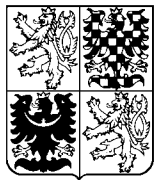


Ročník 2001



SBÍRKA ZÁKONŮ

ČESKÁ REPUBLIKA

Částka 79

Rozeslána dne 22. června 2001

Cena Kč 57,60

O B S A H:

208. Vyhláška Ministerstva zdravotnictví, kterou se mění vyhláška Ministerstva zdravotnictví č. 251/1998 Sb., kterou se stanoví metody pro zjišťování toxicity chemických látek a přípravků

208

VYHLÁŠKA

Ministerstva zdravotnictví

ze dne 8. června 2001,

kterou se mění vyhláška Ministerstva zdravotnictví č. 251/1998 Sb.,
kterou se stanoví metody pro zjišťování toxicity chemických látek a přípravků

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

noví metody pro zjišťování toxicity chemických látek a přípravků, se mění takto:

Čl. I

Příloha k vyhlášce č. 251/1998 Sb., kterou se sta-

1. Před metodu B.1. se vkládá část „B. Všeobecný úvod“, která zní:

„B. VŠEOBECNÝ ÚVOD**1. ZÁKLADNÍ POJMY****1.1 AKUTNÍ TOXICITA**

zahrnuje nepříznivé účinky, které se objeví během určité doby (většinou 14 dní) po podání jedné dávky nějaké látky.

1.2 ZJEVNÁ TOXICITA

je všeobecný termín popisující jasné příznaky toxicity po aplikaci testované látky. Jsou to příznaky dostačující pro posouzení rizika a měly by být takové, že po zvýšení podávané dávky může být očekáván vznik těžkých toxických příznaků a pravděpodobně i úmrtí.

1.3 DÁVKA

je množství podávané testované látky. Dávka je vyjádřena jako hmotnost (gramy nebo miligramy) nebo jako hmotnost testované látky na jednotku hmotnosti pokusného zvířete (např. miligramy na kilogram tělesné hmotnosti), nebo jako konstantní dietní koncentrace (díly na milión dílů nebo miligramy na kilogram potravy).

1.4 DISKRIMINUJÍCÍ DÁVKA

je nejvyšší ze čtyř pevných dávkových hladin, kterou je možno podat aniž by to způsobilo uhynutí (včetně humánního utracení) související s podanou látkou.

1.5 DÁVKOVÁNÍ

je všeobecný termín zahrnující dávku, frekvenci a celkovou dobu podávání.

1.6 LD₅₀ (STŘEDNÍ SMRTNÁ DÁVKA)

je statisticky vypočtená jednotlivá dávka látky, která pravděpodobně způsobí za definovanou dobu smrt 50 % zvířat, kterým byla podána. Hodnota LD₅₀ se udává jako hmotnost testované látky na jednotku hmotnosti pokusného zvířete (mg.kg⁻¹ tělesné hmotnosti).

1.7 LC₅₀ (STŘEDNÍ SMRTNÁ KONCENTRACE)

je statisticky vypočtená koncentrace látky, která pravděpodobně způsobí smrt do určité doby po expozici u 50 % pokusných zvířat, exponovaných po definovanou dobu. Hodnota LC₅₀ se udává jako hmotnost testované látky ve standardním objemu vzduchu (mg.l⁻¹).

1.8 NOAEL

je zkratka pro "no observed adverse effect level" (hladinu bez pozorovaného nepříznivého účinku) a je to nejvyšší v pokusu použitá dávka nebo expoziční koncentrace, při které nedochází k zjištěným toxickým příznakům.

1.9 TOXICITA PO OPAKOVANÉ DÁVCE/SUBCHRONICKÁ TOXICITA

zahrnuje nepříznivé účinky, které se objeví u pokusných zvířat v důsledku opakovaného denního podávání nebo expozice chemické látky, po dobu představující krátký úsek očekávané délky života příslušného živočišného druhu.

1.10 NEJVYŠŠÍ TOLEROVANÁ DÁVKA (MTD - MAXIMUM TOLERATED DOSE)

je nejvyšší dávka, která u zvířat vyvolává zřetelné projevy toxicity, avšak bez podstatného vlivu na přežití s ohledem na účinek, který je testován.

1.11 PODRÁŽDĚNÍ KŮŽE

je vyvolání zánětlivých změn na kůži po aplikaci testované látky.

1.12 PODRÁŽDĚNÍ OČÍ

je vyvolání změn na oku po aplikaci testované látky na povrch oka.

1.13 SENZIBILIZACE KŮŽE (ALERGICKÁ KONTAKTNÍ DERMATITIDA)

je imunologicky vyvolaná reakce kůže na testovanou látku.

1.14 POLEPTÁNÍ KŮŽE

je vyvolání nevratného tkáňového poškození kůže při působení testované látky po dobu od 3 minut do 4 hodin.

1.15 TOXIKOKINETIKA

je studium absorpce, distribuce, metabolismu a exkrece testovaných látek.

1.16 ABSORPCE

označuje proces(y), kterým(i) aplikovaná látka vstupuje do těla.

1.17 EXKRECE

označuje proces(y), kterým(i) aplikovaná látka případně její metabolity jsou odstraňovány z těla.

1.18 DISTRIBUCE

označuje proces(y), kterým(i) je absorbovaná látka případně její metabolity rozdělovány v těle.

1.19 METABOLISMUS

označuje proces(y), kterým(i) je chemická struktura aplikované látky měněna v těle enzymatickými nebo neenzymatickými reakcemi.

2. AKUTNÍ - OPAKOVANÁ APLIKACE/ SUBCHRONICKÁ A CHRONICKÁ TOXICITA

Akutní toxické účinky a orgánová nebo systémová toxicita mohou být vyhodnoceny za použití velkého počtu různých testů toxicity (metody B.1 - B.5), ze kterých může být po jediné aplikaci získán předběžný odhad toxicity.

V závislosti na toxicitě látky lze zvolit různé postupy od limitního testu až po kompletní stanovení LD₅₀. Pro inhalační studie není limitní test navržen, protože nebylo možné definovat limitní hodnotu jednorázové inhalační expozice.

Pozornost by měla být věnována metodám, které využívají co nejmenší počet zvířat a minimalizují utrpení zvířete, například metoda pevné dávky (metoda B.1 bis) a metoda stanovení třídy akutní toxicity (metoda B.1 tris). Při testování na jednom druhu může studie na druhém druhu doplnit závěry vyvozené z první studie. V tomto případě může být použita standardní testovací metoda nebo může být použito menšího počtu zvířat.

Testem toxicity s opakovanou aplikací (metody B.7, B.8 a B.9) se posuzují toxické účinky vznikající v důsledku opakované expozice. Důležité je klinické pozorování zvířat tak, aby se získalo co nejvíce informací. Tyto testy by měly pomoci zjistit cílové orgány toxicity a toxické a netoxické dávky. Od dlouhodobých studií se vyžaduje zkoumání těchto aspektů do větší hloubky (metody B.26 - B.30 a B.33).

3. MUTAGENITA - GENOTOXICITA

Mutagenita se vztahuje k indukci trvalých přenosných změn v množství nebo struktuře genetického materiálu buněk nebo organismů. Tyto změny ("mutace") mohou postihnout jediný gen nebo segmenty genů, blok genů nebo celé chromozómy. Účinky na celé chromozómy se mohou projevovat změnou jejich struktury nebo počtu.

Mutagenní aktivita látky se stanoví testy *in vitro* na genové (bodové) mutace v baktériích (metoda B.13/14) anebo na strukturální chromozómové aberace v savcích buňkách (metoda B.10).

Přijatelné jsou také postupy *in vivo*, např. micronucleus test (metoda B.12) nebo analýza metafáze chromozomů kostní dřeně (metoda B.11). Je však třeba dávat jednoznačně přednost *in vitro* metodám, pokud nejsou kontraindikovány.

Pro látky vyráběné ve velkém množství nebo pro stanovení a kontrolu rizika mohou být vyžadovány ještě další studie ke zjištění mutagenity nebo k předběžnému vyšetření na karcinogenitu. Tyto studie lze využít k několika účelům: potvrzení výsledků získaných základním souborem testů; zkoumání účinků nezachycených základním souborem metod; zahájení nebo rozšíření studií *in vivo*.

Pro tyto účely zahrnují metody B.15 až B.25 jak eukaryontní systémy *in vivo* a *in vitro*, tak rozšiřují rozsah biologických účinků. Tyto testy poskytují informace o bodových mutacích a jiných účincích v organismech složitějších než bakterie používané v základním souboru testů.

Obecně platí, že další uvažované studie mutagenity je třeba naplánovat tak, aby poskytly relevantní doplňující informace o mutagenním, případně karcinogenním potenciálu testované látky.

Konkrétní studie, vhodná pro daný případ, bude záviset na četných faktorech, včetně chemické a fyzikální charakteristiky látky, výsledků základních bakteriálních a cytogenetických testů, metabolického profilu látky, výsledků dalších testů toxicity a známých způsobů použití látky.

Pro posuzování rizika dědičných účinků u savců jsou k dispozici metody na detekci dědičných účinků v celém savčím organismu, ať už vyvolaných genovými (bodovými) mutacemi, např. specifický locus test u myši detekující mutace zárodečné buňky v první generaci (nezahrnuto v této příloze), nebo chromozómovými aberacemi, např. test na přenosné translokace u myši (metoda B.25). Těchto metod lze použít při odhadování možného genetického rizika látky pro člověka. Vzhledem ke složitosti těchto testů a velmi velkému počtu potřebných zvířat, zvláště pro specifický locus test, je třeba se rozhodovat pro takovou studii jen na základě závažných důvodů.

Při stanovení genotoxicity se postupuje podle standardního metodického protokolu vypracovaného pro danou metodiku po projednání s Národní referenční laboratoří genetické toxikologie.

4. KARCINOGENITA

Chemické látky mohou být charakterizovány jako genotoxické nebo negenotoxické karcinogeny, v závislosti na předpokládaném mechanismu působení.

Předběžné informace o genotoxickém karcinogenním potenciálu látky se čerpají ze studií mutagenity/genotoxicity. Další informace poskytují testy toxicity při opakované aplikaci a testy subchronické nebo chronické toxicity. Test toxicity při opakované aplikaci, metoda B.7, a dlouhodobější studie s opakovaným podáváním zahrnují posouzení takových histopatologických změn, např. hyperplazie v určitých tkáních, které by mohly být také významné. Tyto studie a toxikokinetické informace mohou pomoci identifikovat chemické látky s karcinogenním potenciálem, které vyžadují další, podrobnější zkoumání tohoto aspektu pomocí testu karcinogenity (metoda B.32) nebo často v kombinované studii chronické toxicity/karcinogenity (metoda B.33).

K dispozici jsou rovněž testy transformace buněk savců, které určují schopnost látky vyvolat takové morfologické změny a změny chování buněčných kultur, u kterých se předpokládá souvislost s maligní transformací - *in vivo* (metoda B.21). Používá se několika různých buněčných typů a kritérií pro transformaci.

5. REPRODUKČNÍ TOXICITA

Reprodukční toxicita se zjišťuje různými způsoby, např. podle zhoršení reprodukčních funkcí nebo schopností samců a samic (vliv na plodnost) nebo podle nedědičných škodlivých účinků na potomstvo (vývojová toxicita) zahrnující také teratogenitu a účinky v průběhu laktace.

Testovací metoda (metoda B.31) pro studie zaměřené na teratogenitu jako součást vývojové toxicity počítá hlavně s orálním podáváním. Alternativně mohou být použity jiné způsoby aplikace v závislosti na fyzikálních vlastnostech testované látky nebo podle pravděpodobného způsobu expozice člověka. V takových případech je třeba testovací metodu vhodně upravit.

Pokud je vyžadován třígenerační reprodukční test je možno popisovanou metodu pro dvougenerační reprodukční test (metoda B.35) rozšířit tak, aby pokryl třetí generaci.

6. NEUROTOXICITA

Neurotoxicita se zjišťuje různými způsoby, např. podle funkčních změn nebo strukturních a biochemických změn v centrálním nebo periferním nervovém systému. Předběžné upozornění na neurotoxicitu může vzejít z testů akutní toxicity. Test toxicity při opakované aplikaci (metoda B.7) zahrnuje také posouzení neurotoxického účinku. Metoda by měla pomoci odhalit chemické látky s neurotoxickým potenciálem, které vyžadují další, hloubkové zkoumání tohoto aspektu. Navíc je důležité vzít v úvahu specifické neurotoxické účinky, které nemohou být odhaleny v jiných studiích toxicity. Bylo například zjištěno, že jisté organické sloučeniny fosforu způsobují pozdní toxicitu, která je posuzována metodami B.37 a B.38 po jednorázovém nebo opakovaném podání látky.

7. IMUNOTOXICITA

Imunotoxicita se zjišťuje různými způsoby, například podle imunosuprese anebo podle zvětšení odpovědi imunitního systému, které má za následek buď hypersensitivitu nebo navozenou autoimunitu. Test toxicity při opakované aplikaci (metoda B.7), zahrnuje stanovení imunotoxických účinků. Metoda by měla pomoci odhalit chemické látky s imunotoxickým potenciálem, vyžadující další, hloubkové zkoumání tohoto aspektu.

8. TOXIKOKINETIKA

Toxikokinetické studie pomáhají při interpretaci a vyhodnocení údajů o toxicitě, objasňují specifické aspekty toxicity testované chemické látky a výsledky mohou pomoci při návrhu dalších studií toxicity. Nepředpokládá se, že bude v každém případě zapotřebí stanovit všechny parametry. Pouze v ojedinělých případech bude nezbytná celá posloupnost toxikokinetických studií (studie absorpce, distribuce, metabolismu a exkrece). U některých sloučenin mohou být vhodné změny v této sekvenci nebo se může ukázat jako dostatečná studie s jednorázovým podáním (metoda B.36).

Informace o chemické struktuře a fyzikálně-chemických vlastnostech mohou také poskytnout údaje, umožňující odhad charakteristik absorpce při plánovaném způsobu aplikace, metabolismu a distribuce do tkání. Přispět mohou také informace o toxikokinetických parametrech z předcházejících toxikologických a toxikokinetických studií.

9. CHARAKTERISTIKY TESTOVANÉ LÁTKY

Složení testované látky, včetně významnějších nečistot, a její relevantní fyzikálně-chemické vlastnosti včetně stability je třeba znát před zahájením jakékoli toxikologické studie.

Fyzikálně-chemické vlastnosti testované látky poskytují informace důležité pro výběr způsobu podávání, pro návrh konkrétní studie a pro manipulaci s látkou a její skladování.

Vypracování analytické metody pro kvalitativní a kvantitativní stanovení testované látky (a také pokud možno větších nečistot) v dávkovacím médiu a biologickém materiálu by měl předcházet zahájení studie.

Všechny informace týkající se identifikace, fyzikálně-chemických vlastností, čistoty a chování testované látky mají být zahrnuty v závěrečné zprávě o testu.

10. PÉČE O ZVÍŘATA

Pro toxikologické testy je přísná kontrola podmínek prostředí, ve kterém jsou zvířata chována, a správná péče o zvířata podstatnou podmínkou.

10.1 PODMÍNKY CHOVU

Životní podmínky v prostorech pro pokusná zvířata je třeba přizpůsobit jednotlivým druhům. Pro potkany, myši a morčata je vhodná teplota místnosti $22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ při relativní vlhkosti vzduchu 30 - 70 %; pro králíky má být teplota $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ při relativní vlhkosti vzduchu 30 - 70 %.

Některé experimentální techniky výzkumu jsou zvláště citlivé na teplotu. Pro tyto případy jsou podrobnosti o příslušných podmínkách uvedeny v popisu testované metody. Při všech zkouškách toxických účinků je třeba sledovat teplotu a vlhkost vzduchu, zaznamenávat je a uvést je v závěrečné zprávě o průběhu pokusu.

Osvětlení má být umělé se střídáním světla a tmy po dvanácti hodinách. Podrobnosti týkající se osvětlení je třeba zaznamenat a uvést ve zprávě o průběhu pokusu.

Pokud metoda nevyžaduje jiný způsob, mohou být zvířata chována jednotlivě nebo v malých skupinách jedinců jednoho pohlaví, ne více než 5 zvířat v jedné kleci.

Podstatnou součástí zprávy o pokusech na zvířatech jsou údaje o způsobu chovu v klecích a počtu zvířat chovaných v jedné kleci jak během expozice sledované látky, tak během následující doby pozorování.

10.2 PODMÍNKY KRMENÍ

Krmení musí vyhovovat všem požadavkům výživy pro příslušný použitý živočišný druh. Podávají-li se zvířatům studované látky v potravě, může se výživová hodnota snížit vzájemným působením studované látky a některé složky potravy. Možnost takové reakce je nutno vzít v úvahu při interpretaci výsledků. Používají se konvenční laboratorní diety s neomezeným přístupem k pitné vodě. Pokud je testovaná látka podávána v potravě, je třeba tomu přizpůsobit výběr diety.

Příměsi v potravě, které mají prokazatelně vliv na toxicitu, nesmějí být přítomny v koncentracích, ve kterých by se tento vliv projevil.

11. OCHRANA ZVÍŘAT

Při vypracování testovacích metod musí být věnována potřebná pozornost ochraně zvířat.

Snížení počtu a omezení bolesti a stresu zvířat lze dosáhnout např. použitím metody fixní dávky (B.1.bis) nebo metody stanovení třídy akutní toxicity (B.1.tris). Metoda s pevnou dávkou nevyužívá smrti jako specifického kritéria a vyžaduje menší počet zvířat. Metoda stanovení třídy akutní toxicity vyžaduje v průměru o 70 % zvířat méně než metoda B.1.

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

Použití limitních testů, nejen v testech akutní toxicity (metody B.1, B.2 a B.3), ale také v *in vivo* testech mutagenity (metody B.11 a B.12), dovoluje vyhnout se testování zbytečně velkými dávkami.

Při testování dráždivosti je možné test neprovést nebo jej omezit na studii u jednoho zvířete, je-li to dostatečně vědecky zdůvodnitelné. Takové vědecké zdůvodnění může být založeno na fyzikálně-chemických vlastnostech látky, na výsledcích jiných již provedených testů nebo na výsledcích dobře validizovaných testů *in vitro*. Například, byla-li s látkou provedena studie akutní kožní toxicity s dávkou používanou v limitním testu (metoda B.3) a nebylo-li pozorováno žádné podráždění kůže, další testování kožní dráždivosti (metoda B.4) může být zbytečné; látky, které

prokazatelně vyvolaly poleptání nebo silné podráždění kůže při studii kožní dráždivosti (metoda B.4), nesmějí být dále testovány na dráždění oka.

Je nutno neustále vyvíjet a ověřovat alternativní postupy, které mohou poskytovat stejnou úroveň informací jako současné testy na zvířatech a budou přitom využívat menšího počtu zvířat, budou působit méně utrpení nebo se úplně obejdou bez používání zvířat.

Pokud budou takové metody k dispozici, musí být jejich použití pro charakterizování rizika, následnou klasifikaci a označování látky podle nebezpečnosti bráno v úvahu všude tam, kde je to možné.

12. HODNOCENÍ A INTERPRETACE

Při hodnocení a interpretaci pokusů na zvířatech a testů *in vitro* je nutno mít na zřeteli, že přímá extrapolace na člověka je možná jen v omezené míře; doklady o nepříznivých účincích u lidí, pokud jsou k dispozici, mohou sloužit k ověření výsledků testování.

Výsledky testování mohou být použity pro klasifikaci a označování nových i stávajících látek podle účinků na zdraví člověka na základě vlastností zjištěných a kvantifikovaných těmito metodami.

Tyto výsledky mohou být také použity pro studie, zaměřené na posuzování rizika nových i stávajících látek.“.

2. Metody B.10., B.11. a B.12. znějí:

„B.10. MUTAGENITA - TEST CHROMOZÓMOVÝCH ABERACÍ U SAVCŮ *IN VITRO*“

1. METODA

Metoda je replikací OECD TG 473, *In Vitro* Mammalian Chromosome Aberration Test (1997).

1.1 ÚVOD

Účelem analýzy chromozómových aberací *in vitro* je nalézt látky, jež v kulturách savčích buněk způsobují strukturální chromozómové aberace (1) (2) (3). Strukturální aberace jsou dvojího druhu: chromozómové a chromatidové. Aberace vyvolané chemickými mutageny jsou většinou chromatidové, dochází však též k aberacím chromozómového typu. Vznik polyploidie může naznačovat, že daná chemická látka je schopna vyvolávat numerické aberace. Tato metoda však není navržena k analýze numerických aberací a běžně se k tomuto účelu nepoužívá. Chromozómové mutace a příbuzné jevy jsou příčinou řady genetických chorob u člověka a existují přesvědčivé doklady toho, že chromozómové mutace a příbuzné jevy, jež způsobují změny

v onkogenech a tumorsupresorových genech somatických buněk, hrají úlohu při vzniku rakoviny u člověka a experimentálních zvířat.

Tento test se používá k odhalení možných savčích mutagenů a karcinogenů. Řada chemických látek, které jsou v tomto testu pozitivní, je sice pro sabce karcinogenní, není však dostatečná korelace mezi tímto testem a karcinogenitou. Tato korelace závisí na druhu látky a existuje stále více dokladů o tom, že existují chemické látky, jejichž karcinogenní vlastnosti se tímto testem nezjistí, protože zřejmě působí jiným mechanismem než přímým poškozením DNA

K analýze chromozómových aberací *in vitro* se mohou použít kultury stabilizovaných buněčných linií, buněčných kmenů nebo primární buněčné kultury. Použité buňky jsou vybrány na základě schopnosti růstu v kultuře, stability karyotypu, počtu chromozómů, jejich diverzity a četnosti spontánních chromozómových aberací.

Testy *in vitro* vyžadují obecně exogenní zdroj metabolické aktivace. Tento systém metabolické aktivace nedokáže dokonale napodobit podmínky u savců *in vivo*. Je třeba se vyvarovat podmínek, které by mohly vést k pozitivním výsledkům, jež neodrážejí vnitřní mutagenitu, nýbrž jsou způsobeny změnami pH, osmolality nebo vysokou cytotoxicitou (4) (5).

1.2 DEFINICE

Aberace chromatidového typu: strukturální poškození chromozómu, které se projevuje jako zlom jedné, případně obou chromatid, nebo zlom a opětovné spojení mezi chromatidami.

Aberace chromozómového typu: strukturální poškození chromozómu vyjádřená jako zlom respektive jako zlom a opětovné spojení obou chromatid na stejném místě (zahrnuty jsou aberace typu dicentrický chromozóm, prsténčitý chromozóm-ring)

Zlom chromatidy: . jako zlom lze hodnotit porušení kontinuity jedné nebo obou chromatid za předpokladu, že vzniklá mezera ve struktuře chromatidy je větší než je šířka poškozené chromatidy. Dále pak v případech, koncový (distální) fragment v místě zlomu je dislokovaný (nebo mimo osu chromatidy), případně jedna chromatida hodnoceného chromozómu je kratší v důsledku delece.

Endoreduplikace: proces, kde po S-fázi replikace DNA nepřechází jádro do mitózy, nýbrž začíná další S-fáze. Výsledkem jsou chromozómy s 4, 8, 16, ... chromatidami.

Gap: achromatická léze menší než šířka jedné chromatidy a s minimálním vybočením chromatid.

Mitotický index: poměr buněk v metafázi dělený celkovým počtem buněk v dané populaci buněk; udává stupeň proliferace této populace.

Numerická aberace: změna počtu chromozómů oproti normálnímu počtu charakteristickému pro použité buňky.

Polyploidie: násobek haploidního počtu chromozómů (n) jiný než diploidní počet (tedy $3n$, $4n$ atd.).

Strukturální aberace: změna chromozómové struktury zjistitelná mikroskopickou analýzou buněčného dělení ve stádiu metafáze, pozorovaná jako delece a fragmenty a výměny.

1.3 PRINCIP METODY

Buněčné kultury se vystaví působení testované látky, a to s metabolickou aktivací a bez ní. Ve stanovených intervalech po expozici buněčné kultury testované látky, se metafáze zastaví například Colcemidem® nebo kolchicinem, buňky se sklídí, obarví se a v metafázických buňkách se mikroskopicky zjišťují chromozómové aberace.

1.4 POPIS METODY

1.4.1 Příprava

1.4.1.1 Buňky

Je možno použít celou řadu buněčných linií, kmenů nebo primárních buněčných kultur, včetně buněk lidských (například fibroblasty čínského křečka nebo lymfocyty periferní krve člověka či jiného savce).

1.4.1.2 Média a kultivační podmínky

K udržování kultur je třeba používat vhodná kultivační média a inkubační podmínky (kultivační nádoby, koncentrace CO₂, teplota a vlhkost). U buněčných linií a kmenů je třeba běžným způsobem kontrolovat stabilitu modálního počtu chromozómů a nepřítomnost mykoplasmat v buňkách. V případě kontaminace se buňky nepoužívají. Je třeba znát normální dobu buněčného cyklu a kultivační podmínky.

1.4.1.3 Příprava kultur

Stabilizované buněčné linie a kmeny: buňky se množí ze zásobních kultur vysetím do kultivačního média v takové hustotě, aby kultury nedosáhly konfluentní vrstvy před dobou sklizení a inkubují se při teplotě 37°C.

Lymfocyty: ke kultivačnímu médiu obsahujícímu mitogen (např. fytohemaglutinin) se přidá buď plná krev s vhodným antikoagulantem (např. heparinem), nebo separované lymfocyty získané od zdravých jedinců a kultivují se při teplotě 37°C.

1.4.1.4 Metabolická aktivace

Na buňky se testovanou látkou působí v přítomnosti i v nepřítomnosti vhodného metabolického aktivačního systému. Nejobvyklejší je kofaktory suplementovaná mitochondriální frakce (S9) připravená z jater hlodavců, ovlivněná činidly indukujícími enzymy jako je Aroclor 1254 (6) (7) (8) (9), nebo směs fenobarbitalu a β-naftoflavonu (10) (11) (12).

Konečná koncentrace mitochondriální frakce v médiu činí obvykle 1 – 10 % v/v. Aktivita metabolického aktivačního systému bude záviset na tom, jakého typu je testovaná látka. V některých případech je vhodné použít mitochondriální frakci v několika koncentracích.

Pro účely endogenní aktivace mohou být použity i geneticky modifikované buněčné linie exprimující specifické aktivační enzymy. Výběr buněčných linií by měl být vědecky ověřen (např. vztahem isoenzymu cytochromu P450 k metabolismu testované látky).

1.4.1.5 Příprava testované látky

Je-li testovaná látka v pevném stavu, látka se před působením na buňky rozpustí nebo se připraví její suspenze ve vhodném rozpouštědle a případně naředí. Kapalné testované látky se mohou do systému přidávat přímo nebo se předtím ředí. Je třeba používat čerstvé preparáty, ledaže údaje o jejich stabilitě prokazují, že delší skladování neovlivňuje jejich vlastnosti.

1.5 PODMÍNKY TESTU

1.6 ROZPOUŠTĚDLO

U zvoleného rozpouštědla nesmí existovat podezření, že by mohlo s testovanou látkou chemicky reagovat, a nesmí narušovat přežívání buněk a aktivitu S9. Používá-li se méně známé rozpouštědlo musí být podpořeno referencemi prokazujícími jeho kompatibilitu. Doporučuje se, aby všude tam, kde je to možné, bylo na prvním místě zvažováno použití jako rozpouštědla vody. Je-li testovaná látka ve vodě nestálá, musí být použité organické rozpouštědlo zcela bezvodé. Voda se dá odstranit molekulárním sítem.

1.6.1 Koncentrace

Mezi kritéria, jež se uvažují při stanovování nejvyšší koncentrace, patří cytotoxicita, rozpustnost v systému a změny pH resp. osmolality.

Cytotoxicita se stanoví s metabolickou aktivací i bez ní v hlavním experimentu, přičemž se použije vhodné indikace buněčné integrity a růstu, například stupně konfluence, počet živých buněk, nebo mitotický index. Je vhodné stanovit cytotoxicitu a rozpustnost v předběžných experimentech.

Je třeba použít minimálně tři analyzovatelné koncentrace. Dochází-li k cytotoxicitě, musí tyto koncentrace pokrývat rozsah od maximální do nízké nebo nulové toxicity. To obvykle znamená, že se jednotlivé koncentrace nebudou lišit více než násobkem, který leží mezi hodnotami 2 a $\sqrt{10}$. V době sklizení buněk musí být při nejvyšší koncentraci pozorován signifikantní pokles konfluentního růstu, počtu buněk, nebo mitotického indexu (vždy o více než 50%). Mitotický index je pouze nepřímou mírou cytotoxických /cytostatických účinků a je závislý na době uplynulé po expozici testovanou látkou. Je však akceptovatelný pro suspenzní kultury, kde by jiná detekce toxicity byla obtížná a nepraktická. Jako doplňující informace je možno použít také údaje o kinetice buněčného dělení, jako je průměrný generační čas; ten ovšem představuje celkový průměr, který ne vždy odhalí existenci v dělení zpožděných subpopulací buněk. A tak i malé prodloužení průměrného generačního času může znamenat značný odklon od vhodné doby sklizení z hlediska optimálního výtěžku aberací.

