jednotku objemu zkušebního roztoku) by měla být tak nízká, aby bez provzdušňování nádrží bylo možné ve stadiu jiker a plůdků udržet koncentrace rozpuštěného kyslíku alespoň na 60 % nasycení vzduchem. U průtokových zkoušek se doporučuje nasazování nepřekračující 0,5 g/l za 24 hodin a v žádném okamžiku nepřekračující 5 g/l roztoku (3).

Světlo a teplota

20. Fotoperioda a teplota vody by měly vyhovovat zkušebním druhům (viz dodatek 2).

Krmení

21. Potrava a krmení mají zásadní význam a v každém stadiu je nezbytné poskytovat vhodnou potravu v přiměřenou dobu a v množství dostatečném k podpoře normálního růstu. Krmení by ve všech opakováních mělo být přibližně stejné, pokud není upraveno v souvislosti s úhynem. Zbytky potravy a výkaly se, je-li to nutné, odstraní, aby nedošlo k hromadění odpadu. Podrobné režimy krmení jsou uvedeny v dodatku 3, ale s přibývajícími zkušenostmi se potrava a režimy krmení neustále zdokonalují s cílem zlepšit schopnost přežití a optimalizovat růst. Živá potrava představuje zdroj obohacení životního prostředí, a proto by měla být používána namísto suché nebo zmrazené potravy nebo jako doplněk k ní vždy, je-li to vhodné pro druh a životní stadium.

Zkušební koncentrace

22. Obvykle je nutných pět koncentrací zkoušené chemické látky s nejméně čtyřmi opakováními pro každou koncentraci, odstupňovaných podle konstantního faktoru, který nepřekračuje 3,2. Při výběru rozsahu zkušebních koncentrací by měly být zváženy, jsou-li k dispozici, informace o zkoušení akutní toxicity, přednostně se stejným druhem ryb, a/nebo test pro stanovení rozpětí dávek (1). Při výběru zkušebních koncentrací by však měly být zváženy všechny zdroje informací, včetně takových zdrojů, jako jsou např. analogický přístup a údaje ze zkoušek akutní toxicity na rybích embryích.

▼M7

Limitní zkouška nebo rozšířená limitní zkouška s méně než pěti koncentracemi, které se používají v hlavní zkoušce, může být přijatelná, mají-li být stanoveny pouze empirické hodnoty NOEC. Použití méně než pěti koncentrací by mělo být zdůvodněno. Koncentrace zkoušené chemické látky, které jsou vyšší než 96hodinová LC_{50} nebo vyšší než 10 mg/l, podle toho, co je nižší, nemusí být zkoušeny.

Kontroly

23. Kromě sérií s koncentracemi zkoušené chemické látky (viz odstavec 16) by měla být nasazena kontrola s ředicí vodou a podle potřeby kontrola s rozpouštědlem, která obsahuje pouze nosné rozpouštědlo.

Četnost analytických stanovení a měření

24. Před započetím předexpoziční doby je třeba zajistit řádné fungování systému dávkování chemických látek pro všechna opakování (například měřením zkušebních koncentrací). Měly by se definovat všechny analytické metody, které budou nezbytné, včetně příslušné meze stanovitelnosti (LOQ) a dostatečných znalostí o stabilitě chemických látek ve zkušebním systému. Pro charakterizaci expozice se koncentrace zkoušené látky během zkoušky stanovují v pravidelných intervalech. Nezbytným minimem je pět stanovení. Při průtokových systémech by měla být provedena analytická měření zkoušené chemické látky v jednom opakování na každou koncentraci alespoň jednou týdně za systematického střídání opakování. Další analytická stanovení často zlepší kvalitu výsledku zkoušky. Vzorky lze filtrovat (např. přes filtr s průměrem pórů 0,45 μm) nebo odstředit k odstranění veškerých částic, aby se zajistilo, že stanovení budou provedena na chemické látce ve skutečném roztoku. S cílem snížit adsorpci zkoušené chemické látky by filtry měly být před použitím nasyceny. Pokud naměřené koncentrace nezůstanou v rozmezí 80 až 120 % nominální koncentrace, měly by být stanoveny účinné koncentrace, vyjádřené ve vztahu k aritmetickému průměru koncentrace pro průtokové zkoušky (výpočet aritmetického průměru viz dodatek 6 zkušební metody C.20 (8)) a vyjádřené ve vztahu ke geometrickému průměru naměřených koncentrací pro semistatické zkoušky (viz kapitola v Pokynu OECD pro zkoušení toxicity složitých látek a směsí pro vodní organismy (2)).

25. V průběhu zkoušky se měří v každé zkušební nádobě množství rozpuštěného kyslíku, pH a teplota alespoň jednou týdně a salinita a tvrdost, je-li to požadováno, na počátku a na konci zkoušky. Teplota by se měla měřit nepřetržitě alespoň v jedné zkušební nádrži.

Pozorování

26. **Stadia vývoje embrya**: embryonální stadium na začátku expozice zkoušené chemické látce by mělo být identifikováno co nejpřesněji. Lze to provést za použití reprezentativního vzorku vhodně uchovávaných a očištěných jiker.

27. **Líhnutí a přežívání**: Líhnutí a přežívání se pozoruje alespoň jednou denně a zaznamenávají se počty. Zjistí-li se na jikrách mykóza v raném stadiu vývoje embryí (např. v den 1 nebo 2 zkoušky), tyto jikry se spočítají a odstraní. Uhynulá embrya, plůdky a nedospělé ryby se odstraní ihned po nalezení, neboť se mohou rychle rozkládat a činností ostatních ryb mohou být porušeny. Při odstraňování uhynulých jedinců se postupuje s mimořádnou opatrností, aby se fyzicky nepoškodily sousední jikry/plůdky. Příznaky úmrtí se liší podle druhu a životního stadia. Například:

▼M7

— u oplodněných jiker: zejména v raných stadiích zřetelná ztráta průsvitnosti a změna ve zbarvení vyvolaná koagulací a/nebo sražením bílkovin, které vedou k bílému zakalení,

— u embryí, plůdků a nedospělých ryb: nepohyblivost a/nebo absence dýchacích pohybů nebo tepu srdce a/nebo nedostatečná reakce na mechanické podněty.

28. **Neobvyklý vzhled**: počet plůdků nebo nedospělých ryb vykazujících neobvyklý tělesný vzhled se zaznamenává v přiměřených intervalech závisejících na trvání zkoušky a na povaze popisované abnormality. Je třeba si uvědomit, že neobvyklé plůdky a nedospělé ryby se vyskytují přirozeně a u některých druhů jich může být v kontrole (kontrolách) řádově několik procent. Jsou-li deformace a související neobvyklé chování považovány za tak závažné, že daný organismus je vystaven značnému utrpení a nevratným změnám, lze je ze zkoušky vyřadit. Taková zvířata je třeba usmrtit a pro účely následné analýzy údajů by s nimi mělo být zacházeno jako s uhynulými. U většiny druhů doporučených pro tuto zkušební metodu byl zdokumentován normální vývoj embryí (9) (10) (11) (12).

29. **Neobvyklé chování**: abnormality, např. hyperventilace, nekoordinované plavání, netypická nečinnost a netypické chování při krmení, se zaznamenávají v přiměřených intervalech závisejících na trvání zkoušky (např. jednou denně u teplovodních druhů). Tyto účinky, přestože je obtížné je kvantifikovat, mohou – jsou-li pozorovány – pomoci při interpretaci údajů o úhynu.

30. **Hmotnost**: na konci zkoušky se zváží všechny přežívající ryby alespoň v jednom opakování (zaznamená se počet ryb v opakování a střední hmotnost jedné ryby): upřednostňuje se živá hmotnost (po osušení do sucha), avšak uvedeny mohou být také údaje o suché hmotnosti (13).

31. **Délka**: na konci zkoušky se změří individuální délky. Doporučuje se použít celkovou délku, avšak došlo-li k uhnití ocasní ploutve nebo k erozi ploutví, lze použít standardní délku. Pro všechny ryby v dané zkoušce by měla být použita stejná metoda. Individuální délku lze měřit např. posuvným měřítkem, digitálním fotoaparátem nebo kalibrovaným okulárním mikrometrem. Typické minimální délky jsou uvedeny v dodatku 2.

ÚDAJE A PŘEDKLÁDÁNÍ ZPRÁV

Zpracování výsledků

32. Doporučuje se, aby uspořádání experimentu a výběr statistického testu umožnily dostatečnou průkaznost zkoušky (80 % nebo vyšší), aby se zjistily změny biologického významu v ukazatelích, u nichž má být uvedena hodnota NOEC. Vykazování příslušných koncentrací vyvolávajících účinky a příslušných parametrů může záviset na regulačním rámci. Má-li být uvedena hodnota EC_x, mělo by uspořádání experimentu a výběr regresního modelu umožnit odhad EC_x tak, aby i) 95 % interval spolehlivosti uvedený pro EC_x neobsahoval nulu a nebyl příliš široký, ii) 95 % interval spolehlivosti pro odhad střední hodnoty EC_x neobsahoval střední hodnotu kontroly a iii) nebyla zjištěna výrazná neshoda údajů s regresním modelem. Každý z těchto přístupů vyžaduje určení procentuální změny u každého ukazatele, který je třeba zjistit nebo odhadnout. Aby to bylo možné, mělo by být uspořádání experimentu přesně přizpůsobeno. Nejsou-li výše uvedené podmínky pro stanovení EC_x splněny, měla by být použita metoda stanovení NOEC. Není pravděpodobné, že stejná procentuální změna platí pro všechny ukazatele, a není ani pravděpodobné, že je možné naplánovat proveditelný experiment, který splní tato kritéria u všech ukazatelů. Za účelem naplánování experimentu vhodným způsobem je proto důležité se zaměřit na ty

▼M7

ukazatele, které jsou důležité pro daný experiment. V dodatcích 5 a 6 jsou k dispozici statistická schémata a pokyny pro každou z těchto metod, které jsou vodítkem při zpracování údajů a při výběru nejvhodnějšího statistického testu nebo modelu, který má být použit. Mohou být použity i jiné statistické metody za předpokladu, že jsou vědecky odůvodněné.

33. Bude nezbytné analyzovat rozdíly v rámci každé sady opakování pomocí analýzy rozptylu nebo pomocí kontingenční tabulky a na základě této analýzy použít vhodné metody statistické analýzy. K vícenásobnému porovnání výsledků pro jednotlivé koncentrace a výsledků kontrol se doporučuje použít Jonckheerův-Terpstrův test sestupného trendu nebo Williamsův test v případě kontinuálních odezev a Cochranův-Armitageův test sestupného trendu v případě binárních odezev, které jsou v souladu s monotónní odezvou na koncentraci a s neexistencí důkazů o extra-binomické variabilitě (14). Existují-li důkazy o extra-binomické variabilitě, doporučuje se použít Raovu-Scottovu modifikaci Cochranova-Armitageova testu (15) (16) nebo Williamsův nebo Dunnettův test (po transformaci druhou odmocninou funkce arcsin) nebo Jonckheerův-Terpstrův test aplikovaný na podíly v opakováních. Nejsou-li údaje v souladu s monotónní odezvou na koncentraci, lze při kontinuálních odezvách shledat jako užitečnou Dunnettovu nebo Dunnovu či Mannovu-Whitneyovu metodu a při binárních odezvách Fisherův exaktní test (14) (17) (18). Při použití jakékoli statistické metody nebo modelu je třeba zajistit, aby byly splněny požadavky metody nebo modelu (např. odhadne se variabilita v jednotlivých komorách a zohlední se v uspořádání experimentu a v použité zkoušce nebo modelu). Údaje mají být hodnoceny z hlediska jejich normality a v dodatku 5 je uvedeno, jak postupovat, pokud jde o reziduální hodnoty získané z analýzy ANOVA. Další aspekty uplatnění regresního přístupu jsou uvedeny v dodatku 6. Měly by být zváženy transformace potřebné pro splnění požadavků daného statistického testu. Při transformacích umožňujících proložení regresního modelu však je třeba postupovat velmi obezřetně, neboť například 25 % změna netransformované odezvy neodpovídá 25 % změně transformované odezvy. Při všech analýzách je jednotkou analýzy a experimentální jednotkou zkušební komora, a nikoli jednotlivé ryby, a to by mělo být zohledněno jak v testech hypotéz, tak při regresi (3) (14) (19) (20).

Závěrečná zpráva

34. Závěrečná zpráva by měla obsahovat tyto informace:

Zkoušená chemická látka:

Jednosložková látka

— fyzický vzhled, rozpustnost ve vodě a další důležité fyzikálně-chemické vlastnosti,

— chemická identifikace, např. název IUPAC nebo CAS, číslo CAS, kód SMILES nebo InChI, strukturní vzorec, čistota, případně chemická identita nečistot, je-li to prakticky proveditelné, atd. (včetně obsahu organického uhlíku, je-li to třeba).

Vícesložková látka, UVCB a směsi

— charakterizované v co možná největší míře chemickou identitou (viz výše), kvantitativním výskytem a důležitými fyzikálně-chemickými vlastnostmi složek.

Zkušební druh:

— vědecký název, kmen, zdroj a metoda sběru oplodněných jiker a následné zpracování.

▼M7

Zkušební podmínky:

— použitý zkušební postup (např. semistatický nebo průtokový, nasazování),

— fotoperioda (fotoperiody),

— uspořádání zkoušky (např. počet zkušebních komor a počet opakování, počet jiker v každém opakování), materiál a velikost zkušebních komor (výška, šířka, objem), objem vody v každé zkušební komoře),

— metoda přípravy zásobních roztoků a četnost obnovování (je-li použito, mělo by se uvést solubilizační činidlo a jeho koncentrace),

— metoda dávkování zkoušené chemické látky (např. čerpadla, ředicí systémy),

— výtěžnost metody a nominální zkušební koncentrace, mez stanovitelnosti, střední hodnoty naměřených hodnot ve zkušebních nádržích a jejich směrodatné odchylky a metody jejich stanovení a doklad o toho, že naměřené koncentrace odpovídají koncentracím zkoušené chemické látky ve skutečném roztoku,

— charakteristiky ředicí vody: hodnota pH, tvrdost, teplota, koncentrace rozpuštěného kyslíku, koncentrace zbytkového chloru (je-li měřena), obsah celkového organického uhlíku (je-li měřen), obsah suspendovaných látek (je-li měřen), salinita zkušebního média (je-li měřena) a výsledky jakýchkoli jiných provedených měření,

— kvalita vody ve zkušebních nádržích, pH, tvrdost, teplota a koncentrace rozpuštěného kyslíku,

— podrobné informace o krmení (např. druh krmiva (krmiv), původ, podávané množství a frekvence krmení).

Výsledky uvedené individuálně (nebo na základě opakování) a případně jako střední hodnota a variační koeficient pro tyto ukazatele:

— doklad o tom, že kontrolní skupiny splnily obecné požadavky na přijatelnou míru přežití pro zkoušený druh (dodatek 2),

— údaje o úhynu v každém stadiu (embrya, plůdku a nedospělých ryb) a údaje o celkové mortalitě,

— doba do vylíhnutí, počty plůdků vylíhnutých každý den a konec líhnutí,

— počty zdravých ryb na konci zkoušky,

— údaje o délce (uveďte standardní nebo celkovou délku) a hmotnosti přežívajících ryb,

— výskyt, popis a počet morfologických odchylek, vyskytly-li se,

— výskyt, popis a počet účinků na chování, vyskytly-li se,

— metoda statistické analýzy (regresní analýza nebo analýza rozptylu) a zpracování údajů (použitý statistický test nebo model),

— koncentrace bez pozorovaných účinků (NOEC) pro každou posuzovanou odezvu,

▼M7

— nejnižší koncentrace s pozorovaným účinkem (LOEC) (při p = 0,05) pro každou posuzovanou odezvu,

— případně hodnoty EC_x pro každou posuzovanou odezvu a intervaly spolehlivosti (např. 90 % nebo 95 %) a graf proloženého modelu použitý pro jejich výpočet, směrnice křivky koncentrace-odezva, vzorec regresního modelu, odhadované parametry modelu a jejich směrodatné odchylky.

Jakékoli odchylky od zkušební metody.

Rozbor výsledků včetně vlivu případných odchylek od zkušební metody na výsledek zkoušky.

Tabulka 1

Druhy ryb doporučené pro zkoušku

SLADKOVODNÍ	ESTUARINNÍ A MOŘSKÉ
Oncorhynchus mykiss pstruh duhový	*Cyprinodon variegatus* halančík diamantový
Pimephales promelas jeleček velkohlavý	*Menidia sp.* menidia
Danio rerio danio pruhované	
Oryzias latipes halančík japonský (jinak též medaka japonská)	

LITERATURA

(1) OECD (2012), Fish Toxicity Testing Framework, Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.171, OECD, Paris.

(2) OECD (2000), Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures, Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment. No. 23, OECD Paris.

(3) ASTM (1988), Standard Guide for Conducting Early Life-Stage Toxicity Tests with Fishes. American Society for Testing and Materials, E 1241-88. 26 s.

(4) Brauhn, J.L. a R.A. Schoettger (1975), Acquisition and Culture of Research Fish: Rainbow trout, Fathead minnows, Channel catfish and Bluegills, Ecological Research Series, EPA-660/3-75-011, Duluth, Minnesota.

(5) Brungs, W.A. a B.R. Jones (1977), Temperature Criteria for Freshwater Fish: Protocol and Procedures, Ecological Research Series EPA-600/3-77-061, Duluth, Minnesota.

(6) Adolfsson-Erici *et al*. (2012), A flow-through passive dosing system for continuously supplying aqueous solutions of hydrophobic chemicals to bioconcentration and aquatic toxicity tests, Chemosphere 86, 593-599.

(7) Hutchinson, T.H. *et al.* (2006), Acute and chronic effects of carrier solvents in aquatic organisms: A critical review, Aquatic Toxicology, 76, 69-92.

(8) Kapitola C.20 této přílohy, Zkouška toxicity pro reprodukci *Daphnia magna*.

(9) Hansen, D.J. a P.R. Parrish (1977), Suitability of sheepshead minnows (Cyprindon variegatus) for life-cycle toxicity tests, In Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation (edited by F.L. Mayer and J.L. Hamelink), ASTM STP 634.

(10) Kimmel, H. B. *et al*. (1995), Stages of embryonic development of the zebrafish. Developmental Dynamics, 203:253–310.

▼**M7**

(11) Gonzalez-Doncel, M.*et al*. (2005), A quick reference guide to the normal development of *Oryzias latipes* (Teleostei, Adrinichthydae) Journal of Applied Ichthyology, 20:1–14.

(12) Devlin, E.W. *et al* (1996), Prehatching Development of the Fathead Minnow, Pimephales promelas Rafinesque. EPA/600/R-96/079. USEPA, Office of Research and Development, Washington, D.C..

(13) Oris, J.T., S.C. Belanger, a A.J. Bailer, (2012), Baseline characteristics and statistical implications for the OECD 210 Fish Early Life Stage Chronic Toxicity Test, Environmental Toxicology and Chemistry 31; 2, 370 – 376.

(14) OECD (2006). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application, Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.54, OECD, Paris.

(15) Rao, J.N.K. a A.J. Scott (1992), A simple method for the analysis of clustered binary data, Biometrics 48, 577-585.

(16) Rao, J.N.K. a A.J. Scott (1999), A simple method for analyzing overdispersion in clustered Poisson data, Statistics in Medicine 18, 1373-1385.

(17) Dunnett C.W. (1955), A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control, Journal of Ameican Statistical Association, 50, 1096-1121.

(18) Dunnett C.W. (1964), New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics, 20, 482–491.

(19) Rand, G.M. a S.R. Petrocelli (1985), Fundamentals of Aquatic Toxicology. Hemisphere Publication Corporation, New York.

(20) McClave, J.T., J.H. Sullivan a J.G. Pearson (1980). Statistical Analysis of Fish Chronic Toxicity Test Data, Proceedings of 4th Aquatic Toxicology Symposium, ASTM, Philadelphia.

▼M7

Dodatek 1

DEFINICE

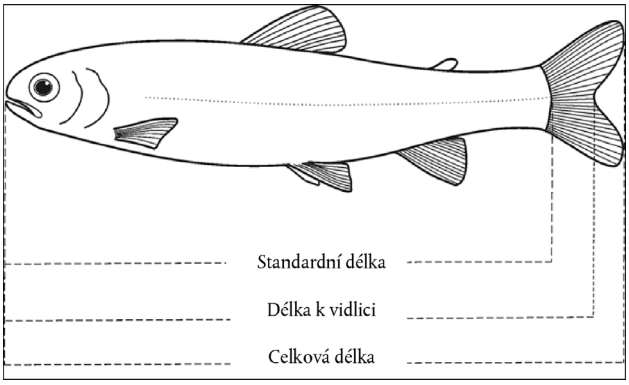
Délka k vidlici (FL): označuje délku od špičky tlamy po průsečík paprsků ocasní ploutve a používá se u ryb, u kterých je obtížné určit, kde končí páteř (www.fishbase.org)

Standardní délka (SL): označuje délku ryby měřenou od špičky tlamy po konec posledního obratle nebo po konec ocasního násadce ve střední části. Jednoduše řečeno, tato míra nezahrnuje délku ocasní ploutve. (www.fishbase.org)

Celková délka (TL): označuje délku od špičky tlamy po konec delšího laloku ocasní ploutve, obvykle měřenou s laloky sevřenými podél střední linie. Je to míra po přímce, neměří se přes zaoblení těla.(www.fishbase.org)

Obrázek 1

Popis různých používaných délek



Chemická látka: látka nebo směs.

EC_x: (účinná koncentrace s x % účinkem) je koncentrace, která vyvolá x % účinek u zkušebních organismů během dané expoziční doby ve srovnání s kontrolou. Například EC_{50} je koncentrace odhadnutá pro vyvolání účinku na zkoušený ukazatel u 50 % exponované populace za stanovenou expoziční dobu.

Nejnižší koncentrace s pozorovaným účinkem (LOEC) je nejnižší zkušební koncentrace zkoušené chemické látky, při níž je pozorován statisticky významný účinek zkoušené látky ve srovnání s kontrolou (při $p < 0,05$). Všechny zkušební koncentrace vyšší než LOEC by však měly mít stejné nebo závažnější škodlivé účinky, než jsou účinky pozorované při koncentraci LOEC. Nelze-li tyto dvě podmínky splnit, mělo by být podrobně vysvětleno, jak byla LOEC (a tedy i NOEC) zvolena. Pokyny jsou uvedeny v dodatcích 5 a 6.

Koncentrace bez pozorovaných účinků (NOEC) je zkušební koncentrace bezprostředně nižší než LOEC, která při srovnání s kontrolou nemá pro danou expoziční dobu statisticky významný účinek (při $p < 0,05$).

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

UVCB: látky s neznámým nebo proměnlivým složením, komplexní reakční produkty nebo biologický materiál.

IUPAC: International Union of Pure and Applied Chemistry (Mezinárodní unie pro čistou a užitou chemii).

SMILES: Simplified Molecular Input Line Entry Specification (Zjednodušená molekulární specifikace pro vstupní řádky).

▼M7

Dodatek 2

ZKUŠEBNÍ PODMÍNKY, DÉLKA ZKOUŠKY A KRITÉRIA PŘEŽITÍ PRO DOPORUČENÉ DRUHY

DRUH	ZKUŠEBNÍ PODMÍNKY			DOPORUČENÁ DÉLKA ZKOUŠKY	Typická minimální střední celková délka ryb v kontrolách na konci studie (v mm) (1)	PŘEŽITÍ V KONTROLÁCH (minimální hodnota)	
	Teplota (ve °C)	Salinita (v $^{0}/_{00}$)	Fotoperioda (v hodinách)			Úspěšnost líhnutí	Zdárný vývoj po vylíhnutí
Sladkovodní:							
Oncorhynchus mykiss pstruh duhový	10 ± 1,5 (2)		12–16 (3)	2 týdny poté, co jsou ryby v kontrolách krmeny ve volném režimu (nebo 60 dnů po vylíhnutí)	40	75 %	75 %
Pimephales promelas jeleček velkohlavý	25 ± 1,5		16	32 dnů od zahájení zkoušky (nebo 28 dnů po vylíhnutí)	18	70 %	75 %
Danio rerio danio pruhované	26 ± 1,5		12–16 (4)	30 dnů po vylíhnutí	11	70 %	75 %
Oryzias latipes halančík japonský (jinak též medaka japonská)	25 ± 2		12–16 (5)	30 dnů po vylíhnutí	17	80 %	80 %
Estuarinní a mořské:							
Cyprinodon variegatus halančík diamantový	25 ± 1,5	15–35 (5)	12–16 (4)	32 dnů od zahájení zkoušky (nebo 28 dnů po vylíhnutí)	17	75 %	80 %
Menidia sp. menidia	22–25	15–35 (5)	13	28 dnů	20	80 %	60 %

Legenda:

(1) Typická minimální střední celková délka není kritériem validity, ale odchylky pod uvedenou hodnotou by měly být pečlivě zkoumány z hlediska citlivosti zkoušky. Minimální střední celková délka je odvozena od souboru údajů, které jsou v současnosti dostupné.

(2) Konkrétní zkušební kmen pstruha duhového může vyžadovat použití jiných teplot. Matečné ryby musí být udržovány při stejné teplotě, jako je teplota používaná pro jikry. Po získání jiker od komerčního chovatele je nezbytná krátká adaptace na zkušební teplotu (např. 1 až 2 hodiny) po přejímce.

(3) Tma pro plůdky do jednoho týdne po vylíhnutí kromě doby, kdy jsou kontrolovány, poté se po dobu zkoušky vystaví osvětlení (fotoperioda 12–16 hodin) (4).

(4) Světelný režim by při jakýchkoli stanovených zkušebních podmínkách měl být konstantní.

(5) Při jakékoli dané zkoušce musí být tato hodnota dodržena s přesností na ± $2^{0}/_{00}$.

▼M7

Dodatek 3

POKYNY PRO KRMENÍ A CHOV MATEČNÝCH A ZKUŠEBNÍCH RYB DOPORUČENÝCH DRUHŮ

DRUH	POTRAVA (*)				DOBA PŘEMISŤOVÁNÍ PO VYLÍHNUTÍ	DOBA DO PRVNÍHO KRMENÍ
	Matečné ryby	Čerstvě vylíhnuté plůdky	Nedospělé ryby			
			Druh	Četnost		
Sladkovodní:						
Oncorhynchus mykiss pstruh duhový	krmivo pro lososovité ryby	žádné ([a])	krmivo pro mladé lososovité ryby BSN	2–4 krmení denně	14–16 dnů po vylíhnutí nebo při vyplavání (není podstatné)	19 dnů po vylíhnutí nebo při vyplavání
Pimephales promelas jeleček velkohlavý	BSN, vločkové krmivo FBS	BSN	BSN48, vločkové krmivo	2–3krát denně	jakmile je vylíhnuto 90 % plůdků	2 dny po vylíhnutí
Danio rerio danio pruhované	BSN, vločkové krmivo	komerční krmivo pro rybí plůdky, prvoci ([b]), proteiny ([c])	BSN48, vločkové krmivo	BSN jednou denně; vločkové krmivo dvakrát denně	jakmile je vylíhnuto 90 % plůdků	2 dny po vylíhnutí
Oryzias latipes halančík japonský (jinak též medaka japonská)	vločkové krmivo	BSN, vločkové krmivo (nebo prvoci nebo vířníci)	BSN48, vločkové krmivo (nebo vířníci)	BSN jednou denně; vločkové krmivo dvakrát denně nebo vločkové krmivo a vířníci jednou denně	nevztahuje se na tento druh	6–7 dnů po vytření
Estuarinní a mořské:						
Cyprinodon variegatus halančík diamantový	BSN, vločkové krmivo FBS	BSN	BSN48	2–3 krmení denně	nevztahuje se na tento druh	1 den po vylíhnutí/vyplavání
Menidia sp. menidia	BSN48, vločkové krmivo	BSN	BSN48	2–3 krmení denně	nevztahuje se na tento druh	1 den po vylíhnutí/vyplavání

Legenda:

(*) Potrava by měla být podávána do sytosti. Zbytky potravy a výkaly se, je-li to nutné, odstraní, aby nedošlo k hromadění odpadu.

FBS zmrazené žábronožky solné; dospělé Artemia sp

BSN larvy (nauplia) žábronožky solné; čerstvě vylíhnuté

BSN48 larvy (nauplia) žábronožky solné; 48 hodin staré

([a]) plůdky se žloutkovým váčkem krmení nevyžadují

([b]) filtrované ze smíšené kultury

([c]) granule z fermentačního procesu

02008R0440 — CS — 16.10.2019 — 008.001 — 2448

▼M7

Dodatek 4

NĚKTERÉ CHEMICKÉ CHARAKTERISTIKY DOPORUČENÉ ŘEDICÍ VODY

Složka	Koncentrační limit
Pevné částice	5 mg/l
Celkový organický uhlík	2 mg/l
Neionizovaný amoniak	1 µg/l
Zbytkový chlor	10 µg/l
Celkové organofosforové pesticidy	50 ng/l
Celkové organochlorové pesticidy a polychlorované bifenyly	50 ng/l
Celkový organický chlor	25 ng/l
Hliník	1 µg/l
Arzen	1 µg/l
Chrom	1 µg/l
Kobalt	1 µg/l
Měď	1 µg/l
Železo	1 µg/l
Olovo	1 µg/l
Nikl	1 µg/l
Zinek	1 µg/l
Kadmium	100 ng/l
Rtuť	100 ng/l
Stříbro	100 ng/l

▼M7

Dodatek 5

STATISTICKÉ POSTUPY KE STANOVENÍ NOEC

Obecné informace

Jednotkou analýzy je nádrž (opakování). Při průběžných měřeních, např. velikosti, je tak třeba vypočítat střední nebo mediánové hodnoty opakování a tyto hodnoty opakování jsou údaje pro analýzu. Měla by být doložena průkaznost použité zkoušky, přednostně na základě odpovídající databáze dosavadních údajů každé laboratoře. Pro každý ukazatel by měla být uvedena velikost účinku, který lze pomocí statistického testu, který má být použit, určit s průkazností 75–80 %.

Databáze dostupné v době vývoje této zkušební metody stanoví, jaké průkaznosti zkoušky je možné dosáhnout při doporučených statistických postupech. Každá jednotlivá laboratoř by měla prokázat svou schopnost splnit tento požadavek na průkaznost buď provedením vlastní statistické analýzy, nebo prokázáním toho, že variační koeficient (CV) pro každou odezvu nepřekračuje 90. percentil variačních koeficientů použitých při vývoji pokynu pro zkoušení. Tyto hodnoty CV jsou uvedeny v tabulce 1. Jsou-li k dispozici pouze střední nebo mediánové hodnoty opakování, není třeba CV v rámci opakování brát v úvahu.

Tabulka 1

90. percentil CV pro vybrané sladkovodní druhy

Druh	Odezva	CV_mezi opakováními	CV_v rámci opakování
Pstruh duhový	Délka	17,4	9,8
	Hmotnost	10,1	28
Jeleček velkohlavý	Délka	16,9	13,5
	Hmotnost	11,7	38,7
Danio pruhované	Délka	43,7	11,7
	Hmotnost	11,9	32,8

Téměř při všech statistických testech, které se používají k hodnocení laboratorních toxikologických studií, jsou předmětem zájmu srovnání mezi zkušebními skupinami a kontrolami. Z tohoto důvodu není vhodné vyžadovat provedení ANOVA F-testu významnosti před použitím Dunnettova nebo Williamsova testu nebo provedení Kruskalova-Wallisova testu významnosti před použitím Jonckheerova-Terpstrova, Mannova-Whitneyova nebo Dunnova testu (Hochberg a Tamhane 1987, Hsu 1996, Dunnett 1955, 1964, Williams 1971, 1972, 1975, 1977, Robertson *et al*., 1988, Jonckheere 1954, Dunn 1964).

Dunnettův test zahrnuje korekci multiplikace a jeho míra falešné pozitivity a míra falešné negativity je nepříznivě ovlivňována použitím F-testu pro snížení rozptylu. Podobně Williamsův a Jonckheerův-Terpstrův test sestupného trendu používající při každém kroku hladinu významnosti 0,05 zajišťuje celkovou 5 % míru falešné pozitivity a tato míra a síla testu jsou nepříznivě ovlivňovány použitím F-testu nebo Kruskalova-Wallisova testu pro snížení rozptylu. U Mannova-Whitneyova a Dunnova testu musí být provedena korekce multiplikace a doporučuje se použít Bonferroniho-Holmovu korekci.

Důkladný rozbor většiny doporučení ohledně testování hypotéz a ověřování předpokladů, z nichž tyto zkoušky vycházejí, je podán v dokumentu OECD (2006), který také obsahuje obsáhlý seznam literatury.

▼M7

Nakládání s kontrolami při použití rozpouštědla

Je-li použito rozpouštědlo, měla by být zařazena jak kontrola s ředicí vodou, tak kontrola s rozpouštědlem. Tyto dvě kontroly by měly být porovnávány pro každou odezvu, a nejsou-li mezi kontrolami shledány významné rozdíly, pro účely statistické analýzy by měly být jejich údaje sloučeny. V opačném případě by měla být pro stanovení NOEC nebo odhad EC_x použita kontrola s rozpouštědlem, a kontrola s vodou se nepoužije. Viz omezení v kritériích platnosti (odstavec 7).

Pro stanovení délky, hmotnosti, podílu uhynulých jiker při líhnutí nebo uhynulých plůdků nebo abnormálních plůdků a pro určení prvního nebo posledního dne líhnutí nebo vyplavání by měl být použit T-test nebo Mannův-Whitneyův test, kterým se porovná kontrola s ředicí vodou a kontrola s rozpouštědlem při hladině významnosti 0,05, přičemž všechny zkušební skupiny se neberou v úvahu. Výsledky těchto testů je třeba uvést ve zprávě.

Měření velikosti (délka a hmotnost)

Individuální hodnoty délky a hmotnosti ryb lze popsat pomocí normálního rozdělení nebo logaritmicko-normálního rozdělení. V každém případě střední hodnoty opakování vykazují sklon k normální distribuci na základě centrální limitní věty, jak potvrzují údaje z více než 100 studií toxicity v raném stadiu života provedených na třech druzích sladkovodních ryb. Alternativně, pokud údaje nebo databáze dosavadních údajů nasvědčují logaritmicko-normálnímu rozdělení hodnot individuální velikostí ryb, lze vypočítat logaritmus střední hodnoty z individuálních hodnot ryb v opakování, a údaje pro analýzu pak budou hodnotami inverzní funkce k logaritmům středních hodnot daného opakování.

Údaje by měly být hodnoceny z hlediska jejich souladu s normálním rozdělením a homogenitou rozptylu. Pro tento účel by měly být použity reziduální hodnoty získané z modelu ANOVA s koncentrací jako jedinou vysvětlující klasifikační proměnnou. Lze je vizuálně stanovit z bodových grafů a histogramů nebo z lodyhových grafů. Alternativně je možné použít formální test, např. Shapirův-Wilkův nebo Andersonův-Darlingův test. Soulad s homogenitou rozptylu lze posoudit na základě vizuálního zkoumání stejného bodového grafu nebo formálně na základě Levenova testu. Pouze parametrické testy (např. Williamsův, Dunnettův) je nutné hodnotit z hlediska normality nebo homogenity rozptylu.

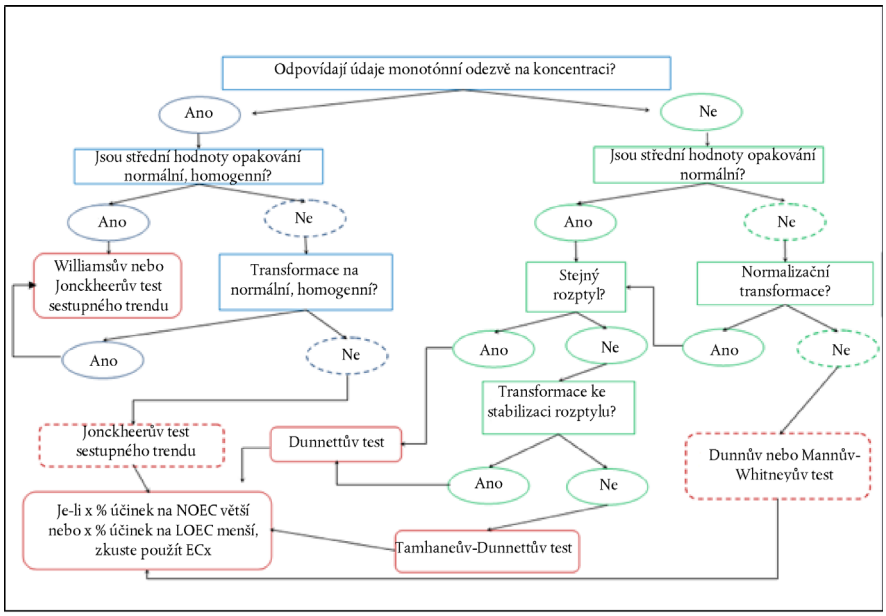
Pozornost by měla být věnována možným odlehlým hodnotám a jejich vlivu na analýzu. Použít lze Tukeyův test odlehlých hodnot a vizuální kontrolu stejných grafů reziduálních hodnot, které jsou popsány výše. Je třeba připomenout, že pozorování se týkají celých opakování, takže vypuštění odlehlé hodnoty z analýzy by se mělo provést pouze po pečlivé úvaze.

Statistickými testy, které využívají charakteristik experimentálního uspořádání a biologického očekávání, jsou testy sestupného trendu, např. Williamsův a Jonckheerův-Terpstrův test. Tyto testy předpokládají monotónní vztah koncentrace-odezva a údaje by měly být posuzovány z hlediska souladu s těmito předpoklady. Toto posouzení lze provést vizuálně z bodového grafu středních hodnot opakování proti zkušební koncentraci. Bude užitečné na tento bodový graf přenést po částech lineární graf spojující střední hodnoty koncentrací vážené velikostí vzorku opakování. Velká odchylka tohoto po částech lineárního grafu od monotónnosti by ukazovala na to, že je možná nutné použít jiný než trendový test. Alternativně lze použít formální testy. Jednoduchý formální test spočívá v porovnání lineárních a kvadratických kontrastů středních hodnot koncentrací. Je-li kvadratický kontrast signifikantní a lineární kontrast není signifikantní, ukazuje to na možný problém s monotónností, která by měla být podrobena dalšímu hodnocení na základě grafů. Tam, kde může být problematická normalita nebo homogenita rozptylu, lze tyto kontrasty vytvořit z transformovaných údajů seřazených do pořadí. Lze použít alternativní postupy, např. Bartholomewův test monotónnosti, ale ty zvyšují složitost.

▼M7

Obrázek 2

Vývojový diagram měření velikosti (délky a hmotnosti) pro účely stanovení NOEC



(*) Tyto odezvy nikdy nesplňují předpoklady pro parametrickou analýzu nebo parametrické modely.

Nejsou-li údaje v souladu s požadavky pro tyto testy, hodnota NOEC se stanoví sestupnou aplikací Williamsova nebo Jonckheerova-Terpstrova testu. Podrobnosti o těchto postupech jsou uvedeny v dokumentu OECD (2006). V případě údajů, které nejsou v souladu s požadavky pro test sestupného trendu, lze použít Dunnettův test nebo Tamhaneho-Dunnettův test, přičemž v obou těchto testech je začleněna korekce multiplikace. Tyto testy předpokládají normalitu a, v případě Dunnettova testu, homogenitu rozptylu. Nejsou-li výše uvedené podmínky splněny, je možné použít Dunnův neparametrický test. Podrobnosti o všech těchto testech obsahuje dokument OECD (2006). Přehled o tom, jak nalézt test, který potřebujete, podává obrázek 2.

Přežití jiker při líhnutí a plůdků

Údaje představují podíly jiker, které se vylíhnou, nebo plůdků, které přežijí v jednotlivých opakováních. Tyto podíly by měly být hodnoceny z hlediska extra-binomické variability, která je při takových měřeních obvyklá, ale není univerzální. Schéma na obrázku 3 obsahuje pokyny pro výběr vhodného testu; podrobný popis je uveden v textu.

Obvykle se používají dva testy. Je to Taronův C(α) test (Tarone, 1979) a chí-kvadrát testy, přičemž každý z nich se použije na každou zkušební koncentraci zvlášť. Vyskytne-li se alespoň v jedné zkušební koncentraci extra-binomická variabilita, měly by být použity metody, které to zohledňují.

Vzorec 1

Taronův C(α) test (Tarone 1979)

$$Z = \frac{\sum_{j=1}^{m} \frac{(x_j - n_j \hat{p})^2}{\hat{p}(1-\hat{p})} - \sum_{j=1}^{m} n_j}{\left\{ 2 \sum_{j=1}^{m} n_j (n_j - 1) \right\}^{1/2}}$$

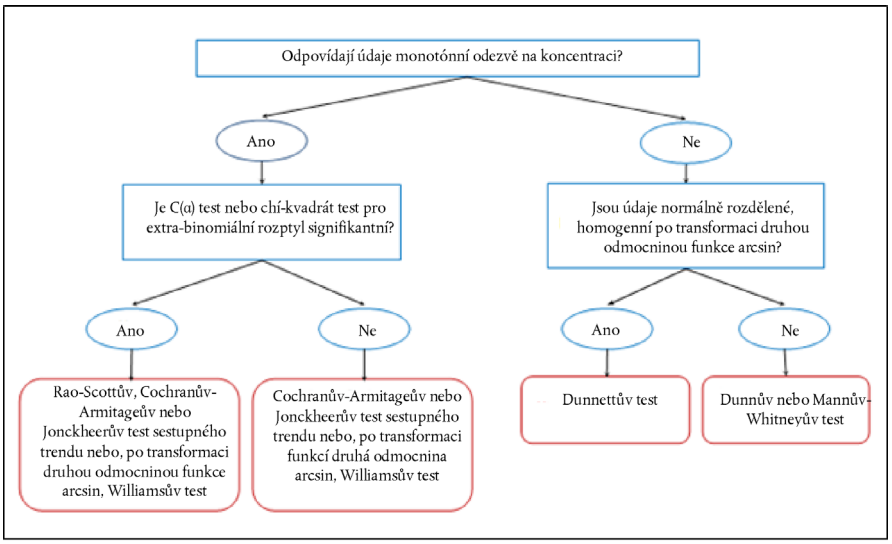
kde je střední hodnota podílu dané koncentrace, **m** je počet nádrží (opakování), $\mathbf{n_j}$ je počet subjektů v opakování **j**, a $\mathbf{x_j}$ je počet subjektů s odezvou v tomto

▼M7

opakování, např. nevylíhlých nebo mrtvých. Tento test se použije na každou koncentraci zvlášť. Lze jej považovat za upravený chí-kvadrát test, avšak omezené simulace síly provedené Taronem ukázaly, že má větší sílu než chí-kvadrát test.

Obrázek 3

Schéma hodnocení úhynu jiker při líhnutí a úhynu plůdků při stanovení NOEC



(*) Údaje představují podíl v rámci opakování.

Neexistuje-li významný důkaz o extra-binomické variabilitě, lze použít sestupný Cochranův-Armitageův test. Tento test nepřihlíží k opakováním, takže pokud takový důkaz existuje, Raova-Scottova korekce ke Cochranovu-Armitageovu testu (RSCA) bere v úvahu opakování, velikost opakování a extra-binomickou variabilitu a doporučuje se ji použít. Mezi alternativní testy patří sestupný Williamsův a Jonckheerův-Terpstrův test a Dunnettův test, jak jsou popsány v oddíle týkajícím se měření velikosti. Tyto testy jsou platné bez ohledu na to, zda existuje extra-binomická variabilita, avšak mají poněkud menší sílu (Agresti 2002, Morgan 1992, Rao a Scott 1992, 1999, Fung *et al.* 1994, 1996).

První nebo poslední den líhnutí nebo vyplavání

Odezva je vyjádřena celým číslem, udává den zkoušky, ve kterém je zpozorováno uvedené zjištění v dané nádrži (opakování). Rozpětí hodnot je zpravidla velmi omezené a často se vyskytuje vysoký podíl propojených hodnot, např. tentýž první den líhnutí je zpozorován ve všech kontrolních opakováních a možná při jedné nebo dvou nejnižších zkušebních koncentracích. Parametrické testy, např. Williamsův a Dunnettův test, nejsou pro takové údaje vhodné. Pokud neexistují důkazy o výrazné nemotónnosti, je pro detekci účinků zkoušené chemické látky velmi silný sestupný Jonckheerův-Terpstrův test. Jinak lze použít Dunnův test.

Abnormality plůdků

Odezvou je počet plůdků, u nichž je shledáno, že jsou nějakým způsobem abnormální. Tato odezva se většinou vyskytuje málo a je spojena se stejnými problémy, jako při stanovení prvního dne líhnutí, a rovněž tak je někdy za odezvu na koncentraci pokládána chybně. Pokud údaje alespoň přibližně sledují monotónní křivku odezvy na koncentraci, je pro detekci účinků silný sestupný Jonckheerův-Terpstrův test. Jinak lze použít Dunnův test.

▼**M7**

ODKAZY

Agresti, A. (2002); Categorical Data Analysis, second edition, Wiley, Hoboken.

Dunnett C. W. (1955); A multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control, J. American Statistical Association 50, 1096-1121.

Dunn O. J. (1964); Multiple Comparisons Using Rank Sums, Technometrics 6, 241-252.

Dunnett C. W. (1964); New tables for multiple comparisons with a control, Biometrics 20, 482-491.

Fung, K.Y., D. Krewski, J.N.K. Rao, A.J. Scott (1994); Tests for Trend in Developmental Toxicity Experiments with Correlated Binary Data, Risk Analysis 14, 639-648.

Fung, K.Y, D. Krewski, R.T. Smythe (1996); A comparison of tests for trend with historical controls in carcinogen bioassay, Canadian Journal of Statistics 24, 431-454.

Hochberg, Y. a A. C. Tamhane (1987); Multiple Comparison Procedures, Wiley, New York.

Hsu, J.C. (1996); Multiple Comparisons: Theory and Methods; Chapman and Hall/CRC Press, Boca Raton.

Jonckheere A. R. (1954); A distribution-free k-sample test against ordered alternatives, Biometrika 41, 133.

Morgan, B.J.T. (1992); Analysis of Quantal Response Data, Chapman and Hall, London.

OECD (2006). Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: A guidance to application. Series on Testing and Assessment, No. 54. Organisation for Economic Co-operation and Development, OECD, Paris..

Rao J.N.K. a Scott A.J. (1992) – A simple method for the analysis of clustered binary data, Biometrics 48, 577-585.

Rao J.N.K. a Scott A.J. (1999) – A simple method for analyzing overdispersion in clustered Poisson data, Statistics in Medicine 18, 1373-1385.

Robertson, T., Wright F.T. a Dykstra R.L. (1988); Order restricted statistical inference, Wiley.

Tarone, R.E. (1979); Testing the goodness of fit of the Binomial distribution, Biometrika 66, 585-590.

Williams D.A. (1971); A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control, Biometrics 27, 103-117.

Williams D.A. (1972); The comparison of several dose levels with a zero dose control, Biometrics 28, 519-531.

Williams D. A. (1975); The Analysis of Binary Responses from Toxicological Experiments Involving Reproduction and Teratotlogy, Biometrics 31, 949-952.

Williams D.A. (1977); Some inference procedures for monotonically ordered normal means, Biometrika 64, 9-14.

▼M7

Dodatek 6

STATISTICKÉ POSTUPY PRO REGRESNÍ ODHADY

Obecné informace

K proložení modelu se používají pozorování střední hodnoty opakování (délka a šířka) nebo podíly v opakováních (úhyn jiker při líhnutí a úhyn plůdků) (OECD 2006).

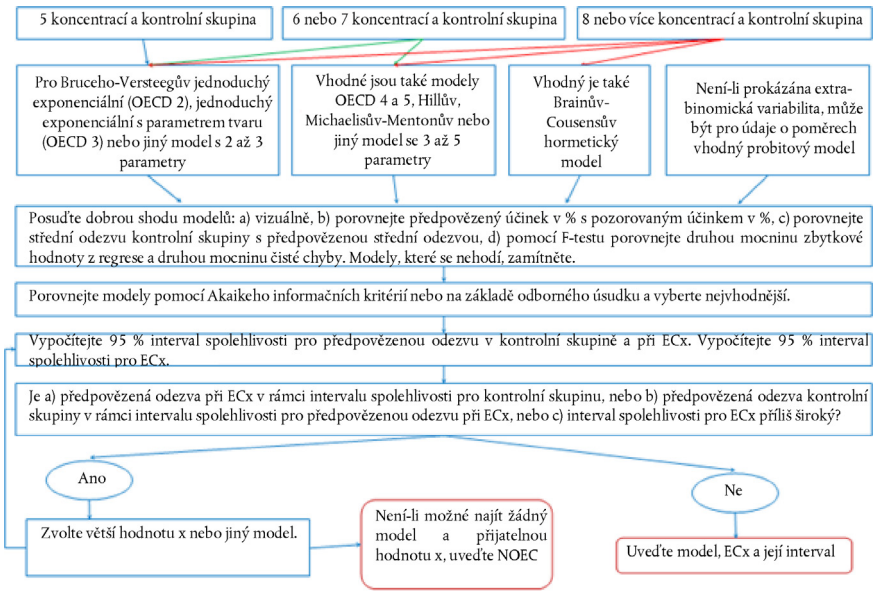
Obecně se doporučuje použít váženou regresi, přičemž se váží velikostí vzorků opakování. Možné jsou i jiné způsoby vážení, například vážení předpovězenou střední hodnotou odezvy nebo kombinací této hodnoty a velikosti vzorku opakování. Vážení převrácenou hodnotou variability vzorků v rámci koncentrací se nedoporučuje (Bunke *et al.*, 1999, Seber a Wild, 2003, Motulsky a Christopoulos 2004, Huet *et al.* 2003).

Při jakékoli transformaci odezev před analýzou by měla být zachována nezávislost pozorování a hodnota EC_x a její intervaly spolehlivosti by měly být vyjádřeny v původních jednotkách měření, a nikoli v transformovaných jednotkách. Například 20 % změna logaritmu délky se nerovná 20 % změně délky (Lyles *et al.* 2008, Draper a Smith 1999).

Přehled kroků pro odhad ECx podává schéma na obrázku 4. Podrobnosti jsou popsány v textu pod ním.

Obrázek 4

Schéma odhadování střední hodnoty délky, hmotnosti nebo podílu uhynulých jiker při líhnutí nebo plůdků pro účely stanovení EC_x, podrobněji viz text



Úvahy týkající se úhynu jiker při líhnutí a úhynu plůdků

Pro posouzení úhynu vylíhnutých jiker a plůdků je obecně nejlépe proložit klesající model, pokud se neprolož probitový model, jak je popsáno níže. To znamená, že by se měl modelovat podíl nevylíhnutých jiker nebo uhynulých plůdků. Důvodem pro tento postup je, že EC_x se vztahuje ke koncentraci, při které dojde ke změně rovnající se x % střední hodnoty odezvy kontroly. Je-li v kontrole 5 % nevylíhnutých jiker a modeluje se neúspěšné vylíhnutí, pak hodnota EC_{20} představuje koncentraci, při které se změna rovná 20 % z těchto 5 % neúspěšných vylíhnutí v kontrole, a to znamená změnu o 0,2 × 0,05 = 0,01 neboli o 1 procentní bod na výsledných 6 % neúspěšného vylíhnutí. Tak malou změnu není možné smysluplně odhadnout z údajů, které jsou k dispozici, a není biologicky důležitá. Naproti tomu, modeluje-li se podíl vylíhlých jiker, jejich

▼M7

podíl v kontrole by v tomto příkladu byl 95 % a 20 % snížení střední hodnoty kontroly by znamenalo změnu o 0,95 × 0,2 = 0,18, čili z 95 % úspěšného vylíhnutí na 77 % (= 95 – 18) úspěšného vylíhnutí a tuto koncentraci vyvolávající účinek je možné odhadnout a lze předpokládat, že bude předmětem většího zájmu. Při měřeních velikosti takový problém nevzniká, ačkoli nepříznivé účinky na velikost zpravidla znamenají snížení velikosti.

Modely pro stanovení velikosti (délky nebo hmotnosti) a úspěšného líhnutí jiker nebo přežití plůdků

Kromě Brainova-Cousensova hormetického modelu jsou všechny tyto modely popsány a doporučeny v dokumentu OECD (2006). O položkách, které jsou označeny OECD 2 až 5, se pojednává také v rámci experimentů ekotoxocity v publikaci Slob (2002). Existuje samozřejmě mnoho jiných modelů, které mohou být užitečné. Bunke *et al*. (1999) podává výčet četných modelů, které zde nejsou uvedeny, a existuje velké množství odkazů na jiné modely. V experimentech na ekotoxicitu jsou jako obzvláště vhodné doporučovány níže uvedené modely, které se široce používají.

S pěti zkušebními koncentracemi a kontrolou

— Bruceho-Versteegův,

— jednoduchý exponenciální (OECD 2),

— exponenciální s parametrem tvaru (OECD 3),

— jednoduchý exponenciální s dolní hranicí (OECD 4).

S šesti nebo více zkušebními koncentracemi a kontrolou

— exponenciální s parametrem tvaru a dolní hranicí (OECD 5),

— Michaelisův-Mentenův,

— Hillův.

Existují-li viditelné známky hormeze (což při stanovení úspěšného líhnutí z jiker nebo přežití plůdků není pravděpodobné, ale někdy bývá zjištěna při pozorování velikosti),

— Brainův-Cousensův hormetický; Brain a Cousens (1989).

Alternativní modely pro neúspěšné líhnutí z jiker a úhyn plůdků

— Neexistují-li důkazy o extra-binomické variabilitě, lze rostoucí modely pro tyto odezvy proložit probitovými (nebo logistickými) modely a v proloženém modelu se odhadne výskyt v rámci kontroly. Tato metoda není upřednostňována, neboť za jednotky analýzy považuje jedince, a nikoli opakování (Morgan 1992, O'Hara Hines a Lawless 1993, Collett 2002, 2003).

Míra shody jediného modelu

— Vizuálně se porovná pozorovaný a předpovězený procentuální pokles každé zkušební koncentrace (Motulsky a Christopoulos 2004, Draper a Smith 1999).

— Pomocí F-testu se porovná druhá mocnina střední hodnoty regresní chyby a druhá mocnina střední hodnoty čisté chyby (Draper a Smith 1999).

— Zkontroluje se, zda se každý člen v modelu významně liší od nuly (tj. stanoví se, zda jsou všechny členy modelu důležité) (Motulsky a Christopoulos 2004).

▼M7

— Zbytkové hodnoty získané regresí se zanesou do grafu proti zkušební koncentraci, lze je zanést i na stupnici logaritmů koncentrací. Tento graf by neměl být nijak uspořádán; body by měly být náhodně rozptýleny kolem horizontály o nulové výšce.

— Údaje by měly být hodnoceny z hlediska jejich normality a homogenity rozptylu stejným způsobem, jak je uvedeno v dodatku 5.

— Navíc by měla být hodnocena normalita zbytkových hodnot z regresního modelu pomocí stejných metod, které jsou uvedeny v dodatku 5 u zbytkových hodnot z ANOVA.

Porovnání modelů

— Použijí se korigovaná Akiakeho informační kritéria (AICc). Menší hodnoty AICc označují lepší shody, a je-li AICc(B)-AICc(A) ≥ 10, pak je model A téměř s jistotou lepší než model B (Motulsky a Christopoulos (2004).

— Oba modely se vizuálně porovnají, jak dobře splňují kritéria jediného modelu uvedená výše.

— Doporučuje se uplatnit princip úspornosti, podle něhož se použije nejjednodušší model, který vykazuje přiměřeně dobrou shodu s údaji (Ratkowsky 1993, Lyles *et* a*l.* 2008).

Kvalita odhadu EC_x

Interval spolehlivosti (CI) pro EC_x by neměl být příliš široký. Pro rozhodnutí toho, jak široký má být interval spolehlivosti ECx, aby ECx byla stále užitečná, je nutný statistický posudek. Simulace vhodnosti regresního modelu pro údaje o líhnutí z jiker a o velikosti ukazují, že přibližně 75 % intervalů spolehlivosti pro EC_x (x = 10, 20 nebo 30) nepokrývá více než dvě zkušební koncentrace. Z toho vyplývá obecný pokyn ohledně toho, co je přijatelné, a praktický pokyn ohledně toho, co je dosažitelné. Mnozí autoři tvrdí, že je nutné uvádět intervaly spolehlivosti pro všechny parametry modelu a že široké intervaly spolehlivosti pro parametry modelu ukazují na modely, které jsou nepřijatelné (Ott a Longnecker 2008, Alvord a Rossio 1993, Motulsky a Christopoulos 2004, Lyles *et al.* 2008, Seber a Wild 2003, Bunke *et al*. 1999, Environment Canada 2005).

Interval spolehlivosti pro EC_x (nebo pro kterýkoli jiný parametr modelu) by neměl obsahovat nulu (Motulsky a Christopoulos 2004). Toto je regrese ekvivalentní minimálnímu významnému rozdílu, na který často odkazují metody testování hypotéz (např. Wang *et al*. 2000). Odpovídá také intervalu spolehlivosti pro střední hodnoty odezev, neboť LOEC neobsahuje střední hodnotu kontroly. Bylo by možné pochybovat, zda jsou tyto parametrické odhady vědecky přijatelné. Jestliže např. interval spolehlivosti pro y0 je ± 20 %, není žádný odhad EC_{10} věrohodný. Předpovídá-li model 20 % účinek při koncentraci C a maximální pozorovaný účinek při C a nižších koncentracích je 10 %, pak hodnota EC_{20} není věrohodná (Motulsky a Christopoulos 2004, Wang *et al*. 2000, Environment Canada 2005).

Stanovení EC_x by nemělo vyžadovat extrapolaci mimo rozmezí pozitivních koncentrací (Draper a Smith 1999, OECD 2006). Například obecným pokynem by mohlo být, aby hodnota EC_x nebyla více než cca 25 % pod nejnižší zkoušenou koncentrací nebo nad nejvyšší zkoušenou koncentrací.

ODKAZY

Alvord, W.G., Rossio, J.L. (1993); Determining confidence limits for drug potency in immunoassay, Journal of Immunological Methods 157, 155-163.

Brain P. a Cousens R. (1989); An equation to describe dose responses where there is stimulation of growth at low doses. Weed res. 29: 93-96.

▼M7

Bunke, O., Droge, B. a Polzehl, J. (1999). Model selection, transformations and variance estimation in nonlinear regression. *Statistics* 33, 197-240.

Collett, D. (2002); Modelling Binary Data, second edition, Chapman and Hall, London.

Collett, D. (2003); Modelling Survival Data in Medical Research, second edition, Chapman a Hall, London.

Draper, N.R. a Smith, H. (1999); Applied Regression Analysis, third edition. New York: John Wiley & Sons.

Environment Canada (2005); Guidance Document on Statistical Methods for Environmental Toxicity Tests, Report EPS 1/RM/46

Huet, S., A. Bouvier, M.-A. Poursat, E. Jolivet (2003); Statistical Tools for Nonlinear Regression: A Practical Guide with S-PLUS and R Examples, Springer Series in Statistics, New York.

Lyles, R. H., C. Poindexter, A. Evans, M. Brown, a C.R. Cooper (2008); Nonlinear Model-Based Estimates of IC50 for Studies Involving Continuous Therapeutic Dose-Response Data, *Contemp Clin Trials*. 2008 November; 29(6): 878–886.

Morgan, B.J.T. (1992); Analysis of Quantal Response Data, Chapman and Hall, London.

Motulsky, H., A. Christopoulos (2004); Fitting Models to Biological Data Using Linear and Nonlinear Regression: A Practical Guide to Curve Fitting, Oxford University Press, USA.

O'Hara Hines, R. J. a J. F. Lawless (1993); Modelling Overdispersion in Toxicological Mortality Data Grouped over Time, *Biometrics* Vol. 49, s. 107-121

OECD (2006); Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: A guidance to application. Series Testing and Assessment, No. 54, Organisation for Economic Co-operation and Development, OECD, Paris.

Ott, R.L., M.T. Longnecker, An Introduction to Statistical Methods and Data Analysis, sixth edition, 2008, Brooks-Cole, Belmont, CA

Ratkowsky, D.A. (1993); Principles of nonlinear regression, Journal of Industrial Microbiology 12, 195-199.

Seber, G.A.F., C.J. Wild, Nonlinear Regression, Wiley, 2003

Slob W. (2002); Dose-response modelling of continuous endpoints. Toxicol. Sci., 66, 298-312

Wang, Q., D.L. Denton, a R. Shukla (2000); Applications and Statistical Properties Of Minimum Significant Difference-Based Criterion Testing In a Toxicity Testing Program, Environmental Toxicology and Chemistry, Vol. 19, s. 113–117, 2000.

▼M7

C.48. KRÁTKODOBÁ ZKOUŠKA PŮSOBENÍ NA REPRODUKCI RYB

ÚVOD

1. Tato zkušební metoda je rovnocenná Pokynu OECD pro zkoušení (TG) č. 229 (2012). Potřeba vyvinout a validovat zkoušku na rybách, která umožní zjistit chemické látky ovlivňující funkce endokrinního systému, pramení z obavy, že přítomnost chemických látek v životním prostředí může vyvolávat nepříznivé účinky na lidi i volně žijící zvířata, způsobené interakcí těchto chemických látek s endokrinním systémem. Organizace OECD v roce 1998 zahájila činnost s vysokou prioritou zaměřenou na revizi stávajících pokynů a vypracování nových pokynů pro zjišťování a zkoušení látek, které mohou narušovat činnost endokrinních žláz. Součástí této činnosti bylo vypracování zkušebních metod pro zjišťování chemických látek ovlivňujících endokrinní systém druhů ryb. Tato krátkodobá zkouška působení na reprodukci ryb prošla rozsáhlým validačním programem, který sestával z mezilaboratorních studií s vybranými chemickými látkami a jehož cílem bylo prokázat relevanci a spolehlivost této zkoušky pro zjišťování chemických látek ovlivňujících reprodukci ryb prostřednictvím různých mechanismů, včetně působení na endokrinní systém (1) (2) (3) (4) (5). Všechny ukazatele, které sleduje pokyn OECD pro zkoušení, byly validovány na jelečku velkohlavém a podmnožina vlastností byla validována na halančíku japonském (tj. vitelogenin a druhotné pohlavní rysy) a na daniu pruhovaném (tj. vitelogenin). Validační studie byly podrobeny odborné revizi, kterou provedla jednak komise složená z odborníků jmenovaných národními koordinátory programu zkušebních pokynů OECD (6), jednak komise odborníků pověřených Agenturou Spojených států amerických pro ochranu životního prostředí (29). Tato zkouška není určena k identifikaci konkrétních mechanismů poškození hormonálního systému, protože pokusná zvířata mají intaktní hypothalamo-hypofýzo-gonadální (HPG) osu, která může reagovat na chemické látky, jež mají vliv na HPG osu na různých úrovních.

2. Tato zkušební metoda popisuje screeningovou zkoušku *in vivo*, kdy jsou pohlavně zralí rybí samečkové a třoucí se samičky drženi pohromadě a po určitou omezenou část svého životního cyklu (21 dnů) jsou vystaveni působení chemické látky. Po ukončení 21denní doby expozice se u samečků a samiček změří dva biomarkerové ukazatele jakožto indikátory endokrinní aktivity zkoušené chemické látky; těmito ukazateli jsou vitelogenin a druhotné pohlavní znaky. Vitelogenin se měří u jelečka velkohlavého, halančíka japonského a dania pruhovaného, zatímco druhotné pohlavní znaky se měří u jelečka velkohlavého a halančíka japonského. Kromě toho se v průběhu celé zkoušky denně provádí kvantitativní sledování plodnosti. Uchovávají se také gonády a může být provedeno histopatologické hodnocení za účelem posouzení reprodukční způsobilosti zkušebních zvířat a posílení váhy důkazů, pokud jde o jiné ukazatele.

3. Tato biologická zkouška slouží jako screeningová zkouška reprodukce *in vivo* a na její provedení je třeba pohlížet v kontextu „Koncepčního rámce OECD pro zkoušky a posuzování chemických látek narušujících činnost endokrinních žláz“ (30). V tomto koncepčním rámci je krátkodobá zkouška působení na reprodukci ryb navržena na úrovni 3 jako zkouška *in vivo* poskytující údaje o vybraných endokrinních mechanismech/drahách.

VÝCHOZÍ ÚVAHY A OMEZENÍ

4. Vitelogenin (VTG) obvykle vzniká v játrech samiček vejcorodých obratlovců v reakci na endogenní estrogen v krevním oběhu. Je to prekurzor žloutkových proteinů a poté, co vznikne v játrech, putuje krevním řečištěm do vaječníku, kde je spotřebováván a modifikován vyvíjejícími se jikrami. V plazmě nedospělých rybích samiček a samečků vitelogenin téměř není možné detekovat, protože v krevním oběhu nemají dostatek estrogenu. Játra jsou však schopna vitelogenin syntetizovat a vylučovat jej v reakci na stimulaci exogenním estrogenem.

▼M7

5. Měření vitelogeninu slouží k zjištění chemických látek s různými mechanismy estrogenního působení. Zjistit přítomnost estrogenních chemických látek je možné pomocí měření indukce vitelogeninu u samečků ryb, které bylo obsáhle zdokumentováno v recenzované vědecké literatuře (např. (7)). Indukce vitelogeninu byla rovněž prokázána na základě expozice aromatizovatelným androgenům (8) (9). Pokles úrovně estrogenu v krevním oběhu u samiček, například prostřednictvím inhibice aromatázy, která endogenní androgen přeměňuje v přírodní estrogen 17-beta-estradiol, způsobuje snížení hladiny VTG, což se použije ke zjištění chemických látek s vlastnostmi způsobujícími inhibici aromatázy (10) (11). Biologický význam odezvy v podobě produkce vitelogeninu po inhibici estrogenu/aromatázy byl potvrzen a široce zdokumentován. Je však možné, že tvorba VTG u samiček může být ovlivněna také obecnou toxicitou a toxickými účinky jiného než endokrinního charakteru, např. toxickými účinky na játra.

6. Podařilo se úspěšně vyvinout několik metod měření, následně standardizovaných pro rutinní používání. Jedná se například o metody enzymové imunosorpční analýzy (ELISA) specifické pro jednotlivé druhy, kdy se pro stanovení hladiny vzniklého VTG v malých vzorcích krve nebo jater odebraných z jednotlivých ryb používá imunochemie (12) (13) (14) (15) (16) (17) (18). Pro měření VTG se odebírají vzorky krve jelečka velkohlavého, krve nebo homogenátu hlavy/ocasu dania pruhovaného a jater halančíka japonského. U halančíka japonského existuje dobrá korelace mezi VTG měřeným z krve a z jater (19). Doporučené postupy pro odběr vzorků pro účely analýzy VTG jsou uvedeny v dodatku 6. Soupravy pro měření VTG jsou široce dostupné; takovéto soupravy by měly být založeny na validované metodě zkoušky ELISA specifické pro jednotlivé druhy.

7. Druhotné pohlavní znaky samečků ryb určitých druhů jsou zvenku viditelné, kvantifikovatelné a odrážejí hladiny endogenních androgenů. Je tomu tak v případě jelečka velkohlavého a halančíka japonského, avšak nikoli u dania pruhovaného, které kvantifikovatelné druhotné pohlavní znaky nemá. U samiček se zachovává schopnost vyvinout samčí druhotné pohlavní znaky, jsou-li exponovány androgenním chemickým látkám ve vodě. Ve vědecké literatuře je k dispozici několik studií, které dokumentují tento typ reakce u jelečka velkohlavého (20) a halančíka japonského (21). Snížený výskyt druhotných pohlavních znaků u samečků by vzhledem k nízké statistické průkaznosti měl být interpretován s opatrností a měl by být založen na odborném posouzení a na závažnosti důkazů. Pro použití dania pruhovaného v této zkoušce existují omezení v důsledku neexistence kvantifikovatelných druhotných pohlavních znaků, které by reagovaly na chemické látky s androgenním působením.

8. U jelečka velkohlavého je hlavním indikátorem expozice exogennímu androgenu počet pářicích hrbolků, které se nacházejí na tlamě samičky. U halančíka japonského představuje hlavní marker exogenní expozice androgenním chemickým látkám počet bradavkovitých výběžků u samiček. Doporučené postupy, kterými je třeba se řídit při hodnocení pohlavních znaků, jsou pro jelečka velkohlavého uvedeny v dodatku 5A a pro halančíka japonského v dodatku 5B.

9. 21denní zkouška na rybách zahrnuje kvantitativní hodnocení produkce jiker a uchování gonád pro účely volitelného histopatologického hodnocení. Některé regulační orgány mohou tento dodatečný ukazatel vyžadovat pro úplnější zhodnocení reprodukční způsobilosti zkušebních zvířat nebo v případech, kdy vitelogenin a druhotné pohlavní znaky neodpovídají expozici chemické látce. Ačkoli některé ukazatele mohou být vysoce diagnostické (např. indukce VTG u samečků a tvorba hrbolků u samiček), ne všechny ukazatele zkoušky (např. plodnost a histopatologie gonád) jsou určeny k jednoznačnému stanovení specifických buněčných mechanismů působení. Vyvozovat závěry, pokud jde o možná endokrinní narušení, umožňuje spíše

▼M7

soubor ukazatelů společně, a poskytuje tak vodítko pro další zkoušení. Plodnost, ač není závislá na endokrinním působení, vzhledem ke své prokázané citlivosti na nejrůznější známé chemické látky ovlivňující funkce endokrinního systému (5) je důležitým ukazatelem, který by měl být ve zkoušce sledován, protože není-li ovlivněna plodnost a další ukazatele, posiluje to přesvědčení, že daná sloučenina pravděpodobně neovlivňuje funkci endokrinního systému. Je-li však plodnost ovlivněna, výrazně to přispěje k vyvození závěrů na základě váhy důkazů. Tato zkušební metoda dále obsahuje pokyny týkající se interpretace údajů a přijatelnosti výsledků zkoušky.

10. Definice použité v této zkušební metodě jsou uvedeny v dodatku 1.

PODSTATA ZKOUŠKY

11. Při zkoušce jsou ve zkušebních nádržích společně exponováni samečci a samičky ryb v reprodukčním stavu. Jejich dospělost a reprodukční stav umožňují jasné rozlišení pohlaví, a tím i analýzu jednotlivých ukazatelů v závislosti na pohlaví, a zajišťuje jejich citlivost vůči exogenním chemickým látkám. Při ukončení zkoušky se pohlaví ověří makroskopickým vyšetřením gonád po ventrálním otevření břicha nůžkami. Přehled příslušných podmínek pro provedení biologické zkoušky je uveden v dodatku 2. Zkouška obvykle začíná se vzorky ryb odebranými z populace, která je schopna tření; zestárlé ryby by se používat neměly. Pokyny ohledně stáří ryb a jejich reprodukčního stavu jsou uvedeny v oddíle „Výběr ryb“. Ve zkoušce se použijí tři expoziční koncentrace chemické látky a kontrola s vodou, a je-li to nezbytné, kontrola s rozpouštědlem. U dania pruhovaného se použijí dvě nádrže nebo opakování pro každou expozici (každá nádrž obsahuje 5 samečků a 5 samiček). U jelečka velkohlavého se použijí čtyři nádrže nebo opakování pro každou expozici (každá nádrž obsahuje 2 samečky a 4 samičky). Účelem je zohlednit teritoriální chování samečků jelečka velkohlavého a současně zachovat dostatečnou průkaznost zkoušky. U halančíka japonského se použijí čtyři nádrže nebo opakování pro každou expozici (každá nádrž obsahuje 3 samečky a 3 samičky). Expozice trvá 21 dnů a v den 21 expozice se u ryb odeberou vzorky. Kvantitativní sledování plodnosti se provádí denně.

12. Při odběru vzorků v den 21 se všechny ryby humánně usmrtí. U jelečka velkohlavého a halančíka japonského se změří druhotné pohlavní znaky (viz dodatek 5A a dodatek 5B); u dania pruhovaného a jelečka velkohlavého se odeberou vzorky krve pro stanovení VTG, alternativně lze pro stanovení VTG u dania pruhovaného odebrat hlavu/ocas (dodatek 6); u halančíka japonského se pro analýzu VTG odeberou játra (dodatek 6); pro potenciální histopatologické hodnocení se zafixují gonády buď vcelku, nebo v řezech (22).

KRITÉRIA PŘIJATELNOSTI ZKOUŠKY

13. Aby byly výsledky zkoušky přijatelné, musí být splněny tyto podmínky:

— mortalita v kontrolách s vodou (nebo s rozpouštědlem) na konci doby expozice by neměla být větší než 10 %,

— koncentrace rozpuštěného kyslíku by po celou dobu expozice měla dosahovat alespoň 60 % hodnoty nasycení vzduchem (ASV),

— teplota vody ve zkušebních nádržích by se v kterémkoli čase během doby expozice neměla lišit o více než ± 1,5 °C a měla by být udržována v rozpětí 2 °C v teplotních rozmezích stanovených pro jednotlivé zkušební druhy (dodatek 2),

— měly by být k dispozici důkazy pro prokázání toho, že koncentrace zkoušené chemické látky v roztoku byly uspokojivě udržovány v rozmezí ± 20 % od středních naměřených hodnot,

▼M7

— důkazy o tom, že před započetím expozice chemické látce se ryby aktivně třou ve všech opakováních a během zkoušky v kontrolních opakováních.

