

Brusel 25. února 2019
(OR. en)

6800/19
ADD 1

COMPET 206
ENV 212
CHIMIE 36
MI 195
ENT 53
SAN 104
CONSOM 77
EMPL 121
SOC 153

PRŮVODNÍ POZNÁMKA

Odesílatel:	Evropská komise
Datum přijetí:	22. února 2019
Příjemce:	Generální sekretariát Rady
Č. dok. Komise:	Annex to D060575/02
Předmět:	NAŘÍZENÍ KOMISE (EU) .../... ze dne XXX, kterým se přizpůsobuje technickému pokroku příloha nařízení (ES) č. 440/2008, kterým se stanoví zkušební metody podle nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1907/2006 o registraci, hodnocení, povolování a omezování chemických látek (REACH)

Delegace naleznou v příloze dokument Annex to D060575/02.

Příloha: Annex to D060575/02

CS

PŘÍLOHA

Příloha nařízení (ES) č. 440/2008 se mění takto:

(1) V části B se kapitola B.4 nahrazuje tímto:

„B.4 AKUTNÍ DRÁŽDIVÉ A LEPTAVÉ ÚČINKY NA KŮŽI**ÚVOD**

1. Tato zkušební metoda je rovnocenná Pokynu OECD pro zkoušení (TG) 404 (2015). Pokyny OECD pro zkoušení chemických látek jsou pravidelně přezkoumávány s cílem zajistit, aby odrážely nejlepší dostupné vědecké poznatky. Při přezkumu Pokynu OECD pro zkoušení č. 404 byla zvláštní pozornost věnována možným zlepšením v oblasti dobrého zacházení se zvířaty a vyhodnocování veškerých existujících informací o zkoušené chemické látce s cílem vyhnout se zkouškám na laboratorních zvířatech, které nejsou nutné. Aktualizovaná verze Pokynu OECD pro zkoušení č. 404 (původně přijatého v roce 1981, revidovaného v letech 1992, 2002 a 2015) obsahuje odkaz na pokyny k integrovanému přístupu ke zkouškám a posuzování (IATA) dráždivých/leptavých účinků na kůži (1) a navrhuje pro zkoušení dráždivých a leptavých účinků na kůži modulový přístup. Integrované přístupy ke zkouškám a posuzování popisují několik modulů obsahujících informační zdroje a analytické nástroje a poskytují návod (i) na integraci a používání stávajících údajů ze zkoušek a dalších údajů pro posouzení potenciálu dráždivých a leptavých účinků chemických látek na kůži a (ii) a navrhuje přístup, když je nutné další zkoušení (1). Navíc se v případě potřeby v počáteční zkoušce *in vivo* doporučuje v tomto pokynu namísto současného aplikování postupná aplikace tří testovacích náplastí.
2. Definice dráždivých a leptavých účinků na kůži jsou uvedeny v dodatku této zkušební metody.

VÝCHOZÍ ÚVAHY

3. V zájmu spolehlivého vědeckého přístupu a dobrého zacházení se zvířaty by se zkoušky *in vivo* neměly provádět, dokud nebyly všechny dostupné údaje, významné pro potenciální leptavé nebo dráždivé účinky zkoušené chemické látky, vyhodnoceny na základě analýzy průkaznosti výsledků, jak se uvádí v pokynech k integrovanému přístupu ke zkouškám a posuzování dráždivých/leptavých účinků na kůži, tj. ve třech částech tohoto pokynu a v

příslušných modulech (1). Stručně řečeno, podle části 1 se stávající údaje hodnotí v sedmi modulech zahrnujících údaje o účincích na člověka, údaje *in vivo*, údaje *in vitro*, údaje o fyzikálně chemických vlastnostech (například pH, zejména silná kyselost nebo zásaditost) a jiné než zkušební metody. Podle části 2 se provádí analýza průkaznosti výsledků. Je-li tato analýza stále neprůkazná, je třeba provést další zkoušení podle části 3, přičemž se začíná metodami *in vitro* a zkoušení *in vivo* se používá až jako poslední možnost. Tato analýza by tedy měla snížit potřebu zkoušek leptavých nebo dráždivých účinků na kůži metodou *in vivo* u zkoušených chemických látek, u nichž již existují dostatečné důkazy z jiných studií, pokud jde o tyto dvě sledované vlastnosti.