U relativně necytotoxických látek činí maximální koncentrace testované látky nejnížší z hodnot 5 $\mu\text{l/ml}$, 5 mg/ml nebo 0,01 M.

U relativně nerozpustných látek, jež jsou netoxické v koncentracích nižších než je koncentrace při které se již látka nerozpouští, má být nejvyšší použitá koncentrace vyšší než je mez rozpustnosti ve finálním kultivačním médiu na konci kultivace s testovanou látkou. V některých případech – například dochází-li k toxickému účinku při koncentracích vyšších než je nejnižší nerozpustná koncentrace – se doporučuje testovat při několika koncentracích s viditelným srážením. Může být užitečné vyhodnotit rozpustnost na počátku a na konci působení, protože se během expozice může rozpustnost změnit v testovacím systému vlivem přítomnosti buněk, séra, S9 apod. Nerozpustnost se dá zjistit i prostým okem.. Sraženina nesmí být na překážku při hodnocení buněk.

1.6.2 Negativní a pozitivní kontroly

Do každého experimentu, ať již s metabolickou aktivací nebo bez ní, je třeba zařadit souběžné pozitivní a negativní kontroly (rozpouštědlo, nebo vehikulum). Pokud se aplikuje metabolická aktivace, musí být pozitivní kontrolou látka vyžadující metabolickou aktivaci k vyvolání mutagenního účinku.

Pro pozitivní kontrolu se používá známý klastogen, a to při expozičních úrovních, kde se očekává, že poskytne reprodukovatelný a detekovatelný nárůst aberací nad pozadí, prokazující citlivost testovacího systému.

Koncentrace pro pozitivní kontrolu je třeba zvolit tak, aby účinek byl zřejmý, ale neodhaloval hodnotiteli přímo identitu zakódovaných preparátů. Mezi látky pro pozitivní kontrolu patří například:

Metabolická aktivace	Látka	CAS	EINECS
Ne	methyl methansulfonát	66-27-3	200-625-0
	ethyl methansulfonát	62-50-0	200-536-7
	ethyl nitrosomočovina	759-73-9	212-072-2
	mitomycin C	50-07-7	200-008-6
	4-nitrochinolin-N-oxid	56-57-5	200-281-1
Ano	benz[a]pyren	50-32-8	200-028-5
	cyklofosfamid monohydrát cyklofosfamidu	50-18-0 6055-19-2	200-015-4

Pro pozitivní kontrolu se mohou použít i jiné vhodné látky. Tam, kde je to možné, je vhodné použít pro pozitivní kontrolu látku ze stejné chemické skupiny.

Pro každý časový interval sklizení kultur je třeba použít i negativní kontrolu, ve které se používá rozpouštědlo nebo vehikulum v kultivačním médiu, zpracované stejným způsobem jako experimentální kultury. Mimoto je rovněž třeba zařadit kontrolu bez jakéhokoliv ovlivnění.

1.6.3 Postup

1.6.3.1 Expozice testovanou látkou

Na proliferující buňky se působí testovanou látkou za přítomnosti i nepřítomnosti metabolického aktivačního systému. Na lymfocyty je třeba začít působit asi 48 hodin po stimulaci mitogenem.

Obvykle se pro každou koncentraci používají dvě kultury; a totéž se doporučuje pro negativní kontroly s rozpouštědlem, nebo vehikulem. Pokud lze na základě historických údajů prokázat, že rozdíly mezi duplicitními kulturami jsou minimální (13) (14), je přijatelné, aby se pro každou koncentraci použila jenom jedna kultura.

V případě plyných nebo těkavých látek je třeba uplatnit v testu vhodné postupy, jako je použití neprodyšně uzavřených kultivačních nádob (15).

1.6.3.2 Doba sklizení kultury

V prvním experimentu se buňky vystaví testované látce s metabolickou aktivací i bez ní po dobu 3 – 6 hodin a vzorky se odebírají v čase odpovídajícím zhruba 1,5-násobku normální délky buněčného cyklu od začátku expozice (12). Pokud jsou při použití aktivačního systému i bez něho výsledky negativní, provádí se další experiment bez aktivace, s kontinuální expozicí až do doby ukončení kultivace odpovídající zhruba 1,5-násobku normálního buněčného cyklu. Některé látky se hodnotí snáze při době expozice delší než je 1,5-násobek délky buněčného cyklu. Negativní výsledky s metabolickou aktivací se posuzují případ od případu. V případech, kdy se potvrzení negativních výsledků nepokládá za nutné, je třeba toto rozhodnutí zdůvodnit.

1.6.3.3 Příprava chromozómů

Na buněčné kultury se působí Colcemidem® nebo kolchicinem obvykle po dobu 1 – 2 hodin před ukončením kultivace. Každá buněčná kultura se pro přípravu chromozómů zpracovává zvlášť. Příprava chromozómů sestává z ovlivnění buněk hypotonickým roztokem, fixace a obarvení.

1.6.3.4 Analýza

Všechny preparáty, včetně pozitivních a negativních kontrol, se před mikroskopickou analýzou nezávisle zakódují. Jelikož fixační postupy často vedou k rozbití určitého podílu metafázických buněk a ztrátě chromozómů, musí být u všech typů buněk počet centromer v hodnocených buňkách roven modálnímu číslu ± 2 . Pro každou koncentraci a kontrolu je třeba hodnotit minimálně 200 dobře rozprostřených metafází, stejnoměrně z obou kultur, pokud byly použity. V případě, že je počet aberací vysoký, může se počet analyzovaných metafází snížit.

I když účelem testu je zjistit strukturální chromozómové aberace, je také důležité zaznamenat případnou polyploidii a endoreduplikaci.

2. ÚDAJE

2.1 ZPRACOVÁNÍ VÝSLEDKŮ

Jelikož experimentální jednotkou je buňka, je třeba vyhodnotit procento buněk se strukturálními chromozómovými aberacemi. Je třeba registrovat jednotlivé typy strukturálních aberací včetně jejich počtu a četnosti u experimentálních i kontrolních kultur. Gapy se zaznamenávají zvlášť, ale obvykle se do celkové četnosti aberací nezahrnují.

Současně je třeba v testu zaznamenávat také zjištěnou cytotoxicitu v experimentálních i kontrolních kulturách.

Udávají se data pro jednotlivé kultury. Nakonec se všechna data uvedou v sumární tabulce.

Verifikace zjevně pozitivních výsledků se nepožaduje. Nejednoznačné výsledky se objasňují dalším testováním, nebo modifikací experimentálních podmínek. O nutnosti potvrdit negativní výsledky bylo pojednáno v odst. 1.4.3.3 V následných experimentech je třeba zvážit modifikaci použitých parametrů tak, aby se rozšířil rozsah posuzovaných podmínek. K parametrům, které lze modifikovat, patří koncentrační intervaly a podmínky metabolické aktivace.

2.2 VYHODNOCENÍ A INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

Ke zjišťování pozitivního výsledku se používá několik kritérií, například na koncentraci testované látky závislá frekvence buněk s chromozómovými aberacemi. Nejprve je třeba uvážit biologickou významnost výsledků. Při vyhodnocování výsledků testu se mohou použít statistické metody (3) (13). Statistická významnost by však neměla být jediným určujícím faktorem pozitivního výsledku.

Nárůst počtu polyploidních buněk může indikovat, že testovaná látka má schopnost inhibovat mitotické procesy a vyvolávat numerické chromozómové aberace. Nárůst počtu buněk s endoreduplikovanými chromozómy může naznačovat, že testovaná látka má schopnost inhibovat fáze buněčného cyklu (17) (18).

Testovaná látka, při jejímž použití výsledky nesplňují výše uvedená kritéria, se v tomto systému považuje za nemutagenní.

Ačkoliv většina experimentů vykazuje jasně pozitivní, nebo negativní výsledky, ve výjimečných případech získaná data nedovolují jednoznačné posouzení účinku testované látky. Výsledky mohou být nejisté, nebo diskutabilní bez ohledu na počet opakovaných experimentů. Pozitivní výsledky testu na chromozómové aberace *in vitro* ukazují, že testovaná látka vyvolává v kultuře savčích somatických buněk strukturální chromozómové aberace. Negativní výsledky ukazují, že za daných experimentálních podmínek testovaná látka v kultuře savčích somatických buněk chromozómové aberace nevyvolává.

3. ZÁVĚREČNÁ ZPRÁVA

ZPRÁVA O PRŮBĚHU POKUSU

Ve zprávě o průběhu pokusu je třeba uvést tyto informace:

Rozpouštědlo / vehikulum:

- zdůvodnění volby rozpouštědla/vehikula
- rozpustnost a stabilita testované látky v rozpouštědle/vehikulu, pokud je známa.

Buňky:

- typ a zdroj buněk,
- karyotyp a vhodnost daného typu buněk,
- absence mykoplasmat, je-li to nutné
- informace o délce buněčného cyklu,
- pohlaví dárce krve, zda byla použita plná krev nebo separované lymfocyty, použitý mitogen,
- počet pasáží buněk, je-li to nutné–metody udržování buněčné kultury, je-li to nutné
- modální počet chromozomů.

Podmínky pokusu:

- název látky blokující metafázi, její koncentrace a doba působení na buňky
- zdůvodnění volby použitých koncentrací a počtu kultur, včetně např. údajů o cytotoxicitě a mezích rozpustnosti, jsou-li k dispozici,
- složení média, koncentrace CO₂, je-li to nutné
- koncentrace testované látky,
- objem vehikula a testované látky,
- kultivační teplota,
- doba kultivace ,
- doba působení,
- hustota buněk na začátku kultivace , je-li to nutné
- typ a složení metabolického aktivačního systému, včetně kritérií akceptovatelnosti,
- pozitivní a negativní kontroly,
- metody přípravy podložních sklíček,
- kritéria pro hodnocení aberací,
- počet analyzovaných metafází,
- metoda stanovení toxicity,
- kritéria, jimiž se studie hodnotí jako pozitivní, negativní nebo nejednoznačná.

Výsledky:

- známky toxicity, tj. stupeň konfluence, údaje o buněčném cyklu, o počtu buněk, mitotický index,
- známky srážení,
- údaje o pH a osmolalitě kultivačního média , jsou-li stanoveny,
- definice aberací, včetně gapů
- počet buněk s chromozómovými aberacemi a typ chromozómových aberací pro každou experimentální i kontrolní kulturu zvlášť,
- případné změny ploidie,
- vztah dávka-odpověď, je-li to možné,
- statistické analýzy, pokud byly provedeny,
- souběžné údaje z negativních (rozpouštědlo/vehikulum) a pozitivních kontrol,
- historické údaje z negativních (rozpouštědlo/vehikulum) a pozitivních kontrol, včetně rozpětí, průměrů a směrodatných odchylek.

Diskuse výsledků.

Závěry.

B.11. MUTAGENITA - TEST CHROMOZOMOVÝCH ABERACÍ V KOSTNÍ DŘENI SAVCŮ *IN VIVO*

1. METODA

Metoda je replikací OECD TG 475, Mammalian Bone Marrow Chromosome Aberration Test (1997).

1.1 ÚVOD

Účelem analýzy chromozómových aberací u savců *in vivo* je zjistit strukturální chromozómové aberace vyvolané testovanou látkou v buňkách kostní dřeně zvířat, obvykle hlodavců (1) (2) (3) (4). Strukturální aberace mohou být dvojího druhu: chromozómové a chromatidové. Nárůst polyploidie může naznačovat, že daná chemická látka je schopna vyvolávat numerické aberace. Aberace vyvolané chemickými mutageny jsou většinou chromatidové, ovšem k aberacím chromozómového typu dochází rovněž. Chromozómové mutace a příbuzné jevy jsou příčinou řady genetických chorob u člověka a existují přesvědčivé doklady toho, že chromozómové mutace a příbuzné jevy, jež způsobují změny v onkogenech a tumorsupresorových genech, hrají úlohu při rakovině u člověka a v experimentálních systémech.

K tomuto testu se běžně využívají hlodavci. Cílovou tkání v něm je kostní dřeň, protože se jedná o tkáň vysoce vaskularizovanou, obsahující populaci rychle se dělících buněk, jež se dají snadno izolovat a zpracovat. Jiné živočišné druhy a cílové tkáně se v tomto testu nepoužívají.

Tento test na chromozómové aberace je zvláště důležitý při hodnocení mutagenního rizika, protože umožňuje brát v úvahu faktory metabolismu *in vivo*, farmakokinetiky a procesů reparace DNA, i když zde mohou být mezi živočišnými druhy a mezi tkáněmi rozdíly. Test *in vivo* je také vhodný pro další analýzu mutagenního efektu, který byl předtím zjištěn testem *in vitro*.

Existují-li doklady o tom, že se testovaná látka nebo její reaktivní metabolit do cílové tkáně nedostane, není vhodné použití tohoto testu.

1.2 DEFINICE

Aberace chromatidového typu: strukturální poškození chromozómu, které se projevuje jako zlom jedné, případně obou chromatid, nebo zlom a opětovné spojení mezi chromatidami.

Aberace chromozómového typu: strukturální poškození chromozómu vyjádřená jako zlom respektive jako zlom a opětovné spojení obou chromatid na stejném místě (zahrnuty jsou aberace typu dicentrický chromozóm, prsténčitý chromozóm-ring)

Zlom chromatidy: jako zlom lze hodnotit porušení kontinuity jedné nebo obou chromatid za předpokladu, že vzniklá mezera ve struktuře chromatidy je větší než je šířka poškozené chromatidy. Dále pak v případech, koncový (distální) fragment v místě zlomu je dislokovaný (nebo mimo osu chromatidy), případně jedna chromatida hodnoceného chromozómu je kratší v důsledku delece.

Endoreduplikace: proces, kde po S-fázi replikace DNA nepřechází jádro do mitózy, nýbrž začíná další S-fáze. Výsledkem jsou chromozómy s 4, 8, 16, ... chromatidami.

Gap: achromatická léze menší než šířka jedné chromatidy a s minimálním vybočením chromatid.

Mitotický index: poměr buněk v metafázi dělený celkovým počtem buněk v dané buněčné populaci; udává stupeň proliferace této populace.

Numerická aberace: změna počtu chromozómů oproti normálnímu počtu charakteristickému pro použité buňky.

Polyploidie: násobek haploidního počtu chromozómů (n) mimo diploidní počet (tedy $3n$, $4n$ atd.).

Strukturální aberace: změna chromozómové struktury zjiitelná mikroskopickou analýzou buněčného dělení ve stádiu metafáze, pozorovaná jako delece a fragmenty a výměny.

1.3 PRINCIP METODY

Zvířata se vhodným způsobem vystaví testované látce a ve vhodnou dobu po působení se usmrtí. Před usmrcením se na ně působí látkou zastavující metafázi (například kolchicinem nebo Colcemidem®). Z buněk kostní dřeně se pak připraví preparáty a v metafázických buňkách se mikroskopicky zjišťují chromozómové aberace.

1.4 POPIS METODY

1.4.1 Příprava

1.4.1.1 Výběr živočišného druhu

Běžně se používají potkani, myši a čínští křečci, lze ovšem použít i jakýkoliv jiný vhodný savčí druh. Používají se běžné laboratorní kmeny mladých zdravých jedinců. Hmotnostní rozdíly by při zahájení studie měly být minimální a u každého pohlaví nemají přesahovat ± 20 % průměrné hmotnosti.

1.4.1.2 Podmínky chovu

Všeobecné podmínky chovu jsou uvedeny ve Všeobecném úvodu v části B, vlhkost by měla být 50 – 60 %.

1.4.1.3 Příprava zvířat

Zdraví mladí dospělí jedinci se náhodně rozdělí do kontrolní a experimentální skupiny. Klece je třeba uspořádat tak, aby se minimalizovaly případné vlivy toho, jak a kde jsou klece umístěny. Zvířata je třeba jednoznačně označit. Po dobu minimálně pěti dní se zvířata aklimatizují v laboratorních podmínkách.

1.4.1.4 Příprava dávek

Je-li testovaná látka v pevném stavu, před podáním zvířatům se rozpustí nebo se připraví její suspenze ve vhodném rozpouštědle nebo vehikulu a případně se zředí. Kapalně testované látky se mohou podávat přímo nebo se před podáváním ředí. Je třeba používat čerstvé preparáty, ledaže údaje o stálosti prokazují, že skladování ji neovlivní.

1.4.2 Podmínky testu

1.4.2.1 Rozpouštědlo / vehikulum

Rozpouštědlo / vehikulum v používaných dávkách nesmí vyvolávat toxické účinky a nesmí s testovanou látkou chemicky reagovat. Používá-li se ne příliš známé rozpouštědlo, musí být jeho použití podpořeno údaji o kompatibilitě s testovanou látkou. Doporučuje se, aby kde je to možné, bylo na prvním místě použito vodné rozpouštědlo / vehikulum.

1.4.2.2 Kontroly

Do každého testu je třeba pro každé pohlaví zařadit souběžné pozitivní a negativní (rozpouštědlo/vehikulum) kontroly. Je třeba zacházet se zvířaty ve všech skupinách stejně.

Pozitivní kontroly by měly vyvolávat strukturální aberace *in vivo* při dávkách, kdy lze očekávat jejich detekovatelné zvýšení nad spontánní úroveň. Dávky při pozitivní kontrole se volí tak, aby byly účinky patrné, ale přitom nenapovídaly hodnotiteli totožnost zakódovaného preparátu. Pozitivní kontrolu je možné podávat odlišným způsobem než testovanou látku a vzorek odebírat v jednom časovém intervalu. Kde je to možné, je třeba používat pozitivní kontrolu ze stejné chemické skupiny, jako je testovaná látka. Příklady látek vhodných pro pozitivní kontrolu:

Látka	CAS	EINECS
ethyl methansulfonát	62-50-0	200-536-7
ethyl nitrosomočovina	759-73-9	212-072-2
mitomycin C	50-07-7	200-008-6
cyklofosfamid cyklofosfamid monohydrát	50-18-0 6055-19-2	200-015-4
triethylenmelamin	51-18-3	200-083-5

Negativní kontroly ovlivněné rozpouštědlem nebo vehikulem a zpracované stejným způsobem jako experimentální skupiny měly by být zařazeny do všech časových intervalů zpracování, pokud nejsou k dispozici přijatelné historické údaje o frekvenci chromozómových aberací a o interindividuální variabilitě mezi zvířaty. Aplikuje-li se u negativních kontrol pouze jeden odběr vzorků, je nejvhodnější dobou první interval odběru vzorků. Mimoto je třeba použít i neovlivněných kontrol, ledaže existují historické nebo publikované údaje prokazující, že zvolené rozpouštědlo, nebo vehikulum nevyvolává žádné nepříznivé nebo mutagenní účinky.

1.5 POSTUP

1.5.1 Počet a pohlaví zvířat

V každé experimentální a kontrolní skupině musí být minimálně pět analyzovatelných jedinců každého pohlaví. Pokud v době, kdy se studie provádí, existují údaje o stejném živočišném druhu a použití stejných způsobů expozice prokazující, že mezi oběma pohlavími nejsou v toxicitě podstatné rozdíly, je testování pouze na jednom pohlaví postačující. Tam, kde humánní expozice chemickým látkám může být závislá na pohlaví, jak je tomu například u některých farmaceutických přípravků, provádí se test na zvířatech odpovídajícího pohlaví.

1.5.2 Dávkovací schéma

Testovanou látku je nejvhodnější podávat jednorázově. Pokud se jedná o objemnou dávku, může se k usnadnění aplikace dávka rozdělit, například na dvě dávky za den podané v rozmezí nanejvýše několika hodin. Jiné režimy dávkování musejí být vědecky odůvodněné.

Vzorky se odebírají ve dvou různých časových intervalech po podání téhož dne. U hlodavců je první interval odběru vzorků 1,5-násobek normální délky buněčného cyklu (která činí obvykle 12 – 18 hodin) po podání látky. Jelikož doba potřebná pro absorpci a metabolismus testované látky a její vliv na kinetiku buněčného cyklu mohou ovlivnit optimální dobu pro detekci chromozómových aberací, doporučuje se další odběr vzorků po 24 hodinách od prvního odběru. Pokud se v daném dávkovacím režimu látka podává vícekrát než jednou za den, je třeba provést jeden odběr vzorků 1,5-násobkem délky normálního buněčného cyklu po posledním podání látky.

Před usmrcením se zvířatům intraperitoneálně injikuje vhodná dávka Colcemidu® nebo kolchicinu a následně se z nich ve vhodném intervalu odeberou vzorky. U myší je tento interval zhruba 3 – 5 hodin, u čínských křečků zhruba 4 – 5 hodin. Z kostní dřeně se odeberou buňky a zjišťují se v nich chromozómové aberace.

1.5.3 Dávkování

Provádí-li se studie ke zjištění rozpětí toxicity, protože nejsou k dispozici žádné vhodné údaje, je třeba ji provádět v téže laboratoři za použití stejného živočišného druhu, kmene, pohlaví a pokusného režimu, jaké se použijí v hlavní studii (5). Při zjištění toxicity, se užívají pro první časový interval odběru vzorků tři dávky tak, aby pokrývaly rozmezí od maximální toxicity k toxicitě nízké nebo nulové. Pro pozdější časový interval odběru vzorků je pak třeba použít jenom nejvyšší dávku. Ta je definována jako dávka vyvolávající takové známky toxicity, že při vyšších dávkách ve stejném režimu podávání by účinky byly letální. Látky, jež v nízkých netoxických dávkách vykazují specifickou biologickou aktivitu, jako jsou hormony nebo mitogeny, mohou představovat z těchto kritérií pro stanovení dávek výjimky, jež se vyhodnocují individuálně případ od případu. Nejvyšší dávka může být také definována jako dávka, která vede k určitým známkám toxicity v kostní dřeni (např. pokles mitotického indexu o více než 50 %).

1.5.4 Limitní test

Jestliže test při dávce minimálně 2 000 mg/kg hmotnosti v jedné dávce nebo ve dvou dávkách podaných v jeden den nevyvolává žádné pozorovatelné toxické účinky a jestliže se na základě údajů o látkách s podobnou chemickou strukturou neočekává genotoxicita, nemusí být provedena celá studie za použití tří dávkových úrovní. Pro dlouhodobé studie činí limitní dávka 2 000 mg/kg hmotnosti za den při době trvání do 14 dnů, a 1 000 mg/kg hmotnosti při době trvání delší než 14 dnů. Podle očekávané humánní expozice může být zapotřebí použít v limitním testu vyšší dávkové úrovně.

1.5.5 Aplikace látky

Testovaná látka se obvykle aplikuje buď žaludeční sondou, nebo intraperitoneální injekcí. V odůvodněných případech jsou přijatelné i jiné způsoby expozice. Maximální objem kapaliny, která se dá sondou nebo injekcí najednou vpravit, závisí na velikosti pokusného zvířete a nemá překročit 2 ml/100g hmotnosti; vyšší dávky musí být zdůvodněné. S výjimkou dráždivých nebo žravých látek, jež normálně vykazují při vyšších koncentracích horší účinky, je třeba upravit koncentrace látky tak, aby objem byl ve všech dávkových úrovních stejný a minimalizovala se tak objemová variabilita.

1.5.6 Příprava chromozómů

Okamžitě po usmrcení zvířete se odebere kostní dřeň, působí se ní hypotonickým roztokem a dřeň se fixuje. Suspenze buněk se nakape na podložní sklo a obarví se.

1.5.7 Analýza

Jakožto míra cytotoxicity se u všech zvířat včetně pozitivních i negativních kontrol stanoví mitotický index pro minimálně 1000 buněk z každého jedince.

Z každého jedince se analyzuje minimálně 100 buněk. Tento počet je možné snížit při vysokém počtu aberací. Všechny preparáty (včetně pozitivních a negativních kontrol) se před mikroskopickou analýzou nezávisle zakódují. Jelikož při jejich přípravě dochází často k porušení určitého podílu metafází spojeného se ztrátou chromozómů, musí být počet centromer v hodnocených buňkách $2n \pm 2$.

2. ÚDAJE

2.1 ZPRACOVÁNÍ VÝSLEDKŮ

Údaje od jednotlivých zvířat se prezentují v tabelární formě. Experimentální jednotkou je jedinec. U každého zvířete se zaznamenává počet hodnocených buněk, počet aberací na jednu buňku a procento buněk se strukturálními chromozómovými aberacemi. U experimentálních i kontrolních skupin se zaznamenávají jednotlivé typy strukturálních chromozómových aberací, jejich počet a četnost. Gapy se zaznamenávají zvlášť a registrují se, ale obvykle se do celkové frekvence aberací nezahrnují. Nejsou-li žádné doklady o tom, že obě pohlaví reagují rozdílně, je možné údaje za obě pohlaví pro statistickou analýzu sloučit.

2.2 VYHODNOCENÍ A INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

Ke zjišťování pozitivního výsledku se používá několik kritérií, například na koncentraci testované látky závislá frekvence buněk s chromozómovými aberacemi, nebo zřetelný nárůst počtu buněk s aberacemi ve skupině s jednorázovou dávkou při jednom časovém intervalu odběru vzorků. Nejprve je třeba uvážit biologickou významnost výsledků. Při vyhodnocování výsledků testu se mohou použít statistické metody (6). Statistická významnost by však neměla být jediným určujícím faktorem pozitivního výsledku. Nejednoznačné výsledky je třeba vyjasnit dalším testováním, nejlépe za modifikovaných experimentálních podmínek.

Nárůst počtu polyploidních buněk může indikovat, že testovaná látka má schopnost inhibovat mitotické procesy a vyvolávat numerické chromozómové aberace. Nárůst počtu buněk s endoreduplikovanými chromozómy může naznačovat, že testovaná látka má schopnost inhibovat fáze buněčného cyklu (7) (8).

Testovaná látka, při jejímž použití výsledky nesplňují výše uvedená kritéria, se v tomto systému považuje za nemutagenní.

Většina experimentů sice poskytuje jednoznačně pozitivní nebo negativní výsledky, v ojedinělých případech však nelze ze získaného souboru dat vyvodit o aktivitě testované látky definitivní závěr. Výsledky mohou být stále nejednoznačné nebo problematické, i když se experiment několikrát opakuje.

Pozitivní výsledky testu na chromozómové aberace *in vivo* ukazují, že testovaná látka vyvolává v kostní dřeni příslušného živočišného druhu strukturální chromozómové aberace. Negativní výsledky ukazují, že za daných experimentálních podmínek testovaná látka v kostní dřeni příslušného živočišného druhu chromozómové aberace nevyvolává.

Je třeba vzít v úvahu, jaká je pravděpodobnost, že testovaná látka bude široce používána, nebo jakou specifickou cílovou tkáň zasáhne (např. systémová toxicita).

3. ZÁVĚREČNÁ ZPRÁVA ZPRÁVA O PRŮBĚHU POKUSU

Ve zprávě o průběhu pokusu je třeba uvést tyto informace:

Rozpouštědlo/vehikulum :

- zdůvodnění volby vehikula,
- rozpustnost a stabilita testované látky v rozpouštědle/vehikulu, pokud je známa.

Pokusná zvířata:

- použitý živočišný druh/kmen,
- počet, věk a pohlaví jedinců,
- původ, chovné podmínky, strava apod.,
- hmotnost jednotlivých zvířat na počátku testu, včetně hmotnostního rozpětí, průměrů a směrodatných odchylek pro jednotlivé skupiny.

Podmínky pokusu:

- pozitivní a negativní (vehikulum/rozpouštědlo) kontroly,
- údaje ze studie pro určení rozpětí, byla-li provedena,
- zdůvodnění volby velikosti dávky,
- podrobnosti o přípravě testované látky,

- podrobnosti o podávání testované látky,
- zdůvodnění způsobu podávání,
- případně metody k ověření, že se látka dostala do celkového oběhu nebo do cílové tkáně,
- případně převod koncentrace látky v potravě/pitné vodě (ppm) na skutečnou dávku (mg/kg hmotnosti/den),
- podrobnosti o kvalitě potravy a vody,
- podrobný popis podávání testované látky a odběru vzorků,
- metody hodnocení toxicity,
- látka zastavující metafázi, její koncentrace a doba aplikace,
- metody přípravy mikroskopických preparátů
- kritéria pro hodnocení aberací,
- počet analyzovaných buněk na jedno zvíře,
- kritéria, jimiž se studie hodnotí jako pozitivní, negativní nebo nejednoznačná.