POPIS METODY

Přístroje a pomůcky

14. Normální laboratorní vybavení a zejména:

a. oximetr a pH-metr;

b. vybavení pro stanovení tvrdosti a alkality vody;

c. vhodné zařízení pro regulaci teploty a pro její pokud možno nepřetržité sledování;

d. nádrže z chemicky inertního materiálu o vhodném objemu vzhledem k doporučené velikosti násady a hustotě obsádky (viz dodatek 2);

e. třecí podklad pro jelečka velkohlavého a danio pruhované, potřebné podrobnosti jsou uvedeny v dodatku 4;

f. dostatečně přesné váhy (tj. vážící s přesností na ± 0,5 mg).

Voda

15. Jako zkušební voda může být použita jakákoli voda, v níž zkušební druh dlouhodobě přežívá a roste. Po celou dobu zkoušky by měla mít stejnou kvalitu. Hodnota pH by měla být v rozmezí 6,5 až 8,5, avšak během zkoušky by se pH nemělo lišit o více než ± 0,5. S cílem zajistit, aby ředicí voda neměla nadměrný vliv na výsledek zkoušky (například v důsledku tvorby komplexů zkoušené chemické látky), by v určitých intervalech měly být odebírány vzorky k analýze. Je-li kvalita ředicí vody relativně konstantní, mělo by být měření těžkých kovů (např. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd a Ni), hlavních aniontů a kationtů (např. Ca^{2+}, Mg^{2+}, Na^{+}, K^{+}, Cl^{-}, and SO_4^{2-}), pesticidů (např. celkový obsah organických fosforových a chlorových pesticidů) a celkového obsahu organického uhlíku a suspendovaných látek provedeno např. každé tři měsíce. Je-li prokázáno, že kvalita vody je konstantní po dobu alespoň jednoho roku, mohou být stanovení méně častá a intervaly lze prodloužit (např. každých šest měsíců). Některé chemické charakteristiky doporučené ředicí vody jsou uvedeny v dodatku 3.

Zkušební roztoky

16. Zkušební roztoky o zvolených koncentracích se připraví ředěním zásobního roztoku. Zásobní roztok se připraví přednostně jednoduchým mechanickým mícháním nebo protřepáváním zkoušené chemické látky v ředicí vodě (např. mechanickým mícháním nebo pomocí ultrazvuku). Pro dosažení vhodné koncentrace zásobního roztoku mohou být použity syticí kolony. Použití nosného rozpouštědla se nedoporučuje. Pokud je však rozpouštědlo nezbytné, měla by být souběžně nasazena kontrola s rozpouštědlem při stejné koncentraci rozpouštědla jako při expozicích chemické látce. V případě chemických látek, jejichž zkoušení je obtížné, může být rozpouštědlo po technické stránce nejlepším řešením; konzultován by měl být metodický dokument OECD ke zkouškám toxicity složitých látek a směsí pro vodní organismy (23). Volba rozpouštědla se řídí chemickými vlastnostmi dané látky nebo směsi. Dokument OECD doporučuje maximální koncentraci 100 µl/l, což by mělo být dodrženo. Nedávno provedený přezkum (24) však poukázal na další problémy při používání rozpouštědel ke zkoušení působení na endokrinní systém. Proto se doporučuje, aby byla koncentrace rozpouštědla – je-li nezbytné – snížena na co nejnižší úroveň, kdykoli je to technicky proveditelné (v závislosti na fyzikálně-chemických vlastnostech zkoušené chemické látky).

▼M7

17. Použije se průtokový zkušební systém. Takový systém nepřetržitě dávkuje a ředí zásobní roztok zkoušené látky (např. pomocí dávkovacího čerpadla, zařízení pro proporcionální ředění či syticího systému), aby byla zajištěna série koncentrací ve zkušebních komorách. Průtok zásobních roztoků a ředicí vody by měl být během zkoušky kontrolován v určitých intervalech, nejlépe denně, a neměl by se v průběhu zkoušky měnit o více než 10 %. Je třeba zajistit, aby se nepoužívaly trubky z plastů nízké kvality nebo jiných materiálů, jež mohou obsahovat biologicky aktivní chemické látky. Při výběru materiálu pro průtokový systém by měla být vzata v úvahu možná adsorpce zkoušené chemické látky na tento materiál.

Chov ryb

18. Zkušební ryby by měly pocházet z laboratorní populace, přednostně z jednoho chovu, která byla alespoň dva týdny před zkouškou udržována v podmínkách kvality vody a osvětlení podobných podmínkám použitým ve zkoušce. Je důležité, aby velikost násady a hustota obsádky (viz definice v dodatku 1) vyhovovaly použitému zkušebnímu druhu (viz dodatek 2).

19. Po 48hodinové aklimatizaci se zaznamená mortalita a uplatní se tato kritéria:

— mortalita vyšší než 10 % populace za sedm dnů: vyměnit celou obsádku,

— mortalita od 5 % do 10 % populace: aklimatizace dalších sedm dnů; je-li mortalita během následujících sedmi dnů vyšší než 5 %, vymění se celá obsádka,

— mortalita nižší než 5 % populace za sedm dnů: obsádka se použije do zkoušky.

20. Během aklimatizačního období, v předexpozičním období nebo během expozice nesmí být u ryb léčeny žádné nemoci.

Předexpozice a výběr ryb

21. Doporučuje se jedno- až dvoutýdenní předexpoziční období, kdy jsou ryby umístěny do podobných nádrží jako při skutečné zkoušce. V průběhu chovu a ve fázi expozice se rybám podává strava *ad libitum*. Fáze expozice začíná s pohlavně dimorfními dospělými rybami z laboratorní dodávky reprodukčně zralých zvířat (např. s jasně viditelnými druhotnými pohlavními znaky, pokud jde o jelečka velkohlavého a halančíka japonského), která se aktivně třou. Jako obecné vodítko lze uvést, že jelečci velkohlaví by měli být ve věku přibližně 20 (± 2) týdnů za předpokladu, že byli po celou délku svého života chováni při teplotě 25 ± 2 °C (nelze to však posuzovat odděleně od pozorování skutečného reprodukčního stavu dané skupiny ryb). Halančíci japonští by měli být přibližně ve věku 16 (± 2) týdnů za předpokladu, že byli po celou dobu svého života chováni při teplotě 25 ± 2 °C. Dania pruhovaná by měla být přibližně ve věku 16 (± 2) týdnů za předpokladu, že po celou dobu svého života byla chována při teplotě 26 ± 2 °C. Během předexpoziční fáze by měla být denně posuzována produkce jiker. Doporučuje se před tím, než jsou zařazeny do expoziční fáze zkoušky, sledovat tření ve všech nádržích (opakováních). Kvantitativní pokyny ohledně žádoucí denní produkce jiker nelze v současnosti udělit, ale je poměrně běžné pozorovat v průměru vytření >10 jiker z každé samičky za den u každého druhu. Pro zajištění vyváženého rozložení opakování by mělo být použito náhodně blokové uspořádání podle celkové produkce jiker, umožňující přidělit opakování do různých experimentálních úrovní.

▼M7

USPOŘÁDÁNÍ ZKOUŠKY

22. Použijí se tři koncentrace zkoušené chemické látky, jedna kontrola (s vodou) a v případě potřeby jedna kontrola s rozpouštědlem. Údaje lze analyzovat, aby se určily statisticky významné rozdíly mezi reakcí na expozici a reakcí kontrolní skupiny. Tyto analýzy ukážou, zda je nezbytné chemickou látku dále dlouhodoběji testovat na nepříznivé účinky (totiž na přežití, rozvoj, růst a reprodukci) a nepoužívat ji při posuzování rizik (25).

23. U dania pruhovaného se v den 21 experimentu odebere vzorek samečků a samiček pro každou úroveň expozice (5 samečků a 5 samiček v každé ze dvou duplikátních nádrží) a z kontroly (kontrol) za účelem změření vitelogeninu. U halančíka japonského se v den 21 experimentu odebere vzorek samečků a samiček pro každou úroveň expozice (3 samečci a 3 samičky v každé ze čtyř duplikátních nádrží) a z kontroly (kontrol) za účelem změření vitelogeninu a druhotných pohlavních znaků. U jelečka velkohlavého se v den 21 expozice odebere vzorek samečků a samiček (2 samečci a 4 samičky z každé ze čtyř duplikátních nádrží) a z kontroly (kontrol) za účelem změření vitelogeninu a druhotných pohlavních znaků. Vyžaduje se kvantitativní posouzení plodnosti a gonadální tkáně by měly být fixovány vcelku nebo v řezech pro případné histopatologické hodnocení, je-li požadováno.

Výběr zkušebních koncentrací

24. Pro účely této zkoušky by nejvyšší zkušební koncentrace měla být stanovena na úrovni maximální tolerované koncentrace (MTC) určené na základě zkoušky ke zjištění rozsahu či jiných údajů o toxicitě, na úrovni 10 mg/l nebo na úrovni maximální rozpustnosti ve vodě, podle toho, která z hodnot je nejnižší. Maximální tolerovaná koncentrace je definována jako nejvyšší zkušební koncentrace chemické látky, která vede k nižší než 10 % mortalitě. Použití tohoto přístupu předpokládá, že existují empirické údaje o akutní toxicitě nebo jiné údaje o toxicitě, z nichž je možné maximální tolerovanou koncentraci odhadnout. Odhad maximální tolerované koncentrace může být nepřesný a obvykle je nezbytný odborný úsudek.

25. Vyžadují se tři zkušební koncentrace odstupňované podle konstantního faktoru, který nepřekračuje 10, a kontrola s ředicí vodou (a v případě potřeby kontrola s rozpouštědlem). Doporučené rozmezí faktorů odstupňování je mezi 3,2 a 10.

POSTUP

Výběr a vážení zkušebních ryb

26. Je důležité minimalizovat rozdíly v hmotnostech ryb na začátku zkoušky. Vhodná rozpětí velikostí ryb různých druhů doporučených pro tuto zkoušku jsou uvedena v dodatku 2. Rozpětí individuálních hmotností samečků a samiček na začátku zkoušky by pro celou násadu ryb použitých ve zkoušce mělo být pokud možno ± 20 % aritmetického průměru hmotností stejného pohlaví. Aby bylo možné odhadnout střední hodnotu hmotnosti, doporučuje se před zkouškou zvážit dílčí vzorek rybí populace.

Podmínky expozice

Doba trvání

27. Doba trvání zkoušky je 21 dnů po předexpozičním období. Doporučené předexpoziční období je jeden až dva týdny.

Krmení

28. Ryby by měly být krmeny *ad libitum* dostatečným množstvím vhodného krmiva (dodatek 2), aby si udržely tělesnou kondici. Je třeba dbát na to, aby nedošlo k růstu mikroorganismů a k zakalení vody. Obecně lze říci, že

▼M7

denní množství krmiva lze rozdělit na dva nebo tři stejné díly a podáváno několikrát za den s odstupem alespoň tří hodin mezi dvěma krmeními. Podávání v jedné větší porci je přijatelné zejména o víkendech. 12 hodin před odběrem vzorků / pitvou se ryby přestanou krmit.

29. Rybí potrava by měla být vyhodnocena z hlediska přítomnosti kontaminantů, např. organochlorových pesticidů, polycyklických aromatických uhlovodíků (PAH) a polychlorovaných bifenylů (PCB). Měla by být vyloučena potrava se zvýšenou hladinou fytoestrogenů, která by zpochybnila reakci na známého agonistu estrogenu (např. 17-b-estradiol).

30. Nespotřebovaná potrava a výkaly se ze zkušebních nádrží odstraňují alespoň dvakrát týdně, např. opatrným odsátím ze dna jednotlivých nádrží pomocí odsávačky.

Světlo a teplota

31. Fotoperioda a teplota vody by měly vyhovovat zkušebním druhům (viz dodatek 2).

Četnost analytických stanovení a měření

32. Před započetím předexpoziční doby je třeba zajistit řádné fungování systému dávkování chemických látek. Měly by se stanovit všechny analytické metody, které budou zapotřebí, včetně dostatečných znalostí o stabilitě chemických látek ve zkušebním systému. Během zkoušky se koncentrace zkoušené látky stanovují v pravidelných intervalech následujícím způsobem: průtok zásobních roztoků toxické látky a ředicí vody se během zkoušky kontroluje nejlépe denně, avšak minimálně dvakrát týdně, a neměl by se v průběhu zkoušky měnit o více než 10 %. Doporučuje se na počátku zkoušky a poté v týdenních intervalech měřit skutečné koncentrace zkoušené chemické látky ve všech nádržích.

33. Doporučuje se zakládat výsledky na naměřených koncentracích. Udržela-li se však koncentrace zkoušené chemické látky v roztoku během celé zkoušky uspokojivě v rozmezí ± 20 % jmenovité koncentrace, lze výsledky zakládat na jmenovitých nebo změřených hodnotách.

34. Může být nezbytné vzorky filtrovat (např. přes filtr s průměrem pórů 0,45 μm) nebo je odstředit. Bude-li toho zapotřebí, doporučuje se odstřeďování. Neadsorbuje-li se zkoušená látka na filtry, je filtrace přijatelná.

35. V průběhu zkoušky se alespoň jednou týdně v každé zkušební nádrži měří koncentrace rozpuštěného kyslíku, teplota a pH. Nejméně jednou týdně se měří celková tvrdost a alkalita vody v kontrolních nádržích a v jedné nádrži s nejvyšší koncentrací. Teplota se měří pokud možno nepřetržitě alespoň v jedné zkušební nádrži.

Pozorování

36. V celém průběhu zkoušky nebo při jejím ukončení se posuzuje počet obecných reakcí (např. přežití) a biologických reakcí (např. hladiny VTG). Vyžadováno je každodenní kvantitativní sledování plodnosti. Měření a hodnocení těchto ukazatelů a jejich využití jsou popsány níže.

Přežití

37. Ryby by se v průběhu zkoušky měly prohlížet denně, každý úhyn by se měl zaznamenat a uhynulé ryby co nejdříve odstranit. Uhynulé ryby v kontrolních ani v exponovaných nádržích by se neměly nahrazovat. Makroskopickým hodnocením gonád by se mělo určit pohlaví ryb, které uhynuly v průběhu zkoušky.

▼M7

Chování a vzhled

38. Mělo by se zaznamenat jakékoli neobvyklé chování (v porovnání s kontrolními skupinami). Může se jednat o příznaky obecné toxicity včetně hyperventilace, nekoordinovaného plavání, ztráty rovnováhy a netypické nečinnosti nebo netypického příjmu potravy. Měly by se rovněž zaznamenat vnější abnormality (např. krvácení, ztráta zbarvení). Takovéto příznaky toxicity by měly být při interpretaci údajů pečlivě zváženy, neboť mohou ukazovat na koncentrace, při kterých biologické markery endokrinní aktivity nejsou spolehlivé. Pozorované změny chování mohou rovněž poskytnout užitečné kvalitativní informace, které se mohou stát podnětem pro možné budoucí požadavky na zkoušky s rybami. Například u jelečka velkohlavého byla pozorována teritoriální agresivita u normálních samečků nebo maskulinizovaných samiček exponovaných androgenním látkám; u dania pruhovaného se v důsledku expozice estrogenním nebo antiandrogenním látkám omezí nebo utlumí typické chování při páření a tření.

39. Některé vzhledové charakteristiky (především zbarvení) se během manipulace mohou rychle měnit, a proto je důležité provádět kvalitativní pozorování ještě před odstraněním ryb ze zkušebního systému. Dosavadní zkušenosti s jelečkem velkohlavým naznačují, že některé chemické látky s endokrinním působením mohou zpočátku vyvolat změny těchto vnějších znaků: zbarvení těla (světlé nebo tmavé), forma zbarvení (přítomnost svislých pruhů) a tvar těla (hlavy a hrudní oblasti). Proto by pozorování fyzického vzhledu ryb měla být prováděna jak v průběhu zkoušky, tak na konci studie.

Plodnost

40. Denní kvantitativní pozorování tření by mělo být zaznamenáno na bázi opakování. Produkce jiker by měla být zaznamenána na bázi opakování jako počet jiker na jednu přeživši samičku za den. Jikry se ze zkušebních nádrží denně odstraňují. U jelečka velkohlavého a dania pruhovaného by se měly do zkušebních nádrží vložit třecí podklady, aby se ryby mohly třít za normálních podmínek. V dodatku 4 jsou uvedeny další podrobnosti k doporučeným třecím podkladům pro dania pruhovaného (dodatek 4A) a jelečka velkohlavého (dodatek 4B). U halančíka japonského se přidání třecího podkladu nepovažuje za nezbytné.

Humánní usmrcení ryb

41. V den 21, tj. při ukončení expozice, by se ryby měly usmrtit přiměřeným množstvím trikainu (trikain methan sulfonát, Metacain, MS-222 (číslo CAS 886-86-2)), pufrovaného na koncentraci 100–500 mg/l roztokem $NaHCO_3$ (hydrogenuhličitan sodný, číslo CAS 144-55-8) v koncentraci 300 mg/l, aby se snížilo podráždění sliznice; poté se odeberou vzorky krve nebo tkání za účelem stanovení vitelogeninu, jak je vysvětleno v části týkající se vitelogeninu.

Pozorování druhotných pohlavních znaků

42. Některé chemické látky s endokrinním působením mohou vyvolat změny v druhotných pohlavních znacích specifických pro jednotlivé druhy (např. počet pářicích hrbolků u samečků jelečka velkohlavého a bradavkovitých výběžků u samečků halančíka japonského). Chemické látky s určitými účinky pak mohou způsobit abnormální výskyt druhotných pohlavních znaků u zvířat opačného pohlaví; např. agonisté androgenního receptoru, jako je trenbolon, methyltestosteron a dihydrotestosteron, mohou způsobit, že se u samiček jelečka vyvinou výrazné pářicí hrbolky nebo že se u samiček halančíka japonského vyvinou bradavkovité výběžky (11) (20) (21). Bylo také zaznamenáno, že agonisté receptoru estrogenu mohou způsobit snížení počtu pářicích hrbolků a velikost dorzálních týlních polštářků u dospělých samečků jelečka velkohlavého (26) (27). Takováto obecná morfologická pozorování mohou poskytnout užitečné kvalitativní a kvantitativní informace, které se mohou stát podnětem pro možné budoucí požadavky na zkoušky

▼M7

s rybami. Počet a velikost pářicích hrbolků u jelečka velkohlavého a bradavkovitých výběžků u halančíka japonského lze kvantifikovat buď přímo, anebo pomocí uchovávaných vzorků, což je praktičtější. Doporučené postupy pro hodnocení druhotných pohlavních znaků u jelečka velkohlavého jsou k dispozici v dodatku 5A a u halančíka japonského v dodatku 5B.

Vitelogenin (VTG)

43. Pomocí heparinizované mikrohematokritové kapiláry nebo alternativně srdeční punkcí pomocí injekční stříkačky se odebere krev z ocasní tepny/žíly. V závislosti na velikosti ryb se objem krve, který lze odebrat, zpravidla nachází v rozmezí 5–60 µl u jednoho jelečka velkohlavého a 5–15 µl u jednoho dania pruhovaného. Odstředěním se z krve oddělí plazma a uskladní se s inhibitory proteázy při teplotě – 80 °C do doby, než je analyzována na VTG. Alternativně lze jako zdroj tkáně pro stanovení VTG u halančíka japonského použít játra a u dania pruhovaného homogenát hlavy/ocasu (dodatek 6). Měření VTG by mělo být založeno na validované homologované metodě ELISA s použitím homologovaného standardu VTG a homologovaných protilátek. Doporučuje se použít metodu schopnou odhalit tak nízké hladiny VTG, jako je několik málo ng na ml plazmy (nebo ng na mg tkáně, což je základní hladina u neexponovaných samečků ryb).

44. Kontrola kvality analýzy VTG bude provedena za použití standardů, provedením slepých zkoušek a analýzou alespoň dvou duplikátních vzorků. U každé metody ELISA by měla být provedena zkouška na vliv matrice (účinek ředění vzorku) s cílem určit minimální faktor ředění vzorku. Každá destička pro analýzu metodou ELISA, která se používá pro zkoušky VTG, by měla zahrnovat tyto vzorky pro kontrolu kvality: alespoň 6 kalibračních standardů pokrývajících rozmezí očekávaných koncentrací VTG a alespoň jednu slepou zkoušku nespecifické vazby (analyzované na dvou duplikátních vzorcích). Absorbance při těchto slepých zkouškách by neměla přesahovat 5 % maximální absorbance kalibrovaných standardů. Analyzovat se budou alespoň dva alikvotní vzorky (duplikátní jamky) vzorku každého ředění. Duplikátní jamky, které se liší o více než 20 %, by měly být analyzovány znovu.

45. Korelační koeficient (R^2) u kalibračních křivek by měl být větší než 0,99. Vysoká korelace však nepostačuje k tomu, aby zaručila odpovídající prognózu koncentrace ve všech rozmezích. Kromě dostatečně vysoké korelace u kalibrační křivky by koncentrace všech standardů vypočtené z kalibrační křivky měly ležet mezi 70 a 120 % jejich jmenovité koncentrace. Pokud se jmenovité koncentrace od kalibrační regresní křivky odchylují (např. při nízkých koncentracích), může být pro adekvátní vyjádření údajů o absorbanci nezbytné rozdělit kalibrační křivku na nízké a vysoké rozpětí nebo použít nelineární model. Je-li křivka rozdělena, oba segmenty křivky by měly mít $R^2 > 0,99$.

46. Mez detekce (LOD) je definována jako koncentrace nejnižšího analytického standardu a mez stanovitelnosti (LOQ) je definována jako koncentrace nejnižšího analytického standardu vynásobená nejnižším faktorem ředění.

47. Každý den, kdy se provádějí zkoušky VTG, se analyzuje obohacený vzorek vytvořený pomocí referenčního standardu pro opakovatelnost (dodatek 7). Poměr mezi očekávanou koncentrací a naměřenou koncentrací se zaznamená spolu s výsledky všech souborů zkoušek provedených v týž den.

Hodnocení histopatologie gonád

48. Regulační orgány mohou vyžadovat provedení histopatologie gonád s cílem prozkoumat cílový orgán osy HPG po expozici chemické látce. V souvislosti s tím se gonády fixují buď vcelku, nebo v řezech. Je-li požadována histopatologie, budou při hodnocení působení chemické látky na endokrinní

▼M7

systém hledány specifické reakce související s endokrinním systémem. Tyto diagnostické reakce zahrnují hlavně přítomnost testikulárních oocytů, hyperplazii Leydigových buněk, sníženou tvorbu žloutku, zvýšení počtu spermatogonií a perifolikulární hyperplazii. Jiné léze v gonádách jako atrézie oocytů, testikulární degenerace a změny stadia mohou mít různé příčiny. Pokyny pro histopatologii rybích gonád stanoví postupy, které se použijí při pitvě, fixaci, provádění řezů a histopatologickém hodnocení gonád (22).

ÚDAJE A PŘEDKLÁDÁNÍ ZPRÁV

Hodnocení reakcí biologických markerů pomocí analýzy rozptylu (ANOVA)

49. Pro zjištění potenciálního působení chemické látky se pomocí analýzy rozptylu (ANOVA) porovnávají reakce mezi zkušebními a kontrolními skupinami. Je-li nasazena kontrola s rozpouštědlem, provede se pro každý ukazatel vhodné statistické porovnání mezi kontrolami s ředicí vodou a kontrolami s rozpouštědlem. Návod k tomu, jak při následné statistické analýze zacházet s údaji o kontrolách s ředicí vodou a kontrolách s rozpouštědlem, lze najít v dokumentu OECD, 2006c (28). Veškeré údaje o biologických reakcích se analyzují a zaznamenají se za každé pohlaví zvlášť. Nejsou-li splněny předpoklady pro použití parametrických metod kvůli nenormálnímu rozdělení (např. Shapirův-Wilkův test) nebo heterogennímu rozptylu (Bartlettův test nebo Lewenův test), měla by být před provedením ANOVA zvážena transformace údajů za účelem homogenizace rozptylů nebo by měla být provedena vážená ANOVA. V případě nemonotónní závislosti dávka-odezva lze použit Dunnettův test (parametrický) vícenásobných párových porovnání nebo Mannův-Whitneyův test s Bonferroniho korekcí (neparametrický). Je-li závislost dávka-odezva přibližně monotónní, lze použít jiné statistické testy (např. Jonckheerův-Terpstrův test nebo Williamsův test). V dodatku 8 je uvedeno statistické schéma, které může pomoci při rozhodování o tom, jaký statistický test je nejvhodnější použít. Další informace lze získat rovněž v dokumentu OECD o současných přístupech ke statistické analýze údajů o ekotoxicitě (28).

Zpráva o výsledcích zkoušky

50. Údaje o studii by měly zahrnovat:

Zkušební zařízení:

— odpovědní pracovníci a jejich odpovědnost v rámci studie,

— každá laboratoř by měla prokázat svoji způsobilost testováním škály reprezentativních chemických látek.

Zkoušená chemická látka:

— charakterizace zkoušených chemických látek,

— fyzikální povaha a relevantní fyzikálně-chemické vlastnosti,

— metoda a frekvence přípravy zkušebních koncentrací,

— informace o stabilitě a biologické rozložitelnosti.

Rozpouštědlo:

— charakterizace rozpouštědla (povaha, použitá koncentrace),

— zdůvodnění výběru rozpouštědla (není-li použita voda).

▼M7

Pokusná zvířata:

— druh a kmen,

— dodavatel a konkrétní zařízení dodavatele,

— věk ryb na počátku zkoušky a reprodukční stav / stav z hlediska tření,

— podrobnosti o postupu aklimatizace ryb,

— tělesná hmotnost ryb na počátku expozice (z dílčího vzorku rybí populace).

Zkušební podmínky:

— použitý zkušební postup (druh zkoušky, velikost nasazení, hustota obsádky atd.),

— metoda přípravy zásobních roztoků a průtok,

— jmenovité zkušební koncentrace, týdně naměřené koncentrace zkušebních roztoků a použitá analytická metoda, střední hodnoty koncentrací naměřených ve zkušebních nádržích a směrodatné odchylky a důkazy toho, že naměřené hodnoty odpovídají koncentracím zkoušené chemické látky v pravém roztoku,

— charakteristiky ředicí vody (včetně pH, tvrdosti, alkality, teploty, koncentrace rozpuštěného kyslíku, koncentrace zbytkového chloru, celkového obsahu organického uhlíku, obsahu suspendovaných látek a výsledků jakýchkoli jiných provedených měření),

— kvalita vody ve zkušebních nádržích: pH, tvrdost, teplota a koncentrace rozpuštěného kyslíku,

— podrobné informace o krmení (např. druh krmiva/krmiv, původ, podávané množství a frekvence krmení), a jsou-li k dispozici, analýzy na přítomnost příslušných kontaminujících látek (např. polychlorovaných bifenylů, polyaromatických uhlovodíků a organochlorových pesticidů).

Výsledky:

— důkazy o tom, že kontrolní skupiny vyhověly kritériím přijatelnosti zkoušky,

— údaje o mortalitě pro každou zkušební koncentraci a kontrolní skupinu,

— použité metody statistické analýzy, zpracování údajů a zdůvodnění použitých metod,

— údaje o biologických pozorováních celkové morfologie včetně druhotných pohlavních znaků, tvorby jiker a VTG,

— výsledky analýz údajů, přednostně ve formě tabulek a grafů,

— výskyt jakýchkoli neobvyklých reakcí ryb a viditelné účinky vyvolané zkoušenou chemickou látkou.

▼M7

POKYNY K INTERPRETACI A PŘIJETÍ VÝSLEDKŮ

51. Tento oddíl obsahuje některé aspekty, které je třeba vzít v úvahu při interpretaci výsledků zkoušky pro různé měřené ukazatele. K výsledkům zkoušky je třeba přistupovat s opatrností, pokud se zdá, že zkoušená chemická látka způsobuje zjevnou toxicitu nebo ovlivňuje celkový stav zkušebního zvířete.

52. Při stanovování rozmezí zkušebních koncentrací by se mělo dbát na to, aby nebyla překročena maximální tolerovaná koncentrace a byla tak umožněna smysluplná interpretace údajů. Je důležité, aby existovala alespoň jedna koncentrace, při které se neprojevují žádné příznaky toxických účinků. Příznaky onemocnění a příznaky toxických účinků se pečlivě posoudí a zaznamenají. Je například možné, že tvorba VTG u samiček může být ovlivněna také obecnou toxicitou a toxickými účinky jiného než endokrinního charakteru, např. toxickými účinky na játra. Interpretace účinků však může být podpořena na jiných úrovních expozice, které nejsou zkresleny systémovou toxicitou.

53. Existuje několik aspektů, které je třeba zvážit pro přijetí výsledků zkoušky. Obecně vzato by hladiny VTG v kontrolních skupinách samečků a samiček měly být odlišné – u jelečka velkohlavého a dania pruhovaného by se měly lišit přibližně o tři řády a u halančíka japonského přibližně o jeden řád. Příklady rozmezí hodnot zjištěných v kontrolních a exponovaných skupinách jsou dostupné ve validačních zprávách (1) (2) (3) (4). Vysoké hodnoty VTG u samečků v kontrolních skupinách by mohly zpochybnit citlivost zkoušky a její schopnost odhalit slabé agonisty estrogenu. Nízké hodnoty VTG u samiček v kontrolních skupinách by mohly zpochybnit citlivost zkoušky a její schopnost detekovat inhibitory aromatázy a antagonisty estrogenu. Při vypracování tohoto návodu byly použity validační studie.

54. Pokud jde o kvantifikaci tvorby jiker, zde se projevují důležité rozdíly [variační koeficient (CV) se může pohybovat od 20 do 60 %], které mohou snížit schopnost zkoušky odhalit výrazný pokles tvorby jiker nižší než 70 %, jestliže se CV blíží 50 % nebo dosahuje ještě vyšší hodnoty. Omezí-li se CV na nižší hodnoty (kolem 20 až 30 %), bude mít zkouška přijatelnou průkaznost (80 %) pro detekci 40 až 50 % snížení tvorby jiker. U jelečka velkohlavého by uspořádání zkoušky zahrnující čtyři opakování pro každou úroveň expozice mělo umožnit větší průkaznost ukazatele plodnosti v porovnání se zkušebním uspořádáním pouze se dvěma opakováními.

55. Pokud laboratoř dříve tuto zkoušku neprováděla nebo došlo k podstatným změnám (např. změna rybího kmene nebo dodavatele), lze doporučit provedení studie odborné způsobilosti. Doporučuje se použít k tomuto účelu chemické látky pokrývající širší spektrum účinků nebo dopadů na několik ukazatelů zkoušky. V praxi se doporučuje, aby každá laboratoř shromáždila své vlastní historické kontrolní údaje pro samečky a samičky v kontrolních skupinách a pro pozitivní kontrolu estrogenního působení chemické látky (např. 17-beta-estradiolu při koncentraci 100 ng/l nebo dobře známého slabého agonisty), jež vede ke zvýšené hodnotě VTG u samečků ryb, pozitivní kontrolu inhibice aromatázy chemické látky (např. fadrozolu nebo prochlorazu při koncentraci 300 µg/l), jež vede ke zvýšené hodnotě VTG u samiček ryb, a pozitivní kontrolu androgenního působení chemické látky (např. 17-beta-trenbolonu při koncentraci 5 µg/l), jež vede k indukci druhotných pohlavních znaků u samiček jelečka velkohlavého a halančíka japonského. Pro zajištění způsobilosti laboratoře lze všechny tyto údaje porovnat s dostupnými údaji z validačních studií (1) (2) (3).

56. Obecně lze říci, že měření VTG se považuje za pozitivní, dojde-li v porovnání s kontrolní skupinou ke statisticky významnému nárůstu VTG u samečků ($p < 0,05$) nebo ke statisticky významnému poklesu u samiček

▼M7

($p < 0,05$) alespoň při nejvyšší koncentraci zkoušené látky a za nepřítomnosti příznaků obecné toxicity. Pozitivní výsledek se dále podpoří prokázáním biologicky možné závislosti mezi dávkou a odezvou. Jak bylo uvedeno výše, pokles hodnoty VTG nemusí být zcela endokrinního původu; avšak pozitivní výsledek by měl být obecně interpretován jako důkaz endokrinního působení *in vivo* a měl by být obvykle podnětem ke krokům za účelem dalšího vyjasnění.

57. Regulační orgány mohou vyžadovat histopatologické hodnocení gonád s cílem stanovit reprodukční způsobilost zkušebních zvířat a umožnit posouzení výsledků zkoušky na základě závažnosti důkazů. Provedení histopatologie gonád nemusí být nezbytné v případech, kdy jsou buď VTG, anebo druhotné pohlavní znaky pozitivní (tj. zvýšení nebo pokles VTG, nebo indukce druhotných pohlavních znaků).

LITERATURA

(1) OECD (2006a). Report of the Initial Work Towards the Validation of the 21-Day Fish Screening Assay for the Detection of Endocrine active Substances (Phase 1A). OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.60, Paris.

(1) OECD (2006b). Report of the Initial Work Towards the Validation of the 21-Day Fish Screening Assay for the Detection of Endocrine active Substances (Phase 1B). OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.61, Paris.

(2) OECD (2007). Final report of the Validation of the 21-day Fish Screening Assay for the Detection of Endocrine Active Substances. Phase 2: Testing Negative Substances. OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.78, Paris.

(3) Owens JW (2007). Phase 3 report of the validation of the OECD Fish Screening Assay. CEFIC LRI Project, Endocrine. http://www.cefic-lri.org/index.php?page=projects (accessed 18/09/08).

(4) US EPA (2007). Validation of the Fish Short-Term Reproduction Assay: Integrated Summary Report. 15 December 2007. US Environmental Protection Agency, Washington, DC. 104 s.

(5) OECD (2008). Report of the Validation Peer Review for the 21-Day Fish Endocrine Screening Assay and Agreement of the Working Group of the National Coordinators of the Test Guidelines Programme on the Follow-up of this Report. OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.94, Paris.

(6) Sumpter J.P. a S. Jobling (1995). Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment. Environmental Health Perspectives; 103 Suppl 7:173-8 Review.

(7) Pawlowski S. *et al.* (2004). Androgenic and estrogenic effects of the synthetic androgen 17alpha-methyltestosterone on sexual development and reproductive performance in the fathead minnow (*Pimephales promelas*) determined using the gonadal recrudescence assay. Aquatic Toxicology; 68(3):277-91.

(8) Andersen L. *et al.* (2006). Short-term exposure to low concentrations of the synthetic androgen methyltestosterone affects vitellogenin and steroid levels in adult male zebrafish (Danio rerio). Aquatic Toxicology; 76(3-4):343-52.

(9) Ankley G.T. *et al.* (2002). Evaluation of the aromatase inhibitor fadrozole in a short-term reproduction assay with the fathead minnow (*Pimephales promelas*). Toxicological Sciences; 67(1):121-30.

(10) Panter G.H. *et al.* (2004). Successful detection of (anti-)androgenic and aromatase inhibitors in pre-spawning adult fathead minnows (*Pimephales promelas*) using easily measured endpoints of sexual development. Aquatic Toxicology; 70(1):11-21.

▼**M7**

(11) Parks L.G. *et al.* (1999). Fathead minnow (*Pimephales promelas*) vitellogenin: purification, characterization and quantitative immunoassay for the detection of estrogenic compounds. Comparative Biochemistry and Physiology. Part C Pharmacology, toxicology and endocrinology; 123(2):113-25.

(12) Panter G.H. *et al.* (1999). Application of an ELISA to quantify vitellogenin concentrations in fathead minnows (*Pimephales promelas*) exposed to endocrine disrupting chemicals. CEFIC-EMSG research report reference AQ001. CEFIC, Brussels, Belgium.

(13) Fenske M. *et al.* (2001). Development and validation of a homologous zebrafish (*Danio rerio* Hamilton- Buchanan) vitellogenin enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and its application for studies on estrogenic chemicals. Comp. Biochem. Phys. C 129 (3): 217-232.

(14) Holbech H. *et al.* (2001). Development of an ELISA for vitellogenin in whole body homogenate of zebrafish (*Danio rerio*). Comparative Biochemistry and Physiology. Part C Pharmacology, toxicology and endocrinology; 130: 119-131.

(15) Rose J. *et al.* (2002). Vitellogenin induction by 17b-estradiol and 17a-ethinylestradiol in male zebrafish (*Danio rerio*). Comp. Biochem. Physiol. C. 131: 531-539.

(16) Brion F. *et al.* (2002). Development and validation of an enzyme-linked immunosorbent assay to measure vitellogenin in the zebrafish (*Danio rerio*). Environmental Toxicology and Chemistry; vol 21: 1699-1708.

(17) Yokota H. *et al.* (2001). Development of an ELISA for determination of the hepatic vitellogenin in Medaka (*Oryzias latipes*). *Jpn J Environ Toxicol* 4:87–98.

(18) Tatarazako N. *et al.* (2004). Validation of an enzyme-linked immunosorbent assay method for vitellogenin in the Medaka. *Journal of Health Science* 50:301-308.

(19) Ankley G.T. *et al.* (2003). Effects of the androgenic growth promoter 17-beta-trenbolone on fecundity and reproductive endocrinology of the fathead minnow. Environmental Toxicology and Chemistry; 22(6): 1350-60.

(20) Seki M. *et al.* (2004). Fish full life-cycle testing for androgen methyltestosterone on medaka (*Oryzias latipes*). Environmental Toxicology and Chemistry; 23(3):774-81.

(21) OECD (2010). Guidance Document on Fish Gonadal Histopathology. OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 123, Paris.

(22) OECD (2000) Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment. No. 23. Paris.

(23) Hutchinson T.H. *et al.* (2006a). Acute and chronic effects of carrier solvents in aquatic organisms: A critical review. Review. Aquatic Toxicology, 76; s. 69–92.

(24) Hutchinson T.H. *et al.* (2006b). Screening and testing for endocrine disruption in fish-biomarkers as „signposts," not „traffic lights," in risk assessment. Environmental Health Perspectives; 114 Suppl 1:106-14.

(25) Miles-Richardson S.R. *et al.* (1999). Effects of waterborne exposure to 17b-estradiol on secondary sex characteristics and gonads of the fathead minnow (*Pimephales promelas*). Aquat. Toxicol. 47, 129-145.

▼**M7**

(26) Martinovic D. *et al.* (2008). Characterization of reproductive toxicity of vinclozolin in the fathead minnow and co-treatment with an androgen to confirm an anti-androgenic mode of action. Environ. Toxicol. Chem. 27, 478-488.

(27) OECD (2006c), Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application, OECD Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No.54, OECD, Paris.

(28) US EPA (2008), Peer-Review Results for the Fish Short-Term Reproduction Assay, dated 30 January 2008, US Environmental Protection Agency, Washington DC. 110 s.

(29) OECD (2012), *OECD Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupters*, OECD Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 150, OECD, Paris.

▼**M7**

Dodatek 1

ZKRATKY A DEFINICE

Chemická látka: látka nebo směs.

CV: variační koeficient.

ELISA: enzymová imunosorpční analýza.

Osa HPG: hypothalamo-hypofýzo-gonadální osa.

Velikost násady: živá hmotnost ryb na jednotku objemu vody.

MTC: maximální tolerovaná koncentrace, představuje přibližně 10 % mediánu letální koncentrace (LC_{50}).

Hustota obsádky: počet ryb na jednotku objemu vody.

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

VTC: vitelogenin je fosfolipoglykoprotein, prekurzor proteinů vaječného žloutku, který se obvykle vyskytuje u sexuálně aktivních samiček všech vejcorodých druhů.

▼M7

Dodatek 2

EXPERIMENTÁLNÍ PODMÍNKY PRO SCREENINGOVOU ZKOUŠKU ENDOKRINNÍHO PŮSOBENÍ NA RYBÁCH

1. Doporučený druh	Jeleček velkohlavý (*Pimephales promelas*)	Halančík japonský (*Oryzias latipes*)	Danio pruhované (*Danio rerio*)
2. Typ zkoušky	průtoková	průtoková	průtoková
3. Teplota vody	25 ± 2 °C	25 ± 2 °C	26 ± 2 °C
4. Kvalita osvětlení	Fluorescenční zářivky (širokospektrální)	Fluorescenční zářivky (širokospektrální)	Fluorescenční zářivky (širokospektrální)
5. Intenzita osvětlení	10–20 μE/m^2/s, 540–1 000 luxů nebo 50–100 ft-c (okolní laboratorní hodnoty)	10–20 μE/m^2/s, 540–1 000 luxů nebo 50–100 ft-c (okolní laboratorní hodnoty)	10–20 μE/m^2/s, 540–1 000 luxů nebo 50–100 ft-c (okolní laboratorní hodnoty)
6. Fotoperioda (přechody ve formě svítání/stmívání jsou volitelné, nejsou však považovány za nezbytné)	16 h světlo, 8 h tma	12–16 h světlo, 12–8 h tma	12–16 h světlo, 12–8 h tma
7. Velikost násady	< 5 g na l	< 5 g na l	< 5 g na l
8. Velikost zkušební komory	10 l (minimálně)	2 l (minimálně)	5 l (minimálně)
9. Objem zkušebního roztoku	8 l (minimálně)	1,5 l (minimálně)	4 l (minimálně)
10. Výměny objemu zkušebního roztoku	Nejméně 6krát denně	Nejméně 5krát denně	Nejméně 5krát denně
11. Stáří zkušebních organismů	Viz odstavec 21	Viz odstavec 21	Viz odstavec 21
12. Přibližná živá hmotnost dospělých ryb (v g)	Samičky: 1,5 ± 20 % Samečci: 2,5 ± 20 %	Samičky: 0,35 ± 20 % Samečci: 0,35 ± 20 %	Samičky: 0,65 ± 20 % Samečci: 0,4 ± 20 %
13. Počet ryb v každé zkušební nádrži	6 (2 samečci a 4 samičky)	6 (3 samečci a 3 samičky)	10 (5 samečků a 5 samiček)
14. Počet expozic	= 3 (plus příslušné kontrolní skupiny)	= 3 (plus příslušné kontrolní skupiny)	= 3 (plus příslušné kontrolní skupiny)
15. Počet nádrží pro každou expozici	minimálně 4	minimálně 4	minimálně 2
16. Počet ryb pro každou zkušební koncentraci	16 dospělých samiček a 8 samečků (4 samičky a 2 samečci v každé duplikátní nádrži)	12 dospělých samiček a 12 samečků (3 samičky a 3 samečci v každé duplikátní nádrži)	10 dospělých samiček a 10 samečků (5 samiček a 5 samečků v každé duplikátní nádrži)
17. Krmný režim	Živé nebo zmrazené dospělé nebo larvy (nauplia) žábronožky solné dvakrát nebo třikrát denně (*ad libitum*), komerčně dostupná potrava nebo kombinace výše uvedeného	Larvy (nauplia) žábronožky solné dvakrát nebo třikrát denně (*ad libitum*), komerčně dostupná potrava nebo kombinace výše uvedeného	Larvy (nauplia) žábronožky solné dvakrát nebo třikrát denně (*ad libitum*), komerčně dostupná potrava nebo kombinace výše uvedeného

▼M7

18. Provzdušňování	Žádné, dokud koncentrace rozpuštěného kyslíku neklesne pod 60 % nasycení vzduchem	Žádné, dokud koncentrace rozpuštěného kyslíku neklesne pod 60 % nasycení vzduchem	Žádné, dokud koncentrace rozpuštěného kyslíku neklesne pod 60 % nasycení vzduchem
19. Ředicí voda	Čistá povrchová, studniční nebo rekonstituovaná voda nebo odchlorovaná vodovodní voda	Čistá povrchová, studniční nebo rekonstituovaná voda nebo odchlorovaná vodovodní voda	Čistá povrchová, studniční nebo rekonstituovaná voda nebo odchlorovaná vodovodní voda
20. Předexpoziční období	doporučeno 7 až 14 dnů	doporučeno 7 až 14 dnů	doporučeno 7 až 14 dnů
21. Trvání expozice chemické látce	21 dnů	21 dnů	21 dnů
22. Biologické ukazatele	— přežití — chování — plodnost — druhotné pohlavní znaky — VTG — volitelně histopatologie gonád	— přežití — chování — plodnost — druhotné pohlavní znaky — VTG — volitelně histopatologie gonád	— přežití — chování — plodnost — VTG — volitelně histopatologie gonád
23. Přijatelnost zkoušky	Obsah rozpuštěného kyslíku ≥ 60 % nasycení; střední teplota 25 ± 2 °C; 90 % přežití ryb v kontrolních skupinách; naměřené zkušební koncentrace v rozmezí 20 % středních naměřených hodnot pro každou úroveň expozice.	Obsah rozpuštěného kyslíku ≥ 60 % nasycení; střední teplota 25 ± 2 °C; 90 % přežití ryb v kontrolních skupinách; naměřené zkušební koncentrace v rozmezí 20 % středních naměřených hodnot pro každou úroveň expozice.	Obsah rozpuštěného kyslíku ≥ 60 % nasycení; střední teplota 26 ± 2 °C; 90 % přežití ryb v kontrolních skupinách; naměřené zkušební koncentrace v rozmezí 20 % středních naměřených hodnot pro každou úroveň expozice.

▼M7

Dodatek 3

NĚKTERÉ CHEMICKÉ CHARAKTERISTIKY DOPORUČENÉ ŘEDICÍ VODY

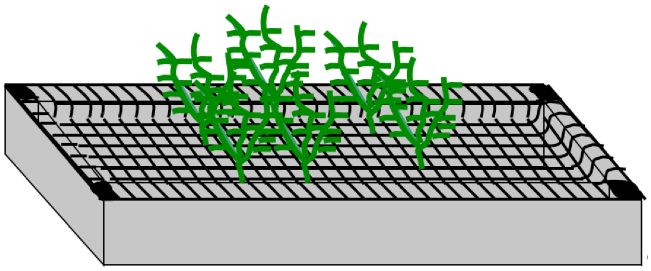
SLOŽKA	KONCENTRACE
Pevné částice	< 20 mg/l
Celkový obsah organického uhlíku	< 2 mg/l
Neionizovaný amoniak	< 1 µg/l
Zbytkový chlor	< 10 µg/l
Celkový obsah organofosforových pesticidů	< 50 ng/l
Celkový obsah organochlorových pesticidů a polychlorovaných bifenylů	< 50 ng/l
Celkový obsah organického chloru	< 25 ng/l

▼M7

Dodatek 4A

TŘECÍ PODKLAD PRO DANIO PRUHOVANÉ

Vytírací rošt: celoskleněná miska na nástroje, např. o rozměrech (d × š × v) 22 × 15 × 5,5 cm, pokrytá snímatelnou drátěnou mřížkou z nerezové oceli (šířka otvorů 2 mm). Mřížka by měla pokrývat misku na nástroje v místech pod úrovní okraje.



Na mřížku se připevní třecí podklad. Měl by vytvořit strukturu, do které budou ryby vplouvat. Vhodné jsou například umělé akvarijní rostliny vyrobené ze zeleného plastového materiálu (poznámka: je třeba vzít v potaz možnou adsorpci zkoušené chemické látky na plastový materiál). Plastový materiál se dostatečně dlouho proplachuje v dostatečném objemu horké vody, aby se zajistilo, že se do zkušební vody nedostanou žádné chemické látky. Při použití skleněných materiálů je třeba zajistit, aby se ryby při prudkých pohybech neporanily a netísnily.

Vzdálenost mezi roštem a skleněnými tabulemi by měla být alespoň 3 cm, aby se zajistilo, že ke tření nebude docházet mimo rošt. Jikry vytřené do roštu propadávají mřížkou a 45–60 minut od začátku osvětlení je lze odebírat. Průsvitné jikry nejsou přilnavé a lze je snadno spočítat pomocí bočního světla. Při použití pěti samiček v každé nádrži se počet jiker do 20 za den považuje za nízký, do 100 za den za středně vysoký a více než 100 jiker za den za vysoký. Třecí rošt se odstraní, odeberou se jikry a třecí rošt se poté opět vsadí do zkušební nádrže, a to co nejpozději večer nebo velmi časně zrána. Doba do opětovného vsazení by neměla překročit jednu hodinu, protože jinak může pod vlivem třecího podkladu dojít k individuálnímu páření a tření v neobvyklé době. Pokud situace vyžaduje pozdější vsazení třecího roštu, mělo by se tak stát alespoň 9 hodin po začátku osvětlení. V tuto pozdní denní dobu již tření vyvoláno nebývá.

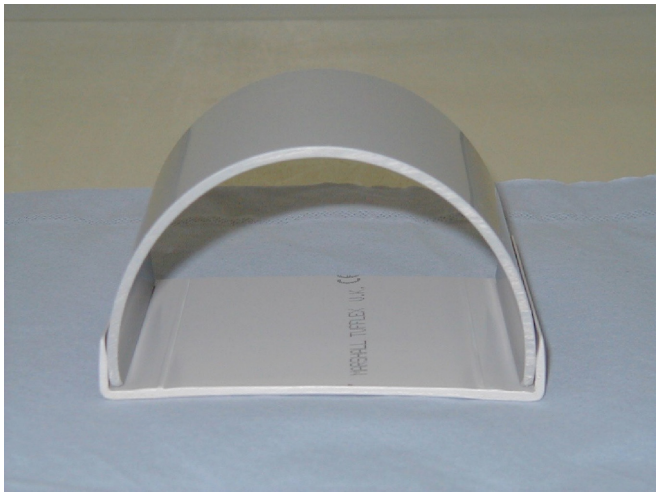
▼**M7**

Dodatek 4B

TŘECÍ PODKLAD PRO JELEČKA VELKOHLAVÉHO

Do jedné zkušební komory se umístí dvě nebo tři kombinované třecí roury a plastové/keramické/skleněné rošty nebo rošty z nerezové oceli (např. šedý žlábek polokruhového tvaru o délce 80 mm uložený na podložce se zvednutými okraji o délce 130 mm) (viz obrázek). Bylo prokázáno, že pro třecí podklad jsou vhodné starší roury z PVC nebo keramiky (Thorpe *et al*, 2007).

Roury se doporučuje obrousit, aby se zlepšila přilnavost. Rošt by rovněž měl být odstíněn, aby se rybám zabránilo v přístupu k vypadlým jikrám, pokud u použitého třecího podkladu nebylo prokázáno, že na něm jikry dobře ulpívají.



Účelem základny je pojmout veškeré jikry, které neulpěly na povrchu roury a které by tak spadly na dno nádrže (nebo jikry, které jsou kladeny přímo na plochou plastovou základnu). Všechny třecí podklady by se před použitím měly nejméně 12 hodin proplachovat v ředicí vodě.

Thorpe KL, Benstead R, Hutchinson TH, Tyler CR, 2007. An optimised experimental test procedure for measuring chemical effects on reproduction in the fathead minnow, *Pimephales promelas.* Aquatic Toxicology, 81, s. 90–98.

▼M7

Dodatek 5A

POSUZOVÁNÍ DRUHOTNÝCH POHLAVNÍCH ZNAKŮ U JELEČKA VELKOHLAVÉHO ZA ÚČELEM ZJIŠTĚNÍ URČITÝCH CHEMICKÝCH LÁTEK S ENDOKRINNÍM PŮSOBENÍM

Přehled

Mezi potenciálně důležité charakteristiky tělesného vzhledu dospělých jelečků velkohlavých při zkouškách endokrinních disruptorů patří zbarvení těla (tj. světlé/tmavé), forma zbarvení (tj. přítomnost či nepřítomnost svislých pruhů), tvar těla (tj. tvar hlavy a hrudní oblasti, rozšíření břicha) a druhotné pohlavní znaky specifické pro tento druh (tj. počet a velikost pářicích hrbolků, velikost dorzálního polštářku a kladélka).

Pářicí hrbolky se nacházejí na hlavě (dorzální polštářek) reprodukčně aktivních jelečků velkohlavých a obvykle jsou uspořádány symetricky po obou stranách (Jensen *et al.*, 2001). U samiček v kontrolních skupinách a u nedospělých samečků a samiček nebyl vývoj hrbolků zaznamenán (Jensen *et al*., 2001). Samečci mohou mít až osm jednotlivých hrbolků kolem očí a mezi nosními dírkami. Nejvíce hrbolků největší velikosti se nachází ve dvou souběžných řadách bezprostředně pod nosními dírkami a nad tlamou. Ryby často mají také skupiny hrbolků pod dolní čelistí. Ty, které jsou nejblíže k tlamě, se zpravidla vyskytují v jednom páru, zatímco více ventrálně se mohou nacházet i po čtyřech. Skutečný počet hrbolků je zřídka větší než 30 (v rozmezí 18–28; Jensen *et al*., 2001). Nejvíce hrbolků má podobu jednotlivých, zaoblených struktur, jejichž výška se přibližně rovná jejich poloměru. Většina reprodukčně aktivních samečků má rovněž alespoň některé hrbolky zvětšené a vystouplé do té míry, že je nelze odlišit jako jednotlivé struktury.

Některé druhy chemických látek narušujících činnost endokrinních žláz mohou způsobit abnormální výskyt určitých druhotných pohlavních znaků u opačného pohlaví. Například agonisté androgenního receptoru, jako je 17-alfa-methyltestosteron nebo 17-beta-trenbolon, mohou způsobit, že se pářicí hrbolky vyvinou u samiček jelečka velkohlavého (Smith, 1974; Ankley *et al.*, 2001; 2003), a agonisté estrogenního receptoru mohou způsobit snížení počtu nebo velikosti pářicích hrbolků u samečků (Miles-Richardson *et al*., 1999; Harries *et al*., 2000).

Následuje popis, jak charakterizovat pářicí hrbolky u jelečka velkohlavého, založený na postupech používaných v laboratoři americké Agentury na ochranu životního prostředí (EPA) v Duluthu ve státě Minnesota. Specifické produkty a/nebo vybavení lze nahradit srovnatelnými materiály, které jsou k dispozici.

Prohlídka se nejlépe provádí pomocí lupy s osvětlením nebo pomocí preparačního mikroskopu s osvětlením a s objektivem 3X. Ryby se prohlížejí z dorzálního směru a anteriorní stranou dopředu (hlavou k pozorovateli).

— Ryba se vloží do malé Petriho misky (např. o průměru 100 mm), anteriorní stranou dopředu a ventrální stranou dolů. Hledáček se zaostří tak, aby bylo možné identifikovat hrbolky. Ryba se jemně a pomalu obrací z boku na bok, aby bylo možné identifikovat oblasti s hrbolky. Hrbolky se spočítají a zaznamená se jejich hodnocení.

— Pozorování se opakuje na ventrálním povrchu hlavy tak, že se ryba položí na Petriho misku dorzálně, anteriorní stranou dopředu.

— Pozorování by u každé ryby měla být dokončena do 2 min.

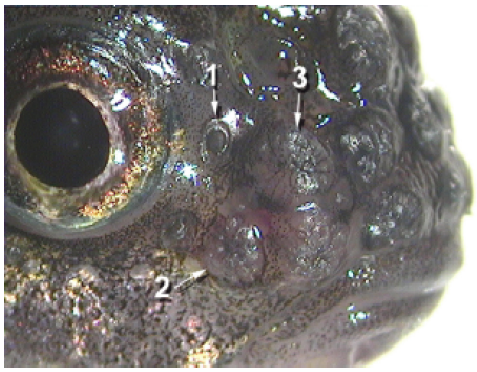
▼M7

Počítání hrbolků a jejich klasifikace

Bylo zjištěno šest specifických oblastí pro posuzování přítomnosti a vývoje hrbolků u dospělých jelečků velkohlavých. Ke zmapování umístění a množství přítomných hrbolků byla vytvořena šablona (viz konec tohoto dodatku). U každého organismu se zaznamená počet hrbolků a jejich velikost pak lze kvantitativně seřadit takto: 0 – nevyskytují se, 1 – přítomné, 2 – zvětšené a 3 – výrazně zvětšené (obrázek 1).

Stupeň 0 – žádné hrbolky se nevyskytují. Stupněm 1 (přítomné) se označí všechny hrbolky s jedním vrcholem, jejichž výška se přibližně rovná jejich poloměru. Stupeň 2 (zvětšené) se projevuje tkání v hvězdicovitém tvaru, který má obvykle velkou radiální základnu s rýhami nebo brázdami směřujícími od středu. Horní část hrbolku je často spíše rozeklaná, ale může být i poněkud zaoblená. Při stupni 3 (výrazně zvětšené) jsou hrbolky obvykle poměrně velké a zaoblené, s málo rozlišenou strukturou. Někdy se hrbolky mohou vyskytovat společně a vytvářet jednolitou strukturu v určité oblasti nebo v několika oblastech najednou (B, C a D, jak jsou popsány níže). Zbarvení a tvar jsou podobné jako u stupně 2, ale někdy je obtížné je navzájem rozlišit. Použití tohoto klasifikačního systému zpravidla vede k celkovému hodnocení hrbolků nižšímu než 50 u normálních samečků v kontrolních skupinách, kteří mají 18–20 hrbolků (Jensen *et al*., 2001).

Obrázek 1



Skutečný počet hrbolků u některých ryb může být v konkrétní oblasti klasifikace větší, než je počet políček v šabloně. Nastane-li tento případ, lze vpravo nebo vlevo od daného políčka vepsat další klasifikační čísla. Šablona proto nemusí být symetrická. Další způsob zmapování hrbolků, které jsou párové nebo spojené vertikálně podél horizontální roviny tlamy, lze provést tak, že se do jednoho políčka uvedou klasifikační body dvou hrbolků.

Oblasti mapování:

A – hrbolky nacházející se kolem oka. Mapují se od dorzálních po ventrální kolem anteriorního okraje oka. U dospělých samečků v kontrolních skupinách jsou obvykle početné, u samiček v kontrolních skupinách se nevyskytují, zpravidla jsou párové (po jednom u každého oka), u samiček exponovaných androgenům může být pouze jeden.

B-hrbolky nacházející se mezi nosními dírkami (póry senzorických kanálků). U samečků v kontrolní skupině jsou obvykle párové a vyššího stupně (2 – zvětšené nebo 3 – výrazně zvětšené). U samiček v kontrolní skupině se nevyskytují, do určité míry se mohou vyskytnout a vyvinout u samiček exponovaných androgenům.

C – hrbolky nacházející se bezprostředně anteriorně před nosními dírkami, souběžně s tlamou. U zralých samečků v kontrolních skupinách jsou zpravidla zvětšené nebo výrazně zvětšené. U méně vyvinutých samečků nebo u samiček exponovaných androgenům bývají stupně 1 (přítomné) nebo zvětšené.

▼M7

D – hrbolky nacházející se souběžně s linií tlamy. Zpravidla jsou klasifikovány u samečků v kontrolních skupinách. U samiček z kontrolních skupin se nevyskytují, ale bývají přítomné u samiček exponovaných androgenům.

E – hrbolky nacházející se na dolní čelisti, poblíž tlamy; obvykle jsou malé a většinou párové. U samečků v kontrolních skupinách nebo u exponovaných samečků bývají různé, stejně tak u exponovaných samiček.

F – hrbolky nacházející se ventrálně k poloze E. Obvykle jsou malé a párové. Bývají přítomné u samečků v kontrole a samiček exponovaných androgenům.

ODKAZY

(1) Ankley GT, Jensen KM, Kahl MD, Korte JJ, Makynen ME. 2001. Description and evaluation of a short-term reproduction test with the fathead minnow *(Pimephales promelas). Environ Toxicol Chem* 20:1276-1290.

(2) Ankley GT, Jensen KM, Makynen EA, Kahl MD, Korte JJ, Hornung MW, Henry TR, Denny JS, Leino RL, Wilson VS, Cardon MC, Hartig PC, Gray EL. 2003. Effects of the androgenic growth promoter 17-β trenbolone on fecundity and reproductive endocrinology of the fathead minnow. *Environ Toxicol Chem* 22:1350-1360.

(3) Harries JE, Runnalls T, Hill E, Harris CA, Maddix S, Sumpter JP, Tyler CR. 2000. Development of a reproductive performance test for endocrine disrupting chemicals using pair-breeding fathead minnows *(Pimephales promelas). Environ Sci Technol* 34:3003-3011.

(4) Jensen KM, Korte JJ, Kahl MD, Pasha MS, Ankley GT. 2001. Aspects of basic reproductive biology and endocrinology in the fathead minnow *(Pimephales promelas). Comp Biochem Physiol C* 128:127-141.

(5) Kahl MD, Jensen KM, Korte JJ, Ankley GT. 2001. Effects of handling on endocrinology and reproductive performance of the fathead minnow. *J Fish Biol* 59:515-523.

(6) Miles-Richardson SR, Kramer VJ, Fitzgerald SD, Render JA, Yamini B, Barbee SJ, Giesy JP. 1999. Effects of waterborne exposure of 17-estradiol on secondary sex characteristics and gonads of fathead minnows *(Pimephales promelas). Aquat Toxicol* 47:129-145.

(7) Smith RJF. 1974. Effects of 17α-methyltestosterone on the dorsal pad and tubercles of fathead minnows *(Pimephales promelas). Can J Zool* 52:1031-1038.

Šablona pro pářicí hrbolky:

Identifikační číslo _____

Datum _____

Celkové hodnocení ____

Číselná klasifikace

1 – přítomné

2 – zvětšené

3 – výrazně zvětšené

	A	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**

	B	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**

	C	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**
	D	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**

		E	**X1**	**X1**	
	F	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**

▼M7

Dodatek 5B

POSUZOVÁNÍ DRUHOTNÝCH POHLAVNÍCH ZNAKŮ U HALANČÍKA JAPONSKÉHO ZA ÚČELEM ZJIŠTĚNÍ URČITÝCH CHEMICKÝCH LÁTEK S ENDOKRINNÍM PŮSOBENÍM

Následuje popis měření bradavkovitých výběžků (*), které jsou druhotným pohlavním znakem u halančíka japonského (*Oryzias latipes*).

1) Po vyříznutí jater (dodatek 6) se mrtvé tělo vloží do kónické zkumavky, která obsahuje asi 10 ml 10 % neutrálního pufrovaného formalínu (hlavou nahoru, ocasem dolů). Fixuje-li se gonáda v jiném roztoku než v 10 % neutrálním pufrovaném formalínu, provede se příčný řez skalpelem přes celé mrtvé tělo mezi anteriorní oblastí řitní ploutve a řitním otvorem, přičemž je nutno dbát na to, aby nedošlo k poškození vývodu pohlavních žláz a samotné gonády (obrázek 3). Kraniální část rybího těla se vloží do fixačního roztoku, aby se zachovala gonáda, a ocasní část rybího těla do 10 % neutrálního pufrovaného formalínu, jak bylo popsáno výše.

2) Po uložení rybího těla do 10 % neutrálního pufrovaného formalínu se anteriorní oblast řitní ploutve uchopí pinzetou a stiskne se asi na 30 vteřin tak, aby řitní ploutev zůstala otevřená. Při uchopení řitní ploutve pinzetou se opatrně uchopí několik ploutevních paprsků v anteriorní oblasti tak, aby se nepoškrábaly bradavkovité výběžky.

3) Poté, co řitní ploutev zůstala asi po 30 vteřin otevřená, se rybí tělo uloží do 10 % neutrálního pufrovaného formalínu při pokojové teplotě až do změření bradavkovitých výběžků (měření se provádí po fixaci trvající alespoň 24 hodin).

Měření

1) Po fixaci rybího těla v 10 % neutrálním pufrovaném formalínu po dobu alespoň 24 hodin se mrtvé tělo ryby vyjme z kónické zkumavky a formalín se otře do filtračního papíru (nebo papírového ubrousku).

2) Ryba se položí břichem nahoru. Poté se malými preparačními nůžkami opatrně odstřihne řitní ploutev (upřednostňuje se řitní ploutev odstřihnout s malým množstvím interneurálních trnů (pterygioforů).

3) Anteriorní oblast oddělené řitní ploutve se uchopí pinzetou a položí na skleněné podložní sklíčko spolu s několika kapkami vody. Poté se řitní ploutev překryje krycím sklíčkem. Je třeba dát pozor, aby se při uchopení řitní ploutve pinzetou nepoškrábaly bradavkovité výběžky.

4) Pod biologickým mikroskopem (vzpřímený mikroskop nebo inverzní mikroskop) se pomocí počítadla stanoví počet článků s bradavkovitými výběžky. Bradavkovité výběžky se započítají, pokud je na posteriorním okraji článku viditelná malá formace výběžků. Počet článků s bradavkovitými výběžky na každé řitní ploutvi se zaznamená v pracovním listu (např. první ploutevní

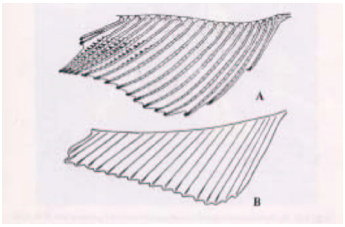
▼M7

paprsek: 0, druhý ploutevní paprsek: 10, třetí ploutevní paprsek: 12 atd.) a součet těchto čísel u jednotlivých ryb se zanese do excelové tabulky. V případě potřeby se řitní ploutev vyfotografuje a počet článků s bradavkovitými výběžky se spočítá na fotografii.

5) Po ukončení měření se řitní ploutev vloží do kónické zkumavky popsané v bodě 1) a uskladní se.

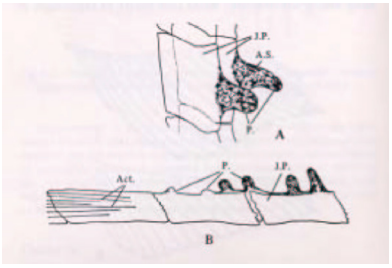
Obrázek 1.

Schéma znázorňující rozdíl mezi pohlavími v tvaru a velikosti řitní ploutve. A – sameček, B – samička. Oka, T. B., 1931. On the processes on the fin rays of the male of *Oryzias latipes* and other sex characters of this fish. J. Fac. Sci., Tokyo Univ., IV, 2, s. 209-218.



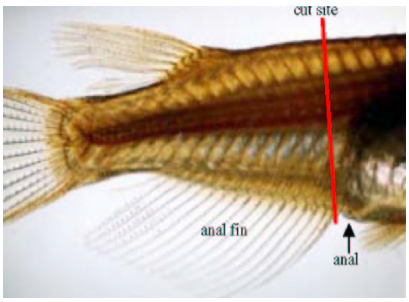
Obrázek 2.

A – výběžky na článcích paprsků řitní ploutve. J. P. – článek, A. S. – osová vzdálenost, P. – výběžek. B – distální konec ploutvového paprsku. Na hrotu paprsku se nacházejí actinotrichia (Act.). Oka, T. B., 1931. On the processes on the fin rays of the male of *Oryzias latipes* and other sex characters of this fish. J. Fac. Sci., Tokyo Univ., IV, 2, s. 209-218.



Obrázek 3.

Fotografie rybího těla, na které je znázorněno místo řezu při fixaci gonád ve fixačním roztoku, nejedná-li se o 10 % neutrální pufrovaný formalín. V takovém případě se zbývající část těla pomocí břitvy odřízne mezi anteriorní oblastí řitní ploutve a řitním otvorem (červená čára), hlavová část rybího těla se uloží do fixačního roztoku pro gonády a ocasní část se uloží do 10 % neutrálního pufrovaného formalínu.



▼M7

Dodatek 6

DOPORUČENÉ POSTUPY PRO ODBĚR VZORKŮ ZA ÚČELEM ANALÝZY VITELOGENINU

Je třeba dbát na to, aby nedošlo ke vzájemné kontaminaci mezi vzorky VTG samečků a samiček.

Postup 1A: Jeleček velkohlavý, odběr krve z ocasní žíly/tepny

Po anestetizaci se skalpelem částečně oddělí ocasní stopka a heparinizovanou mikrohematokritovou kapilárou se odebere krev z ocasní žíly/tepny. Po odebrání krve se rychle izoluje plazma, a to odstředěním po dobu 3 minut při zrychlení 15 000 *g* (nebo alternativně po dobu 10 minut při zrychlení 15 000 *g* a při teplotě 4 °C). Je-li to požadováno, lze po odstředění stanovit procento hematokritu. Část plazmy se poté přenese z mikrohematokritové kapiláry a uloží se do odstředivkové zkumavky s 0,13 jednotkami aprotininu (inhibitor proteázy) při teplotě – 80 °C do doby, než bude možné provést stanovení VTG. Podle velikosti jelečka velkohlavého (závisející na pohlaví) se objem plazmy, kterou lze odebrat, zpravidla nachází v rozmezí od 5 do 60 mikrolitrů z každé ryby (Jensen *et al.*, 2001).

Postup 1B: Jeleček velkohlavý, odběr krve ze srdce

Alternativně lze krev odebrat také srdeční punkcí pomocí heparinizované injekční stříkačky (1 000 jednotek heparinu na ml). Krev se přenese do Eppendorfových zkumavek (uložených na ledu) a poté odstředí (po dobu 5 minut při zrychlení 7 000 *g* a pokojové teplotě). Plazma se přenese do čistých Eppendorfových zkumavek (v poměrných částech, pokud je to s ohledem na objem plazmy proveditelné), urychleně se zmrazí při teplotě – 80 °C a takto se ponechá až do analýzy (Panter *et al.*, 1998).

Postup 2A: Halančík japonský, vyříznutí jater

Vyjmutí zkušební ryby ze zkušební komory

1) Zkušební ryba se pomocí malého čeřenu vyjme ze zkušební komory. Je třeba dát pozor a neupustit zkušební rybu do jiné zkušební komory.

2) V zásadě by se zkušební ryby měly vyjímat v tomto pořadí: kontrolní skupina, kontrola s rozpouštědlem (existuje-li), skupina s nejnižší koncentrací, skupina se střední koncentrací, skupina s nejvyšší koncentrací a pozitivní kontrola. Všichni samečkové se ze zkušební komory vyjmou dříve než zbývající samičky.

3) Pohlaví každé zkušební ryby se zjistí na základě vnějších druhotných pohlavních znaků (např. tvaru řitní ploutve).

4) Zkušební ryby se umístí do přepravní nádrže a dopraví se na pracoviště, kde se provádí vyříznutí jater. Etikety ze zkušební komory a přepravní nádrže se zkontrolují kvůli přesnosti a pro ověření, zda se počet ryb, jež byly vyjmuty ze zkušební komory, a počet ryb, které ve zkušební komoře zůstávají, shodují s očekáváním.

5) Nelze-li pohlaví ryb zjistit podle jejich vnějšího vzhledu, vyjmou se ze zkušební komory všechny ryby. V takovém případě se pohlaví zjistí vyšetřením gonád nebo druhotných pohlavních znaků pod stereoskopickým mikroskopem.

Vyříznutí jater

1) Zkušební ryba se pomocí malého čeřenu přenese z nádrže pro přepravu do anestetického roztoku.

▼M7

2) Po anestetizaci se ryba přenese pinzetou na filtrační papír (nebo na papírový ubrousek). Ryba se uchopí pinzetou za hlavu z obou stran, aby nedošlo k porušení ocasu.

3) Voda na povrchu těla ryby se otře filtračním papírem (nebo papírovým ubrouskem).

4) Ryba se položí břichem nahoru. Poté se pomocí preparačních nůžek provede malý příčný řez v polovině vzdálenosti mezi ventrální hřbetní oblastí a střední břišní oblastí.

5) Do tohoto malého řezu se vloží preparační nůžky a rozstřihne se břicho podél střední linie břicha od bodu ležícího kaudálně od žaberního krytu až po kraniální stranu řitního otvoru. Je třeba dát pozor, aby preparační nůžky nepronikly příliš hluboko a aby nedošlo k poškození jater a gonád.

6) Následující kroky se provedou pod stereoskopickým mikroskopem.

7) Zkušební ryba se položí břichem nahoru na papírový ubrousek (použít lze rovněž skleněnou Petriho misku nebo podložní sklíčko mikroskopu).

8) Stěny břišní dutiny se roztáhnou jemnou pinzetou a odkryjí se tak vnitřní orgány. V případě potřeby je rovněž přijatelné odkrýt vnitřní orgány tak, že se odstraní jedna strana stěny břišní dutiny.

9) Pomocí druhé jemné pinzety se odhalí přirostlá část jater a žlučový měchýř. Poté se uchopí žlučovod a odřízne se žlučový měchýř. Je třeba dbát na to, aby se žlučový měchýř neprotrhl.

10) Stejným způsobem se uchopí jícen a od jater se odřízne gastrointestinální trakt. Je třeba dát pozor, aby obsah trávicí soustavy nevytekl. Kaudální část gastrointestinálního traktu se odřízne od řitního otvoru a gastrointestinální trakt se vyjme z břišní dutiny.

11) Od periferie jater se ořízne tuková hmota a jiné tkáně. Je třeba dát pozor, aby se játra nepoškrábala.

12) Oblast jaterního portálu se uchopí jemnou pinzetou a játra se vyjmou z břišní dutiny.

13) Játra se umístí na podložní sklíčko. V případě potřeby se pomocí jemné pinzety z povrchu jater odstraní veškerý zbývající tuk a vnější tkáně (např. břišní výstelka).