PRINCIP ZKOUŠKY *IN VIVO*

4. Chemická látka, která má být zkoušena, se v jedné dávce nanese na kůži pokusného zvířete; oblasti neexponované kůže pokusného zvířete slouží jako kontrola. Ve stanovených intervalech se určí, vyhodnotí a následně popíše stupeň dráždivých/leptavých účinků, aby bylo možno provést úplné posouzení účinků. Doba studie by měla být dostatečně dlouhá, aby bylo možné zhodnotit vratnost nebo nevratnost pozorovaných účinků.
5. Zvířata, která v jakékoli fázi zkoušky vykazují přetrvávající příznaky značného utrpení a/nebo bolesti, se humánně utratí a zkoušená chemická látka se odpovídajícím způsobem vyhodnotí. Kritéria rozhodování o humánním usmrcení umírajících a značně trpících zvířat lze nalézt v samostatných pokynech OECD (2).

PŘÍPRAVA NA ZKOUŠKU *IN VIVO*

Výběr zvířecích druhů

6. Upřednostňovaným laboratorním zvířetem je albín králíka, používají se zdravá mladá dospělá zvířata. Použití jiného druhu by mělo být zdůvodněno.

Příprava zvířat

7. Asi 24 hodin před zahájením zkoušky se zvířatům ostříhá srst na zádech. Je třeba dbát na to, aby se kůže neporanila. Smějí se použít pouze zvířata se zdravou, neporaněnou kůží.
8. Některé kmeny králíka mají plošky husté srsti, které jsou v některých obdobích roku výraznější. Na takových oblastech husté srsti by se zkouška provádět neměla.

Podmínky chovu a krmení

9. Zvířata se chovají samostatně. Teplota v místnosti pro pokusná zvířata by měla být u králíků 20 °C ($\pm$ 3 °C). Ačkoli by relativní vlhkost vzduchu měla být minimálně 30 % a pokud možno by kromě doby úklidu místnosti neměla přesáhnout 70 %, cílem by měla být hodnota 50–60 %. Osvětlení by mělo být umělé a mělo by se střídát 12 hodin světla a 12

hodin tmy. Ke krmení lze použít konvenční laboratorní stravu s neomezeným přísunem pitné vody.

ZKUŠEBNÍ POSTUP

Aplikace zkoušené chemické látky

10. Zkoušená chemická látka se nanese na malou plochu kůže (asi 6 cm²) a pokryje se plátkem mulu s nedráždivou náplastí. V případech, kdy přímá aplikace není možná (např. kapaliny nebo některé pasty), by se měla zkoušená chemická látka nejprve nanést na plátek mulu, který se následně přiloží na kůži. Po dobu trvání expozice je třeba přidržovat plátek volně na kůži vhodným semiokluzivním obvazem. Pokud se zkoušená chemická látka nanáší na mul, měl by být na kůži připevněn tak, aby se zajistil dobrý kontakt s kůží a rovnoměrné rozložení zkoušené chemické látky na kůži. Je třeba zabránit tomu, aby se zvíře dostalo k mulu a zkoušenou chemickou látku požilo nebo vdechlo.
11. Kapalně zkoušené chemické látky se zpravidla aplikují neředěné. Při zkouškách pevných látek (které mohou být případně rozetřeny na prach) se zkoušená chemická látka navlhčí co nejmenším množstvím vody (v případě potřeby jiným vhodným vehikulem), aby se zajistil dostatečný kontakt s kůží. Pokud se používají jiná vehikula než voda, měl by být potenciální vliv vehikula na dráždivé účinky zkoušené chemické látky na kůži pouze minimální.
12. Po uplynutí doby expozice, která je obvykle 4 hodiny, se odstraní zbytky zkoušené chemické látky, pokud možno vodou nebo vhodným rozpouštědlem, aniž by došlo k ovlivnění odezvy nebo celistvosti kůže.