Výsledky:

- známky toxicity,
- mitotický index,
- typ a počet aberací pro každého jedince zvlášť,
- celkový počet aberací v dané skupině, jejich průměr a směrodatná odchylka,
- případné změny ploidie,
- vztah dávka-účinek, je-li to možné,
- statistické analýzy, byly-li provedeny,
- údaje ze souběžných negativních kontrol,
- historické údaje z negativních kontrol včetně rozpětí, průměrů a směrodatných odchylek.
- údaje ze souběžných pozitivních kontrol,

Diskuse výsledků.

Závěry.

B.12. MUTAGENITA - IN VIVO MIKRONUKLEUS TEST V SAVČÍCH ERYTROCYTECH

1. METODA

Metoda je replikací OECD TG 474, Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test (1997).

1.1 ÚVOD

Mikronukleus test *in vivo* u savců slouží ke zjištění poškození, jež testovaná látka způsobuje v chromozómech nebo v mitotickém aparátu erytroblastů; test spočívá v tom, že se analyzují erytrocyty z kostní dřeně resp. z periferní krve zvířat, obvykle hlodavců.

Účelem mikronukleus testu je zjistit látky, jež způsobují cytogenetické poškození, jehož výsledkem je vznik mikrojader představujících chromozómové fragmenty nebo celých chromozómů.

Když z erytroblastu kostní dřeně vznikne polychromatický erytrocyt, jádro je z buňky vyloučeno; případně zbuďe v cytoplasmě vzniklé mikrojádru. Vizualizace mikrojádra je usnadněna tím, že těmito buňkám jádro chybí. Nárůst četnosti polychromních erytrocytů s mikrojádry je u experimentálních zvířat důkazem poškození chromozómů.

V tomto testu se kostní dřeň hlodavců používá běžně proto, že se polychromní erytrocyty v této tkáni tvoří. Analýza nezralých (polychromních) erytrocytů s mikrojádry v periferní krvi je použitelná u každého živočišného druhu, u kterého byla prokázáno, že jeho slezina nedokáže erytrocyty s mikrojádry odstraňovat nebo že je tento živočišný druh dostatečně citlivý pro detekci látek způsobujících strukturální nebo numerické chromozómové aberace. Mikrojádra se dají rozlišovat podle řady kritérií, jako je přítomnost či nepřítomnost kinetochoru (centromery), nebo centromerické DNA v mikrojádru. Konečným cílem je stanovení četnosti nezralých (polychromních) erytrocytů s mikrojádry. Také počet zralých (normochromních) erytrocytů v periferní krvi obsahujících mikrojádra v rámci daného počtu zralých erytrocytů lze jako základní hodnotu použít v případě, že se zvířata testují po dobu minimálně čtyř týdnů.

Tento *in vivo* mikronukleus test u savců je zvláště vhodný k hodnocení rizika mutagenity protože umožňuje zohlednit faktory metabolismu *in vivo*, farmakokinetiky a procesů reparace DNA, i když zde mohou být mezi živočišnými druhy, mezi tkáněmi a mezi konečným efektem rozdíly. Test *in vivo* je také užitečný pro další výzkum mutagenního efektu, který byl předtím zjištěn v systému *in vitro*.

Existují-li doklady o tom, že se testovaná látka nebo její reaktivní metabolit do cílové tkáně nedostane, není použití tohoto testu vhodné.

1.2 DEFINICE

Centromera (kinetochor): oblasti chromozómů, se kterými se během dělení pojí vlákna dělicího vřeténka umožňující organizovaný pohyb dceřiných chromozómů k pólům dceřiných buněk.

Mikrojádru (mikronukleus): malá jádra oddělená od jádra buňky (nucleus) vytvářená během telofáze mitózy, nebo meiózy reprezentovaná opoždujícími se fragmenty chromozómů nebo celými chromozómy.

Normochromní erytrocyt: zralý erytrocyt, jemuž chybějí ribozómy a jenž se dá od nezralých, polychromních erytrocytů odlišit pomocí barviva selektivního pro ribozómy.

Polychromní erytrocyt: nezralý erytrocyt, vývojové stádium, kdy jsou dosud přítomny ribozómy, takže jej lze odlišit od zralých, normochromních erytrocytů pomocí barviva selektivního pro ribozómy.

1.3 PRINCIP METODY

Zvířata jsou vhodným způsobem exponována testované látce. Pokud se používá kostní dřeň, zvířata se ve vhodnou dobu po působení látky usmrtí, kostní dřeň se izoluje a připraví se preparáty, jež se obarví (1-7). Pokud se používá periferní krev, odebere se ve vhodné době po působení látky a připraví se nátěry, jež se obarví (4) (8) (9) (10). V experimentech, ve kterých se používá periferní krev musí být doba od

poslední expozice do zpracování buněk co nejkratší. V preparátech se zjišťuje přítomnost mikrojader.

1.4 POPIS METODY

1.4.1 Příprava

1.4.1.1 Výběr živočišného druhu

Pokud se používá kostní dřev, doporučují se jako pokusná zvířata myši nebo potkani; může však být použit jiný vhodný savčí druh. Používá-li se periferní krev, doporučují se myši. Lze ovšem použít jakýkoliv vhodný savčí druh za předpokladu, že se u něj slezinou neodstraňují erytrocyty s mikrojádry nebo že u něj byla prokázána dostatečná citlivost vůči látkám, jež způsobují strukturální nebo numerické chromozómové aberace. Používají se běžné laboratorní kmeny mladých zdravých jedinců. Hmotnostní rozdíly by při zahájení studie měly být minimální a u každého pohlaví nemají přesahovat ± 20 % průměrné hmotnosti.

1.4.1.2 Podmínky chovu

Všeobecné podmínky chovu jsou uvedeny ve Všeobecném úvodu v části B.

Vlhkost by měla být 50 – 60 %.

1.4.1.3 Příprava zvířat

Zdraví mladí dospělí jedinci se náhodně rozdělí do kontrolní a experimentální skupiny. Jedinci se jednoznačně označí a po dobu minimálně pěti dní se zvířata aklimatizují v laboratorních podmínkách. Klece je třeba uspořádat tak, aby se minimalizovaly případné vlivy toho, jak a kde jsou klece umístěny.

1.4.1.4 Příprava dávek

Je-li testovaná látka v pevném stavu a je-li to možné, látka se před podáním zvířatům rozpustí nebo se připraví její suspenze ve vhodném rozpouštědle nebo vehikulu. Kapalně testované látky se mohou podávat přímo nebo se před podáváním ředí. Je třeba používat čerstvé preparáty, ledaže údaje o stálosti (stabilitě) prokazují, že skladování ji neovlivní.

1.4.2 Podmínky testu

1.4.2.1 Rozpouštědlo / vehikulum

Rozpouštědlo / vehikulum v používaných dávkách nesmí vyvolávat toxické účinky a nesmí s testovanou látkou chemicky reagovat. Používá-li se nepříliš známé rozpouštědlo, musí být jeho použití podpořeno údaji o kompatibilitě s testovanou látkou. Doporučuje se, aby kde je to možné, bylo na prvním místě použito vodné rozpouštědlo / vehikulum.

1.4.2.2 Kontroly

Do každého testu je třeba pro každé pohlaví zařadit souběžné pozitivní a negativní (rozpouštědlo/vehikulum) kontroly. Je třeba zacházet se zvířaty ve všech skupinách stejně.

U pozitivních kontrol by měla být nalezena mikrojádra *in vivo* při dávkách, kdy lze očekávat jejich detekovatelné zvýšení nad spontánní úroveň. Dávky při pozitivní kontrole se volí tak, aby byly účinky patrné, ale přitom nenapovídaly hodnotiteli totožnost zakódovaného preparátu. Pozitivní kontrolu je možné podávat odlišným způsobem než testovanou látku a vzorek odebírat v jednom časovém intervalu. Kde je to možné, je třeba používat pozitivní kontrolu ze stejné chemické skupiny, jako je testovaná látka. Příklady látek vhodných pro pozitivní kontrolu:

Látka	CAS	EINECS
ethyl methansulfonát	62-50-0	200-536-7
N-ethyl nitrosomočovina	759-73-9	212-072-2
mitomycin C	50-07-7	200-008-6
cyklofosfamid monohydrát cyklofosfamidu	50-18-0 6055-19-2	200-015-4
triethylenmelamin	51-18-3	200-083-5

Negativní kontroly ovlivněné rozpouštědlem nebo vehikulem a zpracované stejným způsobem jako experimentální skupiny měly by být zařazeny do všech časových intervalů zpracování, pokud nejsou k dispozici přijatelné historické údaje o frekvenci buněk s mikrojádry a o interindividuální variabilitě mezi zvířaty. Aplikuje-li se u negativních kontrol pouze jeden odběr vzorků, je nejvhodnější dobou první interval odběru vzorků. Mimoto je třeba použít i neovlivněných kontrol, ledaže existují historické nebo publikované údaje prokazující, že zvolené rozpouštědlo, nebo vehikulum nevyvolává žádné nepříznivé nebo mutagenní účinky.

Používá-li se periferní krev, může být jako souběžná negativní kontrola přijatelný i vzorek odebraný před působením látky, ovšem pouze v rámci krátkodobých studií v periferní krvi (např. 1 – 3 dávky), kde výsledné údaje leží v očekávaném rozmezí historické kontroly.

1.5 POSTUP

1.5.1 Počet a pohlaví zvířat

V každé experimentální a kontrolní skupině musí být minimálně pět analyzovatelných jedinců každého pohlaví (11). Pokud v době, kdy se studie provádí, existují údaje o stejném živočišném druhu a použití stejných způsobů expozice prokazující, že mezi oběma pohlavími nejsou v toxicitě podstatné rozdíly, je testování pouze na jednom pohlaví postačující. Tam, kde humánní expozice chemikáliím může být závislá na pohlaví, jak je tomu například u některých farmaceutických přípravků, provádí se test na zvířatech odpovídajícího pohlaví.

1.5.2 Dávkovací schéma

Nedá se doporučit žádný standardní rozvrh (např. jedna, dvě nebo více dávek v 24-hodinových intervalech). Lze použít delší dávkovací schémata, pokud se v daném experimentu neprokáže pozitivní efekt; v případě negativního výsledku tak dlouho, až se prokáže toxicita, nebo byla použita limitní dávka a podávání pokračovalo až do doby odběru vzorků. Pokud se jedná o objemnou dávku testované látky, může se k usnadnění aplikace rozdělit, například na dvě dávky za den podané v rozmezí nanejvýše několika hodin.

Test se může provádět dvěma způsoby:

- (a) Na zvířata se testovanou látkou působí jednorázově. Vzorky kostní dřeně se odeberou minimálně dvakrát, poprvé ne dříve než po 24 hodinách a celkově ne později než po 48 hodinách od podání látky, s vhodnými intervaly mezi odběry vzorků. Pokud se vzorky odeberou dříve než po 24 hodinách, musí to být odůvodněné. Vzorky periferní krve se odeberou minimálně dvakrát, poprvé ne dříve než po 36 hodinách od podání látky, s vhodnými intervaly po prvním odběru vzorku, celkově však nikoli déle než 72 hodiny. Pokud se v některém časovém intervalu zjistí pozitivní odpověď, není již další odběr zapotřebí.
- (b) Pokud se látka podává dvakrát nebo vícekrát za den (např. dvě nebo více dávek ve 24-hodinových intervalech), odeberou se vzorky v případě kostní dřeně jednou mezi 18 a 24 hodinami po posledním podání látky a v případě periferní krve jednou mezi 36 a 48 hodinami po posledním podání látky (12).

Je-li to relevantní, mohou se mimoto použít i další odběrové intervaly.

1.5.3 Dávkování

Provádí-li se studie ke zjištění rozpětí toxicity, protože nejsou k dispozici žádné vhodné údaje, je třeba ji provádět v téže laboratoři za použití stejného živočišného druhu, kmene, pohlaví a pokusného režimu, jaké se použijí v hlavní studii (13). Při zjištění toxicity se užívají pro první časový interval odběru vzorků tři dávky tak, aby pokrývaly rozmezí od maximální toxicity k toxicitě nízké, nebo nulové. Pro pozdější časový interval odběru vzorků je pak třeba použít jenom nejvyšší dávku. Ta je definována jako dávka vyvolávající takové známky toxicity, že při vyšších dávkách ve stejném režimu podávání by účinky byly letální. Látky, jež v nízkých netoxických dávkách vykazují specifickou biologickou aktivitu, jako jsou hormony nebo mitogeny, mohou představovat výjimky z těchto kritérií pro stanovení dávek a vyhodnocují se případ od případu. Nejvyšší dávka může být také definována jako dávka, která vede k určitým známkám toxicity v kostní dřeni (např. pokles podílu nezralých erytrocytů z celkového počtu erytrocytů v kostní dřeni resp. periferní krvi).

1.5.4 Limitní test

Jestliže test při dávce minimálně 2000 mg/kg hmotnosti v jedné dávce nebo ve dvou dávkách podaných v jeden den nevyvolává žádné pozorovatelné toxické účinky a jestliže se na základě údajů o látkách s podobnou chemickou strukturou neočekává genotoxicita, nemusí být provedena celá studie za použití tří dávkových úrovní. Pro dlouhodobé studie je limitní dávka 2000 mg/kg hmotnosti za den při době trvání do 14 dnů, a 1000 mg/kg hmotnosti při době trvání delší než 14 dnů. Podle očekávané humánní expozice může být zapotřebí použít v limitním testu dávkové úrovně vyšší.

1.5.5 Aplikace látky

Testovaná látka se obvykle vpravuje buď žaludeční sondou, nebo intraperitoneální injekcí. V odůvodněných případech mohou být přijatelné i jiné způsoby expozice. Maximální objem kapaliny, která se dá sondou nebo injekcí najednou vpravit, závisí na velikosti pokusného zvířete a nemá překročit 2 ml/100 g hmotnosti; vyšší dávky musí být zdůvodněné. S výjimkou dráždivých nebo žiravých látek, jež normálně vykazují při vyšších koncentracích horší účinky, je třeba upravit koncentrace látky tak, aby objem byl ve všech dávkových úrovních stejný a minimalizovala se tak objemová variabilita.

1.5.6 Příprava kostní dřeně / krve

Buňky kostní dřeně se obvykle získávají z femuru nebo tibie okamžitě po usmrcení zvířete. Běžným způsobem se kostní dřeň vyjme z femuru nebo tibie, buňky se izolují a obarví zavedenými metodami. Periferní krev se získává z ocasní žíly nebo jiné vhodné cévy. Krevní buňky se okamžitě za vitálního stavu obarví (8) (9) (10), nebo se zhotoví nátěry, které se posléze obarví. Použitím barviva specifického pro DNA (např. akridinové oranže (14) nebo Hoechst 33258 s pyroninem-Y (15)) se mohou eliminovat některé z artefaktů vznikajících při použití barviva, které není DNA specifické. Tato výhoda neznamena, že by se nedala použít běžná barviva (např. Giemsa). Lze použít i další systémy – například kolony se sloupcem celulózy k odstranění buněk s jádrem (16) – pokud tyto metody jsou v laboratoři rutinně používány pro analýzu mikrojader.

1.5.7 Analýza

U každého jedince se stanoví podíl nezralých erytrocytů z celkového počtu erytrocytů (nezralé + zralé). K tomuto účelu se počítá v případě kostní dřeně minimálně 200 erytrocytů a v případě použití periferní krve minimálně 1000 erytrocytů (17). Všechny preparáty (včetně pozitivních i negativních kontrol) se před mikroskopickou analýzou nezávisle zakódují. U každého jedince se vyhodnocuje minimálně 2000 nezralých erytrocytů a zaznamená se počet erytrocytů s mikrojádry. Doplňující informace lze získat tak, že se mikrojádra analyzují ve zralých erytrocytech. Při analýze preparátů nemá být podíl nezralých erytrocytů z celkového počtu erytrocytů menší než 20 % hodnoty v kontrole. Pokud jsou zvířata exponována kontinuálně po dobu čtyř týdnů nebo delší, lze také počet mikrojader vyhodnotit z minimálně 2000 zralých erytrocytů na každého jedince. Možnou alternativou k manuálnímu vyhodnocování jsou systémy automatické analýzy (analýza obrazu a průtoková cytometrická analýza – flow cytometry), pokud jsou zdůvodněny a validovány.

2. ÚDAJE

2.1 ZPRACOVÁNÍ VÝSLEDKŮ

Údaje z jednotlivých zvířat se prezentují v tabelární formě. Experimentální jednotkou je zvíře. U každého jedince se zvlášť zaznamená počet analyzovaných nezralých erytrocytů, počet nezralých erytrocytů s mikrojádry a podíl nezralých erytrocytů ze všech erytrocytů. Pokud byl test prováděn kontinuálně po dobu čtyř týdnů nebo déle, je třeba uvést také údaje o zralých erytrocytech (pokud byly pořizovány). Podíl

nezralých erytrocytů z celkového počtu erytrocytů a případně procento erytrocytů s mikrojádry se udává pro každého jedince. Nejsou-li žádné doklady o tom, že obě pohlaví reagují rozdílně, je možné údaje za obě pohlaví pro statistickou analýzu sloučit.

2.2 VYHODNOCENÍ A INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

Ke zjišťování pozitivního výsledku se používá několik kritérií, například na koncentraci testované látky závislý nárůst počtu buněk s mikrojádry nebo zřetelný nárůst počtu buněk s mikrojádry ve skupině s jednorázovou dávkou při jednom časovém intervalu odběru vzorků. Nejprve je třeba uvážit biologickou významnost výsledků. Při vyhodnocování výsledků testu se mohou použít statistické metody (18) (19). Statistická významnost by však neměla být jediným určujícím faktorem pozitivního výsledku. Nejednoznačné výsledky je třeba vyjasnit dalším testováním, nejlépe za modifikovaných experimentálních podmínek.

Testovaná látka, při jejímž použití výsledky nesplňují výše uvedená kritéria, se v tomto systému považuje za nemutagenní.

Většina experimentů sice poskytuje jednoznačně pozitivní nebo negativní výsledky, v ojedinělých případech však nelze ze získaného souboru dat vyvodit o aktivitě testované látky definitivní závěr. Výsledky mohou být stále nejednoznačné nebo problematické, i když se experiment několikrát opakuje.

Pozitivní výsledky mikronukleus testu ukazují, že látka vyvolává tvorbu mikrojader, jako důsledek chromozómového poškození nebo poškození mitotického aparátu v erytroblastech testovaného zvířecího druhu. Negativní výsledky ukazují, že za daných experimentálních podmínek testovaná látka v kostní dřeni příslušného živočišného druhu nevyvolává vznik mikrojader v nezralých erytrocytech.

Je třeba uvažovat, jaká je pravděpodobnost, že testovaná látka bude široce používána, nebo jakou specifickou cílovou tkáň zasáhne (např. systémová toxicita).

3. ZÁVĚREČNÁ ZPRÁVA

ZPRÁVA O PRŮBĚHU POKUSU

Ve zprávě o průběhu pokusu je třeba uvést tyto informace:

Rozpouštědlo / vehikulum :

- zdůvodnění volby vehikula
- rozpustnost a stabilita testované látky v rozpouštědle/vehikulu, pokud je známa.

Pokusná zvířata:

- použitý živočišný druh/kmen,
- počet, věk a pohlaví jedinců,
- původ, chovné podmínky, strava apod.,
- hmotnost jednotlivých zvířat na počátku testu, včetně hmotnostního rozpětí, průměrů a směrodatných odchylek pro jednotlivé skupiny.

Podmínky pokusu:

- pozitivní a negativní (rozpouštědlo/vehikulum) kontroly,
- údaje ze studie pro určení rozpětí, byla-li provedena,
- zdůvodnění volby velikosti dávky,
- podrobnosti o přípravě testované látky,

- podrobnosti o podávání testované látky,
- zdůvodnění cesty podávání,
- případné metody k ověření, že se látka dostala do celkového oběhu nebo do cílové tkáně,
- případný převod koncentrace látky v potravě/pitné vodě (ppm) na faktickou dávku (mg/kg hmotnosti),
- podrobnosti o kvalitě potravy a vody,
- podrobný popis podávání testované látky a odběru vzorků,
- metody přípravy mikroskopických preparátů,
- metody měření toxicity,
- kritéria pro hodnocení nezralých erytrocytů s mikrojádry,
- počet analyzovaných buněk u každého jedince,
- kritéria, jimiž se studie hodnotí jako pozitivní, negativní nebo nejednoznačná.

Výsledky:

- známky toxicity,
- podíl počtu nezralých erytrocytů k celkovému počtu erytrocytů,
- počet nezralých erytrocytů s mikrojádry pro každého jedince zvlášť,
- průměrný počet $\pm$ směrodatná odchylka nezralých erytrocytů s mikrojádry pro každou skupinu,
- vztah dávka- účinek , je-li to možné,
- použité statistické analýzy a metody,
- údaje ze souběžných a historických negativních kontrol,
- údaje ze souběžných pozitivních kontrol.

Diskuse výsledků.

Závěry. “.

3. Metody B.13. a B.14. se nahrazují metodou B.13/14, která zní:

„B.13/14. MUTAGENITA - TEST REVERZNÍCH MUTACÍ U BAKTERIÍ

1. METODA

Metoda je replikací OECD TG 471, Bacterial Reverse Mutation Test (1997).

1.1 ÚVOD

Při bakteriálním testu reverzních mutací se používají k detekci genových mutací kmeny *Salmonella typhimurium* (auxotrofní ve vztahu k aminokyselině histidin) a kmeny *Escherichia coli* (auxotrofní ve vztahu k aminokyselině tryptofan). Pomocí uvedených systémů lze detekovat genové mutace vzniklé mechanismem substituce nebo delece jednoho nebo několika nukleotidů v chromozómu indikátorových bakteriálních kmenů (1) (2) (3). Princip bakteriálního testu reverzních mutací spočívá v tom, že se zjišťují mutace, které zpětně vracejí mutace přítomné v testovacím

kmenu do původního stavu a obnovuje se funkční schopnost bakterie syntetizovat určitou základní aminokyselinu. Takto změněná bakteriální buňka je detekována na základě své schopnosti růst za nepřítomnosti aminokyseliny, kterou vyžaduje mateřský zkušební kmen.

Genové mutace jsou u člověka příčinou řady genetických nemocí a existují přesvědčivé doklady toho, že genové mutace v onkogenech a tumorově supresorových genech somatických buněk hrají u člověka a pokusných zvířat roli při vzniku nádorů. Bakteriální test na reverzní mutace je rychlý, levný a relativně jednoduchý. Řada testovacích kmenů se vyznačuje charakteristikami, díky nimž jsou citlivější pro detekci mutací, včetně citlivých sekvencí DNA v místech reverze, zvýšené propustnosti buněk pro velké molekuly a eliminace systémů reparace DNA či posílení takových procesů reparace DNA, jež jsou náchylné k chybám. Specifita testovacích kmenů umožňuje získat některé užitečné informace o typech mutací, jež jsou vyvolány genotoxickými látkami. Pro bakteriální testy reverzních mutací je k dispozici velmi rozsáhlá databáze výsledků pro širokou škálu struktur a byly vypracovány osvědčené metody pro testování chemikálií o různých fyzikálně-chemických vlastnostech, včetně chemikálií těkavých.

1.2 DEFINICE

Test reverzních mutací s použitím kmenů *Salmonella typhimurium* nebo *Escherichia coli* slouží ke zjištění mutací v kmeni závislém na určité aminokyselině (histidinu resp. tryptofanu), jež vedou ke vzniku kmene, který je na dodávce aminokyseliny zvenku nezávislý.

Mutageny vyvolávající substituci páru bází jsou látky způsobující změnu bází v DNA. Při reverzním testu může k takové změně dojít na místě původní mutace nebo na jiném místě bakteriálního genomu.

Frameshift mutageny (mutageny vyvolávající posunové mutace) jsou látky, jež způsobují přidání nebo odebrání jednoho nebo více párů bází v DNA, čímž se mění čtecí rámec v RNA.

1.3 VÝCHOZÍ ÚVAHY

V bakteriálním testu se využívají prokaryotické buňky, které se od savčích buněk liší v příjmu látek metabolismu, chromozomální struktuře a procesech opravy DNA. Testy *in vitro* obecně vyžadují exogenní zdroj metabolické aktivace. Systémy metabolické aktivace *in vitro* ovšem nedokáží dokonale imitovat savčí podmínky *in vivo*, takže test neposkytuje přímé informace o mutagenní a karcinogenní potenci dané látky v organismech savců.

Bakteriální test reverzních mutací se běžně používá jako prvotní screening genotoxické aktivity a zvláště aktivity vyvolávající genové mutace. Pomocí rozsáhlé databáze se prokázalo, že mnohé chemikálie, které jsou v tomto testu pozitivní, vykazují také v jiných testech mutagenní aktivitu. Existují ovšem i příklady mutagenních látek, jež se tímto testem neodhalí; důvodem tohoto nedostatku může být specifická povaha vyhodnocovaných veličin, rozdíly v metabolické aktivaci nebo rozdíly v biologické dostupnosti. Na druhé straně faktory, jež citlivost bakteriálního testu reverzní mutace zvyšují, mohou vést k tomu, že se mutagenní aktivita testované látky přecení.

Bakteriální test reverzních mutací může být nevhodný pro určité třídy chemických látek, jakými jsou například některé silně baktericidní sloučeniny (kupříkladu určitá antibiotika) a látky, o nichž se předpokládá nebo ví, že specificky narušují replikační systém savčích buněk (například některé inhibitory topoizomerázy nebo některá analoga nukleozidů); v takovém případě mohou být vhodnější testy na mutace u savců.

Mnohé sloučeniny, jež jsou při tomto testu pozitivní, jsou skutečně karcinogenní pro savce, ovšem korelace není absolutní; závisí na chemické třídě, a existují karcinogeny, které tímto testem odhaleny nejsou, protože působí jiným, negenotoxickým mechanismem nebo mechanismem, který v bakteriálních buňkách neprobíhá.

1.4 PRINCIP METODY

Suspenze bakteriálních buněk se vystaví působení testované látky za přítomnosti a za nepřítomnosti exogenního systému metabolické aktivace. Při klasické miskové metodě "plate incorporation" se suspenze smísí s vrchním agarem a vylije na misky s minimální živnou půdou. Při preinkubační metodě se pokusná směs inkubuje a smísí s vrchním agarem a až potom se očkuje na minimální živnou půdu. Při obou metodách se dva až tři dny po inkubaci revertantní kolonie spočítají a výsledek se porovná s počtem spontánně revertujících kolonií na kontrolních miskách s rozpouštědlem.

Je popsáno několik postupů pro provedení testu. Z nich nejběžnější jsou klasická misková metoda ["plate incorporation"] (1) (2) (3) (4), preinkubační metoda (2) (3) (5) (6) (7) (8), fluktuační metoda (9) (10) a suspenzní metoda (11). Jsou také popsány jejich modifikace pro testování plynů nebo par (12).

Postupy popsané v rámci metody se týkají hlavně metody plate incorporation a metody preinkubační. Obě tyto metody jsou přijatelné pro experimenty jak s metabolickou aktivací, tak bez ní. Některé látky se detekují účinněji preinkubační metodou; jedná se o chemické třídy, kam spadají alifatické nitrosaminy s krátkým řetězcem, dvojmocné kovy, aldehydy, azobarviva a diazosloučeniny, pyrrolizidinové alkaloidy, alylové sloučeniny a nitrosloučeniny (3). Také bylo zjištěno, že existují určité třídy mutagenů, které se pomocí uvedených standardních procedur vždy neodhalí. Na ty je třeba pohlížet jako na "speciální případy", k jejichž detekci je třeba použít jiných metod. Byly identifikovány následující "speciální případy" (spolu s příklady postupů, které se dají pro jejich detekci použít): azobarviva a diazosloučeniny (3) (5) (6) (13), plyny a těkavé chemikálie (12) (14) (15) (16) a glykosidy (17) (18). Odchylky od standardního postupu je třeba vědecky zdůvodnit.

1.5 POPIS METODY

1.5.1 Příprava

1.5.1.1 Bakterie

Čerstvé bakteriální kultury se vypěstují do pozdního exponenciálního nebo počátečního stacionárního stadia růstu (zhruba 10^9 buněk/ml). Kultury v pozdním stacionárním stadiu se nepoužívají. Důležité je, aby kultury použité pro experiment obsahovaly vysoký titr životaschopných bakterií. Titr se dá prokázat buď

z historických údajů růstových křivek, nebo v jednotlivých testech stanovením počtu životaschopných buněk očkovaním na miskách.