14) Na elektronických analytických vahách se změří hmotnost jater s mikrozkumavkou o objemu 1,5 ml jako vahou obalu. Hodnota se zaznamená v pracovním listu (s přesností na 0,1 mg). Na etiketě mikrozkumavky se ověří identifikační údaje.

15) Mikrozkumavka s játry se zazátkuje. Skladuje se v chladicím (nebo mrazicím) stojánku.

16) Po odříznutí jedněch jater se preparační nástroje vyčistí nebo nahradí čistými.

▼M7

17) Výše popsaným způsobem se vyjmou játra u všech ryb v přepravní nádrži.

18) Po vyříznutí jater ze všech ryb v přepravní nádrži (tj. všech samečků nebo samiček ze zkušební komory) se všechny vzorky jater umístí do stojánku na zkumavky s etiketou kvůli identifikaci a uskladní se v mrazničce. Jsou-li játra krátce po vyříznutí dodána k předběžné úpravě, vzorky se na další pracoviště přenesou v chladicím (nebo mrazicím) stojánku.

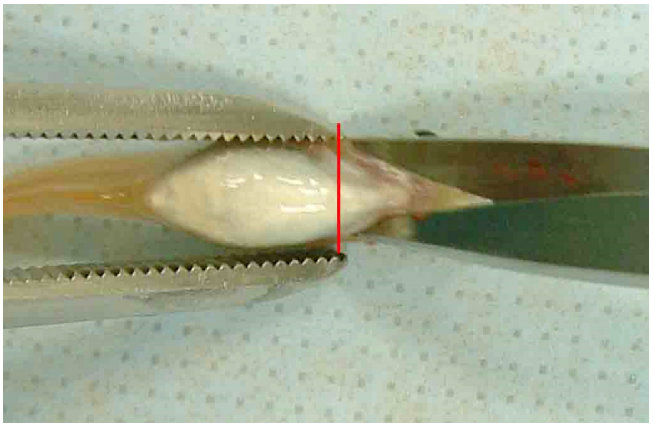
Po odnětí jater je mrtvé tělo ryby k dispozici pro histologii gonád a měření druhotných pohlavních znaků.

Vzorek

Pokud se vzorky jater odebrané u zkušebních ryb krátce po vyříznutí nepoužijí pro předběžnou úpravu, skladují se při teplotě ≤ – 70 °C.

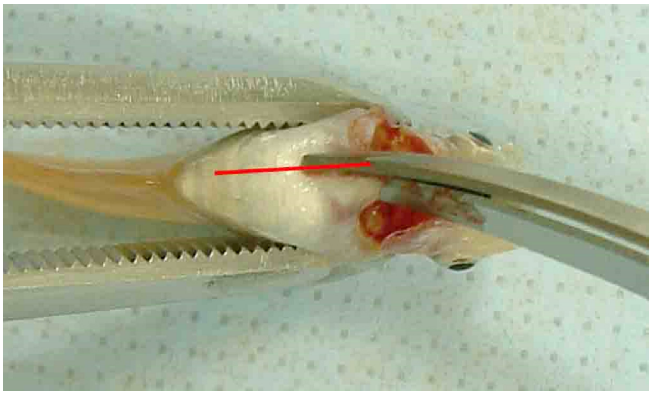
Obrázek 1.

Nůžkami se vede řez těsně před prsními ploutvemi.



Obrázek 2.

Pomocí nůžek se rozstřihne střední linie břicha až k bodu, který se nachází přibližně 2 mm kraniálně od řitního otvoru.



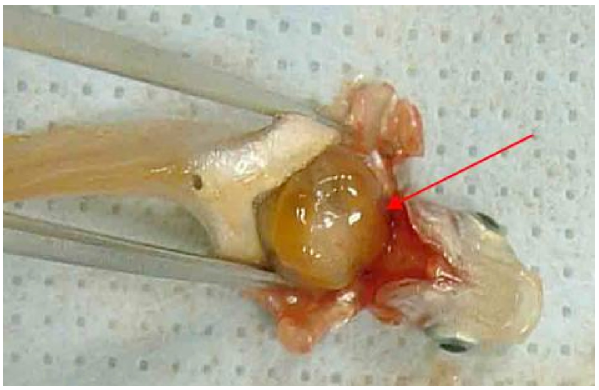
▼M7

Obrázek 3.

Pinzetou se rozevřou břišní stěny, aby se odkryla játra a další vnitřní orgány.

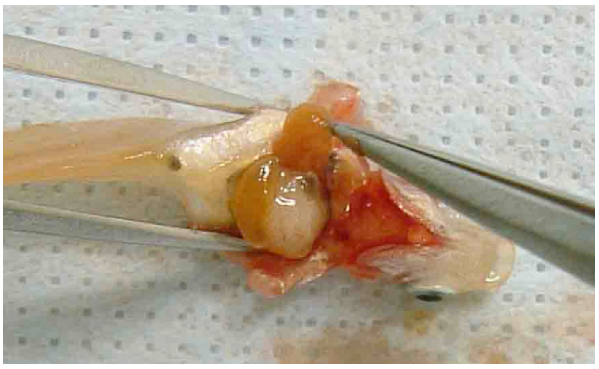
(Alternativně lze břišní stěny laterálně přišpendlit.)

Šipka označuje játra.



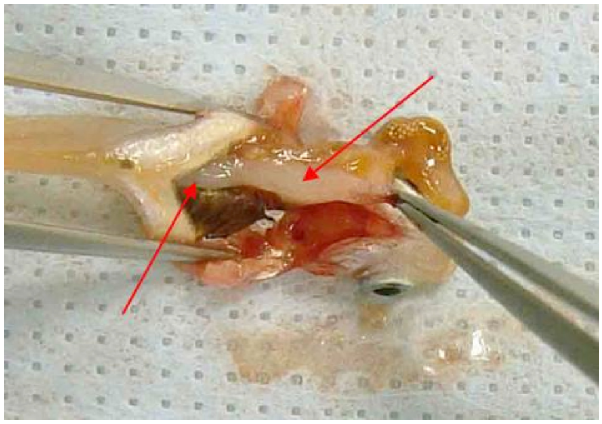
Obrázek 4.

Játra se pomocí pinzety vypreparují a vyříznou.



Obrázek 5.

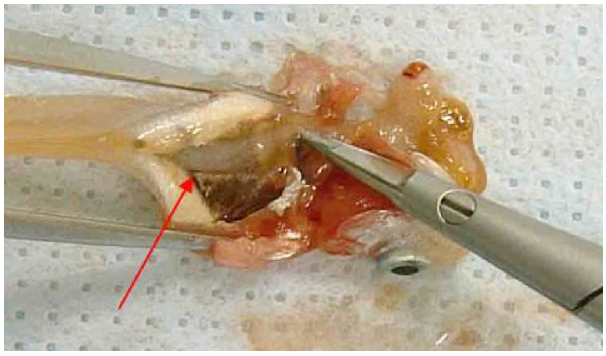
Pinzetou se jemně odtáhnou střeva.



▼M7

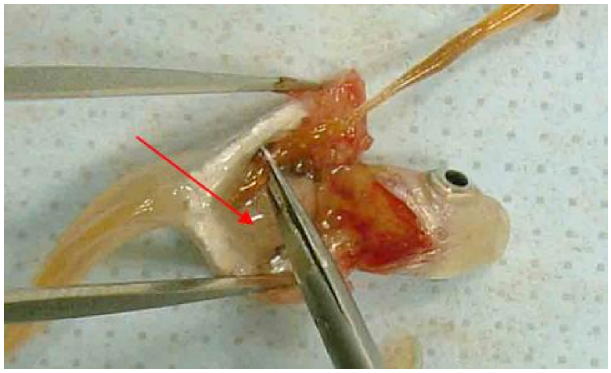
Obrázek 6.

Oba konce střev a veškeré střevní okruží se oddělí nůžkami.



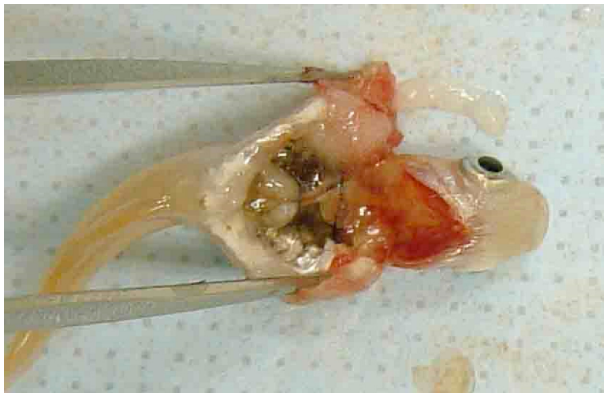
Obrázek 7 (samička).

U samiček je postup stejný.



Obrázek 8.

Dokončený postup.



▼M7

Postup 2B: Halančík japonský (*Oryzias latipes*), předúprava jater pro analýzu vitelogeninu

Ze soupravy pro analýzu ELISA se vezme lahev s homogenizačním pufrem a ochladí se v ledové tříšti (teplota roztoku ≤ 4 °C). Je-li použit homogenizační pufr ze systému ELISA EnBio, roztok se rozmrazí při pokojové teplotě a poté se lahev ochladí v ledové tříšti.

Objem pufru pro homogenizaci jater se vypočítá na základě jejich hmotnosti (na mg hmotnosti jater se přidá 50 µl homogenizačního pufru). Například je-li hmotnost jater 4,5 mg, objem pufru pro homogenizaci jater je 225 µl. Připraví se seznam objemů homogenizačního pufru pro všechna játra.

Příprava jater pro předúpravu

1) Mikrozkumavka o objemu 1,5 ml obsahující játra se vyjme z mrazničky těsně před předúpravou.

2) Předúprava samčích jater by se měla provádět dříve než předúprava samičích jater, aby se předešlo kontaminaci vitelogeninem. U zkušebních skupin by se kromě toho předúprava měla provádět v tomto pořadí: kontrolní skupina, kontrola s rozpouštědlem (existuje-li), skupina s nejnižší koncentrací, skupina se střední koncentrací, skupina s nejvyšší koncentrací a pozitivní kontrola.

3) Počet mikrozkumavek o objemu 1,5 ml obsahujících vzorky jater, které se vyjmou z mrazničky v daný čas, by neměl být větší než počet zkumavek, které lze současně odstředit.

4) Mikrozkumavky o objemu 1,5 ml s jaterními vzorky se uspořádají na mrazicím stojánku podle pořadových čísel (játra není třeba rozmrazovat).

Provedení předúpravy

1) Přidání homogenizačního pufru

   Kontrolou seznamu se zjistí, jaký objem homogenizačního pufru má být přidán pro daný konkrétní vzorek jater, a mikropipeta (rozmezí objemů 100–1 000 µl) se nastaví na příslušný objem. Na mikropipetu se nasadí čistý hrot.

   Z lahve s činidlem se nabere homogenizační pufr a přidá se do zkumavky o objemu 1,5 ml obsahující játra.

   Podle výše uvedeného postupu se homogenizační pufr přidá do všech mikrozkumavek o objemu 1,5 ml obsahujících játra. Hrot mikropipety není třeba měnit za nový. Je-li hrot kontaminován nebo existuje-li podezření, že je kontaminován, musí se vyměnit.

2) Homogenizace jater

   — Vezme se nový homogenizační tlouček pro homogenizátor pro mikrozkumavky.

   — Tlouček se vloží do mikrozkumavky o objemu 1,5 ml. Homogenizátor se uchopí tak, aby tlačil na játra mezi povrchem tloučku a vnitřní stěnou mikrozkumavky o objemu 1,5 ml.

   — Homogenizátor pro mikrozkumavky se ponechá v činnosti 10–20 sekund. Mikrozkumavka o objemu 1,5 ml se během této činnosti chladí ledovou tříští.

▼M7

— Tlouček se vyjme z mikrozkumavky o objemu 1,5 ml a ponechá se asi na 10 sekund v nečinnosti. Poté se provede vizuální kontrola stavu suspenze.

— Jsou-li v suspenzi patrné kousky jater, kroky 3) a 4) se opakují, aby se připravil uspokojivý homogenát jater.

— Suspendovaný homogenát jater se chladí v chladicím stojánku až do odstřeďování.

— Pro každý homogenát se tlouček vymění za nový.

— Podle výše popsaného postupu se všechna játra homogenizují za pomoci homogenizačního pufru.

3) Odstředění suspendovaného homogenátu jater

— Ověří se, že teplota v komoře chlazené odstředivky není ≤ 5 °C.

— Mikrozkumavky o objemu 1,5 ml obsahující suspendovaný homogenát jater se vloží do chlazené odstředivky (v případě potřeby se provede vyvážení).

— Suspendovaný homogenát jater se 10 minut odstřeďuje při zrychlení 13 000 g a při teplotě ≤ 5 °C. Je-li však supernatant dostatečně oddělený, lze sílu a dobu odstředění upravit podle potřeby.

— Po odstředění se zkontroluje, zda je supernatant náležitě oddělený (na povrchu: tuk, uprostřed: supernatant, spodní vrstva: jaterní tkáň). Není-li odstředění dostatečné, suspenze se odstředí znovu za stejných podmínek.

— Všechny vzorky se vyjmou z chlazené odstředivky a uspořádají se na mrazicím stojánku podle pořadových čísel vzorků. Je třeba dát pozor, aby oddělené vrstvy po odstředění opět nesuspendovaly.

4) Odběr supernatantu

— Do stojánku na zkumavky se vloží čtyři mikrozkumavky o objemu 0,5 ml pro uchovávání supernatantu.

— Pomocí mikropipety se z každého supernatantu (odděleného jako prostřední vrstva) odebere 30 µl a vloží se do jedné mikrozkumavky o objemu 0,5 ml. Je třeba dát pozor, aby nebyl odebrán tuk z povrchu nebo jaterní tkáň ze spodní vrstvy.

— Stejným způsobem se supernatant odebere a vloží do dalších dvou mikrozkumavek o objemu 0,5 ml.

— Pomocí mikropipety se odebere zbytek supernatantu (nejméně ≥ 100 µl, je-li to proveditelné). Tento supernatant se poté vloží do zbývající mikrozkumavky o objemu 0,5 ml. Je třeba dát pozor, aby nebyl odebrán tuk z povrchu nebo jaterní tkáň ze spodní vrstvy.

— Mikrozkumavka o objemu 0,5 ml se uzavře zátkou a objem supernatantu se zapíše na etiketu. Poté se mikrozkumavky ihned ochladí v mrazicím stojánku.

— Pro každý supernatant se použije nový hrot mikropipety. Ulpí-li na hrotu větší množství tuku, je třeba ho ihned nahradit novým hrotem, aby nedošlo ke kontaminaci jaterního extraktu tukem.

▼M7

— Podle postupu popsaného výše se všechen odstředěný supernatant vloží do čtyř mikrozkumavek o objemu 0,5 ml.

— Po vložení supernatantu do mikrozkumavek o objemu 0,5 ml se všechny mikrozkumavky s identifikačními etiketami uloží do stojánku na zkumavky a ihned poté se zmrazí v mrazničce. Měří-li se koncentrace VTG okamžitě po předúpravě, zkumavka o objemu 0,5 ml (obsahující 30 µl supernatantu) se uchová v chladu ve stojánku na zkumavky a přenese se na pracoviště, kde se provádí analýza ELISA. V takovém případě se ostatní mikrozkumavky vloží do stojánků na zkumavky a zmrazí se v mrazničce.

— Po odběru supernatantu se reziduum vhodným způsobem odstraní.

Skladování vzorku

Mikrozkumavky o objemu 0,5 ml obsahující supernatant homogenátu jater se skladují při teplotě ≤ – 70 °C do doby, než jsou použity pro analýzu ELISA.

Postup 3A: Danio pruhované, odběr krve z ocasní žíly/tepny

Ihned po anestetizaci se příčně oddělí ocasní stopka a z ocasní tepny/žíly se odebere krev pomocí heparinizované mikrohematokritové kapiláry. Objemy krve se nacházejí v rozmezí od 5 do 15 mikrolitrů v závislosti od velikosti ryby. Do mikrokapiláry se přidá stejný objem pufru s aprotininem (6 mikrogramů aprotininu na ml fosfátového pufru (PBS)) a plazma se od krve oddělí odstředěním (po dobu 5 minut při zrychlení 600 *g*). Plazma se shromáždí do zkušebních zkumavek a uskladní se při teplotě – 20 °C do doby, než se analyzuje na VTG nebo na jiné proteiny, jež jsou předmětem zájmu.

Postup 3B: Danio pruhované, odběr krve srdeční punkcí

Aby nedošlo ke koagulaci krve a rozložení proteinu, vzorky se odebírají ve fosfátovém pufru (PBS) obsahujícím heparin (1 000 jednotek/ml) a inhibitor proteázy aprotinin (2 TIU/ml). Jako složky pro přípravu tohoto pufru se doporučuje použít heparin, amonnou sůl a lyofilizovaný aprotinin. Odběr krve se doporučuje provést injekční stříkačkou (o objemu 1ml) s fixovanou tenkou jehlou (např. značky Braun Omnikan-F). Injekční stříkačka by se měla předem naplnit pufrem (přibližně 100 mikrolitrů) tak, aby malé objemy krve z každé ryby byly plně eluovány. Vzorky krve se odeberou srdeční punkcí. Ryba se nejprve anestetizuje roztokem MS-222 (v koncentraci 100 mg/l). Správný režim anestezie umožní uživateli rozeznat srdeční tep dania pruhovaného. Při provádění srdeční punkce se píst injekční stříkačky udržuje pod slabým tlakem. Množství krve, která lze odebrat, se nacházejí v rozmezí 20–40 mikrolitrů. Po srdeční punkci se směs krve/pufru vloží do zkušební zkumavky. Plazma se oddělí od krve odstředěním (po dobu 20 minut při 5 000 *g*) a uskladní se při teplotě – 80 °C do doby, než bude použita pro analýzu.

Postup 3C: Standardní operační postup: danio pruhované, homogenizace hlavy a ocasu

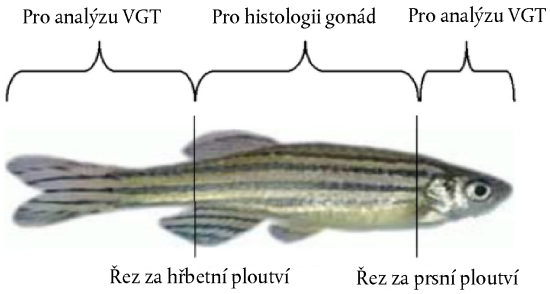
1. Ryba se anestetizuje a usmrtí v souladu s popisem zkoušky.

2. Odřízne se hlava a ocas, jak znázorňuje obrázek 1.

Důležité: *Veškeré preparační nástroje a pracovní stůl je třeba mezi zpracováním každé jednotlivé ryby řádně omýt a vyčistit (např. 96 % ethanolem), aby se zabránilo „znečištění vitelogeninem“ v důsledku přenosu ze samiček nebo ze samečků, u kterých byly vyvolány účinky, na samečky, u kterých účinky vyvolány nebyly.*

▼**M7**

Obrázek 1



3. Stanoví se společná hmotnost hlavy a ocasu každé ryby se zaokrouhlením na mg.

4. Po zvážení se části vloží do vhodných zkumavek (např. Eppendorfovy zkumavky o objemu 1,5 ml) a zmrazí se při teplotě – 80 °C až do homogenizace nebo se přímo homogenizují na ledu pomocí dvou plastových paliček. (Lze užít i jiných metod, jsou-li prováděny na ledu a je-li výsledkem homogenní hmota.) Důležité: *Zkumavky je třeba řádně očíslovat, aby bylo možné hlavu a ocas z určité ryby porovnat s příslušným řezem těla, který se použije pro histologii gonád.*

5. Když je dosaženo homogenní hmoty, přidá se **homogenizační pufr** ([1]) chlazený na ledu v množství čtyřnásobně větším než hmotnost tkáně. Pokračuje se v práci s paličkami, dokud není směs homogenní. Důležitá poznámka: *Na každou rybu se použijí nové paličky.*

6. Vzorky se uloží na led až do odstřeďování při teplotě **4 °C** po dobu 30 minut při zrychlení 50 000 *g*.

7. Pomocí pipety se části supernatantu o objemu 20 µl přenesou do **nejméně dvou** zkumavek tak, že se špička pipety ponoří pod tukovou vrstvu na hladině a opatrně se nasaje supernatant bez frakcí tuku nebo sedimentu.

8. Zkumavky se uskladní při teplotě – 80 °C až do použití.

([1]) Homogenizační pufr:
— (50 mM Tris-HCl pH 7,4; 1 % koktejl inhibitoru proteázy (Sigma)): 12 ml Tris-HCl pH 7,4 + 120 µl koktejlu inhibitoru proteázy.
— TRIS: TRIS-ULTRA PURE (ICN), např. od výrobce Bie & Berntsen, Dánsko.
— Koktejl inhibitoru proteázy: od výrobce Sigma (pro tkáně savců), produktové číslo P 8340.
POZNÁMKA: Homogenizační pufr by měl být použit ve stejný den, kdy byl vyroben. Během použití se má uchovávat na ledu.

▼M7

Dodatek 7

VZORKY OBOHACENÉ VITELOGENINEM A REFERENČNÍ STANDARD PRO OPAKOVATELNOST

Každý den provádění zkoušek na VTG se analyzuje obohacený vzorek vytvořený pomocí referenčního standardu pro opakovatelnost. Pro přípravu referenčního standardu pro opakovatelnost se použije VTG z jiné šarže, než jaká byla použita pro přípravu kalibračních standardů pro zkoušku, která se nyní provádí.

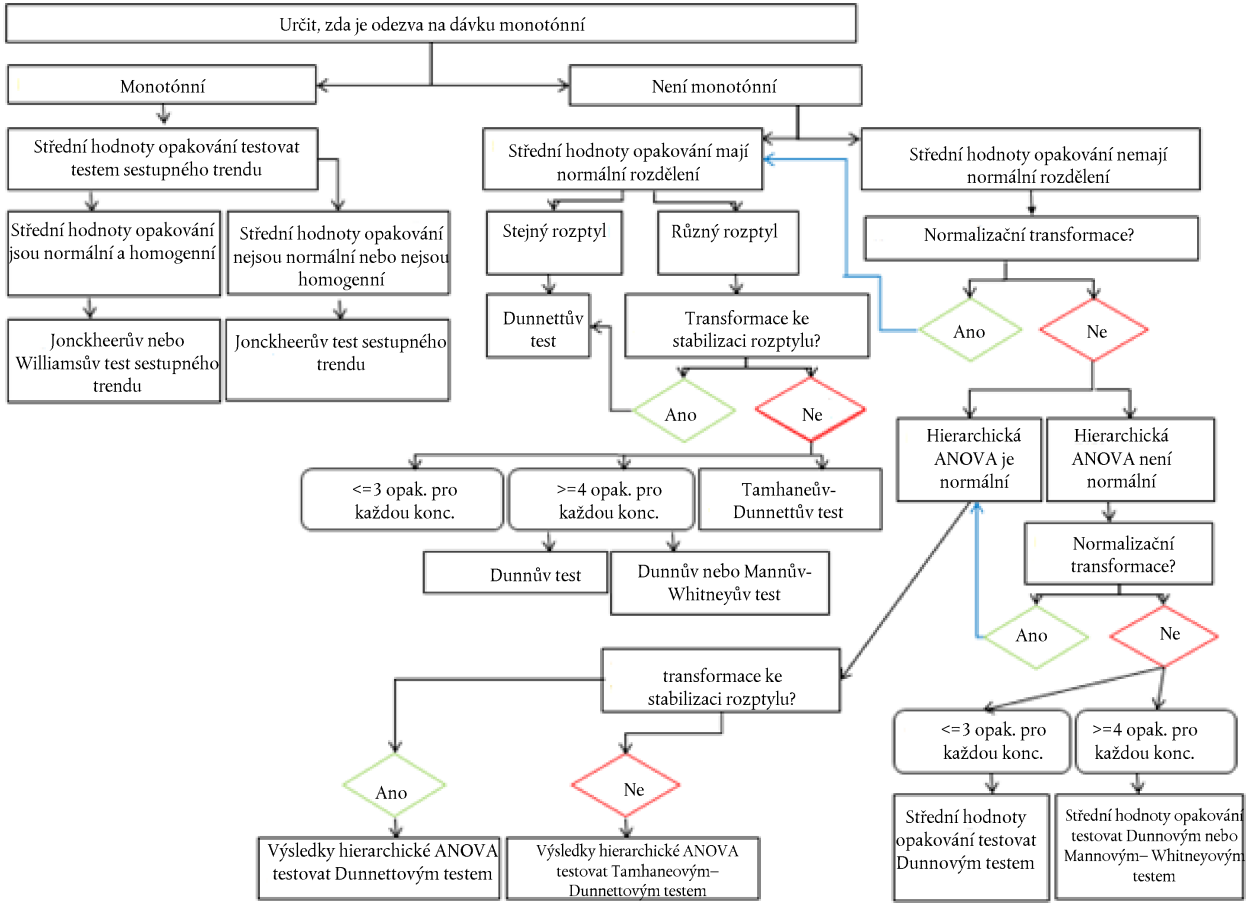
Obohacený vzorek se připraví tak, že se známé množství standardu pro opakovatelnost přidá do vzorku plazmy samečků z kontrolní skupiny. Vzorek se obohatí tak, aby se dosáhlo koncentrace VTG 10krát až 100krát vyšší než očekávaná koncentrace vitelogeninu u samečků ryb z kontrolní skupiny. Vzorek plazmy samečků z kontrolní skupiny, který se obohacuje, může pocházet z jedné ryby, nebo to může být směsný vzorek z několika ryb.

Dílčí vzorek neobohacené plazmy samečků z kontrolní skupiny se analyzuje alespoň ve dvou duplikátních jamkách. Rovněž obohacený vzorek se analyzuje alespoň ve dvou duplikátních jamkách. Za účelem stanovení očekávané koncentrace se střední hodnota množství vitelogeninu z obou neobohacených vzorků plazmy samečků z kontroly přičte k vypočtenému množství VTG přidaného za účelem obohacení vzorků. Poměr mezi touto očekávanou koncentrací a naměřenou koncentrací se zaznamená spolu s výsledky všech souborů zkoušek provedených v týž den.

▼M7

Dodatek 8

SCHÉMA ROZHODOVÁNÍ PRO STATISTICKOU ANALÝZU



▼M7

C.49. ZKOUŠKA AKUTNÍ TOXICITY NA RYBÍCH EMBRYÍCH (FET)

ÚVOD

1. Tato zkušební metoda je rovnocenná Pokynu OECD pro zkoušení (TG) č. 236 (2013). Popisuje zkoušku akutní toxicity na rybích embryích (FET) dania pruhovaného (*Danio rerio*). Tato zkouška je určena ke stanovení akutní toxicity chemických látek pro embryonální stadia vývoje ryb. Zkouška FET je založena na studiích a validacích provedených na daniu pruhovaném (1)(2)(3)(4)(5)(6)(7)(8)(9)(10)(11)(12)(13)(14). Zkouška FET byla úspěšně aplikována na širokou škálu chemických látek s různými mechanismy působení, různou rozpustností, těkavostí a hydrofobností (přehled v (15) a (16)).

2. Definice použité v této zkušební metodě jsou uvedeny v dodatku 1.

PODSTATA ZKOUŠKY

3. Čerstvě oplodněné jikry dania pruhovaného se vystaví působení zkoušené chemické látky po dobu 96 hodin. Každých 24 hodin se zaznamenají pozorování až čtyř hlavních ukazatelů letality (6): i) koagulace oplodněných jiker, ii) netvoří se somity, iii) nedojde k oddělení ocasního pupenu od žloutkového váčku a iv) nepřítomnost srdečního tepu. Na konci expoziční doby se stanoví akutní toxicita na základě pozitivního výsledku kteréhokoli ze čtyř zaznamenaných pozorování hlavních ukazatelů a vypočítá se hodnota LC_{50}.

VÝCHOZÍ ÚVAHY

4. K užitečným informacím o vlastnostech jednotlivých látek patří strukturní vzorec, molekulová hmotnost, čistota, stabilita ve vodě a na světle, pK_a a K_{ow}, rozpustnost ve vodě a tlak par, jakož i výsledky zkoušky snadné biologické rozložitelnosti (zkušební metoda C.4 (17) nebo C.29 (18)). Rozpustnost ve vodě a tlak par lze použít pro výpočet Henryho konstanty, která určí pravděpodobnost významných ztrát zkoušené chemické látky během doby zkoušky. Měla by být k dispozici spolehlivá analytická metoda pro stanovení množství látky ve zkušebních roztocích, a to se známou a doloženou přesností a mezí stanovitelnosti.

5. Jestliže se zkušební metoda použije ke zkoušení směsi, mělo by být pokud možno charakterizováno její chemické složení například chemickou identitou jejích složek, jejich kvantitativním výskytem a jejich vlastnostmi v dané látce (viz odstavec 4). Před použitím zkušební metody ke zkoušení směsi pro účely právních předpisů je třeba zvážit, zda poskytne přijatelné výsledky pro zamýšlený právní účel.

6. Pokud jde o látky, které lze aktivovat prostřednictvím metabolismu, je prokázáno, že embrya dania pruhovaného mají biotransformační schopnosti (19)(20)(21)(22). Metabolická schopnost ryb v embryonálním stadiu však není vždy obdobná jako u nedospělých nebo dospělých ryb. Například ve zkušební metodě FET nebyl zjištěn protoxický alylalkohol (9). Existují-li nějaké známky toho, že metabolity nebo jiné příslušné produkty transformace mohou být toxičtější než výchozí sloučenina, doporučuje se proto provést zkoušku také s těmito metabolity / transformačními produkty a při hodnocení toxicity zkoušené chemické látky použít také tyto výsledky, nebo alternativně provést jinou zkoušku, která více zohlední metabolismus.

7. U látek s molekulovou hmotností $\geq$ 3 kDa, s velmi složitou molekulární strukturou a u látek způsobujících opožděné líhnutí, které by mohly zabránit expozici po vylíhnutí nebo ji omezit, se nepředpokládá citlivost embryí na takové látky vzhledem k jejich omezené biologické dostupnosti a pro tento případ by mohly být vhodnější jiné zkoušky toxicity.

▼M7

VALIDITA ZKOUŠKY

8. Aby byly výsledky zkoušky platné, musí být splněna tato kritéria:

a) Celková míra oplodnění všech odebraných jiker by ve zkoušené sadě měla být ≥ 70 %.

b) Teplota vody by se měla ve zkušebních nádržích po celou dobu zkoušky udržovat na 26 ± 1 °C.

c) Celková míra přežití embryí v negativní kontrole (s ředicí vodou) a případně v kontrole s rozpouštědlem by do konce 96hodinové expozice měla být ≥ 90 %.

d) Expozice pozitivní kontroly (např. 4,0 mg/l 3,4-dichloranilinu u dania pruhovaného) by měla vést minimálně k 30 % mortalitě na konci 96hodinové doby expozice.

e) Míra vylíhnutí v negativní kontrole (a v kontrole s rozpouštědlem, byla-li použita) by měla být ≥ 80 % na konci 96hodinové doby expozice.

f) Na konci 96hodinové doby expozice by koncentrace rozpuštěného kyslíku v negativní kontrole a při nejvyšší zkušební koncentraci měla být ≥ 80 % nasycení.

POPIS METODY

9. Přehled doporučených podmínek pro chov a zkoušení ryb je uveden v dodatku 2.

Přístroje a pomůcky

10. Potřebné je toto vybavení:

a) nádrže na ryby z chemicky inertního materiálu (např. skla) o vhodném objemu vzhledem k doporučené velikosti násady (viz Chov matečných ryb, odstavec 14);

b) inverzní a/nebo binokulární mikroskop alespoň s 80násobným zvětšením. Není-li možné v místnosti, kde se provádí pozorování se záznamy, nastavit teplotu na 26 ± 1 °C, je nezbytné použít křížový stolek mikroskopu s regulací teploty nebo jiné metody pro udržování teploty;

c) zkušební komory; např. standardní destičky s 24 jamkami o hloubce cca 20 mm (viz Zkušební komory, odstavec 11);

d) např. samolepicí fólie pro zakrytí 24jamkových destiček;

e) inkubátor nebo klimatizovaná místnost s regulací teploty umožňující udržovat v jamkách (nebo zkušebních komorách) teplotu 26 ±1 °C;

f) pH-metr;

g) přístroj pro měření koncentrace kyslíku;

h) vybavení pro stanovení tvrdosti a vodivosti vody;

i) lapač na vytřené jikry: misky ze skla, nerezové oceli nebo jiného inertního materiálu na nástroje; drátěné pletivo (velikost otvorů 2 ± 0,5 mm) z nerezové oceli nebo jiného inertního materiálu na ochranu nakladených jiker; třecí podklad (např. imitace rostlin z inertního materiálu) (zkušební metoda C.48 dodatek 4A (23));

j) pipety s rozšířeným hrdlem na sběr jiker;

▼M7

k) skleněné nádoby na přípravu různých zkušebních koncentrací a ředicí vody (kádinky, kalibrované baňky se stupnicí, odměrné válce a kalibrované pipety) nebo na sběr jiker dania pruhovaného (např. kádinky, krystalizační misky);

l) jestliže se k provedení zkoušky použijí alternativní expoziční systémy, např. průtoková metoda (24) nebo pasivní dávkování (25), jsou potřebná vhodná zařízení a vybavení.

Zkušební komory

11. Měly by být použity zkušební komory ze skla nebo polystyrenu (např. destičky s 24 jamkami schopnými pojmout náplň 2,5 až 5 ml každá). V případě, že existuje podezření na adsorpci látky na polystyren (např. u nepolárních látek s planární strukturou, které mají vysokou hodnotu K_{OW}), je třeba použít inertní materiál (sklo), aby se snížily ztráty v důsledku adsorpce (26). Zkušební komory by měly být umístěny v inkubátoru náhodně.

Voda a zkušební podmínky

12. K dosažení úrovně tvrdosti obvyklé pro mnohé povrchové vody se doporučuje zředění chovné vody. Ředicí voda by se měla připravit z rekonstituované vody (27). Výsledný stupeň tvrdosti by měl odpovídat 100 až 300 mg/l $CaCO_3$, aby se zabránilo nadměrnému vysrážení uhličitanu vápenatého. Použít lze i jinou povrchovou nebo studniční vodu s dobře známými charakteristikami. Rekonstituovanou vodu lze upravit na chovnou vodu o nízké tvrdosti zředěním deionizovanou vodou až v poměru 1:5 na minimální tvrdost odpovídající 30 až 35 mg/l $CaCO_3$. Před přidáním zkoušené chemické látky se voda provzdušní do dosažení saturace kyslíkem. Teplota v jamkách by se měla udržovat na 26 ± 1 °C po celou dobu zkoušky. Hodnota pH by měla být v rozmezí 6,5 až 8,5 a v rámci tohoto rozmezí by se v celém průběhu zkoušky neměla změnit o více než 1,5. Jestliže se neočekává, že pH zůstane v tomto rozmezí, měla by se před zahájením zkoušky provést úprava pH. Hodnota pH zásobního roztoku by měla být upravena tak, aby se koncentrace zásobního roztoku významně nezměnila a aby nedošlo k žádné chemické reakci se zkoušenou chemickou látkou nebo k jejímu vysrážení. K úpravě pH v roztocích obsahujících zkoušenou chemickou látku se doporučuje použít chlorovodík (HCl) nebo hydroxid sodný (NaOH).

Zkušební roztoky

13. Zkušební roztoky zvolené koncentrace lze připravit např. ředěním zásobního roztoku. Zásobní roztoky by měly být připraveny přednostně jednoduchým mechanickým mícháním nebo protřepáváním zkoušené chemické látky v ředicí vodě (např. mechanickým mícháním nebo pomocí ultrazvuku). Je-li zkoušená chemická látka obtížně rozpustná ve vodě, měl by se použít postup popsaný v Pokynu OECD č. 23 k manipulaci se složitými látkami a směsmi (28). Rozpouštědla by se používat neměla, ale v některých případech mohou být pro vytvoření zásobního roztoku o vhodné koncentraci nezbytná. Použije-li se k usnadnění přípravy zásobního roztoku rozpouštědlo, neměla by být jeho konečná koncentrace vyšší než 100 µl/l a měla by být ve všech zkušebních nádržích stejná. Je-li použito rozpouštědlo, je nezbytné zařadit další kontrolu s rozpouštědlem.

Chov matečných ryb

14. Pro produkci jiker se použije chovné hejno neexponovaného dania pruhovaného divoké linie s dobře zdokumentovanou mírou oplodnění jiker. Ryby by neměly vykazovat makroskopicky identifikovatelné příznaky infekce a nemocí a neměly by v době 2 měsíců před třením prodělat žádné farmaceutické (akutní nebo profylaktické) léčení. Chovné ryby jsou chovány v akváriích s doporučenou velikostí násady 1 l vody na jednu rybu

▼M7

a pevně stanovenou fotoperiodou 12–16 hodin (29)(30)(31)(32)(33). Měla by být nastavena optimální rychlost filtrace; ta by měla být jen tak velká, aby nezpůsobovala velké čeření vody. K podmínkám krmení viz dodatek 2. Ryby by neměly dostávat nadměrné množství potravy, pravidelně je třeba sledovat kvalitu vody a čistotu akvária a v případě potřeby je uvést do původního stavu.

Zkoušení odborné způsobilosti

15. Jako referenční chemická látka by měl být přednostně dvakrát za rok zkoušen 3,4-dichloranilin (použitý ve validačních studiích (1)(2)) v celém rozsahu závislosti koncentrace-odezva, aby se ověřila citlivost použitého rybího kmene. Referenční látku by měla použít každá laboratoř, která provádí tuto zkoušku poprvé. Laboratoř může použít tuto chemickou látku k prokázání své odborné způsobilosti k provádění zkoušky před předložením údajů pro právní účely.

Produkce jiker

16. Produkce jiker dania pruhovaného může probíhat v třecích skupinách (v individuálních třecích nádržích) nebo hromadným třením (v chovných nádržích). V případě třecích skupin se samečci a samičky (např. v poměru 2:1) v chovné skupině umístí do třecích nádrží několik hodin před nástupem tmy v den předcházející zkoušce. Jelikož v třecích skupinách dania pruhovaného někdy nemusí dojít k vytření, doporučuje se souběžně použít nejméně tři třecí nádrže. Aby nedošlo ke geneticky podmíněnému zkreslení, odeberou se jikry nejméně od třech chovných skupin, smíchají se a náhodně se vyberou.

17. Pro sběr jiker se lapače na vytřené jikry umístí do třecích nádrží nebo chovných nádrží před nástupem tmy v den předcházející zkoušce nebo před nástupem světla v den zkoušky. Aby se předešlo požírání jiker ze strany dospělých danií pruhovaných, lapače na vytřené jikry se pokryjí drátěným pletivem z inertního materiálu o vhodné velikosti otvorů (cca 2 ± 0,5 mm). Je-li to považováno za nezbytné, mohou být na pletivo umístěny umělé rostliny z inertního materiálu (např. plastu nebo skla) pro povzbuzení tření (3)(4)(5)(23)(35). Použity by měly být měkčené plastové materiály, které se nevyluhují (např. ftaláty). K páření, tření a oplodnění dochází během 30 minut po nástupu světla a po této době lze lapače na vytřené jikry se shromážděnými jikrami opatrně vyjmout. Po odebrání z lapačů na vytřené jikry se doporučuje jikry opláchnout rekonstituovanou vodou.

Diferenciace jiker

18. Při teplotě 26 °C nastává u oplodněných jiker asi po 15 minutách první rýhování a při následném synchronním rýhování se tvoří 4, 8, 16 a 32 buněčných blastomerů (viz dodatek 3)(35). V těchto stadiích lze oplodněné jikry snadno rozpoznat podle vývoje blastuly.

POSTUP

Podmínky expozice

19. Každé koncentraci zkoušené chemické látky se exponuje dvacet embryí (po jednom embryu v každé jamce). Expozice by měla být taková, aby v průběhu celé zkoušky byla koncentrace udržována v rozmezí ± 20 % nominální koncentrace chemické látky. Není-li možné toho dosáhnout při statickém systému, měl by se použít semistatický režim s nastavitelným intervalem obnovování (např. obnovení každých 24 hodin). V těchto případech je nutné ověřit expoziční koncentrace minimálně v nejvyšší a nejnižší zkušební koncentraci na začátku a na konci každého intervalu expozice (viz odstavec 36). Není-li možné udržet expoziční koncentraci v rozmezí ± 20 % nominální koncentrace, je nutné na začátku a na konci každého intervalu expozice měřit všechny koncentrace (viz odstavec 36). Krátce před obnovením je

▼M7

třeba dbát na to, aby embrya zůstala pokryta malým množstvím starého zkušebního roztoku a nedošlo tak k vysychání. Uspořádání zkoušky lze upravit, aby byly splněny požadavky na zkoušení konkrétních látek (např. průtokový systém (24) nebo systém s pasivním dávkováním (25) pro snadno rozložitelné nebo vysoce adsorpční látky (29) nebo jiné systémy pro těkavé látky (36)(37)). V každém případě by se mělo dbát na minimalizaci stresu pro embrya. Zkušební komory by měly být kondicionovány po dobu alespoň 24 hodin se zkušebním roztokem. Zkušební podmínky jsou shrnuty v dodatku 2.

Zkušební koncentrace

20. Ke splnění statistických požadavků se obvykle vyžaduje pět koncentrací zkoušené chemické látky odstupňovaných podle konstantního faktoru, který nebude vyšší než 2,2. Použití méně než pěti koncentrací by mělo být zdůvodněno. Nejvyšší zkoušená koncentrace by měla pokud možno vést k 100 % letalitě a nejnižší zkoušená koncentrace by pokud možno neměla vyvolat žádný pozorovatelný účinek, jak je stanoveno v odstavci 28. Zkouška ke stanovení rozsahu provedená před hlavní zkouškou umožní vybrat vhodné rozpětí koncentrací. Zkouška ke stanovení rozsahu se obvykle provádí s deseti embryi na každou koncentraci. Pro provedení této zkoušky v 24jamkových destičkách platí následující pokyny. Jsou-li použity různé zkušební komory (např. malé Petriho misky) nebo se zkouší více koncentrací, je třeba pokyny náležitě upravit.

21. Podrobnosti a názorné pokyny k rozdělení koncentrací na 24jamkových destičkách jsou k dispozici v odstavci 27 a v dodatku 4, obrázek 1.

Kontroly

22. Nezbytné jsou kontroly s ředicí vodou, negativní kontrola a vnitřní kontrola destičky. Je-li při vnitřní kontrole destičky zjištěno více než 1 mrtvé embryo, destička se zamítne, čímž se sníží počet koncentrací, které lze použít pro odvození hodnoty LC_{50}. Je-li zamítnuta celá destička, hodnocení a identifikace pozorovaných účinků tak může být obtížnější, zejména pokud je zamítnuta kontrolní destička s rozpouštědlem nebo destička, ve které jsou rovněž postižena exponovaná embrya. V prvním případě se zkouška musí opakovat. Ve druhém případě může ztráta celé exponované skupiny (exponovaných skupin) v důsledku mortality ve vnitřní kontrolní skupině omezit schopnost hodnocení účinků a stanovení hodnot LC_{50}.

23. Pozitivní kontrolní skupina s pevně stanovenou koncentrací 4 mg/l 3,4-dichloranilinu se zařadí u každé sady jiker, které se použijí ke zkoušení.

24. V případě použití rozpouštědla se další skupina 20 embryí exponuje rozpouštědlu na samostatné 24jamkové destičce, a slouží tak jako kontrola s rozpouštědlem. Aby bylo možné považovat zkoušku za přijatelnou, mělo by být prokázáno, že rozpouštědlo nemá v průběhu času žádné významné účinky na líhnutí a přežití a nevyvolává ani žádné jiné nepříznivé účinky na embrya (viz odst. 8 písm. c).

Začátek expozice a doba trvání zkoušky

25. Zkouška se zahájí co nejdříve po oplodnění jiker a po 96 hodinách expozice se ukončí. Embrya by měla být ponořena do zkušebního roztoku před započetím rýhování blastuly nebo nejpozději před započetím 16buněčného stadia. Aby bylo možno zahájit expozici s co nejmenším zpožděním, náhodně se vybere nejméně dvakrát větší počet jiker potřebných pro každou exponovanou skupinu a přemístí se do nádrží s příslušnými koncentracemi a kontrolních nádrží (např. do krystalizačních misek o objemu 100 ml; jikry by měly být zcela pokryté) nejpozději 90 minut po oplodnění.

26. Do 180 minut po oplodnění by životaschopné oplodněné jikry měly být odděleny od neoplodněných jiker a přemístěny na 24jamkové destičky,

▼M7

které byly po 24 hodin předem kondicionované, a do každé jamky se doplní 2 ml nově připravených zkušebních roztoků. Pomocí stereomikroskopie (přednostně ≥ 30násobné zvětšení) se vyberou oplodněné jikry, v nichž probíhá rýhování a které během rýhování nevykazují žádné očividné nepravidelnosti (např. asymetrii, tvorbu puchýřků) ani poranění chorionu. Ke sběru a oddělení jiker viz dodatek 3 obrázky 1 a 3 a dodatek 4 obrázek 2.

Distribuce jiker na 24jamkových destičkách

27. Jikry se rozdělí na destičky s jamkami v následujících počtech (viz též dodatek 4 obrázek 1):

— 20 jiker na jedné destičce pro každou zkušební koncentraci,

— 20 jiker jako kontrola s rozpouštědlem na jedné destičce (je-li to nezbytné),

— 20 jiker jako pozitivní kontrola na jedné destičce,

— 4 jikry v ředicí vodě jako vnitřní kontrola destičky na každé z výše uvedených destiček,

— 24 jikry v ředicí vodě jako negativní kontrola.

Pozorování

28. Pozorování hlavních ukazatelů, která se provádějí na každém zkušebním embryu, se zaměřují na: koagulaci embryí; nepřítomnost tvorby somitů, neoddělení ocasu a nepřítomnost srdečního tepu (tabulka 1). Tato pozorování se použijí pro stanovení letality: každý pozitivní výsledek v některém z těchto pozorování znamená, že embryo dania pruhovaného je mrtvé. Mimoto se denně zaznamenává počet vylíhnutých jiker v exponovaných a kontrolních skupinách, a to poprvé 48 hodin po vylíhnutí. Výsledky pozorování se zaznamenávají každých 24 hodin až do konce zkoušky.

Tabulka 1

Pozorování hlavních ukazatelů akutní toxicity na embryích dania pruhovaného v době 24 až 96 hodin po oplodnění.

	Doba expozice			
	24 hod.	48 hod.	72 hod.	96 hod.
Koagulovaná embrya	+	+	+	+
Nepřítomnost tvorby somitů	+	+	+	+
Neoddělení ocasu	+	+	+	+
Nepřítomnost srdečního tepu		+	+	+

29. *Koagulace embrya*: Koagulovaná embrya jsou mléčně bílá a pod mikroskopem se jeví jako tmavá (viz dodatek 5 obrázek 1). Stanoví se počet koagulovaných embryí po 24, 48, 72 a 96 hodinách.

30. *Nepřítomnost tvorby somitů*: Při teplotě 26 ± 1 °C se po 24 hodinách v normálně se vyvíjejícím embryu dania pruhovaného vytvořilo asi 20 somitů (viz dodatek 5 obrázek 2). Normálně se vyvíjející embryo vykazuje spontánní pohyby (kontrakce ze strany na stranu). Spontánní pohyby ukazují na tvorbu somitů. Nepřítomnost somitů se zaznamenává po 24, 48, 72 a 96 hodinách. Nevytváření somitů po 24 hodinách by mohlo být důsledkem celkového zpoždění vývoje. Nejpozději po 48 hodinách by se tvorba somitů měla rozvinout. Nestane-li se tak, je embryo považováno za mrtvé.

31. *Neoddělení ocasu*: U normálně se vyvíjejícího embrya dania pruhovaného je oddělení ocasu (viz dodatek 5 obrázek 3) pozorováno po posteriorním

▼M7

prodloužení těla embrya. Nepřítomnost oddělení ocasu se zaznamenává po 24, 48, 72 a 96 hodinách.

32. *Nepřítomnost srdečního tepu*: U normálně se vyvíjejícího embrya dania pruhovaného je při teplotě 26 ± 1 °C srdeční tep viditelný po 48 hodinách (viz dodatek 5 obrázek 4). Při zaznamenávání je třeba být zvlášť pozorný, neboť nepravidelný srdečný tep by *neměl* být zaznamenán jako letální. Rovněž tak viditelný srdeční tep bez oběhu krve v břišní aortě se považuje za neletální. Pro zaznamenání tohoto ukazatele by embrya, jež nevykazují srdeční tep, měla být pozorována při nejméně 80násobném zvětšení nejméně po dobu jedné minuty. Nepřítomnost srdečního tepu se zaznamenává po 48, 72 a 96 hodinách.

33. Míra vylíhnutí by ve všech exponovaných a kontrolních skupinách měla být zaznamenávána počínaje od 48. hodiny a uvedena ve zprávě. Ačkoli líhnutí nepatří mezi ukazatele, které se používají k výpočtu hodnoty LC_{50}, vylíhnutí zajišťuje expozici embrya bez potenciální stínící funkce chorionu a jako takové může pomoci při interpretaci údajů.

34. Podrobné popisy normálního (35) a příklady abnormálního vývoje embryí dania pruhovaného jsou uvedeny v dodatcích 3 a 5.

Analytická měření

35. Na začátku a na konci zkoušky se změří pH, celková tvrdost a vodivost v kontrole (kontrolách) a v nádrži s nejvyšší koncentrací zkoušené chemické látky. Při semistatických systémech s obnovováním by hodnota pH měla být měřena před obnovením vody a po jejím obnovení. Koncentrace rozpuštěného kyslíku se měří na konci zkoušky v negativních kontrolách a v nádrži s nejvyšší zkušební koncentrací s životaschopnými embryi, kde by měla být v souladu s kritérii validity zkoušky (viz odst. 8 písm. f). Existuje-li obava, že teplota v rámci destiček s 24 jamkami není stejná, změří se teplota ve třech náhodně vybraných nádobách. Teplota by se měla během zkoušky zaznamenávat přednostně nepřetržitě nebo minimálně denně.

36. Při statickém systému by se měla měřit koncentrace zkoušené chemické látky minimálně v nádržích s největší a nejnižší zkušební koncentrací, ale přednostně ve všech exponovaných nádržích, a to na začátku a na konci zkoušky. Při semistatických zkouškách (s obnovováním), kde se očekává, že koncentrace zkoušené chemické látky zůstane v rozmezí ± 20 % nominálních hodnot, se doporučuje analyzovat přinejmenším nejvyšší a nejnižší zkušební koncentraci, když je čerstvě připravená a bezprostředně před obnovením. U zkoušek, kde se neočekává, že koncentrace zkoušené chemické látky zůstane v rozmezí ± 20 % nominálních hodnot, se musí analyzovat všechny zkušební koncentrace, když jsou čerstvě připravené a bezprostředně před obnovením. V případě nedostatečného objemu pro účely analýzy může být užitečné sloučení zkušebních roztoků nebo použití náhradních komor, které jsou ze stejného materiálu a mají stejný poměr plochy povrchu k objemu jako 24jamkové destičky. Důrazně se doporučuje zakládat výsledky na naměřených koncentracích. Nezůstávají-li koncentrace v rozmezí 80 až 120 % nominální koncentrace, měla by být účinná koncentrace vyjádřena vzhledem ke geometrickému průměru naměřených koncentrací; podrobněji viz kapitola 5 Pokynu OECD ke zkoušení toxicity složitých látek a směsí ve vodním prostředí (28).

LIMITNÍ ZKOUŠKA

37. Limitní zkouška může být provedena postupy popsanými v této zkušební metodě při koncentraci zkoušené látky 100 mg/l nebo při mezní hodnotě její rozpustnosti ve zkoušeném médiu (podle toho, která z hodnot je nižší) s cílem prokázat, že hodnota LC_{50} je vyšší než tato koncentrace. Limitní

▼M7

zkouška se provede s 20 embryi v exponované skupině, pozitivní kontrole a – je-li to nezbytné – kontrole s rozpouštědlem a 24 embryi v negativní kontrole. Pokud procentuální letalita při zkoušené koncentraci překročí o 10 % letalitu v negativní kontrole (nebo kontrole s rozpouštědlem), je třeba provést úplnou studii. Veškeré pozorované účinky se zaznamenají. Překročí-li mortalita v negativní kontrole (nebo kontrole s rozpouštědlem) 10 %, zkouška je neplatná a je třeba ji opakovat.

ÚDAJE A PŘEDKLÁDÁNÍ ZPRÁV

Zpracování výsledků

38. Pro účely statistické analýzy se jednotlivé jamky v této zkoušce považují za nezávislá opakování. Procenta embryí, u nichž je alespoň jedno pozorování hlavních ukazatelů provedené po 48 a/nebo 96 hodinách pozitivní, se vynesou do grafu v závislosti na zkušebních koncentracích. K výpočtu směrnic křivky, hodnoty LC_{50} a intervalu spolehlivosti (95 %) se použijí vhodné statistické metody (38) a měl by být konzultován pokyn OECD o současných přístupech ve statistické analýze údajů o ekotoxicitě (39).

Závěrečná zpráva

39. Závěrečná zpráva by měla obsahovat tyto informace:

Zkoušená chemická látka:

Jednosložková látka

— fyzický vzhled, rozpustnost ve vodě a další relevantní fyzikálně-chemické vlastnosti,

— chemická identifikace, např. název podle IUPAC nebo CAS, číslo CAS, kód SMILES nebo InChI, strukturní vzorec, čistota, popřípadě chemická identita nečistot, je-li to prakticky proveditelné atd. (včetně obsahu organického uhlíku, je-li měřen).

Vícesložkové látky, UVCB a směsi:

— charakterizované pokud možno chemickou identitou (viz výše), kvantitativním výskytem a relevantními fyzikálně-chemickými vlastnostmi složek.

Zkušební organismy:

— vědecký název, kmen, zdroj a metoda sběru oplodněných jiker a následné zpracování.

Zkušební podmínky:

— použitý zkušební postup (např. semistatický s obnovováním),

— fotoperioda,

— uspořádání zkoušky (např. počet zkušebních komor, druhy kontrol),

— charakteristiky kvality chovné vody (např. pH, tvrdost, teplota, vodivost, koncentrace rozpuštěného kyslíku),

— koncentrace rozpuštěného kyslíku, pH, celková tvrdost, teplota a vodivost zkušebních roztoků na začátku a po 96 hodinách,

— metoda přípravy zásobních roztoků a zkušebních roztoků a četnost obnovování,

▼M7

— zdůvodnění použití rozpouštědla a zdůvodnění volby rozpouštědla, pokud je jiné než voda,

— nominální zkušební koncentrace a výsledky všech analýz pro stanovení koncentrace zkoušené chemické látky ve zkušebních nádobách; uvedena by měla být také výtěžnost dané metody a mez stanovitelnosti (LoQ),

— doklady o tom, že kontrolní skupiny splnily kritéria platnosti týkající se přežití,

— míra oplodnění jiker,

— míra vylíhnutí v exponovaných a kontrolních skupinách.

Výsledky:

— nejvyšší koncentrace, která nevyvolala za dobu zkoušky žádný úhyn,

— nejnižší koncentrace, která vyvolala za dobu zkoušky 100 % mortalitu,

— kumulativní mortalita při každé koncentraci v doporučených časech pozorování,

— hodnoty LC_{50} po 96 hodinách (a volitelně po 48 hodinách) při mortalitě v rámci 95 % intervalu spolehlivosti, je-li to možné,

— graf závislosti koncentrace-mortalita na konci zkoušky,

— mortalita v kontrolních skupinách (negativní kontroly, vnitřní kontroly destiček a pozitivní kontrola a jakákoli použitá kontrola s rozpouštědlem),

— údaje o výsledku každého ze čtyř pozorování hlavních ukazatelů,

— výskyt a popis morfologických a fyziologických abnormalit, pokud se vyskytly (příklady viz dodatek 5 obrázek 2),

— události v průběhu zkoušky, které mohly ovlivnit výsledky,

— statistická analýza a zpracování údajů (probitová analýza, logistický regresní model a geometrický průměr hodnot LC_{50}),

— směrnice a intervaly spolehlivosti regrese (transformované) křivky závislosti koncentrace-odezva.

Jakékoli odchylky od zkušební metody a příslušná vysvětlení.

Rozbor a interpretace výsledků.

LITERATURA

(1) OECD (2011) Validation Report (Phase 1) for the Zebrafish Embryo Toxicity Test: Part I and Part II. Series on Testing and Assessment No. 157, OECD, Paris.

(2) OECD (2012) Validation Report (Phase 2) for the Zebrafish Embryo Toxicity Test: Part I and Part II (Annexes). Series on Testing and Assessment No. 179, OECD, Paris.

(3) Braunbeck, T., Böttcher, M., Hollert, H., Kosmehl, T., Lammer, E., Leist, E., Rudolf, M. and Seitz, N. (2005) Towards an alternative for the acute

▼M7

fish LC_{50} test in chemical assessment: The fish embryo toxicity test goes multi-species-an update. ALTEX 22: 87-102.

(4) ISO (2007) International Standard Water quality – Determination of the acute toxicity of waste water to zebrafish eggs (*Danio rerio*). ISO 15088:2007(E) International Organization for Standardization.

(5) Nagel, R. (2002) DarT: The embryo test with the zebrafish (*Danio rerio*) – a general model in ecotoxicology and toxicology. ALTEX 19: 38-48.

(6) Schulte, C. a Nagel, R. (1994) Testing acute toxicity in embryo of zebrafish, *Brachydanio rerio* as alternative to the acute fish test – preliminary results. ATLA 22, 12-19.

(7) Bachmann, J. (2002) Development and validation of a teratogenicity screening test with embryos of the zebrafish (*Danio rerio*). PhD-thesis, Technical University of Dresden, Germany.

(8) Lange, M., Gebauer, W., Markl, J. a Nagel, R. (1995) Comparison of testing acute toxicity on embryo of zebrafish (*Brachydanio rerio*), and RTG-2 cytotoxicity as possible alternatives to the acute fish test. Chemosphere 30/11: 2087-2102.

(9) Knöbel, M., Busser, F.J.M., Rico-Rico, A., Kramer, N.I., Hermens, J.L.M., Hafner, C., Tanneberger, K., Schirmer, K., Scholz, S. (2012). Predicting adult fish acute lethality with the zebrafish embryo: relevance of test duration, endpoints, compound properties, and exposure concentration analysis. Environ. Sci. Technol. 46, 9690-9700.

(10) Kammann, U., Vobach, M. a Wosniok, W. (2006) Toxic effects of brominated indoles and phenols on zebrafish embryos. Arch. Environ. Contam. Toxicol., 51: 97-102.

(11) Groth, G., Kronauer, K. a Freundt, K.J. (1994) Effects of *N,N*-diemethylformamide and its degradation products in zebrafish embryos. Toxicol. *In Vitro* 8: 401-406.

(12) Groth, G., Schreeb, K., Herdt, V. a Freundt, K.J. (1993) Toxicity studies in fertilized zebrafish fish eggs treated with *N*-methylamine, *N,N*-dimethylamine, 2-aminoethanol, isopropylamine, aniline, *N*-methylaniline, *N,N*-dimethylaniline, quinone, chloroacetaldehyde, or cyclohexanol. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 50: 878-882.

(13) Nguyen, L.T. a Janssen, C.R. (2001) Comparative sensitivity of embryo-larval toxicity assays with African catfish (*Clarias gariepinus*) and zebra fish (*Danio rerio*). Environ. Toxicol. 16: 566-571.

(14) Cheng, S.H., Wai, A.W.K., So, C.H. a Wu, R.S.S. (2000) Cellular and molecular basis of cadmium-induced deformities in zebrafish embryos. Environ. Toxicol. Chem. 19: 3024-3031.

(15) Belanger, S. E., Rawlings J. M. a Carr G. J. (2013) Use of Fish Embryo Toxicity Tests for the Prediction of Acute Fish Toxicity to Chemicals. Environmental Toxicology and Chemistry 32: 1768-1783.

(16) Lammer, E., Carr, G. J., Wendler, K., Rawlings, J. M., Belanger, S. E., Braunbeck, T. (2009) Is the fish embryo toxicity test (FET) with the zebrafish (*Danio rerio*) a potential alternative for the fish acute toxicity test? Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.: 149 (2), 196–209

(17) Kapitola C.4 této přílohy: Snadná biologická rozložitelnost.

(18) Kapitola C.29 této přílohy: Hodnocení snadné biologické rozložitelnosti – uvolňování CO_2 v těsně uzavřených lahvičkách.

(19) Weigt, S., Huebler, N., Strecker, R., Braunbeck, T., Broschard, T.H. (2011) Zebrafish (*Danio rerio*) embryos as a model for testing proteratogens. Toxicology 281: 25-36.

▼M7

(20) Weigt, S., Huebler, N., Strecker, R., Braunbeck, T., Broschard, T.H. (2012) Developmental effects of coumarin and the anticoagulant coumarin derivative warfarin on zebrafish (*Danio rerio*) embryos. Reprod. Toxicol. 33: 133-141.

(21) Incardona, J.P, Linbo, T.L., Scholz, N.L. (2011) Cardiac toxicity of 5-ring polycyclic aromatic hydrocarbons is differentially dependent on the aryl hydrocarbon receptor 2 isoform during zebrafish development. Toxicol. Appl. Pharmacol. 257: 242-249.

(22) Kubota, A., Stegeman, J.J., Woodin, B.R., Iwanaga, T., Harano, R., Peterson, R.E., Hiraga, T., Teraoka, H. (2011) Role of zebrafish cytochrome P450 CYP1C genes in the reduced mesencephalic vein blood flow caused by activation of AHR2. Toxicol. Appl. Pharmacol. 253: 244-252.

(23) Kapitola C.48 této přílohy: Krátkodobá zkouška působení na reprodukci ryb. Viz dodatek 4a.

(24) Lammer, E., Kamp, H.G., Hisgen, V., Koch, M., Reinhard, D., Salinas, E.R., Wendlar, K., Zok, S., Braunbeck, T. (2009) Development of a flow-through system for the fish embryo toxicity test (FET) with zebrafish (*Danio rerio*). Toxicol. *in vitro* 23: 1436-1442.

(25) Brown, R.S., Akhtar, P., Åkerman, J., Hampel, L., Kozin, I.S., Villerius, L.A., Klamer, H.J.C., (2001) Partition controlled delivery of hydrophobic substances in toxicity tests using poly(dimethylsiloxane) (PDMS) films. Environ. Sci. Technol. 35, 4097–4102.

(26) Schreiber, R., Altenburger, R., Paschke, A., Küster, E. (2008) How to deal with lipophilic and volatile organic substances in microtiter plate assays. Environ. Toxicol. Chem. 27, 1676-1682.

(27) ISO (1996) International Standards. Water quality – Determination of the acute lethal toxicity of substances to a freshwater fish [*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae)]. ISO 7346-3. Flow-through method. Dostupné na: [http://www.iso.org].

(28) OECD (2000) Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. Series on Testing and Assessment No. 23, OECD, Paris.

(29) Laale, H.W. (1977) The biology and use of zebrafish, *Brachydanio rerio*, in fisheries research. A literature review. J. Fish Biol. 10: 121-173.

(30) Westerfield, M. (2007) The zebrafish book: A guide for the laboratory use of zebrafish (*Brachydanio rerio*). 5th edition. Eugene, University of Oregon Press, Institute of Neuroscience, USA.

(31) Canadian Council on Animal Care (2005) Guidelines on: the Care and Use of Fish in Research, Teaching and Testing, ISBN: 0-919087-43-4 http://www.ccac.ca/Documents/Standards/Guidelines/Fish.pdf

(32) Evropská komise (2007) Doporučení Komise 2007/526/ES ze dne 18. června 2007 týkající se pokynů pro umístění zvířat používaných pro pokusné a jiné vědecké účely a péči o ně (oznámeno pod číslem K(2007) 2525) [http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2007:197:0001:0089:CS:PDF]

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

http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2010:276:0033:0079:CS:PDF

(34) Nagel, R. (1986) Untersuchungen zur Eiproduktion beim Zebrabärbling (*Brachydanio rerio*, Ham.-Buch.). J. Appl. Ichthyol. 2: 173-181.

▼**M7**

(35) Kimmel, C.B., Ballard, W.W., Kimmel, S.R., Ullmann, B. a Schilling, T.F. (1995) Stages of embryonic development of the zebrafish. Dev. Dyn. 203: 253-310.

(36) Kapitola C.2 této přílohy: Zkouška akutní imobilizace dafnií (*Daphnia sp.*).

(37) Weil, M., Scholz, S., Zimmer, M., Sacher, F., Duis, K. (2009) Gene expression analysis in zebrafish embryos: a potential approach to predict effect conentrations in the fish early life stage test. Environ. Toxicol. Chem. 28: 130, s. 1970-1978.

(38) ISO (2006) International Standard. Water quality – Guidance on statistical interpretation of ecotoxicity data ISO TS 20281. Dostupné na: [http://www.iso.org].

(39) OECD (2006) Guidance Document on Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: a Guidance to Application. Series on Testing and Assessment No. 54. OECD, Paris.

(40) Braunbeck, T., Lammer, E., 2006. Detailed review paper „Fish embryo toxicity assays“. UBA report under contract no. 20385422 German Federal Environment Agency, Berlin. 298 s.

▼M7

Dodatek 1

DEFINICE

Hlavní ukazatel: způsobuje účinek na úrovni populace.

Blastula: buněčný útvar obklopující animální pól, který zakrývá určitou část žloutku.

Chemická látka: látka nebo směs.

Epibolie: masivní proliferace převážně epidermálních buněk ve fázi gastrulace embrya a jejich pohyb od dorzální k ventrální straně, v důsledku kterého jsou vrstvy endodermálních buněk internalizovány během procesu podobnému invaginaci (vchlípení) a žloutek je vstřebán do embrya.

Průtoková metoda: zkouška, při níž zkušební roztoky plynule protékají zkušebním systémem po celou dobu trvání expozice.

Vnitřní kontrola destičky: vnitřní kontrola sestávající z naplnění 4 jamek ve 24jamkové destičce ředicí vodou má za cíl zjistit potenciální kontaminaci destiček způsobenou výrobcem nebo výzkumníkem během zkušebního postupu a jakýkoli účinek na destičku, který může ovlivnit výsledek zkoušky (např. teplotní gradient).

IUPAC: International Union of Pure and Applied Chemistry (Mezinárodní unie pro čistou a užitou chemii).

Chovná voda: voda, ve které se provádí chov dospělých ryb.

Medián letální koncentrace (LC_{50}): koncentrace zkoušené chemické látky, která usmrtí přibližně 50 % zkušebních organismů během celé zkoušky.

Semistatická (obnovovací) zkouška: zkouška, při níž se zkušební roztoky pravidelně obnovují po stanovených časových úsecích (např. každých 24 hodin).

SMILES: Simplified Molecular Input Line Entry Specification (zjednodušená molekulární specifikace pro vstupní řádky).

Somit: somity jsou bloky mezodermu ve vyvíjejícím se embryu obratlovců rozmístěné po stranách neurální trubice, z nichž později vzniká škára (dermatomy), kosterní svaly (myotomy) a obratle (sklerotomy).

Statická metoda: zkouška, při níž se zkušební roztoky během celé zkoušky nemění.

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

UVCB: látky s neznámým nebo proměnlivým složením, komplexní reakční produkty nebo biologický materiál.

▼M7

Dodatek 2

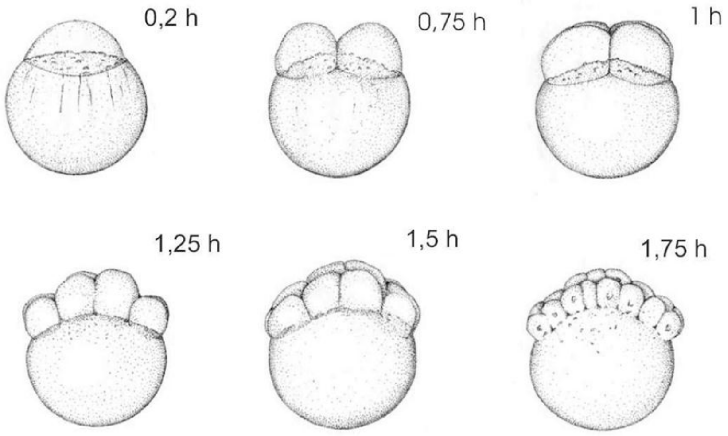
CHOV, MNOŽENÍ A TYPICKÉ PODMÍNKY PRO ZKOUŠKY AKUTNÍ TOXICITY NA EMBRYÍCH DANIA PRUHOVANÉHO

Danio pruhované (*Danio rerio*)		
Původ druhu		Indie, Barma, Malakka, Sumatra
Pohlavní dimorfismus		Samičky: vystouplé břicho, když v něm mají jikry Samečci: štíhlejší, oranžové zbarvení mezi modrými podélnými pruhy (obzvláště patrné na řitní ploutvi)
Krmný režim		Suché vločkové krmivo (maximálně 3 % hmotnosti ryb za den) 3–5krát denně; doplňkově larvy (nauplie) žábronožky solné (druh *Artemia*) a/nebo malé dafnie o vhodné velikosti získané z nekontaminovaného zdroje. Krmení živou potravou obohacuje prostředí, a proto by měla být dle možnosti podávána živá potrava. Aby se zajistila co nejlepší kvalita vody, přebytky potravy a exkrety by se měly odstranit asi hodinu po krmení.
Přibližná hmotnost dospělých ryb		Samičky: 0,65 ± 0,13 g Samečci: 0,5 ± 0,1 g
Chov matečných ryb	Osvětlení	Fluorescenční zářivky (širokospektrální); 10–20 $\mu E/m^2/s$, 540–1 080 lx nebo 50–100 ft-c (okolní laboratorní hodnoty); fotoperioda 12–16 hodin
	Teplota vody	26 ± 1 °C
	Kvalita vody	$O_2 \geq 80$ % nasycení, tvrdost: např. ~ 30–300 mg/l $CaCO_3$, NO_3^-: ≤ 48 mg/l, NH_4^+ a NO_2^-: < 0,001 mg/l, zbytkový chlor < 10 µg/l, celkový obsah organického chloru < 25 ng/l, pH = 6,5–8,5
	Další kritéria pro kvalitu vody	Pevné částice < 20 mg/l, celkový obsah organického uhlíku < 2 mg/l, celkový obsah organofosforových pesticidů < 50 ng/l, celkový obsah organochlorových pesticidů a polychlorovaných bifenylů < 50 ng/l
	Velikost chovných nádrží	např. 180 l, 1 ryba/l
	Čištění vody	Stálé (filtrace přes aktivní uhlí); jinými možnostmi jsou např. kombinace se semistatickým systémem s obnovováním nebo průtokový systém s nepřetržitým obnovováním vody
	Doporučený poměr samečků a samiček pro množení:	2:1 (nebo hromadné tření)
Třecí nádrže		např. 4litrové nádrže vybavené dnem z ocelové mřížky a imitací rostlin pro povzbuzení tření; rohože vnějšího vytápění nebo hromadné tření v chovných nádržích
Struktura a vzhled jiker		Stabilní chorion (tj. vysoce průhledný, nelepivý, průměr ~ 0,8 až 1,5 mm)
Rychlost tření		Jedna pohlavně zralá samička vytře za den nejméně 50 až 80 jiker. V závislosti na kmenu může být rychlost tření značně vyšší. Míra oplodnění by měla být ≥ 70 %. U ryb, které se třou poprvé, může být při několika prvních třeních míra oplodnění jiker nižší.
Typ zkoušky		Statická, semistatická s obnovováním, průtoková, teplota 26 ± 1 °C, zkušební komory kondiciované po dobu 24 hodin (např. 24jamkové destičky s objemem jednotlivých dutin 2,5 až 5 ml)

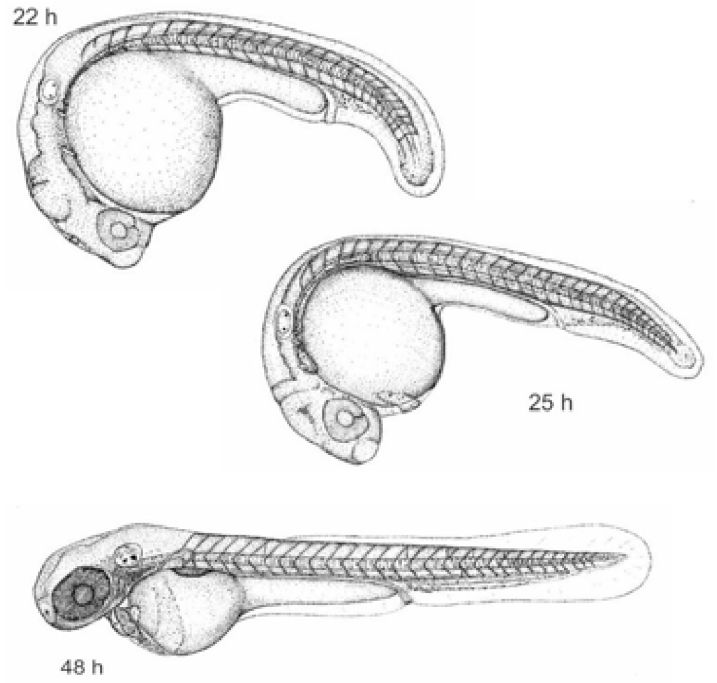
▼M7

Dodatek 3

NORMÁLNÍ VÝVOJ DANIA PRUHOVANÉHO PŘI TEPLOTĚ 26 C

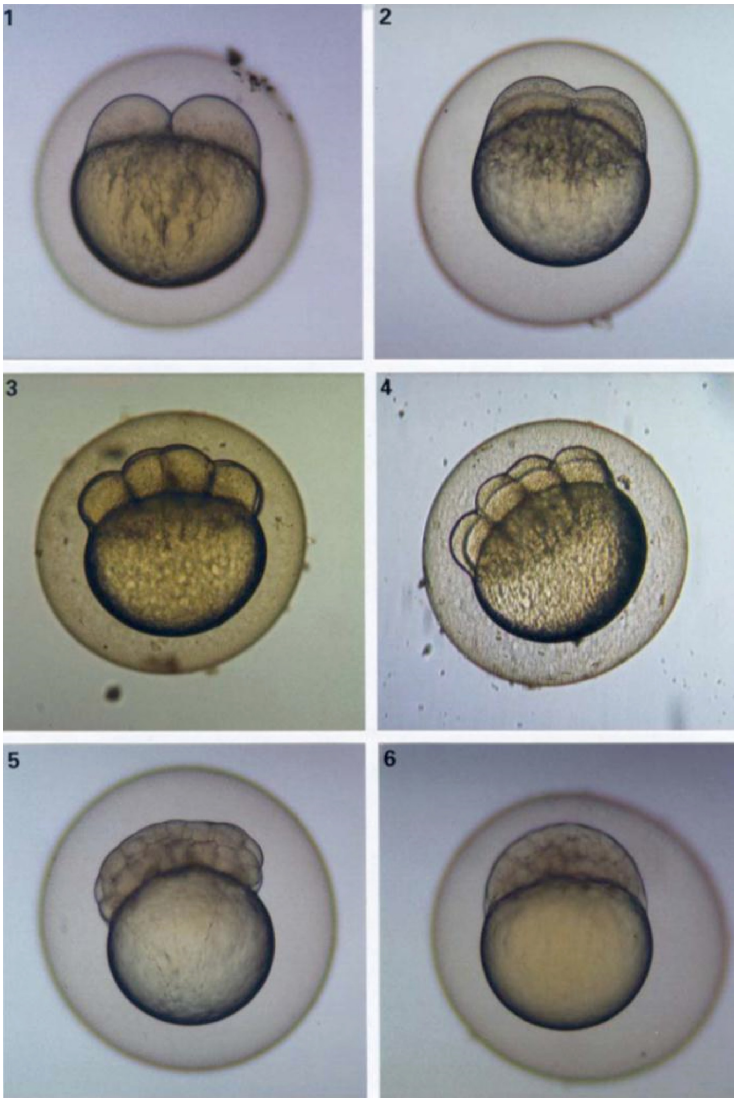


Obrázek 1: Vybraná stadia raného vývoje dania pruhovaného (Danio rerio): 0,2–1,75 hodiny po oplodnění (z Kimmel *et al.*, 1995 (35)). Časový sled normálního vývoje lze použít k diagnostikování oplodnění a životaschopnosti jiker (viz odstavec 26: Výběr oplodněných jiker).