Úroveň dávek

13. Na testovací místo se nanese 0,5 ml kapaliny nebo 0,5 g pevné látky nebo pasty.

Počáteční zkouška (zkouška dráždivých/leptavých účinků na kůži *in vivo* s použitím jednoho zvířete)

14. Pokud byla na základě analýzy průkaznosti výsledků nebo na základě předchozího zkoušení *in vitro* zkoušená chemická látka posouzena jako žíravá, dráždivá nebo neklasifikovaná, není žádné další zkoušení *in vivo* obvykle nutné. Avšak v případech, kdy je opodstatněné získat doplňující údaje, provede se zkouška *in vivo* nejprve na jednom zvířeti a s použitím následujícího přístupu. Zvířeti se postupně přiloží tři testovací náplasti. První náplast se odstraní po třech minutách. Pokud není pozorována závažná kožní reakce, přiloží se na jiné místo druhá náplast a po jedné hodině se odstraní. Pokud pozorování v této fázi naznačují, že expozici lze bez porušení zásady humánního zacházení prodloužit na čtyři hodiny, přiloží se třetí náplast, která se po čtyřech hodinách odstraní, a vyhodnotí se odezva.

15. Pokud je po některé ze tří následných expozic pozorován leptavý účinek, zkouška se okamžitě ukončí. Pokud po odstranění třetí náplasti není leptavý účinek pozorován, zvíře se pozoruje po dobu 14 dnů, pokud se u něj poleptání kůže neprojeví dříve.
16. V takových případech, kdy se u zkoušené chemické látky nepředpokládá, že vyvolá leptavé účinky, ale může být dráždivá, by se měla jednomu zvířeti přiložit jedna náplast na čtyři hodiny.

Potvrzující zkouška (zkouška dráždivých účinků na kůži *in vivo* s dalšími zvířaty)

17. Pokud během počáteční zkoušky není pozorován leptavý účinek, měla by se dráždivá nebo negativní reakce potvrdit nejvýše na dvou dalších zvířatech, u každého s jednou náplastí a dobou expozice 4 hodiny. Pokud je během počáteční zkoušky pozorován dráždivý účinek, lze potvrzující zkoušku provést postupně, nebo exponováním dvou dalších zvířat současně. Ve výjimečném případě, kdy se počáteční zkouška neprovádí, lze dvěma nebo třem zvířatům přiložit jednu náplast, která se po čtyřech hodinách odstraní. Jestliže se použijí dvě zvířata a u obou se projeví stejná reakce, není žádné další zkoušení nutné. Jinak se zkouší také třetí zvíře. Neurčité reakce je možné zhodnotit na dalších zvířatech.

Doba pozorování

18. Doba studie by měla být dostatečně dlouhá, aby bylo možné plně zhodnotit vratnost pozorovaných účinků. Zkouška by však měla být ukončena kdykoliv v okamžiku, kdy zvíře vykazuje přetrvávající příznaky značné bolesti nebo utrpení. Za účelem určení vratnosti účinků by se zvířata měla pozorovat 14 dnů po odstranění náplastí. Pokud je vratnost pozorována před uplynutím 14 dnů, zkouška se v tomto okamžiku ukončí.

Klinická pozorování a hodnocení reakcí kůže

19. Všechna zvířata se pozorují na příznaky erytému a edému, reakce kůže se hodnotí po 60 min a dále po 24, 48 a 72 hodinách po odstranění náplasti. V počáteční zkoušce na jednom zvířeti se po odstranění náplasti okamžitě vyšetří také testované místo. Kožní reakce se vyhodnotí a zaznamenají podle stupnice v níže uvedené tabulce. Pokud se objeví poškození kůže, které po 72 hodinách nelze označit za dráždivé nebo leptavé účinky, může být nezbytné pokračovat v pozorování až do 14. dne kvůli stanovení vratnosti účinků. Kromě pozorování dráždivých účinků by měly být důkladně popsány a zaznamenány veškeré místní toxické účinky, jako je odtučnění kůže a jakékoli systémové nežádoucí účinky (např. vliv na klinické příznaky toxicity a tělesnou hmotnost). K objasnění neurčitých reakcí se zváží histopatologické vyšetření.
20. Hodnocení reakcí kůže je nevyhnutelně subjektivní. S cílem podporovat harmonizaci hodnocení reakcí kůže a napomáhat zkušebními laboratorii a těm, kdo provádějí a interpretují pozorování, musí být zaměstnanci provádějící pozorování odpovídajícím způsobem kvalifikováni pro práci s používaným systémem vyhodnocování (viz níže