Doporučená inkubační teplota činí 37°C.

Použije se minimálně pět bakteriálních kmenů, které budou zahrnovat čtyři kmeny *S. typhimurium* (TA 1535; TA 1537 nebo TA97a nebo TA97; TA98; a TA100); u nichž byla prokázána spolehlivost a reprodukovatelnost výsledků mezi různými laboratořemi. Tyto čtyři kmeny *S. typhimurium* mají na primárním reverzním místě páry bází GC a je známo, že nemusejí detekovat určité oxidační mutageny, látky vyvolávající křížové vazby a hydraziny. Tyto látky se dají detekovat pomocí kmenů *E. coli* WP2 nebo *S. typhimurium* TA102 (19), které mají na primárním reverzním místě pár bází AT. Proto je doporučená kombinace kmenů tato:

- *S. typhimurium* TA1535 a
- *S. typhimurium* TA1537 nebo TA97 nebo TA97a a
- *S. typhimurium* TA98 a
- *S. typhimurium* TA100 a
- *E. coli* WP2 uvrA nebo *E. coli* WP2 uvrA (pKM101) nebo *S. typhimurium* TA102.

K detekci mutagenů vytvářejících křížové vazby může být nejvhodnější použit TA102 nebo přidat DNA reparačně proficientní kmen *E. coli* (např. *E. coli* WP2 nebo *E. coli* WP2 (pKM101)).

Je třeba použít zavedených postupů přípravy zásobní kultury, ověření markeru a uchovávání. Pro každý zmrazený preparát zásobní kultury je třeba prokázat závislost na aminokyselině nutné pro růst (histidin v případě kmenů *S. typhimurium*, tryptofan v případě kmenů *E. coli*). Podobně je třeba zkontrolovat i další fenotypické charakteristiky, a to: přítomnost či nepřítomnost R-faktor plazmidů tam, kde to přichází v úvahu (např. rezistence vůči ampicilinu u kmenů TA98, TA100 a TA97a nebo TA97, WP2 uvrA (pKM101) a rezistence vůči ampicilinu + tetracyklinu u kmene TA 102); přítomnost charakteristických mutací (tj. rfa mutace u *S. typhimurium* pomocí citlivosti vůči krystalové violeti a uvrA mutace u *E. coli* nebo uvrB mutace u *S. typhimurium* pomocí citlivosti na ultrafialové záření) (2) (3). Použité kmeny mají mít počet spontánně revertujících kolonií ve frekvenčním rozmezí očekávaném podle historických kontrolních dat dané laboratoře a pokud možno i v rozmezí uvedeném v literatuře.

1.5.1.2 Médium

Použije se vhodný minimální agar (např. s Vogelovým-Bonnerovým minimálním médiem E a glukózou) a vrchní agar obsahující histidin a biotin nebo tryptofan umožňující několik dělení buněk (1) (2) (9).

1.5.1.3 Metabolická aktivace

Bakterie se působení testované látky vystaví jak za přítomnosti, tak za nepřítomnosti vhodného systému metabolické aktivace. Nejčastěji se používá kofaktorem suplementovaná post-mitochondriální frakce (S9) připravená z jater hlodavců po indukci enzymů látkami jako je Aroclor 1254 (1) (2) nebo kombinace fenobarbitalu a β-naftoflavonu (18) (20) (21). Post-mitochondriální frakce se obvykle používá v koncentracích mezi 5 a 30 % v/v ve směsi S9. Volba a podmínky metabolického aktivčního systému mohou záviset na třídě testované chemikálie. V některých

případech může být vhodné použít post-mitochondriální frakci v několika koncentracích. U azobarviv a diazosloučenin může být vhodnější použít redukční systém metabolické aktivace (6) (13).

1.5.1.4 Testovaná látka / příprava

Pevné látky se před působením na bakterie rozpustí nebo se připraví jejich suspenze ve vhodném rozpouštědle nebo vehikulu a případně se zředí. Kapalně látky se mohou do pokusného systému přidávat přímo nebo se předtím ředí. Je třeba používat čerstvé preparáty, ledaže údaje o stabilitě prokazují, že jejich delší skladování je přijatelné.

1.5.2 Podmínky testu

1.5.2.1 Pokusné kmeny (viz 1.5.1.1.)

1.5.2.2 Koncentrace

Ke kritériím, která je třeba vzít v úvahu při stanovení nejvyššího použitého množství testované látky, patří cytotoxicita a rozpustnost v konečné směsi, která se k působení použije.

Může být účelné stanovit toxicitu a nerozpustnost v předběžném experimentu. Cytotoxicita se dá zjistit snížením počtu revertantních kolonií, vymizením nebo zmenšením růstu na pozadí nebo pomocí stupně přežití pokusných kultur. Za přítomnosti metabolického aktivačního systému se může cytotoxicita změnit. Nerozpustnost se posuzuje podle srážení v konečné směsi za skutečných pokusných podmínek, viditelného i pouhým okem.

Doporučená maximální pokusná koncentrace je u rozpustných necytotoxických látek 5 mg/misku resp. 5 μ l/misku. U necytotoxických látek, jež v těchto koncentracích nejsou rozpustné, by jedna nebo několik koncentrací mělo být v konečné pokusné směsi nerozpustných. Testované látky, jež jsou cytotoxické již za koncentrací nižších než 5 mg/misku resp. 5 μ l/misku, se testují až do cytotoxické koncentrace. Sraženina nesmí rušit při vyhodnocování.

Používá se minimálně pět různých analyzovatelných koncentrací se zhruba půl-logaritmickým intervalem (tj. $\sqrt{10}$) mezi jednotlivými body v prvotním experimentu. Zkoumá-li se koncentrační závislost, může být vhodný interval menší. Testování za koncentrací vyšších než 5 mg/misku resp. 5 μ l/misku přichází v úvahu, hodnotí-li se látka obsahující podstatné množství potenciálně mutagenních nečistot.

1.5.2.3 Negativní a pozitivní kontroly

Každý test musí zahrnovat i souběžnou kmenově specifickou pozitivní a negativní (rozpouštědlo nebo vehikulum) kontrolu, jak s metabolickou aktivací, tak bez ní. Pro pozitivní kontrolu se volí takové koncentrace, jež prokazují efektivnost daného testu.

U testů s metabolickým aktivačním systémem se referenční látka pro pozitivní kontrolu volí podle použitého typu bakteriálního kmene.

Příklady látek, jež jsou vhodné pro pozitivní kontrolu v testech s metabolickou aktivací, uvádí tabulka:

Látka	CAS	EINECS
9,10-dimethylantracen	781-43-1	212-308-4
7,12-dimethylbenz[a]antracen	57-97-6	200-359-5
benz[a]pyren	50-32-8	200-028-5
2-aminoantracen	613-13-8	210-330-9
cyklofosfamid monohydrát cyklofosfamidu	50-18-0 6055-19-2	200-015-4

Následující látka je vhodnou pozitivní kontrolou při použití metabolické aktivace reduktázami:

Látka	CAS	EINECS
Kongo červen	573-58-0	209-358-4

2-aminoantracen se nepoužívá jako jediný indikátor účinnosti směsi S9. Pokud se 2-aminoantracen použije, je třeba každou šarži S9 charakterizovat také mutagenem, který vyžaduje metabolickou aktivaci mikrosomálními enzymy, např. benz[a]pyrenem, dimethylbenzantracem.

Příklady látek, jež jsou vhodné pro kmenově specifickou pozitivní kontrolu v testech bez exogenního systému metabolické aktivace, uvádí tato tabulka:

Látka	CAS	EINECS	
azid sodný	26628-22-8	247-852-1	TA 1535 a TA 100
2-nitrofluoren	607-57-8	210-138-5	TA 98
9-aminoakridin	90-45-9	201-995-6	TA 1537, TA 97 a TA 97a
ICR 191	17070-45-0	241-129-4	TA 1537, TA 97 a TA 97a
kumen-hydroperoxid	80-15-9	201-254-7	TA 102
mitomycin C	50-07-7	200-008-6	WP2 uvrA a TA 102
N-ethyl-N-nitro-N-nitrosoguanidin	70-25-7	200-730-1	WP2, WP2uvrA a WP2uvrA(pKM101)
4-nitrochinolin-1-oxid	56-57-5	200-281-1	WP2, WP2uvrA a WP2uvrA(pKM101)
Furylfuramid (AF2)	3688-53-7		kmeny obsahující plazmidy

K pozitivní kontrole lze použít i jiné vhodné referenční látky. Jsou-li dostupné, je třeba uvážit použití chemikálií se vztahem k chemické třídě.

Je třeba použít i negativní kontroly sestávající z rozpouštědla nebo vehikula samotného, bez testované látky, se kterými se jinak zachází stejně jako při použití testované látky. Mimoto se použijí i negativní kontroly bez ovlivnění testovanou látkou, ledaže existují historické kontrolní údaje prokazující, že zvolené rozpouštědlo nevyvolává žádné rušivé či mutagenní účinky.

1.5.3 Postup

Při klasické miskové metodě (1) (2) (3) (4) bez metabolické aktivace se obvykle smísí 0,05 nebo 0,1 ml testovaného roztoku, 0,1 ml čerstvé bakteriální kultury (obsahující zhruba 10^8 životaschopných buněk) a 0,5 ml sterilního pufru a 2,0 ml vrchního agaru. V testech s metabolickou aktivací se obvykle mísí 0,5 ml metabolické aktivační směsi obsahující přiměřené množství post-mitochondriální frakce (v rozmezí 5 – 30 % v/v v metabolické aktivační směsi) s 2,0 ml vrchního agaru společně s bakteriemi a testovanou látkou /testovaným roztokem. Obsah každé zkumavky se promísí a nalije na povrch misky s minimálním agarem. Vrchní agar se nechá před inkubací ztuhnout.

Při preinkubační metodě (2) (3) (5) (6) se testovaná látka / testovaný roztok nechá preinkubovat s pokusným kmenem (obsahujícím zhruba 10^8 životaschopných buněk) a sterilním pufrem nebo metabolickým aktivačním systémem (0,5 ml) obvykle po dobu 20 min nebo déle při 30 – 37 °C; potom se smísí s vrchním agarem a nalije na misku s minimálním agarem. Obvykle se mísí 0,05 nebo 0,1 ml testované látky / testovaného roztoku, 0,1 ml bakterií a 0,5 ml směsi S9 nebo sterilního pufru s 2,0 ml vrchního agaru. Zkumavky se během preinkubace provzdušňují třepáním.

Pro adekvátní odhad variací se pro každou dávku očkují tři misky. Duplicitní očkování je přijatelné, je-li vědecky zdůvodněno. Dojde-li náhodně ke ztrátě misky, nemusí to test nutně znehodnotit.

Plynné nebo těkavé látky se testují za použití vhodných postupů, například v zatavených nádobách (12) (14) (15) (16).

1.5.4 Inkubace

Všechny misky v rámci daného testu se inkubují při teplotě 37°C po dobu 48 – 72 hodin, načež se spočítají revertantní kolonie na každé misce.

2. ÚDAJE

2.1 ZPRACOVÁNÍ VÝSLEDKŮ

Údaje se prezentují jako počet revertantních kolonií na jednu misku. Rovněž se uvede počet revertantních kolonií jak z negativní kontroly (rozpouštědlo, popřípadě kontrola bez působení, byla-li použita), tak z kontroly pozitivní. Pro testovanou látku i pro pozitivní a negativní kontrolu (resp. bez působení rozpouštědlo) se uvedou počty pro jednotlivé misky a průměrný počet revertantních kolonií na jednu misku včetně směrodatné odchylky.

Verifikace zjevně pozitivní reakce se nepožaduje. Nejednoznačné výsledky se objasňují dalším testováním, nejlépe za modifikovaných experimentálních podmínek. Negativní výsledky se musejí potvrdit případ od případu. Pokud se potvrzení negativních výsledků nepovažuje za nutné, je třeba to zdůvodnit. V následných experimentech je třeba zvážit modifikaci studijních parametrů tak, aby se rozšířil rozsah posuzovaných podmínek. Ke studijním parametrům, které se dají modifikovat, patří rozdíly mezi koncentracemi, metoda působení („plate incorporation“ nebo preinkubace v tekutém prostředí) a podmínky metabolické aktivace.

2.2 VYHODNOCENÍ A INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

Ke stanovení pozitivního výsledku existuje několik kritérií, například dávkově závislý nárůst ve sledovaném rozmezí a/nebo reprodukovatelný nárůst počtu revertantních kolonií na jednu misku při jedné nebo více koncentracích u minimálně jednoho kmene s metabolickým aktivačním systémem nebo bez něj (23). Jako první se uvažuje biologická relevance výsledků. Jako pomůcku při vyhodnocování výsledků testu je možno využít statistické metody (24), statistická významnost by však neměla být jediným určujícím faktorem pro pozitivní reakci.

Testovaná látka, jejíž výsledky výše uvedená kritéria nesplňují, se v tomto testu považuje za nemutagenní.

Většina experimentů sice poskytuje jednoznačně pozitivní nebo negativní výsledky, v ojedinělých případech však nelze ze získaného souboru dat vyvodit o aktivitě testované látky definitivní závěr. Výsledky mohou být stále nejednoznačné nebo problematické, i když se experiment několikrát opakuje.

Pozitivní výsledky bakteriálního testu na reverzní mutace ukazují, že látka vyvolává genové mutace typu substitucí bází nebo posunových mutací v genomu *Salmonella typhimurium* resp. *Escherichia coli*. Negativní výsledky ukazují, že za daných zkušebních podmínek není testovaná látka ve zkušebním druhu mutagenní.

3. ZÁVĚREČNÁ ZPRÁVA

ZPRÁVA O PRŮBĚHU POKUSU

Ve zprávě o průběhu pokusu je třeba uvést tyto informace:

Rozpouštědlo/vehikulum:

- zdůvodnění volby rozpouštědla,
- rozpustnost a stabilita testované látky v tomto rozpouštědle, pokud je známa.

Kmeny:

- použité kmeny,
- počet buněk v kultuře,
- charakteristika kmene.,

Podmínky pokusu:

- množství testované látky na jednu misku (v mg nebo μl) se zdůvodněním volby dávky a počtu misek pro jednu koncentraci,
- použitá média,
- typ a složení systému metabolické aktivace (včetně kritérií akceptovatelnosti),
- postupy působení (zpracování).

Výsledky:

- známky toxicity,
- známky srážení,
- počty na jednotlivých miskách,
- průměrný počet revertantních kolonií na jednu misku a směrodatná odchylka,
- vztah dávka-odpověď, je-li to možné,
- statistické analýzy, byly-li provedeny,
- údaje ze souběžných negativních (rozpouštědlo/vehikulum) a pozitivních kontrol včetně rozpětí, průměrů a směrodatných odchylek,

- údaje z historických negativních (rozpouštědlo/vehikulum) a pozitivních kontrol včetně rozpětí, průměrů a směrodatných odchylek.

Diskuse výsledků.

Závěry.“.

4. Metoda B.17 zní:

„B.17. MUTAGENITA - TEST GENOVÝCH MUTACÍ V SAVČÍCH BUŇKÁCH *IN VITRO*

1. METODA

Metoda je replikací OECD TG 476, *In Vitro* Mammalian Cell Gene Mutation Test (1997).

1.1 ÚVOD

Test genových mutací *in vitro* se dá používat ke zjišťování genových mutací vyvolaných chemickými látkami. Mezi vhodné buněčné linie patří myší lymfomové buňky L5178Y, linie CHO, CHO-AS52 a V79 buněk čínského křečka a lidské lymfoblastoidní buňky TK6 (1). U těchto buněčných linií se nejčastěji jako konečný genetický efekt zjišťují mutace v thymidinkináze (TK) a hypoxanthin-guanin fosforibosyltransferáze (HPRT) a v transgenní xanthin-guanin fosforibosyltransferáze (XPRT). Testy mutací v TK, HPRT a XPRT se zjišťují různá spektra genetických změn. Autosomální lokalizace TK a XPRT může umožnit detekci i takové genetické změny (např. velké delece), které se na lokusu HPRT chromozomu X nezjistí (2) (3) (4) (5) (6).

K testu na genové mutace v savcích buňkách *in vitro* se dají použít kultury stabilizovaných buněčných linií nebo buněčných kmenů. Při volbě buněk se berou v úvahu růstové schopnosti dané kultury a stabilita frekvence spontánních mutací.

Testy *in vitro* obecně vyžadují exogenní zdroj metabolické aktivace. Takový systém metabolické aktivace nedokáže imitovat savčí podmínky *in vivo* dokonale. Je třeba vzniku takových podmínek, za kterých by výsledky neodrážely vlastní mutagenitu. K pozitivním výsledkům, jež nejsou důsledkem vlastní mutagenity může dojít v důsledku změny pH, osmolality či vysoké cytotoxicity (7).

Tento test se používá ke screeningu možných savcích mutagenů a karcinogenů. Řada sloučenin, které jsou v tomto testu pozitivní, jsou savčími karcinogeny, neexistuje však dokonalá korelace mezi tímto testem a karcinogenitou. Tato korelace závisí na druhu chemické látky a existuje stále více dokladů toho, že existují karcinogeny, které se tímto testem nezjistí, protože zřejmě působí nějakým jiným, negenotoxickým mechanismem či mechanismem, který v bakteriálních buňkách nepůsobí (6).

1.2 DEFINICE

Forward mutace: genová mutace výchozího typu mutantní formy, jež vede ke změně nebo ztrátě enzymatické aktivity kódovaného proteinu.

Mutageny vyvolávající substituci páru bází: látky způsobující substituci jednoho nebo několika páru bází v DNA.

Frameshift mutageny (mutageny vyvolávající posunové mutace): látky, jež způsobují přidání nebo ztrátu jednoho nebo více párů bází v DNA.

Doba fenotypické exprese: období, během kterého jsou z nově zmutovaných buněk odstraňovány nezměněné genové produkty.

Frekvence mutací: počet pozorovaných mutovaných buněk dělený počtem živých buněk.

Relativní celkový růst: nárůst počtu buněk v čase v porovnání s kontrolní populací buněk; vypočítává se jako součin poměrného suspenzního růstu (v porovnání s negativní kontrolou) a poměrné klonovací účinnosti cloning efficiency (v porovnání s negativní kontrolou).

Relativní suspenzní růst: poměrný nárůst počtu buněk během období exprese v porovnání s negativní kontrolou.

Životnost (viabilita): klonovací účinnost (cloning efficiency) ovlivněných buněk v době inokulace na miskách v selekčních podmínkách po období exprese.

Přežití: klonovací účinnost (cloning efficiency) ovlivněných buněk inokulovaných na miskách na konci působení látky; vyjadřuje se obvykle v porovnání s přežitím kontrolní buněčné populace.

1.3 PRINCIP METODY

Buňky, deficientní na thymidinkinázu (TK) v důsledku mutace $TK^{+/-} \rightarrow TK^{-/-}$, jsou rezistentní vůči cytotoxickému působení pyrimidinového analogu trifluorthymidinu (TFT). Buňky produkující thymidinkinázu jsou vůči TFT citlivé, což způsobuje inhibici buněčného metabolismu a zastavuje další buněčné dělení. Za přítomnosti TFT proto mohou proliferovat mutované buňky, zatímco normální buňky, obsahující thymidinkinázu, proliferovat nemohou. Podobně jsou buňky s deficientní HPRT nebo XPRT selektivně rezistentní vůči 6-thioguaninu (TG) nebo 8-azaguaninu (AG). Pokud je analog báze nebo sloučenina příbuzná se selekčním činidlem analyzována v některém testu na genové mutace v savčích buňkách, je třeba vlastnosti testované látky bedlivě zvážit. Například je třeba prozkoumat každé podezření na selekční toxicitu testované látky vůči buňkám s mutacemi i bez nich. Testují-li se tedy chemikálie strukturně příbuzné se selekčním činidlem, je třeba potvrdit, že je selekční systém/činidlo vhodné (8).

Buňky v suspenzi nebo jednovrstevné kultuře se po vhodné dobu vystaví působení testované látky s metabolickou aktivací i bez ní a kultivují se ke stanovení cytotoxicity a k detekci fenotypické exprese před výběrem mutantů (9) (10) (11) (12) (13). Cytotoxicita se stanoví obvykle hodnocením relativní klonovací účinnosti (přežití) (cloning efficiency) nebo relativního celkového nárůstu kultur po působení látky. Kultury se ponechají v růstovém médiu po dostatečnou dobu, charakteristickou pro daný lokus a typ buňky, aby mohlo dojít k co nejoptimálnější fenotypické expresi indukovaných mutací. Frekvence mutantů se stanoví inokulací známého počtu buněk

v médiu obsahujícím selekční činidlo pro detekci mutovaných buněk a v médiu bez tohoto činidla, ke stanovení klonovací účinnosti (cloning efficiency), (životnosti). Po vhodné inkubační době se kolonie spočítají. Mutační frekvence se odvodí z počtu kolonií mutovaných buněk v selekčním médiu a z počtu kolonií v neselekčním médiu.

1.4 POPIS METODY

1.4.1 Příprava

1.4.1.1 Buňky

Dá se použít celá řada buněčných typů, včetně subklonů buněk L5171Y, CHO, CHO-AS52, V79 a TK6. U buněčných typů používaných v tomto testu musí být prokázána citlivost vůči chemickým mutagenům, vysoká klonovací účinnost (cloning efficiency) a stabilní frekvence spontánních mutací. U buněk se kontroluje, zda nejsou kontaminovány mykoplazmaty; infikované buňky se použít nesmějí.

Test je třeba naplánovat tak, aby měl zvolenou citlivost a efektivnost (power). Počet buněk, počet kultur a koncentrace testované látky musí těmto definovaným parametrům vyhovovat (14). Minimální počet vitálních buněk, které přežijí expozici a použijí se v jednotlivých stádiích testu, je dán frekvencí spontánních mutací. Obecným vodítkem je, že počet buněk má být minimálně desetinásobkem převrácené hodnoty frekvence spontánních mutací. Doporučuje se však použít alespoň 10^6 buněk. Měly by být k dispozici adekvátní historické údaje, kterými by se prokázala bezproblémové zvládnutí testu.

1.4.1.2 Média a kultivační podmínky

Je třeba použít vhodná kultivační média a inkubační podmínky (kultivační nádoby, koncentraci CO_2 , teplotu a vlhkost). Média se pro test volí podle selekčního systému a typu buňky. Zvláště důležité je, aby podmínky kultivace zajišťovaly optimální růst buněk během expresní periody a schopnost jak mutovaných, tak nemutovaných buněk tvořit kolonie.

1.4.1.3 Příprava kultur

Buňky se namnoží ze zásobních kultur, inokulují do kultivačního média a inkubují při teplotě 37°C . Před provedením testu, je třeba kultury zbavit dříve vzniklých mutovaných buněk.

1.4.1.4 Metabolická aktivace

Na buňky se testovanou látkou působí v přítomnosti i v nepřítomnosti vhodného metabolického aktivačního systému. Nejobvyklejší je kofaktory suplementovaná mitochondriální frakce (S9) připravená z jater hlodavců, ovlivněná činidly indukujícími enzymy jako je Aroclor 1254 (15) (16) (17) (18), nebo směs fenobarbitalu a β -naftoflavonu (19) (20).

Konečná koncentrace mitochondriální frakce v médiu činí obvykle 1 – 10 % v/v. Aktivita metabolického aktivačního systému bude záviset na tom, jakého typu je testovaná chemikálie. V některých případech je vhodné použít mitochondriální frakci v několika koncentracích.

Pro účely endogenní aktivace mohou být použity i geneticky modifikované buněčné linie exprimující specifické aktivační enzymy. Výběr buněčných linií by měl být vědecky ověřen (např. vztahem isoenzymu cytochromu P450 k metabolismu testované látky).

1.4.1.5 Příprava testované látky

Je-li testovaná látka v pevném stavu, látka se před působením na buňky rozpustí nebo se připraví její suspenze ve vhodném rozpouštědle a případně naředí. Kapalně testované látky se mohou do systému přidávat přímo nebo se předtím ředí. Je třeba používat čerstvé preparáty, ledaže údaje o jejich stabilitě prokazují, že delší skladování neovlivňuje jejich vlastnosti.

1.4.2 Podmínky testu

1.4.2.1 Rozpouštědlo / vehikulum

U zvoleného rozpouštědla nesmí existovat podezření, že by mohlo s testovanou látkou chemicky reagovat, a nesmí narušovat přežívání buněk a aktivitu S9. Používá-li se méně známé rozpouštědlo musí být podpořeno referencemi prokazujícími jeho kompatibilitu. Doporučuje se, aby všude tam, kde je to možné, bylo na prvním místě zvažováno použití jako rozpouštědla vody. Je-li testovaná látka ve vodě nestálá, musí být použité organické rozpouštědlo zcela bezvodé. Voda se dá odstranit molekulárním sítem.

1.4.2.2 Koncentrace

Mezi kritéria, jež se uvažují při stanovování nejvyšší koncentrace, patří cytotoxicita, rozpustnost v systému a změny pH resp. osmolality.

Cytotoxicita se stanoví s metabolickou aktivací i bez ní v hlavním experimentu, přičemž se použije vhodné indikace buněčné integrity a růstu buněk, jako je relativní klonovací účinnost (přežití) nebo relativní celkový růst. Je vhodné stanovit cytotoxicitu a rozpustnost v předběžných experimentech.

Použijí se minimálně čtyři analyzovatelné koncentrace. Dochází-li k cytotoxicitě, musí tyto koncentrace pokrývat rozsah od maximální do nízké nebo nulové toxicity. To obvykle znamená, že se jednotlivé koncentrace nebudou lišit více než násobkem, který leží mezi hodnotami 2 a $\sqrt{10}$. Vychází-li maximální koncentrace z cytotoxicity, měla by vést k relativnímu přežití (relativní klonovací účinnosti) nebo relativnímu celkovému růstu v 10–20 %, ne však méně než 10 %. U relativně netoxických látek by maximální expoziční dávka měla být nejnižší z hodnot 5 mg/ml, 5 μ l/ml a 1,01 M.

U relativně nerozpustných látek, jež jsou netoxické v koncentracích nižších než je koncentrace při které se již látka nerozpouští, má být nejvyšší použitá koncentrace vyšší než je mez rozpustnosti ve finálním kultivačním médiu na konci kultivace s testovanou látkou. Může být účelné vyhodnotit rozpustnost na začátku a na konci působení, jelikož se rozpustnost může během expozice v důsledku přítomnosti buněk, S9, séra atd. měnit. Nerozpustnost se dá zjistit i prostým okem.. Sraženina nesmí být na překážku při hodnocení buněk.

1.4.2.3 Kontroly

V rámci každého experimentu se musejí provést i souběžné pozitivní a negativní (rozpouštědlo, vehikulum) kontroly, a to jak s metabolickou aktivací, tak bez ní. Pokud se aplikuje metabolická aktivace, musí být pozitivní kontrola látka vyžadující metabolickou aktivaci k vyvolání mutagenního účinku. Mezi látky pro pozitivní kontrolu patří například:

Metabolická aktivace	Lokus	Látka	CAS	EINECS
Ne	HPRT	ethyl methansulfonát	62-50-0	200-536-7
		ethyl nitrosomočovina	759-73-9	212-072-2
	TK (malé a velké kolonie)	methyl methansulfonát	66-27-3	200-625-0
	XPRT	ethyl methansulfonát	62-50-0	200-536-7
		ethyl nitrosomočovina	759-73-9	212-072-2
Ano	HPRT	3-methylcholantren	56-49-5	200-276-4
		N-nitrosodimethylamin	62-75-9	200-549-8
		7,12-dimethylbenzantracen	57-97-6	200-359-5
	TK (malé a velké kolonie)	cyklofosfamid	50-18-0	200-015-4
		monohydrát cyklofosfamidu	6055-19-2	
		benzo[a]pyren	50-32-8	200-028-5
		3-methylcholantren	56-49-5	200-276-5
	XPRT	N-nitrosodimethylamin (pro vysoké koncentrace S-9)	62-75-9	200-549-8
		benzo[a]pyren	50-32-8	200-028-5

Pro pozitivní kontrolu se mohou použít i jiné vhodné látky; jestliže má například laboratoř historickou údaje o 5-brom-2'-deoxyuridinu (CAS 59-14-3, číslo EINECS 200-415-9), lze použít i tuto referenční látku. Tam, kde je to možné, je vhodné použít pro pozitivní kontrolu látku ze stejné chemické skupiny.