Obrázek 2: Vybraná stadia pozdního vývoje dania pruhovaného (*Danio rerio*) (embryo s odstraněným chorionem pro dosažení co nejlepší viditelnosti): 22–48 hodin po oplodnění (z Kimmel *et al*., 1995 (35)).

▼M7



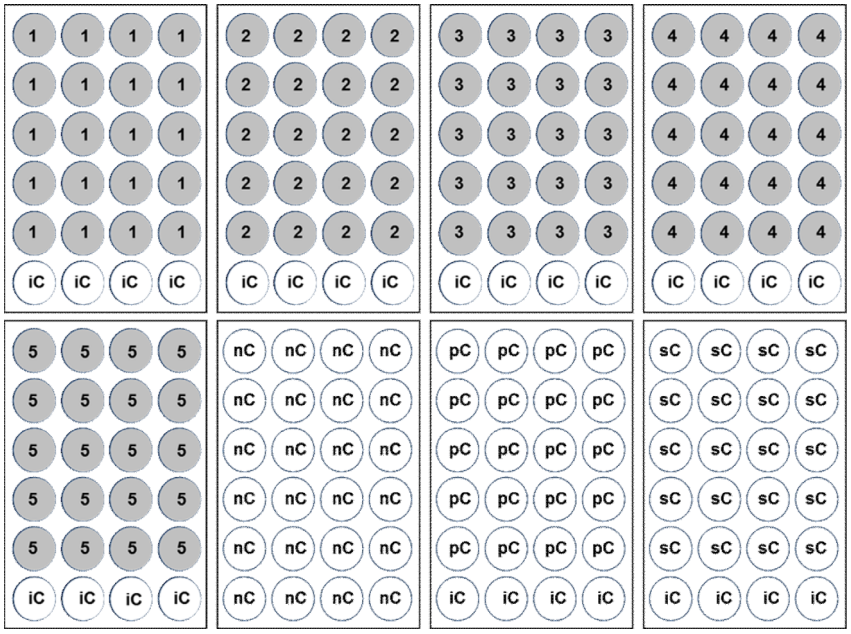
Obrázek 3: Normální vývoj embryí dania pruhovaného (Danio rerio): (1) 0,75 hodiny, 2buněčné stadium; (2) 1 hodina, 4buněčné stadium; (3) 1,2 hodiny, 8buněčné stadium; (4) 1,5 hodiny, 16buněčné stadium; (5) 4,7 hodiny, počínající epibolie; (6) 5,3 hodiny, cca 50 % epibolie (z Braunbeck & Lammer 2006 (40)).

▼M7

Dodatek 4

Obrázek 1

Rozvržení 24jamkových destiček



1–5 = pět zkušebních koncentrací / chemická látka;

nC = negativní kontrola (s ředicí vodou);

iC = vnitřní kontrola destičky (s ředicí vodou);

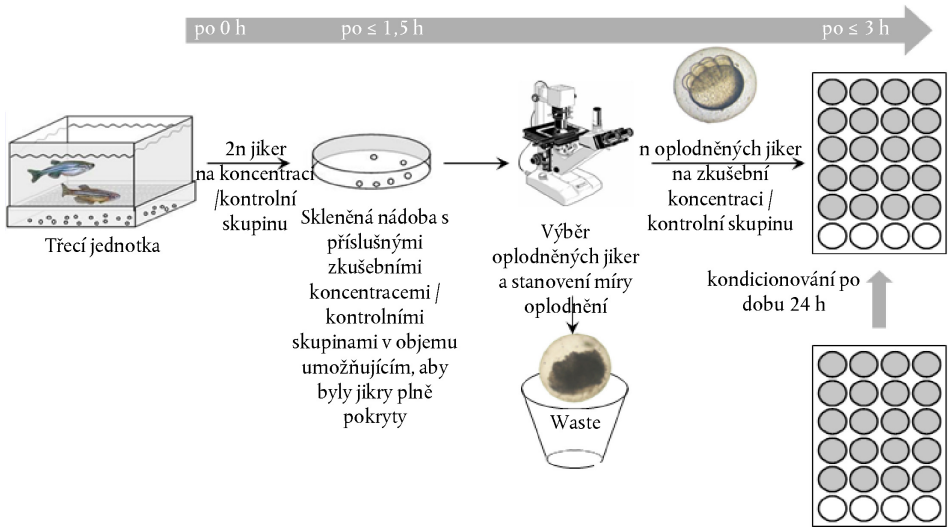
pC = pozitivní kontrola (3,4-dichloranilin 4 mg/l);

sC = kontrola s rozpouštědlem.

▼M7

Obrázek 2

Schéma postupu při zkoušce akutní toxicity na embryích dania pruhovaného (zleva doprava): tvorba jiker, sběr jiker, předexpoziční doba bezprostředně po oplodnění ve skleněných nádobách, výběr oplodněných jiker s inverzním nebo binokulárním mikroskopem a rozdělení oplodněných jiker do připravených 24jamkových destiček s příslušnými zkušebními koncentracemi / kontrolami, n = požadovaný počet jiker pro každou zkušební koncentraci / kontrolu (zde 20), hpf = hodin po oplodnění.



▼M7

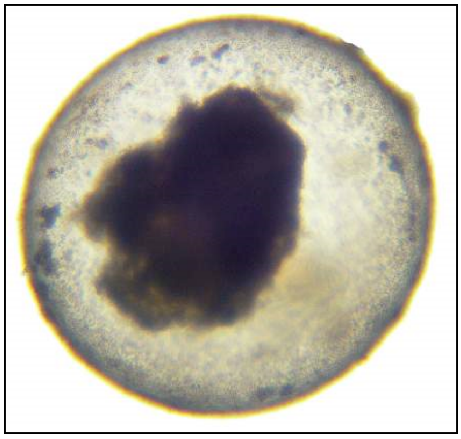
Dodatek 5

ATLAS UKAZATELŮ LETALITY PRO ZKOUŠKU AKUTNÍ TOXICITY NA EMBRYÍCH DANIA PRUHOVANÉHO

Následující hlavní ukazatele naznačují akutní toxicitu a následně uhynutí embryí: *koagulace embrya, neoddělení ocasu, nepřítomnost tvorby somitů a nepřítomnost srdečního tepu.* K ilustraci těchto ukazatelů byly vybrány následující mikroskopické snímky.

Obrázek 1

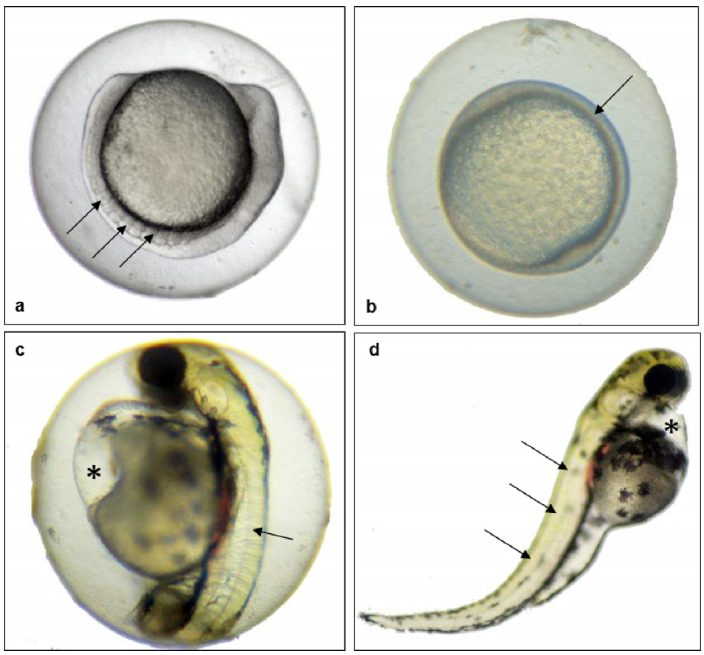
Koagulace embrya:



Při osvětlení v jasném poli jsou na koagulovaných embryích dania pruhovaného viditelné různé neprůhledné útvary.

Obrázek 2

Nepřítomnost tvorby somitů:

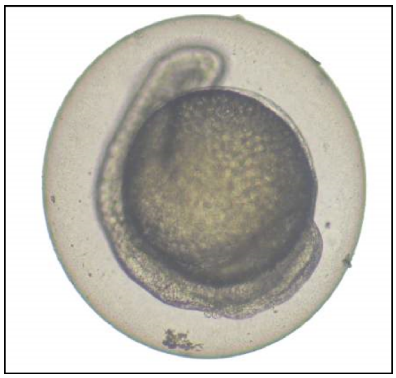


▼M7

Třebaže je embryo dania pruhovaného ve věku 24 h na snímku a) opožděné ve vývoji přibližně o 10 h, vykazuje dobře vyvinuté somity (→), zatímco embryo na snímku b) nevykazuje žádné známky tvorby somitů (→). Ačkoli embryo dania pruhovaného ve věku 48 h na snímku c) vykazuje výrazný otok žloutkového váčku (*), zároveň je zřetelně patrná tvorba somitů (→), zatímco embryo dania pruhovaného ve věku 96 h vyobrazené na snímku d) nevykazuje žádné známky tvorby somitů (→). Na embryu vyobrazeném na snímku d) si povšimněte také zakřivení páteře (skoliózy) a otoku perikardu (*).

Obrázek 3

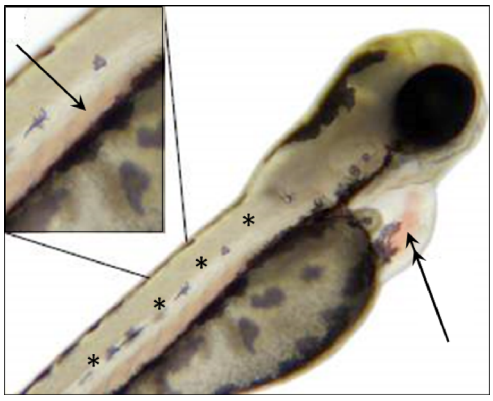
Neoddělení ocasního pupenu,



pohled z boku (a: →; embryo dania pruhovaného ve věku 96 h). Povšimněte si také neexistence očního pupenu (*).

Obrázek 4

Nepřítomnost srdečního tepu



Nepřítomnost srdečního tepu je z povahy věci obtížné prokázat z mikroskopického snímku. Na nepřítomnost srdečního tepu ukazuje to, že nedochází ke stahům srdce (dvojitá šipka). Nepohyblivost krevních buněk např. v břišní aortě (→ na vloženém snímku) není ukazatelem nepřítomnosti srdečního tepu. Povšimněte si také neexistence tvorby somitů v tomto embryu (*, spíše homogenní než členitý vzhled svalových tkání). Pozorování pro zaznamenání nepřítomnosti srdečního tepu by mělo trvat nejméně jednu minutu při minimálně 80 násobném zvětšení.

▼M7

C.50. ZKOUŠKA TOXICITY NA *MYRIOPHYLLUM SPICATUM* BEZ SEDIMENTU

ÚVOD

1. Tato zkušební metoda je rovnocenná Pokynu OECD pro zkoušení (TG) č. 238 (2014). Je určena k hodnocení toxicity chemických látek pro *Myriophyllum spicatum* (stolístek klasnatý), vodní dvoudložnou rostlinu z čeledi *Haloragaceae* rostoucí pod hladinou. Je založena na stávající zkušební metodě ASTM (1) upravené na zkušební systém bez sedimentu pro odhadování vlastní ekotoxicity zkoušených chemických látek (nezávisle na vztahu rozdělení a chování zkoušené chemické látky ve vodě a v sedimentu). Zkušební systém bez sedimentu není z analytického hlediska složitý (má pouze vodní fázi) a výsledky lze analyzovat souběžně a/nebo v srovnání s výsledky získanými ve zkoušce s druhy *Lemna* (3); požadované sterilní podmínky navíc umožňují udržovat účinky mikroorganismů a řas (příjem/rozklad chemické látky) na co možná nejnižší úrovni. Tato zkouška nenahrazuje jiné zkoušky toxicity ve vodním prostředí; měla by je spíše doplňovat, aby bylo možné provést úplnější posouzení nebezpečí a rizik pro vodní rostliny. Tato zkušební metoda byla validována mezinárodní mezilaboratorní porovnávací zkouškou (4).

2. Podrobně se popisuje zkoušení s obnovením (semistatické) a bez obnovení (statické) zkušebního roztoku. V závislosti na cílech zkoušky a právních požadavcích se doporučuje použití semistatické metody, například pro látky, které se z roztoku rychle ztrácejí v důsledku odpaření, adsorpce, fotodegradace, hydrolýzy, srážení nebo biologického rozkladu. Další pokyny jsou uvedeny v (5). Tato zkušební metoda se používá na látky, pro které byla zkušební metoda validována (viz podrobnosti ve zprávě o mezilaboratorní porovnávací zkoušce (4)), nebo na přípravky či známé směsi; je-li zkoušena směs, její složky by měly být v co možná největší míře identifikovány a kvantifikovány. Zkušební metoda s *Myriophyllum spicatum* bez sedimentu doplňuje zkoušku toxicity na *Myriophyllum spicatum* v systému voda-sediment (6). Před použitím této zkušební metody na zkoušení směsi pro zamýšlené použití v právních předpisech by se mělo zvážit, zda tato metoda může pro tento účel poskytnout přiměřené výsledky, a pokud ano, proč tomu tak je. Takové úvahy nejsou nutné, pokud existuje právní požadavek na zkoušení dané směsi.

PODSTATA ZKOUŠKY

3. Nepřetržitě rostoucí kultury rostlin *Myriophyllum spicatum* (pouze v modifikovaném Andrewsově médiu, viz dodatek 2) se po dobu 14 dnů nechají růst jako monokultury v různých koncentracích zkoušené látky ve zkušebním systému bez sedimentu. Cílem zkoušky je kvantifikovat účinky související s chemickou látkou na vegetativní růst během tohoto období, a to na základě hodnocení zvolených proměnných měření. Proměnnými měření jsou nárůst délky výhonků, bočních větví a kořenů, vývoj čerstvé hmotnosti a hmotnosti sušiny a zvýšení počtu přeslenů. Kromě toho se berou v úvahu výrazné kvalitativní změny ve zkušebních organismech, jako např. znetvoření nebo chloróza a nekróza, které se projevují zežloutnutím nebo bílým a hnědým zbarvením. Pro kvantifikaci účinků souvisejících s chemickou látkou se růst ve zkušebních roztocích porovnává s růstem v kontrolních vzorcích a stanoví se koncentrace způsobující stanovenou x % inhibici růstu a vyjádří se jako EC_x; „x“ může být jakákoli hodnota v závislosti na právních požadavcích, např. EC_{10}, EC_{20}, EC_{50}. Je třeba poznamenat, že odhady hodnot EC_{10} a EC_{20} jsou spolehlivé a vhodné pouze ve zkouškách, kde variační koeficient u kontrolních rostlin klesne pod odhadovanou úroveň účinku, tj. pro spolehlivý odhad EC_{20} by variační koeficient měl být < 20 %.

4. Měla by být stanovena průměrná specifická růstová rychlost (odhadnutá na základě posouzení délky hlavního výhonku a tří dalších proměnných měření) a výtěžek (odhadnutý na základě růstu délky hlavního výhonku a tří dalších

▼M7

proměnných měření) u neexponovaných a exponovaných rostlin. Specifická růstová rychlost (r) se následně použije pro stanovení hodnot E_rC_x (např. E_rC_{10}, E_rC_{20}, E_rC_{50}) a výtěžek (y) se použije pro stanovení E_yC_x (např. E_yC_{10}, E_yC_{20}, E_yC_{50}).

5. Kromě toho se může statisticky určit nejnižší koncentrace s pozorovaným účinkem (LOEC) a koncentrace bez pozorovaných účinků (NOEC).

INFORMACE O ZKOUŠENÉ CHEMICKÉ LÁTCE

6. Měla by být k dispozici analytická metoda s odpovídající citlivostí pro kvantifikaci zkoušené chemické látky ve zkušebním médiu. Užitečnými informacemi o zkoušené chemické látce pro účely stanovení zkušebních podmínek mohou být strukturní vzorec, čistota a nečistoty, rozpustnost ve vodě, stabilita ve vodě a na světle, kyselá disociační konstanta (pK_a), rozdělovací koeficient oktanol/voda (K_{ow}), tlak par a biologická rozložitelnost. Rozpustnost ve vodě a tlak par lze použít pro výpočet Henryho konstanty, která určí pravděpodobnost významných ztrát zkoušené chemické látky během doby zkoušky. Toto pomáhá zjistit, zda by se měla podniknout konkrétní opatření ke kontrole takových ztrát. Jestliže nejsou informace o rozpustnosti a stabilitě zkoušené látky jisté, doporučuje se, aby byly hodnoceny za podmínek zkoušky, tj. v růstovém médiu, při teplotě a režimu osvětlení, které mají být při zkoušce použity.

7. Zvláště důležitá je kontrola pH zkušebního média, např. zkoušejí-li se kovy nebo látky, které jsou hydrolyticky nestálé. Další pokyny pro zkoušení chemických látek s fyzikálně-chemickými vlastnostmi, které činí jejich zkoušení obtížné, jsou uvedeny v pokynu OECD (5).

VALIDITA ZKOUŠKY

8. Aby byla zkouška platná, musí být doba, za kterou se zdvojnásobí délka hlavního výhonku v kontrolním vzorku, kratší než 14 dnů. Při použití média a zkušebních podmínek popsaných v této zkušební metodě lze tohoto kritéria dosáhnout použitím režimu statické nebo semistatické zkoušky.

9. Střední variační koeficient pro výtěžek založený na měřeních hmotnosti čerstvých výhonků (tj. od zahájení zkoušky do jejího ukončení) a další proměnné měření (viz odstavec 37) v kontrolních kulturách se mezi opakováními neliší o více než 35 %

10. Více než 50 % opakování kontrolní skupiny je po expoziční dobu 14 dnů udržováno ve sterilních podmínkách, což znamená, že tato opakování jsou očividně prosta kontaminace jinými organismy, například řasami, houbami a bakteriemi (čistý roztok). *Poznámka*: Pokyny ohledně toho, jak posuzovat sterilitu, jsou uvedeny ve zprávě o mezilaboratorní porovnávací zkoušce (4).

REFERENČNÍ CHEMICKÁ LÁTKA

11. Jako prostředek kontroly zkušebního postupu lze zkoušet referenční látku (látky), například 3,5-dichlorfenol použitý v mezilaboratorní porovnávací zkoušce; podle údajů mezilaboratorní porovnávací zkoušky se střední hodnoty EC_{50} 3,5-DCP pro různé proměnné odezvy (viz odstavce 37–40 této zkušební metody) pohybují mezi 3,2 mg/l a 6,9 mg/l (podrobnosti o intervalech spolehlivosti pro každou z těchto hodnot – viz zpráva o mezilaboratorní porovnávací zkoušce). Doporučuje se zkoušet referenční chemickou látku nejméně dvakrát ročně nebo – pokud se zkoušení provádí s menší četností – souběžně se stanovováním toxicity zkoušené chemické látky.

▼M7

POPIS METODY

Přístroje a pomůcky

12. Veškeré vybavení přicházející do styku se zkušebními médii by mělo být vyrobeno ze skla nebo jiného chemicky inertního materiálu. Skleněné pomůcky použité pro kultivační a zkušební účely je zapotřebí vyčistit od chemických kontaminantů, které by mohly unikat do zkušebního média, a měly by být sterilní. Zkušební nádoby by měly být dostatečně dlouhé, aby mohly výhonky v kontrolních nádobách ve vodní fázi růst, aniž by na konci zkoušky dosáhly hladiny zkušebního média. Doporučují se silnostěnné zkušební zkumavky z borokřemičitého skla bez výčnělků, s vnitřním průměrem přibližně 20 mm, o délce přibližně 250 mm, s hliníkovým víčkem.

13. Jelikož modifikované Andrewsovo médium obsahuje sacharózu (která povzbuzuje růst hub a bakterií), musí se zkušební roztoky připravovat za sterilních podmínek. Veškeré kapaliny a vybavení se před použitím sterilizují. Sterilizace se provádí horkým vzduchem (210 °C) po dobu 4 hodin nebo v autoklávu po dobu 20 minut při teplotě 121 °C. Všechny baňky, misky, mísy atd. a další vybavení navíc těsně před použitím projdou ošetřením plamenem na sterilním laboratorním stole.

14. Kultury a zkušební nádoby by se měly přechovávat odděleně. Toho se nejlépe dosáhne pomocí samostatných komor, inkubátorů či místností pro růst za podmínek prostředí. Osvětlení a teplota by měly být regulovatelné a měly by se udržovat na stálé úrovni.

Zkušební organismy

15. *Myriophyllum spicatum* (stolístek klasnatý) – vodní dvouděložná rostlina rostoucí pod hladinou – je druh stolístku z čeledi *Haloragaceae* (zrnulovité). Od června do srpna jeho nenápadné růžově bílé květy vyrůstají nad vodní hladinu. Rostliny jsou zakořeněny v zemi soustavou pevných oddenků a lze se s nimi setkat po celé severní polokouli v eutrofních, avšak neznečištěných stojatých vodách s větším obsahem vápníku a s bahnitým substrátem. *Myriophyllum spicatum* upřednostňuje sladkou vodu, ale vyskytuje se i v brakických vodách.

16. Pro zkoušku toxicity bez sedimentu jsou vyžadovány sterilní rostliny. Nemá-li zkušební laboratoř standardní kultury *Myriophyllum spicatum*, lze získat sterilní rostlinný materiál z jiné laboratoře nebo by bylo možné (nesterilní) rostlinný materiál odebrat v terénu nebo získat od komerčního dodavatele; pocházejí-li rostliny z terénu, předpokládá se taxonomické ověření druhu. Jestliže se sběr provádí z terénu, nebo jsou rostliny dodány komerčním dodavatelem, měly by se sterilizovat (1) a kultivovat ve stejném médiu, jaké se používá ke zkoušení, minimálně po dobu osmi týdnů před použitím. Terénní místa použitá pro sběr výchozích kultur musí být prostá zřejmých zdrojů kontaminace. Při sběru *Myriophyllum spicatum* v terénu je třeba věnovat velkou pozornost tomu, aby byl získán správný druh, zejména v oblastech, kde se může zkřížit s jinými druhy *Myriophyllum*. Pokud se získávají z jiné laboratoře, měly by se podobně uchovávat minimálně po tři týdny. Ve zkušebním protokolu je vždy třeba uvést zdroj rostlinného materiálu a druhu použitého ke zkoušení.

17. Kvalita a jednotnost rostlin použitých ve zkoušce bude mít významný vliv na její výsledek, a proto by se jejich výběru měla věnovat velká pozornost. Měly by se používat mladé, rychle rostoucí rostliny bez viditelných lézí či odbarvení (chlorózy). Podrobnosti o přípravě zkušebního organismu jsou uvedeny v dodatku 4.

Kultivace

18. Pro snížení četnosti udržování kultury (např. pokud se na určité období neplánují žádné zkoušky s *Myriophyllum*) lze kultury udržovat za sníženého osvětlení a teploty (50 μE m^{-2} s^{-1}, 20 ± 2 °C) Podrobnosti o kultivaci jsou uvedeny v dodatku 3.

▼M7

19. Nejméně 14 až 21 dnů před zkoušením se dostatečný počet zkušebních organismů asepticky převede do čerstvého sterilního média a kultivuje se 14 až 21 dnů za podmínek zkoušky jako předkultura. Podrobnosti o přípravě předkultury jsou uvedeny v dodatku 4.

Zkušební médium

20. Pro *Myriophyllum spicatum* ve zkušebním systému bez sedimentu se doporučuje použít pouze jedno živné médium, jak je popsáno v dodatku 2. Pro kultivaci a zkoušení *Myriophyllum spicatum* se doporučuje modifikace Andrewsova média, jak je popsáno v (1). Modifikované Andrewsovo médium se připraví z pěti samostatně připravených zásobních živných roztoků s přidáním 3 % sacharózy. Podrobnosti o přípravě média jsou uvedeny v dodatku 2.

21. Pro získání zkušebních roztoků (odpovídajícím zředěním) je zapotřebí desetinásobně koncentrované, modifikované Andrewsovo médium. Složení tohoto média je uvedeno v dodatku 2.

Zkušební roztoky

22. Zkušební roztoky se obvykle připravují ředěním zásobního roztoku. Zásobní roztoky zkoušené chemické látky se zpravidla připraví rozpuštěním chemické látky v demineralizované (tj. destilované nebo deionizované) vodě. Doplnění živin se dosáhne pomocí desetinásobně koncentrovaného, modifikovaného Andrewsova média.

23. Zásobní roztoky zkoušené chemické látky lze sterilizovat v autoklávu při teplotě 121 °C po dobu 20 minut, nebo sterilní filtrací za předpokladu, že použitá technika sterilizace zkoušenou chemickou látku nedenaturuje. Zkušební roztoky lze též připravit ve sterilní demineralizované vodě nebo médiu za sterilních podmínek. Při volbě postupu sterilizace zásobních roztoků zkoušené chemické látky by měla být vzata v úvahu její teplotní stabilita a adsorpce na různé povrchy. Vzhledem k tomu se doporučuje, aby byly zásobní roztoky připraveny za sterilních podmínek, tj. s použitím sterilního materiálu pro rozpuštění zkoušené chemické látky za sterilních podmínek (např. sterilizace plamenem, digestoř s laminárním prouděním atd.) v sterilní vodě. Tato metoda přípravy sterilních zásobních roztoků je platná pro látky i směsi.

24. Nejvyšší zkušební koncentrace zkoušené chemické látky by obvykle neměla překročit rozpustnost látky ve vodě za zkušebních podmínek. Pro zkoušené chemické látky s nízkou rozpustností ve vodě může být nezbytné připravit koncentrovaný zásobní roztok nebo disperzi látky pomocí organického rozpouštědla nebo dispergátoru, aby se usnadnilo přidávání přesných množství zkoušené chemické látky do zkušebního média, a napomohlo se tak jejímu rozptýlení a rozpuštění. Měla by být vynaložena maximální snaha takové látky nepoužívat. Používání pomocných rozpouštědel nebo dispergátorů by nemělo způsobovat žádnou fytotoxicitu. Příkladem běžně používaných rozpouštědel, která nezpůsobují fytotoxicitu při koncentracích až do 100 µl/l, jsou aceton a dimethylformamid. Jestliže se použije rozpouštědlo nebo dispergátor, jeho konečná koncentrace by se měla uvést v závěrečné zprávě a udržovat na minimální hodnotě (≤ 100 µl/l) a všechny exponované vzorky a kontroly by měly obsahovat stejnou koncentraci rozpouštědla nebo dispergátoru. Další pokyny k používání dispergátorů jsou uvedeny v (5).

Zkušební a kontrolní skupiny

25. Předběžná znalost toxicity zkoušené chemické látky pro *Myriophyllum spicatum*, např. ze zkoušky ke stanovení rozsahu, pomůže při volbě vhodných zkušebních koncentrací. Při hlavní zkoušce toxicity se zpravidla použije alespoň pět

▼M7

(jako ve zkoušce inhibice růstu druhů *Lemna*, kapitola C.26 této přílohy) až sedm zkušebních koncentrací tvořících geometrickou posloupnost; měly by být zvoleny tak, aby hodnoty NOEC a EC_{50} byly zahrnuty v rozmezí koncentrací (viz níže). Faktor mezi zkušebními koncentracemi by optimálně neměl překročit 3,2, ale lze použít i vyšší hodnotu, jestliže je křivka závislosti koncentrace a odezvy plochá. Použití méně než pěti koncentrací by mělo být zdůvodněno. Pro každou zkušební koncentraci se použije nejméně pět opakování.

26. Při volbě rozmezí zkušebních koncentrací (pro orientační a/nebo hlavní zkoušku toxicity) je zapotřebí vzít v úvahu následující:

Pro stanovení EC_x by se zkušební koncentrace měly pohybovat pod a nad hodnotou EC_x, aby se zajistila patřičná úroveň spolehlivosti. Například pokud se odhaduje EC_{50}, nejvyšší zkušební koncentrace by měla být vyšší než hodnota EC_{50}. Jestliže hodnota EC_{50} leží mimo rozmezí zkušebních koncentrací, související intervaly spolehlivosti budou velké, a proto správné hodnocení statistické vhodnosti modelu nemusí být možné.

Jestliže je cílem odhadnout LOEC/NOEC, nejnižší zkušební koncentrace by měla být dostatečně nízká, aby růst nebyl výrazně nižší než růst v kontrolním vzorku. Dále by nejvyšší zkušební koncentrace měla být dostatečně vysoká, aby byl růst výrazně nižší než růst v kontrolním vzorku. Pokud tomu tak není, zkouška se bude muset opakovat v odlišném rozmezí koncentrací (s výjimkou případů, kdy je nejvyšší koncentrace na mezi rozpustnosti nebo představuje maximální požadovaný koncentrační limit, např. 100 mg/l).

27. Každá zkouška by měla zahrnovat kontrolní vzorky obsahující stejné živné médium, stejný zkušební organismus (z předkultur se vybere co možná nejhomogennější rostlinný materiál, s čerstvými bočními větvemi, zkrácenými na 2,5 cm od báze), stejné podmínky okolního prostředí a postupy, jaké byly zvoleny pro zkušební nádoby, avšak neobsahující zkoušenou chemickou látku Jestliže se použije pomocné rozpouštědlo nebo dispergátor, měla by být zahrnuta i další kontrolní expozice s rozpouštědlem/dispergátorem přítomným ve stejné koncentraci jako v nádobách se zkoušenou chemickou látkou. Počet kontrolních nádob použitých k opakování (a případných nádob s rozpouštědly) by měl být nejméně deset.

28. Jestliže stanovení NOEC není požadováno, uspořádání zkoušky lze pozměnit tak, že se zvýší počet koncentrací a sníží počet replik pro příslušnou koncentraci. Počet kontrolních opakování by však v každém případě měl být nejméně deset.

Expozice

29. Čerstvé boční větve z předkultury zkrácené na 2,5 cm od báze se náhodně přiřadí do zkušebních nádob za aseptických podmínek; každá zkušební nádoba by měla obsahovat jednu boční větev o délce 2,5 cm, která by měla mít na konci apikální meristém. Vybraný rostlinný materiál by v každé zkušební nádobě měl mít stejnou kvalitu.

30. K minimalizaci vlivu prostorových rozdílů v intenzitě světla nebo v teplotě je potřebné náhodné uspořádání zkušebních nádob v inkubátoru. Při provádění pozorování se rovněž vyžaduje uspořádání do bloků nebo náhodné přemísťování nádob (nebo častější přemísťování).

31. Jestliže předběžná zkouška stálosti ukazuje, že během doby trvání zkoušky (14 dnů) nelze udržet koncentraci zkoušené chemické látky (tj. měřená koncentrace poklesne pod 80 % naměřené počáteční koncentrace), doporučuje se režim semistatické zkoušky. V tomto případě by měly být rostliny

▼M7

nejméně jednou během zkoušky (např. v den 7) vystaveny čerstvě připraveným zkušebním a kontrolním roztokům. Četnost expozice čerstvému médiu závisí na stabilitě zkoušené chemické látky; pro udržení téměř konstantních koncentrací vysoce nestálých či těkavých chemických látek může být zapotřebí vyšší četnost.

32. Scénář expozice prostřednictvím aplikace na lístek (rozprašování) není do této zkušební metody zahrnut.

Zkušební podmínky

33. Pomocí teplého a/nebo chladného bílého fluorescenčního osvětlení je třeba zajistit ozářenost zvolenou z rozmezí 100 až 150 μE m^{-2} s^{-1}, přičemž se tato ozářenost měří v pásmu fotosynteticky aktivního záření (400 až 700 nm) v bodech nacházejících se ve stejné vzdálenosti od zdroje světla na dně zkušebních nádob (ekvivalent cca 6 000–9 000 lx) a s použitím cyklu světlo-tma v poměru 16:8 h. Naměřenou hodnotu bude ovlivňovat metoda detekce světla a měření, zejména typ čidla. Kulová čidla (která reagují na světlo přicházející ze všech úhlů nad i pod rovinou měření) a „kosinová“ čidla (která reagují na světlo přicházející ze všech úhlů nad rovinou měření) jsou vhodnější než jednosměrná čidla, neboť poskytují vyšší naměřené hodnoty pro vícebodový světelný zdroj zde popsaného typu.

34. Teplota v zkušebních nádobách by měla být 23 ± 2 °C. Zvláštní pozornost je zapotřebí věnovat posunu pH ve speciálních případech, jako jsou zkoušky nestálých chemických látek nebo kovů; hodnota pH by měla zůstat v rozmezí 6 až 9. Další pokyny naleznete v (5).

Doba trvání

35. Zkouška je ukončena za 14 dnů poté, co byly rostliny přeneseny do zkušebních nádob.

Měření a analytická stanovení

36. Na počátku zkoušky činí délka hlavního výhonku 2,5 cm (viz odstavec 29); měří se pravítkem (viz dodatek 4) nebo pomocí fotografie a analýzy obrazu. Na počátku zkoušky, dále nejméně jednou během 14denní expoziční doby a při ukončení zkoušky se musí určit délka hlavního výhonku zkušebního organismu, který má normální nebo nenormální vzhled. Poznámka: Jako alternativa pro ty, kdo nemají analýzu obrazu, lze pro změření délky hlavního výhonku při zahájení a během zkoušky použít také sterilní pravítko, je-li před přidáním rostlin do zkušebních nádob pracovní stůl sterilizovaný. V závěrečné zprávě by se měly zaznamenat změny ve vývoji rostlin, např. deformace výhonků, vzhled, známky nekrózy, chlorózy, rozpadávání rostlin nebo ztráta vzplývavosti, a v délce a vzhledu kořenu. Měly by se rovněž zaznamenat významné znaky zkušebního média (např. přítomnost nerozpuštěného materiálu, růst řas, hub a bakterií ve zkušební nádobě).

37. Kromě určení délky hlavního výhonku během zkoušky by se také měly hodnotit účinky zkoušené chemické látky na tři (nebo více) následujících proměnných měření:

i. celková délka bočních větví,

ii. celková délka výhonků,

iii. celková délka kořenů,

iv. čerstvá hmotnost,

v. hmotnost sušiny,

vi. počet přeslenů.

▼M7

Poznámka 1: Pozorování provedená během zkoušky ke stanovení rozsahu by mohla pomoci při volbě příslušných doplňkových měření výše uvedených šesti proměnných.

Poznámka 2: Stanovení čerstvé hmotnosti a hmotnosti sušiny (parametry iv) a v)) je vysoce žádoucí.

Poznámka 3: Vzhledem k tomu, že sacharóza a světlo (expozice kořenů světlu během zkoušky) mohou mít vliv na nosiče auxinů (růstové hormony rostlin) a že některé chemické látky mohou mít mechanismus účinku auxinového typu, je zařazení kořenových ukazatelů (parametr iii) sporné.

Poznámka 4: Výsledky mezilaboratorní porovnávací zkoušky ukazují na vysoký variační koeficient (> 60 %) pro celkovou délku bočních větví (parametr i)). Celková délka bočních větví je v každém případě zahrnuta do měření celkové délky výhonků (parametr ii)), jež vykazuje přijatelnější variační koeficient < 30 %.

Poznámka 5: Z výše uvedených úvah vycházejí doporučené hlavní měřené ukazatele, kterými jsou: celková délka výhonků, čerstvá hmotnost a hmotnost sušiny (parametry ii), iv) a v)); parametr vi) – počet přeslenů – je ponechán na úsudku experimentátora.

38. Délka hlavního výhonku a počet přeslenů má tu výhodu, že je lze stanovit pro každou zkušební a kontrolní nádobu na počátku, během a na konci zkoušky pomocí fotografie a analýzy obrazu, ačkoli může být použito také (sterilní) pravítko.

39. Celkovou délku bočních větví, celkovou délku kořenů (jako součet všech bočních větví nebo kořenů) a celkovou délku výhonků (jako součet délky hlavního výhonku a celkové délky bočních větví) lze měřit pravítkem na konci expozice.

40. Čerstvá hmotnost a/nebo hmotnost sušiny by se měly určit na počátku zkoušky ze vzorku předkultury, která se obvykle používá k zahájení zkoušky, a na konci zkoušky pak na základě rostlinného materiálu z každé zkušební a kontrolní nádoby.

41. Celkovou délku bočních větví, celkovou délku výhonků, celkovou délku kořenů, čerstvou hmotnost, hmotnost sušiny a počet přeslenů lze určit takto:

i. Celková délka bočních větví: Délku bočních větví lze určit změřením všech bočních větví pravítkem na konce expozice. Celková délka bočních větví je součet všech bočních větví v každé zkušební a kontrolní nádobě.

ii. Celková délka výhonků: Celkovou délku výhonků lze určit analýzou obrazu nebo pravítkem. Celková délka výhonků je součet celkové délky bočních větví a délky hlavního výhonku v každé zkušební a kontrolní nádobě na konci expozice.

iii. Celková délka kořenů: Délku kořenů lze určit změřením všech kořenů pravítkem na konci expozice. Celková délka kořenů je součet všech kořenů v každé zkušební a kontrolní nádobě.

iv. Čerstvá hmotnost: Čerstvou hmotnost lze určit zvážením zkušebních organismů na konci expozice. Veškerý rostlinný materiál z každé

▼M7

zkušební a kontrolní nádoby se opláchne destilovanou vodou a utře dosucha celulózovým papírem. Po této přípravě se určí čerstvá hmotnost zvážením. Počáteční biomasa (čerstvá hmotnost) se určuje na základě vzorku zkušebních organismů odebraných ze stejné vsázky použité k naočkování zkušebních nádob.

v. Hmotnost sušiny: Po přípravě pro určení čerstvé hmotnosti se zkušební organismy vysuší při teplotě 60 °C na konstantní hmotnost. Tato hmotnost je hmotnost sušiny. Počáteční biomasa (hmotnost sušiny) se určuje na základě vzorku zkušebních organismů odebraných ze stejné vsázky použité k naočkování zkušebních nádob.

vi. Počet přeslenů: Spočítají se všechny přesleny na hlavním výhonku.

Četnost měření a analytická stanovení

42. Jestliže se používá statické uspořádání zkoušky, pH každé expozice by se mělo změřit na počátku a na konci zkoušky. Jestliže se používá semistatické uspořádání zkoušky, pH by se mělo měřit v každé vsázce „čerstvého“ zkušebního roztoku před každým obnovením a rovněž i v odpovídajících „spotřebovaných“ roztocích.

43. Intenzita osvětlení by se měla měřit v růstové komoře, inkubátoru nebo místnosti v bodech nacházejících se ve stejné vzdálenosti od zdroje světla jako zkušební organismy. Měření je třeba provádět nejméně jednou během zkoušky. Teplota média v náhradní nádobě držené za stejných podmínek v růstové komoře, inkubátoru nebo místnosti by se měla zaznamenávat nejméně jednou denně (nebo nepřetržitě se zařízením k záznamu dat).

44. Během zkoušky se koncentrace zkoušené chemické látky (látek) určují ve vhodných intervalech. Při statických zkouškách je minimálním požadavkem určení koncentrací na počátku a na konci zkoušky.

45. Při semistatických zkouškách, u nichž se neočekává, že koncentrace zkoušené chemické látky (látek) zůstanou v rozmezí ± 20 % nominální koncentrace, je nezbytné analyzovat všechny čerstvě připravené zkušební roztoky a tytéž roztoky při každém obnovení. Ovšem u zkoušek, u nichž nejsou naměřené počáteční koncentrace zkoušené chemické látky (látek) v rozmezí ± 20 % nominální hodnoty, avšak u nichž lze dostatečně prokázat, že počáteční koncentrace jsou reprodukovatelné a stálé (tj. od 80 do 120 % počáteční koncentrace), mohou být chemická stanovení provedena pouze na nejvyšších a nejnižších zkušebních koncentracích. Ve všech případech je třeba určit zkušební koncentrace před obnovením při každé zkušební koncentraci vždy pouze u jedné nádoby z počtu použitých opakování (nebo u sdruženého obsahu nádob všech opakování).

46. Lze-li prokázat, že byla po celou dobu zkoušky zkušební koncentrace uspokojivě udržována v rozmezí ± 20 % nominální nebo naměřené počáteční koncentrace, může být analýza výsledků založena na nominálních nebo naměřených počátečních hodnotách. Je-li odchylka od nominální nebo naměřené počáteční koncentrace větší než ± 20 %, analýza výsledků by měla být založena na geometrické střední koncentraci během expozice nebo na modelech popisujících pokles koncentrace zkoušené chemické látky (5).

Limitní zkouška

47. Za určitých okolností, např. pokud předběžná zkouška naznačuje, že zkoušená chemická látka nemá žádné toxické účinky při koncentracích až do 100 mg/l nebo až do meze své rozpustnosti ve zkušebním médiu nebo v případě přípravků až do meze jejich dispergovatelnosti, může se provést limitní zkouška zahrnující porovnání odezvy v kontrolní skupině a odezvy

▼M7

v jedné exponované skupině (100 mg/l nebo koncentrace rovná mezi rozpustnosti). Důrazně se doporučuje podpořit tuto zkoušku analýzou expozičních koncentrací. Všechny dříve popsané zkušební podmínky a kritéria platnosti se vztahují i na limitní zkoušku s výjimkou toho, že počet opakování s exponovanými vzorky by se měl zdvojnásobit. Růst v kontrolní a exponované skupině může být analyzován pomocí statistické zkoušky pro porovnání středních hodnot, např. Studentova t-testu.

ÚDAJE A PŘEDKLÁDÁNÍ ZPRÁV

Proměnné odezvy

48. Účelem této zkoušky je stanovit účinky zkoušené chemické látky na vegetativní růst *Myriophyllum spicatum*. Tato zkušební metoda popisuje dvě proměnné odezvy.

a) Průměrná specifická růstová rychlost: Tato proměnná odezvy se počítá na základě změn logaritmů délky hlavního výhonku a dále na základě změn logaritmů jiných parametrů měření, tj. celkové délky výhonků, čerstvé hmotnosti, hmotnosti sušiny nebo počtu přeslenů v čase (ve dnech) v kontrolních vzorcích a každé exponované skupině. Poznámka: Výpočet průměrné specifické růstové rychlosti nelze provést pro parametry měření, jako jsou celková délka bočních větví a celková délka kořenů. Na počátku zkoušky zkušební organismus nemá žádné boční větve a žádné kořeny (na základě přípravy z předkultury); výpočet průměrné specifické růstové rychlosti z nulové hodnoty není definován.

b) Výtěžek: Tato proměnná odezvy se počítá na základě změn délky hlavního výhonku a dále na základě změn jiných parametrů měření – tj. přednostně celkové délky výhonků, čerstvé hmotnosti, hmotnosti sušiny nebo počtu přeslenů a jiných parametrů, je-li to považováno za užitečné – v kontrolních vzorcích a každé exponované skupině až do ukončení zkoušky.

49. Odhady toxicity by měly být založeny na délce hlavního výhonku a třech dalších proměnných měření (tj. přednostně celkové délce výhonků, čerstvé hmotnosti, hmotnosti sušiny nebo počtu přeslenů), viz odstavec 37 a poznámky 2, 4 a 5 k tomuto odstavci), protože některé chemické látky mohou ovlivňovat jiné proměnné měření mnohem více než délku hlavního výhonku. Pouhým počítáním délky hlavního výhonku by se tento účinek nezjistil.

Průměrná specifická růstová rychlost

50. Průměrná specifická růstová rychlost pro konkrétní období se vypočítá jako logaritmické zvýšení proměnných růstu – délky hlavního výhonku a tří dalších proměnných měření (tj. celkové délky výhonků, čerstvé hmotnosti, hmotnosti sušiny nebo počtu přeslenů) – pomocí následujícího vzorce pro každé opakování kontrolních a exponovaných vzorků:

$$\mu_{i-j} = \frac{\ln(N_j) - \ln(N_i)}{t}$$

kde:

μ_{i-j}: průměrná specifická růstová rychlost od času i do času j,

N_i: proměnná měření ve zkušební nebo kontrolní nádobě v čase i,

N_j: proměnná měření ve zkušební nebo kontrolní nádobě v čase j,

t: časový interval od času i do času j.

▼M7

Pro každou exponovanou skupinu a kontrolní skupinu se vypočítá střední hodnota růstové rychlosti a odhady rozptylu.

51. Průměrná specifická růstová rychlost by se měla vypočítat pro celou dobu trvání zkoušky (čas „i“ ve shora uvedeném vzorci je počátek zkoušky a čas „j“ je okamžik ukončení zkoušky). Pro každou zkušební koncentraci a kontrolu se vypočítá střední hodnota průměrné specifické růstové rychlosti a odhady rozptylu. Dále je zapotřebí vyhodnotit růstovou rychlost v jednotlivých časových úsecích s cílem zhodnotit účinky zkoušené chemické látky, které se vyskytly během expoziční doby (např. kontrolou logaritmicky transformovaných růstových křivek).

52. Procentuální inhibici růstové rychlosti (I_r) lze potom vypočítat pro každou zkušební koncentraci (exponovanou skupinu) podle následujícího vzorce:

$$\%I_r = \frac{(\mu_C - \mu_T)}{\mu_C} \times 100$$

kde:

% I_r: procentuální inhibice průměrné specifické růstové rychlosti,

μ_C: střední hodnota μ v kontrolní skupině,

μ_T: střední hodnota μ v exponované skupině.

Výtěžek

53. Účinky na výtěžek se určují na základě délky hlavního výhonku (proměnná měření) a tří dalších proměnných měření (tj. přednostně celkové délky výhonků, čerstvé hmotnosti, hmotnosti sušiny nebo počtu přeslenů), přítomných v každé zkušební nádobě na počátku a konci zkoušky. Pro čerstvou hmotnost nebo hmotnost sušiny se počáteční biomasa určuje na základě vzorku zkušebních organismů odebraných ze stejné vsázky použité k naočkování zkušebních nádob. Pro každou zkušební koncentraci a kontrolu se vypočítá střední hodnota výtěžku a odhad rozptylu. Střední hodnotu procentuální inhibice výtěžku (% I_y) lze vypočítat pro každou exponovanou skupinu následovně:

$$\%I_y = \frac{(b_c - b_T)}{b_c}$$

kde:

% I_y: procentuální snížení výtěžku,

b_C: konečná biomasa minus počáteční biomasa pro kontrolní skupinu,

b_T: konečná biomasa minus počáteční biomasa pro exponovanou skupinu.

Doba zdvojnásobení

54. Pro stanovení doby zdvojnásobení (T_d) délky hlavního výhonku a dodržování tohoto kritéria platnosti (odstavec 8) se používá následující vzorec s údaji získanými z kontrolních nádob:

$T_d = \ln 2/\mu$

kde μ je průměrná specifická růstová rychlost stanovená tak, jak je popsáno v odstavcích 50–52.

▼M7

Vynášení křivek závislosti koncentrace-odezva

55. Je třeba vynést křivky závislosti koncentrace-odezva, které vyjadřují vztah střední procentuální inhibice proměnné odezvy (I_r nebo I_y vypočítané postupem z odstavce 53) a logaritmu koncentrace zkoušené chemické látky.

Odhad EC_x

56. Odhady EC_x by měly být založeny jak na průměrné specifické růstové rychlosti (E_rC_x), tak na výtěžku (E_yC_x), přičemž obě tyto hodnoty by zase měly vycházet z délky hlavního výhonku a možná z dalších proměnných měření (tj. přednostně celková délka výhonků, čerstvá hmotnost, hmotnost sušiny nebo počet přeslenů). Důvodem je skutečnost, že existují zkoušené chemické látky, které mají odlišný dopad na délku hlavního výhonku a na další proměnné měření. Požadovanými parametry toxicity jsou proto čtyři hodnoty EC_x pro každou vypočítanou úroveň inhibice x: E_rC_x (délka hlavního výhonku); E_rC_x (tj. přednostně celková délka výhonků, čerstvá hmotnost, hmotnost sušiny nebo počet přeslenů); E_yC_x (délka hlavního výhonku); a E_yC_x (tj. přednostně celková délka výhonků, čerstvá hmotnost, hmotnost sušiny nebo počet přeslenů).

57. Je třeba uvést, že hodnoty EC_x vypočítané pomocí těchto dvou proměnných odezvy nejsou srovnatelné a při používání výsledků zkoušky se musí vzít tento rozdíl na vědomí. Hodnoty EC_x založené na průměrné specifické růstové rychlosti (E_rC_x) budou ve většině případů vyšší než výsledky založené na výtěžku (E_yC_x) – pokud se dodrží zkušební podmínky této zkušební metody –, a to kvůli matematickému základu příslušných přístupů. Tento rozdíl nelze vykládat jako rozdíl v citlivosti mezi těmito dvěma proměnnými odezvy; hodnoty jsou jednoduše matematicky odlišné.

Statistické postupy

58. Cílem je získat kvantitativní vztah mezi koncentrací a odezvou pomocí regresní analýzy. Je možné použít váženou lineární regresi po provedení linearizující transformace dat odezvy – například s probitovými nebo logitovými či Weibullovými modely (7), ale dává se přednost nelineárním regresním postupům, s jejichž pomocí se lépe zpracovávají nevyhnutelné nepravidelnosti dat a odchylky od hladkých distribucí. Při přiblížení se k nule či úplné inhibici mohou být takové nepravidelnosti zesíleny transformací a rušit při analýze (7). Je zapotřebí uvést, že standardní metody analýzy používající probitové, logitové nebo Weibullovy transformace jsou určeny k použití s binárními daty (např. mortalita nebo přežití) a měly by se upravit, aby mohly být použity s daty růstové rychlosti nebo výtěžku. Speciální postupy pro stanovení hodnoty EC_x ze spojitých dat lze nalézt v literatuře (8) (9) (10).

59. Pro každou proměnnou odezvy, která se má analyzovat, se použije vztah koncentrace a odezvy pro výpočet bodových odhadů hodnot EC_x. Je-li to možné, je zapotřebí určit 95 % intervaly spolehlivosti pro každý odhad. Dobrá shoda dat odezvy s regresním modelem se vyhodnotí buď graficky, nebo statisticky. Regresní analýza by se měla provádět pomocí odezev jednotlivých opakování, nikoliv pomocí středních hodnot exponovaných skupin.

60. Odhady EC_{50} a meze spolehlivosti lze rovněž získat lineární interpolací s bootstrapem (10), pokud se dostupné regresní modely/metody pro příslušná data nehodí.

61. Pro odhad LOEC, a tedy i NOEC je nezbytné porovnat střední hodnoty exponovaných vzorků pomocí metod analýzy rozptylu (ANOVA). Střední hodnota pro každou koncentraci se poté porovná se střední hodnotou pro kontrolní skupinu, a to vhodnou metodou vícenásobného porovnání nebo metodou zkoušky trendu (trend test). Užitečný může být Dunnettův nebo Williamsův test (12) (13) (14) (15) (16). Je nezbytné vyhodnotit, zda je splněn předpoklad homogenity rozptylu nezbytný pro metodu ANOVA. Toto hodnocení lze provádět graficky nebo formálním testem (15). Vhodný

▼M7

je Leveneův nebo Bartlettův test. Nesplnění předpokladu homogenity rozptylů se dá někdy napravit logaritmickou transformací dat. Jestliže je heterogenita rozptylů extrémní a nelze ji napravit transformací, pak je třeba zvážit analýzu takovými metodami, jako je Jonckheerův test sestupného trendu. Další pokyny pro stanovení NOEC lze nalézt v (10).

62. Vědecký vývoj poslední doby vedl k doporučení opustit koncepci NOEC a nahradit ji odhady bodů EC_x na základě regrese. Vhodná hodnota x nebyla pro tuto zkoušku s *Myriophyllum* stanovena. Nicméně se zdá, že vhodné je rozmezí od 10 do 20 % (v závislosti na zvolené proměnné odezvy) a nejlépe by se měly uvádět jak EC_{10}, tak EC_{20} a jejich intervaly spolehlivosti.

Předkládání zpráv

63. Závěrečná zpráva obsahuje následující informace:

Zkoušená chemická látka

Jednosložková látka:

— fyzický vzhled, rozpustnost ve vodě a další relevantní fyzikálně-chemické vlastnosti,

— chemická identifikace, např. název podle IUPAC nebo CAS, číslo CAS, kód SMILES nebo InChI, strukturní vzorec, čistota, popřípadě chemická identita nečistot, je-li to prakticky proveditelné atd. (včetně obsahu organického uhlíku, je-li měřen).

Vícesložkové látky, UVCB nebo směsi:

— charakterizované pokud možno chemickou identitou (viz výše), kvantitativním výskytem a relevantními fyzikálně-chemickými vlastnostmi složek.

Zkušební druh

— Vědecký název a zdroj.

Zkušební podmínky

— použitý zkušební postup (statický nebo semistatický),

— datum zahájení zkoušky a délka jejího trvání,

— zkušební médium,

— popis experimentálního provedení: zkušební nádoby a kryty, objemy roztoků, délka hlavního výhonku na zkušební nádobu na počátku zkoušky,

— zkušební koncentrace (nominální, popř. naměřené) a počet opakování pro každou koncentraci,

— metody přípravy zásobních a zkušebních roztoků, včetně použití jakýchkoliv rozpouštědel nebo dispergátorů,

— teplota během zkoušky,

— zdroj světla, intenzita světla a homogenita,

— hodnoty pH zkušebních a kontrolních médií,

— metoda analýzy s příslušnými údaji pro hodnocení jakosti (validační studie, směrodatné odchylky nebo intervaly spolehlivosti analýz),

▼M7

— metody pro určení délky hlavního výhonku a dalších proměnných měření, např. celkové délky bočních větví, celkové délky výhonků, celkové délky kořenů, čerstvé hmotnosti, hmotnosti sušiny nebo počtu přeslenů,

— stav kultury (sterilní nebo nesterilní) v každé zkušební a kontrolní nádobě při každém pozorování,

— všechny odchylky od této zkušební metody.

Výsledky

— hrubá data: délka hlavního výhonku a další proměnné měření v každé zkušební a kontrolní nádobě při každém pozorování a každé analýze,

— střední hodnoty a směrodatné odchylky pro každou proměnnou měření,

— křivky růstu pro každou proměnnou měření,

— vypočítané proměnné odezvy pro všechna opakování s exponovanými vzorky, spolu se středními hodnotami a variačními koeficienty pro opakování,

— grafické znázornění vztahu koncentrace a odezvy,

— odhady toxických cílových ukazatelů pro proměnné odezvy, např. EC_{50}, EC_{10}, EC_{20}, a související intervaly spolehlivosti. Jestliže se počítají LOEC a/nebo NOEC, uvedou se jejich hodnoty a statistické metody použité k jejich stanovení,

— jestliže byla použita ANOVA, uvede se velikost účinku, který lze detekovat (např. nejmenší významný rozdíl),

— jakákoliv stimulace růstu zjištěná v kterémkoli exponovaném vzorku,

— jakékoliv vizuální známky fytotoxicity, jakož i pozorování zkušebních roztoků,

— rozbor výsledků včetně případného ovlivnění výsledku zkoušky v důsledku odchylek od této zkušební metody.

LITERATURA

(1) ASTM Designation E 1913-04, Standard Guide for Conducting Static, Axenic, 14-Day Phytotoxicity Tests in Test Tubes with the Submersed Aquatic Macrophyte, *Myriophyllum sibiricum* Komarov.

(2) Maletzki, D. *et al*. (2010), *Myriophyllum spicatum* als ökotoxikologischer Testorganismus: Methodenentwicklung eines sedimentfreien Testsystems und erste Ergebnisse mit 3,5-Dichlorphenol, *Umweltwiss Schadst Forsch,* No. 22, s. 702–710.

(3) Kapitola C.26 této přílohy: *Zkouška inhibice růstu druhů Lemna*.

(4) OECD (2014), „*Myriophyllum spicatum* Toxicity Test: Results of an inter-laboratory ring test using a sediment-free test system“, OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series Testing and Assessment, No. 205, OECD Publishing, Paris.

(5) OECD (2000), „Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures“, OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, No. 23, OECD Publishing, Paris.

(6) Kapitola C.51 této přílohy: Zkouška toxicity na *Myriophyllum spicatum* v systému voda-sediment:

▼**M7**

(7) Christensen, E.R., N. Nyholm (1984), Ecotoxicological Assays with Algae: Weibull Dose-Response Curves, *Environmental Science & Technology*, sv. 18/9, 713-718.

(8) Nyholm, N. *et al*. (1992), Statistical treatment of data from microbial toxicity tests, *Environmental Toxicology and Chem*istry, sv. 11/2, s. 157-167.

(9) Bruce, R.D., D.J. Versteeg (1992), A statistical procedure for modelling continuous toxicity data, *Environmental Toxicology and Chemistry*, sv. 11/10, s. 1485-1494.

(10) OECD (2006), „Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application“, OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, No. 54, OECD Publishing, Paris.

(11) Norberg-King, T.J. (1988), An interpolation estimate for chronic toxicity: The ICp approach, National Effluent Toxicity Assessment Center Technical Report 05-88, US EPA, Duluth, MN.

(12) Dunnett, C.W. (1955), A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control, *Journal of the American Statistical Association*, sv. 50/272, s. 1096-1121.

(13) Dunnett, C.W. (1964), New tables for multiple comparisons with a control, *Biometrics*, sv. 20/3, s. 482-491.

(14) Williams, D.A. (1971), A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control, *Biometrics*, sv. 27/1, s. 103-117.

(15) Williams, D.A. (1972), The comparison of several dose levels with a zero dose control, *Biometrics*, sv. 28/2, s. 519-531.

(16) Brain, P., R. Cousens (1989), An equation to describe dose-responses where there is stimulation of growth at low doses, *Weed Research*, sv. 29/2, s. 93-96.

▼M7

Dodatek 1

DEFINICE

Biomasa je čerstvá hmotnost a/nebo hmotnost sušiny živé hmoty přítomné v populaci. V této zkoušce se biomasou rozumí součet hlavního výhonku, všech bočních větví a všech kořenů.

Chemická látka je látka nebo směs.

Chloróza je změna zbarvení ze zelené barvy k zežloutnutí zkušebního organismu, zejména přeslenů.

EC_x je koncentrace zkušební chemické látky rozpuštěné ve zkušebním médiu, která pro danou expoziční dobu (musí se výslovně uvést, pokud se odchyluje od plné či normální doby trvání zkoušky) vede k x % (např. 50 %) snížení růstu *Myriophyllum spicatum*. Pro jednoznačný popis hodnoty EC odvozené z růstové rychlosti nebo z výtěžku se pro růstovou rychlost používá symbol „E_rC“ a pro výtěžek „E_yC“ následovaný proměnnou měření, např. E_rC(délka hlavního výhonku).

Růst je zvýšení proměnné měření, např. délky hlavního výhonku, celkové délky bočních větví, celkové délky výhonků, celkové délky kořenů, čerstvé hmotnosti, hmotnosti sušiny nebo počtu přeslenů, během doby zkoušky.

Růstová rychlost (průměrná specifická růstová rychlost) je logaritmický nárůst proměnné měření během období expozice. *Poznámka*: Proměnné měření, kterých se růstová rychlost týká, jsou nezávislé na době trvání zkoušky, pokud je funkce růstu neexponovaných organismů exponenciální.

Nejnižší koncentrace s pozorovaným účinkem (LOEC) je nejnižší zkušební koncentrace, při níž je pro danou expoziční dobu pozorován statisticky významný účinek chemické látky na snížení růstu (při $p < 0,05$) ve srovnání s kontrolou. Všechny zkušební koncentrace vyšší než LOEC musí však mít stejné nebo závažnější škodlivé účinky, než jsou účinky pozorované při koncentraci LOEC. Nelze-li tyto dvě podmínky splnit, mělo by být podrobně vysvětleno, jak byla LOEC (a tedy i NOEC) zvolena.

Proměnné měření jsou jakýmkoliv druhem proměnných, které se měří pro vyjádření cílového ukazatele pomocí jedné či více různých proměnných odezvy. V této metodě jsou proměnnými měření délka hlavního výhonku, celková délka bočních větví, celková délka výhonků, celková délka kořenů, čerstvá hmotnost, hmotnost sušiny a počet přeslenů.

Monokultura je kultura s jedním druhem rostliny.

Nekróza je mrtvá (tj. bílá nebo tmavě hnědá) tkáň zkušebního organismu.

Koncentrace bez pozorovaných účinků (NOEC) je zkušební koncentrace bezprostředně nižší než LOEC.

Proměnná odezvy je proměnná pro odhad toxicity odvozená z jakýchkoliv naměřených proměnných, jež popisují biomasu, různými metodami výpočtu. Pro tuto metodu jsou proměnnými odezvy růstová rychlost a výtěžek, které se odvozují z proměnných měření jako např. délky hlavního výhonku, celkové délky výhonků, čerstvé hmotnosti, hmotnosti sušiny nebo počtu přeslenů.

Semistatická (obnovovací) zkouška je zkouška, při níž je zkušební roztok během zkoušky ve stanovených intervalech pravidelně nahrazován.

▼M7

Statická zkouška je zkušební metoda bez obnovování zkušebního roztoku během zkoušky.

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

Cílový ukazatel popisuje obecný faktor, který bude jakožto cíl zkoušky změněn zkoušenou chemickou látkou vzhledem ke kontrole. Při této metodě je cílovým ukazatelem inhibice růstu, kterou lze vyjádřit různými proměnnými odezvy, jež jsou založeny na jedné či více proměnných měření.

Zkušební médium je úplné syntetické růstové médium, v němž rostou zkušební rostliny při expozici zkoušené chemické látce. Zkoušená chemická látka se za normálních podmínek v zkušebním médiu rozpustí.

UVCB je látka s neznámým nebo proměnlivým složením, komplexní reakční produkt nebo biologický materiál.

Výtěžek je hodnota proměnné měření pro vyjádření biomasy na konci expoziční doby minus proměnná měření na počátku expoziční doby. Poznámka: Při exponenciálním růstu neexponovaného organismu budou proměnné odezvy založené na výtěžku během zkoušky klesat.

▼M7

Dodatek 2

MODIFIKOVANÉ ANDREWSOVO MÉDIUM PRO ZÁSOBNÍ KULTURY A PŘEDKULTURY

Andrewsovo médium potřebné pro zásobní kultury a předkultury se připraví z pěti samostatně připravených zásobních živných roztoků s přidáním 3 % sacharózy.

Tabulka 1

Složení Andrewsova živného roztoku: (norma ASTM E 1913-04)

Příprava zásobního živného roztoku			Příprava živného roztoku
Zásobní roztok	Chemická látka	Počáteční hmotnost na 1 000 ml	ml na 5 l živného roztoku
1	KCl	74,6 mg	50
	KNO_3	8,08 g	
	$Ca(NO_3)_2 \times 4\ H_2O$	18,88 g	
2	$MgSO_4 \times 7\ H_2O$	9,86 g	50
3	Viz dále zásobní roztok 3.1		50
4	KH_2PO_4	2,72 g	50
5	$FeSO_4 \times 7\ H_2O$	0,278 g	50
	$Na_2EDTA \times 2\ H_2O$	0,372 g	

Zásobní roztoky lze držet v chladničce po dobu 6 měsíců (při 5 až 10 °C). Pouze zásobní roztok č. 5 má omezenou životnost (dva měsíce).

Tabulka 2

Příprava zásobního roztoku 3.1 na přípravu zásobního roztoku 3

Chemická látka	Počáteční hmotnost v g/100 ml
$MnSO_4 \times 4\ H_2O$	0,223
$ZnSO_4 \times 7\ H_2O$	0,115
H_3BO_3	0,155
$CuSO_4 \times 5\ H_2O$	0,0125
$(NH_4)_6Mo_7O_{24} \times 4\ H_2O$	0,0037

Připravený zásobní roztok 3.1 (tabulka 2) se hluboce zmrazí v poměrných dílech přibližně po 11 ml (nejméně při – 18 °C). Hluboce zmrazené části mají životnost pět let.

Pro přípravu zásobního roztoku 3 se zásobní roztok 3.1 rozmrazí, 10 ml z něho se odlije do odměrné baňky o objemu 1 l a dolije se velmi čistá voda až po značku 1 l.

Pro získání Andrewsova modifikovaného média se přibližně 2 500 ml velmi čisté vody nalije do odměrné baňky o objemu 5 l. Po přidání 50 ml každého zkušebního roztoku se odměrná baňka z 90 % naplní velmi čistou vodou a pH se upraví na 5,8.

▼M7

Poté se přidá 150 g rozpuštěné sacharózy (3 % na každých 5 l); poté se do odměrné baňky dolije velmi čistá voda až po značku 5 l. Nakonec se živným roztokem naplní Schottovy baňky o objemu 1 l a autoklávují se při 121 °C po dobu 20 minut.

Takto získaný živný roztok lze udržovat sterilní v chladničce (při 5 až 10 °C) po dobu tří měsíců.

Modifikované Andrewsovo médium pro zkoušku toxicity bez sedimentu

Z pěti zásobních živných roztoků již popsaných v tabulkách 1 a 2 se připraví desetinásobně koncentrované modifikované Andrewsovo médium, které je požadováno pro získání živných roztoků, přidáním 30 % sacharózy. Provede se to tak, že přibližně 100 ml velmi čisté vody se nalije do odměrné baňky o objemu 1 l. Po přidání 100 ml každého ze zásobních roztoků se pH nastaví na 5,8. Poté se přidá 30 % rozpuštěná sacharóza (300 g na 1 000 ml); poté se do odměrné baňky dolije velmi čistá voda až po značku 1 l.

Nakonec se živným roztokem naplní Schottovy baňky o objemu 0,5 l a autoklávují se při 121 °C po dobu 20 minut.

Takto získaný desetinásobně koncentrovaný modifikovaný živný roztok lze udržovat sterilní v chladničce (při 5 až 10 °C) po dobu tří měsíců.

▼M7

Dodatek 3

UCHOVÁVÁNÍ ZÁSOBNÍCH KULTUR

V tomto dodatku 3 se popisuje zásobní kultura *Myriophyllum spicatum* L ([1]), vodní dvouděložné rostliny rostoucí pod hladinou, která je druhem stolístku z čeledi *Haloragaceae*. Od června do srpna jeho nenápadné růžově bílé květy vyrůstají nad vodní hladinu. Rostliny jsou zakořeněny v zemi soustavou pevných oddenků a lze se s nimi setkat po celé severní polokouli v eutrofních, avšak neznečištěných stojatých vodách s větším obsahem vápníku a s bahnitým substrátem. *Myriophyllum spicatum* upřednostňuje sladkou vodu, ale vyskytuje se i v brakických vodách.

Pro zásobní kulturu bez sedimentu v laboratorních podmínkách jsou zapotřebí sterilní rostliny. Sterilní rostliny jsou dostupné z ekotoxikologické laboratoře německého Umweltbundesamt (Spolkový úřad pro životní prostředí, Německo).

Alternativně lze zkušební organismy připravit z nesterilních rostlin v souladu s normou ASTM E 1913-04. Následuje postup pro kultivaci *Myriophyllum sibiricum* odebraných v terénu – výtah ze standardních pokynů ASTM:

„Začínáte-li od nesterilních rostlin sbíraných v terénu, odeberte na podzim turiony *M. sibiricum*. Vložte turiony do akvária o objemu 20 l obsahujícího 5 cm sterilního sedimentu, který je pokryt křemenným pískem nebo například Turface®, a 18 l reagenční vody. Akvárium provzdušněte a udržujte při teplotě 15 °C a ozářenosti 200 až 300 μmol m^{-2} s^{-1} po dobu 16 hodin za den. Rostlinnou kulturu v akváriu lze udržovat jako zásobní zdroj rostlin v případě, že sterilní rostlinné kultury jsou zničeny mechanickým poškozením v růstové komoře, kontaminací nebo z jiného důvodu. Rostliny pěstované v akváriu nejsou sterilní a sterilní kultury není možné udržovat ve vsádkovém kultivačním systému. Za účelem sterilizace kultury se rostliny vyjmou z akvária a oplachují pod tekoucí deionizovanou vodou asi po dobu 0,5 h. V aseptických podmínkách v komoře s laminárním prouděním vzduchu se rostliny dezinfikují po dobu necelých 20 minut (dokud většina rostlinných tkání nevybledne a pouze rostoucí vrcholek je ještě zelený) v 3 % (m/V) roztoku chlornanu sodného obsahujícím 0,01 % vhodného smáčedla. Dezinfekční přípravek a rostlinný materiál se protřepou. Segmenty s několika kolínky se přenesou do sterilních kultivačních zkumavek obsahujících 45 ml sterilizovaného modifikovaného Andrewsova média a uzavřou se plochými uzávěry pro kultivační zkumavky. Do každé zkušební komory se vloží pouze jeden segment rostliny. K zajištění uzávěru kultivační nádoby se použije laboratorní těsnicí fólie. Po založení sterilní kultury by se segmenty rostlin obsahující několik kolínek vždy po deseti až dvanácti dnech měly přemístit do nových zkušebních komor s čerstvým kapalným živným médiem. Jak bylo prokázáno kultivací v miskách za použití agaru, rostliny musí být sterilní a zůstat sterilní po dobu osmi týdnů předtím, než lze zahájit zkoušení.“

Jelikož modifikované Andrewsovo médium obsahuje sacharózu (která stimuluje růst hub a bakterií), musí se veškerá manipulace s materiálem a roztoky a kultivace provádět za sterilních podmínek. Veškeré kapaliny a vybavení se před použitím sterilizují. Sterilizace se provádí horkým vzduchem (210 °C) po dobu 4 hodin nebo v autoklávu po dobu 20 minut při teplotě 121 °C. Všechny baňky, misky, mísy atd. a jiné vybavení navíc těsně před použitím projdou úpravou plamenem na sterilním laboratorním stole.