uvedená tabulka). Jako pomůcku lze použít ilustrované pokyny pro hodnocení dráždivých účinků na kůži a jiných lézí (3).

ÚDAJE A PŘEDKLÁDÁNÍ ZPRÁV

21. Výsledky studie se shrnou do tabulky uvedené v závěrečné zprávě. Měly by zpracovávat všechny položky uvedené v odstavci 24.

Vyhodnocení výsledků

22. Stupně dráždivých účinků na kůži se zhodnotí ve spojení s povahou a závažností lézí a jejich vratností nebo nevratností. Jednotlivé stupně nepředstavují absolutní měřítko dráždivých vlastností látky, neboť se hodnotí také jiné účinky zkoušené látky. Jednotlivé stupně by spíše měly být považovány za referenční hodnoty, které je nutno zhodnotit společně s dalšími pozorováními vyplývajícími ze studie.
23. Při hodnocení dráždivých reakcí se zohlední vratnost kožních lézí. Pokud do ukončení čtrnáctidenní doby pozorování přetrvávají reakce jako alopecie (na omezené ploše), hyperkeratóza, hyperplazie a šupinatění, považuje se zkoušená chemická látka za dráždivou.

Závěrečná zpráva

24. Závěrečná zpráva musí obsahovat tyto údaje:

Odůvodnění zkoušení in vivo:

- analýza průkaznosti výsledků údajů z dřívějších zkoušek, včetně výsledků strategie postupného zkoušení, s posouzením závažnosti důkazů:
- popis relevantních údajů z předchozích zkoušek,
- údaje získané v každé fázi strategie zkoušení,
- popis provedených zkoušek *in vitro*, včetně podrobných údajů o postupech a o výsledcích získaných se zkoušenými/referenčními látkami,
- analýza závažnosti důkazů odůvodňující provedení studie *in vivo*.

Zkoušená chemická látka:

- jednosložková látka: chemická identifikace, např. název podle IUPAC nebo CAS, číslo CAS, kód SMILES nebo InChI, strukturní vzorec, čistota, případně chemická identita nečistot, je-li to prakticky možné, atd.,
- vícesložková látka, směs a látky s neznámým nebo proměnlivým složením, komplexní reakční produkty nebo biologické materiály (UVCB): charakterizované pokud možno

chemickou identitou (viz výše), kvantitativním výskytem a relevantními fyzikálně-chemickými vlastnostmi složek,

- fyzický vzhled, rozpustnost ve vodě a další relevantní fyzikálně-chemické vlastnosti,
- zdroj, číslo šarže, jsou-li k dispozici,
- případně ošetření zkoušených chemických/kontrolních látek před zkoušením (např. zahřátí, mletí),
- stabilita zkoušené chemické látky, datum použitelnosti nebo datum opětovné analýzy, je-li známo,
- podmínky skladování.

Vehikulum:

- identifikace, koncentrace (podle potřeby), použitý objem,
- zdůvodnění výběru vehikula.

Pokusná zvířata:

- použitý druh/kmen, zdůvodnění použití jiných zvířat, není-li použit albinotický králík,
- počet zvířat každého pohlaví,
- hmotnosti jednotlivých zvířat na začátku a na konci zkoušky,
- stáří na začátku studie,
- původ zvířat, podmínky chovu, strava atd.