Pro každý časový interval sklizení kultur je třeba použít i negativní kontrolu, ve které se používá rozpouštědlo nebo vehikulum v kultivačním médiu, zpracované stejným způsobem jako experimentální kultury. Mimoto je rovněž třeba zařadit kontrolu bez jakéhokoliv ovlivnění, ledaže existují historické údaje prokazující, že zvolené rozpouštědlo/vehikulum nevykazuje žádné pro buňky nepříznivé či mutagenní účinky.

1.4.3 Postup

1.4.3.1 Expozice testovanou látkou

Na proliferující buňky se působí testovanou látkou jak s metabolickou aktivací, tak bez ní. Expozice probíhá po vhodné dobu (obvykle je účinná doba 3–6 hodin). Doba expozice může přesáhnout jeden nebo více buněčných cyklů.

Pro každou koncentraci se používají kultury duplicitní nebo jenom jedna. Používá-li se jenom jedna kultura, je třeba zvýšit počet koncentrací tak, aby se zajistil adekvátní počet kultur k analýze (tj. minimálně osm analyzovatelných koncentrací). Kultury s negativní kontrolou (rozpouštědlem/vehikulem) se používají duplicitní.

V případě plyných nebo těkavých látek je třeba uplatnit v testu vhodné postupy, jako je použití neprodyšně uzavřených kultivačních nádob (21, 22).

1.4.3.2 Hodnocení přežívání, viability a mutační frekvence

Po skončení expozice se buňky promyjí a kultivují ke stanovení přežívání a fenotypické exprese. Po expozici se obvykle začíná s analýzou cytotoxicity stanovením klonovací účinnosti – cloning efficiency nebo relativního celkového růstu.

Každý lokus má určitou minimální časový interval pro téměř optimální expresi nově indukovaných mutantů (HPRT a XPRT vyžaduje minimálně 6 – 8 dní, TK minimálně 2 dny). Buňky se pěstují v médiu s a bez selekčního činidla pro stanovení počtu mutantů a klonovací účinnosti. Po skončení doby exprese se začne s analýzou životnosti (používané k výpočtu četnosti mutantů) inokulací buněk na neselekční médium.

Pokud je látka v testu L5178Y TK⁺/− pozitivní, je třeba minimálně na jedné z experimentálních kultur (nejvyšší pozitivní koncentrace) a na negativních a pozitivních kontrolách stanovit velikost kolonií. Pokud je látka v tomto testu negativní, změří se velikost kolonií u negativní a pozitivní kontroly. Měření se může provést i ve studiích s TK6TK⁺/−.

2. ÚDAJE

2.1 ZPRACOVÁNÍ VÝSLEDKŮ

Jako data slouží výsledky stanovení cytotoxicity a životnosti, počty kolonií a mutační frekvence u experimentálních a kontrolních kultur. V případě pozitivní reakce v testu L5178TK⁺/− se kolonie hodnotí pomocí kritérií malých a velkých kolonií přinejmenším v jedné koncentraci testované látky (nejvyšší pozitivní koncentrace) a v negativní a pozitivní kontrole. Molekulární a cytogenetické vlastnosti velkých i malých kolonií byly podrobně prostudovány v publikacích (23) (24). Při testu TK⁺/− se kolonie hodnotí podle kritéria kolonií normálního růstu (velké) a pomalého růstu (malé) (25). Mutanty, které utrpěly nejrozsáhlejší genetické poškození, mají delší dobu zdvojení a proto tvoří malé kolonie. Rozmezí tohoto poškození obvykle sahá od ztráty celého genu po karyotypicky viditelné chromozómové aberace. Tvorba malých kolonií je asociována s expozicí látkám indukujících hrubé chromozómové aberace (26). Méně závažně postižené mutanty rostou podobnou rychlostí jako buňky rodičovské a vytvářejí velké kolonie.

Je třeba uvádět také přežití (relativní klonovací účinnost – relative cloning efficiency) nebo relativní celkový růst. Mutační frekvence se vyjadřuje jako počet mutovaných buněk dělený počtem přežívajících buněk.

Uvádějí se individuální údaje o kultivačních podmínkách; nakonec se všechna data shrnou v tabelární formě.

Verifikace zjevně pozitivní reakce se nepožaduje. Nejednoznačné výsledky se objasňují dalším testováním, nejlépe za modifikovaných experimentálních podmínek. Negativní výsledky se musí potvrdit případ od případu. V případech, kdy se potvrzení negativních výsledků nepovažuje za nutné, je třeba podat zdůvodnění. V případě nejednoznačných nebo negativních výsledků je třeba v následných experimentech zvážit modifikaci parametrů studie tak, aby se rozšířilo rozmezí podmínek. K parametrům, které se dají v experimentu modifikovat, patří rozdíly mezi jednotlivými koncentracemi a podmínky metabolické aktivace.

2.2 VYHODNOCENÍ A INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

Ke stanovení pozitivního výsledku existuje několik kritérií, například na koncentraci testované látky závislý nárůst nebo reprodukovatelný nárůst mutační frekvence. Nejprve je třeba uvážit biologickou významnost výsledků. Při vyhodnocování výsledků testu se mohou použít statistické metody. Statistická významnost by však neměla být jediným určujícím faktorem pozitivního výsledku.

Testovaná látka, při jejímž použití výsledky nesplňují výše uvedená kritéria, se v tomto systému považuje za nemutagení. Většina experimentů sice poskytuje jednoznačně pozitivní nebo negativní výsledky, v ojedinělých případech však nelze ze získaného souboru dat vyvodit o aktivitě testované látky definitivní závěr. Výsledky mohou být stále nejednoznačné nebo problematické, i když se experiment několikrát opakuje.

Pozitivní výsledky testu na genové mutace v savčích buňkách *in vitro* ukazují, že testovaná látka vyvolává v kultuře savčích buněk genové mutace. Nejprůkaznější je reprodukovatelný pozitivní efekt dávka-účinek. Negativní výsledky ukazují, že za daných experimentálních podmínek testovaná látka v kultuře savčích buněk nevyvolává genové mutace.

3. ZÁVĚREČNÁ ZPRÁVA

ZPRÁVA O PRŮBĚHU POKUSU

Ve zprávě o průběhu pokusu je třeba uvést tyto informace:

Rozpouštědlo / vehikulum:

- zdůvodnění volby rozpouštědla/vehikula,
- rozpustnost a stabilita testované látky v rozpouštědle/vehikulu, pokud je známa.

Buňky:

- typ a zdroj buněk,
- počet buněčných kultur,
- případně počet pasáží ,
- případně metody kultivace buněčné kultury,
- absence mykoplasmat.

Podmínky pokusu:

- zdůvodnění volby použitých koncentrací a počtu kultur, včetně např. údajů o cytotoxicitě a limitech v rozpustnosti, jsou-li k dispozici,
- složení média, koncentrace CO₂,
- koncentrace testované látky,
- objem vehikula a přidané testované látky,
- inkubační teplota,
- doba inkubace,
- doba působení látky,
- hustota buněk během působení látky,
- typ a složení systému metabolické aktivace, včetně kritérií akceptovatelnosti,
- pozitivní a negativní kontroly,
- délka expresní periody (případně včetně počtu inokulovaných buněk, subkultur)
- selekční činidla,
- kritéria, jimiž se studie hodnotí jako pozitivní, negativní nebo nejednoznačná,
- metody zjišťování počtu živých a mutovaných buněk,
- definice kolonií, u nichž se hodnotí velikost a typ (včetně případných kritérií pro rozlišování mezi „malými“ a „velkými“ koloniemi).

Výsledky:

- známky toxicity,
- známky srážení,
- údaje o pH a osmolalitě během působení testované látky, jsou-li stanoveny,
- velikost kolonií, je-li hodnocena, minimálně pro negativní a pozitivní kontrolu,
- případné možnosti laboratoře zjistit malé kolonie mutantů pomocí systému L5178Y TK⁺/
- vztah dávka- účinek, je-li to možné,
- statistické analýzy, byly-li provedeny,
- souběžné údaje z negativních (rozpouštědlo/vehikulum) a pozitivních kontrol,
- historické údaje z negativních (rozpouštědlo/vehikulum) a pozitivních kontrol, včetně rozpětí, průměrů a směrodatných odchylek.

*Diskuse výsledků.**Závěry. “.*

5. Metoda B.23 zní:

„B.23. ANALÝZA CHROMOSÓMOVÝCH ABERACÍ V SAVČÍCH SPERMATOGONIÍCH

1. METODA

Metoda je replikací OECD TG 483, Mammalian Spermatogonial Chromosome Aberration Test (1997).

1.1 ÚVOD

Účelem testu je *in vivo* identifikovat látky způsobující strukturální chromozómové aberace v savčích spermatogoniích (1) (2) (3) (4) (5). Strukturální aberace jsou dvojího druhu: chromozómové a chromatidové. Aberace vyvolané chemickými mutageny jsou většinou chromatidové, ovšem k aberacím chromozómového typu dochází rovněž. Tato metoda není určena k analýze numerických aberací a běžně se k tomuto účelu nepoužívá. Chromozómové mutace a příbuzné jevy jsou u člověka příčinou řady genetických chorob.

Tímto testem se analyzují chromozómové aberace v spermatogoniích a proto se předpokládá, že dokáže predikovat indukci dědičných mutací v zárodečných buňkách.

K testu se obvykle používají hlodavci. Tímto cytogenetickým testem *in vivo* se zjišťují chromozómové aberace v mitózách spermatogonií. Tato metoda nepoužívá jiné cílové buňky.

Aby se ve spermatogoniích zjistily aberace chromatidového typu, je třeba analyzovat první mitózu po působení testované látky, dříve než se poškození ztratí v následujícím buněčném dělení. Další informace z ovlivněných spermatogonií lze získat analýzou meiotických chromozómů, kde se zjišťují aberace chromozómového typu v diakíněze I, když se ovlivněné buňky mění ve spermatocyty.

Tento test *in vivo* je určen ke zjišťování, zda jsou mutageny aktivní v somatických buňkách také aktivní v buňkách zárodečných. Mimoto má test význam také pro hodnocení rizika mutagenity tím, že umožňuje posuzovat faktory metabolismu *in vivo*, farmakokinetiky a reparačních procesů DNA.

V testes je přítomna řada generací spermatogonií se širokým spektrem citlivosti vůči chemickým látkám. Zjištěné aberace tedy představují souhrn reakcí ovlivněných populací spermatogonií, kde převládají diferencované spermatogonie. Podle jejich polohy ve varleti pak různé generace spermatogonií mohou, ale nemusejí být exponovány krevním oběhem kvůli anatomické a fyziologické bariéře Sertoliho buněk a hemato-testikulární bariéře.

Existují-li doklady toho, že se testovaná látka nebo její reaktivní metabolit do cílové tkáně nedostane, není tato látka pro test vhodná.

1.2 DEFINICE

Aberace chromatidového typu: strukturální poškození chromozómu, které se projevuje jako zlom jedné, případně obou chromatid, nebo zlom a opětovné spojení mezi chromatidami.

Aberace chromozómového typu: strukturální poškození chromozómu vyjádřená jako zlom respektive jako zlom a opětovné spojení obou chromatid na stejném místě (zahrnuty jsou aberace typu dicentrický chromozóm, prsténčitý chromozóm-ring)

Zlom chromatidy: jako zlom lze hodnotit porušení kontinuity jedné nebo obou chromatid za předpokladu, že vzniklá mezera ve struktuře chromatidy je větší než je šířka poškozené chromatidy. Dále pak v případech, koncový (distální) fragment v místě zlomu je dislokovaný (nebo mimo osu chromatidy), případně jedna chromatida hodnoceného chromozómu je kratší v důsledku delece.

Gap: achromatická léze menší než šířka jedné chromatidy a s minimálním vybočením chromatid.

Numerická aberace: změna počtu chromozómů oproti normálnímu počtu charakteristickému pro použité buňky.

Polyploidie: násobek haploidního počtu chromozómů (n) jiný než diploidní počet (tedy $3n$, $4n$ atd.).

Strukturální aberace: změna chromozómové struktury zjištělná mikroskopickou analýzou buněčného dělení ve stádiu metafáze, pozorovaná jako delece a fragmenty, a výměny.

1.3 PRINCIP METODY

Zvířata se vhodným způsobem exponují testované látce a ve vhodnou dobu po působení se usmrtí. Před usmrcením se na ně působí látkou zastavující metafázi (například kolchicinem nebo Colcemidem®). Ze zárodečných buněk se pak připraví preparáty a po obarvení se v metafázích analyzují chromozómové aberace.

1.4 POPIS METODY

1.4.1 Příprava

1.4.1.1 Výběr živočišného druhu

Běžně se používají samci čínských křečků a myši, lze ovšem použít samce jakéhokoliv jiného vhodného savčího druhu. Používají se běžné laboratorní kmeny mladých zdravých dospělých jedinců. Hmotnostní rozdíly by při zahájení studie měly být minimální a u každého pohlaví nemají přesahovat ± 20 % průměrné hmotnosti.

1.4.1.2 Podmínky chovu

Všeobecné podmínky chovu jsou uvedeny ve Všeobecném úvodu v části B.

Vlhkost by měla být 50 – 60 %.

1.4.1.3 Příprava zvířat

Zdraví mladí dospělí jedinci se náhodně rozdělí do kontrolní a experimentální skupiny. Jedinci se jednoznačně označí a po dobu minimálně pěti dní se zvířata aklimatizují v laboratorních podmínkách. Klece je třeba uspořádat tak, aby se minimalizovaly případné vlivy toho, jak a kde jsou klece umístěny.

1.4.1.4 Příprava dávek

Je-li testovaná látka v pevném stavu a je-li to možné, látka se před podáním zvířatům rozpustí nebo se připraví její suspenze ve vhodném rozpouštědle nebo vehikulu. Kapalně testované látky se mohou podávat přímo nebo se před podáváním ředí. Je třeba používat čerstvé preparáty, ledaže údaje o stálosti (stabilitě) prokazují, že skladování ji neovlivní.

1.4.2 Podmínky testu

1.4.2.1 Rozpouštědlo / vehikulum

Rozpouštědlo/vehikulum v používaných dávkách nesmí vyvolávat toxické účinky a nesmí s testovanou látkou chemicky reagovat. Používá-li se nepříliš známé rozpouštědlo, musí být jeho použití podpořeno údaji o kompatibilitě s testovanou látkou. Doporučuje se, aby kde je to možné, bylo na prvním místě použito vodné rozpouštědlo/ vehikulum.

1.4.2.2 Kontroly

Do každého testu je třeba pro každé pohlaví zařadit souběžné pozitivní a negativní (rozpouštědlo/vehikulum) kontroly. Je třeba zacházet se zvířaty ve všech skupinách stejně.

Pozitivní kontroly by měly ve spermatogoniích vykazovat chromozómové aberace *in vivo* při dávkách kdy lze očekávat jejich detekovatelné zvýšení nad spontánní úroveň.

Dávky při pozitivní kontrole se volí tak, aby byly účinky patrné, ale přitom nenapovídaly hodnotiteli totožnost zakódovaného preparátu. Pozitivní kontrolu je možné podávat odlišným způsobem než testovanou látku a vzorek odebírat v jednom časovém intervalu. Kde je to možné, je třeba používat pozitivní kontrolu ze stejné chemické skupiny, jako je testovaná látka. Příklady látek vhodných pro pozitivní kontrolu.

Látka	CAS	EINECS
cyklofosfamid monohydrát cyklofosfamidu	50-18-0 6055-19-2	200-015-4
cyklohexylamin	108-91-8	203-629-0
mitomycin C	50-07-7	200-008-6
akrylamid monomer	79-06-1	201-173-7
triethylenmelamin	51-18-3	200-083-5

Negativní kontroly ovlivněné rozpouštědlem nebo vehikulem a zpracované stejným způsobem jako experimentální skupiny měly by být zařazeny do všech časových intervalů zpracování, pokud nejsou k dispozici přijatelné historické údaje o frekvenci buněk s aberacemi a o interindividuální variabilitě mezi zvířaty. Mimoto je třeba použít i neovlivněných kontrol, ledaže existují historické nebo publikované údaje prokazující, že zvolené rozpouštědlo, nebo vehikulum nevyvolává žádné nepříznivé nebo mutagenní účinky

1.5 POSTUP

1.5.1 Počet a pohlaví zvířat

V každé zkušební a kontrolní skupině musí být minimálně pět analyzovatelných samců.

1.5.2 Dávkovací schéma

Testovaná látka se podává nejlépe jednorázově nebo ve dvou dávkách. Pokud se jedná o objemnou dávku, může se k usnadnění aplikace rozdělit, tj. na dvě dávky za den podané v rozmezí nanejvýše několika hodin. Jiné režimy dávkování musejí být vědecky odůvodněné.

V případě skupiny s nejvyšší dávkou se vzorky po expozici látky odebírají dvakrát. Jelikož testovaná látka může ovlivňovat kinetiku buněčného dělení, provádí se jeden dřívější a jeden pozdější odběr zhruba 24 a 48 hodin po expozici. U ostatních dávek (tj. mimo dávku nejvyšší) se odběr vzorků provádí po 24 hodinách nebo po 1,5-násobku délky buněčného cyklu po expozici, ledaže je znám vhodnější časový interval pro detekci účinku (6).

Kromě toho mohou být použity jiné časové intervaly odběru vzorků. Např. jedná-li se o látku zpomalující pohyb chromozómů během mitózy, nebo látku s účinky nezávislými na S-fázi cyklu, jsou vhodnější dřívější doba odběru vzorku (1).

Zda je vhodné nechat látku působit opakovaně, se posuzuje případ od případu. Pokud se provádí aplikace látky opakovaně, usmrcují se zvířata po 24 hodinách (1,5-násobku buněčného cyklu) od poslední aplikace. Odběry lze provádět i v dalších intervalech, považuje-li se to za účelné.

Před usmrcením se zvířatům intraperitoneálně injikuje vhodná dávka Colcemidu® nebo kolchicinu a následně se z nich ve vhodném intervalu odeberou vzorky. U myší je tento interval zhruba 3–5 hodin, u čínských křečků zhruba 4–5 hodin.

1.5.3 Dávkování

Provádí-li se studie ke zjištění rozpětí toxicity, protože nejsou k dispozici žádné vhodné údaje, je třeba ji provádět v téže laboratoři za použití stejného živočišného druhu, kmene a pokusného režimu, jaké se použijí v hlavní studii (7). Při zjištění toxicity se užívají pro první časový interval odběru vzorků tři dávky tak, aby pokrývaly rozmezí od maximální toxicity k toxicitě nízké nebo nulové. Pro pozdější čas odběru vzorků je pak třeba použít jenom nejvyšší dávku. Ta je definována jako dávka vyvolávající takové známky toxicity, že při vyšších dávkách ve stejném režimu podávání by účinky byly letální.

Látky, jež v nízkých netoxických dávkách vykazují specifickou biologickou aktivitu, jako jsou hormony nebo mitogeny, mohou představovat výjimky z těchto kritérií pro stanovení dávek a vyhodnocují se případ od případu. Nejvyšší dávka může být také definována jako dávka, která vede k určitým známkám toxicity ve spermatogoniích (např. pokles poměru mitóz spermatogonií k první a druhé meiotické metafázi; tento pokles nemá být vyšší než 50 %).

1.5.4 Limitní test

Jestliže test při dávce minimálně 2000 mg/kg hmotnosti v jedné dávce nebo ve dvou dávkách podaných v jeden den nevyvolává žádné pozorovatelné toxické účinky a jestliže se na základě údajů o látkách s podobnou chemickou strukturou neočekává genotoxicita, nemusí být provedena celá studie za použití tří dávkových úrovní. Podle očekávané humánní expozice se může použít v limitním testu vyšší dávky.

1.5.5 Aplikace látky

Testovaná látka se obvykle vpravuje buď žaludeční sondou, nebo intraperitoneální injekcí. V odůvodněných případech mohou být přijatelné i jiné způsoby expozice. Maximální objem kapaliny, která se dá sondou nebo injekcí najednou vpravit, závisí na velikosti pokusného zvířete a nemá překročit 2 ml/100 g hmotnosti; vyšší dávky musí být zdůvodněné. S výjimkou dráždivých nebo žíravých látek, jež normálně vykazují při vyšších koncentracích horší účinky, je třeba upravit koncentrace látky tak, aby objem byl ve všech dávkových úrovních stejný a minimalizovala se tak objemová variabilita.

1.5.6 Příprava chromozómů

Okamžitě po usmrcení zvířete se připraví z jednoho nebo z obou varlat připraví buněčná suspenze, na kterou se působí hypotonickým roztokem a fixuje se. Buněčná suspenze se nakape na podložní sklo a obarví.

1.5.7 Analýza

U každého jedince se analyzuje minimálně 100 dobře rozprostřených metafází (tj. minimálně 500 metafází v jedné skupině). Tento počet se dá snížit, je-li počet pozorovaných aberací vysoký. Všechny mikroskopické preparáty (včetně pozitivních a negativních kontrol) se před analýzou nezávisle zakódují. Jelikož fixační postupy často vedou k rozbití určitého podílu metafázických buněk a ztrátě chromozómů, musí být u všech typů buněk počet centromer v hodnocených buňkách roven číslu $2n \pm 2$.

2. ÚDAJE

2.1 ZPRACOVÁNÍ VÝSLEDKŮ

Údaje z jednotlivých zvířat se prezentují v tabelární formě. Experimentální jednotkou je jedinec. U každého jedince se vyhodnocuje počet buněk se strukturálními chromozómovými aberacemi a počet aberací na jednu buňku. U experimentálních i kontrolních skupin se zaznamenávají jednotlivé typy strukturálních chromozómových aberací, jejich počet a četnost. Gapy se zaznamenávají zvlášť, uvádějí se, ale obvykle se do celkové četnosti aberací nezahrnují.

Je-li analyzována mitóza i meióza, stanoví se u všech pokusných zvířat i zvířat z negativní kontroly jakožto míra cytotoxicity poměr mitóz spermatogonií k první a druhé meiotické metafázi, a to tak, že se z každého jedince použije 100 dělicích se buněk. Je-li analyzována pouze mitóza, stanoví se mitotický index u minimálně 1000 buněk z každého jedince.

2.2 VYHODNOCENÍ A INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

Ke zjišťování pozitivního výsledku se používá několik kritérií, například na koncentraci testované látky závislá frekvence buněk s chromozómovými aberacemi, nebo zřetelný nárůst počtu buněk s aberacemi ve skupině ovlivněné jednorázovou dávkou a s jedním časovým intervalem odběru vzorků. Nejprve je třeba uvážit biologickou významnost výsledků. Při vyhodnocování výsledků testu je možno využít statistické metody (8); statistická významnost by však neměla být jediným

určujícím faktorem pozitivního výsledku. Nejednoznačné výsledky je třeba vyjasnit dalším testováním, nejlépe za modifikovaných experimentálních podmínek.

Testovaná látka, při jejímž použití výsledky nesplňují výše uvedená kritéria, se v tomto systému považuje za nemutagenní.

Ačkoliv většina experimentů vykazuje jasně pozitivní, nebo negativní výsledky, ve výjimečných případech získaná data nedovolují jednoznačné posouzení účinku testované látky. Výsledky mohou být nejisté, nebo diskutabilní bez ohledu na počet opakovaných experimentů.

Pozitivní výsledky testu ukazují, že testovaná látka vyvolává v zárodečných buňkách příslušného živočišného druhu strukturální chromozómové aberace. Negativní výsledky ukazují, že za daných experimentálních podmínek testovaná látka v zárodečných buňkách příslušného živočišného druhu chromozómové aberace nevyvolává.

Je třeba diskutovat, jaká je pravděpodobnost, že testovaná látka dosáhne širokého použití nebo je specifická pro určitou cílovou tkáň (např. systémová toxicita).

3. ZÁVĚREČNÁ ZPRÁVA

ZPRÁVA O PRŮBĚHU POKUSU

Ve zprávě o průběhu pokusu je třeba uvést tyto informace:

Rozpouštědlo / vehikulum :

- zdůvodnění volby vehikula ,
- rozpustnost a stabilita testované látky rozpouštědla/vehikulu, pokud je známa.

Pokusná zvířata:

- použitý živočišný druh/kmen,
- počet a věk zvířat,
- původ, chovné podmínky, strava apod.,
- hmotnost jednotlivých zvířat na počátku testu, včetně hmotnostního rozpětí, průměrů a směrodatných odchylek pro jednotlivé skupiny.

Podmínky pokusu:

- údaje ze studie pro určení rozpětí toxicity, byla-li provedena,
- zdůvodnění volby velikosti dávek,
- zdůvodnění způsobu aplikace látky,
- podrobnosti o přípravě testované látky,
- podrobnosti o podávání testované látky,
- zdůvodnění doby usmrcení zvířat,
- případný převod koncentrace látky v potravě/pitné vodě (ppm) na faktickou dávku (mg/kg hmotnosti /den),
- podrobnosti o kvalitě potravy a vody,
- podrobné schéma podávání testované látky a odběru vzorků,
- metody zjišťování toxicity,
- látka blokující metafázi, její koncentrace a délka působení ,
- metody přípravy mikroskopických preparátů
- kritéria pro hodnocení aberací,
- počet analyzovaných buněk na jedno zvíře,
- kritéria, jimiž se studie hodnotí jako pozitivní, negativní nebo nejednoznačná.

Výsledky:

- známky toxicity,
- mitotický index,
- poměr mitóz spermatogonií k první a druhé meiotické metafázi,
- typ a počet aberací pro každého jedince zvlášť,
- celkový počet aberací v dané skupině,
- počet buněk s aberacemi na jednu skupinu,
- vztah dávka-odpověď, je-li to možné,
- statistické analýzy, byly-li provedeny,
- údaje ze souběžných negativních kontrol,
- historické údaje z negativních kontrol včetně rozpětí, průměrů a směrodatných odchylek.
- údaje ze souběžných pozitivních kontrol,
- případně pozorované změny ploidie.

*Diskuse výsledků.**Závěry. “.*

6. Za metodu B.38 se doplňují metody B.39., B.40. a B.41, které znějí:

„B.39. TEST NEPLÁNOVANÉ SYNTÉZY DNA V SAVČÍCH JATERNÍCH BUŇKÁCH *IN VIVO*“

1. METODA

Metoda je replikací OECD TG 486, Unscheduled DNA Synthesis (UDS) Test with Mammalian Liver Cells *In Vivo* (1997).

1.1 ÚVOD

Účelem testu neplánované syntézy DNA (unscheduled DNA synthesis, UDS) v savčích jaterních buňkách *in vivo* je určit látky, vyvolávající reparaci DNA v jaterních buňkách pokusných zvířat (1) (2) (3) (4).

Tento test *in vivo* představuje metodu pro zjišťování genotoxických účinků chemických látek v játrech. Výsledek testu indikuje poškození DNA v jaterních buňkách a její následnou reparaci. Játra jsou obvykle hlavním místem metabolismu absorbovaných sloučenin; jsou proto vhodným objektem pro detekci poškození DNA *in vivo*.

Existují-li doklady o tom, že se testovaná látka do cílové tkáně nedostane, není tento test vhodný.

Výsledek neplánované syntézy DNA (UDS) se hodnotí tak, že se stanoví absorpce značených nukleosidů v buňkách, které neprocházejí plánovanou (S-fáze) syntézou DNA. Nejběžnější je metoda, při které se autoradiograficky stanoví thymidin značený tritiem (^3H -TdR). Pro testy UDS *in vivo* se nejčastěji používají potkaní játra. Jiné tkáně než játra se sice také mohou použít, nejsou však předmětem této metody.

Detekce odpovědi závisí na počtu bází DNA, jež jsou v místě poškození odstraněny a nahrazeny. Proto je metoda UDS zvláště vhodná k detekci látek indukujících „longpatch repair“ (20 – 30 bází), zatímco pro látky indukující „shortpatch repair“ (1 – 3 báze) je méně citlivá. Dále může docházet k mutacím v důsledku neopravení, chybného opravení nebo chybné replikace lézí DNA. Rozsah odpovědi UDS neříká nic o přesnosti procesu reparace. Mimoto je možné, že mutagen bude sice s DNA reagovat, ale poškození DNA není opraveno excizním reparačním procesem. To, že UDS test neposkytuje o mutagenní aktivitě specifické informace, je vyváжено jeho potenciální citlivostí, protože poskytuje výsledek v celém genomu.

1.2 DEFINICE

Buňky v reparaci: net nuclear grain (NNG) vyšší než určitá, předem stanovená hodnota, kterou zdůvodní laboratoř provádějící test.

Net nuclear grains (NNG): kvantitativní míra UDS aktivity buněk při autoradiografických testech UDS, vypočtená jako rozdíl mezi počtem zrn v jádře (NG) a průměrným počtem zrn v cytoplasmě (CG): $NNG = NG - CG$. Počty NNG se vypočítávají pro jednotlivé buňky a následně přepočítány na buňky v kultuře, v paralelních kulturách apod.