Zásobní kultury je možné uchovávat při sníženém osvětlení a teplotě (50 μE m^{-2} s^{-1}, 20 ± 2 °C) po delší dobu, bez potřeby je znovu zakládat.

([1]) Carl von Linné (* 23. května 1707 v Råshultu u Älmhultu; † 10. ledna 1778 v Uppsale).

▼M7

Růstové médium pro *Myriophyllum* může být stejné jako médium použité pro zkoušení, ale pro zásobní kultury je možné použít jiná média bohatá na živiny.

Segmenty rostlin se axenicky (jednodruhově) rozdělí do několika Erlenmeyerových baněk o objemu 500 ml a/nebo Fernbachových baněk o objemu 2 000 ml, do každé z nich se nalije přibližně 450, respektive 1 000 ml modifikovaného Andrewsova média. Baňky se poté axenicky uzavřou celulózovou zátkou.

Dále je zcela nezbytné důkladné ošetření náčiní plamenem na sterilním laboratorním stole těsně před použitím. V závislosti na počtu a velikosti se rostliny přibližně každé tři týdny mají přemístit do čerstvého živného roztoku.

Pro tuto obnovenou kulturu lze použít vrcholky, jakož i segmenty střední části stonků. Počet a velikost přenesených rostlin (nebo segmentů rostlin) závisí na tom, kolik rostlin je potřeba. Je například možné přemístit pět segmentů výhonku do jedné Fernbachovy baňky a tři segmenty výhonku do jedné Erlenmeyerovy baňky, každý o délce 5 cm. Veškeré zakořeněné, kvetoucí, mrtvé nebo jinak zjevně odlišné části se vyřadí.

Obrázek 1

Řezání rostlin pro zásobní kulturu a předkulturu po třech týdnech kultivace.



Kultivace rostlin se má provádět v Erlenmeyerových baňkách o objemu 500 ml a Fernbachových baňkách o objemu 2 000 l v chladicím inkubátoru při teplotě 20 ± 2 °C za nepřetržitého světla přibližně 100 až 150 µE m^{-2} s^{-1} nebo 6 000 až 9 000 luxů (vydávaného komorovým osvětlením barevné teploty „teplé bílé světlo“).

Obrázek 2

Kultivace rostlin v chladicím inkubátoru s komorovým osvětlením.



Je třeba používat chemicky čisté (umyté kyselinou) a sterilní skleněné kultivační nádoby a dodržovat aseptické podmínky manipulace. V případě kontaminace zásobní kultury, např. řasami, houbami nebo bakteriemi, je třeba připravit novou kulturu nebo by pro obnovení dané kultury měla být použita zásobní kultura z jiné laboratoře.

▼M7

Dodatek 4

UDRŽOVÁNÍ PŘEDKULTURY A PŘÍPRAVA ZKUŠEBNÍCH ORGANISMŮ PRO ZKOUŠENÍ

Pro získání předkultury se výhonky ze zásobní kultury nařežou na segmenty, každý s dvěma přesleny; segmenty se vloží do Fernbachových baněk naplněných modifikovaným Andrewsovým médiem (s 3 % sacharózy). Každá baňka může obsahovat až 50 segmentů výhonků. Je však třeba dbát na to, aby byly segmenty vitální a neměly žádné kořeny ani boční větve nebo jejich pupeny (viz obrázek 1 v dodatku 3).

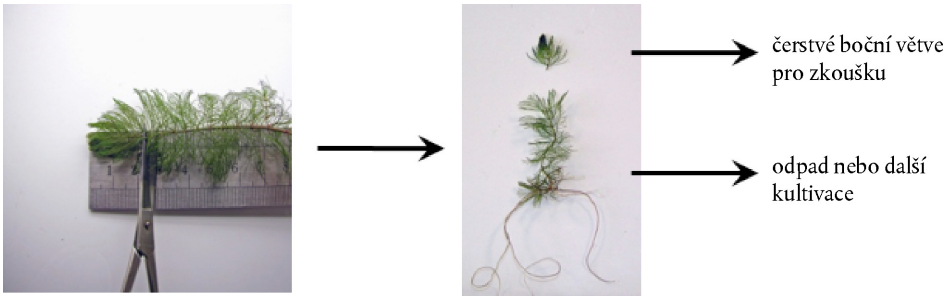
Organismy v předkultuře se kultivují po 14 až 21 dnů za sterilních podmínek v komoře za podmínek prostředí se střídáním fází 16 hodin světla / 8 hodin tmy. Intenzita světla se zvolí v rozmezí 100 až 150 µE m^{-2} s^{-1}. Teplota ve zkušebních nádobách by měla být 23 ± 2 °C.

Jelikož modifikované Andrewsovo médium obsahuje sacharózu (která stimuluje růst řas, hub a bakterií), musí se zkušební roztoky připravovat a kultivovat za sterilních podmínek. Veškeré kapaliny a vybavení se před použitím sterilizují. Sterilizace se provádí horkým vzduchem (210 °C) po dobu 4 hodin nebo v autoklávu po dobu 20 minut při teplotě 121 °C. Všechny baňky, misky, mísy atd. a jiné vybavení navíc těsně před použitím projdou úpravou plamenem na sterilním laboratorním stole.

Výhonky se axenicky odstraní z baněk předkuktury, přičemž se vybere materiál, který je co nejvíce homogenní. Pro každé zkoušení je zapotřebí nejméně 60 zkušebních organismů (zkoušení s osmi koncentracemi zkoušené chemické látky). Pro zkoušení se z předkultur odeberou čerstvé boční větve, zkrátí se na 2,5 cm od báze (měřeno pravítkem) a přenesou se do kádinky se sterilním modifikovaným Andrewsovým roztokem. Tyto čerstvé boční větve lze použít na zkoušku toxicity na *Myriophyllum spicatum* bez sedimentu.

Obrázek 2

Řezání rostlin z předkultury na zkoušku toxicity na *Myriophyllum spicatum* bez sedimentu.



▼M7

C.51. ZKOUŠKA TOXICITY NA *MYRIOPHYLLUM SPICATUM* V SYSTÉMU VODA-SEDIMENT

ÚVOD

1. Tato zkušební metoda je rovnocenná Pokynu OECD pro zkoušení (TG) č. 239 (2014). K dispozici jsou i zkušební metody pro ve vodě se vznášející jednoděložnou vodní rostlinu, druhy *Lemna* (1) a pro druhy řas (2). Tyto metody se běžně používají k získávání údajů pro zkoumání rizik pro necílové druhy vodních rostlin, která jsou spojena s používáním zkoušených chemických látek, zejména látek s herbicidním působením. V některých případech však mohou být požadovány údaje o dalších rostlinných druzích. V nedávno zveřejněných pokynech, které vzešly ze semináře Společností pro environmentální toxikologii a chemii (SETAC) o posuzování rizik pesticidů pro vodní rostliny (AMRAP), bylo navrženo, aby bylo možno požadovat údaje o zakořeněných vodních rostlinách vystavených chemickým látkám, přičemž o *Lemna* a řasách je známo, že nejsou na jejich mechanismus účinku citlivé, nebo pokud je předmětem zájmu rozdělení do sedimentu, jež vede k expozici prostřednictvím příjmu kořeny (3). Na základě dosavadních poznatků a zkušeností byly jako upřednostňovaný druh v případech, kdy jsou požadovány údaje o zakořeněných dvouděložných druzích rostoucích pod hladinou, vybrány druhy *Myriophyllum spp* (4) (5) (6). Tato zkouška nenahrazuje jiné zkoušky toxicity ve vodním prostředí; měla by je spíše doplňovat, aby bylo možné provést úplnější posouzení nebezpečí a rizik pro vodní rostliny. Zkušební metoda s *Myriophyllum spicatum* v systému voda-sediment doplňuje zkoušku toxicity na *Myriophyllum spicatum* bez sedimentu (7).

2. Tento dokument popisuje zkušební metodu, která umožňuje posouzení účinků zkoušené chemické látky na zakořeněné vodní rostliny druhu *Myriophyllum spicatum* pěstované v systému voda-sediment. Tato zkušební metoda je založena zčásti na již existujících metodách (1) (2) (8) a bere v úvahu nedávné výzkumy související s posuzováním rizik u vodních rostlin (3) Metoda systému voda-sediment byla validována mezinárodní mezilaboratorní porovnávací zkouškou prováděnou na druzích *Myriophyllum* pěstovaných ve statických podmínkách, jež byly exponovány zkoušené chemické látce prostřednictvím aplikací ve vodní koloně (9). Tento zkušební systém však lze snadno přizpůsobit tak, aby umožňoval expozici prostřednictvím obohaceného sedimentu nebo expozici prostřednictvím vodní fáze v semistatických scénářích nebo scénářích s pulzním dávkováním, třebaže pro tyto scénáře ještě nebyla provedena formální mezilaboratorní porovnávací zkouška. Obecnou metodu lze kromě toho použít i na jiné druhy vodních rostlin zakořeněných, rostoucích pod i nad vodní hladinou, včetně jiných druhů *Myriophyllum* (např. *Myriophyllum aquaticum*) a *Glyceria maxima* (10). Pro alternativní druhy může být nezbytná úprava zkušebních podmínek, uspořádání a doby trvání zkoušky. Více práce si vyžádá zejména definování vhodných postupů pro *Myriophyllum aquaticum*. Těmito možnostmi se tato zkušební metoda, která popisuje standardní přístup pro expozici *Myriophyllum spicatum* ve statickém systému prostřednictvím vodní fáze, podrobně nezabývá.

3. Tato zkušební metoda se používá na látky, pro které byla zkušební metoda validována (viz podrobnosti ve zprávě o mezilaboratorní porovnávací zkoušce (9)), nebo na přípravky či známé směsi. Zkoušku s *Myriophyllum* je možné provádět ke splnění požadavku na údaje stupně 1 vyvolaného potenciálním rozdělováním zkoušené chemické látky do sedimentu nebo otázkami souvisejícími s mechanismem účinku / selektivností. Stejně tak může být laboratorní zkouška na *Myriophyllum* požadována v rámci strategie vyššího stupně s cílem řešit obavy související s rizikem pro vodní rostliny. Konkrétní důvod pro provedení zkoušky pak určí způsob expozice (tj. prostřednictvím vody nebo sedimentu). Před použitím této zkušební metody na zkoušení směsi pro zamýšlené použití v právních předpisech by se mělo zvážit, zda tato metoda může pro tento účel poskytnout přiměřené výsledky, a pokud ano, proč tomu tak je. Takové úvahy nejsou nutné, pokud existuje právní požadavek na zkoušení dané směsi.

▼M7

PODSTATA ZKOUŠKY

4. Zkouška je určena k posouzení účinků souvisejících s chemickou látkou na vegetativní růst rostlin *Myriophyllum* rostoucích ve standardizovaných médiích (voda, sediment a živiny). Za tímto účelem se vrcholky výhonků zdravých, nekvetoucích rostlin zasadí do standardizovaného umělého sedimentu spolu s doplňkovými živinami s cílem zajistit přiměřený růst rostlin, a poté se udržují ve Smartově a Barkově médiu (dodatek 1). Po zaváděcí době, která má umožnit tvorbu kořenů, se rostliny vystaví řadě zkušebních koncentrací přidaných do vodní kolony. Alternativně lze expozici prostřednictvím sedimentu simulovat obohacením umělého sedimentu zkoušenou chemickou látkou a přesazením rostlin do tohoto obohaceného sedimentu. V obou případech se rostliny následně udržují po dobu 14 dnů za regulovaných podmínek okolního prostředí. Účinky na růst se stanoví na základě kvantitativního hodnocení délky výhonků, čerstvé hmotnosti a hmotnosti sušiny a na základě kvalitativních pozorování příznaků jako chloróza, nekróza nebo deformace růstu.

5. Pro kvantifikaci účinků souvisejících s chemickou látkou se růst ve zkušebních roztocích porovnává s růstem kontrolních rostlin a stanoví se koncentrace způsobující stanovenou x % inhibici růstu a vyjádří se jako EC_x; „x“ může být jakákoli hodnota v závislosti na právních požadavcích, např. EC_{10}, EC_{20} a EC_{50}. Je třeba poznamenat, že odhady hodnot EC_{10} a EC_{20} jsou spolehlivé a vhodné pouze ve zkouškách, kde variační koeficient u kontrolních rostlin klesne pod odhadovanou úroveň účinku, tj. pro spolehlivý odhad EC_{20} by variační koeficient měl být < 20 %.

6. Měla by být stanovována průměrná specifická růstová rychlost (odhadnutá na základě posouzení délky výhonků, čerstvé hmotnosti výhonků a hmotnosti sušiny výhonků) a výtěžek (odhadnutý na základě nárůstu délky výhonků, čerstvé hmotnosti výhonků a hmotnosti sušiny výhonků) u neexponovaných a exponovaných rostlin. Specifická růstová rychlost (r) se následně použije pro stanovení hodnot E_rC_x (např. E_rC_{10}, E_rC_{20}, E_rC_{50}) a výtěžek (y) se použije pro stanovení E_yC_x (např. E_yC_{10}, E_yC_{20}, E_yC_{50}).

7. Na základě odhadů průměrných specifických růstových rychlostí a výtěžků se může, je-li to požadováno, statisticky určit nejnižší koncentrace s pozorovaným účinkem (LOEC) a koncentrace bez pozorovaných účinků (NOEC).

INFORMACE O ZKOUŠENÉ CHEMICKÉ LÁTCE

8. Měla by být k dispozici analytická metoda s odpovídající citlivostí pro kvantifikaci chemických látek ve zkušebním médiu.

9. Užitečnými informacemi o zkoušené chemické látce pro účely stanovení zkušebních podmínek mohou být strukturní vzorec, chemické složení v případě vícesložkových látek, UVCB, směsí či přípravků, čistota, rozpustnost ve vodě, stabilita ve vodě a na světle, kyselá disociační konstanta (pK_a), rozdělovací koeficient oktanol/voda (K_{ow}), K_d pro sedimenty (je-li k dispozici), tlak par a biologická rozložitelnost. Rozpustnost ve vodě a tlak par lze použít pro výpočet Henryho konstanty, která určí pravděpodobnost významných ztrát zkoušené chemické látky během doby zkoušky. Jsou-li pravděpodobné ztráty zkoušené chemické látky, měly by být kvantifikovány a následná opatření by měla být kvůli kontrole takových ztrát zdokumentována. Jestliže nejsou informace o rozpustnosti a stabilitě zkoušené látky (látek) jisté, doporučuje se, aby byly tyto vlastnosti hodnoceny za podmínek zkoušky, tj. v růstovém médiu, při teplotě a režimu osvětlení, které mají být při zkoušce použity. *Poznámka*: Jestliže se zkoušejí peroxidující herbicidy závislé na světle, mělo by použité laboratorní osvětlení mít odpovídající zastoupení slunečního ultrafialového záření, které se vyskytuje v přírodním slunečním světle.

▼M7

10. Hodnota pH by se měla měřit a ve zkušebním roztoku podle potřeby upravovat. Zvláště důležitá je kontrola pH zkušebního média, např. zkoušejí-li se kovy nebo chemické látky, které jsou hydrolyticky nestálé. Další pokyny pro zkoušení chemických látek s fyzikálně-chemickými vlastnostmi, které činí jejich zkoušení obtížné, jsou uvedeny v pokynech OECD (11).

VALIDITA ZKOUŠKY

11. Aby byly výsledky platné, musí se střední celková délka výhonků a střední celková čerstvá hmotnost u kontrolních rostlin během expoziční fáze zkoušky přinejmenším zdvojnásobit. Kontrolní rostliny navíc nesmí vykazovat žádné viditelné příznaky chlorózy a měly by být očividně prosté kontaminace jinými organismy, například řasami a/nebo vrstvou bakterií na rostlinách, na povrchu sedimentu a ve zkušebním médiu.

12. Střední variační koeficient pro výtěžek založený na měřeních čerstvé hmotnosti výhonků (tj. od zahájení zkoušky do jejího ukončení) v kontrolních kulturách se mezi opakováními neliší o více než 35 %.

REFERENČNÍ CHEMICKÁ LÁTKA

13. Aby se ověřila funkčnost zkušebního postupu v průběhu času, měla by se referenční látka (látky), například 3,5-dichlorfenol použitý v mezilaboratorní porovnávací zkoušce (9), pravidelně zkoušet. Údaje z mezilaboratorní porovnávací zkoušky ukazují, že se střední hodnoty EC_{50} u 3,5 DCP pro různé proměnné odezvy pohybovaly mezi 4,7 a 6,1 mg/l (podrobnosti o předpokládaných intervalech spolehlivosti pro každou z těchto hodnot – viz zpráva o mezilaboratorní porovnávací zkoušce). Doporučuje se zkoušet referenční chemickou látku nejméně dvakrát ročně nebo – pokud se zkoušení provádí méně často – souběžně s hlavními zkouškami toxicity. Návod ohledně očekávaných hodnotu EC_{50} pro 3,5-DCP je uveden ve statistické zprávě o mezinárodní mezilaboratorní porovnávací zkoušce (9).

POPIS METODY

Zkušební zařízení

14. Zkouška by se měla provádět za řízených podmínek okolního prostředí, tj. v růstové komoře, růstové místnosti nebo laboratoři s regulovatelnou délkou dne, osvětlením a teplotou (vid oddíl Zkušební podmínky, odstavce 56–58). Zásobní kultury by měly být uchovávány odděleně od zkušebních nádob.

15. Studie by měla být prováděna s použitím skleněných zkušebních nádob, např. akvárií nebo kádinek; obvykle se používají kádinky o objemu 2 l (přibližně 24 cm vysoké a o průměru 11 cm). Vhodné však mohou být i jiné (tj. větší) nádoby, pokud hloubka vody je dostatečná, aby umožňovala neomezený růst a udržovala rostliny ponořené po celou dobu zkoušky.

16. Plastové nebo skleněné květináče (o průměru přibližně 9 cm, výšce 8 cm a objemu 500 ml) mohou být použity jako nádrže pro nasazení rostlin do sedimentu. Alternativně lze použít skleněné kádinky a v některých případech se jim dává přednost (např. při zkoušení hydrofobních chemických látek nebo chemických látek s vysokým K_{ow}).

17. Volbu velikosti květináče/kádinky je třeba zvážit stejně jako volbu zkušebních nádob a uspořádání zkoušky, které bude upřednostněno (viz níže). Použije-li se uspořádání zkoušky A (jeden výhonek na květináč a tři květináče na nádobu), mohou být zapotřebí menší květináče nebo větší nádoby. Použije-li se uspořádání zkoušky B (tři výhonky na květináč a jeden květináč na nádobu), měly by být přiměřené uvedené velikosti květináče a nádoby. V každém případě by minimální hloubka vody nad povrchem sedimentu měla být 12 cm a poměr plochy povrchu sedimentu k objemu a plochy povrchu vody k objemu by se měl zaznamenat.

▼M7

Zkušební organismy

18. Obecné přístupy popsané v této zkušební metodě mohou být použity na zkoušení různých druhů vodních rostlin. Podmínky nastíněné v této zkušební metodě však byly uzpůsobeny pro zkoušení druhu stolístků *Myriophyllum spicatum*. Tento druh patří do čeledi dvouděložných rostlin, *Haloragaceae*.

19. *Myriophyllum spicatum* (stolístek klasnatý) je zakořeněný druh rostoucí pod hladinou, který snáší nejrůznější podmínky a vyskytuje se jak ve stojatých, tak v tekoucích vodách. *M. spicatum* je víceletá rostlina, která přes zimu hyne až ke kořenům. Rostliny obvykle kvetou a volně se vysemeňují, nicméně hlavním způsobem kolonizace často bývá vegetativní množení z axilárních (úžlabních) pupenů nebo z fragmentů kořenů, které se oddělují přirozenou cestou nebo po narušení.

Kultivace zkušebního organismu

20. Rostliny lze získat z přírodních populací nebo od dodavatelů vodních rostlin. V obou případech by zdroj rostlin měl být zdokumentován a měla by být ověřena identita druhu. Při sběru *Myriophyllum spicatum* v terénu je třeba věnovat velkou pozornost tomu, aby byl získán správný druh, zejména v oblastech, kde se může zkřížit s jinými druhy *Myriophyllum*. V případě pochybností se doporučuje použít laboratorní kultury ze známých zdrojů. Rostliny, které byly vystaveny jakýmkoliv chemickým kontaminantům nebo byly odebrány z míst, o nichž je známo, že jsou kontaminované, by se v této zkoušce používat neměly.

21. V oblastech, kde *M. spicatum* není v zimních měsících snadno dostupný, může být nezbytné dlouhodobé udržování zásobních kultur ve skleníkových nebo laboratorních podmínkách. Zásobní kultury by měly být udržovány za podmínek podobných zkušebním podmínkám, ačkoli ozářenost a teplota mohou být sníženy s cílem snížit četnost udržování kultury (např. pokud se na určité období neplánují žádné zkoušky s *Myriophyllum)*. Doporučuje se použít větší akvária a květináče, než jaké by byly použity ve zkouškách, aby se vytvořil prostor pro proliferaci. Složení sedimentu a vodních médií by mělo být stejné jako to, které by bylo použito pro zkoušky, ačkoli lze uplatnit alternativní metody fertilizace sedimentu (např. použití komerčních fertilizačních přípravků s pomalým uvolňováním).

22. Zásobní rostliny by měly být očividně prosté kontaminace jakýmikoli jinými organismy včetně hlemýžďů, vláknitých řas, hub a hmyzu, např. vajíček nebo larev mola *Paraponyx stratiotata* a larev nebo dospělců nosatce *Eubrychius velutus*. Aby se zamezilo viditelné kontaminaci, může být nezbytné propláchnutí rostlinného materiálu v sladké vodě. Kromě toho by se mělo dbát na minimalizaci rozvoje jednobuněčných řas a bakteriální kontaminace, i když úplná sterilita rostlinného materiálu není nezbytná. Zásobní kultury by se měly sledovat a v případě potřeby přesadit, aby nedošlo k rozvoji kontaminace řasami a bakteriemi. Prospěšné může být provzdušňování zásobních kultur, pokud by vznikl problém kontaminace řasami nebo bakteriemi.

23. Ve všech případech se rostliny po přiměřenou dobu (např. > 2 týdny) před použitím ve zkoušce kultivují/aklimatizují za podmínek podobných podmínkám, které se použijí ve zkoušce, ale nemusí být nutně s nimi totožné.

24. Kvetoucí zásobní kultury by se ve zkoušce používat neměly, protože v době kvetení a po odkvětu rychlost vegetativního růstu obvykle klesá.

▼M7

Sedimenty

25. Pro použití v této zkoušce se doporučuje následující, přísadami doplněný sediment založený na umělém sedimentu užitém v kapitole C.28 této přílohy (8). Tento sediment se připraví tak, jak je popsáno ve zkušební metodě C.28, kromě přidání živin, jak je popsáno níže:

a) 4–5 % rašeliny (sušiny, podle 2 ± 0,5 % organického uhlíku) s pH co nejblíže 5,5 až 6,0; je důležité, aby byla ve formě prášku, jemně namletá (pokud možno velikost částic < 1 mm) a sušená výhradně na vzduchu;

b) 20 % (sušiny) kaolinitického jílu (pokud možno s více než 30 % kaolinitu);

c) 75–76 % (sušiny) křemenného písku (měl by převažovat jemný písek s více než 50 % částic velikosti 50 až 200 μm);

d) přidá se tekuté/vodné živné médium, tak aby konečná vsázka sedimentu obsahovala 200 mg chloridu amonného a 200 mg fosforečnanu sodného na kg suchého sedimentu a vlhkost konečné směsi byla v rozmezí 30 až 50 %;

e) přidá se chemicky čistý uhličitan vápenatý ($CaCO_3$) pro úpravu pH konečné směsi sedimentu na pH 7,0 ± 0,5.

26. Rašelina, kaolinitický jíl a písek by měly pocházet ze známého zdroje a zdroj by měl být zdokumentován. Je-li původ neznámý nebo vzbuzuje určité pochybnosti, měly by být jednotlivé složky kontrolovány z hlediska nepřítomnosti chemické kontaminace (např. těžké kovy, chlorované organické sloučeniny, organofosforové sloučeniny).

27. Suché složky sedimentu by se měly nejprve homogenně promísit a teprve potom se do sedimentu důkladně vmíchá vodný živný roztok. Vlhký sediment by se měl připravit nejméně dva dny před použitím, aby se umožnilo důkladné prosáknutí rašeliny a zamezilo se vyplavení hydrofobních částic rašeliny na povrch, když je sediment překryt médiem; vlhký sediment může být před použitím skladován v temnu.

28. Pro provedení zkoušky se sediment přemístí do nádoby o vhodné velikosti, např.do květináče o průměru, který se vejde do skleněné nádoby (plocha povrchu sedimentu by měla pokrývat přibližně 70 % plochy povrchu nádoby nebo i více). V případech, kdy má nádoba na dně otvory, kus filtračního papíru na dně nádoby pomůže udržet sediment v nádobě. Květináče se naplní sedimentem tak, že povrch sedimentu je zarovnaný s okrajem, pak se pokryje tenkou vrstvou (~ 2 až 3 mm) inertního materiálu, např. písku, jemného zahradnického štěrku (nebo rozdrceného korálu), aby se sediment udržel na místě.

Zkušební médium

29. Pro kultivaci a zkoušení *Myriophyllum spicatum* se doporučuje Smartovo a Barkovo médium (12). Příprava tohoto média je popsána v dodatku 1. Pro optimální růst rostlin by pH médií (vodní fáze) na počátku zkoušky mělo být mezi 7,5 a 8,0.

Uspořádání experimentu

30. Zkouška by měla zahrnovat nejméně 6 replik zkušebních nádob pro neexponovanou kontrolní skupinu a nejméně 4 repliky zkušebních nádob pro každou z nejméně pěti úrovní koncentrací.

31. Jestliže stanovení NOEC není požadováno, uspořádání zkoušky lze pozměnit tak, že se zvýší počet koncentrací a sníží počet replik pro příslušnou koncentraci.

▼M7

32. Každá zkušební nádoba představuje repliku (opakování) obsahující tři výhonky. Existují dvě možnosti pěstování tří výhonků v každé zkušební nádobě:

— uspořádání zkoušky A: jeden výhonek na květináč a tři květináče na nádobu,

— uspořádání zkoušky A: tři výhonky na květináč a jeden květináč na nádobu,

— alternativní uspořádání zkoušky s jedním výhonkem na květináč na zkušební nádobu jsou přípustná, pokud je replika upravena tak, jak je požadováno pro dosažení požadovaných kritérií platnosti.

33. Jednotlivé zkušební nádoby by měly být náhodně přiděleny do exponovaných skupin. K minimalizaci vlivu prostorových rozdílů v intenzitě světla nebo v teplotě je potřeba zkušební nádoby ve zkušebním prostoru náhodně uspořádat.

Koncentrace zkoušené chemické látky a kontrolní skupiny

34. Koncentrace by zpravidla měly představovat geometrickou řadu; faktor mezi zkušebními koncentracemi by neměl překročit 3,2. Předběžná znalost toxicity zkoušené chemické látky ze zkoušky pro stanovení rozsahu pomůže při volbě vhodných zkušebních koncentrací.

35. Pro stanovení EC_x by se zkušební koncentrace měly pohybovat pod a nad hodnotou EC_x, aby se zajistila patřičná úroveň spolehlivosti. Například pokud se odhaduje EC_{50}, nejvyšší zkušební koncentrace by měla být vyšší než hodnota EC_{50}. Jestliže hodnota EC_{50} leží mimo rozmezí zkušebních koncentrací, související intervaly spolehlivosti budou velké, a proto správné hodnocení statistické vhodnosti modelu nemusí být možné. Použití více zkušebních koncentrací pomůže zlepšit interval spolehlivosti výsledné hodnoty EC_x.

36. Pro stanovení LOEC/NOEC (volitelný ukazatel) by nejnižší zkušební koncentrace měla být dostatečně nízká, aby růst nebyl výrazně vyšší než růst kontrolních rostlin. Dále by nejvyšší zkušební koncentrace měla být dostatečně vysoká, aby byl růst výrazně nižší než růst v kontrolní skupině. Použití více replik zvýší statistickou významnost uspořádání koncentrace bez účinků / uspořádání ANOVA.

Limitní zkouška

37. V případech, kdy zkouška pro stanovení rozsahu naznačuje, že zkoušená chemická látka nemá žádné nepříznivé účinky při koncentracích až do 100 mg/l nebo až do meze své rozpustnosti ve zkušebním médiu nebo v případě přípravků až do meze jejich dispergovatelnosti, může se provést limitní zkouška k usnadnění porovnání odezvy v kontrolní skupině a odezvy v jedné exponované skupině – 100 mg/l nebo koncentrace rovná mezi rozpustnosti nebo 1 000 mg/kg suchého sedimentu. Tato zkouška by se měla řídit obecnými zásadami standardní zkoušky závislosti odezvy na dávce s tou výjimkou, že se doporučuje zvýšit minimální počet replik na šest zkušebních nádob na kontrolní skupinu a koncentraci. Růst v kontrolní a exponované skupině může být analyzován pomocí statistické zkoušky pro porovnání středních hodnot, např. Studentova t-testu.

Zkušební roztoky

38. Zkušební roztoky se obvykle připravují ředěním zásobního roztoku, připraveného rozpuštěním nebo dispergací zkoušené chemické látky do Smartova a Barkova média pomocí demineralizované (tj. destilované nebo deionizované) vody (viz dodatek 1).

▼M7

39. Nejvyšší zkušební koncentrace by obvykle neměla překročit rozpustnost látky ve vodě nebo v případě přípravků dispergovatelnosti za zkušebních podmínek.

40. Pro zkoušené chemické látky s nízkou rozpustností ve vodě může být nezbytné připravit koncentrovaný zásobní roztok nebo disperzi látky pomocí organického rozpouštědla nebo dispergátoru, aby se usnadnilo přidávání přesných množství zkoušené chemické látky do zkušebního média, a napomohlo se tak její dispergaci a rozpuštění. Měla by být vynaložena maximální snaha taková rozpouštědla nebo dispergátory nepoužívat. Používání pomocných rozpouštědel nebo dispergátorů by nemělo způsobovat žádnou fytotoxicitu. Příkladem běžně používaných rozpouštědel, která nezpůsobují fytotoxicitu při koncentracích až do 100 µl/l, jsou aceton a dimethylformamid. Použije-li se rozpouštědlo nebo dispergátor, jeho konečná koncentrace by se měla uvést v závěrečné zprávě a udržovat na minimální hodnotě (≤100 µl/l). Za těchto okolností by všechny expozice a kontroly (s rozpouštědlem) měly obsahovat stejnou koncentraci rozpouštědla nebo dispergátoru. Do uspořádání zkoušky se zařadí také neexponované kontrolní repliky, které rozpouštědlo nebo dispergátor neobsahují. Další pokyny k používání dispergátorů jsou uvedeny v pokynu OECD (11).

POSTUP ZKOUŠKY

41. Postup zkoušky se liší podle způsobu aplikace zkoušené chemické látky (tj. prostřednictvím vodní nebo sedimentové fáze). Mělo by se posoudit pravděpodobné chování zkoušené chemické látky v systému voda-sediment a na základě těchto informací zvolit režim expozice, který se použije ve zkoušce (tj. statický nebo semistatický obnovovací, obohacená voda nebo obohacený sediment). Zkouškám s obohaceným sedimentem může být v některých případech dána přednost, a to u chemických látek, u nichž existuje předpověď významného rozdělení do sedimentu.

Zaváděcí fáze

42. Zdravé vrcholky/špičky výhonků, t.j. bez bočních výhonků, se odříznou z rostlin v kultuře tak, aby se získaly výhonky o délce 6 cm (± 1 cm). Při uspořádání zkoušky A (jeden výhonek na květináč a tři květináče na nádobu) se do každého květináče zasadí jedna špička výhonku. Při uspořádání zkoušky B (tři výhonky na květináč a jeden květináč na nádobu) se do každého květináče se sedimentem zasadí čtyři až pět vrcholků výhonku.

43. V obou případech by měly být osazeny nějaké květináče navíc, což umožní při zahájení zkoušky výběr jednotných rostlin a poskytne náhradní rostliny, které se použijí pro kontrolu růstu kořenů bezprostředně před expozicí, a také rostliny, které je možné sklidit za účelem měření biomasy výhonků a délky výhonků v den 0.

44. Výhonky se zasadí tak, aby přibližně tři cm, což jsou minimálně dvě kolínka, měly pod povrchem sedimentu.

45. Květináče se poté přemístí do zkušebních nádob za stejných podmínek okolního prostředí jako ve fázi expozice a udržují se sedm dnů ve Smartově a Barkově médiu, aby se indukoval vývoj kořenů.

46. Po uplynutí této doby by několik rostlin v náhradních květináčích mělo být vyjmuto za účelem prohlídky růstu kořenů. Není-li růst kořenů viditelný (tj. nejsou vidět špičky kořenů), měla by být zaváděcí fáze prodloužena do doby, než bude růst kořenů viditelný. Tento krok se doporučuje proto, aby se zajistil aktivní růst rostlin v době zahájení zkoušky.

▼M7

Výběr jednotného rostlinného materiálu

47. Při uspořádání zkoušky A (jeden výhonek na květináč a tři květináče na nádobu) se před zahájením zkoušky vyberou květináče z hlediska jednotnosti. Při uspořádání zkoušky B (tři výhonky na květináč a jeden květináč na nádobu) se odstraní náhradní rostliny, takže zůstanou tři rostliny, které jsou co do velikosti a vzhledu jednotné.

Expozice prostřednictvím vodní fáze

48. Květináče vybrané z hlediska jednotnosti se vloží do zkušebních nádob, jak vyžaduje uspořádání experimentu. Do zkušebních nádob se poté přidá Smartovo a Barkovo médium. Je třeba dbát na to, aby nedošlo k narušení sedimentu. Média by se proto měla přidávat pomocí nálevky nebo plastového disku, kterým se sediment přikryje po dobu, kdy se médium nalévá do zkušebních nádob, za předpokladu, že se bezprostředně poté disk vyjme. Alternativně lze květináče s rostlinami vložit do zkušebních nádob po přidání média. V obou případech lze na počátku fáze expozice použít čerstvá média, je-li to nezbytné pro minimalizaci potenciální tvorby řas a bakterií, nebo aby se umožnila příprava jedné dávky zkušebního roztoku pro všechna opakování.

49. Změří se délka výhonků nad sedimentem buď před přidáním média, nebo po jeho přidání.

50. Příslušná množství zkoušené chemické látky lze přidat do zkušebního média předtím, než je médium přidáno do zkušebních nádob. Alternativně je možné zkoušenou chemickou látku zavést do média poté, co bylo přidáno do zkušebních nádob. V takovém případě je třeba dbát na to, aby zkoušená chemická látka byla homogenně rozložena v celém zkušebním systému, aniž dojde k narušení sedimentu.

51. Ve všech případech se na počátku zkoušky zaznamená vzhled média (čiré, zakalené atd.)

Expozice prostřednictvím sedimentu

52. Obohacené sedimenty zvolené koncentrace se připraví přidáním roztoku zkoušené chemické látky přímo do čerstvého sedimentu. Zásobní roztok zkoušené chemické látky rozpuštěné v deionizované vodě se smísí s připraveným sedimentem pomocí kroužívé míchačky, míchačky krmiv nebo ručním smícháním. Je-li zkoušená chemická látka špatně rozpustná ve vodě, může být rozpuštěna v co nejmenším objemu vhodného organického rozpouštědla (např. hexanu, acetonu nebo chloroformu). Tento roztok se pak smísí s cca 10 g jemného křemenného písku na jednu zkušební nádobu. Rozpouštědlo se nechá vypařit a písek se poté smísí s vhodným množstvím sedimentu na zkušební nádobu. K rozpuštění, dispergaci nebo emulgaci zkoušené chemické látky mohou být použita pouze činidla, která snadno vytěkají. Je třeba mít na paměti, že při konečné přípravě sedimentu musí být brán v potaz objem/hmotnost písku obohaceného zkoušenou chemickou látkou (tzn. při přípravě sedimentu by se tedy mělo použít menší množství písku). Je třeba dbát na to, aby zkoušená chemická látka přidaná do sedimentu byla v sedimentu důkladně a rovnoměrně rozložena.

53. Obohacený sediment se umístí do květináčů (jak je popsáno výše). Rostliny vybrané z hlediska jednotnosti a přiměřeného kořenového systému se vyjmou z květináčů použitých během zaváděcí fáze a přemístí se do obohaceného sedimentu, jak je popsáno výše.

54. Květináče se vloží do zkušebních nádob, jak vyžaduje uspořádání experimentu. Poté se opatrně (tj. pomocí nálevky) přidá Smartovo a Barkovo médium, tak aby nedošlo k narušení sedimentu. Změří se délka výhonků nad sedimentem, a to buď před přidáním média, nebo po jeho přidání.

▼M7

Udržování úrovně vody po dobu trvání zkoušky

55. Musí se zapsat konečný objem vody a označit úroveň vody na každé zkušební nádobě. Jestliže se v průběhu zkoušky vypaří více než 10 % vody, je třeba úroveň vody upravit přidáním destilované vody. Je-li to nezbytné, lze kádinky volně přikrýt průhledným krytem, např. průhlednými plastovými víčky, aby se minimalizovalo vypařování a kontaminace spórami řas.

Zkušební podmínky

56. Pomocí teplého nebo chladného bílého fluorescenčního osvětlení je třeba zajistit ozářenost zvolenou v rozmezí cca 140 (± 20) $\mu E \cdot m^{-2} s^{-1}$, přičemž se tato ozářenost měří v pásmu fotosynteticky aktivního záření (400–700 nm) na vodní hladině a pomocí cyklu světlo:tma v poměru 16:8 h. Odchylky od zvoleného ozáření světlem nad zkušební plochou by neměly být větší než ± 15 %.

57. Teplota ve zkušebních nádobách je 20 ± 2 °C.

58. Hodnota pH kontrolního média by neměla během zkoušky vzrůst o více než 1,5. Ovšem odchylka o více než 1,5 nebude znamenat neplatnost zkoušky, pokud je možné prokázat, že byla splněna dříve stanovená kritéria validity.

Doba trvání zkoušky

59. Zkouška trvá 14 dní.

Měření a analytická stanovení

60. Po zaváděcí fázi a bezprostředně před expozicí (tj. v den 0) se sklidí náhradní rostliny z pěti náhodně vybraných květináčů při uspořádání s třemi rostlinami na květináč nebo 15 květináčů při uspořádání s jednou rostlinou na květináč za účelem vyhodnocení délky výhonků a čerstvé hmotnosti a hmotnosti sušiny, jak je uvedeno dále.

61. U rostlin převedených do expoziční fáze se provedou následující hodnocení, jak je uvedeno v tabulce 1:

— hodnocení délky hlavního výhonku, počet bočních výhonků a délka bočních výhonků se zaznamenají přinejmenším na konci expoziční doby (tj. v den 14),

— vizuální hodnocení zdraví rostlin se zaznamenají nejméně třikrát během expoziční doby (tj. v den 0, 7 a 14),

— hodnocení čerstvé hmotnosti a hmotnosti sušiny výhonků se provede při ukončení zkoušky (tj. v den 14).

62. Délka výhonků se stanoví pomocí pravítka. Jsou-li přítomny boční výhonky, měl by se určit také jejich počet a délka.

63. Vizuální hodnocení zdraví rostlin se provádí zaznamenáním vzhledu rostlin a celkového stavu zkušebního média. Mezi pozorování, které je třeba uvést, patří:

— nekróza, chloróza nebo jiná ztráta zbarvení, např. nadměrné zčervenání vzhledem ke kontrolním rostlinám,

— rozvoj kontaminace bakteriemi nebo řasami,

— růstové abnormality, např. zaostávání růstu, změněná vzdálenost mezi kolínky, poškozené výhonky/listy, proliferace bočních výhonků, ztráta listů, ztráta vzplývavosti a fragmentace kořenů.

▼M7

— Vizuální hodnocení zdraví kořenů se provádí při ukončení zkoušky pečlivým vymytím sedimentu z kořenů, aby bylo možno provést pozorování kořenového systému. Níže je uvedena navržená hodnotící škála ve vztahu ke kontrolním rostlinám:

1) kořeny chybí;

2) málo kořenů;

3) mírný vývoj kořenů;

4) velmi dobrý vývoj kořenů, podobný jako v kontrole.

64. Hodnocení čerstvé hmotnosti se provádí na začátku a na konci zkoušky odříznutím výhonku na úrovni sedimentu a odsátím do sucha před zvážením. Je třeba dbát na to, aby se odstranily částice sedimentu, které mohou přilnout k bázi výhonku. Materiál výhonků se poté vloží do vysoušecí pece při cca 60 °C a vysuší na konstantní hmotnost, předtím než se znovu zváží a zaznamená se hmotnost sušiny.

65. Shrnutí minimálních biologických hodnocení požadovaných po dobu trvání zkoušky je podáno v tabulce 1.

Tabulka 1

Harmonogram hodnocení

Den po expozici (DAT)	*Myriophyllum spicatum*			
	Délka výhonků, délka a počet bočních výhonků	Vizuální posouzení výhonků	Hmotnost čerstvých a suchých výhonků, vizuální posouzení kořenů	pH O_2
0	A	A	A	A
4	—	—	—	—
7	—	A	—	A
14	A	A	A	A

A: znamená, že v těchto termínech je třeba provést hodnocení,
—: znamená, že měření není požadováno.

Četnost měření a analytická stanovení

66. Teplota média v náhradní nádobě držené za stejných podmínek v růstové komoře, inkubátoru nebo místnosti by se měla zaznamenávat nejméně jednou denně (nebo nepřetržitě se zařízením k záznamu dat).

67. pH zkušebního média a jeho koncentrace rozpuštěného kyslíku se kontrolují ve všech opakovacích nádobách při zahájení zkoušky, alespoň jednou během studie a na konci studie. Všechna měření by se měla provádět ve stejnou denní dobu. Použijí-li se pro přípravu všech opakování při každé zkušební koncentraci zásobní roztoky, je přijatelné jediné měření každého zásobního roztoku v den 0.

68. Ozářenost se měří v růstové komoře, inkubátoru nebo místnosti v bodech stejně vzdálených od vodní hladiny. Měření je třeba provádět nejméně jednou na začátku nebo během zkoušky. Naměřenou hodnotu bude ovlivňovat metoda detekce světla a měření, zejména typ čidla. Kulová čidla (která reagují na světlo přicházející ze všech úhlů nad i pod rovinou měření)

▼M7

a „kosinová“ čidla (která reagují na světlo přicházející ze všech úhlů nad rovinou měření) jsou vhodnější než jednosměrná čidla, neboť poskytují vyšší naměřené hodnoty pro vícebodový světelný zdroj zde popsaného typu.

Analytická měření zkoušené chemické látky

69. Správnou aplikaci zkoušené chemické látky by měla podpořit analytická měření koncentrací zkoušené chemické látky.

70. Vzorky vody pro analýzu zkoušené chemické látky by se pro všechny zkušební koncentrace měly odebrat krátce po zahájení zkoušky (tj. v den aplikace pro stálé chemické látky nebo hodinu po aplikaci pro chemické látky, které stálé nejsou) a při ukončení zkoušky.

71. Koncentrace v sedimentu a v kapilární vodě sedimentu se stanoví při zahájení zkoušky a při jejím ukončení alespoň u nejvyšší zkušební koncentrace, pokud není známo, že zkoušené chemické látky jsou ve vodě stálé (> 80 % nominální hodnoty). Měření v sedimentu a v kapilární vodě nemusí být nutná, pokud distribuce zkoušené chemické látky mezi vodou a sedimentem byla jasně stanovena studií voda/sediment za srovnatelných podmínek (např. poměr sedimentu k vodě, metoda aplikace, typ sedimentu).

72. Odběr vzorků při zahájení zkoušky by pravděpodobně poškodil zkušební systém. Proto mohou být zapotřebí další exponované zkušební nádoby, což usnadní analytická stanovení na začátku a na konci zkoušky. Podobně i v případech, kdy jsou nezbytná hodnocení v průběhu zkoušky, tj. v den 7, a pro analýzu jsou potřebné velké vzorky sedimentu, které nelze snadno vyjmout ze zkušebního systému, měla by se analytická stanovení provádět za použití dalších zkušebních nádob exponovaných stejně jako nádoby používané pro biologická hodnocení.

73. Doporučeným postupem izolace intersticiální vody je odstřeďování např. při odstředivé síle 10 000 g a teplotě 4 °C po dobu 30 minut. Pokud však filtry zkoušenou chemickou látku prokazatelně neadsorbují, je přijatelná i filtrace. V některých případech nemusí být možné provést analýzu koncentrací v kapilární vodě, pokud je vzorek příliš malý.

74. Při semistatických zkouškách (např. expozice prostřednictvím vodní fáze), u nichž se neočekává, že koncentrace příslušné chemické látky (látek) zůstane v rozmezí 20 % nominální koncentrace po celou dobu trvání zkoušky bez obnovení zkušebních roztoků, je třeba pro účely analýz koncentrací zkoušené chemické látky odebrat vzorky použitých a čerstvě připravených zkušebních roztoků při každém obnovení.

75. V případech, kdy není naměřená počáteční koncentrace zkoušené chemické látky v rozmezí ± 20 % nominální hodnoty, avšak kdy lze dostatečně prokázat, že počáteční koncentrace jsou reprodukovatelné a stálé (tj. od 80 do 120 % počáteční koncentrace), mohou být chemická stanovení provedena pouze na nejvyšších a nejnižších zkušebních koncentracích.

76. Ve všech případech se určení koncentrací zkoušené chemické látky provádí pouze u jedné z opakovaných kultur při každé zkušební koncentraci. Alternativně lze pro účely analýzy zkušební roztoky ze všech opakování při každé koncentraci sloučit.

77. Lze-li prokázat, že byla po celou dobu zkoušky koncentrace zkoušené chemické látky udržována v rozmezí 20 % nominální nebo naměřené počáteční koncentrace, může být analýza výsledků a následné odvození sledovaných ukazatelů založena na nominálních nebo naměřených počátečních hodnotách.

▼M7

78. V těchto případech by účinné koncentrace měly být založeny na nominálních nebo naměřených koncentracích ve vodě na začátku zkoušky.

79. Pokud však lze prokázat, že koncentrace po celou dobu zkoušky klesala (tj. není udržována v rozmezí ± 20 % nominální nebo naměřené počáteční koncentrace v exponovaném prostředí), měla by být analýza výsledků založena na geometrické střední koncentraci během expozice nebo na modelech popisujících pokles koncentrace zkoušené chemické látky v exponovaném prostředí (11).

VYHODNOCENÍ ÚDAJŮ

80. V případech, kdy je nutné použití rozpouštědla/dispergátoru, lze údaje z kontrol s rozpouštědlem a neexponovaných kontrol pro účely statistické analýzy sloučit, pokud odezvy kontrol s rozpouštědlem a neexponovaných kontrol nejsou statisticky významně rozdílné.

Proměnné odezvy

81. Účelem této zkoušky je stanovit účinky zkoušené chemické látky na vegetativní růst zkušebního druhu pomocí dvou proměnných odezvy, průměrné specifické růstové rychlosti a výtěžku, a to následujícím způsobem:

Průměrná specifická růstová rychlost

82. Tato proměnná odezvy je založena na změnách logaritmů celkové délky výhonků, celkové čerstvé hmotnosti výhonků a celkové hmotnosti sušiny výhonků v průběhu času v kontrolách a v každé exponované skupině. Tato proměnná se vypočítá pro každé opakování každé kontrolní a exponované skupiny. Střední délka a hmotnost tří rostlin na zkušební nádobu (opakování) a následně růstová rychlost pro každé opakování se vypočítá pomocí následujícího vzorce:

$$\mu_{i-j} = \frac{\ln(N_j) - \ln(N_i)}{t}$$

kde:

μ_{i-j}: průměrná specifická růstová rychlost od času i do času j,

N_i: proměnná měření ve zkušební nebo kontrolní nádobě v čase i,

N_j: proměnná měření ve zkušební nebo kontrolní nádobě v čase j,

t: časový interval od času i do času j.

83. Z odezev opakování by se měla vypočítat střední hodnota růstové rychlosti a odhady rozptylu pro každou exponovanou a kontrolní skupinu.

84. Průměrná specifická růstová rychlost by se měla vypočítat pro celou dobu trvání zkoušky (čas „i“ ve shora uvedeném vzorci je počátek zkoušky a čas „j“ je okamžik ukončení zkoušky). Pro každou zkušební koncentraci a kontrolu se vypočítá střední hodnota průměrné specifické růstové rychlosti a odhady rozptylu.

▼M7

85. Procentuální inhibici růstové rychlosti (I_r) lze potom vypočítat pro každou zkušební koncentraci (exponovanou skupinu) podle následujícího vzorce:

$$\%I_r = \frac{(\mu_C - \mu_T)}{\mu_C} \times 100$$

kde:

% I_r: procentuální inhibice průměrné specifické růstové rychlosti,

μ_C: střední hodnota μ v kontrolní skupině,

μ_T: střední hodnota μ v exponované skupině.

Výtěžek

86. Tato proměnná odezvy je založena na změnách celkové délky výhonků, celkové čerstvé hmotnosti výhonků a celkové hmotnosti sušiny výhonků v průběhu času v kontrolách a v každé exponované skupině. Střední hodnotu procentuální inhibice výtěžku (% I_y) lze vypočítat pro každou exponovanou skupinu následovně:

$$\%I_y = \frac{(b_C - b_T)}{b_C}$$

kde:

% I_y: procentuální snížení výtěžku,

b_C: konečná biomasa minus počáteční biomasa pro kontrolní skupinu,

b_T: konečná biomasa minus počáteční biomasa pro exponovanou skupinu.

Vynášení křivek závislosti koncentrace-odezva

87. Je třeba vynést křivky závislosti koncentrace-odezva, které vyjadřují vztah střední procentuální inhibice proměnné odezvy (I_r, nebo I_y), vypočítané postupem uvedeným výše, a logaritmu koncentrace zkoušené chemické látky.

Odhad EC_x

88. Odhady EC_x (např. EC_{50}) by měly být založeny jak na průměrné specifické růstové rychlosti (E_rC_x), tak na výtěžku (E_yC_x), přičemž obě tyto hodnoty by zase měly vycházet z celkové čerstvé hmotnosti výhonků, celkové hmotnosti sušiny výhonků a celkové délky výhonků.

89. Je třeba uvést, že hodnoty EC_x vypočítané pomocí těchto dvou proměnných odezvy nejsou srovnatelné a při používání výsledků zkoušky se musí vzít tento rozdíl na vědomí. Hodnoty EC_x založené na průměrné specifické růstové rychlosti (E_rC_x) budou ve většině případů vyšší než výsledky založené na výtěžku (E_yC_x) – pokud se dodrží zkušební podmínky této zkušební metody –, a to kvůli matematickému základu příslušných přístupů. Tento rozdíl by neměl být vykládán jako rozdíl v citlivosti mezi těmito dvěma proměnnými odezvy; hodnoty jsou jednoduše matematicky odlišné.

Statistické postupy

90. Cílem je získat kvantitativní vztah mezi koncentrací a odezvou pomocí regresní analýzy. Je možné použít váženou lineární regresi po provedení linearizující transformace dat odezvy – například do probitových nebo logitových či Weibullových jednotek (13), ale dává se přednost nelineárním regresním postupům, s jejichž pomocí se lépe zpracovávají nevyhnutelné nepravidelnosti dat a odchylky od hladkých distribucí. Při přiblížení se

▼M7

k nule či úplné inhibici mohou být takové nepravidelnosti zesíleny transformací a rušit při analýze (13). Je zapotřebí uvést, že standardní metody analýzy používající probitové, logitové nebo Weibullovy transformace jsou určeny k použití s binárními daty (např. mortalita nebo přežití) a měly by se upravit, aby mohly být použity s daty růstové rychlosti nebo výtěžku. Speciální postupy pro stanovení hodnoty EC_x ze spojitých dat lze nalézt v literatuře (14) (15) (16) (17).

91. Pro každou proměnnou odezvy, která se má analyzovat, se použije vztah koncentrace a odezvy pro výpočet bodových odhadů hodnot EC_x. Určí se 95 % intervaly spolehlivosti pro každý odhad a dobrá shoda dat odezvy s regresním modelem se vyhodnotí buď graficky, nebo statisticky. Regresní analýza by se měla provádět pomocí odezev jednotlivých opakování, nikoliv pomocí středních hodnot exponovaných skupin.

92. Odhady EC_{50} a meze spolehlivosti lze rovněž získat lineární interpolací s bootstrapem (18), pokud se dostupné regresní modely/metody pro příslušná data nehodí.

93. Pro odhad LOEC, a tedy i NOEC je nezbytné porovnat střední hodnoty exponovaných vzorků pomocí metod analýzy rozptylu (ANOVA). Střední hodnota pro každou koncentraci se poté porovná se střední hodnotou pro kontrolní skupinu, a to vhodnou zkušební metodou (např. Dunnettův, Williamsův test) (19) (20) (21) (22). Je nezbytné vyhodnotit, zda je splněn předpoklad normality rozdělení (ND) a homogenity rozptylu (VH) nezbytný pro ANOVA. Toto hodnocení by se mělo provést Shapirovým-Wilksovým testem (ND) nebo Leveneovým testem (VH). Nesplnění předpokladu normality rozdělení a homogenity rozptylů se dá někdy napravit logaritmickou transformací dat. Jestliže je heterogenita rozptylů a/nebo odchylka od normality rozdělení extrémní a nelze ji napravit transformací, pak je třeba zvážit analýzu takovými metodami, jako je Bonferroniho-Welchův t-test, sestupný Jonckheerův-Terpstrův test a Bonferroniho mediánový test. Další pokyny pro stanovení NOEC lze nalézt v (16).

PŘEDKLÁDÁNÍ ZPRÁV

94. V závěrečné zprávě se uvedou tyto údaje:

Zkoušená chemická látka

Jednosložková látka:

— fyzický vzhled, rozpustnost ve vodě a další relevantní fyzikálně-chemické vlastnosti,

— chemická identifikace, např. název podle IUPAC nebo CAS, číslo CAS, kód SMILES nebo InChI, strukturní vzorec, čistota, případně chemická identita nečistot, je-li to prakticky možné, atd.

Vícesložkové látky, UVCB a směsi:

— charakterizované pokud možno chemickou identitou (viz výše), kvantitativním výskytem a relevantními fyzikálně-chemickými vlastnostmi složek.

Zkušební druh

— vědecký název a zdroj.

Zkušební podmínky

— délka trvání a podmínky zaváděcí fáze,

— použitý zkušební postup (statický, semistatický, pulzní),

▼M7

— datum zahájení zkoušky a délka jejího trvání,

— zkušební médium, tj. sediment a tekuté živné médium,

— popis experimentálního uspořádání: růstová komora/místnost nebo laboratoř, zkušební nádoby a kryty, objemy roztoků, délka a hmotnost zkušebních rostlin na zkušební nádobu na počátku zkoušky, poměr povrchu sedimentu a povrchu vody, objemový poměr sedimentu a vody,

— zkušební koncentrace (nominální, popř. naměřené) a počet opakování pro každou koncentraci,

— metody přípravy zásobních a zkušebních roztoků, včetně použití jakýchkoliv rozpouštědel nebo dispergátorů,

— teplota během zkoušky,

— zdroj světla, ozářenost ($\mu E \cdot m^{-2} s^{-1}$),

— hodnoty pH zkušebního a kontrolního média a vzhled zkušebního média na počátku a na konci zkoušky,

— koncentrace kyslíku,

— metoda analýzy s příslušnými údaji pro hodnocení jakosti (validační studie, směrodatné odchylky nebo intervaly spolehlivosti analýz),

— metody pro určení proměnných měření, např. délky, hmotnosti sušiny, čerstvé hmotnosti,

— všechny odchylky od této zkušební metody.

Výsledky

— hrubá data: délka výhonků a hmotnost výhonků rostlin v každém květináči a další proměnné měření v každé zkušební a kontrolní nádobě při každém pozorování a při každé analýze podle harmonogramu hodnocení uvedeného v tabulce 1,

— střední hodnoty a směrodatné odchylky pro každou proměnnou měření,

— růstové křivky pro každou koncentraci,

— doba zdvojnásobení/růstová rychlost v kontrole na základě délky výhonků a čerstvé hmotnosti včetně variačního koeficientu pro výtěžek čerstvé hmotnosti,

— vypočítané proměnné odezvy pro všechna opakování s exponovanými vzorky, spolu se středními hodnotami a variačními koeficienty pro opakování,

— grafické znázornění vztahu koncentrace a odezvy,

— odhady toxických ukazatelů pro proměnné odezvy, např. EC_{50}, a související intervaly spolehlivosti. Jestliže se počítají LOEC a/nebo NOEC, uvedou se jejich hodnoty a statistické metody použité k jejich stanovení,

— jestliže byla použita ANOVA, uvede se velikost účinku, který lze detekovat (např. nejmenší významný rozdíl),

— jakákoliv stimulace růstu zjištěná v jakémkoli exponovaném vzorku,

▼M7

— jakékoliv vizuální známky fytotoxicity, jakož i pozorování zkušebních roztoků,

— rozbor výsledků včetně případného ovlivnění výsledku zkoušky v důsledku odchylek od této zkušební metody.

LITERATURA

(1) Kapitola C.26 této přílohy: Zkouška inhibice růstu druhů Lemna.

(2) Kapitola C.3 této přílohy: Zkouška inhibice růstu sladkovodních řas a sinic.

(3) Maltby, L. et al. (2010), Aquatic Macrophyte Risk Assessment for Pesticides, Guidance from the AMRAP Workshop in Wageningen (NL), 14-16 January 2008.

(4) Arts, G.H.P. et al. (2008), Sensitivity of submersed freshwater macrophytes and endpoints in laboratory toxicity tests, Environmental Pollution, sv. 153, s. 199-206.

(5) ISO 16191:2013 Water quality – Determination of the toxic effect of sediment on the growth behaviour of Myriophyllum aquaticum.

(6) Knauer, K. et al. (2006), Methods for assessing the toxicity of herbicides to submersed aquatic plants, Pest Management Science, sv. 62/8, s. 715-722.

(7) Kapitola C.50 této přílohy: Zkouška toxicity na *Myriophyllum spicatum* bez sedimentu.

(8) Kapitola C.28 této přílohy: Test toxicity na Chironomidae v systému sediment-voda za použití obohacené vody.

(9) Ratte, M., H. Ratte (2014), „Myriophyllum Toxicity Test: Result of a ring test using *M. aquaticum* and *M. spicatum* grown in a water-sediment system“, OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, No. 206, OECD Publishing, Paris.

(10) Davies, J. et al. (2003), Herbicide risk assessment for non-target aquatic plants: sulfosulfuron – a case study, Pest Management Science, sv. 59/2, s. 231-237.

(11) OECD (2000), „Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures“, OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, No. 23, OECD Publishing, Paris.

(12) Smart, R.M., J.W. Barko (1985), Laboratory culture of submersed freshwater macrophytes on natural sediments, Aquatic Botany, sv. 21/3, s. 251-263.

(13) Christensen, E.R., N. Nyholm (1984), Ecotoxicological Assays with Algae: Weibull Dose-Response Curves, Environmental Science Technology, sv. 18/9, s. 713-718.

(14) Nyholm, N. et al. (1992), Statistical treatment of data from microbial toxicity tests, Environmental Toxicology and Chemistry, sv. 11/2, s. 157-167.

(15) Bruce, R.D., D.J. Versteeg (1992), A statistical procedure for modelling continuous toxicity data, Environmental Toxicology and Chemistry, sv. 11/10, s. 1485-1494.

(16) OECD (2006), „Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application“, OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, No. 54, OECD Publishing, Paris.

(17) Brain, P., R. Cousens (1989), An equation to describe dose-responses where there is stimulation of growth at low doses, Weed Research, sv. 29/2, s. 93-96.

▼**M7**

(18) Norberg-King, T.J. (1988), An interpolation estimate for chronic toxicity: The ICp approach, National Effluent Toxicity Assessment Center Technical Report 05-88. US EPA, Duluth, MN.

(19) Dunnett, C.W. (1955), A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control, Journal of the American Statistical Association, sv. 50/272, s. 1096-1121.

(20) Dunnett, C.W. (1964), New tables for multiple comparisons with a control, Biometrics, sv. 20/3, s. 482-491.

(21) Williams, D.A. (1971), A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control, Biometrics, sv. 27/1, s. 103-117.

(22) Williams, D.A. (1972), The comparison of several dose levels with a zero dose control, Biometrics, sv. 28/2, s. 519-531.

▼**M7**

Dodatek 1

SLOŽENÍ SMARTOVA A BARKOVA MÉDIA

Složka	Množství činidla přidaného do vody (*) (v mg/l)
$CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$	91,7
$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$	69,0
$NaHCO_3$	58,4
$KHCO_3$	15,4
pH (rovnováha se vzduchem)	7,9

(*) Demineralizovaná (tj. destilovaná nebo deionizovaná) voda.

▼M7

Dodatek 2

DEFINICE

Biomasa je čerstvá hmotnost a/nebo hmotnost sušiny živé hmoty přítomné v populaci. V této zkoušce se biomasou rozumí součet hlavního výhonku, všech bočních větví a všech kořenů.

Chemická látka je látka nebo směs.

Chloróza je změna zbarvení ze zelené barvy k zežloutnutí zkušebního organismu, zejména přeslenů.

EC_x je koncentrace zkušební chemické látky rozpuštěné ve zkušebním médiu, která pro danou expoziční dobu (musí se výslovně uvést, pokud se odchyluje od plné či normální doby trvání zkoušky) vede k x % (např. 50 %) snížení růstu *Myriophyllum spicatum*. Pro jednoznačný popis hodnoty EC odvozené z růstové rychlosti nebo z výtěžku se pro růstovou rychlost používá symbol „E_rC“ a pro výtěžek „E_yC“ následovaný proměnnou měření, např. E_rC(délka hlavního výhonku).

Růst je zvýšení proměnné měření, např. délky hlavního výhonku, celkové délky bočních větví, celkové délky výhonků, celkové délky kořenů, čerstvé hmotnosti, hmotnosti sušiny nebo počtu přeslenů, během doby zkoušky.

Růstová rychlost (průměrná specifická růstová rychlost) je logaritmický nárůst proměnné měření během období expozice. *Poznámka*: Proměnné měření, kterých se růstová rychlost týká, jsou nezávislé na době trvání zkoušky, pokud je funkce růstu neexponovaných organismů exponenciální.

Nejnižší koncentrace s pozorovaným účinkem (LOEC) je nejnižší zkušební koncentrace, při níž je pro danou expoziční dobu pozorován statisticky významný účinek chemické látky na snížení růstu (při $p < 0,05$) ve srovnání s kontrolou. Všechny zkušební koncentrace vyšší než LOEC musí však mít stejné nebo závažnější škodlivé účinky, než jsou účinky pozorované při koncentraci LOEC. Nelze-li tyto dvě podmínky splnit, mělo by být podrobně vysvětleno, jak byla LOEC (a tedy i NOEC) zvolena.

Proměnné měření jsou jakýmkoliv druhem proměnných, které se měří pro vyjádření cílového ukazatele pomocí jedné či více různých proměnných odezvy. V této metodě jsou proměnnými měření délka hlavního výhonku, celková délka bočních větví, celková délka výhonků, celková délka kořenů, čerstvá hmotnost, hmotnost sušiny a počet přeslenů.

Monokultura je kultura s jedním druhem rostliny.

Nekróza je mrtvá (tj. bílá nebo tmavě hnědá) tkáň zkušebního organismu.

Koncentrace bez pozorovaných účinků (NOEC) je zkušební koncentrace bezprostředně nižší než LOEC.

Proměnná odezvy je proměnná pro odhad toxicity odvozená z jakýchkoliv naměřených proměnných, jež popisují biomasu, různými metodami výpočtu. Pro tuto metodu jsou proměnnými odezvy růstová rychlost a výtěžek, které se odvozují z proměnných měření jako např. délky hlavního výhonku, celkové délky výhonků, čerstvé hmotnosti, hmotnosti sušiny nebo počtu přeslenů.

Semistatická (obnovovací) zkouška je zkouška, při níž je zkušební roztok během zkoušky ve stanovených intervalech pravidelně nahrazován.

Statická zkouška je zkušební metoda bez obnovování zkušebního roztoku během zkoušky.

▼M7

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

Cílový ukazatel popisuje obecný faktor, který bude jakožto cíl zkoušky změněn zkoušenou chemickou látkou vzhledem ke kontrole. Při této metodě je cílovým ukazatelem inhibice růstu, kterou lze vyjádřit různými proměnnými odezvy, jež jsou založeny na jedné či více proměnných měření.

Zkušební médium je úplné syntetické růstové médium, v němž rostou zkušební rostliny při expozici zkoušené chemické látce. Zkoušená chemická látka se za normálních podmínek v zkušebním médiu rozpustí.

UVCB je látka s neznámým nebo proměnlivým složením, komplexní reakční produkt nebo biologický materiál.

Výtěžek je hodnota proměnné měření pro vyjádření biomasy na konci expoziční doby minus proměnná měření na počátku expoziční doby. Poznámka: Při exponenciálním růstu neexponovaného organismu budou proměnné odezvy založené na výtěžku během zkoušky klesat.

▼M8

C.52. ROZŠÍŘENÁ JEDNOGENERAČNÍ ZKOUŠKA REPRODUKCE HALANČÍKA JAPONSKÉHO (MEOGRT)

ÚVOD

1. Tato zkušební metoda odpovídá pokynu OECD pro zkoušení (TG) 240 (2015). Rozšířená jednogenerační zkouška reprodukce halančíka japonského (MEOGRT) popisuje souhrnnou zkušební metodu založenou na rybách exponovaných v několika generacích, aby byly získány údaje relevantní pro ekologickou nebezpečnost a posouzení rizik chemických látek, včetně pravděpodobných endokrinních disruptorů (EDC). Expozice v MEOGRT pokračuje až do vylíhnutí (do dvou týdnů po fertilizaci) v druhé (F2) generaci. Pro odůvodnění užitečnosti rozšíření generace F2 do doby po vylíhnutí by byly nutné další studie; v současnosti nejsou k dispozici dostatečné informace, aby bylo možné stanovit relevantní podmínky nebo kritéria pro rozšíření generace F2. Tato zkušební metoda se však může aktualizovat, tak jak budou zohledňovány nové informace a údaje. Například pokyn k rozšíření generace F2 prostřednictvím reprodukce může být za určitých podmínek potenciálně užitečný (např. chemické látky s vysokým potenciálem biokoncentrace nebo indikacemi mezigeneračních účinků u jiných taxonů). Tato zkušební metoda se může používat na posouzení potenciálních chronických účinků chemických látek, včetně potenciálních endokrinních disruptorů, na ryby. Metoda klade primární důraz na potenciální účinky relevantní pro populaci (a to negativní dopady na přežití, vývoj, růst a reprodukci) pro výpočet koncentrace bez pozorovaných účinků (NOEC) nebo účinné koncentrace (EC_x), ačkoliv je třeba poznamenat, že metody EC_x jsou jen zřídka vhodné pro velké studie tohoto typu, kde může být nepraktické zvyšovat počet zkušebních koncentrací, aby bylo možné stanovit požadovanou EC_x, což může také způsobit významné problémy v oblasti dobrých životních podmínek zvířat vzhledem k velkému počtu použitých zvířat. Pro chemické látky, které nevyžadují hodnocení „několika generací“, nebo chemické látky, které nejsou potenciálními endokrinními disruptory mohou být vhodnější jiné zkušební metody (1). Vhodným druhem pro použití u této zkušební metody je halančík japonský vzhledem k jeho krátkému životnímu cyklu a možnosti stanovit jeho genetické pohlaví (2), což je považováno za kritickou součást této zkušební metody. Konkrétní metody a sledované cílové parametry popsané v této metodě jsou použitelné u halančíka japonského samotného. Jiné druhy malých ryb (např. danio pruhované) mohou být adaptovány na podobný zkušební protokol.

2. Tato zkušební metoda měří několik biologických cílových parametrů. Primární důraz je kladen na relevantní parametry, a to potenciální nežádoucí účinky na populaci, včetně přežití, celkového vývoje, růstu a reprodukce. Sekundárně za účelem zajištění mechanistických informací a spojení mezi výsledky z jiných druhů terénních a laboratorních studií, pokud budou dodatečně zjištěny důkazy, že chemická látka působí jako potenciální endokrinní disruptor (např. androgenní nebo estrogenní aktivita v jiných zkouškách a analýzách), se další užitečné informace získávají měřením mRNA *vitelogeninu* (*vtg)* (nebo bílkoviny vitelogeninu, VTG), fenotypových sekundárních pohlavních charakteristik (SSC) souvisejících s genetickým pohlavím a vyhodnocením histopatologie. Je třeba poznamenat, že pokud neexistuje podezření, že zkoušená chemická látka nebo její metabolity jsou endokrinní disruptory, nemusí být nutné měřit tyto sekundární cílové parametry a může být vhodnější použít studie, které jsou méně náročné na zdroje a zvířata (1). Definice použité v této zkušební metodě jsou uvedeny v dodatku 1.

▼**M8**

VÝCHOZÍ ÚVAHY A OMEZENÍ

3. Vzhledem k omezenému počtu zkoušených chemických látek a laboratoří zapojených do validace této dosti složité analýzy lze předpokládat, že až bude k dispozici dostatečný počet studií k posouzení účinnosti experimentálního uspořádání této nové metody, bude zkušební metoda přezkoumána a v případě potřeby bude revidována z hlediska nabytých zkušeností. Údaje mohou být použity na úrovni 5 koncepčního rámce OECD pro zkoušení a posuzování endokrinních disruptorů (3). Zkušební metoda začíná expozicí dospělých ryb (generace F0) zkoušené chemické látce v průběhu reprodukční fáze. Expozice pokračuje po dobu vývoje a reprodukce v generaci F1 a líhnutí v generaci F2; analýza tak umožňuje hodnocení strukturálních a aktivačních endokrinních drah. Při interpretaci cílových parametrů souvisejících s endokrinním systémem může být provedena analýza průkaznosti výsledků.

4. Zkouška by měla zahrnovat adekvátní počet jednotlivců, aby byla zajištěna dostatečná síla na hodnocení cílových parametrů relevantních pro reprodukci (viz dodatek 3) a aby bylo zároveň zajištěno, že počet použitých zvířat je minimální potřebný počet s ohledem na dobré životní podmínky zvířat. Vzhledem k velkému počtu použitých pokusných zvířat je důležité pečlivě zvažovat, zda je nutné zkoušku provést s ohledem na existující údaje, které již mohou obsahovat podstatné informace o mnoha cílových parametrech ve zkoušce MEOGRT. V tomto směru může určitou pomoc poskytnout rámec OECD pro zkoušení toxicity na rybách (1).

5. Tato zkušební metoda je primárně určena na rozlišení účinků jedné látky. Pokud je však potřebná zkouška směsi, je třeba zvážit, zda poskytne přijatelné výsledky pro zamýšlený právní účel.

6. Před zahájením zkoušky je důležité mít informace o fyzikálně chemických vlastnostech zkoušené chemické látky, zejména proto, aby bylo možné připravit stabilní chemické roztoky. Rovněž je nutné mít adekvátně citlivou analytickou metodu pro ověření koncentrací zkoušené chemické látky.

PODSTATA ZKOUŠKY

7. Zkouška se zahajuje exponováním pohlavně zralých samců a samic (alespoň 12 týdnů po fertilizaci) v chovných párech po dobu 3 týdnů, během nichž se zkoušená chemická látka distribuuje v organismu rodičovské generace (F0) podle svého toxikokinetického chování. Pokud možno co nejblíže prvnímu dni čtvrtého týdne se sesbírají vajíčka a zahájí se generace F1. V průběhu chovu generace F1 (celkem 15 týdnů) se posuzuje líhnivost a přežití. Kromě toho se 9–10 týdnů po fertilizaci odeberou vzorky ryb pro stanovení vývojových cílových parametrů a od 12. do 14. týdne po fertilizaci se posuzuje tření. Po třetím týdnu posuzování reprodukce a chovu až do ukončení líhnutí se zahajuje generace F2.

KRITÉRIA PLATNOSTI ZKOUŠKY

8. Použijí se tato kritéria platnosti zkoušky:

— koncentrace rozpuštěného kyslíku by po celou dobu zkoušky měla být ≥ 60 % nasycení vzduchem,

— střední teplota vody by se měla po celou dobu trvání studie pohybovat mezi 24 a 26 °C. Krátké odchylky od střední teploty v jednotlivých akváriích by neměly být větší než 2 °C,

▼M8

— střední plodivost kontrol v každé generaci (F0 a F1) by měla být větší než 20 vajíček na pár denně. Fertilita všech vajíček vyprodukovaných v průběhu posuzování by měla být větší než 80 %. Kromě toho 16 z doporučených 24 kontrolních chovných párů (> 65 %) by mělo vyprodukovat více než 20 vajíček na pár denně,

— líhnivost vajíček by u kontrol měla být ≥ 80 % (průměr) (v každé generaci F1 a F2),

— přežití po vylíhnutí do 3. týdne po fertilizaci a od 3. týdne po fertilizaci až do ukončení zkoušky pro generaci F1 (tj. 15 týdnů po fertilizaci) by u kontrol (F1) mělo být ≥ 80 % (průměr), respektive ≥ 90 % (průměr),

— měly by být k dispozici důkazy pro prokázání toho, že koncentrace zkoušené chemické látky v roztoku byly uspokojivě udržovány v rozmezí ±20 % od středních naměřených hodnot.

Co se týká teploty vody, i když nejde o kritérium platnosti, replikáty v rámci expozice by se neměly vzájemně statisticky odlišovat a ani expoziční skupiny v rámci zkoušky by se neměly statisticky odlišovat (na základě denního měření teploty, s vyloučením krátkých odchylek).

9. I když může být ve skupinách s vyšší expozicí pozorována snížená reprodukce, mělo by docházet k dostatečné reprodukci alespoň v třetí nejvyšší skupině a ve všech nižších skupinách generace F0, aby se naplnily inkubátory. Kromě toho by mělo být adekvátní přežití embryí v třetí nejvyšší a v nižších expozičních skupinách generace F1, aby bylo možné hodnotit cílový parametr při odebírání vzorků nedospělých zvířat (viz odstavce 36 a 38 a dodatek 9). Dále by mělo být alespoň minimální přežití po vylíhnutí (~20 %) v druhé nejvyšší expoziční skupině generace F1. Nejde o kritéria platnosti jako taková, ale o doporučení, aby bylo možné vypočítat robustní koncentrace bez pozorovaných účinků (NOEC).

10. Je-li zjištěna odchylka od kritérií platnosti zkoušky, měly by být zváženy důsledky z hlediska spolehlivosti výsledků zkoušek a tyto odchylky a úvahy by měly být zahrnuty do závěrečné zprávy.

POPIS METODY

Přístroje a pomůcky

11. Normální laboratorní vybavení, a zejména:

a) oximetr a pH-metr;

b) vybavení pro stanovení tvrdosti a alkality vody;

c) vhodné zařízení pro regulaci teploty a pro její pokud možno nepřetržité sledování;

d) nádrže z chemicky inertního materiálu o vhodném objemu vzhledem k doporučené velikosti násady a hustotě obsádky (viz dodatek 3);

e) dostatečně přesné váhy (tj. vážící s přesností na ±0,5 mg).

▼M8

Voda

12. Jako zkušební voda může být použita jakákoli voda, v níž zkušební druh dlouhodobě přežívá a roste. Po celou dobu zkoušky by měla mít stejnou kvalitu. Pro ujištění, že ředicí voda nebude mít přílišný vliv na výsledky zkoušky (například tvorbou komplexů se zkoušenou látkou) nebo nepříznivý vliv na stav matečných ryb, by měly být odebírány v pravidelných intervalech její vzorky pro analýzu. Je-li kvalita ředicí vody relativně konstantní, mělo by být stanovení těžkých kovů (např. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni), hlavních aniontů a kationtů (např. Ca^{2+}, Mg^{2+}, Na^{+}, K^{+}, Cl^{-}, SO_4^{2-}), pesticidů, celkového obsahu organického uhlíku a suspendovaných látek provedeno např. každých šest měsíců. Některé chemické charakteristiky doporučené ředicí vody jsou uvedeny v dodatku 2. Hodnota pH by měla být v rozmezí 6,5 až 8,5, avšak během zkoušky by se pH nemělo lišit o více než ±0,5.

Systém expozice

13. Návrh a materiály použité pro systém expozice nejsou stanoveny. Pro výstavbu zkušebního systému by mělo být použito sklo, nerezavějící ocel nebo jiný chemicky inertní materiál, který nebyl kontaminován v průběhu předchozích zkoušek. Pro účely této zkoušky může vhodný systém expozice sestávat z kontinuálního průtokového systému (4)(5)(6)(7)(8)(9)(10)(11)(12)(13).

Zkušební roztoky

14. Zásobní roztok zkoušené chemické látky se do systému expozice přivádí vhodným čerpadlem. Průtok zásobního roztoku by měl být kalibrován v souladu s analytickým potvrzením zkušebních roztoků před zahájením expozice a v průběhu zkoušky by měl být pravidelně kontrolován jeho objem. Zkušební roztok v každé komoře se adekvátně vyměňuje (např. minimálně 5krát/den až 16krát/den nebo max. průtok 20 ml/min) v závislosti na stabilitě zkoušené chemické látky a kvalitě vody.

15. Zkušební roztoky o zvolených koncentracích se připraví ředěním zásobního roztoku. Zásobní roztok by měl být připraven přednostně jednoduchým mechanickým mícháním nebo protřepáváním zkoušené chemické látky v ředicí vodě (např. mechanickým mícháním nebo pomocí ultrazvuku). Pro dosažení vhodné koncentrace zásobního roztoku mohou být použity syticí kolony/systémy nebo metody pasivního dávkování (14). Měla by být vynaložena maximální snaha nepoužívat rozpouštědla nebo nosiče, protože: 1) některá rozpouštědla sama o sobě mohou vyvolávat toxicitu anebo nežádoucí či neočekávané odpovědi, 2) zkoušené chemické látky v koncentraci vyšší, než je jejich rozpustnost ve vodě (což se může často stát při použití rozpouštědel), mohou způsobit nepřesné stanovení účinných koncentrací, 3) použití rozpouštědel u dlouhodobějších zkoušek může mít za následek značný vznik „biofilmu“ souvisejícího s mikrobiální aktivitou, což může mít vliv na okolní podmínky i na schopnost udržet expoziční koncentrace a 4) v případě, že nejsou k dispozici dřívější údaje, které prokazují, že rozpouštědlo neovlivňuje výsledek studie, vyžaduje použití rozpouštědel kontrolu s rozpouštědlem, což má dopady na dobré životní podmínky zvířat, neboť k provedení zkoušky jsou potřebná další zvířata. V případě chemických látek, jejichž zkoušení je obtížné, lze použít rozpouštědlo jako poslední řešení, a určení, jaká metoda je nejvhodnější, by mělo vycházet z metodického dokumentu OECD č. 23 ke zkouškám toxicity složitých látek a směsí pro vodní organismy (15). Volba rozpouštědla se bude řídit chemickými vlastnostmi dané chemické látky a dostupností dosavadních údajů o používání rozpouštědla. Jsou-li použita jako nosiče rozpouštědla, je nutné vyhodnotit kontrolní měření nejen při použití vhodného rozpouštědla, ale i při kontrolách (negativních), kdy se rozpouštědlo nepoužije (pouze ředicí voda). V případě, že se

▼M8

použití rozpouštědla nelze vyhnout a dojde k mikrobiální aktivitě (vznik biofilmu), doporučuje se zaznamenávat/vykázat vznik biofilmu v každé nádrži (alespoň týdně) po celou dobu zkoušky. Ideálně by se měla udržovat konstantní koncentrace rozpouštědla při kontrole s rozpouštědlem a při všech zkušebních expozicích. Jestliže koncentrace rozpouštědla není udržována v konstantní výši, je třeba při kontrole s rozpouštědlem použít nejvyšší koncentraci rozpouštědla při zkušební expozici. V případech, kdy je použito nosné rozpouštědlo, neměla by maximální koncentrace rozpouštědla překročit 100 µl/l nebo 100 mg/l (15) a doporučuje se udržovat koncentraci rozpouštědla co možná nejnižší (např. < 20 µl/l) aby se zamezilo potenciálnímu účinku rozpouštědla na měřené ukazatele (16).

Zkušební organismy

Výběr a chov ryb

16. Zkušebním druhem je halančík japonský *Oryzias latipes* vzhledem k jeho krátkému životnímu cyklu a možnosti určit genetické pohlaví. I když mohou být na podobný zkušební protokol adaptovány jiné druhy malých ryb, konkrétní metody a sledované cílové parametry popsané v této zkušební metodě jsou použitelné pouze u halančíka japonského (viz odstavec 1). Halančíka japonského lze snadno přimět, aby se rozmnožoval v zajetí; pro jeho chov existují publikované metody (17) (18) (19) a k dispozici jsou údaje z krátkodobých zkoušek letality, raného vývojového stádia i celého životního cyklu (5) (6) (8) (9) (20). Všechny ryby se chovají v režimu 16 h světlo, 8 h tma. Ryby se krmí živými larvami (nauplie) žábronožky (druh *Artemia*), které mohou být v případě potřeby doplněny komerčně dostupným vločkovým krmivem. Komerčně dostupné vločkové krmivo by se mělo pravidelně analyzovat, aby se zjistila přítomnost kontaminantů.

17. Pokud jsou dodržovány vhodné metody chovu, není nutný žádný konkrétní kultivační protokol. Halančík japonský může být chován například ve dvoulitrových nádržích s 240 rybími larvami v každé nádrži do 4. týdne po fertilizaci, poté mohou být ryby chovány ve dvoulitrových nádržích s 10 rybami v každé nádrži do 8. týdne po fertilizaci, kdy se přemístí v chovných párech do dvoulitrových nádrží.

Aklimatizace a výběr ryb

18. Zkušební ryby by měly pocházet z laboratorní populace, která byla alespoň dva týdny před zkouškou udržována v podmínkách kvality vody a osvětlení podobných podmínkám použitým ve zkoušce (poznámka: toto aklimatizační období není předexpoziční období *in situ*). Doporučuje se, aby testovací ryby byly pořizovány z vlastní kultivace, neboť přeprava dospělých ryb je stresující a může narušit spolehlivé tření. Ryby se krmí larvami (nauplia) žábronožky dvakrát denně po celou dobu chovného období i v průběhu expoziční fáze a v případě potřeby mohou být dokrmovány komerčně dostupným vločkovým krmivem. Aby byla zajištěna adekvátní replikace, považuje se za potřebné zahájit tuto zkoušku minimálně se 42 chovnými páry (54 chovnými páry, jestliže je vyžadována kontrola s rozpouštědlem částečně v důsledku nedostatku dřívějších údajů na podporu použití pouze kontroly s rozpouštědlem i bez rozpouštědla). Dále je třeba ověřit, že každý chovný pár generace F0 je XX-XY (tj. normální komplement pohlavních chromozomů u každého pohlaví), aby nedošlo k možnému zahrnutí spontánních samců XX (viz odstavec 39).

▼M8

19. V průběhu aklimatizační fáze se zaznamenává mortalita chovaných ryb, přičemž po 48hodinovém stabilizačním období se použijí tato kritéria:

— mortalita větší než 10 % chované populace za sedm dnů před přemístěním do zkušebního systému: vyměnit celou obsádku,

— mortalita mezi 5 % a 10 % populace za sedm dnů před přemístěním do zkušebního systému: aklimatizace po dobu sedmi dalších dnů až dvoutýdenní aklimatizační období; je-li mortalita během následujících sedmi dnů větší než 5 %, vymění se celá obsádka,

— mortalita menší než 5 % populace za sedm dnů před přemístěním do zkušebního systému: násada se přijímá.

20. Během dvoutýdenního aklimatizačního období před zkouškou a během expozice nesmí být u ryb léčeny žádné nemoci a léčba nemocí by měla být pokud možno zcela vyloučena. Ryby s klinickými známkami onemocnění by neměly být ve studii používány. Měl by být veden záznam pozorování a všech profylaktických a terapeutických ošetření nemocí v průběhu chovného období předcházejícího zkoušce.

21. Fáze expozice začíná s pohlavně dimorfními dospělými rybami s geneticky stanoveným pohlavím z laboratorní dodávky reprodukčně zralých zvířat chovaných při 25 ± 2 °C. Ryby by měly být prokazatelně chovné (tj. ryby, které měly životaschopné potomstvo) v průběhu týdne před expozicí. Rozpětí individuálních hmotností podle pohlaví na začátku zkoušky by pro celou skupinu ryb použitých ve zkoušce mělo být pokud možno ±20 % aritmetického průměru hmotností stejného pohlaví. Před zkouškou by se měl zvážit menší vzorek ryb s cílem odhadnout střední hodnotu hmotnosti. Vybrané ryby by měly být alespoň 12 týdnů po fertilizaci a měly by vyvážit ≥ 300 mg u samiček a ≥ 250 mg u samečků.

USPOŘÁDÁNÍ ZKOUŠKY

Zkušební koncentrace

22. Doporučuje se použít pět koncentrací chemické látky plus kontrolu (kontroly). Při výběru rozmezí zkušebních koncentrací by měly být zvažovány všechny zdroje informací, včetně kvantitativních vztahů mezi strukturou a aktivitou (QSAR), údajů odvozených z analogických látek, výsledků zkoušek na rybách, jako jsou analýzy akutní toxicity (kapitola C.1 této přílohy), krátkodobá analýza reprodukce ryb (kapitola C.48 této přílohy) a další zkušební metody např. kapitoly C.15, C.37, C.41, C.47 nebo C.49 této přílohy (21) (22) (23) (24) (25) (26), jestliže jsou k dispozici, nebo v případě potřeby ze zkoušky ke stanovení rozsahu, případně včetně reprodukční fáze. V případě potřeby může být provedena zkouška ke stanovení rozsahu za podmínek (kvalita vody zkušební systém, násada) podobných podmínkám použitým v hlavní zkoušce. Jestliže je nezbytné použít rozpouštědlo a nejsou k dispozici žádné předchozí údaje, může být k určení vhodnosti rozpouštědla použita zkouška ke stanovení rozsahu. Nejvyšší zkušební koncentrace by neměla překročit rozpustnost látky ve vodě, 10 mg/l nebo 1/10 z 96h-LC50 (27). Nejnižší koncentrace by měla být 10krát až 100krát nižší než nejvyšší koncentrace. Použití pěti koncentrací v této zkoušce

▼M8

umožňuje nejen změřit vztah mezi dávkou a odpovědí, ale poskytuje také nejnižší koncentraci s pozorovaným účinkem (LOEC) a koncentraci bez pozorovaných účinků (NOEC), které jsou v některých regulačních programech nebo jurisdikcích nezbytné pro posouzení rizik. Obecně je rozdíl mezi nominálními koncentracemi zkoušené chemické látky mezi jednotlivými úrovněmi expozice ≤ 3,2.

Replikáty ve zkušebních skupinách a kontrolách

23. Mělo by být použito minimálně šest replikátů zkušebních komor na každou zkoušenou koncentraci (viz dodatek 7). V průběhu reprodukční fáze (s výjimkou generace F0) se struktura replikací u hodnocení plodivosti zdvojnásobí, přičemž každý replikát má pouze jeden chovný pár (viz odstavec 42).

24. Kromě zkušebních koncentrací by měla být nasazena kontrolní skupina v ředicí vodě a podle potřeby kontrolní skupina s rozpouštědlem. Pro kontroly se použije dvojitý počet replikátů komor, aby byla zajištěna adekvátní statistická síla (tj. pro kontroly by mělo být použito alespoň dvanáct replikátů). V průběhu reprodukční fáze se počet replikátů v kontrolách zdvojnásobí (tj. minimálně 24 replikátů a každý replikát má jen jeden chovný pár). Po reprodukci by měly kontrolní replikáty obsahovat maximálně 20 (rybích) embryií.

POSTUP

Zahájení zkoušky

25. Reprodukčně aktivní dospělé ryby použité pro zahájení generace F0 zkoušky se vybírají podle dvou kritérií: věku (obvykle více než 12 týdnů po fertilizaci, ale doporučuje se nepřekračovat 16 týdnů po fertilizaci) a hmotnosti (měla by být ≥ 300 mg u samiček a ≥ 250 mg u samečků).

26. Páry samička-sameček, které splňují výše uvedené specifikace, se při zahájení zkoušky přemístí jako jednotlivé páry do každého replikátu nádrže, tj. dvanáct replikátů v kontrolních skupinách a šest replikátů ve skupinách exponovaných chemické látce. Tyto nádrže se náhodně rozdělí na expozice (např. T1–T5 a kontrola) a replikát (např. A–L u kontrol a A–F u expozice) a poté se umístí do expozičního systému s příslušným průtokem do každé nádrže.

Podmínky expozice

27. Úplný souhrn zkušebních parametrů a podmínek lze najít v dodatku 3. Při dodržení těchto specifikací by kontrolní ryby měly mít hodnoty sledovaných parametrů podobné hodnotám uvedeným v dodatku 4.

28. V průběhu zkoušky se měří alespoň v jedné zkušební nádrži každé expoziční skupiny a kontroly množství rozpuštěného kyslíku, pH a teplota. S výjimkou teploty by se měla tato měření provádět minimálně jednou týdně po celou dobu expozice. Střední teplota vody by se měla po celou dobu zkoušky pohybovat mezi 24 a 26 °C. Teplota by se měla měřit každý den po celou dobu expozice. Hodnota pH by měla být v rozmezí 6,5 až 8,5, avšak během zkoušky by se pH nemělo lišit o více než ±0,5. Replikáty v rámci expozice by se neměly vzájemně statisticky odlišovat a ani expoziční skupiny v rámci zkoušky by se neměly statisticky odlišovat (na základě denního měření teploty, s vyloučením krátkých odchylek).

▼M8

Doba trvání expozice

29. Ve zkoušce jsou pohlavně reprodukční ryby exponovány od generace F0 po dobu tří týdnů. V týdnu 4 přibližně v den zkoušky 24 se založí generace F1 a chovné páry z generace F0 se humánně usmrtí a zaznamená se jejich hmotnost a délka (viz odstavec 34). Poté následuje expozice generace F1 po dobu dalších 14 týdnů (celkem 15 týdnů u generace F1) a generace F2 po dobu dvou týdnů až do vylíhnutí. Celková doba trvání zkoušky je primárně 19 týdnů (tj. až do vylíhnutí generace F2). Časové plány zkoušky jsou uvedeny v tabulce 2 a dále podrobně vysvětleny v dodatku 9.

Krmný režim

30. Ryby mohou být krmeny libovolně dlouho žábronožkou, rod *Artemia,* (24 hodin staré larvy) a v případě potřeby doplňkově komerčně dostupným vločkovým krmivem. Komerčně dostupné vločkové krmivo by mělo být pravidelně analyzováno, zda neobsahuje kontaminanty, např. organochlorové pesticidy, polycyklické aromatické uhlovodíky (PAH) a polychlorované bifenyly (PCB). Měla by být vyloučena potrava se zvýšenou hladinou endokrinně aktivních látek (tj. fytoestrogenů), která by mohla narušit odpověď zkoušky. Nespotřebovaná potrava a výkaly se ze zkušebních nádrží odstraňují podle potřeby, např. opatrným odsátím ze dna jednotlivých nádrží pomocí odsávačky. Jednou nebo dvakrát týdně je třeba vyčistit také stěny a dno každé nádrže (např. oškrábáním špachtlí). Příklad harmonogramu krmení lze najít v dodatku 5. Množství krmiva závisí na počtu ryb v každém replikátu. Proto se množství krmiva sníží, pokud v replikátu došlo k úhynu.

Analytické stanovení a měření

31. Před započetím předexpoziční doby je třeba zajistit řádné fungování systému dávkování chemických látek. Měly by se stanovit všechny analytické metody, které budou zapotřebí, včetně dostatečných znalostí o stabilitě chemické látky ve zkušebním systému. Během zkoušky se koncentrace zkoušené látky určují ve vhodných intervalech, nejlépe alespoň každý týden v jednom replikátu u každé expoziční skupiny, přičemž replikáty ve stejné expoziční skupině se každý týden střídají.

32. V průběhu zkoušky se průtoky ředicího a zásobního roztoku v určitých intervalech kontrolují (např. minimálně třikrát týdně). Doporučuje se zakládat výsledky na naměřených koncentracích. Udržela-li se však koncentrace zkoušené chemické látky v roztoku během celé zkoušky uspokojivě v rozmezí ±20 % středních naměřených hodnot, lze výsledky zakládat na jmenovitých nebo změřených hodnotách. V případě chemických látek, které se v rybách výrazně akumulují, se mohou zkušební koncentrace snižovat s tím, jak ryba roste. V těchto případech se doporučuje upravit rychlost výměny zkušebního roztoku v každé komoře tak, aby byly zkušební koncentrace udrženy v maximální možné míře konstantní.

Pozorování a měřené parametry

33. Měřené parametry zahrnují plodivost, fertilitu, líhnutí, růst a přežití za účelem zhodnocení možných účinků na úrovni populace. Také pozorování chování by se mělo provádět denně a každé neobvyklé chování by se mělo zaznamenat. Další mechanistické parametry zahrnují hladiny hepatické *vtg* mRNA nebo bílkoviny VTG určené na základě imunotestu (28), pohlavní fenotypové markery, jako jsou charakteristické samčí papily na řitní ploutvi, histologické vyšetření pohlaví podle gonád a histopatologické vyšetření ledvin, jater a gonád (viz seznam parametrů v tabulce 1). Všechny tyto specifické parametry se hodnotí v souvislosti s určením genetického pohlaví jednotlivce podle přítomnosti nebo nepřítomnosti genu *dmy* určujícího samčí pohlaví halančíka japonského (viz odstavec 41). Dále se hodnotí také doba do tření. Kromě toho lze jednoduché podíly fenotypového pohlaví odvodit

▼M8

podle informací o počtu papil na řitní ploutvi, které definují jednotlivé halančíky japonské jako samičky nebo samečky. Od této zkušební metody nelze očekávat, že bude detekovat menší odchylky od očekávaného podílu pohlaví, protože relativně malé počty ryb v každém replikátu nezajišťují dostatečnou statistickou sílu. V průběhu histopatologického vyšetření se také hodnotí gonády a provádí se mnohem silnější analýzy pro stanovení fenotypu gonád v souvislosti s genetickým pohlavím.

34. Hlavním účelem této zkušební metody je posoudit potenciální účinky zkoušené chemické látky relevantní pro populaci. Mechanistické parametry (VTG, SSC a některé účinky na histopatologii gonád) mohou rovněž pomoci při určování, zda je některý účinek zprostředkován endokrinní aktivitou. Tyto mechanistické parametry však mohou být rovněž ovlivněny systémovými a jinými toxicitami. Proto může být také detailně posuzována histopatologie jater a ledvin, což pomůže lépe pochopit odpovědi u mechanistických cílových parametrů. I když se však neprovedou tato podrobná hodnocení, je třeba přesto zaznamenávat a vykázat hrubé abnormality zpozorované náhodně při histopatologickém vyšetření.

Humánní usmrcení ryb

35. Při ukončení expozice generace F0 a F1 a když se odebírá dílčí vzorek nedospělých ryb, by se ryby měly usmrtit přiměřeným množstvím roztoku anestetika (např. trikain methan sulfonát, MS-222 (CAS.886-86-2), 100–500 mg/l), pufrovaného roztokem $NaHCO_3$ (hydrogenuhličitan sodný, číslo CAS 144-55-8) 300 mg/l, aby se snížilo podráždění sliznice. Jestliže ryby vykazují známky značného utrpení (velmi silné utrpení a spolehlivě lze předvídat úhyn) a jsou považovány za hynoucí, je třeba jim podat anestetikum, usmrtit je a při analýze dat je zahrnout do mortality. Pokud je ryba usmrcena v důsledku morbidity, je třeba to zaznamenat a vykázat. V závislosti na tom, kdy v průběhu studie jsou ryby usmrceny, je lze uchovat pro histopatologickou analýzu (fixovat ryby pro případnou histopatologii).

Nakládání s vajíčky a rybími larvami

Sběr vajíček od chovných párů pro namnožení další generace

36. Sběr vajíček se provádí první den (nebo v případě potřeby první dva dny) zkušebního týdne 4, aby se přešlo z generace F0 na generaci F1, a zkušebního týdne 18, aby se přešlo z generace F1 na generaci F2. Zkušební týden 18 odpovídá generaci F1, 15 týdnů pro fertilizaci dospělých ryb. Je důležité, aby byla z každé nádrže odebrána všechna vajíčka v den před započetím sběru vajíček, aby bylo zajištěno, že všechna vajíčka získaná od chovného páru jsou z jednoho tření. Po vytření někdy samičky halančíka japonského nosí svá vajíčka v blízkosti kloaky, dokud je nemohou uložit na substrát. Protože v nádrži žádný substrát není, mohou být vajíčka nalezena přichycená k samičce nebo na dně nádrže. Podle toho, kde se vajíčka nacházejí, ve zkušebním týdnu 4 generace F0 a ve zkušebním týdnu 18 generace F1 se opatrně oddělí od samičky nebo vysají ze dna. Všechna vajíčka shromážděná v rámci expozice se před distribucí do inkubačních komor sloučí.

▼M8

37. Vlákna, která drží vytřená vajíčka dohromady, je třeba odstranit. Od každého chovného páru (1 pár na každý replikát) se sesbírají oplodněná vajíčka (maximálně 20), sloučí se podle expozice a systematicky rozdělí do vhodných inkubačních komor (dodatek 6, 7). Pomocí kvalitního stereoskopického mikroskopu lze vidět známky rané fertilizace/vývoje, jako je vznik fertilizační membrány (chorionu), probíhající dělení buněk nebo vznik blastuly. Inkubační komory mohou být vloženy do samostatného „inkubačního akvária“ sestaveného pro každou expozici (v takovém případě je třeba v nich měřit kvalitu vody a koncentrace zkoušené chemické látky) nebo do replikátu akvária, v němž budou chovány vylíhlé larvy (například eleutheroembryo). Pokud je potřebný druhý den sběru (zkušební den 23), všechna vajíčka z obou dnů se sloučí a poté se systematicky rozdělí do všech zkušebních replikátů.

Pěstování vajíček do vylíhnutí

38. Oplodněná vajíčka se průběžně promíchávají, *např.* v inkubátoru vzduchovými bublinkami nebo vertikálním kroužením inkubátoru. Mortalita oplodněných vajíček (embryí) se každý den kontroluje a zaznamenává. Odumřelá vajíčka se z inkubátorů odstraňují (dodatek 9). V den 7 po fertilizaci se promíchávání zastaví nebo sníží, aby se oplodněná vajíčka mohla usadit na dně inkubátoru. Podporuje to líhnutí, zpravidla následující den či po dvou dnech. U každé expozice a kontroly se spočítá (ze spojených replik) plůdek (mladé larvy; eleutheroembrya). Oplodněná vajíčka, z nichž se nevylíhl plůdek ani po dvojnásobku střední doby líhnutí v kontrole (obvykle 16. nebo 17. den po fertilizaci), se považují za neživotaschopná a zlikvidují se.

39. Do každé repliky nádrže se přenese dvanáct plůdků. Plůdek z inkubačních komor se sloučí a systematicky rozdělí do replik nádrží (dodatek 7). Lze to provést náhodným výběrem plůdku z expoziční skupiny a postupným přidáváním plůdku bez rozdílu do replikovaných akvárií. Každá z nádrží by měla obsahovat stejný počet (n = 12) vylíhlých larev (maximálně 20 larev v nádrži). Pokud není dostatek plůdku k zaplnění všech expozičních replikátů, doporučuje se zajistit, aby co možná nejvíce replikátůu mělo 12 plůdků. S plůdkem lze bezpečně manipulovat pomocí skleněných pipet s velkým vnitřním průměrem. Zbývající plůdek se humánně usmrtí anestetikem. V týdnech před sestavením chovných párů je třeba zaznamenat den, kdy bylo v každém replikátu pozorováno první tření.

Příprava chovných párů

Označení ploutví a určení genotypového pohlaví

40. Určení genotypového pohlaví označením ploutví se provádí v 9.–10. týdnu po fertilizaci (tj. zkušební týden 12–13 u generace F1). Všechny ryby v nádrži se anestetizují (s použitím schválených metod, např. IACUC) a z dorzální nebo ventrální špičky ocasní ploutve každé ryby se odebere malý vzorek tkáně za účelem stanovení genotypového pohlaví jednotlivce (29). Ryby z replikátu mohou být v replikátové nádrži umístěny do klícek, pokud možno jedna ryba na klícku. Alternativně lze do každé klícky umístit dvě ryby, pokud je lze od sebe odlišit. Jednou z metod je zastřihnout při odebírání vzorku tkáně ocasní ploutev různě (např. dorzální nebo ventrální špičku).

▼M8

41. Genotypové pohlaví halančíka japonského se určí identifikovaným a sekvenovaným genem (*dmy*), který je umístěn na chromozomu Y. Přítomnost *dmy* indikuje jedince XY, a to bez ohledu na fenotyp, zatímco nepřítomnost *dmy* indikuje jedince XX, a to bez ohledu na fenotyp (30); (31). Z každé odstřižené ploutve se extrahuje kyselina deoxyribonukleová (DNA) a přítomnost nebo nepřítomnost genu *dmy* se určí metodami polymerázové řetězové reakce (PCR) (viz dodatek 9 v kapitole C.41 této přílohy nebo dodatek 3 a 4 v (29).

Sestavení chovných párů

42. Informace o fenotypovém pohlaví se použijí k sestavení chovných párů XX-XY bez ohledu na externí fenotyp, který může být pozměněn expozicí zkoušené chemické látce. V den po stanovení genotypového pohlaví každé ryby se náhodně vyberou z každého replikátu dvě ryby XX a dvě ryby XY a sestaví se dva chovné páry XX-XY. Pokud v replikátu nejsou dvě ryby XX, případně dvě ryby XY, použije se vhodná ryba z jiných replikátů v rámci skupiny. Prioritou je mít doporučený počet replikovaných chovných párů (12) v každé expozici i v kontrolách (24). Při sestavování chovných párů se vyloučí ryby se zjevnými abnormalitami (problémy s plynovým měchýřem, páteřní deformity, extrémní odchylky velikosti atd.). V průběhu reprodukční fáze generace F1 by měla každá replikovaná nádrž obsahovat pouze jeden chovný pár.

Výběr vzorku nedospělých jedinců a hodnocení cílových parametrů

Výběr vzorku ryb netvořících chovný pár

43. Po přípravě chovných párů se ryby, které nebyly vybrány k dalšímu chovu, humánně usmrtí za účelem měření cílových parametrů nedospělých jedinců ve zkušebním týdnu 12–13 (F1). Je velice důležité, aby bylo s rybami zacházeno tak, aby bylo stále možné vysledovat genotypové pohlaví stanovené pro výběr chovných párů k jednotlivým rybám. Všechny shromážděné údaje se analyzují v rámci genotypového pohlaví konkrétní ryby. Každá ryba se použije pro měření nejrůznějších cílových parametrů, včetně: stanovení míry přežití juvenilních/nedospělých ryb (zkušební týdny 7–12/13 (F1)), nárůstu délky (standardní délka se může měřit, jestliže byla ocasní ploutev zkrácená v rámci výběru vzorku pro analýzu genetického pohlaví. Celková délka se může měřit, jestliže byl odebrán vzorek pouze části ocasní ploutve, dorzální nebo ventrální, pro stanovení genu *dmy*) a tělesné hmotnosti (tj. hmotnost ve vlhkém stavu, po osušení do sucha), jaterní *vtg* mRNA (nebo VTG) a papil řitní ploutve (viz tabulky 1 a 2). Nezapomeňte, že hmotnost a délka chovných párů je potřebná také pro výpočet středního růstu v expoziční skupině.

Odběr tkáňových vzorků a měření vitelogeninu

44. Játra se vypreparují a uloží při teplotě ≤ –70 °C až do doby měření *vtg* mRNA (neboVTG). Ocas ryby, včetně řitní ploutve, se konzervuje ve vhodné fixační látce (např. Davidsonův roztok) nebo se vyfotografuje, aby bylo možné později spočítat papily na řitní ploutvi. V tomto okamžiku mohou být odebrány i vzorky jiných tkání (tj. gonád) a uchovány. Koncentrace jaterní VTG se kvantifikuje metodou homologní ELISA (viz doporučené postupy pro halančíka japonského v dodatku 6 v kapitole C.48 této přílohy). Alternativně byly americkou agenturou EPA stanoveny metody pro kvantifikaci mRNA vtg, tj. extrakce mRNA genu *vtg I* ze vzorku jater a kvantifikace počtu kopií genu *vtg I* (na ng celkové mRNA) kvantitativní PCR (29).

▼M8

Místo stanovování počtu kopií genu *vtg* v kontrolní skupině a v expoziční skupině je metodou méně náročnou na zdroje i méně technicky obtížnou stanovit relativní (násobnou) změnu exprese *vtg I* z kontrolní skupiny a expoziční skupiny.

Druhotné pohlavní znaky

45. Za normálních okolností má papily, které se vyvinou na článcích některých paprsků řitní ploutve jako druhotná pohlavní charakteristika, pouze pohlavně dospělý sameček halančíka japonského, což představuje potenciální biomarker endokrinních disruptivních účinků. Metoda počítání papil na řitní ploutvi (počet článků s papilami) je uvedena v dodatku 8. Počet papil na řitní ploutvi u jednotlivce se také používá pro účely výpočtu jednoduchého podílu pohlaví v replikátu jako ukazatel, že daný jednotlivec je externě fenotypový sameček nebo samička. Halančík japonský s libovolným počtem větším než 0 je definován jako sameček; halančík japonský bez papil (0 papil) na řitní ploutvi je definován jako samička.

Posouzení plodivosti a fertility

46. Plodivost a fertilita se posuzují ve zkušebních týdnech 1 až 3 v generaci F0 a ve zkušebních týdnech 15 až 17 v generaci F1. Vajíčka od každého chovného páru se sbírají denně během 21 po sobě jdoucích dnů. Vajíčka se každé ráno jemně uvolní z vylovených samiček anebo se vysají ze dna akvária. Plodivost i fertilita se zaznamenávají denně pro každý replikovaný chovný pár. Plodivost je definována jako počet vytřených vajíček a fertilita je funkčně definována jako počet oplodněných a životaschopných vajíček v době počítání. Počítání by se mělo provést co nejdříve po sběru vajíček.

47. Plodivost replikátu se zaznamenává denně jako počet vajíček na chovný pár a analyzuje se podle doporučených statistických postupů s použitím středních hodnot replikátů. Fertilita replikátu je součet počtu fertilních vajíček vyprodukovaných chovným párem děleno součtem počtu vajíček vyprodukovaných tímto párem. Statistická fertilita se analyzuje jako podíl na replikát. Líhnivost replikátu je počet plůdků děleno počtem nasazených embryí (obvykle 20). Statistická líhnivost se analyzuje jako podíl na replikát.

Výběr vzorku dospělých jedinců a hodnocení cílových parametrů

Odběr vzorků chovných párů

48. Po zkušebním týdnu 17 (tj. po úspěšném zahájení generace F2) se dospělí jedinci z generace F1 humánně usmrtí a hodnotí se různé sledované parametry (viz tabulky 1 a 2). Pořídí se obrazový záznam řitní ploutve pro posouzení papil na řitní ploutvi (viz dodatek 8) a/nebo se odebere ocas bezprostředně za kloakou a fixuje se pro pozdější spočítání papil. V tomto okamžiku může být případně odebrán vzorek části ocasní ploutve a archivován pro ověření genetického pohlaví (*dmy*). V případě potřeby může být odebrán vzorek tkáně pro zopakování analýzy *dmy* za účelem ověření genetického pohlaví konkrétní ryby. Před ponořením celého těla do fixační látky se otevře tělní dutina, aby byla umožněna perfúze příslušnými fixačními látkami (např. Davidsonův roztok). Pokud je však před fixací proveden vhodný permeabilizační krok, není třeba tělní dutinu otevírat.

▼**M8**

Histopatologie

49. Každá ryba se histologicky vyšetří, zda gonadální tkáň není patologická (30), (29). Jak je zmíněno v odstavci 33, mohou být další mechanistické parametry hodnocené v této analýze (tj. VTG, SSC a některé gonadální histopatologické účinky) ovlivněny systémovou či jinou toxicitou. Proto může být také detailně posuzována histopatologie jater a ledvin, což pomůže lépe pochopit odpovědi u mechanistických cílových parametrů. I když se však neprovedou tato podrobná hodnocení, je třeba přesto zaznamenávat a vykázat hrubé abnormality zpozorované náhodně při histopatologickém vyšetření. Lze zvážit „odečet“ od skupiny s nejvyšší expozicí (v porovnání s kontrolou) do expozice bez účinku, doporučuje se však histopatologický postup konzultovat (29). Obvykle se zpracují/preparují všechny vzorky a poté je posoudí patolog. Při použití „odečtové“ metody nezapomeňte, že postup podle Rao-Scotta a Cochrane-Armitage využívající dílčí testy (RSCABS) používá předpoklad, že se zvyšováním úrovně dávky se zvyšuje také biologický dopad (patologie). Síla analýzy se tedy ztratí, pokud bude posuzována pouze jedna vysoká dávka bez středně velkých dávek. Pokud není nezbytné provádět statistickou analýzu, aby mohlo být rozhodnuto, že vysoká dávka nemá žádný účinek, je tento postup přijatelný. Z tohoto hodnocení se odvodí také gonádový fenotyp.

Další pozorování

50. Zkouška MEOGRT poskytuje údaje, které mohou být použity (např. při analýze průkaznosti výsledků) pro současné hodnocení alespoň dvou obecných typů drah nežádoucích účinků (AOP), které končí narušením reprodukční funkce: a) endokrinně mediované dráhy zahrnující narušení endokrinní osy hypotalamus-hypofýza-gonády (HPG) a b) dráhy, které působí snížení přežití, růstu (délky a hmotnosti) a rozmnožování prostřednictvím neendokrinně mediované toxicity. V této zkoušce jsou zahrnuty také parametry obvykle měřené ve zkouškách chronické toxicity, jako je zkouška celého vývojového cyklu a zkouška raných vývojových stádií, a tyto parametry mohou být použity na vyhodnocení nebezpečnosti, kterou představují neendokrinně mediované toxické způsoby účinku i endokrinně mediované dráhy toxicity. V průběhu zkoušky by se mělo provádět denně pozorování chování a každé neobvyklé chování by se mělo zaznamenat. Dále by se měla zaznamenat veškerá mortalita a přežití do redukce ryb (zkušební týden 6/7), přežití po redukci do odběru vzorku nedospělých jedinců (v týdnu 9–10 po fertilizaci) a vypočítat přežití od spárování do odběru vzorku dospělých ryb.

Tabulka 1

Přehled sledovaných parametrů u zkoušky MEOGRT (*)

Vývojové stádium	Ukazatel	Generace
Embryo (2 týdny po fertilizaci)	Vylíhnutí (% a doba do vylíhnutí)	F1, F2
Mladé ryby (4 týdny po fertilizaci)	Přežití	F1
Nedospělé ryby (9 nebo 10 týdnů po fertilizaci)	Přežití	F1
	Růst (délka a hmotnost)	

▼M8

Vývojové stádium	Ukazatel	Generace
	Vitelogenin (mRNA nebo bílkovina)	
	Druhotné pohlavní znaky (papily na řitní ploutvi)	
	Poměr pohlaví podle vnějších znaků	
	Doba do 1. vytření	
Dospělý jedinec (12–14 týdnů po fertilizaci)	Reprodukce (plodivost a fertilita)	F0, F1
Dospělý jedinec (15 týdnů po fertilizaci)	Přežití	F1
	Růst (délka a hmotnost)	
	Druhotné pohlavní znaky (papily na řitní ploutvi)	
	Histopatologie (gonády, játra, ledviny)	

(*) Tyto parametry se statisticky analyzují.

HARMONOGRAM

51. Harmonogram zkoušky MEOGRT znázorněný v tabulce 2 ukazuje průběh zkoušky. Zkouška MEOGRT zahrnuje 4 týdny expozice do vývoje dospělých jedinců generace F0, 15 týdnů expozice do generace F1 a dobu expozice pro druhou generaci (F2) až do vylíhnutí (2 týdny pro fertilizaci). Průběh zkoušky MEOGRT je shrnut v dodatku 9.

Tabulka 2

Harmonogram expozice a měření sledovaných parametrů u zkoušky MEOGRT

Harmonogram expozice a sledované parametry u zkoušky MEOGRT																				
F0	1	2	3	4																
F1				1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15		
F2																		1	2	
Týden	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	
Vývojové stádium					**Embryo**					**Larva**					**Mladá ryba**			**Nedospělá ryba**	**Dospělá ryba**	
Sledované vlastnosti																				
Plodnost	F_0														F_1					
Fertilita	F_0														F_1					
Vylíhnutí					F_1														F_2	
Přežití						F_1						F_1						F_1		
Růst				F_0								F_1						F_1		
Vitelogenin												F_1								
Druhotné pohlavní znaky												F_1						F_1		
Histopatologie																		F_1		
Zkušební týden	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	

- Uspořádání experimentu má 7 skupin replikátů
  - 5 pro expozici zkoušené chemické látce
  - 2 pro kontrolní expozici (4, pokud je použito rozpouštědlo)
- Uspořádání v rámci skupiny
  - 12 replikátů pro reprodukci, patologii a SSC dospělých jedinců (týdny 10 až 18)
  - 6 replikátů pro vylíhnutí, přežití, Vtg a - SSC a růst nedospělých jedinců (týdny 1 až 9)

SSC: druhotné pohlavní znaky; Wks: týdny;
Vtg: vitelogenin

▼M8

ÚDAJE A PŘEDKLÁDÁNÍ ZPRÁV

Statistická analýza

52. Protože se pro všechny pokusné ryby stanoví genotypové pohlaví, je třeba údaje analyzovat pro každé genotypové pohlaví samostatně (tj. sameči XY a samičky XX). V opačném případě by se výrazně snížila statistická síla jakékoli analýzy. Statistická analýza údajů by se pokud možno měla řídit postupy, které jsou popsány v dokumentu OECD *Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application* (32) (Současné přístupy ke statistické analýze dat týkajících se údajů o ekotoxicitě: Pokyny k použití). Další pokyny ke statistické analýze jsou uvedeny v dodatku 10.

53. Uspořádání experimentu a výběr statistických testů by měl umožňovat dostatečnou průkaznost zkoušky, aby se zjistily změny biologického významu v ukazatelích, u nichž má být uvedena hodnota NOEC (32). Vykazování příslušných koncentrací vyvolávajících účinky a příslušných parametrů může záviset na regulačním rámci. Je třeba určit procentuální změnu u každého ukazatele, který má být zjištěn nebo odhadnut. Aby to bylo možné, mělo by být uspořádání experimentu přesně přizpůsobeno. Není pravděpodobné, že stejná procentuální změna platí pro všechny ukazatele, a není ani pravděpodobné, že je možné naplánovat proveditelný experiment, který splní tato kritéria u všech ukazatelů. Za účelem naplánování experimentu vhodným způsobem je proto důležité zaměřit se na ty ukazatele, které jsou důležité pro daný experiment. V dodatku 10 je uvedeno statistické schéma a pokyny, které jsou vodítkem při zpracování údajů a při výběru nejvhodnějšího statistického testu nebo modelu, který má být použit. Mohou být použity i jiné statistické metody za předpokladu, že jsou vědecky odůvodněné.

54. Bude nezbytné analyzovat rozdíly v rámci každé sady opakování pomocí analýzy rozptylu nebo pomocí kontingenční tabulky a na základě této analýzy použít dostatečné, vhodné metody statistické analýzy. K vícenásobnému porovnání výsledků pro jednotlivé koncentrace a pro kontrolní skupiny se doporučuje test sestupného trendu (např. Jonckheerův-Terpstrův test) pro kontinuální odpovědi. Nejsou-li údaje v souladu s monotónní odpovědí na koncentraci, je třeba použít Dunnettův test nebo Dunnův test (v případě potřeby po adekvátní transformaci dat).

55. U plodivosti se vajíčka počítají denně, ale analýza může být provedena jako celkový počet vajíček nebo jako opakované měření. Podrobnosti o analyzování tohoto parametru jsou uvedeny v dodatku 10. Pro histopatologické údaje, které jsou ve formě stupně závažnosti, byl vypracován nový statistický test, Rao-Scottův, Cochranův-Armitageův test využívající dílčí testy (RSCABS) (33).

56. Všechny sledované parametry pozorované při expozicích chemické látce, které jsou významně odlišné od příslušných kontrol, je třeba vykázat.

Poznámky k analýze dat

Použití zpochybněných úrovní expozice

57. Při určování toho, zda opakování nebo celá expozice vykazují zjevnou toxicitu a měly by být z analýzy vyřazeny, se zvažuje několik faktorů. Zjevná toxicita je definována jako > 4 úhyny v každém opakování mezi týdnem 3 a 9 po fertilizaci, které nelze vysvětlit technickou chybou. Jiné příznaky zjevné toxicity zahrnují krvácení, nestandardní chování, nestandardní

▼M8

plavání, anorexii a jakékoli jiné klinické příznaky choroby. Při subletálních příznacích toxicity mohou být nezbytná kvalitativní hodnocení, která by měla být vždy prováděna ve srovnání s kontrolní skupinou v ředicí vodě (pouze čistá voda). Jestliže nejvyšší expozice vykazuje (vykazují) zjevnou toxicitu, doporučuje se, aby byly tyto expozice z analýzy cenzurovány.

Kontroly s rozpouštědlem

58. Použití rozpouštědla by mělo být zvažováno pouze jako poslední možnost, když byly uváženy všechny ostatní možnosti dávkování chemické látky. Je-li použito rozpouštědlo, měla by být souběžně provedena u kontrolní skupiny zkouška s ředicí vodou. Při ukončení zkoušky je třeba provést hodnocení případných účinků rozpouštědla. To se provede pomocí statistického srovnání kontrolní skupiny s rozpouštědlem a kontrolní skupiny s ředicí vodou. Nejdůležitějšími ukazateli, které je třeba při této analýze posoudit, jsou determinanty růstu (hmotnost), jelikož tyto ukazatele mohou být ovlivněny generalizovanými toxicitami. Jsou-li zaznamenány statisticky významné rozdíly v těchto ukazatelích mezi kontrolní skupinou s ředicí vodou a kontrolní skupinou s rozpouštědlem, je třeba odborně posoudit, zda je platnost zkoušky zpochybněna. Jestliže se tyto dvě kontroly liší, je třeba skupiny exponované chemické látce porovnávat s kontrolou s rozpouštědlem, pokud není známo, že je vhodnější porovnání s kontrolou s ředicí vodou. Není-li zaznamenán žádný statisticky významný rozdíl mezi oběma kontrolními skupinami, doporučuje se porovnávat skupiny exponované zkoušené chemické látce se sloučenými skupinami (kontrola s rozpouštědlem a kontrola s ředicí vodou), pokud není známo, že je vhodnější buď porovnání pouze s kontrolou s ředicí vodou, nebo pouze s kontrolní skupinou s rozpouštědlem.

ZÁVĚREČNÁ ZPRÁVA

59. Závěrečná zpráva by měla obsahovat:

Zkoušená chemická látka: fyzikální povaha a (je-li to podstatné) fyzikálně-chemické vlastnosti,

— údaje o chemické identifikaci.

Jednosložková látka:

— fyzický vzhled, rozpustnost ve vodě a další relevantní fyzikálně-chemické vlastnosti.

— chemická identifikace, např. název podle IUPAC nebo CAS, číslo CAS, kód SMILES nebo InChI, strukturní vzorec, čistota, popřípadě chemická identita nečistot, je-li to prakticky proveditelné atd. (včetně obsahu organického uhlíku, je-li měřen).

Vícesložková látka, UVCB a směsi:

— charakterizované pokud možno chemickou identitou (viz výše), kvantitativním výskytem a relevantními fyzikálně-chemickými vlastnostmi složek.

Zkušební druh:

— vědecký název, kmen, je-li k dispozici, zdroj a metoda sběru oplodněných jiker a následné zpracování.

Zkušební podmínky:

— fotoperioda (fotoperiody),

— uspořádání zkoušky (např. velikost nádrže, materiál a objem vody, počet zkušebních nádrží a jejich replikátů, počet plůdků v každém replikátu),

▼**M8**

— metoda přípravy zásobních roztoků a četnost obnovování (je-li použito, mělo by se uvést solubilizační činidlo a jeho koncentrace),

— metoda dávkování zkoušené chemické látky (např. čerpadla, ředicí systémy),

— výtěžnost metody a nominální zkušební koncentrace, mez stanovitelnosti, střední hodnoty naměřených hodnot ve zkušebních nádržích a jejich směrodatné odchylky a metody jejich stanovení a doklad toho, že naměřené koncentrace odpovídají koncentracím zkoušené chemické látky ve skutečném roztoku,

— charakteristiky ředicí vody: hodnota pH, tvrdost, teplota, koncentrace rozpuštěného kyslíku, koncentrace zbytkového chloru (je-li měřena), obsah celkového organického uhlíku (je-li měřen), obsah suspendovaných látek (je-li měřen), salinita zkušebního média (je-li měřena) a výsledky jakýchkoli jiných provedených měření,

— nominální zkušební koncentrace, střední hodnoty naměřených koncentrací ve zkušebních nádobách a jejich směrodatné odchylky,

— kvalita vody ve zkušebních nádržích, pH, teplota (denně) a koncentrace rozpuštěného kyslíku,

— podrobné informace o krmení (např. druh krmiva (krmiv), původ, podávané množství a frekvence krmení).

Výsledky:

— doklady o tom, že kontrolní skupiny splnily celková kritéria validity,

— následující údaje o kontrolních (plus kontrole s rozpouštědlem, když je použita) a expozičních skupinách: líhnutí (líhnivost a doba do vylíhnutí) pro generace F1 a F2, přežití po vylíhnutí u generace F1, růst (délka a tělesná hmotnost) u generace F1, genotypové pohlaví a rozlišení pohlaví (např. druhotné pohlavní znaky podle papil na řitní ploutvi a histologie gonád) u generace F1, fenotypové pohlaví u generace F1, druhotné pohlavní znaky (papily na řitní ploutvi) u generace F1, mRNA *vtg* (nebo bílkovina VTG) u generace F1, histopatologické vyšetření (gonády, játra a ledviny) u generace F1 a reprodukce (plodivost a fertilita) u generace F0, F1, (viz tabulky 1 a 2),

— metoda statistické analýzy (regresní analýza nebo analýza rozptylu) a zpracování údajů (použité statistické testy a modely),

— koncentrace bez pozorovaných účinků (NOEC) pro každou posuzovanou odpověď,

— nejnižší koncentrace s pozorovaným účinkem (LOEC) pro každou posuzovanou odpověď (při p = 0,05), případně hodnoty EC_x pro každou posuzovanou odezvu a intervaly spolehlivosti (např. 90 % nebo 95 %) a graf proloženého modelu použitý pro jejich výpočet, směrnice křivky koncentrace-odezva, vzorec regresního modelu, odhadované parametry modelu a jejich směrodatné odchylky,

— všechny odchylky od této zkušební metody a odchylky od kritérií přijatelnosti a dále poznámky k potenciálním důsledkům na výsledek zkoušky.

▼M8

60. U výsledků měření sledovaných ukazatelů by měly být uvedeny střední hodnoty a jejich směrodatné odchylky (pokud možno pro jednotlivé replikáty i koncentrace).

LITERATURA

(1) OECD (2012a). Fish Toxicity Testing Framework, Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 171), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(2) Padilla S, Cowden J, Hinton DE, Yuen B, Law S, Kullman SW, Johnson R, Hardman RC, Flynn K and Au DWT. (2009). Use of Medaka in Toxicity Testing. Current Protocols in Toxicology 39: 1-36.

(3) OECD (2012b). Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Endocrine Disrupters. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 150), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(4) Benoit DA, Mattson VR, Olson DL. (1982). A Continuous-Flow Mini-Diluter System for Toxicity Testing. Water Research 16: 457–464.

(5) Yokota H, Tsuruda Y, Maeda M, Oshima Y, Tadokoro H, Nakazono A, Honjo T and Kobayashi K. (2000). Effect of Bisphenol A on the Early Life Stage in Japanese Medaka (*Oryzias Latipes*). Environmental Toxicology and Chemistry 19: 1925-1930.

(6) Yokota H, Seki M, Maeda M, Oshima Y, Tadokoro H, Honjo T and Kobayashi K. (2001). Life-Cycle Toxicity of 4-Nonylphenol to Medaka (*Oryzias Latipes*). Environmental Toxicology and Chemistry 20: 2552-2560.

(7) Kang IJ, Yokota H, Oshima Y, Tsuruda Y, Yamaguchi T, Maeda M, Imada N, Tadokoro H and Honjo T. (2002). Effects of 17β-Estradiol on the Reproduction of Japanese Medaka (*Oryzias Latipes*). Chemosphere 47: 71–80.

(8) Seki M, Yokota H, Matsubara H, Tsuruda Y, Maeda M, Tadokoro H and Kobayashi K. (2002). Effect of Ethinylestradiol on the Reproduction and Induction of Vitellogenin and Testis-Ova in Medaka (*Oryzias Latipes*). Environmental Toxicology and Chemistry 21: 1692-1698.

(9) Seki M, Yokota H, Matsubara H, Maeda M, Tadokoro H and Kobayashi K. (2003). Fish Full Life-Cycle Testing for the Weak Estrogen 4-T*ert*-Pentylphenol on Medaka (*Oryzias Latipes*). Environmental Toxicology and Chemistry 22: 1487-1496.

(10) Hirai N, Nanba A, Koshio M, Kondo T, Morita M and Tatarazako N. (2006a). Feminization of Japanese Medaka (*Oryzias latipes*) Exposed to 17β-Estradiol: Effect of Exposure Period on Spawning Performance in Sex-Transformed Females. Aquatic Toxicology 79: 288-295.

(11) Hirai N, Nanba A, Koshio M, Kondo T, Morita M and Tatarazako N. (2006b). Feminization of Japanese Medaka (*Oryzias latipes*) Exposed to 17β-Estradiol: Formation of Testis-Ova and Sex-Transformation During Early-Ontogeny. Aquatic Toxicology 77: 78-86.

(12) Nakamaura A, Tamura I, Takanobu H, Yamamuro M, Iguchi T and Tatarazako N. (2015). Fish Multigeneration Test with Preliminary Short-Term Reproduction Assay for Estrone Using Japanese Medaka (*Oryzias Latipes).* Journal of Applied Toxicology 35:11-23.

(13) U.S. Environmental Protection Agency (2013). Validation of the Medaka Multigeneration Test: Integrated Summary Report. Dostupné na: http://www.epa.gov/scipoly/sap/meetings/2013/062513meeting.html.

(14) Adolfsson-Erici M, Åkerman G, Jahnke A, Mayer P and McLachlan M. (2012). A Flow-Through Passive Dosing System for Continuously Supplying Aqueous Solutions of Hydrophobic Chemicals to Bioconcentration and Aquatic Toxicity Tests. Chemosphere 86: s. 593-599.

▼**M8**

(15) OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 23.), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(16) Hutchinson TH., Shillabeer N., Winter MJ and Pickford DB. (2006). Acute and Chronic Effects of Carrier Solvents in Aquatic Organisms: A Critical Review. Review. Aquatic Toxicology 76: 69–92.

(17) Denny JS, Spehar RL, Mead KE and Yousuff SC. (1991). Guidelines for Culturing the Japanese Medaka, *Oryzias latipes*. US EPA/600/3-91/064.

(18) Koger CS, Teh SJ and Hinton DE. (1999). Variations of Light and Temperature Regimes and Resulting Effects on Reproductive Parameters in Medaka (*Oryzias Latipes*). Biology of Reproduction 61: 1287-1293.

(19) Kinoshita M, Murata K, Naruse K and Tanaka M. (2009). Medaka: Biology, Management, and Experimental Protocols, Wiley- Blackwell.

(20) Gormley K and Teather K. (2003). Developmental, Behavioral, and Reproductive Effects Experienced by Japanese Medaka in Response to Short-Term Exposure to Endosulfan. Ecotoxicology and Environmental Safety 54: s. 330-338.

(21) Kapitola C.15 této přílohy, Zkouška krátkodobé toxicity na rybím embryu a váčkovém plůdku.

(22) Kapitola C.37 této přílohy, 21denní zkouška na rybách: krátkodobý screening estrogenní a androgenní aktivity a inhibice aromatázy.

(23) Kapitola C.41 této přílohy, Zkouška pohlavního vývoje ryb.

(24) Kapitola C.48 této přílohy: Krátkodobá zkouška působení na reprodukci ryb.

(25) Kapitola C.47 této přílohy, Zkouška toxicity v raných fázích života ryb.

(26) Kapitola C.49 této přílohy, Zkouška akutní toxicity na rybích embryích (FET).

(27) Wheeler JR, Panter GH, Weltje L and Thorpe KL. (2013). Test Concentration Setting for Fish *In Viv*o Endocrine Screening Assays. Chemosphere 92: 1067-1076.

(28) Tatarazako N, Koshio M, Hori H, Morita M and Iguchi T. (2004). Validation of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Method for Vitellogenin in the Medaka. Journal of Health Science 50: 301-308.

(29) OECD (2015). Guidance Document on Medaka Histopathology Techniques and Evaluation. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 227). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(30) Nanda I, Hornung U, Kondo M, Schmid M and Schartl M. (2003). Common Spontaneous Sex-Reversed XX Males of the Medaka *Oryzias Latipes*. Genetics 163: 245–251.

(31) Shinomiya, A, Otake H. Togashi K. Hamaguchi S and Sakaizumi M. (2004). Field Survey of Sex-Reversals in the Medaka, *Oryzias Latipes*: Genotypic Sexing of Wild Populations, Zoological Science 21: s. 613-619.

(32) OECD (2014). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A guidance to application (annexes to this publication exist as a separate document), OECD Publishing, Paris.

(33) Green JW, Springer TA, Saulnier AN and Swintek J. (2014). Statistical Analysis of Histopathology Endpoints. Environmental Toxicology and Chemistry 33: 1108-1116.

▼M8

Dodatek 1

DEFINICE

Chemická látka: látka nebo směs

ELISA: enzymová imunosorpční analýza

Plodivost = počet vajíček

Fertilita = počet životaschopných vajíček/plodivost

Délka k vidlici (FL) označuje délku od špičky tlamy po průsečík paprsků ocasní ploutve a používá se u ryb, u kterých je obtížné určit, kde končí páteř (www.fishbase.org)

Líhnivost = plůdky/počet embryí nasazených do inkubátoru

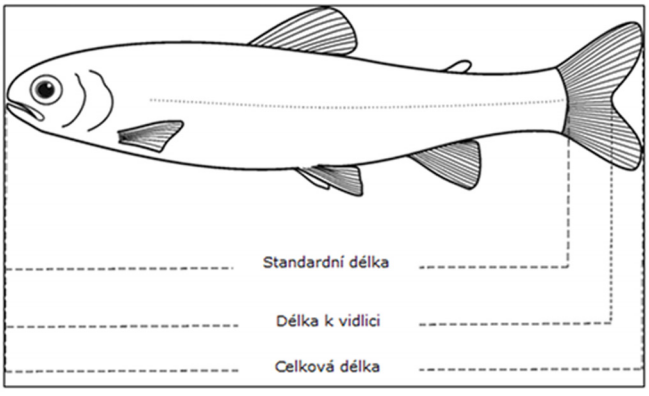
IACUC: Institutional Animal Care and Use Committee (Instituciální výbor pro péči o zvířata a jejich používání)

Standardní délka (SL) označuje délku ryby měřenou od špičky tlamy po konec posledního obratle nebo po konec ocasního násadce ve střední části. Jednoduše řečeno, tato míra nezahrnuje délku ocasní ploutve (www.fishbase.org).

Celková délka (TL) označuje délku od špičky tlamy po konec delšího laloku ocasní ploutve, obvykle měřenou s laloky sevřenými podél střední linie. Je to míra po přímce, neměří se přes zaoblení těla (www.fishbase.org).

Obrázek 1

Popis různých používaných délek



EC_x: (účinná koncentrace s x% účinkem) je koncentrace, která vyvolá x% účinek u zkušebních organismů během dané expoziční doby ve srovnání s kontrolou. Například EC_{50} je koncentrace odhadnutá pro vyvolání účinku na zkoušený ukazatel u 50 % exponované populace za stanovenou expoziční dobu.

Průtoková metoda je zkouška, při níž zkušební roztoky plynule protékají zkušebním systémem po celou dobu trvání expozice.

Osa HPG: hypothalamo-hypofýzo-gonadální osa.

▼**M8**

IUPAC: International Union of Pure and Applied Chemistry (Mezinárodní unie pro čistou a užitou chemii).

Velikost násady: živá hmotnost ryb na jednotku objemu vody.

Nejnižší koncentrace s pozorovaným účinkem (LOEC) je nejnižší zkušební koncentrace zkoušené chemické látky, při níž je pozorován statisticky významný účinek zkoušené látky ve srovnání s kontrolou (při $p < 0,05$). Všechny zkušební koncentrace vyšší než LOEC musí však mít stejné nebo závažnější škodlivé účinky, než jsou účinky pozorované při koncentraci LOEC. Nelze-li tyto dvě podmínky splnit, mělo by být podrobně vysvětleno, jak byla LOEC (a tedy i NOEC) zvolena. Pokyny jsou uvedeny v dodatku 5 a 6.

Medián letální koncentrace (LC_{50}): je koncentrace zkoušené chemické látky, která usmrtí přibližně 50 % zkušebních organismů během celé zkoušky.

Koncentrace bez pozorovaných účinků (NOEC) je zkušební koncentrace bezprostředně nižší než LOEC, která při srovnání s kontrolou nemá pro danou expoziční dobu statisticky významný účinek (při $p < 0,05$).

SMILES: Simplified Molecular Input Line Entry Specification (Zjednodušená molekulární specifikace pro vstupní řádky).

Hustota obsádky: počet ryb na jednotku objemu vody.

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

UVCB: látky s neznámým nebo proměnlivým složením, komplexní reakční produkty nebo biologický materiál.

VTG: vitelogenin je fosfolipoglykoprotein, prekurzor proteinů vaječného žloutku, který se obvykle vyskytuje u sexuálně aktivních samiček všech vejcorodých druhů.

WPF: týdny po fertilizaci.

▼**M8**

Dodatek 2

NĚKTERÉ CHEMICKÉ CHARAKTERISTIKY DOPORUČENÉ ŘEDICÍ VODY

Látka	Koncentrační limit
Pevné částice	5 mg/l
Celkový obsah organického uhlíku	2 mg/l
Neionizovaný amoniak	1 µg/l
Zbytkový chlor	10 µg/l
Celkové organofosforové pesticidy	50 ng/l
Celkový obsah organochlorových pesticidů a polychlorovaných bifenylů	50 ng/l
Celkový obsah organického chloru	25 ng/l
Hliník	1 µg/l
Arsen	1 µg/l
Chrom	1 µg/l
Kobalt	1 µg/l
Měď	1 µg/l
Železo	1 µg/l
Olovo	1 µg/l
Nikl	1 µg/l
Zinek	1 µg/l
Kadmium	100 ng/l
Rtuť	100 ng/l

▼**M8**

Dodatek 3

ZKUŠEBNÍ PODMÍNKY PRO ZKOUŠKU MEOGRT

1.	Doporučený druh	Halančík japonský (*Oryzias latipes*)
2.	Typ zkoušky	Kontinuální průtok
3.	Teplota vody	Nominální teplota při zkoušce je 25 °C. Střední teplota po celou dobu zkoušky v každé nádrži je 24–26 °C.
4.	Kvalita osvětlení	Fluorescenční zářivky (širokospektrální a ~ 150 lumen/m^2) (~ 150 lux).
5.	Fotoperioda	16 h světlo: 8 h tma
6.	Velikost násady	F0: 2 dospělé ryby/replikát; F1: zahajuje se maximálně s 20 vajíčky (embryi)/replikát, redukuje se na 12 embryí/replikát při vylíhnutí a poté 2 dospělé ryby (chovný pár XX-XY) v týdnu 9–10 pro reprodukční fázi
7.	Minimální využitelný objem zkušební komory	1,8 l (např. velikost zkušební komory: 18 x 9 x 15 cm)
8.	Výměna objemu zkušebních roztoků	Minimálně 5násobek objemu/den a maximálně 16násobek objemu/den (nebo průtok 20 ml/min)
9.	Stáří zkušebních organismů při zahájení	F0: > 12 týdnů po fertilizaci, ale doporučuje se nepřekračovat 16 týdnů po fertilizaci
10.	Počet organismů na replikát	F0: 2 ryby (pár samička a sameček); F1: maximálně 20 ryb (vajíček)/replikát (vyprodukovaných chovnými páry z generace F0 a F1).
11.	Počet expozic	5 expozic zkoušené chemické látce plus příslušná kontrola (kontroly)
12.	Počet replikátů pro každou expozici	Minimálně 6 replikátů na expozici u zkoušené chemické látky a minimálně 12 replikátů u kontrol a u kontroly s rozpouštědlem, pokud je použita (počet replikátů se v reprodukční fázi u generace F1 zdvojnásobí)
13.	Počet organismů na zkoušku	Minimálně 84 ryb v generaci F0 a 504 v generaci F1. (Je-li použita kontrola s rozpouštědlem, pak 108 ryb v generaci F0 a 648 ryb v generaci F1.) Počítanou jednotkou je post-eleutheroembryo.
14.	Krmný režim	Ryby se krmí libovolně dlouho žábronožkou, rod *Artemia,* (24 hodin staré larvy) a v případě potřeby doplňkově komerčně dostupným vločkovým krmivem. (Příklad krmného plánu pro zajištění adekvátního růstu a vývoje na podporu silné reprodukce lze nalézt v dodatku 5.)

▼**M8**

15. Provzdušňování	Žádné, pokud rozpuštěný kyslík neklesne pod 60 % hodnoty saturace vzduchu.
16. Ředicí voda	Čistá povrchová, studniční nebo rekonstituovaná voda nebo odchlorovaná vodovodní voda.
17. Doba expozice	Primárně 19 týdnů (od generace F0 do vylíhnutí generace F2)
18. Biologické ukazatele (primární)	Líhnivost (F1 a F2); přežití (F1, od vylíhnutí do týdne 4 po fertilizaci (konec larválního stádia / začátek stádia mladých ryb), od týdne 4 do týdne 9 (nebo 10) po fertilizaci (začátek stádia mladých ryb do stádia nedospělých ryb) a od týdne 9 do týdne 15 po fertilizaci (nedospělé ryby až do ukončení zkoušky u dospělých ryb)); růst (F1, délka a hmotnost v týdnu 9 a 15 po fertilizaci); druhotné pohlavní znaky (F1, papily na řitní ploutvi v týdnu 9 a 15 po fertilizaci); vitelogenin (F1, mRNA *vtg* nebo bílkovina VTG v týdnu 15 po fertilizaci); fenotypové pohlaví (F1, prostřednictvím histologického vyšetření gonád v týdnu 15 po fertilizaci); rozmnožování (F0 a F1, plodivost a fertilita po dobu 21 dnů); doba do vytření (F1) a histopatologie (F1, gonády, játra a ledviny v týdnu 15 po fertilizaci)
19. Kritéria platnosti zkoušky	Rozpuštěný kyslík ≥ 60 % hodnoty nasycení vzduchem; střední teplota vody 24–26 °C po celou dobu zkoušky; úspěšná reprodukce ≥ 65 % samiček v kontrolní skupině (skupinách); střední denní plodivost ≥ 20 vajíček v kontrolní skupině (skupinách); líhnivost vajíček ≥ 80 % (průměr) v kontrolních skupinách (v každé generaci F1 a F2); přežití po vylíhnutí do týdne 3 po fertilizaci ≥ 80 % (průměr) a od týdne 3 po fertilizaci až do ukončení pro tuto generaci ≥ 90 % (průměr) v kontrolních skupinách (F1), koncentrace zkoušené chemické látky v roztoku by měly být uspokojivě udržovány v rozmezí ± 20 % středních naměřených hodnot.

▼M8

Dodatek 4

POKYNY K TYPICKÝM KONTROLNÍM HODNOTÁM

Je třeba uvést, že tyto kontrolní hodnoty vycházejí z omezeného počtu validačních studií a s ohledem na další zkušenosti mohou být revidovány.

Růst

Hmotnost a délka se měří u všech vzorků ryb v týdnu 9 (nebo 10) a 15 po fertilizaci. Při dodržování tohoto protokolu bude očekávaná hmotnost za vlhka v týdnu 9 po fertilizaci 85–145 mg u samečků a 95–150 mg u samiček. Očekávaná hmotnost v týdnu 15 po fertilizaci je 250–330 mg u samečků a 280–350 mg u samiček. I když se u jednotlivých ryb mohou objevit značné odchylky od těchto rozmezí, střední kontrolní hmotnosti výrazně mimo uvedené rozmezí, zejména nižší, naznačují problémy s krmením, řízením teploty, kvalitou vody, nemocemi nebo kombinaci těchto faktorů.

Líhnutí

Úspěšnost líhnutí v kontrolních skupinách je obvykle kolem 90 %, ale ani tak nízké hodnoty, jako je 80 %, nejsou neobvyklé. Úspěšnost líhnutí menší než 75 % může ukazovat na nedostatečné míchání vyvíjejících se vajíček nebo neadekvátní péči o vajíčka, například odumřelá vajíčka nebyla včas odstraňována, což vedlo k napadení houbami.

Přežití

Míra přežití od vylíhnutí do týdne 3 po fertilizaci a po týdnu 3 po fertilizaci je u kontrolních skupin obvykle 90 % nebo více, ale ani tak nízká míra přežití v raných vývojových stádiích, jako je 80 %, není alarmující. Míra přežití v kontrolních skupinách menší než 80 % by měla vzbuzovat obavy a může naznačovat nedostatečné čištění akvária vedoucí k úhynu rybích larev z důvodu nemocí nebo udušení v důsledku nízkých hladin rozpuštěného kyslíku. Mortalita může být rovněž důsledkem poranění při čištění nádrže a ztráty rybích larev vypuštěním do odtoku z nádrže.

Gen Vitelogenin

I když se absolutní hladiny genu *vitelogenin* (*vtg*), vyjádřené jako kopie celkové mRNA, mezi jednotlivými laboratořemi mohou značně lišit v důsledku používaných postupů nebo nástrojů, měl by být poměr *vtg* přibližně 200krát větší u kontrolních samiček než u kontrolních samečků. Není neobvyklé, aby byl tento poměr vysoký i 1 000 až 2 000, avšak poměry menší než 200 jsou podezřelé a mohou naznačovat problémy s kontaminací vzorku nebo problémy s použitým postupem anebo reagenciemi.

Druhotné Pohlavní Znaky

U samečků je normální rozsah druhotných pohlavních znaků, definovaný jako celkový počet segmentů ploutevních paprsků papil na řitní ploutvi, 40–80 segmentů v týdnu 9–10 po fertilizaci. Do týdne 15 po fertilizaci by měl být rozsah u kontrolních samečků přibližně 80–120 a 0 u kontrolních samiček. Ve vzácných případech nemají někteří sameci z nevysvětlitelných důvodů do týdne 9 po fertilizaci žádné papily, ale protože do týdne 15 po fertilizaci se papily vyvinou u všech kontrolních samečků, je to s největší pravděpodobností způsobeno opožděným vývojem. Přítomnost papil u kontrolních samiček ukazuje přítomnost samečků XX v populaci.

▼**M8**

Samečci XX

Zdá se, že normální výskyt samečků XX v chovu je přibližně 4 % nebo méně při 25 °C, přičemž výskyt se zvyšuje se zvyšující se teplotou. Je třeba učinit opatření na minimalizaci podílu samečků XX v populaci. Protože se zdá, že výskyt samečků XX má genetickou složku a je tedy dědičný, je efektivním způsobem jak snížit výskyt samečků XX v populaci monitorování chovné zásoby a zajištění, aby samečci XX nebyli používáni na rozmnožování chovné zásoby.

Tření

Před posouzením plodivosti by mělo být u kontrolních replikátů denně monitorováno tření. Kontrolní páry mohou být kvalitativně posuzovány vizuálně, zda jeví známky tření. Do týdne 12–14 po fertilizaci by se měla většina kontrolních párů vytřít. Nízké počty párů, které se do této doby vytřely, ukazují na potenciální problémy se zdravotním stavem, vyspělostí nebo dobrými podmínkami ryb.

Plodivost

Zdravý, dobře živený halančík japonský se do týdne 12–14 po fertilizaci obvykle tře denně, přičemž každý den vyprodukuje 15 až 50 vajíček. 16 z doporučených 24 kontrolních chovných párů (> 65 %) by mělo vyprodukovat více než 20 vajíček na pár denně, ale může to být i 40 vajíček denně. Méně vajíček, než je uvedené množství, může ukazovat, že páry jsou nezralé, podvyživené nebo nezdravé.

Fertilita

Procento fertilních vajíček pro kontrolní páry je obvykle v rozsahu 90 %, přičemž hodnoty pohybující se kolem 95 % nebo více nejsou neobvyklé. Míry fertility menší než 80 % u kontrolních vajíček jsou podezřelé a mohou ukazovat na nezdravé jedince nebo horší než ideální podmínky chovu.