Neplánovaná syntéza DNA (unscheduled DNA synthesis, UDS): opravná syntéza DNA po excizi a odstranění úseku DNA obsahujícího oblast poškození vyvolaného chemickou látkou nebo fyzikálním činidlem.

1.3 PRINCIP METODY

Test UDS v savcích jaterních buňkách *in vivo* indikuje reparační syntézu DNA po excizi a odstranění segmentu DNA obsahujícího oblast poškození vyvolaného chemickou látkou nebo fyzikálním působením. Test vychází obvykle z inkorporace ^3H -TdR do DNA jaterních buněk, charakteristických nízkým počtem buněk v S-fázi buněčného cyklu. Inkorporace ^3H -TdR se obvykle stanoví autoradiograficky, protože tato technika není tak náchylná k interferenci s buňkami v S-fázi, jako je např. scintilační metoda.

1.4 POPIS METODY

1.4.1 Příprava

1.4.1.1 Výběr živočišného druhu

Běžně se používají potkani, lze ovšem použít jakýkoliv vhodný savčí druh. Používají se běžné laboratorní kmeny mladých zdravých dospělých jedinců. Hmotnostní rozdíly by při zahájení studie měly být minimální a u každého pohlaví nemají přesahovat $\pm 20\%$ průměrné hmotnosti.

1.4.2 Podmínky chovu

Všeobecné podmínky chovu jsou uvedeny ve Všeobecném úvodu v části B.

Vlhkost by měla být 50 – 60 %.

1.4.2.1 Příprava zvířat

Zdraví mladí dospělí jedinci se náhodně rozdělí do kontrolní a experimentální skupiny. Jedinci se jednoznačně označí a po dobu minimálně pěti dní se zvířata aklimatizují v laboratorních podmínkách. Klece je třeba uspořádat tak, aby se minimalizovaly případné vlivy toho, jak a kde jsou klece umístěny.

1.4.2.2 Testovaná látka/příprava

Je-li testovaná látka v pevném stavu a je-li to možné, látka se před podáním zvířatům rozpustí nebo se připraví její suspenze ve vhodném rozpouštědle nebo vehikulu. Kapalně testované látky se mohou podávat přímo nebo se před podáváním ředí. Je třeba používat čerstvé preparáty, ledaže údaje o stálosti (stabilitě) prokazují, že skladování ji neovlivní.

1.4.3 Podmínky testu

1.4.3.1 Rozpouštědlo / vehikulum

Rozpouštědlo / vehikulum v používaných dávkách nesmí vyvolávat toxické účinky a nesmí s testovanou látkou chemicky reagovat. Používá-li se ne příliš známé rozpouštědlo, musí být jeho použití podpořeno údaji o kompatibilitě s testovanou látkou. Doporučuje se, aby kde je to možné, bylo na prvním místě použito vodné rozpouštědlo / vehikulum.

1.4.3.2 Kontroly

Do každého testu je třeba pro každé pohlaví zařadit souběžné pozitivní a negativní (rozpouštědlo/vehikulum) kontroly. Je třeba zacházet se zvířaty ve všech skupinách stejně.

Pozitivní kontroly by měly indukovat UDS při dávkách kdy lze očekávat jejich detekovatelné zvýšení nad spontánní úroveň. Pozitivní kontroly vyžadující metabolickou aktivaci se používají v dávkách vedoucích ke středně vysoké odezvě (4). Dávky při pozitivní kontrole se volí tak, aby byly účinky patrné, ale přitom nenapovídaly hodnotiteli totožnost zakódovaného preparátu. Mezi látky pro pozitivní kontrolu patří například:

Doba odběru vzorku	Látka	CAS	EINECS
odběr v intervalu (2 – 4 hodiny)	N-nitrosodimethylamin	62-75-9	200-249-8
odběr v intervalu (12 – 16 hodin)	N-2-fluorenylacetamid (2-AAF)	53-96-3	200-188-6

Je možno použít i jiné vhodné látky. Je možná aplikace pozitivní kontroly jinou cestou, než je podávána testovaná látka.

1.5 POSTUP

1.5.1 Počet a pohlaví zvířat

V každé skupině musí být minimálně tři analyzovatelní jedinci. Pokud existuje historická databáze, pak pro souběžné skupiny negativní a pozitivní kontroly postačují jeden, nebo dva jedinci.

Pokud v době, kdy se studie provádí, existují údaje ze studií s tímž živočišným druhem využívajících týž expozičních cest, prokazující, že mezi oběma pohlavími nejsou v toxicitě podstatné rozdíly, je možné provést testování pouze na jednom pohlaví, nejlépe na samcích. Tam, kde humánní expozice testovaným látkám může být pohlavně specifická, jak je tomu například u některých farmaceutických přípravků, provádí se test na zvířatech odpovídajícího pohlaví.

1.5.2 Dávkovací schéma

Testovaná látka se obvykle podává jednorázově.

1.5.3 Dávkování

Obvykle se používají dvě různé dávky. Nejvyšší dávka je definována jako dávka vyvolávající takové známky toxicity, že při vyšší dávce ve stejném režimu by se očekával letální účinek. Nižší dávka představuje obecně 50–25 % dávky vyšší.

Látky, jež v nízkých netoxických dávkách vykazují specifickou biologickou aktivitu, jako jsou hormony nebo mitogeny, mohou představovat výjimky z těchto kritérií pro stanovení dávek a vyhodnocují se případ od případu. Provádí-li se studie ke zjištění rozpětí toxicity, protože potřebné údaje nejsou k dispozici, je třeba ji realizovat v téže laboratoři a za použití stejného živočišného druhu, kmene, pohlaví a pokusného režimu, jaké se pak použijí v hlavní studii.

Jako nejvyšší dávku lze také definovat dávku vyvolávající určité známky toxicity v játrech (např. pyknotická jádra).

1.5.4 Limitní test

Jestliže test při dávce minimálně 2 000 mg/kg hmotnosti podané v jedné dávce nebo ve dvou dávkách v jeden den nevyvolává žádné pozorovatelné toxické účinky a jestliže se na základě údajů o strukturně příbuzných látkách neočekává genotoxicita, nemusí se provést úplná studie. Podle očekávané humánní expozice může být použita v limitním testu vyšší dávka.

1.5.5 Aplikace látky

Testovaná látka se obvykle vpravuje žaludeční sondou. V odůvodněných případech mohou být přijatelné i jiné expoziční cesty. Intraperitoneální aplikace se však nedoporučuje, protože by se tím mohla játra vystavit působení testované látky přímo, nikoli krevním oběhem. Maximální objem kapaliny, která se dá sondou nebo injekcí najednou vpravit, závisí na velikosti pokusného zvířete a nemá překročit 2 ml/100 g hmotnosti organismu; vyšší dávky musí být zdůvodněné. S výjimkou dráždivých nebo žíravých látek, jež normálně vykazují při vyšších koncentracích horší účinky, je

třeba upravit koncentrace látky tak, aby objem byl ve všech dávkových úrovních stejný a minimalizovala se tak objemová variabilita.

1.5.6 Příprava jaterních buněk

Jaterní buňky se z pokusných zvířat zpracovávají obvykle 12 – 16 hodin po podání dávky testované látky. Obvykle je zapotřebí ještě další odběr (obvykle 2 – 4 hodiny po podání látky), ledaže je po 12 – 16 hodinách pozitivní reakce zjevná. Je ovšem možno použít i jiné časy odběru vzorků, je-li to odůvodněné na základě toxokinetických údajů.

Krátkodobé kultury savčích jaterních buněk se obvykle zakládají perfuzí jater *in situ* kolagenázou. Je třeba zajistit, aby se čerstvě disociované jaterní buňky mohly přichytit ke vhodnému povrchu. Jaterní buňky ze zvířat z negativní kontroly mají mít minimálně 50 % životaschopnost (5).

1.5.7 Stanovení UDS

Čerstvě izolované savčí jaterní buňky se po vhodné dobu (např. 3 – 8 hodin) obvykle inkubují v médiu obsahujícím ^3H -TdR. Po inkubaci se médium odstraní; buňky se potom mohou inkubovat v médiu obsahujícím nadbytek neznačeného thymidinu, aby se snížila neinkorporovaná radioaktivita (tzv. „cold chase“). Buňky se pak promyjí, fixují a vysuší. Při delších inkubačních intervalech nemusí se „cold chase“ provádět. Sklíčka s preparáty se ponoří do autoradiografické emulze, exponují ve tmě (např. po dobu jednoho nebo dvou týdnů v chladničce), vyvolají, obarví a počítají se exponovaná stříbrná zrna. Z každého jedince se připraví dva nebo tři preparáty.

1.5.8 Analýza

Mikroskopické preparáty musí obsahovat dostatečný počet buněk s normální morfologií, aby bylo možno UDS vyhodnotit. Mikroskopicky se hodnotí zjevné známky cytotoxicity (např. pyknóza, snížená úroveň radioaktivního značení).

Preparáty se před počítáním zrn zakódují. Vždy na minimálně dvou preparátech z každého jedince se obvykle hodnotí 100 buněk; pokud je buněk méně než 100 na jednoho jedince, musí to být zdůvodněné. Při počítání zrn se nevyhodnocují jádra v S-fázi, ale podíl buněk v S-fázi se registruje.

Vhodnou metodou se stanoví stupeň inkorporace ^3H -TdR do jader a cytoplazmy v morfologicky normálních buňkách, zjištěných podle depozice stříbrných zrn.

2. ÚDAJE

2.1 ZPRACOVÁNÍ VÝSLEDKŮ

Výsledky zahrnují údaje z jednotlivých preparátů a zvířat. Mimoto se všechna data shrnou v tabelární formě. Pro každou buňku, každého jedince a každou dávku a čas se stanoví čistý počet „nuclear grain“ (NNG) odečtením počtu CG od počtu NG. Počítají-li se „buňky v opravě“, musí být kritéria, kterými se tyto buňky určují, zdůvodněna a podložena daty z historických nebo souběžných negativních kontrol.

Numerické výsledky se mohou vyhodnotit statistickými metodami; pokud se statistické testy použijí, je třeba je vybrat a zdůvodnit ještě před započítáním studie.

2.2 VYHODNOCENÍ A INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

Kritéria pro pozitivní / negativní reakci zahrnují:

- | | |
|-----------|--|
| pozitivní | (I) hodnoty NNG nad předem stanoveným prahem,
zdůvodněným na základě historických dat dané laboratoře |
| nebo | (II) hodnoty NNG významně vyšší než u souběžné kontroly |
| negativní | (I) hodnoty NNG na úrovni/pod úrovni historického prahu u kontrol |
| nebo | (II) hodnoty NNG nejsou signifikantně vyšší než souběžná kontrola |

Je třeba uvážit biologickou významnost získaných dat, což znamená, že je třeba vzít v úvahu parametry, jako jsou variabilita mezi jednotlivými jedinci, vztah dávka-odpověď a cytotoxicita. Při vyhodnocování výsledků lze použít statistické metody; statistická významnost by však neměla být pro pozitivní reakci rozhodujícím faktorem.

Většina experimentů poskytuje jednoznačné pozitivní nebo negativní výsledky, v ojedinělých případech však nelze ze získaného souboru dat vyvodit o aktivitě testované látky definitivní závěr. Výsledky mohou být stále nejednoznačné nebo problematické, i když se experiment několikrát opakuje.

Pozitivní výsledek testu UDS se savčími jaterními buňkami *in vivo* ukazuje, že testovaná látka vyvolává v savčích jaterních buňkách *in vivo* poškození DNA, které lze opravit neplánovanou syntézou DNA *in vitro*. Negativní výsledek ukazuje, že za daných experimentálních podmínek testovaná látka nevyvolává takové poškození DNA, jež je tímto testem zjištělná.

Je třeba vzít v úvahu, jaká je pravděpodobnost, že testovaná látka dosáhne širokého použití nebo je specifická pro určitou cílovou tkáň (např. systémová toxicita).

3. ZÁVĚREČNÁ ZPRÁVA

ZPRÁVA O PRŮBĚHU POKUSU

Ve zprávě o průběhu pokusu je třeba uvést tyto informace:

Rozpouštědlo / vehikulum :

- zdůvodnění volby vehikula
- rozpustnost a stabilita testované látky v rozpouštědle/vehikulu, pokud je známa.

Pokusná zvířata:

- použitý živočišný druh/kmen,
- počet, věk a pohlaví jedinců,
- původ, chovné podmínky, strava apod.,
- hmotnost jednotlivých zvířat na počátku testu, včetně hmotnostního rozpětí, průměrů a směrodatných odchylek pro jednotlivé skupiny.

Podmínky pokusu:

- pozitivní a negativní (rozpouštědlo/vehikulum) kontroly,
- údaje ze studie pro určení rozpětí, byla-li provedena,
- zdůvodnění volby i dávek,
- podrobnosti o přípravě testované látky,
- podrobnosti o podávání testované látky,
- zdůvodnění způsobu podávání,
- případné metody k ověření, že se látka dostala do krevního oběhu nebo do cílové tkáně,
- případný převod koncentrace látky v potravě/pitné vodě (ppm) na faktickou dávku (mg/kg hmotnosti /den),
- podrobnosti o kvalitě potravy a vody,
- podrobné schéma podávání testované látky a odběru vzorků,
- metody zjišťování toxicity,
- metoda přípravy a kultivace jaterních buněk,
- použitá autoradiografická metoda,
- počet připravených preparátů a počet hodnocených buněk,
- kritéria analýzy,
- kritéria, jimiž se studie hodnotí jako pozitivní, negativní nebo nejednoznačná.

Výsledky:

- průměrné hodnoty počtů stříbrných zrn v jádrech, cytoplazmě a „net nuclear grains“ pro jednotlivé preparáty, zvířata a skupiny,
- vztah dávka-odpověď, pokud je k dispozici,
- statistické hodnocení, bylo-li provedeno,
- známky toxicity,
- údaje ze souběžných negativních (rozpouštědlo/vehikulum) a pozitivních kontrol,
- historické údaje z negativních (rozpouštědlo/vehikulum) a pozitivních kontrol včetně rozpětí, průměrů a směrodatných odchylek,
- počet „buněk v opravě“, byl-li stanoven,
- počet buněk v S-fázi, byl-li stanoven,
- životaschopnost buněk.

*Diskuse výsledků.**Závěry.***B.40. LEPTAVÉ ÚČINKY NA KŮŽI****1. METODA****1.1 ÚVOD**

Evropské centrum pro validizaci alternativních metod (European Centre for the Validation of Alternative Methods, ECVAM, Joint Research Centre, European Commission) schválilo jakožto vědecky validní dva testy *in vitro* na leptavé účinky na kůži: test na principu měření transkutánního elektrického odporu kůže potkana

(transcutaneous electrical resistance, TER) a test využívající modelu lidské kůže. Validizační studie ECVAM prokázala, že oba testy dokáží spolehlivě rozlišovat mezi známými látkami leptajícími a neleptajícími kůži. Mimoto test vycházející z modelu lidské kůže umožňuje správně rozlišovat jednotlivé stupně leptavých účinků (známé látky způsobující těžké poleptání kůže R35, a ostatní látky způsobující poleptání kůže, R34). Je uveden popis a postupy obou testů; výběr mezi oběma testy závisí na konkrétních požadavcích a na preferencích uživatele.

1.2 DEFINICE

Poleptání kůže: způsobení nevratného poškození tkáně kůže po aplikaci testované látky.

1.3 REFERENČNÍ LÁTKY

Žádná referenční látka není specifikována, viz však odst. 1.5.3.4 a 1.7.2.3.

1.4 PRINCIP METODY - TEST TER NA KŮŽI POTKANA

Testovaný materiál se nanese na dobu až 24 hodin na epidermální povrch terčků kůže odebrané z mladých potkanů utracených humánním způsobem. Látky, které mají leptavé účinky, jsou identifikovány podle své schopnosti porušit normální integritu a bariérové funkce stratum corneum. Tato schopnost se měří jakožto pokles inherentního transkutánního elektrického odporu (TER) pod určitou prahovou hodnotu (5 k Ω) (4) (5). Dráždivé a nedráždivé látky TER pod prahovou hodnotu nesnižují. V případě detergentů a neutrálních organických látek (jejichž definici viz v lit. (6)) je možno do zkušební postupu zařadit test fixace barviva, aby se snížil počet falešných pozitivních výsledků, jež se u těchto typů chemických látek vyskytují (2) (7).

1.5 POPIS METODY - TEST TER NA KŮŽI POTKANA

1.5.1 Pokusná zvířata

Pro přípravu kožních terčků jsou používáni mladí (20- až 23-denní) potkani, Wistar nebo srovnatelný kmen. Malými nůžkami na zvířata se pečlivě odstraní srst z dorzální a boční plochy. Zvířata se pak omyjí pečlivým otíráním a oblast se ponoří do roztoku antibiotika, například streptomycinu, penicilinu, chloramfenikolu nebo amfotericinu, v koncentracích inhibujících růst bakterií. Třetí nebo čtvrtý den po prvním omytí se zvířata omyjí antibiotiky znovu a během 3 dní se použijí. Pro přípravu kožních vzorků nesmějí být zvířata starší než 31 dní.

1.5.2 Příprava terčků kůže

Zvířata se humánním způsobem usmrtí, sejme se kůže z dorzální plochy a z té se opatrně sloupne přebytečný tuk. Kůže se přiloží přes konec polytetrafluorethylenové (PTFE) trubice, a to epidermální stranou k trubici. Přes konec trubice se přetáhne gumový O-kroužek, kterým se kůže připne, a přebytečná tkáň se odřízne. Rozměry trubice a O-kroužku ukazuje obr. 1. Gumový O-kroužek se pak zatěsňuje pečlivě ke konci PTFE trubice žlutou vazelínou. Trubice se ponoří do nádoby obsahující roztok síranu hořečnatého (154 mM), kde je přidržována pružinovou sponou (obr. 2).

1.5.3 Popis postupu

1.5.3.1 Nanese testované látky

Je-li testovaná látka v tekutém stavu, nanese se na epidermální povrch uvnitř trubice (obr. 2). Je-li ve stavu pevném, nanese se na terčík v takovém množství, aby se pokryl celý povrch epidermis, na povrch látky se přidá 150 μ l deionizované vody a trubicemi se jemně zatřepe. Testovaná látka musí mít s kůží maximální možný kontakt. U některých pevných látek toho lze dosáhnout zahřátím látky na 30°C, aby se roztavila, nebo rozetřením zrnitého materiálu na jemný prášek. Použijí se vždy tři terčíky pro každou látku. Látka se nanáší na dobu 24 hodin (viz též 1.5.3.4) a odstraní se promýváním proudem vodovodní vody teplé maximálně 30°C tak dlouho, dokud se látka vyplavuje. Odstranění testované látky, která v trubici ztuhla, se dá napomoci vymýváním prudkým proudem vody teplé zhruba 30°C.

1.5.3.2 Měření TER

Transkutánní elektrický odpor (TER) se měří pomocí nízkonapětového impedančního můstku pro střídavý proud (např. AIM 401 nebo 6401 či ekvivalentního). Před měřením elektrického odporu se sníží povrchové napětí kůže přidávkou dostatečného objemu 70% ethanolu, kterým se pokryje epidermis. Po několika sekundách se ethanol odstraní tak, že se trubice otočí, a tkáň se hydratuje přidávkou tří mililitrů 154 mM roztoku síranu hořečnatého. Elektrody můstku se přiloží na obě strany kůže a změří se odpor v k Ω /terčík (obr. 2). Rozměry elektrod a délku holé elektrody pod krokosvorkou ukazuje obr. 1. Svorka vnitřní (silné) elektrody se během měření uloží navrch PTFE trubice tak, aby byla do roztoku síranu hořečnatého ponořena vždy stejná délka elektrody. Vnější (tenká) elektroda se uloží do receptorové komůrky tak, aby ležela na dně. Je třeba dodržovat konstantní vzdálenost mezi spodní hranou pružinové svorky a spodkem PTFE trubice (obr. 1), tato vzdálenost má vliv na získanou hodnotu odporu.

Upozorňujeme, že je-li naměřený odpor vyšší než 20 k Ω , může to být důsledek toho, že testovaná látka překrývá epidermální povrch terčíku kůže. Je možno se pokusit tento povlak odstranit, například tak, že se PTFE trubice utěsní palcem v rukavici a zhruba 10 sekund se protřepává, roztok síranu hořečnatého se vylije a měření odporu se opakuje s čerstvým roztokem.

Průměrná naměřená hodnota TER je akceptována, pokud hodnoty ze souběžné pozitivní a negativní kontroly leží v rozmezích přijatelných pro tuto metodu. Navrhované kontrolní látky a příslušná akceptovatelná rozmezí odporu pro popisovanou metodu a aparaturu jsou tyto:

Kontrola	Látka	Rozmezí odporu (k Ω)
Pozitivní	10 M kyselina chlorovodíková (36%)	0,5 – 1,0
Negativní	destilovaná voda	10 – 25

1.5.3.3 Modifikovaný postup pro povrchově aktivní látky a neutrální organické látky

Pokud je při testování povrchově aktivních látek (detergentů) nebo neutrálních organických látek hodnota TER menší nebo rovna 5 k Ω , lze na této tkáni provést

hodnocení průniku (penetrace) barviva. Tímto postupem se zjistí, zda se nejedná o výsledek falešně pozitivní (2).

1.5.3.3.1 *Nanesení a odstranění barviva sulforhodaminu B*

Po prvotním ošetření testovanou látkou se na epidermální povrch všech terčů nanesou na 2 hodiny po 150 μl 10% (w/v) roztoku sulforhodaminu B v destilované vodě. Terčíky kůže se pak zhruba po dobu 10 sekund oplachují prudkým proudem vodovodní vody, která má nejvýše pokojovou teplotu. Tím se má odstranit přebytečné (nenavázané) barvivo. Každý terčík kůže se pak opatrně sejme z PTFE trubice a uloží do nádoby (např. do 20 ml skleněných kyvet pro scintilaci) obsahující 8 ml deionizované vody. Nádoby se po dobu 5 minut jemně třepou, aby se odstranily veškeré zbytky přebytečného (nenavázaného) barviva. Tento oplach se opakuje. Pak se terčíky vyjmou a vloží do nádobek s 5 ml 30 % (w/v) roztoku dodecylsulfátu sodného (SDS) v destilované vodě, kde se přes noc inkubují při teplotě 60°C. Po inkubaci se terčíky vyjmou a zlikvidují a zbývající roztok se odstředí po dobu 8 minut při teplotě 21°C (relativní odstředivá síla ~175). Vzorek 1 ml supernatantu se pak zředí 30 % (w/v) roztokem SDS v destilované vodě v objemovém poměru 1 v 5 (v/v) (tj. 1 ml supernatantu + 4 ml roztoku SDS). Optická densita (OD) roztoku se měří při cca 565 nm.

1.5.3.3.2 *Výpočet obsahu barviva*

Obsah sulforhodaminu B v terčíku se vypočítá z hodnoty OD (molární extinkční koeficient sulforhodaminu B při 565 nm činí $8,7 \cdot 10^4$; molekulová hmotnost = 580). Obsah sulforhodaminu B se vypočítá pro každý terčík kůže zvlášť a stanoví se průměrná hodnota. Průměrná hodnota navázaného barviva je akceptována za podmínky, že souběžné kontrolní hodnoty spadají do akceptovatelného rozsahu této metody. Za akceptovatelná rozmezí obsahu barviva se u kontrolních látek při této metodě a experimentálním uspořádání považují:

Kontrola	Látka	Rozmezí obsahu barviva (μg / terčík)
Pozitivní	10 M kyselina chlorovodíková	40 – 100
Negativní	destilovaná voda	15 – 35

1.5.3.4 *Doplňující informace*

Je možné zvolit kratší dobu působení testované látky na terčík kůže (např. 2 hodiny) za účelem rozlišení silně leptajících látek. Ve validizační studii však bylo zjištěno, že test TER přeceňuje leptavé schopnosti některých testovaných látek aplikovaných na terčíky kůže na 2 hodiny (2), jakkoliv umožňuje správnou identifikaci leptajících a neleptajících látek po 24-hodinovém působení.

Získané hodnoty TER mohou být ovlivněny vlastnostmi a rozměry zkušební aparatury a experimentálním postupem. Prahová hodnota pro leptavé účinky 5 k Ω byla stanovena na základě údajů získaných na konkrétní aparatuře a při aplikaci postupu uvedeného zde. Pokud by se zkušební podmínky výrazně změnily, mohlo by být třeba použít jiných prahových a kontrolních hodnot. Proto se doporučuje okalibrovat metodiku i prahovou hodnotu otestováním řady referenčních standardů vybraných z látek, jež byly použity při validační studii (3).

1.6 PRINCIP ZKUŠEBNÍ METODY - TEST S MODELEM LIDSKÉ KŮŽE

Testovaný materiál se nanáší topicky na dobu až 4 hodin na trojrozměrný model lidské kůže, sestávající z rekonstruované epidermis s funkční stratum corneum. Leptající materiál se pozná podle schopnosti vyvolat pokles životnosti buněk stanovené například testem „MTT reduction assay“ (MTT = 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5 difenyl tetrazolium bromid) pod prahovou hodnotu definovanou pro danou expoziční dobu. Princip testu vychází z předpokladu, že látky způsobující poleptání kůže jsou ty, které dokáží proniknout skrze stratum corneum (difúzí nebo erozí) a jsou dostatečně cytotoxické, aby přivodily smrt buněk v hlubších buněčných vrstvách.

1.7 POPIS METODY - TEST S MODELEM LIDSKÉ KŮŽE

1.7.1 Modely lidské kůže

Modely lidské kůže mohou pocházet z různých zdrojů, musí však splňovat určitá kritéria. Model musí mít funkční stratum corneum s podkladovou vrstvou živých buněk. Bariérová funkce stratum corneum musí být přiměřeně zachována. To lze prokázat tím, že model bude rezistentní vůči cytotoxicitě po nanesení látek, o nichž je známo, že jsou pro buňky cytotoxické, které však normálně skrze stratum corneum neprocházejí. Model musí za definovaných experimentálních podmínek vykazovat reprodukovatelné výsledky.

Životnost živých buněk v modelu musí být dostačující k tomu, aby se dalo dobře rozlišit mezi látkami pozitivní a negativní kontroly. Životnost buněk (měřená například velikostí redukce MTT, tj. OD hodnotou) po expozici látky použité jako negativní kontrola musí ležet v přijatelných mezích pro daný model. Podobně v případě látky pro pozitivní kontrolu (ve srovnání s látkami pro negativní kontrolu) musí hodnoty životnosti spadat do určených mezí. Je velmi důležité, aby bylo prokázáno, že použitý predikční model odpovídá mezinárodnímu validačnímu standardu (2).

1.7.2 Popis postupu

1.7.2.1 Nanesení testovaného materiálu

Je-li testovaná látka tekutá, nanese se tak, aby pokrývala povrch kůže (minimální množství 25 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$). Je-li pevná, nanese se tak, aby pokrývala kůži, a následně se zvlhčí, aby se s kůží zajistil dobrý styk. Pokud je to třeba, pevné látky se před aplikací roztírají na prášek. U metody nanášení musí být prokázáno, že je vhodná pro široký rozsah látek (2). Po uplynutí doby expozice se materiál z povrchu kůže pečlivě smyje fyziologickým roztokem.

1.7.2.2 Měření životnosti buněk

K měření životnosti buněk se dá použít jakákoliv validizovaná kvantitativní metoda. Nejčastěji se používá redukce MTT, o které bylo prokázáno že v různých laboratořích poskytuje přesné a reprodukovatelné výsledky (2). Terčik kůže se na dobu 3 hodin ponoří do roztoku MTT o koncentraci 0,3 mg/ml při teplotě 20 - 28°C. Vyloučený modrý formazanový produkt se pak extrahuje (extrakce rozpouštědlem) a koncentrace formazanu se stanoví měřením OD při vlnové délce 545 a 595 nm.

1.7.2.3 Doplnující informace

Použitý model kůže i přesné dodržení doby působení, promývacího postupu atd. mají na životnost buněk významný vliv. Doporučuje se metodu i predikční model okalibrovat za použití řady referenčních standardů vybraných z látek použitých ve validizační studii ECVAM (3). Je nezbytně nutné, aby bylo prokázáno, že je použita metoda za použití široké škály látek reprodukovatelná podle mezinárodních standardů jak v rámci dané laboratoře, tak mezi různými laboratořemi. Minimálně musí metoda splňovat kritéria vědecké validity definované dříve (2) a výsledky takové validizační studie musí být zveřejněny ve takovém vědeckém časopise, ve kterém články před zveřejněním procházejí odbornou revizí.