▼**M8**

Dodatek 5

PŘÍKLAD KRMNÉHO PLÁNU

Příklad krmného plánu, který zajišťuje adekvátní růst a vývoj na podporu robustní reprodukce, je uveden v tabulce 1. Lze připustit odchylky od tohoto krmného plánu, ale doporučuje se, aby byly otestovány za účelem ověření, že bude pozorován přijatelný růst a reprodukce. Aby byl dodržen navrhovaný krmný plán, je třeba před zahájením zkoušky stanovit hmotnost sušiny žábronožky v objemu žábronožky ve formě kaše. Lze to provést zvážením definovaného objemu kaše žábronožky, která byla vysušována po dobu 24 hodin při 60 °C na předem zvážených miskách. Za účelem zohlednění hmotnosti solí v kaši je třeba vysušit stejný objem stejného solného roztoku použitého v kaši, zvážit jej a odečíst od hmotnosti vysušené kaše žábronožky. Alternativně je možné žábronožku před vysušením přefiltrovat a propláchnout destilovanou vodou, čímž se eliminuje nutnost stanovit hmotnost „solného slepého roztoku“. Tyto informace slouží k přepočtu údajů z tabulky o hmotnosti sušiny žábronožky na objem žábronožky ve formě kaše, který má být zkrmen na jednu rybu. Kromě toho se doporučuje každý týden zvážit poměrný podíl kaše žábronožky, a ověřit tak správnou hmotnost zkrmované sušiny.

Tabulka 1

Příklad krmného plánu

Čas (po vylíhnutí)	Žábronožka (hmotnost sušiny v mg/ryba/den)
Den 1	0,5
Den 2	0,5
Den 3	0,6
Den 4	0,7
Den 5	0,8
Den 6	1,0
Den 7	1,3
Den 8	1,7
Den 9	2,2
Den 10	2,8
Den 11	3,5
Den 12	4,2
Den 13	4,5
Den 14	4,8
Den 15	5,2
Dny 16–21	5,6

▼**M8**

Čas (po vylíhnutí)	Žábronožka (hmotnost sušiny v mg/ryba/den)
Týden 4	7,7
Týden 5	9,0
Týden 6	11,0
Týden 7	13,5
Týden 8–utracení	22,5

▼**M8**

Dodatek 6

PŘÍKLADY INKUBAČNÍ KOMORY NA VAJÍČKA

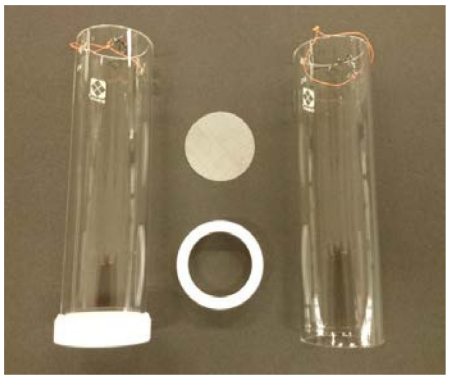
Příklad A





Tento inkubátor se skládá z příčně dělené skleněné odstředivky, která je připojena objímkou z korozivzdorné oceli a uchycena šroubovací zátkou. Skrz zátku prochází úzká skleněná trubička nebo trubička z korozivzdorné oceli a vede až k zaoblenému dnu, kam přivádí vzduch, který lehce probublává a víří vajíčka, čímž se snižuje přenos saprofytických plísňových infekcí mezi vajíčky a zároveň usnadňuje výměna chemické látky mezi inkubátorem a chovnou nádrží.

Příklad B



▼**M8**



Tento inkubátor se skládá ze skleněného válcovitého tělesa (průměr 5 cm a výška 10 cm) a sítě z korozivzdorného ocelového drátu (oko 0,25 φ a 32), které je připevněno ke dnu tělesa kroužkem z PTFE. Inkubátory jsou zavěšeny v nádržích na tyči a vertikálně protřepávány (v amplitudě přibližně 5 cm) v cyklu (přibližně jednou za 4 sekundy) vhodném pro vajíčka halančíka japonského.

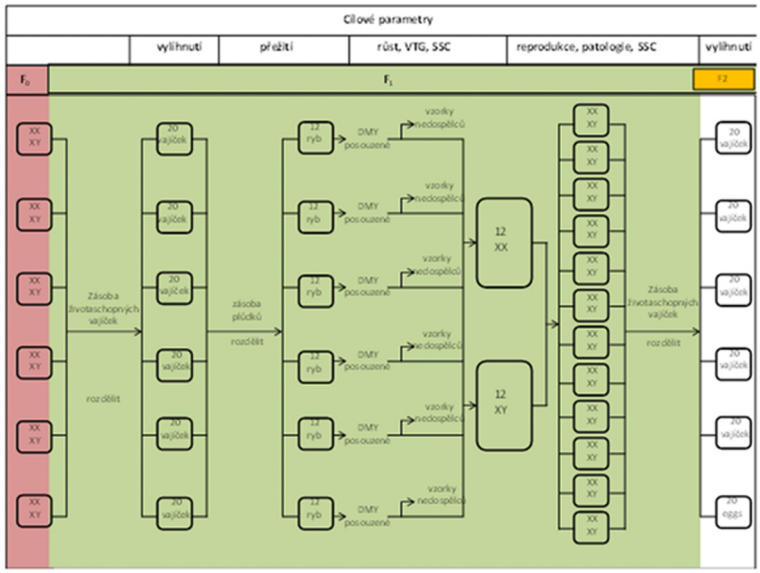
▼M8

Dodatek 7

SCHEMATICKÝ DIAGRAM PRO SLUČOVÁNÍ A OSAZOVÁNÍ REPLIKÁTŮ V PRŮBĚHU ZKUŠEBNÍ METODY MEOGRT

Obrázek 1

Slučování a osazování replikátů v průběhu zkušební metody MEOGRT Obrázek představuje jednu expozici nebo polovinu kontroly. Vzhledem ke slučování není v průběhu zkoušky identita replikátu kontinuální. Upozorňujeme, že výraz „vajíčka“ se týká životaschopných, oplodněných vajíček (ekvivalent embryí).



Expozice A Replikace

Zkušební metoda doporučuje pět expozic zkoušené chemické látce s použitím technického materiálu a negativní kontroly. Počet replikátů v jedné expozici není v průběhu zkoušky MEOGRT konstantní, počet replikátů v kontrolní expozici je dvojnásobek expozice každé jednotlivé zkoušené chemické látce. V generaci F0 má každá expozice zkoušené chemické látce šest replikátů, zatímco expozice negativní kontrole má 12 replikátů. Důrazně se nedoporučuje používat rozpouštědla, a pokud jsou přesto použita, je třeba do zprávy o zkoušce MEOGRT uvést vybrané rozpouštědlo a odůvodnění pro jeho použití. Je-li použito rozpouštědlo, je také třeba provést dva druhy kontroly: a) kontrolu s rozpouštědlem a b) negativní kontrolu. Každá z těchto dvou kontrolních skupin by měla zahrnovat celou škálu replikátů ve všech bodech časového průběhu zkoušky MEOGRT. Tato struktura replikátů zůstává stejná po celou dobu vývoje zkušebních organismů v generaci F1 (a v generaci F2, do vylíhnutí). Ve stádiu dospělosti, když jsou sestavovány chovné páry generace F1, se však počet replikátů reprodukčních párů na jednu expozici optimálně zdvojnásobí; proto je v každé expozici zkoušené chemické látce až 12 replikovaných párů a v kontrolní skupině 24 replikovaných párů (a dalších 24 replikovaných párů v kontrole s rozpouštědlem, je-li potřebná). Určení líhnutí z embryí vyprodukovaných páry generace F1 se provádí na stejné struktuře replikátů jako u embryí vyprodukovaných páry z generace F0, což znamená zpočátku šest replikátů na jednu expozici zkoušené chemické látce a 12 replikátů v kontrolní skupině (skupinách).

▼**M8**

Dodatek 8

POČÍTÁNÍ PAPIL NA ŘITNÍ PLOUTVI

Hlavní Materiál A Reakční Činidla

— Stereoskopický mikroskop (volitelně s připojenou kamerou)

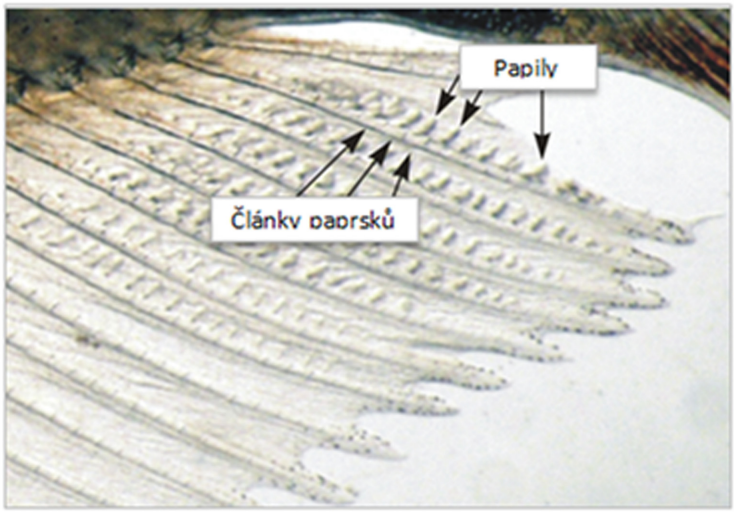
— Fixační roztok (např. Davidsonův (Bouinův se nedoporučuje)), pokud se nepočítá přímo ze zobrazení

Postupy

Po pitvě se řitní ploutev zobrazí, aby bylo možné pohodlně spočítat papily na řitní ploutvi. I když je zobrazení doporučenou metodou, lze řitní ploutev zafixovat pomocí Davidsonova fixačního roztoku nebo jiné vhodné fixační látky aplikované přibližně na 1 minutu. Je důležité udržet při fixaci řitní ploutev plochou, aby bylo možné snáze spočítat papily na řitní ploutvi. Mrtvé tělo s řitní ploutví lze do analýzy uchovat v Davidsonově fixačním roztoku nebo v jiné vhodné fixační látce. Spočítejte počet článků paprsků (viz **obrázek 1**) s papilami, které vystupují ze zadního okraje článku paprsků.

Obrázek 1

Papily na řitní ploutvi



▼M8

Dodatek 9

PODROBNÝ ČASOVÝ PLÁN ZKOUŠKY MEOGRT

Zkušební Týdny 1–3 (F0)

Ryby ve tření z generace F0, které splnily kritéria výběru (viz odstavce 16–20), se exponují na tři týdny, aby se umožnil vývoj gamet a gonadálních tkání, jež mají být exponovány zkoušené chemické látce. V každé replikované nádrži se chová jeden chovný rybí pár (chovný pár samička XX – sameček XY). Počínaje prvním dnem zkoušky se po dobu 21 po sobě jdoucích dnů sbírají vytřená vajíčka, spočítají se a vyhodnotí se jejich fertilita.

Zkušební Týden 4 (F0 A F1)

Vhodnější je sesbírat oplodněná a životaschopná vajíčka (embrya) v jeden den; pokud však není embryí dostatek, mohou být sbírána po dva dny. Jestliže se embrya sbírají dva dny, všechna embrya v expozičních skupinách, která byla sesbírána první den, se sloučí s embryi sesbíranými druhý den. Poté se všechna sloučená embrya za každou expozici náhodně rozdělí do jednotlivých replikovaných inkubátorů v počtu 20 embryí na inkubátor. Každý den se kontroluje a zaznamenává mortalita oplodněných vajíček (embryí). Odumřelá vajíčka se z inkubátorů odstraňují (odumřelá vajíčka se vyznačují zejména v raných stadiích zřetelnou ztrátou průsvitnosti a změnou ve zbarvení vyvolanou koagulací a/nebo sražením bílkovin, což vede k bílému zakalení; OECD (2010).

Poznámka: jestliže jednorázové podání vyžaduje sběr druhý den, musí být tomuto postupu podrobeny všechny expoziční skupiny (včetně kontrol). Jestliže ani po druhém dni sběru není v rámci expoziční skupiny k dispozici dostatečný počet embryí, aby bylo možné nasadit 20 embryí na inkubátor, snižte počet nasazených embryí v rámci této konkrétní expoziční skupiny na 15 embryí na inkubátor. Jestliže není k dispozici dostatečný počet embryí, aby bylo možné nasadit 15 embryí na inkubátor, snižte počet replikovaných inkubátorů, dokud nebude k dispozici dostatečné množství pro 15 embryí na inkubátor. Dále lze v generaci F0 přidat více chovných párů na každou expoziční a kontrolní skupinu, aby vyprodukovaly více vajíček, a mohl tak být dosažen doporučený počet 20 vajíček na replikát.

V den zkoušky 24 se chovné páry z generace F0 humánně usmrtí a zaznamená se jejich hmotnost a délka. V případě potřeby mohou být chovné páry z generace F0 chovány další 1–2 dny, aby se zahájila generace F1.

Zkušební Týdny 5–6 (F1)

Jeden až dva dny před očekávaným začátkem líhnutí ukončete nebo omezte míchání inkubovaných vajíček, aby se líhnutí urychlilo. Embrya vylíhlá v jednotlivé dny se sloučí podle expoziční skupiny a systematicky rozdělí do každé nádrže pro rybí larvy v rámci dané expoziční skupiny, přičemž do jedné nádrže se umístí maximálně 12 plůdků. Provádí se to náhodným výběrem plůdků a jejich umístěním po jednom postupně do replikátů bez rozlišení, přičemž se postupuje v pořadí konkrétních expozičních replikátů, dokud všechny replikáty v rámci expoziční skupiny nemají 12 plůdků. Pokud není dostatek plůdků k zaplnění všech replikátů, zajistěte, aby co možná nejvíce replikátů mělo 12 plůdků a mohla být zahájena fáze F1.

Vajíčka, z nichž se nevylíhl plůdek ani po dvojnásobku střední doby líhnutí v kontrole, se považují za neživotaschopná a zlikvidují se. Počet plůdků se zaznamená a v každém replikátu se vypočítá úspěšnost líhnutí (líhnivost).

▼M8

Zkušební Týden 7–11 (F1)

Ve všech replikátech se každý den kontroluje a zaznamenává přežití rybích larev. V den zkoušky 43 se zaznamená počet přeživších ryb v každém replikátu, jakož i počáteční počet plůdků umístěných do daného replikátu (nominálně 12). Umožňuje to vypočítat procento přežití od vylíhnutí do stádia nedospělosti.

Zkušební Týden 12 (F1)

Ve dnech zkoušky 78–85 se z ocasní ploutve každé ryby odebere malý vzorek tkáně za účelem stanovení genotypového pohlaví jednotlivce (tj. vystřižení ploutve). Tyto informace se použijí k sestavení chovných párů.

Do tří dnů po stanovení genotypového pohlaví každé ryby se náhodně sestaví 12 chovných párů na každou expoziční skupinu a 24 párů na každou kontrolu. Z každého replikátu se náhodně vyberou dvě ryby XX a XY, poté se sloučí podle pohlaví a pak náhodně vyberou za účelem sestavení chovného páru (tj. pár XX-XY). Sestaví se minimálně 12 replikátů na každou expozici chemické látce a minimálně 24 replikátů na každou kontrolu s jedním chovným párem v každém replikátu. Pokud v replikátu nejsou k dispozici dvě ryby XX, případně dvě ryby XY ke sloučení, použije se ryba s příslušným genotypem pohlaví z jiných replikátů v rámci expoziční skupiny.

Zbývající ryby (maximálně 8 ryb na replikát) se humánně usmrtí a odeberou se vzorky pro různé sledované parametry nedospělého stádia. Údaje o *dmy* (XX nebo XY) ze všech vzorků nedospělého stádia se uchovají, aby bylo zajištěno, že všechna data sledovaných parametrů mohou být vztažena ke genetickému pohlaví každé jednotlivé ryby.

Zkušební Týdny 13–14 (F1)

Expozice pokračuje po dobu, kdy se nedospělé chovné páry vyvíjejí na dospělé jedince. V den zkoušky 98 (tj. den před zahájením sběru vajíček) se z akvárií i od samiček odstraní vajíčka.

Zkušební Týdny 15–17 (F1)

Vyprodukovaná vajíčka se v každém replikátu denně sbírají po dobu 21 po sobě jdoucích dnů a vyhodnotí se jejich plodivost a fertilita.

Zkušební Týden 184 (Opakování Zkušebního Týdne 4) (F1 A F2)

Ráno v den zkoušky 120 se v každé replikované nádrži provede sběr vajíček. Sesbíraná vajíčka se vyhodnotí a oplodněná vajíčka (s odstraněnými vlákny) od každého z chovných párů se sloučí podle expozice a systematicky rozdělí do inkubačních komor po 20 oplodněných vajíčkách na inkubátor. Inkubátory mohou být umístěny do samostatných „inkubačních nádrží“ vytvořených pro každou expozici nebo do replikované nádrže, která bude po vylíhnutí obsahovat larvy. Vhodnější je sesbírat embrya v jeden den; pokud však není embryí dostatek, mohou být sbírána po dva dny. Jestliže se embrya sbírají dva dny, všechna embrya v expozičních skupinách, která byla sesbírána první den, se sloučí s embryi sesbíranými druhý den. Poté se všechna sloučená embrya za každou expozici náhodně rozdělí do jednotlivých replikovaných inkubátorů v počtu 20 embryí na inkubátor. Poznámka: jestliže jednorázové podání vyžaduje sběr druhý den, musí být tomuto postupu podrobeny všechny expoziční skupiny (včetně kontrol). Jestliže ani po druhém dni sběru není v rámci expoziční skupiny k dispozici dostatečný počet embryí, aby bylo možné nasadit 20 embryí na

▼M8

inkubátor, snižte počet nasazených embryí v rámci této konkrétní expoziční skupiny na 15 embryí na inkubátor. Jestliže není k dispozici dostatečný počet embryí, aby bylo možné nasadit 15 embryí na inkubátor, snižte počet replikovaných inkubátorů, dokud nebude k dispozici dostatečné množství pro 15 embryí na inkubátor.

V den zkoušky 121 (nebo v den zkoušky 122, aby bylo zajištěno dobré zahájení generace F2) se chovné páry z generace F1 humánně usmrtí a analyzují se sledované parametry dospělých jedinců. V případě potřeby mohou být chovné páry z generace F1 chovány další 1–2 dny, aby se zahájila generace F2.

Zkušební Týden 19–20 (F2)

Jeden až dva dny před očekávaným začátkem líhnutí ukončete nebo omezte míchání inkubovaných vajíček, aby se líhnutí urychlilo. Jestliže je zkouška ukončena do dokončení líhnutí generace F2, jsou plůdky každý den spočítány a zlikvidovány. (Embrya, z nichž se nevylíhl plůdek ani po prodloužené inkubační době definované jako dvojnásobek střední doby líhnutí v kontrole, se považují za neživotaschopná.)

▼M8

Dodatek 10

STATISTICKÁ ANALÝZA

Typy biologických údajů vznikajících ve zkoušce MEOGRT nejsou jedinečné jen pro tuto zkoušku a bylo vyvinuto mnoho vhodných statistických metodik pro správnou analýzu podobných dat, s výjimkou patologických údajů, v závislosti na jejich charakteristikách, včetně normality, homogenity rozptylu, na tom, zda plán studie sám o sobě vede k testování hypotézy, nebo k regresní analýze, zda jde o parametrické nebo neparametrické testy atd. V zásadě platí, že navržené statistické analýzy dodržují doporučení OECD pro údaje o ekotoxicitě (OECD 2006), schéma rozhodování pro analýzu údajů ze zkoušky MEOGRT je uvedeno na obrázku 2.

Lze předpokládat, že soubory dat budou nejčastěji zobrazovat monotónní odpovědi. Dále je třeba vzít v úvahu problém použití jednostranného statistického testu proti oboustrannému statistickému testu. Pokud neexistuje biologické zdůvodnění, že jednostranný test je nevhodný, doporučuje se používat jednostranné testy. I když jsou v následující části doporučeny určité statistické testy, pokud jsou vyvinuty vhodnější anebo silnější statistické metody pro použití u specifických údajů vzniklých při zkoušce MEOGRT, použijí se tyto statistické testy, aby byly maximálně využity uvedené výhody.

Údaje ze zkoušky MEOGRT se analyzují zvlášť pro každé genotypové pohlaví. Existují dvě strategie analyzování údajů od ryb s opačným pohlavím (samečků XX nebo samiček XY). 1) Cenzurovat všechny údaje od ryb s opačným pohlavím v celé zkoušce s výjimkou prevalence změny pohlaví v každém replikátu. 2) Ponechat údaje od všech ryb s opačným pohlavím v souboru dat a analyzovat je podle genotypu.

Histopatologické Údaje

Histopatologické údaje se uvádějí jako stupně závažnosti, které se hodnotí pomocí nově vyvinutého statistického postupu, Rao-Scottova, Cochran-Armitagova testu využívajícího dílčí testy (RSCABS), (Green *et al*., 2014). Úprava podle *Rao-Scotta* ponechává informace z replikací zkoušky; postup *využívající dílčí testy* zahrnuje biologické očekávání, že stupně závažnosti budou mít tendenci se zvyšovat s rostoucími koncentracemi expozice. U každé diagnózy specifikuje výstup RSCABS, u kterých expozičních skupin byla prevalence patologie vyšší než u kontrol, a s tím související úroveň závažnosti.

Údaje O Plodivosti

Analýzy pro údaje o plodivosti zahrnují sestupný Jonckheerův-Terpstrův nebo Williamsův test na stanovení účinků expozice za předpokladu, že data jsou konzistentní a mají monotónní odpověď na koncentraci. U sestupného testu se všechna porovnání provádějí na hladině významnosti 0,05 a bez korekce počtu provedených porovnání. Očekává se, že údaje budou odpovídat monotónní odpovědi na koncentraci, ale lze to ověřit buď vizuální prohlídkou dat, nebo sestavením lineárních a kvadratických kontrastů středních hodnot expozice po transformaci dat seřazených do pořadí. S výjimkou případů, kdy je kvadratický kontrast signifikantní a lineární kontrast není signifikantní, provádí se trend-test. Jinak se používá Dunnettův test na stanovení účinku expozice, pokud jsou data normálně distribuovaná s homogenními rozptyly. Jestliže tyto požadavky nejsou splněny, pak se použije Dunnův test s úpravou podle Bonferonniho-Holma. Všechny uvedené testy se provádějí nezávisle na případném celkovém F-testu nebo Kruskalově-Wallisově testu. Další podrobnosti jsou uvedeny v dokumentu OECD 2006.

▼M8

Pro počítání vajíček (bez transformace) lze použít alternativní metody, jako je generalizovaný lineární model s Poissonovým rozdělením chyb, jestliže je to statisticky odůvodněno (Cameron and Trividi, 2013). Při použití alternativního přístupu se doporučuje vyžádat si radu od statistiků.

Denní Počítání Vajíček U Jedné Generace

Model ANOVA je dán vztahem Y= čas*čas + expozice + *expozice + čas*expozice + *čas*expozice, s náhodnými účinky replikátu (generace*expozice), a čas*replikát (expozice), což umožňuje nerovné složky rozptylu obou typů napříč generacemi. Čas zde znamená frekvenci počítání vajíček (např. denně nebo týdně). Jde o analýzu opakovaného měření s korelacemi mezi pozorováními stejného replikátu při zohlednění skutečnosti, že data jsou měřena opakovaně.

Hlavní účinky expozice se testují pomocí Dunnettova (nebo Dunnettova-Hsuova) testu, který zahrnuje korekci podle počtu srovnání. Korekce hlavního účinku u generace nebo času jsou nutné, neboť u těchto dvou faktorů není žádná „kontrolní“ úroveň a každý pár úrovní může představovat srovnání, které je předmětem zájmu. Jestliže je u těchto dvou hlavních účinků F-test hlavního účinku signifikantní na úrovni 0,05, pak mohou být párová porovnání tohoto faktoru mezi úrovněmi testována na úrovni 0,05 bez další úpravy.

Model zahrnuje interakce dvou a tří faktorů, takže hlavní účinek například u času nemusí být signifikantní, i když má čas signifikantní dopad na výsledky. Jestliže je tedy interakce dvou nebo tří faktorů zahrnujících čas signifikantní na úrovni 0,05, lze akceptovat srovnání úrovní času na úrovni signifikance 0,05 bez další úpravy.

Další jsou F-testy signifikance expozice v čase, tzv. dílčí testy v tabulce ANOVA. Jestliže je například dílčí test expozice v generaci F1 a čase 12 signifikantní na úrovni 0,05, pak mohou být párová porovnání expozice v generaci F1 a čase 12 akceptována na úrovni 0,05 bez další úpravy. Podobná tvrzení platí i pro testy času v generaci F1 a expozice a pro generaci v rámci určitého času a expozice.

Konečně, u srovnání nespadajících do žádné z výše uvedených kategorií je třeba srovnání upravit pomocí Bonferroniho-Holmovy korekce na p-hodnoty. Další informace o analýzách těchto modelů lze nalézt v publikaci Hockinga (1985) a Hochberga a Tamhana (1987).

Alternativně se nezpracovaná data zaznamenají a uvedou v závěrečné zprávě jako plodivost (počet vajíček) na replikát za každý den. Vypočítá se střední hodnota nezpracovaných dat replikátu a poté se použije transformace druhou odmocninou. Vypočítá se jednocestná analýza ANOVA z transformovaných středních hodnot replikátu a poté Dunnettovy kontrasty. Rovněž může být užitečné vizuálně zkontrolovat data o plodivosti u každé expozice anebo replikátu na bodovém grafu, který zobrazuje data v čase. Umožní to neformální posouzení potenciálních účinků v průběhu času.

Všechny Ostatní Biologické Údaje

Statistické analýzy vycházejí ze základního předpokladu, že při správné volbě dávky budou data monotónní. Data se tedy považují za monotónní a formálně se vyhodnotí jejich monotónnost pomocí lineárních a kvadratických kontrastů. Jsou-li data monotónní, doporučuje se Jonckheerův-Terpstrův trend-test mediánů replikátů (jak je doporučeno v dokumentu OECD 2006). Je-li kvadratický kontrast signifikantní a lineární kontrast není signifikantní, data se považují za nemonotónní.

▼M8

Jestliže jsou data nemonotónní, zejména vzhledem k redukované odpovědi nejvyšší expozice nebo nejvyšších dvou expozic, je třeba zvážit cenzurování datového souboru, aby byla analýza provedena bez těchto expozic. Toto rozhodnutí je třeba učinit na základě odborného posouzení a všech dostupných dat, zejména dat, která naznačují zjevnou toxicitu na těchto úrovních expozice.

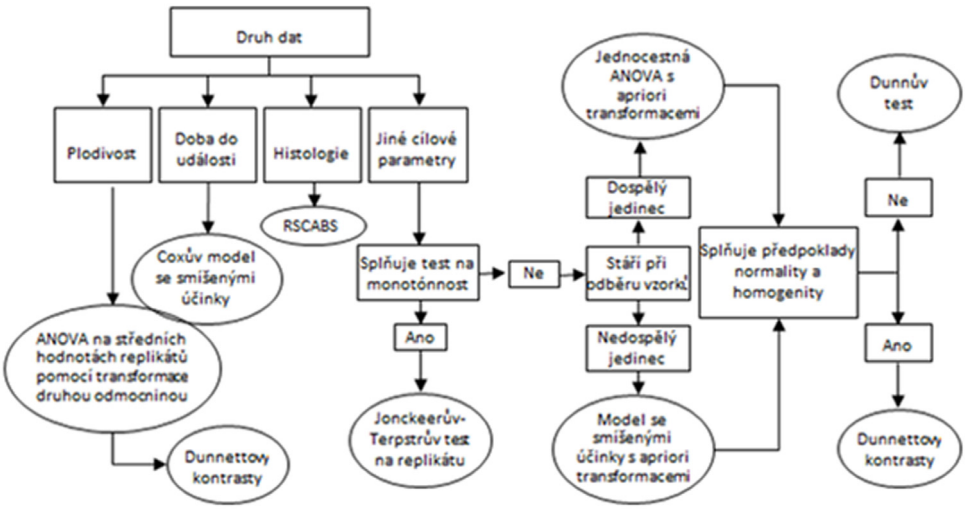
U hmotnosti a délky se nedoporučuje provádět žádné transformace, i když občas mohou být nutné. U údajů o vitelogeninu se však doporučuje logaritmická transformace; u údajů o SSC (papily na řitní ploutvi) se doporučuje transformace druhou odmocninou; u údajů o líhnivosti, procentu přežití, podílu pohlaví a procentu fertilních vajíček se doporučuje transformace druhou odmocninou funkce arcsin. Doba do vylíhnutí a doba do prvního vytření se považuje za údaj o vztahu mezi časem a událostí, přičemž jednotlivá embrya, která se nevylíhnou v definovaném časovém období, nebo replikáty, které se nevytřou, se považují za vpravo cenzurovaná data. Doba do vylíhnutí se počítá od mediánového dne vylíhnutí každého replikátu. Tyto cílové parametry se analyzují pomocí Coxova modelu proporcionálních rizik u smíšených účinků.

Biologická data ze vzorků dospělých ryb mají jedno měření na replikát, to znamená, že v každém replikovaném akváriu je jedna ryba XX a jedna ryba XY. Proto se doporučuje provést jednocestnou analýzu ANOVA středních hodnot replikátu. Jsou-li splněny předpoklady analýzy ANOVA (normalita a homogenita rozptylu posuzovaná podle reziduálních hodnot z analýzy ANOVA pomocí Shapirova-Wilksova testu, respektive Levenova testu), použijí se Dunnettovy kontrasty na stanovení expozic, které se lišily od kontroly. Naopak, jestliže předpoklady analýzy ANOVA nejsou splněny, je třeba provést Dunnův test a stanovit tak, které expozice se lišily od kontroly. Podobný postup se doporučuje i pro data, která jsou ve formě procent (fertilita, líhnutí a přežití).

Biologická data ze vzorků nedospělých ryb mají od 1 do 8 měření na replikát, to znamená, že počty jednotlivců, kteří přispívají ke střední hodnotě replikátu u každého genotypového pohlaví, mohou být různé. Proto se doporučuje použít model ANOVA se smíšenými účinky a poté Dunnettovy kontrasty, pokud byly splněny předpoklady normality a homogenity rozptylu (na reziduální hodnoty smíšených účinků analýzy ANOVA). Jestliže splněny nebyly, je třeba provést Dunnův test a stanovit tak, které expozice se lišily od kontroly.

Obrázek 2

Vývojový diagram pro doporučené statistické postupy pro analýzu dat MEOGRT.



▼**M8**

LITERATURA

(1) OECD (2014). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A guidance to application (přílohy k této publikaci jsou ve formě samostatného dokumentu), OECD Publishing, Paris.

(2) Cameron AC and Trivedi PK (2013). Regression Analysis of Count Data, 2nd edition, Econometric Society Monograph No 53, Cambridge University Press.

(3) Hocking RR (1985). The Analysis of Linear Models, Monterey, CA: Brooks/ Cole.

(4) Hochberg Y and Tamhane AC (1987). Multiple Comparison Procedures. John Wiley and Sons, New York.

▼M8

C.53. **ANALÝZA RŮSTU A VÝVOJE LAREV OBOJŽIVELNÍKŮ (LAGDA)**

ÚVOD

1. Tato zkušební metoda je rovnocenná pokynu OECD pro zkoušení č. 241 (2015). Potřeba vyvinout a ověřit zkoušku schopnou zjistit a charakterizovat nežádoucí důsledky expozice toxickým chemickým látkám u obojživelníků vyplývá z obavy, že úrovně chemických látek v životním prostředí mohou mít nepříznivé účinky na lidi i volně žijící živočichy. Pokyn OECD týkající se analýzy růstu a vývoje larev obojživelníku (LAGDA) popisuje zkoušku toxicity na obojživelnících, při níž je posuzován růst a vývoj od fertilizace po dobu raného juvenilního období. Jde o analýzu (obvykle 16 týdnů), která hodnotí raný vývoj, metamorfózu, přežití, růst a částečné reprodukční dospívání. Umožňuje také měřit sadu dalších cílových parametrů za účelem diagnostického hodnocení pravděpodobných endokrinních disruptorů (EDC) nebo jiných druhů vývojových a reprodukčních toxických látek. Metoda popsaná v této zkušební metodě je odvozena od validační práce na drápatce vodní (*Xenopus laevis*) provedené americkou Agenturou pro ochranu životního prostředí (U.S. EPA) s podporou z Japonska (1). I když mohou být na růstový a vývojový zkušební protokol adaptovány jiné druhy obojživelníků, přičemž důležitou složkou je schopnost určit genetické pohlaví, konkrétní metody a sledované cílové parametry popsané v této zkušební metodě jsou použitelné pouze u halančíka *Xenopus laevis*.

2. Analýza LAGDA slouží jako zkouška vyššího stupně u obojživelníků pro sběr složitějších informací o nežádoucích účincích na základě vztahu mezi koncentrací a odpovědí a je vhodná pro použití při identifikaci a charakterizaci nebezpečnosti a posuzování ekologických rizik. Analýza je na úrovni 4 koncepčního rámce OECD pro zkoušení a posuzování endokrinních disruptorů, kde analýzy *in vivo* poskytují také údaje o nežádoucích účincích na sledované parametry související s endokrinním systémem (2). Obecné uspořádání experimentu zahrnuje exponování embryí *X. laevis* ve stádiu 8–10 (3) podle Nieuwkoopa a Fabera (NF) minimálně čtyřem různým koncentracím zkoušené chemické látky (obvykle minimálně v polovičních logaritmických intervalech) a kontrole (kontrolám) po 10 týdnů po střední době do stádia NF 62 v kontrole, s jedním průběžným dílčím vzorkem ve stádiu NF 62 (≤ 45 po fertilizaci; obvykle přibližně 45 dnů (dpf). V každé zkušební koncentraci jsou čtyři replikáty s osmi replikáty pro kontrolu. Cílové parametry hodnocené v průběhu expozice (při odebírání průběžného dílčího vzorku a konečného vzorku po dokončení zkoušky) zahrnují parametry indikující generalizovanou toxicitu: mortalitu, abnormální chování a stanovení růstu (délka a hmotnost), jakož i cílové parametry určené pro charakterizaci specifických způsobů působení endokrinní toxicity ovlivňující estrogenní a androgenní fyziologické procesy nebo fyziologické procesy zprostředkované štítnou žlázou. Tato metoda klade primární důraz na potenciální účinky relevantní pro populaci (a to nežádoucí dopady na přežití, vývoj, růst a reprodukční vývoj) pro výpočet koncentrace bez pozorovaných účinků (NOEC) nebo účinné koncentrace působící x% změnu (EC_x) měřeného cílového parametru. Je však třeba poznamenat, že přístupy EC_x jsou jen zřídka vhodné pro velké studie tohoto druhu, kde může být nepraktické zvyšovat počet zkoušených koncentrací, aby bylo možné stanovit požadovanou EC_x. Rovněž je třeba poznamenat, že tato metoda nezahrnuje reprodukční fázi samotnou. Definice použité v této zkušební metodě jsou uvedeny v dodatku 1.

VÝCHOZÍ ÚVAHY A OMEZENÍ

3. Vzhledem k omezenému počtu zkoušených chemických látek a laboratoří zapojených do validace této dosti složité analýzy, a zejména proto, že mezilaboratorní reprodukovatelnost není doposud zadokumentována s experimentálními daty, lze předpokládat, že až bude k dispozici dostatečný počet studií

▼M8

k posouzení účinnosti experimentálního uspořádání této nové metody, bude pokyn OECD 241 přezkoumán a v případě potřeby revidován z hlediska nabytých zkušeností. Analýza LAGDA je důležitá analýza řešící potenciální faktory přispívající k poklesu populace obojživelníků hodnocením účinků expozice chemickým látkám v průběhu citlivého larválního stádia, kdy mohou účinky na přežití a vývoj, včetně normálního vývoje reprodukčních orgánů, negativně ovlivnit populace.

4. Zkouška je navržena tak, aby detekovala hlavní účinek (účinky) vyplývající z endokrinních i neendokrinních mechanismů, a zahrnuje diagnostické cílové parametry, které jsou z části specifické pro klíčové endokrinní dráhy. Je třeba uvést, že dokud nebyla vyvinuta analýza LAGDA, neexistovala žádná validovaná analýza, která by sloužila pro tuto funkci u obojživelníků.

5. Před zahájením analýzy je důležité mít informace o fyzikálně chemických vlastnostech zkoušené chemické látky, zejména proto, aby bylo možné připravit stabilní chemické roztoky. Rovněž je nutné mít adekvátně citlivou analytickou metodu pro ověření koncentrací zkoušené chemické látky. Po dobu přibližně 16 týdnů vyžaduje tato analýza celkový počet 480 zvířat, tj. embryí *X. laevis* (nebo 640 embryí, jestliže je použita kontrola s rozpouštědlem), aby byla zajištěna dostatečná síla zkoušky pro hodnocení cílových parametrů relevantních pro populaci, jako je růst, vývoj a reprodukční dospělost.

6. Před použitím zkušební metody ke zkoušení směsi pro účely právních předpisů je třeba zvážit, zda poskytne přijatelné výsledky pro zamýšlený právní účel. Kromě toho tato analýza nehodnotí plodivost přímo, takže nemusí být použitelná v pokročilejším stádiu, než je úroveň 4 Koncepčního rámce OECD pro zkoušky a posuzování chemických látek narušujících činnost endokrinních žláz.

VĚDECKÝ ZÁKLAD ZKUŠEBNÍ METODY

7. Většina našich současných znalostí o biologii obojživelníků byla získána pomocí modelového laboratorního druhu *X. laevis.* Tento druh může být rutinně chován v laboratoři, ovulaci lze indukovat pomocí lidského choriového gonadotropinu (hCG), přičemž zásoba zvířaty je běžně dostupná u komerčních chovatelů.

8. Stejně jako u všech obratlovců je reprodukce obojživelníků řízená hypothalamo-hypofýzo-gonadální (HPG) osou (4). Mediátory tohoto endokrinního systému jsou estrogeny a androgeny, které řídí vývoj a fyziologii pohlavně dimorfních tkání. Ve vývojovém cyklu obojživelníků jsou tři odlišné fáze, kdy je tato osa zvláště aktivní: 1) diferenciace gonád v průběhu larválního vývoje, 2) vývoj druhotných pohlavních znaků a vyzrálost gonád v průběhu juvenilní fáze a 3) funkční reprodukce dospělých jedinců. Každé z těchto tří vývojových oken může být náchylné na narušení endokrinního systému určitými chemickými látkami, jako jsou estrogeny a androgeny, což nakonec vede ke ztrátě reprodukční způsobilosti organismů.

9. Gonády se začínají vyvíjet ve stádiu NF 43, kdy se nejdříve vyvine bipotenciální genitální rýha. Diferenciace gonád začíná ve stádiu NF 52, kdy primordiální zárodečné buňky buď migrují do medulární tkáně (samečci), nebo zůstávají v kortikální oblasti (samičky) vyvíjejících se gonád (3). Poprvé bylo zjištěno, že je tento proces pohlavní diferenciace gonád

▼M8

náchylný na chemickou alteraci, u druhu *Xenopus* v 50. letech minulého století (5) (6). Při expozici pulců estradiolu v průběhu tohoto období diferenciace gonád dochází ke změně pohlaví samečků, kteří jsou pak po dosažení dospělosti plně funkčními samičkami (7) (8). Funkční změna pohlaví samiček na samečky je také možná a byla hlášena po implantaci tkáně varlat pulcům (9). Přestože však expozice inhibitoru aromatázy také působí funkční změnu pohlaví u *X. tropicalis* (10), nebylo prokázáno, že by k tomu docházelo u *X. laevis*. V minulosti byly účinky toxických látek na diferenciaci gonád hodnoceny podle histologického vyšetření gonád při metamorfóze a změna pohlaví mohla být stanovena pouze analýzou podílů pohlaví. Donedávna neexistovaly žádné prostředky jak přímo určit genetické pohlaví druhu *Xenopus*. Nedávné stanovení markerů souvisejících s pohlavím u druhu *X. laevis* však umožňuje určit genetické pohlaví a přímo identifikovat zvířata se změněným pohlavím (11).

10. U samečků postupuje juvenilní vývoj se zvyšováním hladin testosteronu v krvi odpovídajícím vývoji druhotných pohlavních znaků, jakož i vývoji varlat. U samiček produkují vaječníky estradiol, což vyvolává vznik vitelogeninu (VTG) v plazmě, vitelogeninových oocytů ve vaječníku a vývoj vejcovodů (12). Vejcovody jsou samičí druhotné pohlavní znaky, které fungují při dozrávání oocytů v průběhu reprodukce. Na vnější stranu oocytů procházejících přes vejcovod se nabalí sliz, oocyty se poté shromažďují ve váčku a jsou připraveny k fertilizaci. Zdá se že vývoj vejcovodů je regulován estrogeny, neboť u *X. laevis* (13) a *X. tropicalis* vývoj koreluje s hladinami estradiolu (12). Byl hlášen vývoj vejcovodů u samečků po expozici sloučeninám polychlorovaných bifenylů (14) a 4-*terc*-oktylfenolu (15).

PODSTATA ZKOUŠKY

11. Uspořádání experimentu zahrnuje exponování embryí *X. laevis* ve stádiu NF 8–10 vodní cestou čtyřem různým koncentracím zkoušené chemické látky (látek) po 10 týdnů po střední době do stádia NF 62 v kontrole, s jedním průběžným dílčím vzorkem ve stádiu NF 62. I když je možné podávat vysoce hydrofobní chemické látky potravou, s použitím této cesty expozice při této analýze je doposud málo zkušeností. V každé zkušební koncentraci jsou čtyři replikáty s osmi replikáty pro každou použitou kontrolu. Cílové parametry hodnocené v průběhu expozice zahrnují parametry indikující generalizovanou toxicitu (tj. mortalitu, abnormální chování a stanovení růstu (délka a hmotnost)), jakož i cílové parametry určené pro charakterizaci specifických způsobů působení endokrinní toxicity ovlivňující estrogenní a androgenní fyziologické procesy nebo fyziologické procesy zprostředkované štítnou žlázou (tj. histopatologie štítné žlázy, histopatologie gonád a gonadálního traktu, abnormální vývoj, plazmatický vitelogenin (doplňkově) a podíly genotypového/fenotypového pohlaví).

KRITÉRIA PLATNOSTI ZKOUŠKY

12. Použijí se tato kritéria platnosti zkoušky:

— koncentrace rozpuštěného kyslíku by po celou dobu zkoušky měla být ≥ 40 % nasycení vzduchem,

▼M8

— teplota vody by měla být v rozsahu 21 ± 1 °C a rozdíly mezi replikáty a mezi expozicemi by neměly přesahovat 1,0 °C,

— hodnota pH zkušebního roztoku by měla být udržována mezi 6,5 a 8,5 a rozdíly mezi replikáty a mezi expozicemi by neměly přesahovat 0,5,

— měly by být k dispozici důkazy pro prokázání toho, že koncentrace zkoušené chemické látky v roztoku byly uspokojivě udržovány v rozmezí ±20 % od středních naměřených hodnot,

— mortalita po dobu expozice by měla být ≤ 20 % v každém replikátu v kontrolách,

— životaschopnost potěru vybraného k zahájení studie ≥ 70 %,

— střední doba do stádia NF 62 kontrol by měla být ≤ 45 dnů,

— střední hmotnost zkušebních organismů ve stádiu NF 62 a při ukončení analýzy v kontrolách a v kontrolách s rozpouštědlem (jsou-li použity) by měla dosahovat 1,0 ± 0,2, respektive 11,5 ± 3 g.

13. I když nejde o kritérium platnosti, doporučuje se, aby byly pro analýzu k dispozici alespoň tři expoziční úrovně se třemi nezpochybněnými replikáty. Příliš vysoká mortalita, která zpochybňuje platnost expozice, je definována jako > 4 úhyny (> 20 %) ve 2 nebo více replikátech, které nelze vysvětlit technickou chybou. Pro analýzu musí být dostupné alespoň tři úrovně expozice bez zjevné toxicity. Známky zjevné toxicity mohou zahrnovat zejména plavání na hladině, ležení na dně nádrže, obrácené nebo nepravidelné plavání, nepravidelné vyplouvání k hladině a nereagování na podnět, morfologické abnormality (např. deformity končetin), hemoragické léze a abdominální edém.

14. V případě, že zjištěno nedodržení kritérií přijatelnosti zkoušky, měly by být zváženy důsledky z hlediska spolehlivosti zkušebních údajů a tyto úvahy by měly být zahrnuty do zpráv.

POPIS METOD

Přístroje a pomůcky

15. Normální laboratorní vybavení, a zejména:

a) zařízení řídící teplotu (např. ohřívače nebo chladiče nastavitelné na 21 ° ± 1 °C);

▼M8

b) teploměr;

c) binokulární stereoskopický mikroskop a preparační nástroje;

d) digitální fotoaparát s rozlišením minimálně 4 megapixelů a s mikrofunkcí (v případě potřeby);

e) analytické váhy s přesností měření na 0,001 mg nebo 1 μg;

f) oximetr (měřič rozpuštěného kyslíku) a pH-metr;

g) luxmetr (měřič intenzity osvětlení) s přesností měření na jednotky luxů.

Voda

Zdroje a kvalita

16. Použít lze jakoukoli ředicí vodu, která je místně dostupná (např. pramenitou vodu nebo vodu z kohoutku filtrovanou přes aktivní uhlí) a umožňuje normální růst a vývoj *X. laevis*, přičemž by měly být k dispozici důkazy o normálním růstu v této vodě. Jelikož kvalita místní vody se může v různých oblastech podstatně lišit, je třeba provést analýzu kvality vody, zejména pokud nejsou dostupné historické údaje o používání této vody pro chov larev obojživelníků. Je-li kvalita ředicí vody relativně konstantní, mělo by být stanovení těžkých kovů (např. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni), hlavních aniontů a kationtů (např. Ca^{2+}, Mg^{2+}, Na^{+}, K^{+}, Cl^{-}, $SO4^{2-}$), pesticidů, celkového obsahu organického uhlíku a suspendovaných látek provedeno před začátkem zkoušení a/nebo například každých šest měsíců. Některé chemické charakteristiky doporučené ředicí vody jsou uvedeny v dodatku 2.

Koncentrace jódu ve zkušební vodě

17. K tomu, aby mohla štítná žláza syntetizovat thyroidální hormony na podporu normální metamorfózy, musí mít larvy k dispozici dostatek jodidu podávaného současně vodou i potravou. V současnosti neexistují žádné empiricky podložené pokyny ohledně minimální koncentrace jodidu v potravě nebo vodě pro zajištění správného vývoje. Dostupnost jodidu však může ovlivnit schopnost tyreoidálního systému reagovat na činitele ovlivňující činnost štítné žlázy, a jak známo, moduluje bazální aktivitu štítné žlázy, což si zasluhuje pozornost při interpretaci výsledků provedené histopatologie štítné žlázy. Na základě předchozích prací byla prokázána funkční způsobilost analýzy při koncentraci jodidu (I^{-}), která se v ředicí vodě pohybovala mezi 0,5 a 10 μg/l. Optimální hodnota minimální koncentrace jodidu (přidávaného jako sodná nebo draselná sůl) v ředicí vodě by měla po celou dobu zkoušky činit 0,5 μg/l. Pokud je zkušební voda rekonstituována z deionizované vody, měl by se přidat jód v minimální koncentraci 0,5 μg/l. Změřené koncentrace jodidu ze zkušební vody (tj. ředicí vody) a doplnění jódu či jiných solí (jsou-li použity) do zkušební vody je třeba uvést. Kromě zkušební vody může být měřen také obsah jódu v potravě.

Systém expozice

18. Zkouška byla vypracována pomocí průtokového systému ředění. Složky systému, které přicházejí do styku s vodou, by měly být vyrobeny ze skla, nerezové oceli a/nebo jiných chemicky inertních materiálů. Jako expoziční nádrže by měla sloužit akvária ze skla nebo nerezové oceli a využitelný objem nádržky by měl být mezi 4,0 a 10,0 l (minimální hloubka vody 10 až 15 cm). Systém by měl být schopen podporovat všechny zkušební koncentrace, kontrolu a v případě potřeby kontrolu s rozpouštědlem, se čtyřmi replikáty na expozici a osmi v kontrolách. Průtoková rychlost by měla být u všech nádob stejná a neměnná, jednak kvůli zachování biologických podmínek, jednak kvůli expozici chemické látce. Doporučuje se, aby byly průtoky přiměřené (např. výměna objemu nádrže alespoň pětkrát

▼M8

denně), aby nedošlo k poklesu koncentrace chemické látky v důsledku metabolismu zkušebních organismů a vodních organismů přítomných v akváriu nebo abiotickými cestami degradace (hydrolýzou, fotolýzou) nebo zánikem odpařením, sorpcí). Expoziční nádrže by k určité pozici v systému expozice měly být přiřazeny náhodně, aby se snížily potenciální poziční vlivy, včetně mírných rozdílů v teplotě, intenzitě osvětlení apod. Další informace o nastavení průtokových systémů expozice jsou uvedeny v publikaci *Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests on Test Materials with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians* (16).

Dávkování chemické látky: příprava zkušebních roztoků

19. Zkušební roztoky v expozičním systému se připravují tak, že se zásobní roztok zkoušené chemické látky přivádí do systému vhodným čerpadlem. Průtok zásobního roztoku by měl být kalibrován v souladu s analytickým potvrzením zkušebních roztoků před zahájením expozice a v průběhu zkoušky by měl být pravidelně kontrolován jeho objem. Objem zkušebního roztoku v každé komoře by měl být vyměněn minimálně pětkrát denně.

20. Zkoušenou chemickou látku je možné zavést do systému různým způsobem, v závislosti na jejích fyzikálně-chemických vlastnostech. Před zkouškou je proto třeba získat výchozí informace o chemické látce, které jsou podstatné pro stanovení její testovatelnosti. K užitečným informacím o vlastnostech jednotlivých zkoušených chemických látek patří strukturní vzorec, molekulová hmotnost, čistota, stabilita ve vodě a na světle, pK_a a K_{ow}, rozpustnost ve vodě (nejlépe ve zkušebním médiu) a tlak par, jakož i výsledky zkoušky snadné biologické rozložitelnosti (zkušební metoda C.4 (17) nebo C.29 (18)). Rozpustnost ve vodě a tlak par lze použít pro výpočet Henryho konstanty, která určí, zda může dojít ke ztrátám v důsledku odpařování zkoušené chemické látky. Provedení této zkoušky bez výše uvedených informací by mělo být pečlivě zváženo, neboť plán studie bude záviset na fyzikálně chemických vlastnostech zkoušené chemické látky a bez těchto dat může být obtížné interpretovat výsledky, případně výsledky nemusí dávat smysl. Měla by být k dispozici spolehlivá analytická metoda pro stanovení množství zkoušené chemické látky ve zkušebních roztocích, a to se známou a doloženou přesností a mezí stanovitelnosti. Zkoušené chemické látky rozpustné ve vodě mohou být rozpuštěny v přiměřeném množství ředicí vody v koncentraci, která umožňuje dávkování v cílové zkušební koncentraci v průtokovém systému. Chemické látky, které jsou kapalné nebo pevné při pokojové teplotě a jsou středně rozpustné ve vodě, mohou vyžadovat sytící kolony kapalina: kapalina nebo pevná látka: pevná látka (např. válec ze skelné vaty) (19). I když je možné podávat velmi hydrofobní zkoušené chemické látky potravou, s použitím této cesty expozice při této analýze je málo zkušeností.

21. Zkušební roztoky o zvolených koncentracích se připraví ředěním zásobního roztoku. Zásobní roztok by měl být připraven přednostně jednoduchým mechanickým mícháním nebo protřepáváním zkoušené chemické látky v ředicí vodě (např. mícháním a/nebo pomocí ultrazvuku). Pro dosažení vhodné koncentrace zásobního roztoku mohou být použity sytící kolony/systémy nebo metody pasivního dávkování (20). Upřednostňuje se použití zkušebního systému bez rozpouštědel; avšak různé zkoušené chemické látky budou mít rozličné fyzikálně-chemické vlastnosti, které mohou vyžadovat různé přístupy při přípravě vody pro expozici chemické látce. Měla by být vynaložena maximální snaha nepoužívat rozpouštědla nebo nosiče, protože:

▼M8

1) některá rozpouštědla sama o sobě mohou vyvolávat toxicitu anebo nežádoucí či neočekávané odpovědi, 2) zkoušené chemické látky v koncentraci vyšší, než je jejich rozpustnost ve vodě (což se může často stát při použití rozpouštědel), mohou způsobit nepřesné stanovení účinných koncentrací, 3) použití rozpouštědel u dlouhodobějších zkoušek může mít za následek značný vznik „biofilmu“ souvisejícího s mikrobiální aktivitou, což může mít vliv na okolní podmínky i na schopnost udržet expoziční koncentrace a 4) neexistence dřívějších údajů, které prokazují, že rozpouštědlo neovlivňuje výsledek studie, vyžaduje použití rozpouštědel kontrolu s rozpouštědlem, což má významné dopady na dobré životní podmínky zvířat, neboť k provedení zkoušky jsou potřebná další zvířata. V případě chemických látek, jejichž zkoušení je obtížné, lze použít rozpouštědlo jako poslední řešení, a určení, jaká metoda je nejvhodnější, by mělo vycházet z metodického dokumentu OECD ke zkouškám toxicity složitých látek a směsí pro vodní organismy (21). Volba rozpouštědla se bude řídit chemickými vlastnostmi dané chemické látky a dostupností dosavadních kontrolních údajů o rozpouštědle. Nejsou-li k dispozici dřívější údaje, je třeba před provedením konečné studie stanovit vhodnost rozpouštědla. V případě, že se použití rozpouštědla nelze vyhnout a dojde k mikrobiální aktivitě (vznik biofilmu), doporučuje se zaznamenávat/vykázat vznik biofilmu v každé nádrži (alespoň týdně) po celou dobu zkoušky. Ideálně by se měla udržovat konstantní koncentrace rozpouštědla při kontrole s rozpouštědlem a při všech zkušebních expozicích. Jestliže koncentrace rozpouštědla není udržována v konstantní výši, je třeba při kontrole s rozpouštědlem použít nejvyšší koncentraci rozpouštědla při zkušební expozici. V případech, kdy je použito nosné rozpouštědlo, neměla by maximální koncentrace rozpouštědla překročit 100 µl/l nebo 100 mg/l (21) a doporučuje se udržovat koncentraci rozpouštědla co možná nejnižší (např. ≤20 µl/l), aby se zamezilo potenciálnímu účinku rozpouštědla na měřené ukazatele (22).

Zkušební organismy

Zkušební druh

22. Zkušebním druhem je *X. laevis*, protože: 1) se běžně chová v laboratořích na celém světě, 2) je snadno dostupný od komerčních dodavatelů a 3) lze stanovit jeho genetické pohlaví.

Péče o dospělé jedince a množení

23. Správná péče a chov *X. laevis* jsou popsány ve standardizovaném pokynu (23). Chov a péči o *X. laevis* popisuje také Read (24). Množení se provádí tak, že se třem až pěti párům dospělých samiček a samečků vstřikuje intraperitoneálně lidský choriogonadotropin (hCG). Samičkám ve vzorku se vstříkne např. přibližně 800–1 000 IU a samečkům 500–800 IU hCG rozpuštěného v 0,6–0,9 % solném roztoku (nebo Ringerově žabím roztoku, izotonickém roztoku pro použití u obojživelníků). Injekční objemy by měly být přibližně 10 µl/g tělesné hmotnosti (~1 000 µl). Poté jsou indukované chovné páry drženy ve velkých nádržích, v klidu a ve statických podmínkách, aby se podpořil amplexus. Na dně každé množicí nádrže by mělo být nepravé dno z nerezového ocelového pletiva (např. otvory 1,25 cm), které umožní propadnutí vajíček na dno nádrže. Žáby, kterým se vstříkne hCG pozdě odpoledne, obvykle nakladou většinu vajíček do druhého dne dopoledne. Po uvolnění a oplodnění dostatečného množství vajíček by dospělí jedinci měli být z množicích nádrží odstraněni. Vajíčka se poté sesbírají a slizový obal se odstraní ošetřením v L-cysteinu (23). Připraví se 2 % roztok L-cysteinu a jeho hodnota pH se upraví na 8,1 pomocí 1 M NaOH. Tento roztok o teplotě 21 °C se přidá do Erlenmeyerovy baňky o objemu 500 ml obsahující vajíčka z jednoho kladení, lehce se promíchává po dobu jedné až

▼M8

dvou minut a poté se důkladně propláchne 6–8krát kultivační vodou o teplotě 21 °C. Vajíčka se poté přenesou do krystalizační misky a stanoví se, zda jsou životaschopné z > 70 % a vykazují jen minimální abnormality buněčného dělení embryí.

USPOŘÁDÁNÍ ZKOUŠKY

Zkušební koncentrace

24. Doporučuje se použít minimálně čtyři koncentrace chemické látky a příslušné kontroly (v případě potřeby včetně kontrol s rozpouštědlem). Obvykle se doporučuje rozdíl koncentrací (faktor odstupňování) nepřesahující 3,2.

25. Pro účely této zkoušky by se měly v maximální možné míře používat výsledky z již existujících studií obojživelníků pro stanovení nejvyšší zkoušené koncentrace, aby se nepoužívaly koncentrace, které jsou zjevně toxické. Ke stanovení této koncentrace mohou přispět například informace o kvantitativním vztahu mezi strukturou a aktivitou, analogické údaje a data z již existujících studií obojživelníků, jako je analýza metamorfózy obojživelníků, zkušební metoda C.38 (25) a analýza teratogeneze žabích embryí – *Xenopus* (23), anebo zkoušek na rybách, jako jsou zkušební metody C.48, C.41 a C.49 (26) (27) (28). Před provedením analýzy LAGDA může být provedena zkouška ke zjištění rozsahu. Doporučuje se, aby expozice ke zjištění rozsahu byla zahájena do 24 hodin po fertilizaci a pokračovala po dobu 7–14 dnů (v případě potřeby i déle) a aby byly zkoušené koncentrace nastaveny tak, aby intervaly mezi jednotlivými zkoušenými koncentracemi nebyly větší než faktor 10. Výsledky zkoušky ke zjištění rozsahu by měly sloužit pro stanovení nejvyšší zkoušené koncentrace při analýze LAGDA. Nezapomeňte, že pokud musí být použito rozpouštědlo, pak může být vhodnost tohoto rozpouštědla (tj. zda může mít dopad na výsledek studie) stanovena v rámci studie ke zjištění rozsahu.

Replikáty ve zkušebních skupinách a kontrolách

26. Měly by se použít minimálně čtyři replikované nádrže na každou zkoušenou koncentraci a minimálně osm replikátů pro kontroly (a v případě potřeby pro kontrolu s rozpouštědlem) (tj. počet replikátů v kontrolách a v každé kontrole s rozpouštědlem by měl být dvakrát tak velký jako počet replikátů každé expoziční skupiny, aby byla zajištěna správná statistická síla). Každý replikát by měl obsahovat maximálně 20 jedinců. Minimální počet zpracovaných jedinců bude 15 (5 pro dílčí vzorek stádia NF 62 a 10 juvenilních jedinců). Do každého replikátu se však přidají další jedinci, aby se tak kompenzovala možná mortalita a zachoval se kritický počet 15.

POSTUP

Přehled analýzy

27. Analýza se zahajuje s nově nakladenými embryi (stádium NF 8–10) a pokračuje do vývoje juvenilních jedinců. Každý den se kontroluje mortalita a případné známky abnormálního chování. Ve stádiu NF 62 se odebere dílčí vzorek larev (maximálně 5 jedinců na replikát) a vyšetří se jednotlivé sledované parametry (tabulka 1). Poté, co všichni jedinci dosáhnou stádia NF 66, tj. dokončení metamorfózy (nebo po 70 dnech od zahájení studie, pokud toto datum nastane dříve), se provede náhodná redukce (avšak bez odebírání

▼M8

dílčích vzorků), aby se počet jedinců snížil (10 na nádrž) (viz odstavec 43), a zbývající jedinci jsou i nadále exponováni až do 10 týdnů po střední době do stádia NF 62 v kontrole. Při ukončení zkoušky (odebírání vzorků juvenilních jedinců) se provedou další měření (tabulka 1).

Podmínky expozice

28. Úplný souhrn zkušebních parametrů lze najít v dodatku 3. V průběhu doby expozice se denně měří množství rozpuštěného kyslíku, teplota a pH zkušebních roztoků. Jednou měsíčně se měří konduktivita, zásaditost a tvrdost. Pokud jde o teplotu vody zkušebních roztoků, rozdíly mezi jednotlivými replikáty a mezi jednotlivými expozicemi (v rámci jednoho dne) by neměly překročit 1,0 ^{o}C. Také u hodnoty pH zkušebních roztoků by rozdíly mezi jednotlivými replikáty a mezi jednotlivými expozicemi neměly překročit 0,5.

29. Expoziční nádrže mohou být každý den čištěny odsáváním, aby se z nich odstranila nezkonzumovaná potrava a odpadní produkty, přičemž je třeba dávat pozor, aby nedošlo ke křížové kontaminaci nádrží. Je nutné dbát na minimalizaci stresu a traumat zvířat, zejména během přemisťování, čištění akvárií a manipulace. Je třeba se vyvarovat stresových podmínek/činností, jakými jsou hlasitý a/nebo nepřetržitý hluk, klepání na akvária, vibrace v nádržích.

Délka expozice zkoušené chemické látce

30. Expozice se zahajuje s nově nakladenými embryi (stádium NF 8–10) a pokračuje po 10 týdnů po střední době do stádia NF 62 ($\leq$ 45 dnů od zahájení studie) v kontrolní skupině. Analýza LAGDA trvá obvykle 16 týdnů (maximálně 17 týdnů).

Zahájení analýzy

31. Rodičovská zvířata použitá pro zahájení analýzy by měla v minulosti prokazatelně vyprodukovat potomstvo, u nějž lze geneticky určit pohlaví (dodatek 5). Po vytření dospělých jedinců se sesbírají embrya, ošetří se cysteinem, aby se z nich odstranil slizový povlak, a zkontroluje se jejich životaschopnost (23). Ošetření cysteinem umožňuje, aby se embrya při manipulaci v průběhu screeningu nenalepila na povrchy. Screening probíhá pod stereomikroskopem pomocí očního kapátka vhodné velikosti, kterým se odstraňují neživotaschopná embrya. Preferuje se, aby byl pro zkoušku použit jeden potěr s větší než 70 % životaschopností. Embrya ve stádiu NF 8–10 se náhodně rozdělí do expozičních nádrží obsahujících příslušný objem ředící vody tak, aby každá nádrž obsahovala 20 embryí. S embryi je třeba při tomto přemístění zacházet opatrně, aby se minimalizoval manipulační stres a předešlo jakémukoli poranění. 96 hodin po fertilizaci by měli pulci vyplavat ve vodním sloupci nahoru a začít se přichytávat na stěny nádrže.

Krmný režim

32. Krmivo a změna krmného režimu v průběhu jednotlivých vývojových stádií *X. laevis* představují velmi důležitý aspekt protokolu LAGDA. Při nadměrném krmení v průběhu larvální fáze obvykle dochází ke zvýšenému výskytu a závažnosti skoliózy (dodatek 8) a tomu by se mělo zabránit. Naopak při nedostatečném krmení v průběhu larvální fáze dochází k vysoce variabilním vývojovým výsledkům mezi kontrolami, což by potenciálně

▼M8

mohlo narušit statistickou sílu nebo způsobit zavádějící výsledky zkoušky. V dodatku 4 je uvedeno doporučené krmivo a krmné režimy pro larvy a juvenilní jedince *X. laevis* v průtokových podmínkách, ale jsou přípustné i alternativy, pokud zkoušené organismy rostou a vyvíjejí se uspokojivě. Je důležité poznamenat, že pokud se měří endokrinní specifické cílové parametry, nesmí krmivo obsahovat endokrinní účinné látky, jako je sója.

Krmení larev

33. Doporučená potrava pro larvy zahrnuje krmivo pro mladé lososovité ryby, řasy *Spirulina* a vločky pro okrasné rybičky (např. vločky TetraFin®, Tetra, Německo) promíchané v kultivační (nebo ředicí) vodě. Tato směs se podává třikrát denně v pracovní dny a jednou denně o víkendech. Pulci se také krmí živou žábronožkou, rod *Artemia*, 24 hodin starými larvami (nauplie), a to dvakrát denně v pracovní dny a jednou denně o víkendech, počínaje dnem 8 po fertilizaci. Krmení, které by mělo být stejné v každé zkušební nádrži, by mělo umožňovat správný růst a vývoj pokusných zvířat, aby byla zajištěna reprodukovatelnost a přenositelnost výsledků analýzy: 1) střední doba do stádia NF 62 v kontrolách by měla být ≤ 45 dnů a 2) doporučuje se, aby střední hmotnost byla v kontrolách ve stádiu NF 62 v rozmezí 1,0 ± 0,2 g.

Krmení juvenilních jedinců

34. Po dokončení metamorfózy zahrnuje krmný režim prvotřídní krmivo pro žáby, které klesá pod hladinu, např. Sinking Frog Food -3/32 (Xenopus Express, FL, USA) (dodatek 4). Pro malé žabky (rané juvenilní stádium) se peletky krátce pomelou v mlýnku na kávu, mixéru nebo se podrtí tloučkem v třecí misce, aby se zmenšila jejich velikost. Jakmile jsou juvenilní žabky dostatečně velké, aby mohly konzumovat celé peletky, není mletí nebo drcení dále nutné. Zvířata by měla být krmena jednou denně. Krmení juvenilních jedinců by mělo umožňovat správný růst a vývoj organismů: doporučuje se střední hmotnost kontrolních juvenilních jedinců v rozmezí 11,5 ± 3 g při ukončení analýzy.

Analytická chemie

35. Před zahájením analýzy je třeba stanovit stabilitu zkoušené chemické látky (např. rozpustnost, odbouratelnost a těkavost) a všech potřebných analytických metod například pomocí stávajících informací nebo znalostí. Při dávkování přes ředicí vodu se doporučuje, aby byly zkoušené roztoky z každé replikované nádrže před zahájením zkoušky analyzovány, aby se ověřila účinnost systému. Během doby expozice se koncentrace zkoušené látky určují ve vhodných intervalech, nejlépe každý týden alespoň v jednom replikátu u každé expoziční skupiny, přičemž replikáty ve stejné expoziční skupině se každý týden střídají. Doporučuje se zakládat výsledky na naměřených koncentracích. Udržela-li se však koncentrace zkoušené chemické látky v roztoku během celé zkoušky uspokojivě v rozmezí ± 20 % jmenovité koncentrace, lze výsledky zakládat na jmenovitých nebo změřených hodnotách. Také variační koeficient (CV) měřených zkoušených koncentrací by měl být po celou dobu zkoušky v rámci expozice v každé koncentraci udržován na 20 % nebo méně. Když změřené koncentrace nezůstávají v rámci 80–120 % nominální koncentrace (například při testování vysoce biologicky rozložitelných nebo adsorpčních chemických látek), je třeba stanovit účinné koncentrace a vyjádřit je ve vztahu k průměrné koncentraci pro průtokové zkoušky.

▼M8

36. Rychlosti průtoku ředicí vody a zásobního roztoku by měly být ve vhodných intervalech kontrolovány (např. třikrát týdně) po celou dobu expozice. U chemických látek, které nelze detekovat při některých nebo při všech nominálních koncentracích (např. v důsledku rychlého rozkladu nebo adsorpce ve zkušebních komorách nebo při výrazné akumulaci chemické látky v organismu exponovaných zvířat), se doporučuje přizpůsobit rychlost obměny zkušebního roztoku v každé komoře tak, aby byly zkoušené koncentrace udržovány pokud možno konstantní.

Pozorování a měření sledovaných parametrů

37. Sledovanými parametry hodnocenými v průběhu expozice jsou parametry naznačující toxicitu včetně mortality a abnormálního chování, jako jsou klinické známky onemocnění anebo generalizované toxicity, a stanovení růstu (délka a hmotnost), jakož i patologické parametry, které mohou být odpovědí na generalizovanou toxicitu i na endokrinní způsoby účinku působící na dráhy zprostředkované estrogeny, androgeny nebo hormony štítné žlázy. Doplňkově může být při ukončení analýzy změřena koncentrace VTG v plazmě. Měření VTG může být užitečné pro pochopení výsledků studie v souvislosti s endokrinními mechanismy pravděpodobných endokrinních disruptorů. Sledované parametry a harmonogramy měření jsou uvedeny v tabulce 1.

Tabulka 1

Přehled sledovaných parametrů u zkoušky LAGDA

Sledované parametry (*)	Denně	Průběžný odběr vzorků (odběr vzorků larev)	Ukončení zkoušky (odběr vzorků juvenilních jedinců)
Mortalita a abnormality	X		
Doba do stádia NF 62		X	
Histo(pato)logie (štítná žláza)		X	
Morfometrické údaje (růst jako hmotnost a délka)		X	X
Jaterní somatický index (LSI)			X
Podíly genetického/fenotypového pohlaví			X
Histopatologie (gonády, reprodukční cesty, ledviny a játra)			X
Vitelogenin (VTG) (doplňkově)			X

(*) Všechny sledované parametry se analyzují statisticky.

Mortalita a denní pozorování

38. Všechny zkušební nádrže je třeba denně kontrolovat, zda neobsahují mrtvé jedince, a zaznamenávat mortalitu v každé nádrži. Mrtvé jedince ihned po jejich zpozorování je třeba ze zkušební nádrže odstranit. Vývojová stádia mrtvých zvířat se kategorizují jako stádium před NF 58 (před vytvořením předních končetin), stádium NF 58 až stádium NF 62, stádium NF 63 až stádium NF 66 (mezi stádiem 62 a úplnou absorpcí ocasu) nebo stádium po NF 66 (po larválním stádiu). Míra mortality vyšší než 20 % může ukazovat na nevhodné zkušební podmínky nebo na zjevně toxické účinky zkoušené

▼M8

chemické látky. Zvířata bývají nejcitlivější na mortalitu indukovanou jinými událostmi než chemickou látkou v prvních několika dnech vývoje po nakladení vajíček a v průběhu vrcholu metamorfózy. Tato mortalita může být zjevná z kontrolních dat.

39. Dále by mělo být zaznamenáno každé pozorované abnormální chování, makroskopicky viditelné malformace (např. skolióza) nebo léze. Pozorované případy skoliózy je třeba spočítat (incidence) a stanovit její stupeň závažnosti (např. nenápadná – NR, minimální – 1, střední – 2, těžká – 3; dodatek 8). Je třeba usilovat o minimalizaci prevalence střední až těžké skoliózy (např. pod 10 % v kontrolách) po celou dobu studie, přestože větší prevalence abnormalit v kontrolách nemusí být nutně důvodem pro zastavení zkoušky. Pro standardní chování je typické, že larvy jsou ponořeny ve vodním sloupci, ocas mají zvednutý výše, než je hlava, pravidelně rytmicky mrskají ocasní ploutví, pravidelně vyplouvají k hladině, zavírají žábry a reagují na podněty. Nestandardní chování by zahrnovalo například plavání na hladině, ležení na dně nádrže, obrácené nebo nepravidelné plavání, nepravidelné vyplouvání k hladině a nereagování na podnět. U jedinců po metamorfóze by kromě výše uvedeného normálního chování měly být zaznamenány velké rozdíly ve spotřebě potravy mezi expozicemi. Závažné malformace a léze mohou zahrnovat například morfologické abnormality (např. deformace končetin), krvácivé léze, bakteriální nebo plísňové infekce. Výskyt lézí na hlavě juvenilních jedinců bezprostředně za nosními dírkami může být indikací nedostatečné vlhkosti. Tato stanovení jsou kvalitativní, měla by být považována za rovnocenná klinickým příznakům onemocnění/stresu a porovnána s kontrolními zvířaty. Pokud je míra výskytu v exponovaných nádržích větší než v kontrolních, pak tento výskyt nebo míru výskytu je třeba považovat za důkaz zjevné toxicity.

Dílčí odběr vzorků larev

Popis dílčího odběru vzorků larev:

40. Pulci, kteří dosáhli stádia NF 62, se z nádrží odstraní a použijí se jako vzorky, nebo se přemístí do další části expozice v nové nádrži, případně se fyzicky oddělí od zbývajících pulců ve stejné nádrži dělící přepážkou. Pulci se každý den kontrolují a zaznamená se den studie, kdy jednotliví pulci dosáhnou stádia NF 62. Rozhodující charakteristikou při tomto hodnocení je tvar hlavy. Jakmile se hlava zmenší natolik, že je vizuálně zhruba stejně široká jako trup pulce a přední končetiny na úrovni střední části srdce, počítá se tento jedinec jako pulec, který dosáhl stádia NF 62.

41. Cílem je odebrat celkem pět vzorků pulců ve stádiu NF 62 z každé replikované nádrže. Provádí se to zcela náhodně, ale je třeba rozhodnout předem. Hypotetický příklad replikované nádrže je uveden na **obrázku 1**. Pokud je v konkrétní nádrži 20 přeživších pulců, když první jednotlivec dosáhne stadia NF 62, vybere se z čísel 1–20 pět náhodných čísel. Pulec číslo 1 je první jednotlivec, který dosáhl stadia NF 62, a pulec číslo 20 je poslední jedinec v nádrži, který dosáhl stádia NF 62. Podobně, pokud je v konkrétní nádrži 18 přeživších pulců, vybere se z čísel 1–18 pět náhodných čísel. Toto se udělá u každé replikované nádrže, když první jednotlivec ve zkoušce dosáhne stadia NF 62. Jestliže jsou při odběru vzorků ve stádiu NF 62 mortality, je třeba zbývající vzorky opět randomizovat podle toho, kolik larev zbylo do stádia NF 62 a kolik dalších vzorků je zapotřebí pro dosažení celkem pěti vzorků z tohoto replikátu. V den, kdy pulec dosáhne stádia NF 62, se udělá poznámka v připraveném schématu pro odběr vzorků, aby bylo možné určit, zda je daný jednotlivec použit jako vzorek, nebo fyzicky

▼M8

oddělen od zbývajících pulců pro další expozici. V uvedeném příkladu (obrázek 1) je první jednotlivec, který dosáhne stádia NF 62 (tj. políčko číslo jedna), fyzicky oddělen od ostatních larev, pokračuje v expozici a den studie, kdy tento jednotlivec dosáhl stádia NF 62, se zaznamená. Poté se stejným způsobem pokračuje u jednotlivců číslo 2 a číslo 3 jako u čísla 1 a poté je jednotlivec číslo 4 použit jako vzorek pro stanovení růstu a histologické vyšetření štítné žlázy (podle tohoto příkladu). Tento postup pokračuje až do doby, kdy se 20. jednotlivec buď připojí ke zbývajícím jednotlivcům ve stádiu po NF 62, nebo je použit jako vzorek. Použitý postup náhodného výběru musí každému organismu ve zkoušce poskytnout stejnou pravděpodobnost, že bude vybrán. Toho lze dosáhnout použitím jakékoli metody náhodného výběru, avšak vyžaduje se také, aby každý pulec byl v určité době v průběhu odběru dílčích vzorků ve stádiu NF 62 odloven.

Obrázek 1

Hypotetický příklad režimu odběru vzorků ve stádiu NF 62 u jedné replikované nádrže



42. Sledovanými parametry při odběru vzorků v larválním stádiu jsou: 1) doba do stádia NF 62 (tj. počet dnů mezi fertilizací a stádiem NF 62), 2) externí abnormality, 3) morfometrické údaje (např. hmotnost a délka) a 4) histologie štítné žlázy.

Humánní usmrcení pulců

43. Pulci odebíraní jako vzorek ve stádiu NF 62 (5 jednotlivců na replikát) se usmrtí ponořením do vhodného množství (např. 500 ml) roztoku anestetika (např. 0,3 % roztok MS-222, trikain methan sulfonát, CAS.886-86-2) na dobu 30 minut. Roztok MS-222 by měl být pufrován bikarbonátem sodným na hodnotu pH přibližně 7,0, protože nepufrovaný roztok MS-222 je kyselý a dráždivý pro žabí kůži, což působí špatnou absorpci a zbytečný další stres pro organismy.

44. Pulec se pomocí podběráku vyjme z experimentální nádrže a přenese (umístí) do eutanazačního roztoku. Zvíře se správně usmrtí a je připraveno na pitvu, když nereaguje na externí podněty, jako je zaštípnutí zadní končetiny kleštičkami.

Morfometrické údaje (hmotnost a délka)

45. Stanovení hmotnosti ve vlhkém stavu (na nejbližší mg) a délky těla od tlamy po kloaku (SVL) (na nejbližší 0,1 mm) u každého půlce se provede okamžitě poté, co přestane reagovat v důsledku anestetika (obrázek 2a). Na změření SVL z fotografie může být použit software pro analýzu obrazu. Pulci se před

▼M8

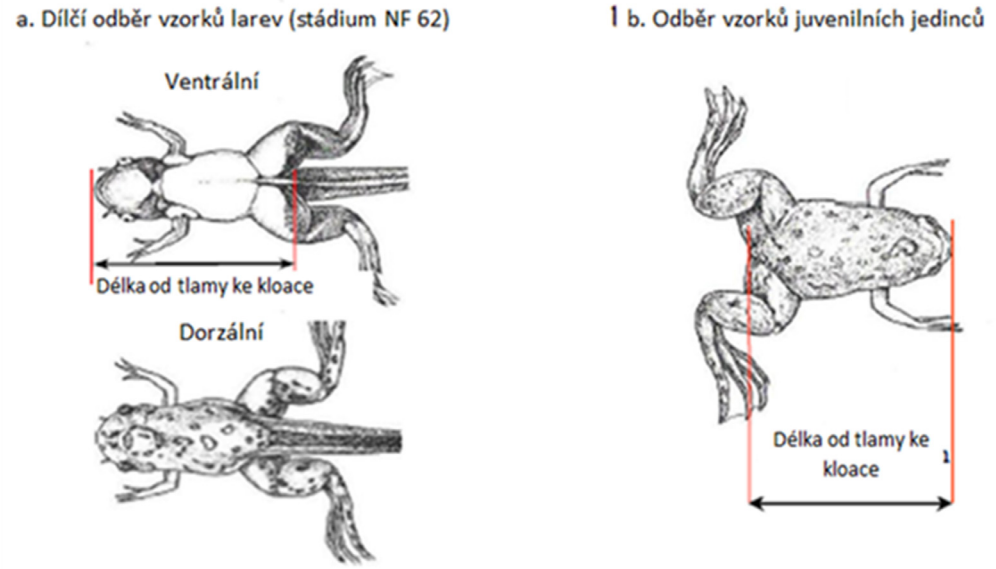
vážením osuší, aby se z nich odstranila nadbytečná ulpělá voda. Po změření velikosti těla (hmotnost a SVL) se zaznamenají nebo zapíší všechny velké morfologické abnormality anebo klinické známky toxicity, jako je skolióza (viz dodatek 8), petechie a krvácení, přičemž se doporučuje elektronická dokumentace. Nezapomeňte, že petechie jsou drobná tečkovitá krvácení červené nebo fialové barvy v kožních vlásečnicích.

Odběr a zpracování tkání

46. U dílčích vzorků odebraných v larválním stádiu se histologicky vyšetří štítná žláza. Dolní část těla za předními končetinami se odstraní a zlikviduje. Zastřižené mrtvé tělo se zafixuje v Davidsonově fixačním médiu. Objem fixačního roztoku v nádobě by měl být alespoň desetinásobkem přibližného objemu tkání. Aby se zájmové tkáně adekvátně zafixovaly, je třeba zajistit správné promíchání nebo cirkulaci fixačního roztoku. Všechny tkáně zůstanou v Davidsonově fixačním médiu minimálně 48 hodin, avšak ne déle než 96 hodin, a poté se opláchnou v deionizované vodě a uchovávají v 10 % neutrálním pufrovaném formalínu (1) (29).

Histologie štítné žlázy

47. U každého dílčího vzorku larvy (zafixované tkáně) se histologicky vyšetří štítná žláza, tj. stanoví se diagnóza a stupeň závažnosti (29) (30).



Obrázek 2: Značky pro měření délky těla od tlamy po kloaku při analýze LAGDA ve stádiu NF 62 a) a u juvenilních žab b). Rozhodující charakteristiky stádia NF 62 a): hlava má stejnou šířku jako trup, délka čichového nervu je kratší než průměr čichového bulbu (pohled zezadu) a přední končetiny jsou na úrovni srdce (pohled zepředu). Obrázky převzaty z publikace Nieuwkoop a Faber (1994).

Konec expozice larev

48. Vzhledem k počátečnímu počtu pulců lze předpokládat, že jedinců, kteří se nebudou vyvíjet normálně a nedokončí metamorfózu (stádium NF 66) v přiměřeném čase, bude pravděpodobně malé procento. Larvální část expozice by neměla překročit 70 dní. Všechny pulce zbývající na konci tohoto

▼M8

období je třeba usmrtit (viz odstavec 43), stanovit jejich hmotnost ve vlhkém stavu a SVL, stanovit stádium podle Nieuwkoopa and Fabera, 1994 a zaznamenat případné vývojové abnormality.

Redukce po stádiu NF 66

49. Od stádia NF 66 (úplná resorpce ocasu) až do ukončení expozice by mělo pokračovat deset jedinců na nádrž. Jakmile tedy všechna zvířata dosáhla stadia NF 66 nebo po 70 dnech (pokud toto datum nastane dříve) je třeba provést redukci. Zvířata po stádiu NF 66, která nebudou nadále exponovaná, se vybírají náhodně.

50. Zvířata, která nejsou vybrána pro další expozici, se utratí (viz odstavec 43). U každého zvířete se provede měření vývojového stádia, stanoví se jeho hmotnost za vlhka a SVL (obrázek 2b) a provede se podrobná pitva. Fenotypové pohlaví (podle morfologie gonád) se označí jako samičí, samčí nebo neurčité.

Odběr vzorků juvenilních jedinců

Popis odběru vzorků juvenilních jedinců

51. Zbývající zvířata jsou nadále exponována až do 10 týdnů po střední době do stádia NF 62 v kontrole s ředicí vodou (anebo v kontrole s rozpouštědlem v příslušných případech). Na konci doby expozice se zbývající zvířata (maximálně 10 žab na replikát) usmrtí a změří se nebo vyhodnotí jednotlivé sledované parametry a zaznamenají se: 1) morfometrické údaje (hmotnost a délka), 2) podíl fenotypového/genotypového pohlaví, 3) hmotnost jater (jaterní somatický index), 4) histopatologie (gonády, reprodukční trakt, játra a ledviny) a doplňkově 5) plazmatický VTG.

Humánní usmrcení žab

52. Juvenilní vzorky, žáby po metamorfóze se usmrtí intraperitoneální injekcí anestetika, např. 10 % MS-222 ve vhodném fosfátovém pufru. Jakmile žáby přestanou reagovat (obvykle zhruba 2 minuty po injekci, pokud je použit 10 % MS-222 v dávce 0,01 ml na 1 g žáby), mohou se z nich odebrat vzorky. I když juvenilní žáby mohou být ponořeny do vyšší koncentrace anestetika (MS-222), zkušenosti ukazují, že při použití této metody trvá déle, než na ně anestetikum začne působit, přičemž doba působení nemusí být adekvátní, aby umožnila odběr vzorků. Injekce představuje efektivní a rychlé usmrcení před odběrem vzorků. Odběr vzorků by neměl být zahájen, dokud není potvrzeno, že žáby nereagují, aby bylo zajištěno, že jsou zvířata mrtvá. Jestliže žáby vykazují známky značného utrpení (velmi silné utrpení a spolehlivě lze předvídat úhyn) a jsou považovány za hynoucí, je třeba jim podat anestetikum, usmrtit je a při analýze dat je zahrnout do mortality. Pokud je žába usmrcena v důsledku morbidity, je třeba to zaznamenat a vykázat. V závislosti na tom, kdy v průběhu studie jsou žáby usmrceny, je lze uchovat pro histopatologickou analýzu (fixovat žáby pro případnou histopatologii).

Morfometrické údaje (hmotnost a délka)

53. Měření hmotnosti ve vlhkém stavu a SVL je stejné jako měření popsané u odběru dílčích vzorků larev.

▼**M8**

Plazmatický vitelogenin (VTG) (doplňkově)

54. VTG je široce akceptovaný biologický marker vyplývající z expozice estrogenovým chemickým látkám. Ve zkoušce LAGDA může být doplňkově měřen plazmatický VTG u juvenilních vzorků (může to být zvláště podstatné v případě podezření, že zkoušená chemická látka je estrogen).

55. Odříznou se zadní končetiny usmrcených juvenilních jedinců a z heparinizované vlásečnice se odebere krev (i když mohou být vhodné i alternativní metody odběru krve, jako je srdeční punkce). Krev se vystříkne do mikrozkumavky do odstředivky (např. o objemu 1,5 ml) a odstředěním se získá plazma. Vzorky plazmy se skladují při teplotě –70 °C nebo nižší až do stanovení VTG. Koncentraci VTG v plazmě lze změřit metodou enzymové imunoanalýzy s enzymem vázaným na imunosorbent (ELISA) (dodatek 6) nebo alternativní metodou, jako je například hmotnostní spektrometrie (31). Vzhledem k větší senzitivitě jsou vhodnější protilátky specifické pro daný druh.

Určení genetického pohlaví

56. Genetické pohlaví každé juvenilní žáby se posuzuje podle markerů, které vypracoval Yoshimoto *et al.* (11). Aby mohlo být stanoveno genetické pohlaví, odebere se část (nebo celá) jedné zadní končetiny (nebo jakékoli jiné tkáně) odpreparované při pitvě a uloží se do mikrozkumavky (vzorky žabí tkáně mohou být získány z jakékoli tkáně). Tkáň lze uchovávat při teplotě –20 °C nebo nižší až do izolace kyseliny deoxyribonukleové (DNA). Izolace DNA z tkání může být provedena pomocí komerčně dostupných sad a analýza přítomnosti nebo nepřítomnosti markeru se provádí metodou polymerázové řetězové reakce (PCR) (dodatek 5). Obecně je shoda mezi histologickým pohlavím a genotypem u všech kontrolních zvířat v okamžiku odběru vzorků v juvenilním stádiu v kontrolních skupinách větší než 95 %.

Odběr tkání a jejich fixace pro histopatologii

57. Při posledním odběru vzorků se odeberou gonády, reprodukční trakt, ledviny a játra pro histologickou analýzu. Otevře se břišní dutina, vypreparují se játra a zváží se. Poté se opatrně vyjmou z podbřišku trávicí orgány (například žaludek, střeva), aby se odhalily gonády, ledviny a reprodukční trakt. Všechny závažné morfologické abnormality gonád se zaznamenají. Nakonec se odeberou zadní končetiny, pokud již nebyly odebrány za účelem odběru krve. Odebraná játra a mrtvé tělo s gonádami ponechanými na místě je třeba okamžitě uložit do Davidsonova fixačního roztoku. Objem fixačního roztoku v nádobě by měl být alespoň desetinásobkem přibližného objemu tkání. Všechny tkáně zůstanou v Davidsonově fixačním médiu minimálně 48 hodin, avšak ne déle než 96 hodin, a poté se opláchnou v deionizované vodě a uchovávají v 10 % neutrálním pufrovaném formalínu (1) (29).

Histopatologie

58. Každý juvenilní vzorek se histologicky vyšetří, zda nevykazuje patologii gonád, reprodukčního traktu, ledvin a jaterní tkáně, tj. stanoví se diagnóza a určí stupeň závažnosti (32). Z tohoto hodnocení se odvodí také gonádový fenotyp (např. vaječník, varle, obojetný pohlavní vývoj) a společně s jednotlivými měřeními genetického pohlaví mohou být tato pozorování použita pro výpočet podílů fenotypových/genotypových pohlaví.

▼M8

ÚDAJE A PŘEDKLÁDÁNÍ ZPRÁV

Statistická analýza

59. Při analýze LAGDA jsou generovány tři druhy dat, které je třeba statisticky analyzovat: 1) kvantitativní kontinuální data (hmotnost, SVL, LSI, VTG), 2) data o době do události u vývojových podílů (tj. dny do stádia NF 62 od zahájení analýzy) a 3) ordinální data ve formě stupňů závažnosti nebo vývojových stádií z histopatologického vyšetření.

60. Doporučuje se, aby uspořádání zkoušky a výběr statistického testu umožnily dostatečnou průkaznost zkoušky, aby se zjistily změny biologického významu v ukazatelích, u nichž má být uvedena hodnota NOEC nebo EC_x. Statistická analýza údajů (obvykle střední hodnoty replikátů) by se pokud možno měla řídit postupy, které jsou popsány v dokumentu *Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application* (33). V dodatku 7 této zkušební metody je uvedeno doporučené schéma rozhodování při statistické analýze a pokyny pro zpracování údajů a výběr nejvhodnějšího statistického testu nebo modelu, který má být při zkoušce LAGDA použit.

61. Údaje z juvenilních vzorků (např. růst, LSI) by měly být analyzovány samostatně pro každé genotypové pohlaví, protože genotypové pohlaví se určuje u všech žab.

Poznámky k analýze dat

Použití zpochybněných replikátů a expozic

62. Replikáty a expozice mohou být zpochybněny v důsledku nadúmrtnosti při zjevné toxicitě, onemocnění nebo technické chybě. Jestliže je expozice zpochybněná v důsledku onemocnění nebo technické chyby, měly by být pro analýzu k dispozici alespoň tři nezpochybněné expozice se třemi nezpochybněnými replikáty. Jestliže se u vysoké expozice (expozic) objeví zjevná toxicita, je lepší, aby byly pro analýzu k dispozici alespoň tři expoziční úrovně se třemi nezpochybněnými replikáty (odpovídající metodě maximální tolerované koncentrace podle pokynu OECD (34)). Vedle mortality mohou známky zjevné toxicity zahrnovat ovlivnění chování (např. plavání na hladině, ležení na dně nádrže, obrácené nebo nepravidelné plavání, nepravidelné vyplouvání k hladině), morfologické léze (např. hemoragické léze, abdominální edém) nebo inhibici normálních odpovědí na krmení při kvalitativním srovnání s kontrolními zvířaty.

Kontrola s rozpouštědlem

63. Při ukončení zkoušky je třeba provést hodnocení případných účinků rozpouštědla (pokud bylo použito). To se provede pomocí statistického srovnání kontrolní skupiny s rozpouštědlem a kontrolní skupiny s ředicí vodou. Nejdůležitějšími ukazateli, které je třeba při této analýze posoudit, jsou determinanty růstu (hmotnost a délka), jelikož tyto ukazatele mohou být ovlivněny generalizovanými toxicitami. Jsou-li zaznamenány statisticky významné rozdíly v těchto ukazatelích mezi kontrolní skupinou s ředicí vodou a kontrolní skupinou s rozpouštědlem, je třeba odborně posoudit, zda je platnost zkoušky zpochybněna. Jestliže se tyto dvě kontroly liší, je třeba skupiny exponované chemické látce porovnávat s kontrolou s rozpouštědlem, pokud není známo, že že je vhodnější porovnání s kontrolou s ředicí vodou. Není-li zaznamenán žádný statisticky významný rozdíl mezi oběma kontrolními skupinami, doporučuje se, porovnávat skupiny exponované zkoušené chemické látce se sloučenými skupinami (kontrola s rozpouštědlem a kontrola s ředicí vodou), pokud není známo, že je vhodnější buď porovnání pouze s kontrolou s ředicí vodou, nebo pouze s kontrolní skupinou s rozpouštědlem.

▼M8

ZÁVĚREČNÁ ZPRÁVA

64. Závěrečná zpráva by měla obsahovat:

Zkoušená chemická látka:

— fyzikální povaha a (je-li to podstatné) fyzikálně-chemické vlastnosti,

— jednosložková látka:

fyzický vzhled, rozpustnost ve vodě a další relevantní fyzikálně-chemické vlastnosti,

chemická identifikace, např. název podle IUPAC nebo CAS, číslo CAS, kód SMILES nebo InChI, strukturní vzorec, čistota, popřípadě chemická identita nečistot, je-li to prakticky proveditelné atd. (včetně obsahu organického uhlíku, je-li měřen),

— vícesložková látka, UVCB a směsi:

charakterizované pokud možno chemickou identitou (viz výše), kvantitativním výskytem a relevantními fyzikálně-chemickými vlastnostmi složek.

Zkušební druh:

— vědecký název, kmen, je-li k dispozici, zdroj a metoda sběru oplodněných jiker a následné zpracování.

— incidence skoliózy u dosavadních kontrol pro použitou chovanou populaci.

Zkušební podmínky:

— fotoperioda (fotoperiody),

— uspořádání zkoušky (např. velikost nádrže, materiál a objem vody, počet zkušebních nádrží a jejich replikátů, počet pokusných organismů v každém replikátu),

— metoda přípravy zásobních roztoků a četnost obnovování (je-li použito, mělo by se uvést solubilizační činidlo a jeho koncentrace),

— metoda dávkování zkoušené chemické látky (např. čerpadla, ředicí systémy),

— výtěžnost metody a nominální zkušební koncentrace, mez stanovitelnosti, střední hodnoty naměřených hodnot ve zkušebních nádržích a jejich směrodatné odchylky a metody jejich stanovení a doklad o toho, že naměřené koncentrace odpovídají koncentracím zkoušené chemické látky ve skutečném roztoku,

— charakteristiky ředicí vody: hodnota pH, tvrdost, teplota, koncentrace rozpuštěného kyslíku, koncentrace zbytkového chloru (je-li měřena), celkový obsah jódu, obsah celkového organického uhlíku (je-li měřen), obsah suspendovaných látek (je-li měřen), salinita zkušebního média (je-li měřena) a výsledky jakýchkoli jiných provedených měření,

— nominální zkušební koncentrace, střední hodnoty naměřených koncentrací ve zkušebních nádobách a jejich směrodatné odchylky,

— kvalita vody ve zkušebních nádržích, pH, teplota (denně) a koncentrace rozpuštěného kyslíku,

▼**M8**

— podrobné informace o krmení (např. druh krmiva (krmiv), původ, podávané množství a frekvence krmení).

Výsledky:

— doklady o tom, že kontrolní skupiny splnily kritéria validity,

— následující údaje o kontrolní skupině (plus o kontrole s rozpouštědlem, je-li použita) a o expozičních skupinách: pozorovaná mortalita a abnormalita, doba do stádia NF 62, histologické vyšetření štítné žlázy (pouze vzorek larev), růst (hmotnost a délka), LSI (pouze juvenilní vzorek), podíly genotypového/fenotypového pohlaví (pouze juvenilní vzorek), výsledky histopatologického vyšetření gonád, reprodukčního traktu, ledvin a jater (pouze juvenilní vzorek) a plazmatický VTG (pouze juvenilní vzorek, je-li stanoven),

— metoda statistické analýzy a zpracování údajů (použitý statistický test nebo model),

— koncentrace bez pozorovaných účinků (NOEC) pro každou posuzovanou odpověď,

— nejnižší koncentrace s pozorovaným účinkem (LOEC) pro každou posuzovanou odpověď (při $\alpha = 0{,}05$), případně hodnoty EC_x pro každou posuzovanou odezvu a intervaly spolehlivosti (např. 95 %) a graf proloženého modelu použitý pro jejich výpočet, směrnice křivky koncentrace-odezva, vzorec regresního modelu, odhadované parametry modelu a jejich směrodatné odchylky,

— všechny odchylky od zkušební metody a odchylky od kritérií přijatelnosti a dále poznámky k potenciálním důsledkům na výsledek zkoušky.

65. U výsledků měření sledovaných ukazatelů by měly být uvedeny střední hodnoty a jejich směrodatné odchylky (pokud možno pro jednotlivé replikáty i koncentrace).

66. Měla by být vypočtena střední doba do stádia NF 62 v kontrolách a uvedena jako průměr mediánů replikátů a jejich směrodatná odchylka. Podobně by u expozic měl být vypočten expoziční medián a uveden jako průměr mediánů replikátů a jejich směrodatná odchylka.

LITERATURA

(1) U.S. Environmental Protection Agency (2013). Validation of the Larval Amphibian Growth and Development Assay: Integrated Summary Report.

(2) OECD (2012a). Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Endocrine Disrupters. Environment, Health and Safety Publications, Series on testing and assessment (No 150) Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(3) Nieuwkoop PD and Faber J. (1994). Normal Table of *Xenopus laevis* (Daudin). Garland Publishing, Inc, New York, NY, USA.

(4) Kloas W and Lutz I. (2006). Amphibians as Model to Study Endocrine Disrupters. Journal of Chromatography A 1130: 16-27.

▼**M8**

(5) Chang C, Witschi E. (1956). Genic Control and Hormonal Reversal of Sex Differentiation in *Xenopus*. Journal of the Royal Society of Medicine 93: 140-144.

(6) Gallien L. (1953). Total Inversion of Sex in *Xenopus laevis* Daud, Following Treatment with Estradiol Benzoate Administered During Larval Stage. Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences 237: 1565.

(7) Villalpando I and Merchant-Larios H. (1990). Determination of the Sensitive Stages for Gonadal Sex-Reversal in *Xenopus Laevis* Tadpoles. International Journal of Developmental Biology 34: 281-285.

(8) Miyata S, Koike S and Kubo T. (1999). Hormonal Reversal and the Genetic Control of Sex Differentiation in *Xenopus*. Zoological Science 16: 335-340.

(9) Mikamo K and Witschi E. (1963). Functional Sex-Reversal in Genetic Females of *Xenopus laevis*, Induced by Implanted Testes. Genetics 48: 1411.

(10) Olmstead AW, Kosian PA, Korte JJ, Holcombe GW, Woodis K and Degitz SJ. (2009)a. Sex reversal of the Amphibian, *Xenopus tropicalis*, Following Larval Exposure to an Aromatase Inhibitor. Aquatic Toxicology 91: 143-150.

(11) Yoshimoto S, Okada E, Umemoto H, Tamura K, Uno Y, Nishida-Umehara C, Matsuda Y, Takamatsu N, Shiba T and Ito M. (2008). A W-linked DM-Domain Gene, DM-W, Participates in Primary Ovary Development in *Xenopus Laevis*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 105: 2469-2474.

(12) Olmstead AW, Korte JJ, Woodis KK, Bennett BA, Ostazeski S and Degitz SJ. (2009)b. Reproductive Maturation of the Tropical Clawed Frog: *Xenopus tropicalis*. General and Comparative Endocrinology 160: 117-123.

(13) Tobias ML, Tomasson J and Kelley DB. (1998). Attaining and Maintaining Strong Vocal Synapses in Female *Xenopus laevis*. Journal of Neurobiology 37: s. 441-448.

(14) Qin ZF, Qin XF, Yang L, Li HT, Zhao XR and Xu XB. (2007). Feminizing/Demasculinizing Effects of Polychlorinated Biphenyls on the Secondary Sexual Development of *Xenopus Laevis*. Aquatic Toxicology 84: 321-327.

(15) Porter KL, Olmstead AW, Kumsher DM, Dennis WE, Sprando RL, Holcombe GW, Korte JJ, Lindberg-Livingston A and Degitz SJ. (2011). Effects of 4-*Tert*-Octylphenol on *Xenopus Tropicalis* in a Long Term Exposure. Aquatic Toxicology 103: 159-169.

(16) ASTM. (2002). Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests on Test Materials with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians. ASTM E729-96, Philadelphia, PA, USA.

(17) Kapitola C.4 této přílohy, Zkouška snadné biologické rozložitelnosti.

(18) Kapitola C.29 této přílohy, Hodnocení snadné biologické rozložitelnosti – uvolňování CO_2 v těsně uzavřených lahvičkách (Headspace Test).

(19) Kahl MD, Russom CL, DeFoe DL and Hammermeister DE (1999). Saturation Units for Use in Aquatic Bioassays. Chemosphere 39: 539-551.

▼**M8**

(20) Adolfsson-Erici M, Åkerman G, Jahnke A, Mayer P, McLachlan MS (2012). A flow-through passive dosing system for continuously supplying aqueous solutions of hydrophobic chemicals to bioconcentration and aquatic toxicity tests. Chemosphere, 86(6): 593-9.

(21) OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. Environment, Health and Safety Publications, Series on testing and assessment (No 23), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(22) Hutchinson TH, Shillabeer N, Winter MJ and Pickford DB. (2006). Acute and Chronic Effects of Carrier Solvents in Aquatic Organisms: A Critical Review. Review. Aquatic Toxicology 76: 69–92.

(23) ASTM (2004). Standard Guide for Conducting the Frog Embryo Teratogenesis Assay - *Xenopus* (FETAX). ASTM E1439 - 98, Philadelphia, PA, USA.

(24) Read BT (2005). Guidance on the Housing and Care of the African Clawed Frog *Xenopus Laevis*. Royal Society for the Prevention of Cruelty to Animals (RSPCA), Horsham, Sussex, U.K., 84 pp.

(25) Kapitola C.38 této přílohy, Analýza metamorfózy obojživelníků.

(26) Kapitola C.48 této přílohy, Krátkodobá zkouška působení na reprodukci ryb.

(27) Kapitola C.41 této přílohy, Zkouška pohlavního vývoje ryb.

(28) Kapitola C.49 této přílohy, Zkouška akutní toxicity na rybích embryích (FET).

(29) OECD (2007). Guidance Document on Amphibian Thyroid Histology.Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment. (No 82) Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(30) Grim KC, Wolfe M, Braunbeck T, Iguchi T, Ohta Y, Tooi O, Touart L, Wolf DC and Tietge J. (2009). Thyroid Histopathology Assessments for the Amphibian Metamorphosis Assay to Detect Thyroid-Active Substances, Toxicological Pathology 37: 415-424.

(31) Luna LG and Coady K.(2014). Identification of *X. laevis* Vitellogenin Peptide Biomarkers for Quantification by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. Analytical and Bioanalytical Techniques 5(3): 194.

(32) OECD (2015). Guidance on histopathology techniques and evaluation. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 228), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(33) OECD (2006). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. Environment, Health and Safety Publications, Series on testing and assessment (No 54), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(34) Hutchinson TH, Bögi C, Winter MJ, Owens JW, 2009. Benefits of the Maximum Tolerated Dose (MTD) and Maximum Tolerated concentration (MTC) Concept in Aquatic Toxicology. Aquatic Toxicology 91(3): 197-202.

▼M8

Dodatek 1

DEFINICE

Hlavní ukazatel: způsobuje účinek na úrovni populace.

Chemická látka: látka nebo směs.

ELISA: enzymová imunosorpční analýza.

EC_x: (účinná koncentrace s x% účinkem) je koncentrace, která vyvolá x% účinek u zkušebních organismů během dané expoziční doby ve srovnání s kontrolou. Například EC_{50} je koncentrace odhadnutá pro vyvolání účinku na zkoušený ukazatel u 50 % exponované populace za stanovenou expoziční dobu.

dpf: dny po fertilizaci.

Průtoková metoda: zkouška, při níž zkušební roztoky plynule protékají zkušebním systémem po celou dobu trvání expozice.

Osa HPG: hypothalamo-hypofýzo-gonadální osa.

IUPAC: International Union of Pure and Applied Chemistry (Mezinárodní unie pro čistou a užitou chemii).

Nejnižší koncentrace s pozorovaným účinkem (LOEC): je nejnižší zkušební koncentrace zkoušené chemické látky, při níž je pozorován statisticky významný účinek zkoušené látky ve srovnání s kontrolou (při $p < 0,05$). Všechny zkušební koncentrace vyšší než LOEC musí však mít stejné nebo závažnější škodlivé účinky, než jsou účinky pozorované při koncentraci LOEC. Nelze-li tyto dvě podmínky splnit, mělo by být podrobně vysvětleno, jak byla LOEC (a tedy i NOEC) zvolena. Pokyny jsou uvedeny v dodatku 7.

Medián letální koncentrace (LC_{50}): je koncentrace zkoušené chemické látky, která usmrtí přibližně 50 % zkušebních organismů během celé zkoušky.

Koncentrace bez pozorovaných účinků (NOEC): je zkušební koncentrace bezprostředně nižší než LOEC, která při srovnání s kontrolou nemá pro danou expoziční dobu statisticky významný účinek (při $p < 0,05$).

SMILES: Simplified Molecular Input Line Entry Specification (Zjednodušená molekulární specifikace pro vstupní řádky).

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

UVCB: látky s neznámým nebo proměnlivým složením, komplexní reakční produkty nebo biologický materiál.

VTG: vitelogenin je fosfolipoglykoprotein, prekurzor proteinů vaječného žloutku, který se obvykle vyskytuje u sexuálně aktivních samiček všech vejcorodých druhů.

▼**M8**

Dodatek 2

NĚKTERÉ CHEMICKÉ CHARAKTERISTIKY DOPORUČENÉ ŘEDICÍ VODY

Látka	Koncentrační limit
Pevné částice	5 mg/l
Celkový obsah organického uhlíku	2 mg/l
Neionizovaný amoniak	1 µg/l
Zbytkový chlor	10 µg/l
Celkové organofosforové pesticidy	50 ng/l
Celkový obsah organochlorových pesticidů a polychlorovaných bifenylů	50 ng/l
Celkový obsah organického chloru	25 ng/l
Hliník	1 µg/l
Arsen	1 µg/l
Chrom	1 µg/l
Kobalt	1 µg/l
Měď	1 µg/l
Železo	1 µg/l
Olovo	1 µg/l
Nikl	1 µg/l
Zinek	1 µg/l
Kadmium	100 ng/l
Rtuť	100 ng/l
Stříbro	100 ng/l

▼**M8**

Dodatek 3

ZKUŠEBNÍ PODMÍNKY PRO ZKOUŠKU LAGDA

1. Zkušební druh	*Xenopus laevis*
2. Typ zkoušky	Kontinuální průtok
3. Teplota vody	Nominální teplota je 21 °C. Střední teplota po dobu trvání zkoušky je 21 ± 1 °C (rozdíly mezi replikáty a mezi expozicemi by neměly přesahovat 1,0 °C).
4. Kvalita osvětlení	Fluorescenční zářivky (širokospektrální) 600–2 000 lux (lumen/m^2) na povrchu vody
5. Fotoperioda	12 h světlo: 12 h tma
6. Objem zkušebního roztoku a zkušební nádoby (nádrže)	4–10 l (minimální hloubka vody 10–15 cm) Akvária skleněná nebo z nerezové oceli
7. Výměny objemu zkušebních roztoků	Konstantní, s ohledem na zachování biologických podmínek a expozici chemické látce (např. objem nádrže se vymění 5x denně)
8. Stáří zkušebních organismů při zahájení	Stádium 8–10 podle Nieuwkoopa a Fabera (NF)
9. Počet organismů na replikát	20 zvířat (embryí)/nádrž (replikát) při zahájení expozice a 10 zvířat (juvenilních jedinců)/nádrž (replikát) po stádium NF 66 až do ukončení expozice
10. Počet expozic	Minimálně 4 expozice zkoušené chemické látce plus příslušná kontrola (kontroly)
11. Počet replikátů pro každou expozici	4 replikáty na expozici pro zkoušenou chemickou látku a 8 replikátů pro kontrolu (kontroly)
12. Počet organismů na zkoušenou koncentraci	Minimálně 80 zvířat na expozici pro zkoušenou chemickou látku a 160 zvířat pro kontrolu (kontroly)
13. Ředicí voda	Jakákoli voda, která umožňuje normální růst a vývoj *X. laevis* (např. pramenitá voda nebo voda z vodovodní sítě přefiltrovaná přes aktivní uhlí)
14. Provzdušňování	Není vyžadováno, ale provzdušňování nádrží může být nutné, jestliže hladina rozpuštěného kyslíku poklesne pod doporučené limity a jestliže je maximalizován nárůst průtoku zkušebního roztoku.
15. Rozpuštěný kyslík ve zkušebním roztoku	Rozpuštěný kyslík: ≥ 40 % hodnoty nasycení vzdušným kyslíkem nebo ≥ 3,5 mg/l

▼**M8**

16.	pH zkušebního roztoku	6,5–8,5 (rozdíly mezi replikáty a expozicemi by neměly být větší než 0,5)
17.	Tvrdost a zásaditost zkušebního roztoku	10–250 mg $CaCO_3$/l
18.	Krmný režim	(viz dodatek 4)
19.	Doba expozice	Od stádia NF 8–10 do deseti týdnů po střední době do stádia NF 62 ve vodě a/nebo kontrolní skupině s rozpouštědlem (maximálně 17 týdnů)
20.	Biologické ukazatele	Mortalita (a abnormální jevy), doba do stádia NF 62 (vzorek larev), histologické vyšetření štítné žlázy (vzorek larev), růst (hmotnost a délka), jaterní somatický index (juvenilní vzorek), podíly genotypového/fenotypového pohlaví (juvenilní vzorek), histopatologie gonád, reprodukčního traktu, ledvin a jater (juvenilní vzorek) a plazmatický vitelogenin (juvenilní vzorek, doplňkově)
21.	Kritéria platnosti zkoušky	Rozpuštěný kyslík by měl být > 40 % hodnoty nasycení vzduchem; střední teplota vody by měla být v rozsahu 21 ± 1 °C a rozdíly mezi replikáty a mezi expozicemi by měly být < 1,0 °C; pH zkušebního roztoku by mělo být v rozsahu 6,5 až 8,5; mortalita v kontrole by měla být ≤ 20 % a střední doba do stádia NF 62 v kontrole by měla být ≤ 45 dnů; střední hmotnost zkušebních organismů ve stádiu NF 62 a při ukončení analýzy v kontrolách a v kontrolách s rozpouštědlem (jsou-li použity) by měla dosahovat 1,0 ± 0,2, respektive 11,5 ± 3 g; měly by být k dispozici důkazy pro prokázání toho, že koncentrace zkoušené chemické látky v roztoku byly uspokojivě udržovány v rozmezí ±20 % od středních naměřených hodnot.

▼M8

Dodatek 4

KRMNÝ REŽIM

Je třeba uvést, že ačkoli je tento krmný režim doporučován, jsou přípustné i alternativy, pokud budou zkušební organismy růst a vyvíjet se správnou rychlostí.

Krmení Larev

Příprava krmiva pro larvy

A. 1: 1 (obj.) krmivo pro mladé lososovité ryby: řasy/TetraFin® (nebo ekvivalent)

1. Krmivo pro mladé lososovité ryby: míchejte 50 g krmiva pro mladé lososovité ryby (drobné granule nebo prášek) a 300 ml vhodné filtrované vody v mixéru nastaveném na vysokou rychlost po dobu 20 sekund

2. Směs řasy/TetraFin® (nebo ekvivalent): míchejte 12 g řas spirulina v tabletách a 500 ml filtrované vody v mixéru nastaveném na vysokou rychlost po dobu 40 sekund, smíchejte 12 g přípravku Tetrafin® (nebo ekvivalentu) s 500 ml filtrované vody a poté tyto dvě směsi slijte, čímž vznikne 1 litr krmiva s obsahem 12 g/l řas spirulina a 12 g/l přípravku Tetrafin® (nebo ekvivalentu)

3. Smíchejte stejné objemy krmiva pro mladé lososovité ryby a směsi řasy/TetraFin® (nebo ekvivalent)

B. Žábronožka:

15 ml vajíček žábronožky se nechá vylíhnout v 1 l slané vody (připravené přidáním 20 ml NaCl do 1 l deionizované vody). Po provzdušňování po dobu 24 hodin při pokojové teplotě za konstantního osvětlení se žábronožka odloví. Žábronožka se nechá na dobu 30 minut usadit zastavením provzdušňování. Skořápky, které vyplavou v nádobě nahoru, se slijí a zlikvidují a žábronožka se přecedí přes vhodný filtr a přemístí do 30 ml filtrované vody.

Krmný protokol

V tabulce 1 je uveden popis druhu a množství krmiva používaného v průběhu larválních stádií expozice. Zvířata se krmí třikrát denně od pondělí do pátku a jednou denně o víkendu.

Tabulka 1

Krmný režim pro larvy *X. laevis* v průtokových podmínkách

Doba (*) (po fertilizaci	Krmivo pro mladé lososovité ryby: řasy/TetraFin® (nebo ekvivalent)		Žábronožka	
	Pracovní dny (třikrát denně)	Víkend (jednou denně)	Pracovní dny (dvakrát denně)	Víkend (jednou denně)
Dny 4–14 (v týdnech 0–1)	0,33 ml	1,2 ml	0,5 ml (ode dne 8 do 15) 1 ml (ode dne 16)	0,5 ml (ode dne 8 do 15) 1 ml (ode dne 16)
Týden 2	0,67 ml	2,4 ml		
Týden 3	1,3 ml	4,0 ml	1 ml	1 ml
Týden 4	1,5 ml	4,0 ml	1 ml	1 ml
Týden 5	1,6 ml	4,4 ml	1 ml	1 ml

▼M8

Doba (*) (po fertilizaci	Krmivo pro mladé lososovité ryby: řasy/ TetraFin® (nebo ekvivalent)		Žábronožka	
	Pracovní dny (třikrát denně)	Víkend (jednou denně)	Pracovní dny (dvakrát denně)	Víkend (jednou denně)
Týden 6	1,6 ml	4,6 ml	1 ml	1 ml
Týden 7	1,7 ml	4,6 ml	1 ml	1 ml
Týdny 8–10	1,7 ml	4,6 ml	1 ml	1 ml

(*) Den 0 je definován jako den podání injekce hCG.

Přechod z larválního krmiva na krmivo pro juvenilní jedince

Po dokončení metamorfózy larev se přechází na krmivo pro juvenilní jedince, které je popsáno níže. Při tomto přechodu se postupně snižuje množství krmiva pro larvy a zvyšuje množství krmiva pro juvenilní jedince. Lze to provést poměrným snižováním krmiva pro larvy a poměrným zvyšováním krmiva pro juvenilní jedince podle toho, jak každá skupina pěti pulců projde stádiem NF 62 a přiblíží se k dokončení metamorfózy ve stádiu NF 66.

Krmení juvenilních jedinců

Krmivo pro juvenilní jedince

Po dokončení metamorfózy (stádium 66) se krmný režim změní pouze na prvotřídní krmivo pro žáby, které klesá pod hladinu, o velikosti 3/32 palce (Xenopus Express™, FL, USA) nebo ekvivalentní.

Příprava drcených pelet pro larvy při přechodu na krmivo pro juvenilní jedince

Peletky krmiva pro žáby, které klesá pod hladinu, se krátce pomelou v mlýnku na kávu, mixéru nebo se rozdrtí v misce s tloučkem, aby se jejich velikost zmenšila přibližně o 1/3. Při příliš dlouhém zpracování vznikne prášek, což se nedoporučuje.

Krmný protokol

V tabulce 2 je uveden popis druhu a množství krmiva používaného v průběhu juvenilních a dospělých vývojových stádií. Zvířata by měla být krmena jednou denně. Je třeba poznamenat, že s postupem metamorfózy zvířata i nadále dostávají část krmiva ve formě žábronožky, dokud > 95 % zvířat nedokončí metamorfózu.

V den ukončení zkoušky by zvířata neměla být krmena, aby krmivo nezkreslilo stanovení hmotnosti.

Tabulka 2

Krmný režim pro juvenilní jedince *X. laevis* v průtokových podmínkách. Je třeba poznamenat, že zvířata, u nichž ještě neproběhla metamorfóza, včetně zvířat, u nichž je metamorfóza opožděna v důsledku expozice chemické látce, nemohou konzumovat nerozdrcené peletky.

Doba (*) (týdny po mediánu data metamorfózy)	Drcené peletky (mg na 1 žabku)	Celé peletky (mg na 1 žabku)
Když zvířata dokončí metamorfózu	25	0
Týdny 0–1	25	28

▼**M8**

Doba (*) (týdny po mediánu data metamorfózy)	Drcené peletky (mg na 1 žabku)	Celé peletky (mg na 1 žabku)
Týdny 2–3	0	110
Týdny 4–5	0	165
Týdny 6–9	0	220

(*) První den týdne 0 je mediánem data metamorfózy u kontrolních zvířat.

▼**M8**

Dodatek 5

URČOVÁNÍ GENETICKÉHO POHLAVÍ (GENETICKÉ SEXOVÁNÍ)

Metoda určování genetického pohlaví pro*Xenopus laevis* vychází z publikace Yoshimoto *et al.*, 2008. Podrobné postupy určování genotypu lze v případě potřeby zjistit v této publikaci. Pokud je to považováno za vhodné, mohou být použity alternativní metody (např. qPCR vhodná pro vysoké propustnosti).

Primery X. laevis

Marker DM-W

Přímý:: 5'-CCACACCCAGCTCATGTAAAG-3'

Reverzní:: 5'-GGGCAGAGTCACATATACTG-3'

Pozitivní kontrola

Přímý:: 5'-AACAGGAGCCCAATTCTGAG-3'

Reverzní:: 5'-AACTGCTTGACCTCTAATGC-3'

Purifikace DNA

DNA purifikujte ze svalové nebo kožní tkáně např. pomocí sady Qiagen DNeasy pro krev a tkáně (kat. č. 69 506) nebo podobného výrobku podle přiložených pokynů. DNA lze vyluhovat z páteře s použitím menšího množství pufru, aby byly získány koncentrovanější vzorky, je-li to považováno za nezbytné pro analýzu PCR. Upozorňujeme, že DNA je celkem stabilní, je proto třeba dbát na to, aby nedošlo ke křížové kontaminaci, což by mohlo vést k chybnému určení samečků jako samiček nebo naopak.

Polymerázová řetězová reakce

Vzor protokolu s použitím sady JumpStart™ *Taq* od společnosti Sigma je uveden v **tabulce 1**.

Tabulka 1

Vzor protokolu s použitím sady JumpStart™ *Taq* od společnosti Sigma

Roztok master mix	1x (µl)	[Konečné množství]
NFW (*)	11	–
10X pufr	2,0	–
$MgCl_2$ (25 mM)	2,0	2,5 mM
dNTP (po 10 mM)	0,4	200 µM
Marker pro primer (8 µM)	0,8	0,3 µM
Marker rev primer (8 µM)	0,8	0,3 µM
Kontrola pro primer (8 µM)	0,8	0,3 µM
Kontrola rev primer (8 µM)	0,8	0,3 µM
JumpStart™ Taq	0,4	0,05 jednotky/µl
Templát DNA	1,0	~ 200 pg/µl

(*) Voda bez nukleázy Poznámka:
Poznámka: Připravte si větší množství roztoků master mix pro případné ztráty, k nimž může dojít při pipetování (příklad: 25x by se měly použít pouze pro 24 reakcí).

▼**M8**

Reakce:

Roztok master mix	19,0 µl
Templát	1,0 µl
Celkem	20,0 µl

Profil termocykleru:

Krok 1.	94 °C	1 min
Krok 2.	94 °C	30 s
Krok 3.	60 °C	30 s
Krok 4.	72 °C	1 min
Krok 5.	Pokračovat podle kroku 2.	35 cyklů
Krok 6.	72 °C	1 min
Krok 7.	4 °C	udržovat

Výrobky PCR lze použít okamžitě v gelu nebo uchovávat při 4 °C.

Gelová elektroforéza v agaróze (vzor protokolu)

50X TAE

Tris	24,2 g
Bezvodá (ledová) kyselina octová	5,71 ml
Na_2 (EDTA)·$2H_2O$	3,72 g

Přidejte vodu do objemu 100 ml

1X TAE

H_2O	392 ml
50X TAE	8 ml

Agaróza 3:1

3 díly agarózy NuSieve™ GTG™

1 díl agarózy Fisher s nízkou elektroendosmózou (EEO)

Metoda

1. Připravte 3 % gel přidáním 1,2 g směsi agarózy do 43 ml 1X TAE. Protřepte, aby se rozptýlily velké shluky.

2. Směs agarózy ohřívejte v mikrovlnce, dokud se zcela nerozpustí (nesmí se převařit). Nechte trochu vychladit.

3. Přidejte 1,0 µl ethidiumbromidu (10 mg/ml). Láhev protřepte. Nezapomeňte, že ethidiumbromid je mutagenní, proto by měly být pro tento krok použity alternativní chemické látky, pokud je to technicky možné, aby se minimalizovala zdravotní rizika pro pracovníky ([1]).

4. Nalijte gel do formy s hřebenem. Nechte ho zcela vychladnout.

([1]) V souladu s čl. 4 odst. 1 směrnice Evropského parlamentu a Rady 2004/37/ES ze dne 29. dubna 2004 o ochraně zaměstnanců před riziky spojenými s expozicí karcinogenům nebo mutagenům při práci (šestá samostatná směrnice ve smyslu čl. 16 odst. 1 směrnice 89/391/EHS) (Úř. věst. L 158, 30.4.2004, s. 50).

▼**M8**

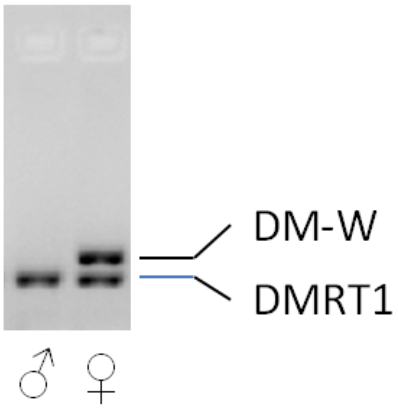
5. Přidejte gel do přístroje. Gel pokryjte 1X TAE.

6. Přidejte 1 µl 6x zaváděcího barviva do každého produktu PCR o objemu 10 µl.

7. Vzorky napipetujte do jamek.

8. Zpracujte při konstantním napětí 160 V po dobu ~ 20 minut.

Na **obrázku 1** je zobrazení agarózového gelu znázorňující vzory pruhů, které ukazují samčí a samičí jedince.



Obrázek 1: Zobrazení agarózového gelu znázorňující vzor pruhů, které ukazují samčí (♂) jedince (jeden pruh ~ 203 bp: DMRT1) a samičí (♀) jedince (dva pruhy při ~ 259 bp: DM-W a 203 bp:DMRT1).

LITERATURA

Yoshimoto S, Okada E, Umemoto H, Tamura K, Uno Y, Nishida-Umehara C, Matsuda Y, Takamatsu N, Shiba T, Ito M. 2008. A W-linked DM-domain gene, DM-W, participates in primary ovary development in *Xenopus laevis*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 105: 2 469-2 474.

▼M8

Dodatek 6

MĚŘENÍ VITELOGENINU

Měření vitelogeninu (VTG) se provádí pomocí metody enzymové imunoanalýzy s enzymem vázaným na imunosorbent (ELISA), která byla původně vyvinuta pro VTG jelečka velkohlavého (Parks *et al.*, 1999). V současnosti neexistují žádné komerčně dostupné protilátky pro *X. laevis*. Vzhledem k velkému množství informací o této bílkovině a dostupnosti nákladově efektivních služeb komerční produkce protilátek lze předpokládat, že laboratoře si mohou snadno vyvinout test ELISA pro toto měření (Olmstead *et al.*, 2009). V publikaci Olmstead *et al.* (2009) je také uveden popis analýzy upravený pro VTG u *X. tropicalis*, jak je ukázáno níže. Metoda používá protilátku připravenou proti VTG *X. tropicalis*, ale je známo, že funguje také na VTG *X. laevis*. Je třeba poznamenat, že mohou být použity i nekompetitivní testy ELISA a že tyto testy mohou mít nižší detekční limity než metoda popsaná níže.

Materiál a reakční činidla

— Předadsorbované sérum s 1. protilátkou (Ab)

— Smíchejte jeden díl séra 1. Ab anti-*X. tropicalis* VTG s 2 díly kontrolní samčí plazmy a nechte při pokojové teplotě po dobu ~ 75 minut, položte na led na dobu 30 minut, odstřeďujte > 20K x G po dobu 1 hodiny při 4 °C, odstraňte supernatant, alikvotní množství, uchovávejte při –20 °C.

— 2. protilátka

— Konjugát kozí proti-králičí IgG-HRP (např. Bio-Rad 172-1019)

— VTG Standard

— purifikovaný VTG *X. laevis* v koncentraci 3,3 mg/ml.

— TMB (3,3',5,5' tetramethyl-benzidin) (např. KPL 50-76-00; nebo Sigma T0440)

— Normální kozí sérum (NGS)(např. Chemicon® S26-100ml)

— 96jamkové polystyrenové mikrotitrační destičky EIA (např. ICN: 76-381-04, Costar: 53590, Fisher:07-200-35)

— Hybridizační komora 37 °C (nebo vzduchový inkubátor s rychlým dosažením rovnovážného stavu) na destičky, vodní lázeň na zkumavky

— Další běžné laboratorní vybavení, chemikálie a spotřební materiál.

Předpisy

Nanášecí pufr (50 mM karbonátového pufru, pH 9,6):

$NaHCO_3$	1,26 g
Na_2CO_3	0,68 g
voda	428 ml

10X PBS (0,1 M fosfát, 1,5 M NaCl):

$NaH_2PO_4.H_2O$	0,83 g
$Na_2HPO_4.7\ H_2O$	20,1 g
NaCl	71 g
voda	810 ml

▼**M8**

Promývací pufr (PBST):

10X PBS	100 ml
voda	900 ml

Upravte pH na 7,3 přidáním 1 M HCl, poté přidejte 0,5 ml Tween-20.

Zkušební pufr:

Normální kozí sérum (NGS)	3,75 ml
Promývací pufr	146,25 ml

Odběr vzorků

Krev se odebírá heparinizovanou mikrohematokritovou kapilárou a umístí na led. Po odstřeďování po dobu 3 minut se kapilára nařízne, rozlomí a plazma se vystříkne do mikrozkumavek o objemu 0,6 ml, které obsahují 0,13 jednotek lyofilizovaného aprotininu. (Tyto zkumavky se připraví předem přidáním příslušného množství aprotininu, zmrazením a lyofilizováním v odparce při nízké teplotě až do vysušení.) Plasma uchovávejte při teplotě –80 °C až do analýzy.

Postup pro jednu destičku

Nanášení na destičku

Smíchejte 20 µl purifikovaného VTG s 22 ml karbonátového pufru (konečná koncentrace 3 µg/ml). Přidejte 200 µl do každé jamky 96- jamkové destičky. Destičku zakryjte lepicí fólií a nechte inkubovat při teplotě 37 °C po dobu 2 hodin (nebo při teplotě 4 °C přes noc).

Zastavení reakce na destičce

Tlumivý roztok se připraví přidáním 2 ml normálního kozího séra (NGS) do 38 ml karbonátového pufru. Odstraňte nanášecí roztok a otřepte dosucha. Do každé jamky přidejte 350 µl tlumivého roztoku. Zakryjte lepicí fólií a nechte inkubovat při teplotě 37 °C po dobu 2 hodin (nebo při teplotě 4°C přes noc).

Příprava standardů

5,8 µl purifikovaného VTG se smíchá s 1,5 ml zkušebního pufru v jednorázové zkumavce z borokřemičitého skla 12 x 75 mm. Vznikne tak 12 760 ng/ml. Poté se provede postupné ředění přidáním 750 µl předchozího naředěného roztoku do 750 µl zkušebního pufru, čímž vzniknou konečné koncentrace 12 760, 6 380, 3 190, 1 595, 798, 399, 199, 100 a 50 ng/ml.

Příprava vzorků

Začněte roztokem plazmy ve zkušebním pufru 1: 300 (např. smíchejte 1 µl plazmy s 299 µl zkušebního pufru) nebo 1: 30. Jestliže očekáváte velké množství VTG, mohou být potřebná další ředění nebo větší ředění. Snažte se udržovat B/B_o v rozmezí standardů. U vzorků bez hodnotitelného VTG, např. kontrolní samečci a samičky (všechny nezralé), použijte ředění 1: 30. Vzorky naředěné méně, než je uvedeno, mohou vykazovat nechtěné matricové jevy.

Dále se doporučuje provést na každé destičce pozitivní kontrolní vzorek. Tento vzorek pochází ze zásoby plazmy obsahující vysoce indukované hladiny VTG. Zásoba se nejprve naředí v NGS, rozdělí se na poměrné díly a uchovává se při –80 °C. Pro každou destičku se rozmrazí poměrný díl, dále se naředí ve zkušebním pufru a použije se podobně jako zkušební vzorek.

▼M8

Inkubace s 1. protilátkou

1. protilátka se připraví zhotovením zředěného roztoku 1: 2000 předadsorbovaného séra s 1. protilátkou ve zkušebním pufru (např. 8 µl v 16 ml zkušebního pufru). Smíchejte 300 µl roztoku 1. protilátky s 300 µl vzorku/standardu ve skleněné zkumavce. Zkumavka B_o se připraví podobně s 300 µl zkušebního pufru a 300 µl protilátky. Rovněž se připraví zkumavka NSB pouze s 600 µl zkušebního pufru, tj. bez protilátky. Zkumavky zakryjte fólií Parafilm a lehce promíchejte. Inkubujte ve vodní lázni o teplotě 37 °C po dobu 1 hodiny.

Promytí destičky

Bezprostředně před dokončením inkubace 1. protilátky destičku promyjte. Provádí se to vytřepáním obsahu a oklepáním dosucha na savém papíru. Poté jamky naplňte 350 µl promývacího roztoku, vylijte jej a oklepte dosucha. Zde je užitečná více-kanálová pipeta nebo promývačka destiček. Promývání se zopakuje ještě dvakrát, aby se destička promyla celkem třikrát.

Nanášení vzorku na destičku

Po promytí destičky vyjměte zkumavky z vodní lázně a lehce je promíchejte. Přidejte 200 µl z každého vzorku, standardu, B_o a zkumavky NSB, aby byly jamky na destičce duplikovány. Destičku zakryjte lepicí fólií a nechte inkubovat při teplotě 37 °C po dobu 1 hodiny.

Inkubace s 2. protilátkou

Na konci inkubace z předchozího kroku se destička opět třikrát promyje, jak je uvedeno výše. Naředěná 2. protilátka se připraví smícháním 2,5 µl 2. protilátky s 50 ml zkušebního pufru. Do každé jamky se přidá 200 µl naředěné 2. protilátky, destička se zakryje, jak je uvedeno výše a inkubuje se po dobu 1 hodiny při teplotě 37 °C.

Přidání substrátu

Po dokončení inkubace s 2. protilátkou destičku třikrát promyjte, jak je popsáno výše. Poté do každé jamky přidejte 100 µl substrátu TMB. Nechte reakci probíhat 10 minut, nejlépe mimo jasné světlo. Reakci zastavte přidáním 100 µl kyseliny fosforečné 1 M. Změní to barvu z modré na intenzivně žlutou. Pomocí čtečky změřte absorbanci při 450 nm.

Výpočet B/B_o

Odečtěte průměrnou hodnotu NSB od všech měření. B/B_o pro každý vzorek a standard se vypočítá vydělením hodnoty absorbance (B) průměrnou absorbancí vzorku B_o.

Zjištění standardní křivky a stanovení neznámých množství

Pomocí některého grafického softwaru (např. Slidewrite™ nebo Sigma Plot®) vygenerujte standardní křivku, která bude extrapolovat množství ze vzorku B/B_o podle standardů B/B_o. Obvykle je množství vyneseno na logaritmické stupnici a křivka má sigmoidní tvar. Při použití úzkého rozmezí standardů však může vypadat lineárně. Korigujte množství vzorku podle faktoru ředění a uveďte je v mg VTG/ml plazmy.

Určení minimálních mezí stanovitelnosti (MDL)

Zejména u normálních samečků je často nejasné, jak se mají vykazovat výsledky z nízkých hodnot. V takových případech je třeba použít 95 % „konfidenční interval“ pro stanovení, zda má být hodnota vykázána jako nula, nebo jako nějaké jiné číslo. Jestliže je výsledek vzorku v rámci intervalu spolehlivosti

▼M8

nulového standardu (B_o), výsledek se vykazuje jako nula. Minimální úrovní detekce bude nejnižší standard, který je konzistentně odlišný od nulového standardu; to znamená, že se dva konfidenční intervaly nepřekrývají. Pro každý výsledek vzorku, který je v rámci konfidenčního intervalu minimální úrovně detekce nebo nad ní, se vykáže vypočtená hodnota. Jestliže vzorek spadá mezi intervaly nulového standardu a konfidenční intervaly minimální úrovně detekce, vykáže se polovina minimální úrovně detekce pro hodnotu tohoto vzorku.

LITERATURA

Olmstead AW, Korte JJ, Woodis KK, Bennett BA, Ostazeski S, Degitz SJ. 2009. Reproductive maturation of the tropical clawed frog: *Xenopus tropicalis*. General and Comparative Endocrinology 160: 117-123.

Parks LG, Cheek AO, Denslow ND, Heppell SA, McLachlan JA, LeBlanc GA, Sullivan CV. 1999. Fathead minnow (*Pimephales promelas*) vitellogenin: purification, characterisation and quantitative immunoassay for the detection of estrogenic compounds. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology 123: 113-125.

▼M8

Dodatek 7

STATISTICKÁ ANALÝZA

Při analýze LAGDA jsou generovány tři druhy dat, které je třeba statisticky analyzovat: 1) kvantitativní kontinuální data, 2) data o době do události u vývojových podílů (doba do stádia NF 62) a 3) ordinální data ve formě stupňů závažnosti nebo vývojových stádií z histopatologického vyšetření. Doporučené rozhodovací schéma statistické analýzy pro zkoušku LAGDA je uvedeno na obrázku 1. Níže jsou uvedeny také některé anotace, jež mohou být potřebné k provedení statistické analýzy pro měření ze zkoušky LAGDA. Pro rozhodovací schéma analýzy je třeba analyzovat výsledky měření mortality, růstu (hmotnost a délka) a jaterního somatického indexu (LSI) podle větve „jiné sledované parametry“.

Kontinuální data

Nejprve je třeba transformovat pořadí dat a zkontrolovat tak, zda jsou data u kontinuálních sledovaných parametrů monotónní, nanést je do modelu ANOVA a porovnat lineární a kvadratické kontrasty. Jestliže data jsou monotónní, je třeba provést Jonckheerův-Terpstrův trend test na mediánech replikátů, přičemž se neprovádějí žádné další analýzy. Alternativou pro data, která jsou normálně distribuována s homogenními rozptyly, je sestupný Williamsův test. Jestliže data nejsou monotónní (kvadratický kontrast je významný a lineární není významný), je třeba je analyzovat pomocí modelu ANOVA se smíšenými účinky. Údaje by poté měly být posouzeny z hlediska normality rozdělení (pokud možno Shapiro-Wilkovým nebo Anderson-Darlingovým testem) a homogenity rozptylu (pokud možno Levenovým testem). Oba testy se provádějí na základě reziduálních hodnot získaných z modelu ANOVA se smíšenými účinky. Místo těchto formálních testů na normalitu rozdělení a homogenitu rozptylu lze použít odborný posudek, ovšem formální testy se upřednostňují. Jestliže jsou data normálně distribuována s homogenním rozptylem, jsou splněny předpoklady modelu ANOVA se smíšenými účinky a významný účinek expozice se stanoví Dunnettovým testem. Pokud je zjištěno nenormální rozdělení nebo heterogenní rozptyl, pak jsou porušeny předpoklady Dunnettova testu a je třeba hledat normalizační transformaci ke stabilizaci rozptylu. Jestliže žádná taková transformace není nalezena, stanoví se významný účinek expozice Dunnovým testem. Pokud je to možné, provádí se jednostranný test místo oboustranného, ale stanovení, který test je pro daný sledovaný parametr vhodný, vyžaduje odborné posouzení.

Mortalita

U dat o mortalitě se analyzuje časové období zahrnující celou zkoušku a mortalita se vyjadřuje jako podíl uhynulých jedinců v každé konkrétní nádrži. Pulci, kteří nedokončí metamorfózu v daném časovém rámci, pulci, kteří jsou v kohortě larválního dílčího vzorku, juvenilní žáby, které jsou redukovány, a všechna zvířata uhynulá v důsledku chyby experimentátora se považují za cenzurovaná data a nezařazují se do jmenovatele při výpočtu procenta. Před jakoukoli statistickou analýzou je třeba podíly mortality transformovat druhou odmocninou funkce arcsin. Alternativně lze použít sestupný Cochranův-Armitageův test, případně s Raovou-Scottovou korekcí při nadměrném rozptylu.

Hmotnost a délka (údaje o růstu)

Samečci a samičky nejsou v průběhu metamorfózy pohlavně dimorfní, proto se údaje o růstu z dílčího vzorku z larválního stádia analyzují nezávisle na pohlaví. Údaje o růstu z juvenilního stádia se však analyzují zvlášť pro každé genotypové pohlaví. Pro tyto sledované parametry může být nutné provést logaritmickou transformaci, protože logaritmická normalita dat o velikosti není neobvyklá.

▼**M8**

Jaterní somatický index (LSI)

Hmotnosti jater je třeba normalizovat jako podíly z hmotností celého těla (tj. LSI) a analyzovat zvlášť podle genetického pohlaví.

Doba do stádia NF 62

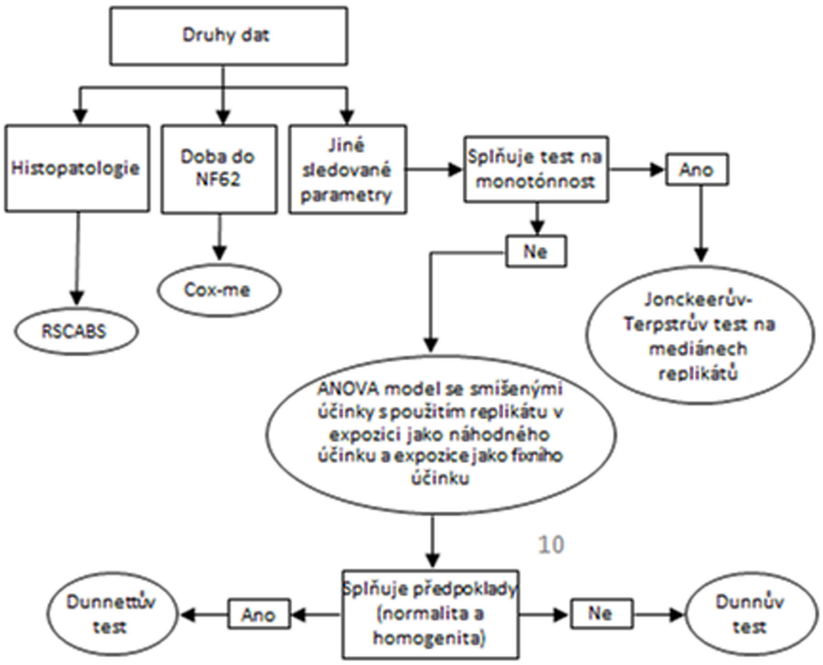
Údaje o době do metamorfózy se považují za data o času do události, přičemž mortality nebo jednotlivci, kteří nedosáhli stádia NF 62 do 70 dnů, se považují za vpravo cenzurovaná data (tj. skutečná hodnota je větší než 70 dnů, ale studie končí dříve, než zvířata dosáhla stadia NF 62 do 70 dnů). K určení data ukončení zkoušky by se měla použít střední doba do stádia NF 62 dokončení metamorfózy v kontrolách s ředicí vodou. Střední doba do dokončení metamorfózy by mohla být určena podle Kaplanových-Meierových odhadů funkce přežití. Tento cílový parametr by se měl analyzovat pomocí Coxova modelu proporcionálních rizik u smíšených účinků, který zohledňuje replikátovou strukturu studie.

Histopatologické údaje (stupně závažnosti a vývojová stádia)

Histopatologické údaje jsou ve formě stupňů závažnosti nebo vývojových stádií. Test s názvem RSCABS (Rao-Scottův, Cochranův-Armitagův testu využívající dílčí testy) používá sestupný Cochranův-Armitagův trend test s korekcí podle Rao-Scotta na každé úrovni závažnosti histopatologické odpovědi (Green *et al.*, 2014). Korekce podle Rao-Scotta začleňuje do testu uspořádání experimentu formou replikátových nádob. Postup „využívající dílčí testy“ zahrnuje biologické očekávání, že stupně závažnosti budou mít tendenci se zvyšovat s rostoucími koncentracemi expozice, přičemž budou uchovávat stupně jednotlivých subjektů a odhalovat závažnost jakéhokoli zjištěného účinku. Postup RSCABS určuje nejen, jaké expozice jsou statisticky odlišné od kontrol (tj. mají závažnější patologii než kontroly), ale určuje také, na jakém stupni závažnosti k rozdílu dochází, čímž poskytuje velmi potřebný rámec analýzy. V případě určování vývojového stádia gonád a reprodukčního traktu je třeba na data aplikovat další manipulaci, protože předpoklad testu RSCABS je, že závažnost účinku se zvyšuje s dávkou. Pozorovaný účinek může být opoždění nebo urychlení vývoje. Proto je třeba data o vývojovém stádiu analyzovat tak, jak jsou uvedena, aby bylo možné detekovat urychlení vývoje, a poté je před druhou analýzou manuálně invertovat, aby bylo možné detekovat opoždění vývoje.

Obrázek 1

Rozhodovací schéma statistické analýzy pro data LAGDA.



▼M8

LITERATURA

Green JW, Springer TA, Saulnier AN, Swintek J. 2014. Statistical analysis of histopathology endpoints. Environmental Toxicology and Chemistry 33, 1 108-1 116.

▼M8

Dodatek 8

POZNÁMKY KE SLEDOVÁNÍ A MINIMALIZACI VZNIKU SKOLIÓZY

Idiopatická skolióza, projevující se u pulců *Xenopus laevis* obvykle jako zahnutý ocas, může komplikovat morfologické pozorování a pozorování chování ve zkušebních populacích. Je třeba usilovat o minimalizaci nebo eliminaci výskytu skoliózy, a to jak v zásobní populaci, tak i ve zkušebních podmínkách. Při definitivním testu se doporučuje, aby byla prevalence střední a těžké skoliózy menší než 10 %, aby se zlepšila spolehlivost, že test dokáže detekovat vývojové účinky závislé na expozici u jinak zdravých larev obojživelníků.

Při denních pozorováních v průběhu definitivního testu je třeba zaznamenávat výskyt (jednotlivý počet) i závažnost skoliózy, je-li zjištěna. Je třeba popsat povahu abnormality s ohledem na umístění (např. před kloakou nebo za kloakou) a směr zakřivení (např. laterální nebo dorzálně ventrální). Závažnost může být odstupňována takto:

(NR) Nenápadné: žádné zakřivení

1) Minimální: mírné laterální zakřivení za kloakou; zjevné pouze v klidu

2) Střední: laterální zakřivení za kloakou; viditelné vždy, ale neinhibuje pohyb

3) Těžké: laterální zakřivení před kloakou; NEBO jakékoli zakřivení, které inhibuje pohyb; NEBO jakékoli dorzálně ventrální zakřivení

Americký vědecký poradní panel EPA FIFRA (FIFRA SAP 2013) provedl revizi souhrnných dat o skolióze v patnácti analýzách metamorfózy obojživelníků s *X. laevis* (stádium NF 51 až 60+) a stanovil obecná doporučení pro redukci prevalence této abnormality ve zkušebních populacích. Doporučení jsou relevantní pro analýzu LAGDA, i když tato zkouška zahrnuje delší vývojovou časovou řadu.

Historická výkonnost tření

Obecně by se jako chovné páry měli používat kvalitní, zdraví dospělí jedinci; eliminace chovných párů, které produkují potomstvo se skoliózou, může minimalizovat její výskyt v čase. Přínosná může být zejména minimalizace používání chovné populace odlovené v přírodě. Expoziční doba ve zkoušce LAGDA začíná stádiem NF 8 až 10 embryí a není prakticky možné stanovit při zahájení zkoušky, zda budou daní jednotlivci jevit známky skoliózy. Kromě sledování incidence skoliózy u zvířat, která jsou zařazena do zkoušky, je proto třeba zadokumentovat také historickou výkonnost snůšky (včetně prevalence skoliózy u všech larev ponechaný ve vývoji). Může být užitečné dále monitorovat část každé snůšky nepoužitou v dané studii a uvést tato pozorování (FIFRA SAP 2013).

Kvalita vody

Důležité je zajistit adekvátní kvalitu vody, a to jak v laboratorním zásobním chovu, tak i v průběhu zkoušky. Kromě kritérií kvality vody rutinně hodnocených při zkouškách vodní toxicity může být užitečné monitorovat a korigovat případné deficity živin (např. deficit vitamínu C, vápníku, fosforu) nebo nadměrné hladiny selenu a mědi, o nichž se uvádí, že u laboratorně chovaných druhů *Rana* sp. a *Xenopus* sp. působí skoliózu různého stupně (Marshall *et al.* 1980; Leibovitz *et al.* 1992; Martinez *et al.* 1992; jak se uvádí v publikaci FIFRA SAP 2013). Použití vhodného krmného režimu (viz dodatek 4) a pravidelné čištění nádrže obvykle zlepší kvalitu vody a zdraví pokusných druhů.

▼M8

Potrava

Konkrétní doporučení pro krmný režim, o němž bylo zjištěno, že je ve zkoušce LAGDA úspěšný, jsou podrobně uvedena v dodatku 4. Doporučuje se prověřovat zdroje krmiva, zda neobsahují toxiny, herbicidy a jiné pesticidy, o nichž je známo, že u druhů *X. laevis* nebo jiných vodních živočichů působí skoliózu (Schlenk and Jenkins 2013). Například expozice některým inhibitorům cholinesterázy souvisí se skoliózou u ryb (Schultz *et al.* 1985) a žab (Bacchetta *et al.* 2008).

LITERATURA

Bacchetta, R., P. Mantecca, M. Andrioletti, C. Vismara, and G. Vailati. 2008. Axial-skeletal defects caused by carbaryl in *Xenopus laevis* embryos. Science of the Total Environment 392: 110 – 118.

Schultz, T.W., J.N. Dumont, and R.G. Epler. 1985. The embryotoxic and osteolathyrogenic effects of semicarbazide. Toxicology 36: 185-198.

Leibovitz, H.E., D.D. Culley, and J.P. Geaghan. 1982. Effects of vitamin C and sodium benzoate on survival, growth and skeletal deformities of intensively culture bullfrog larvae (*Rana catesbeiana*) reared at two pH levels. Journal of the World Aquaculture Society 13: 322-328.

Marshall, G.A., R.L. Amborski, and D.D. Culley. 1980. Calcium and pH requirements in the culture of bullfrog (*Rana catesbeiana*) larvae. Journal of the World Aquaculture Society 11: 445-453.

Martinez, I., R. Alvarez, I. Herraez, and P. Herraez. 1992. Skeletal malformations in hatchery reared *Rana perezi* tadpoles. Anatomical Records 233(2): 314-320.

Schlenk, D., and Jenkins, F. 2013. Endocrine Disruptor Screening Prog (EDSP) Tier 1 Screening Assays and Battery Performance. US EPA FIFRA SAP Minutes No. 2013-03. May 21-23, 2013. Washington, DC.