2. ÚDAJE

1.8 ZPRACOVÁNÍ VÝSLEDKŮ

1.8.1 Test TER na kůži potkana

Hodnoty odporu (v $k\Omega$) pro testovaný materiál, pozitivní a negativní kontrolu a pro případné standardní referenční látky se uvádějí v tabelární formě, a to data pro všechny replikace a opakované experimenty, průměrné hodnoty a z nich vyvozená klasifikace.

1.8.2 Test s modelem lidské kůže

Hodnoty OD a vypočtené procento životaschopných buněk se pro testovaný materiál, pozitivní a negativní kontroly a případné standardní referenční látky uvádějí v tabelární formě, a to data pro všechny replikace a opakované experimenty, průměrné hodnoty a z nich vyvozená klasifikace.

1.9 VYHODNOCENÍ A INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

1.9.1 Test TER na kůži potkana

Pokud je průměrná hodnota TER pro testovaný materiál vyšší než 5 $k\Omega$, je látka neleptající. Je-li hodnota TER nižší nebo rovna 5 $k\Omega$ a nejedná se přitom o povrchově aktivní látku (detergent) či neutrální organickou látku, pak testovaná látka leptavé účinky má.

U povrchově aktivních látek (detergentů) a neutrálních organických látek, jež poskytují hodnoty TER nepřesahující 5 $k\Omega$, lze provést zkoušku penetrace barviva. Je-li obsah barviva v terčíku vyšší nebo rovný průměrnému obsahu barviva v terčíku při souběžně provedené pozitivní kontrole s 36 % HCl, je testovaná látka skutečně pozitivní a tedy má leptavé účinky, kdežto je-li obsah barviva v terčíku menší, je testovaná látka falešně pozitivní a tedy leptavé účinky nemá.

1.9.2 Test s modelem lidské kůže

Hodnota OD pro negativní kontrolu představuje 100 % životaschopnost buněk. Z hodnot OD pro jednotlivé zkušební vzorky se vypočte procentuální životnost vůči negativní kontrole. Hraniční procentický podíl životaschopných buněk, který

odděluje látky, které nezpůsobují poleptání kůže, od těch, které poleptání způsobují, respektive odlišuje jednotlivé třídy leptavých vlastností, musí být v predikčním modelu jasně definován předtím, než je metoda validována, a následnou validační studií se musí prokázat, že je tato hraniční hodnota odpovídající.

3. ZÁVĚREČNÁ ZPRÁVA

ZPRÁVA O PRŮBĚHU POKUSU

Ve zprávě o průběhu pokusu je třeba uvést tyto informace:

Testovaná látka:

- identifikační údaje, fyzikální stav, popřípadě fyzikálně-chemické vlastnosti; pokud se používají referenční látky, uvedou se tyto údaje i pro ně.

Podmínky pokusu:

- podrobný popis použitého postupu,
- popis a zdůvodnění všech případných modifikací.

Výsledky:

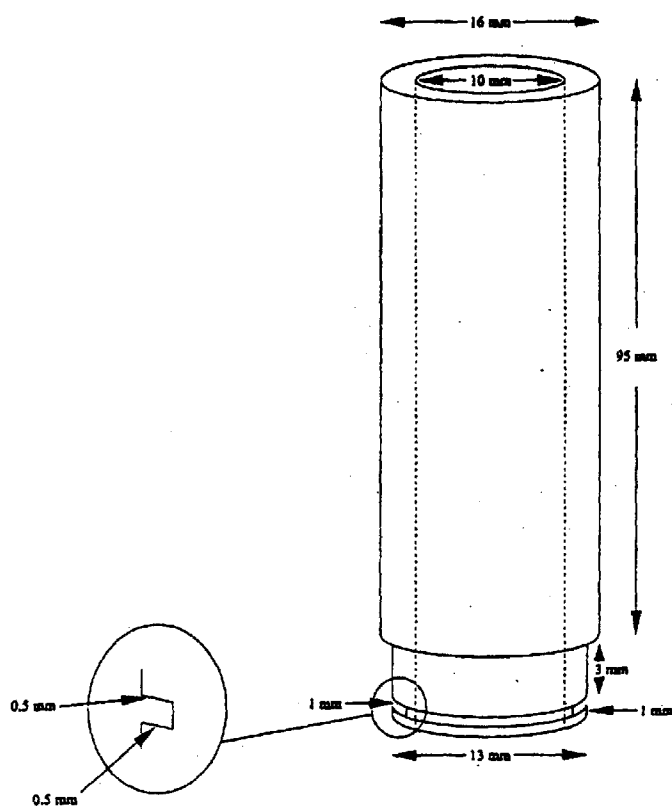
- tabulka hodnot odporu (test TER) nebo procentuální podíl životaschopných buněk (test s modelem lidské kůže) pro testovaný materiál, pozitivní a negativní kontroly a případné standardní referenční látky, a to údaje pro všechny replikace resp. opakované experimenty a průměrné hodnoty;
- popis všech jiných pozorovaných efektů.

Diskuse výsledků.

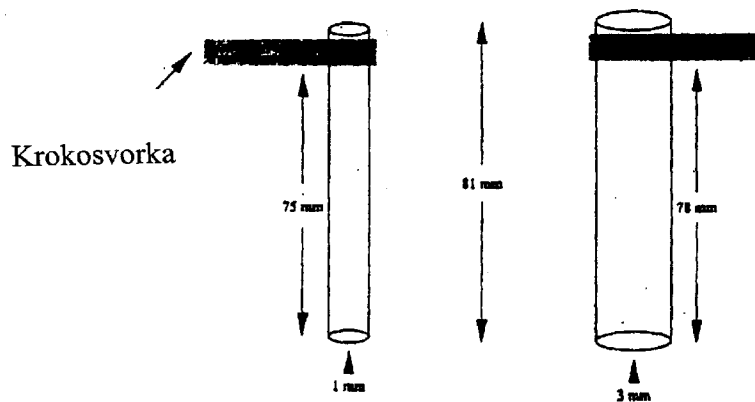
Závěry.

Obrázek 1

Rozměry PTFE trubice

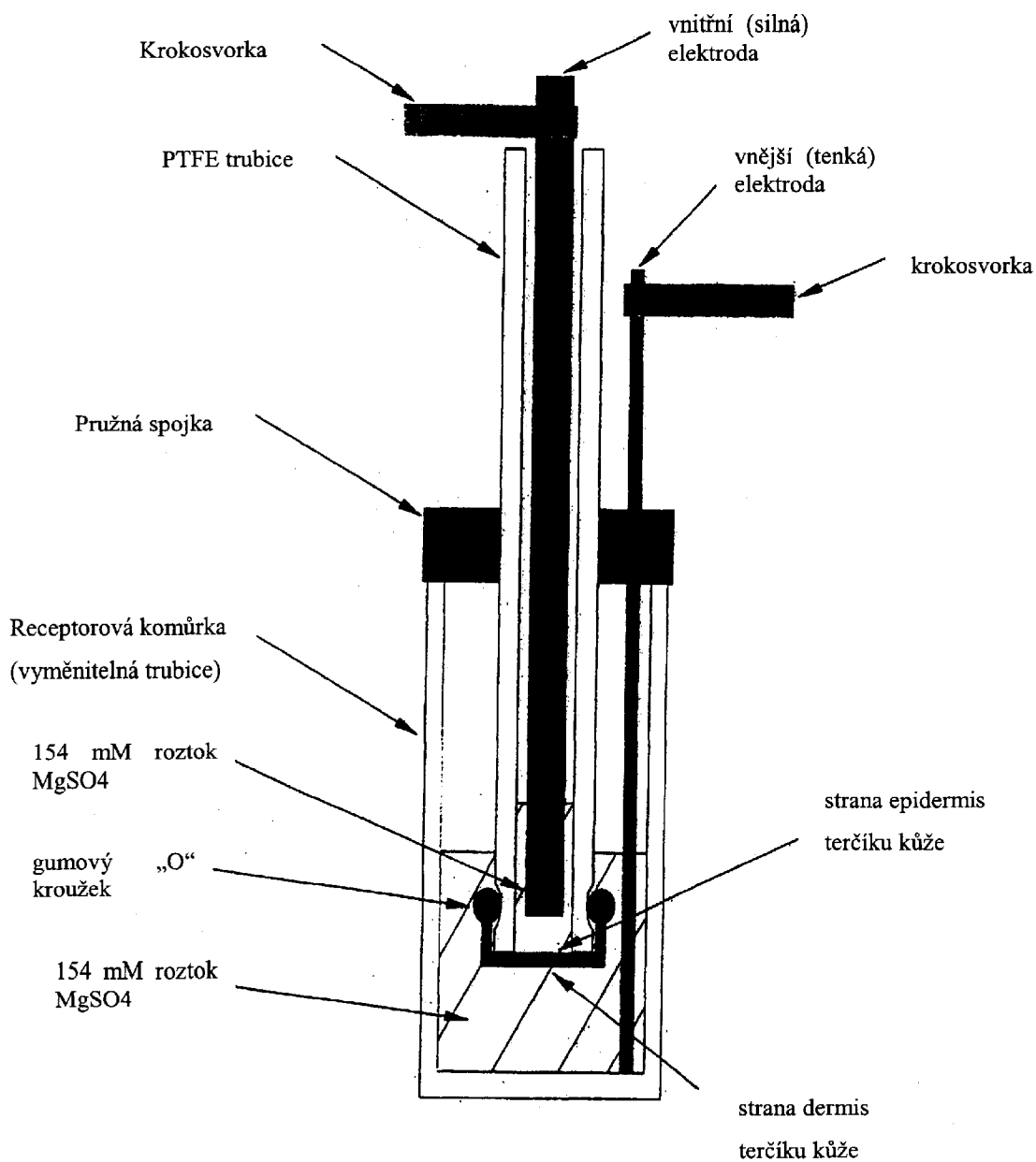


Rozměry elektrod



Obrázek 2

Aparatura pro test TER s kůží potkana



B.41. FOTOTOXICITA – TEST FOTOTOXICITY 3T3 NRU *IN VITRO*

1. METODA

1.1 ÚVOD

Fototoxicita je definována jako toxická odezva (reakce), k níž dochází, je-li kůže poprvé vystavena určitým chemickým látkám a následně pak světlu, nebo je-li podobně kůže ozářena po celkovém podání určité látky.

Informace získané v rámci testu fototoxicity 3T3 NRU *in vitro* slouží ke stanovení fototoxického potenciálu dané testované látky, tedy ke zjištění, zda daná látka ve spojení s expozicí ultrafialovému a viditelnému záření představuje možné nebezpečí nebo nikoli.

Toxikologickým výsledkem testu *in vitro* je stanovení fototoxicity vyvolané kombinovaným působením látky a světla, tímto testem je možné zjistit sloučeniny, které jsou fototoxické *in vivo* po celkové aplikaci a distribuci v kůži, a sloučeniny, jež působí jako fotoiritanty po topickém nanesení na pokožku.

Test fototoxicity 3T3 NRU *in vitro* byl vypracován a validován v rámci společného projektu EU/COLIPA z let 1992 – 1997 (1) (2) (3) jakožto validní alternativa *in vitro* vůči různým používaným testům *in vivo*. V roce 1996 doporučila pracovní schůze OECD přístup následných *in vitro* testů pro hodnocení fototoxicity (4).

Výsledky testu fototoxicity 3T3 NRU *in vitro* byly porovnány s akutními účinky fototoxicity/fotoiritace *in vivo* u zvířat a lidí a bylo zjištěno, že tento test má pro uvedené účinky vynikající predikční schopnosti. Test není navržen k tomu, aby předpovídal jiné nepříznivé účinky, jež mohou z kombinovaného působení látky a světla vzniknout, jako je fotogenotoxicita, fotoalergie nebo fotokarcinogenita, i když řada látek tyto specifické vlastnosti vykazuje, reaguje při testu fototoxicity 3T3 NRU *in vitro* pozitivně. Test není rovněž uspořádán tak, aby umožňoval hodnocení stupně fototoxicity.

Sekvenční přístup testování fototoxicity u chemických látek je přiložen viz dodatek.

1.2 DEFINICE

Irradiance: intenzita ultrafialového (UV) či viditelného záření dopadajícího na povrch; měřená ve W/m^2 nebo v mW/cm^2 .

Dávka světla: množství (= intenzita $\times$ čas) ultrafialového (UV) nebo viditelného (VIS) záření dopadajícího na povrch, vyjádřené v joulech (= $\text{W} \times \text{s}$) na jednotku povrchu, např. J/m^2 nebo J/cm^2 .

Pásma vlnových délek ultrafialového světla: podle doporučení CIE (Commission International de L'Eclairage) se používá označení UVA (315 – 400 nm), UVB (280 – 315 nm) a UVC (100 – 280 nm). Používají se i jiná vymezení: za hranici mezi pásmy UVA a UVB se často považuje 320 nm a UVA se někdy dělí na UV-A1 a UV-A2 s hranicí zhruba u 340 nm.

Životaschopnost (viabilita) buněk: parametr, kterým se měří celková aktivita buněčné populace (např. příjem barviva indikujícího živou buňku, neutrální červeně,

do buněčných lysozomů), jež podle parametrů měřených daným testem a jeho uspořádání koreluje s celkovým počtem resp. životností (vitalitou) buněk.

Relativní životaschopnost (viabilita) buněk: životaschopnost buněk vyjádřená v porovnání s negativními kontrolami (rozpouštědlo), které prošly celou procedurou testu (buď +UV nebo -UV), ovšem bez působení testované látky.

Predikční model: algoritmus, kterým se výsledky testu toxicity transformují do predikce toxického potenciálu. V tomto metodickém návodu pro test je možno k transformaci výsledků testu na fototoxicitu 3T3 NRU *in vitro* k predikci fototoxického potenciálu použít veličin PIF a MPE.

PIF (photo irritation factor, fotoiritační faktor): koeficient představující poměr dvou stejně účinných cytotoxických koncentrací (EC_{50}) testované látky získaných v nepřítomnosti (-UV) a v přítomnosti (+UV) necytotoxického UVA/VIS ozáření.

MPE (mean photo effect, střední fotoefekt): nová míra odvozená z matematické analýzy kompletního průběhu dvou křivek koncentrace–odezva získaných v nepřítomnosti (-UV) a v přítomnosti (+UV) necytotoxického UVA/VIS ozáření.

Fototoxická: akutní toxická reakce (odezva), která vzniká po první expozici kůže určité látky a následné expozici kůže světlu, nebo reakce která je obdobně navozena ozářením kůže po systémovém podání určité látky.

Fotoiritace: nižší úroveň pojmu „fototoxická“, týkající se pouze těch fototoxických reakcí, k nimž dochází v kůži poté, co na ni působí (topicky nebo orálně přijatá) nějaká látka. Tyto fototoxické reakce vedou vždy k nespecifickému poškození buněk (reakce podobné jako při nadměrném slunění).

Fotoalergie: získaná imunologická reaktivita, která se při prvním působení látky a světla neprojevuje, a kdy je zapotřebí jednotýdenní až dvoutýdenní indukční periody k tomu, aby se reaktivita kůže projevila.

Fotogenotoxická: genotoxická reakce (odezva) s genetickými projevy, ke které dochází poté, co byly buňky vystaveny negenotoxické dávce UV/VIS záření a negenotoxické látky.

Fotokarcinogenita: karcinogenita vyvolaná opakovanou aplikací světla a látky. Pokud je tumorogeneze vyvolaná UV zářením zesílena látkou, mluvíme o fotokokarcinogenitě.

1.3 REFERENČNÍ LÁTKY

Vedle chlorpromazinu jako látky pro pozitivní kontrolu, která je souběžně testována při každé studii, se pro zavedení testu na fototoxicitu 3T3 NRU doporučuje použít jako referenční látky podsoubor z látek, které byly použity při mezilaboratorním porovnávání tohoto testu (1) (3) (13).

1.4 PRVOTNÍ ÚVAHY

Fototoxické účinky byly pozorovány u řady látek (5) (6) (7) (8), jejichž jediným společným rysem je to, že dokáží absorbovat světelnou energii v oblasti slunečního záření. Podle prvního zákona fotochemie (Grotthausův-Draperův zákon) vyžaduje každá fotoreakce dostatečnou absorpci světelných kvant. Proto by se předtím, než se začne uvažovat o biologickém testování podle tohoto metodického návodu, mělo by se vždy stanovit absorpční spektrum testované látky v UV/VIS oblasti (například

podle zkušební metody OECD č. 101). Pokud je molární extinkční/absorpční koeficient nižší než $10 \text{ litrů} \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$, nemá látka fotoreaktivní potenciál a není třeba ji na škodlivé fotochemické účinky testovat ani testem na fototoxicitu 3T3 NRU *in vitro*, ani žádným jiným biologickým testem (viz dodatek).

1.5 PRINCIP METODY

Byly zjištěny čtyři mechanismy, kterými může absorpce světla (chemickým chromoforem vyústit ve fototoxickou reakci (7), přičemž všechny vedou k poškození buněk. Proto je test fototoxicity 3T3 NRU *in vitro* založen na porovnání cytotoxicity látky testované v přítomnosti a nepřítomnosti necytotoxické dávky UVA/VIS záření. Cytotoxicita se při tomto testu vyjadřuje jako koncentračně závislý pokles příjmu vitálního barviva, neutrální červeně (neutral red, NR) (9), 24 hodin po působení testované látky a ozařování.

Buňky Balb/c 3T3 se kultivují po dobu 24 hodin tak, aby se vytvořila kultura buněk v jedné vrstvě (monolayer). Pro každou testovanou látku se preinkubují dvě destičky po 96 jamkách s látkou v osmi různých koncentracích po dobu 1 hodiny. Jedna z obou destiček se pak vystaví necytotoxickému UVA/VIS záření v dávce 5 J/cm^2 UVA (+UV experiment), druhá destička se uchovává v temnu (-UV experiment). V obou destičkách se pak médium nahradí médiem kultivačním a po dalších 24 hodinách kultivace se pomocí inkorporace neutrální červeně (neutral red uptake, NRU) po dobu 3 hodin stanoví životaschopnost buněk. Pro každou z osmi koncentrací se stanoví relativní životaschopnost buněk, vyjádřená jako procento hodnot u negativních kontrol. K posouzení fototoxického potenciálu se porovnají koncentračně závislé reakce získané v přítomnosti (+UV) a v nepřítomnosti (-UV) záření, obvykle na úrovni EC_{50} , tj. při koncentraci inhibující životaschopnost buněk o 50 % v porovnání s kontrolami bez ovlivnění.

1.6 KRITÉRIA JAKOSTI

Citlivost buněk vůči záření UVA, historické údaje: u buněk je třeba pravidelně provádět kontrolu citlivosti vůči záření UVA. Buňky se nasadí v hustotě, která se používá při testu fototoxicity 3T3 NRU *in vitro*, příští den se vystaví záření UVA v dávce $1 - 9 \text{ J/cm}^2$ a další den se testem NRU stanoví životaschopnost buněk. Buňky splňují kritéria jakosti, jestliže jejich životaschopnost po ozaření dávkou UVA záření 5 J/cm^2 není nižší než 80 % životaschopnosti kontrolních vzorků uchovávaných v temnu. Při nejvyšší dávce UVA záření 9 J/cm^2 nemá být životaschopnost nižší než 50 % životaschopnosti vzorků uchovávaných v temnu. Tato kontrola se provádí zhruba po každé desáté pasáži buněk.

Citlivost buněk negativní kontroly vůči záření UVA, běžný test: test splňuje kritéria jakosti, jestliže negativní kontroly (buňky v Earlově vyváženém solném roztoku [Earl's balanced salt solution, EBSS] s 1 % roztokem dimethylsulfoxidu (DMSO) nebo ethanolu (EtOH) nebo bez nich vykazují v experimentu (+UVA) životaschopnost minimálně 80% v porovnání s neozařenými buňkami v témž rozpouštědle v rámci souběžného experimentu v temnu (-UVA).

Životaschopnost negativních kontrol: absolutní optická hustota ($\text{OD}_{540 \text{ NRU}}$) měřená v NR extraktu negativních kontrol ukazuje, zda oněch 1×10^4 buněk nasazených v každé jamce rostlo během dvou dnů testu s normální dobou zdvojnásobení. Test

splňuje kritéria akceptovatelnosti, je-li průměrná hodnota OD₅₄₀ NRU u kontrol bez ovlivnění větší nebo rovna 0,2.

Pozitivní kontrola: při každém testu na fototoxicitu 3T3 NRU *in vitro* je třeba provést souběžný test se známou fototoxickou látkou. Při validační studii EU/COLIPA byl jako látka pro pozitivní kontrolu použit chlorpromazin (CPZ); proto se tato látka doporučuje. Pro CPZ testovaný dle standardního protokolu v testu fototoxicity 3T3 NRU *in vitro* byla definována tato kritéria akceptovatelnosti: CPZ ozářený (+UVA): EC₅₀ = 0,1 – 2,0 µg/ml, CPZ neozářený (–UVA): EC₅₀ = 7,0 – 90,0 µg/ml. Fotoiritační faktor (PIF), tzn. posun hodnoty EC₅₀, má být minimálně 6.

Místo CPZ se pro souběžnou pozitivní kontrolu dají použít i jiné známé fototoxické látky, pokud jsou vhodné pro charakteristiku chemické skupiny nebo rozpustnosti testované (hodnocené) látky. V takovém případě je třeba na základě historických dat adekvátně definovat jako kritéria akceptovatelnosti rozsahy hodnot EC₅₀ a PIF nebo MPE (střední fotoefekt).

1.7 POPIS METODY

1.7.1 Příprava

1.7.1.1 Buňky

Při validační studii byla použita stabilizovaná buněčná linie myších fibroblastů Balb/c 3T3 klon 31, a to buď z ATCC nebo z ECACC; ta se proto doporučuje. Podle stejného protokolu se dají s úspěchem použít i jiné buňky nebo buněčné linie, pokud se kultivační podmínky upraví podle jejich specifických potřeb; je však třeba prokázat, že jsou stejně vhodné.

U buněk je třeba pravidelně kontrolovat, že nejsou kontaminovány mykoplazmaty, a smí se použít jen v případě, že je výsledek kontroly uspokojivý.

Jelikož citlivost buněk vůči UVA záření může s počtem pasáží narůstat, je třeba používat buňky Balb/c 3T3 z pasáže s nejnižším číslem, pokud možno nižším než 100. Citlivost buněk Balb/c 3T3 vůči UVA záření je třeba pravidelně kontrolovat, a to postupem kontroly jakosti popsaným v tomto metodickém návodu.

1.7.1.2 Média a kultivační podmínky

Pro rutinní pasážování buněk a během postupu je třeba používat vhodná kultivační média a inkubační podmínky. V případě buněk Balb/c 3T3 se jedná o DMEM obohacený 10 % séra novorozených telat, 4 mM glutaminu, penicilinem a streptomycinem a o inkubaci ve vlhkém prostředí při teplotě 37°C / 7,5 % CO₂. Je nezbytné, aby podmínky kultivace zajišťovaly buněčný cyklus v normálním historickém rozmezí pro dané buňky resp. buněčnou linii.

1.7.1.3 Příprava kultur

Buňky ze zmrazených zásobních kultur se nasadí v příslušné hustotě v kultivačním médiu a minimálně jednou se před použitím v testu na fototoxicitu 3T3 NRU *in vitro* pasážují.

Pro test fototoxicity se buňky nasadí v kultivačním médiu v takové hustotě, aby na konci testu (tj. kdy se stanovuje životaschopnost buněk 48 hodin po nasazení) nedošlo ke konfluenci (ke splnutí v souvislou, jednolitou vrstvu buněk). V případě buněk Balb/c 3T3 kultivovaných v destičkách s 96 jamkami se doporučuje hustota 1×10^4 buněk v jedné jamce.

Pro každou testovanou látku se buňky nasazují identicky na dvě destičky s 96 jamkami, které pak procházejí celým postupem za identických kultivačních podmínek, s výjimkou doby, kdy je jedna z destiček ozařována (+UVA/VIS) a druhá je uchovávána v temnu (–UVA/VIS).

1.7.1.4 Metabolická aktivace

Zatímco při všech testech *in vitro* pro posouzení genotoxického nebo karcinogenního potenciálu je obecným požadavkem použití metabolizujícího systému, není v případě fototoxikologie známa žádná látka, kde by k tomu, aby působila jako fototoxin *in vivo* nebo *in vitro*, bylo metabolické transformace zapotřebí. Nepokládá se proto ani za nutné, ani za vědecky odůvodněné, aby se tento test prováděl s nějakým metabolickým aktivačním systémem.

1.7.1.5 Testovaná látka / příprava

Testovaná látka musí být před použitím čerstvě připravena, ledaže údaje o její stabilitě prokazují, že se dá skladovat. Pokud je pravděpodobné, že by došlo k fotodegradaci, musí se příprava provádět pod červeným světlem.

Látka se rozpustí v pufovaném solném roztoku, například v Earlově vyváženém solném roztoku (EBSS) nebo ve fyziologickém roztoku pufovaném fosfátem (phosphate buffered saline, PBS), který – aby nemohlo dojít k interferenci během ozařování – nesmí obsahovat žádné proteinové složky ani barevné indikátory pH, pohlcující světlo.

Pokud je testovaná látka ve vodě omezeně rozpustná, rozpustí se ve vhodném rozpouštědle v koncentraci stonásobně vyšší, než je požadovaná konečná koncentrace, a následně se zředí v poměru 1 : 100 pufovaným solným roztokem. Pokud se používá rozpouštědlo, musí být přítomno v konstantním objemu 1 % (v/v) ve všech kulturách, tj. ve všech koncentracích testované látky i v negativních kontrolách.

Jako rozpouštědlo se doporučuje dimethylsulfoxid (DMSO) nebo ethanol (EtOH). Vhodná mohou být i další rozpouštědla s nízkou cytotoxicitou, například aceton, je však třeba vždy pečlivě zvážit jejich specifické vlastnosti, jako je případná reakce s testovanou látkou, potlačení fototoxického efektu nebo vychytávání radikálů.

Aby se napomohlo rozpouštění, dá se použít míchání resp. sonifikace, popřípadě ohřev na 37 °C

1.7.1.6 Ozařování UV světlem / příprava

Světelný zdroj: volba správného světelného zdroje a správná filtrace je při testování fototoxicity klíčovým faktorem. Záření v UVA a ve viditelné oblasti je obvykle spojováno s fotosenzibilizací (7) (10), kdežto záření UVB je v tomto směru méně relevantní, je přímo vysoce cytotoxické, přičemž jeho cytotoxicita se

při přechodu od 313 nm k 280 nm zvyšuje tisícinásobně. Mezi kritéria pro volbu světelného zdroje patří zásadní požadavek, aby emitoval vlnové délky, jež testovaná látka absorbuje, a aby byla světelná dávka (dosažitelná za přiměřenou dobu) postačující ke zjištění známých fotosenzibilizujících látek. Dále nesmějí být použité vlnové délky a dávky nepatřičně poškozující testovací systém – patří sem i vyzařování tepla (infračervená oblast).

Za optimální světelný zdroj se pokládají solární simulátory, jimiž se simuluje sluneční záření. Jako tyto simulátory se používají xenonové výbojky a dále (vysokotlaké) rtuťové halogenové výbojky – ty mají tu výhodu, že vyzařují méně tepla a jsou levnější, sluneční světlo však imitují hůře. Jelikož všechny solární simulátory emitují významné množství záření UVB, je třeba záření filtrovat tak, aby se toto vysoce cytotoxické záření dostatečně zeslabilo.

Pro test na fototoxicitu 3T3 NRU *in vitro* je třeba použít spektrum záření, kde se složka UVB prakticky nevyskytuje (UVA:UVB ~ 20 : 1). Příklad spektrálního rozložení filtrovaného záření solárního simulátoru použitého při validační studii testu na fototoxicitu 3T3 NRU *in vitro* je v práci (3).

Dozimetrie: intenzita světla (irradiance) se musí pravidelně před každým testem fototoxicity kontrolovat pomocí vhodného širokopásmového UV-metru, který musí být kalibrován pro daný zdroj. Funkčnost UV-metru je třeba kontrolovat, k čemuž se doporučuje použít druhý, referenční UV-metr téhož typu a kalibrace. Ideální je, když se v delších intervalech měří spektrální irradiance filtrovaného světelného zdroje a kontroluje se kalibrace širokopásmového UV-metru pomocí spektrometru; taková instrumentace ovšem vyžaduje kvalifikovanou obsluhu vyškoleného personálu.

Při validační studii bylo zjištěno, že dávka UVA záření 5 J/cm^2 je pro buňky Balb/c 3T3 necytotoxická a přitom dostatečně silná, aby excitovala i slabě fototoxické látky. Aby se této dávky dosáhlo během 50 minut, musí být irradiance nastavena na $1,666 \text{ mW/cm}^2$. Použije-li se jiná buněčná linie nebo jiný zdroj světla, musí se dávka záření UVA upravit tak, aby buňky nepoškozovala a byla dostatečná k průkazu standardních fototoxinů. Doba světelné expozice se vypočítává podle vzorce:

$$t \text{ (min)} = \frac{\text{dávka záření (J/cm}^2\text{)} \times 100}{\text{záření (mW/cm}^2\text{)} \times 60} \quad (1 \text{ J} = 1 \text{ W s})$$

1.7.2 Podmínky testu

Maximální koncentrace testované látky nemá převýšit hodnotu $100 \mu\text{g/ml}$, neboť všechny fototoxické látky byly detekovány při koncentracích nižších, při vyšších koncentracích se zvyšuje četnost falešně pozitivních výsledků (13). Hodnota pH při nejvyšší koncentraci testované látky musí být přijatelná (oblast pH 6,5 – 7,8).

Rozsah koncentrací testované látky při použití světla (+UVA) a bez něj (–UVA) je třeba stanovit v rámci předběžných experimentů. Rozsah a postup koncentrační řady se zvolí tak, aby křivky závislosti koncentrace-odezva byly dostatečně podloženy experimentálními údaji. Používá se koncentrační geometrická řada (s konstantním faktorem ředění).

1.7.3 Popis postupu

1.7.3.1 První den

Připraví se suspenze 1×10^5 buněk/ml v kultivačním médiu. Do periferních jamek 96 jamkové mikrotitrační destičky pro tkáňové kultury se odpipetuje po 100 μ l samotného média (= slepý pokus), do ostatních jamek se dává po 100 μ l buněčné suspenze o denzitě 1×10^5 buněk/ml ($=1 \times 10^4$ buněk na jamku). Pro každou testovanou látku se připraví dvě destičky – jedna pro stanovení cytotoxicity (–UVA), druhá pro stanovení fotocytotoxicity (+UVA).

Buňky se inkubují po dobu 24 hodin (7,5 % CO₂, 37 °C), aby se vytvořil semikonfluentní monolayer. Tato inkubační doba umožňuje regeneraci a adherenci buněk a jejich exponenciální růst.

1.7.3.2 Druhý den

Po inkubaci se kultivační médium z buněk odstraní a promyje dvakrát objemem 150 μ l EBSS/PBS na každou jamku. Přidá se 100 μ l EBSS/PBS obsahujícího testovanou látku v příslušné koncentraci nebo jenom rozpouštědlo (negativní kontrola). Testovaná látka se přidává v osmi koncentracích. Buňky s testovanou látkou se inkubují v temnu po dobu 60 minut (7,5 % CO₂, 37 °C).

Část testu s UVA (+UVA) se provádí tak, že se buňky za pokojové teploty ozařují po dobu 50 minut skrz víčko destičky s 96 jamkami zářením UVA o intenzitě 1,7 mW/cm² (= dávka 5 /cm²). Aby nedocházelo ke kondenzaci vody pod víčkem, je třeba použít ventilátoru. Duplicitní destičky (–UVA) se po dobu 50 minut (= expoziční doba UVA) uchovávají za pokojové teploty v temném boxu.

Roztok se odstraní a jamky se promyjí dvakrát 150 μ l EBSS/PBS. Poté se naplní kultivačním médiem a přes noc (18 – 22 hodin) se inkubují (7,5 % CO₂, 37 °C).

1.7.3.3 Třetí den

Mikroskopické hodnocení

Buňky se prohlédnou pod mikroskopem s fázovým kontrastem. Zaznamenají se změny morfologie buněk způsobené cytotoxickým účinkem testované látky. Tato kontrola se doporučuje, aby se eliminovaly experimentální chyby, ale při vyhodnocování cytotoxicity nebo fototoxicity se tyto záznamy nepoužijí.

Test příjmu neutrální červeně (NR)

Buňky se promyjí objemem 150 μ l předehřátého EBSS/PBS. Promývací roztok se odstraní jemným poklepem. Přidá se 100 μ l média s NR a inkubuje se při 37 °C ve zvlhčené atmosféře s 7,5 % CO₂ po dobu 3 hodin.

Po inkubaci se médium s NR odstraní a buňky se promyjí objemem 150 μ l EBSS/PBS, jenž se pak zcela a důkladně odstraní (je také možno destičky zcentrifugovat v obrácené poloze).

Přidá se přesně 150 μ l roztoku na uvolnění NR (čerstvě připravená směs ethanol/kyselina octová).

Mikrotitrační destičky se po dobu 10 minut rychle třepou na třepačce, dokud se NR z buněk nevyextrahuje a nevytvoří se homogenní roztok.

Na spektrofotometru se změří optická hustota extraktu NR při 540 nm za použití slepého pokusu jako srovnávacího roztoku. Údaje se uchovají ve vhodném formátu (např. ASCII) pro další analýzu.

2. ÚDAJE

1.8 KVALITA A KVANTITA ÚDAJŮ

Údaje musí umožňovat smysluplnou analýzu vztahu koncentrace-odezva při aplikaci UVA/VIS záření a bez ní. Je-li zjištěna cytotoxicita, koncentrační rozsah a postup jednotlivých koncentrací se nastaví tak, aby se experimentální údaje daly vyjádřit křivkou. Jelikož testovaná látka může být až do definované limitní koncentrace 100 µg/ml v experimentu ve tmě (–UVA) necytotoxická, ale při ozařování (+UVA) vysoce cytotoxická, může dojít k tomu, že se koncentrační rozsahy v obou částech experimentu budou muset řádově lišit, aby byl splněn požadavek adekvátní kvality dat. Pokud není cytotoxicita zjištěna v žádné z obou částí experimentu (ani při –UVA, ani při +UVA), postačuje testování s velkým rozestupem mezi jednotlivými dávkami až do nejvyšší koncentrace.

Jsou-li výsledky hraniční – blízko dělicí čáry predikčního modelu – je třeba test pro ověření opakovat.

Považuje-li se opakování testu za potřebné, může být důležité pozměnit experimentální podmínky, aby se dosáhlo jasného výsledku. Klíčovou proměnnou v tomto testu je příprava roztoků testované látky, nejvhodnější při jeho opakování je variace těchto podmínek (spolurozpouštědlo, trituration, sonifikace). Lze také uvažovat o změnách inkubační doby před ozařováním. U látek, jež jsou ve vodě nestálé, může mít významný vliv zkrácení doby.

1.9 ZPRACOVÁNÍ VÝSLEDKŮ

Pokud je to možné, stanoví se koncentrace testované látky vedoucí k 50 % inhibici buněčného příjmu NR (EC_{50}). To lze učinit tak, že se na data koncentrace-odezva použije jakákoliv vhodná metoda nelineární regrese (nejlépe Hillova funkce nebo logistická regrese) nebo se použije jiná vhodná metoda proložení (14). Než se hodnota EC_{50} použije pro další výpočty, je třeba zkontrolovat kvalitu proložení. K výpočtu hodnoty EC_{50} je také možno použít grafické metody. V tomto případě se doporučuje použít pravděpodobnostní papír (osa x: log, osa y: probit), protože po této transformaci bývá křivka koncentrace-odezva mnohdy téměř lineární.

1.10 VYHODNOCENÍ VÝSLEDKŮ (PREDIKČNÍ MODEL Y)

1.10.1 Predikční model, verze 1: fotoiritační faktor (PIF)

Pokud se získají úplné křivky koncentrace-odezva jak za přítomnosti (+UVA), tak za nepřítomnosti (–UVA) světla, se fotoiritační faktor (PIF) vypočítá podle vzorce

$$(a) \text{ PIF} = \frac{EC_{50}(-UV)}{EC_{50}(+UV)}$$

$$EC_{50} (+UV)$$

PIF < 5, nepředpovídá žádný fototoxický potenciál, kdežto PIF ≥ 5 fototoxický potenciál předpovídá.

Je-li látka cytotoxická pouze při +UVA, kdežto při -UVA je necytotoxická, nedá se PIF vypočítat, i když se jedná o výsledek, který indikuje, že látka má fototoxický potenciál. V takovém případě se dá vypočítat tzv. „> PIF“, když se test cytotoxicity (-UV) provede až po maximální zkušební koncentraci (C_{max}) a tato hodnota se dosadí do vzorce:

$$(b) >PIF = \frac{C_{max} (-UV)}{EC_{50} (+UV)}$$

Pokud se dá vypočítat pouze „>PIF“, pak každá hodnota > 1 předpovídá fototoxický potenciál.

Jestliže se nedá vypočítat ani $EC_{50} (-UV)$, ani $EC_{50} (+UV)$, protože látka nevykazuje cytotoxicitu až do nejvyšší zkušební koncentrace, je to indikací toho, že látka nemá žádný fototoxický potenciál. V takovém případě se používá formální „PIF = *1“, čímž se charakterizuje výsledek

$$(c) PIF = *1 = \frac{C_{max} (-UV)}{C_{max} (+UV)}$$

Pokud se dá získat pouze hodnota „PIF = *1“, předpovídá to, že není přítomen žádný fototoxický potenciál.

V případech (b) a (c) je třeba při predikci fototoxického potenciálu vzít bedlivě v úvahu koncentrace, jichž se při testu dosáhlo.

1.10.2 Predikční model, verze 2: střední fotoefekt (MPE)

Je možno také použít novější verze modelu pro predikci fototoxického potenciálu, vypracovaného za použití dat z validační studie EU/COLIPA (15) a odzkoušeného za podmínek slepé studie stanovení fototoxicity *in vitro* u látek UV filtrů (13). V tomto modelu jsou překonána omezení modelu PIF v těch případech, kde nelze získat hodnotu EC_{50} . V tomto modelu se používá veličina „střední fotoefekt“ (MPE) založená na porovnání celého průběhu křivek koncentrace-odezva. Pro aplikaci modelu MPE byl na Humboldtově univerzitě v Berlíně vyvinut speciální počítačový software, který lze obdržet zdarma.

1.11 INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

Pozitivní výsledek testu (PIF ≥ 5 nebo MPE ≥ 0,1) ukazuje, že daná látka má fototoxický potenciál. Pokud se k tomuto výsledku dojde při koncentracích nižších než 10 µg/ml, je pravděpodobné, že látka bude působit jako fototoxin také za různých expozičních podmínek *in vivo*. Získá-li se pozitivní výsledek pouze při nejvyšší zkušební koncentraci (100 µg/ml), bude pro posouzení nebezpečnosti nebo fototoxické schopnosti dané látky nejspíše zapotřebí dalších informací. Sem mohou spadat informace o penetraci, absorpci a možné akumulaci látky v kůži, nebo údaje z testování dané látky v jiném potvrzujícím alternativním testu, například za použití modelu lidské kůže *in vitro*.

Negativní výsledek testu fototoxicity 3T3 NRU *in vitro* ($PIF < 5$ nebo $MPE < 0,1$) ukazuje, že testovaná látka není fototoxická pro použité savčí buňky v daných podmínkách. V případech, kdy by se látka dala testovat i při nejvyšší koncentraci 100 µg/ml, negativní výsledek znamená, že látka nemá žádný fototoxický potenciál a fototoxicita *in vivo* se dá považovat za nepravděpodobnou. V případech, kdy byly při nižších koncentracích získány identické koncentrační závislosti toxické reakce ($EC_{50} +UV$ a $EC_{50} -UV$), je interpretace dat stejná. Naproti tomu pokud nebyla prokázána žádná toxicita (+UV ani -UV) a pro omezenou rozpustnost látky se nedalo dosáhnout koncentrace 100 µg/ml, je možno považovat tento test pro danou látku za ne zcela vhodný a mělo by se uvažovat o jiném, potvrzujícím testu (například s použitím modelu kůže *in vitro* nebo modelu kůže *ex vivo* nebo test *in vivo*).

3. ZÁVĚREČNÁ ZPRÁVA ZPRÁVA O PRŮBĚHU POKUSU

Ve zprávě o průběhu pokusu je třeba uvést tyto informace:

Testovaná látka:

- identifikační údaje a číslo CAS, je-li známo,
- fyzikální povaha a čistota,
- fyzikálně-chemické vlastnosti, jež jsou k provedení testu důležité,
- stabilita a fotostabilita, jsou-li známy.

Rozpouštědlo:

- zdůvodnění volby daného rozpouštědla,
- rozpustnost testované látky v tomto rozpouštědle,
- procentický podíl rozpouštědla v působícím médiu (EBSS nebo PBS).

Buňky:

- typ a zdroj buněk,
- nepřítomnost mykoplazmat,
- číslo buněčné pasáže, je-li známo,
- citlivost buněk vůči záření UVA stanovená pomocí ozařovacího zařízení, jež se v testu na fototoxicitu 3T NRU *in vitro* používá.

Podmínky pokusu (a) – inkubace před ovlivněním a po něm:

- typ a složení kultivačního média,
- podmínky inkubace (koncentrace CO₂, teplota, vlhkost),
- doba inkubace (zpracování před ni a po ní),.

Podmínky pokusu (b) – ovlivnění látkou:

- zdůvodnění volby koncentrací testované látky, které se použijí v přítomnosti ozařování UV/VIS zářením a bez něj,
- v případě omezené rozpustnosti testované látky a absence cytotoxicity zdůvodnění nejvyšší testované koncentrace,
- typ a složení působícího média (pufrovaný solný roztok),
- doba ovlivňování látkou.

Podmínky pokusu (c) – ozařování:

- zdůvodnění volby daného světleného zdroje,

- spektrální charakteristika záření světelného zdroje,
- charakteristiky propustnosti/absorpce použitého filtru (filtrů),
- charakteristika radiometru a podrobnosti o jeho kalibraci,
- vzdálenost světelného zdroje od testovaného systému,
- irradiance UVA (v mW/cm^2) při této vzdálenosti,
- doba expozice UV/VIS záření,
- dávka záření UVA (irradiance $\times$ čas) v J/cm^2 ,
- teplota buněčných kultur během ozařování a kultur souběžně uchovávaných v temnu.

Podmínky pokusu (d) – test NRU:

- složení média s NR,
- doba inkubace s NR,
- inkubační podmínky (koncentrace CO_2 , teplota, vlhkost),
- podmínky extrakce NR (extrakční činidlo, doba extrakce),
- vlnová délka, při které se spektrofotometricky odečítala optická hustota NR,
- druhá vlnová délka (referenční), byla-li použita,
- složení srovnávacího roztoku pro spektrofotometrii (blanku), pokud byl použit.

Výsledky:

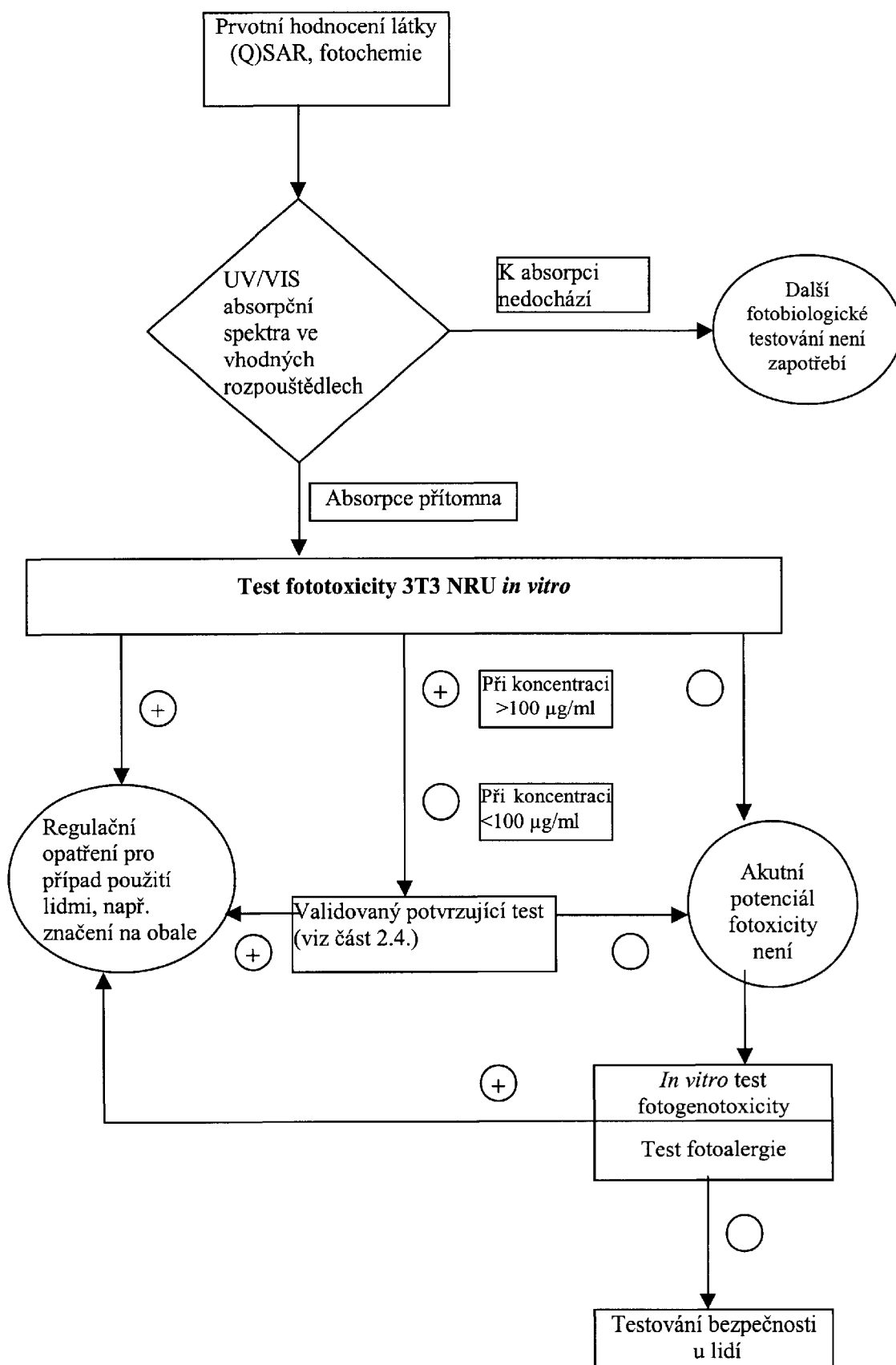
- životaschopnost buněk při jednotlivých koncentracích testované látky, vyjádřená v procentech vůči průměrné životaschopnosti kontrol,
- křivky koncentrace-odezva (koncentrace testované látky vs relativní životaschopnost buněk) získané souběžnými experimenty +UVA a -UVA,
- analýza křivek koncentrace-odezva: podle možnosti výpočet hodnot EC_{50} (+UVA) a EC_{50} (-UVA),
- porovnání obou křivek koncentrace-odezva získaných za použití ozařování UV/VIS světlem – výpočet buď fotoiritačního faktoru (PIF) nebo středního fotoefektu (MPE),
- klasifikace fototoxického potenciálu,
- kritéria akceptovatelnosti testu (a) – souběžná negativní kontrola:
 - absolutní životaschopnost (optická denzita extraktu NR) ozářených a neozářených buněk,
 - historické údaje negativních kontrol, průměr a směrodatná odchylka,
- kritéria akceptovatelnosti testu (b) – souběžná pozitivní kontrola:
 - hodnoty EC_{50} (+UVA), EC_{50} (-UVA) a PIF látky použité pro pozitivní kontrolu,
 - historické údaje látky použité pro pozitivní kontrolu: hodnoty EC_{50} (+UVA), EC_{50} (-UVA) a PIF, průměry a směrodatné odchylky.

Diskuse výsledků.

Závěry.

Dodatek

Úloha testu fototoxicity 3T3 NRU v sekvenčním přístupu k testování fototoxicity látek



7. Část Obsah přílohy zní:

„Obsah přílohy

- B. Metody stanovení toxicity – Všeobecný úvod
- B.1. Akutní toxicita orální (per os)
- B.1.bis Akutní toxicita orální (per os) - metoda fixní dávky
- B.1.tris Akutní toxicita (orální) - metoda stanovení třídy akutní toxicity
- B.2. Akutní toxicita (inhalační)
- B.3 Akutní toxicita (dermální)
- B.4. Akutní toxicita (kožní dráždivost)
- B.5. Akutní toxicita (oční dráždivost)
- B.6. Senzibilizace kůže
- B.7. Subakutní toxicita orální (per os) (28denní opakovaná aplikace)
- B.8. Subakutní toxicita inhalační (28denní opakovaná aplikace)
- B.9. Subakutní toxicita dermální (28denní opakovaná dávka)
- B.10. Mutagenita - test chromozómových aberací u savčích buněk *in vitro*
- B.11. Mutagenita - test chromozomových aberací v kostní dřeni savců *in vivo*
- B.12. Mutagenita - in vivo mikronukleus test v savčích erytrocytech
- B.13/14 Mutagenita - test reverzních mutací u bakterií
- B.15. Genové mutace-*Saccharomyces cerevisiae*
- B.16 Mitotická rekombinace - *Sacchoromyces cerevisiae*
- B.17. Mutagenita - test genových mutací v savčích buňkách *in vitro*
- B.18. Poškození DNA reparace - neplánovaná syntéza DNA - savčí buňky *in vitro*
- B.19. SCE - výměna sesterských chromatid *in vitro*
- B.20. Recesivní letální mutace vázané na pohlaví u *Drosophila melanogaster*
- B.21. Test transformace savčích buněk *in vitro*
- B.22. Dominantní letální test u hlodavců
- B.23. Analýza chromosómových aberací v savčích spermatogoniích
- B.24. Spot test u myši
- B.25. Přenosné translokace u myši
- B.26. Subchronická toxicita orální (90 denní opakované podávání per os, studie na hlodavcích)
- B.27. Subchronická toxicita orální (90 denní opakované podávání per os, studie na

- nehlodavcích)
- B.28. Subchronická toxicita dermální (90denní opakovaná aplikace, studie na hlodavcích)
- B.29. Subchronická toxicita inhalační (90denní opakovaná inhalační expozice, studie na hlodavcích)
- B.30. Testování chronické toxicity
- B.31. Studie teratogenity - hlodavci a nehlodavci
- B.32. Test karcinogenity
- B.33. Kombinovaný test chronické toxicity/karcinogenity
- B.34. Reprodukční toxicita - jednogenerační test
- B.35. Reprodukční toxicita - dvougenerační test
- B.36. Toxikokinetika
- B.37. Pozdní neurotoxicita organických sloučenin fosforu - akutní expozice
- B.38. Pozdní neurotoxicita organických sloučenin fosforu - 28denní opakovaná expozice
- B.39. Test neplánované syntézy dna v savčích jaterních buňkách *in vivo*
- B.40. Leptavé účinky na kůži
- B.41. Fototoxicita – test fototoxicity 3t3 nru *in vitro*. “.

Čl. II

Tato vyhláška nabývá účinnosti dnem vyhlášení.

Ministr:

prof. MUDr. Fišer, CSc. v. r.



Vydává a tiskne: Tiskárna Ministerstva vnitra, p. o., Bartůňkova 4, pošt. schr. 10, 149 01 Praha 415, telefon (02) 792 70 11, fax (02) 795 26 03 – Redakce: Ministerstvo vnitra, Nad Štolou 3, pošt. schr. 21/SB, 170 34 Praha 7-Holešovice, telefon: (02) 614 32341 a 614 33502, fax (02) 614 33502 – Administrace: písemné objednávky předplatného, změny adres a počtu odebíraných výtisků – MORAVIAPRESS, a. s., U Póny 3061, 690 02 Břeclav, telefon 0627/305 161, fax: 0627/321 417. Objednávky ve Slovenské republice přijímá a titul distribuuje Magnet-Press Slovakia, s. r. o., Teslova 12, 821 02 Bratislava, tel./fax: 00421 7 525 46 28, 525 45 59. Roční předplatné se stanovuje za dodávku kompletního ročníku včetně rejstříku a je od předplatitelů vybíráno formou záloh ve výši oznámené ve Sbírce zákonů. Závěrečné vyúčtování se provádí po dodání kompletního ročníku na základě počtu skutečně vydaných částek (první záloha na rok 2001 činí 3000,- Kč) – Vychází podle potřeby – Distribuce: celoroční předplatné i objednávky jednotlivých částek – MORAVIAPRESS, a. s., U Póny 3061, 690 02 Břeclav, telefon: 0627/305 179, 305 153, fax: 0627/321 417. Internetová prodejna: www.sbirkyzakonu.cz – Drobný prodej – Benešov: HAAGER – Potřeby školní a kancelářské, Masarykovo nám. 101; Bohumín: ŽDB, a. s., technická knihovna, Bezručova 300; Brno: Vyšehrad, s. r. o., Kapucínské nám. 11, Knihkupectví M. Ženíška, Květinářská 1, M.C.DES, Cejl 76, SEVT, a. s., Česká 14; České Budějovice: PROSPEKTRUM, Kněžská 18, SEVT, a. s., Česká 3; Hradec Králové: TECHNOR, Hořícká 405; Cheb: EFREX, s. r. o., Karlova 31; Chomutov: DDD Knihkupectví – Antikvariát, Ruská 85; Kadaň: Knihařství – Přibíková, J. Švermy 14; Kladno: eL VaN, Ke Stadionu 1953; Klatovy: Krameriovo knihkupectví, Klatovy 169/I.; Liberec: Podještědské knihkupectví, Moskevská 28; Most: Knihkupectví Šeříková, Ilona Růžičková, Šeříková 529/1057, Knihkupectví „U Knihomila“, Ing. Romana Kopková, Moskevská 1999; Napajedla: Ing. Miroslav Kučeřík, Svato-plukova 1282; Olomouc: ANAG, spol. s r. o., Denisova č. 2, BONUM, Ostružnická 10, Týcho, Ostružnická 3; Ostrava: LIBREX, Nádražní 14, Profesio, Hollarova 14, SEVT, a. s., Nádražní 29; Pardubice: LEJHANEC, s. r. o., Sladkovského 414; Plzeň: ADMINA, Úslavská 2, EDICUM, Vojanova 45, Technické normy, Lábkova pav. č. 5; Praha 1: Dům učebnic a knih Černá Labuť, Na Poříčí 25, FIŠER-KLEMENTINUM, Karlova 1, KANT CZ, s. r. o., Hybernská 5, LINDE Praha, a. s., Opletalova 35, Moraviapress, a. s., Na Florenci 7-9, tel.: 02/232 07 66, PROSPEKTRUM, Na Poříčí 7; Praha 2: ANAG, spol. s r. o., nám. Míru 9 (Národní dům), BMSS START, s. r. o., Vinohradská 190, NEWSLETTER PRAHA, Šafaříkova 11; Praha 4: PROSPEKTRUM, Nákupní centrum Budějovická, Olbrachtova 64, SEVT, a. s., Jihlavská 405; Praha 5: SEVT, a. s., E. Peškové 14; Praha 6: PPP – Staňková Isabela, Puškinovo nám. 17; Praha 8: JASIPA, Zenklova 60, Specializovaná prodejna Sbírky zákonů, Sokolovská 35, tel.: 02/24 81 35 48; Praha 10: Abonentní tiskový servis, Hájek 40, Uhřetěves; Přerov: Knihkupectví EM-ZET, Bartošova 9; Sokolov: KAMA, Kalousek Milan, K. H. Borovského 22, tel.: 0168/303 402; Šumperk: Knihkupectví D-G, Hlavní tř. 23; Tábor: Milada Šimonová – EMU, Budějovická 928; Teplice: L + N knihkupectví, Kapelní 4; Trutnov: Galerie ALFA, Bulharská 58; Ústí nad Labem: Severočeská distribuční, s. r. o., Havříská 327, tel.: 047/560 38 66, fax: 047/560 38 77; Zábřeh: Knihkupectví PATKA, Žižkova 45; Žatec: Prodejna U Pivovaru, Žižkovo nám. 76. Distribuční podmínky předplatného: jednotlivé částky jsou expedovány neprodleně po dodání z tiskárny. Objednávky nového předplatného jsou vyřizovány do 15 dnů a pravidelné dodávky jsou zahajovány od nejbližší částky po ověření úhrady předplatného nebo jeho zálohy. Částky vyšlé v době od zaevidování předplatného do jeho úhrady jsou doposílány jednorázově. Změny adres a počtu odebíraných výtisků jsou prováděny do 15 dnů. Reklamacce: informace na tel. čísle 0627/305 168. V písemném styku vždy uvádějte IČO (právnícká osoba), rodné číslo (fyzická osoba). Podávání novinových zásilek povoleno Českou poštou, s. p., Odštěpný závod Jižní Morava Ředitelství v Brně č. j. P/2-4463/95 ze dne 8. 11. 1995.