Zkušební podmínky:

- technika přípravy oblasti kůže, na kterou se nanese náplast;
- podrobné údaje o materiálech použitých na náplasti a technice aplikování náplastí,
- podrobné údaje o přípravě zkoušené chemické látky, jejím nanesení a odstranění.

Výsledky:

- údaje o stupni odezvy na dráždivé nebo leptavé účinky u každého zvířete v každém okamžiku měření,
- popis všech pozorovaných lézí,
- podrobný popis povahy a stupně pozorovaných dráždivých nebo leptavých účinků a případné histopatologické nálezy,
- popis jiných místních (např. odtučnění kůže) a systémových účinků vedle dráždivých nebo leptavých účinků na kůži.

Diskuse o výsledcích

Závěry

LITERATURA

- (1) OECD (2014). Guidance document on Integrated Approaches to Testing and Assessment for Skin Irritation/Corrosion. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (No 203), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (2) OECD (1998) Harmonized Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances, as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals, November 1998.
- (3) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 19), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

TABULKA: HODNOCENÍ KOŽNÍCH REAKCÍ**Tvorba erytému a příškvaru**

Žádný erytém.....	0
Velmi slabý erytém (sotva patrný).....	1
Zřetelně viditelný erytém.....	2
Mírný až výrazný erytém.....	3
Těžký erytém (silné zrudnutí) nebo tvorba příškvaru znemožňující posouzení erytému....	4
Maximálně možné: 4	

Tvorba edému

Žádný edém.....	0
Velmi lehký edém (sotva patrný).....	1
Lehký edém (okraje jsou patrné, plocha je ohraničena zřetelným vyvýšením).....	2
Mírný edém (okraje vyvýšeny asi o 1 mm).....	3
Výrazný edém (zduření více než 1 mm a otok přesahující hranice exponované plochy)....	4
Maximálně možné: 4	

Pro objasnění neurčitých reakcí lze provést histopatologické vyšetření.

Dodatek

DEFINICE

Chemická látka je látka nebo směs.

Dráždivé účinky na kůži znamenají vyvolání vratných změn na kůži do 4 hodin po aplikaci zkoušené chemické látky.

Leptavé účinky na kůži znamenají vyvolání nevratného poškození kůže; zejména viditelné, do koria zasahující nekrózy pokožky, do čtyř hodin po aplikaci zkoušené chemické látky. Typickými reakcemi na poleptání jsou vředy, krvácení, krvavé strupy a v závěru čtrnáctidenního pozorování ztráta barvy v důsledku vyblednutí kůže, úplná ložiska alopecie a jizvy. K vyhodnocení sporných lézí by se měla uvážit histopatologie.

Zkoušená chemická látka je jakákoli látka nebo směs zkoušená touto zkušební metodou.“

(2) V části B se kapitola B.17 nahrazuje tímto:

„B.17 ZKOUŠKA NA GENOVÉ MUTACE V BUŇKÁCH SAVCŮ *IN VITRO* S POUŽITÍM GENŮ HPRT A XPRT

ÚVOD

1. Tato zkušební metoda je rovnocenná Pokynu OECD pro zkoušení (TG) č. 476 (2016). Zkušební metody se pravidelně přezkoumávají s ohledem na vědecký pokrok, měnící se potřeby regulace a dobré životní podmínky zvířat. Současná revidovaná verze zkušební metody B.17 odráží téměř třicet let zkušeností s touto zkouškou a vyplývá také z vývoje samostatné nové metody určené pro zkoušky na genové mutace v buňkách savců *in vitro* s použitím genu thymidinkinázy. Zkušební metoda B.17 je součástí série zkušebních metod v oblasti genetické toxikologie. Byl vypracován dokument, který obsahuje stručné informace o zkoušení v oblasti genetické toxikologie a přehled posledních změn, které OECD provedla ve svých pokynech ke zkoušení genotoxicity (1).
2. Účelem zkoušky na genové mutace v buňkách savců *in vitro* je detekce genových mutací vyvolaných chemickými látkami. Buněčné linie používané při těchto zkouškách měří přímé mutace reportérových genů, a to endogenního hypoxanthin-guaninfosforibosyltransferázového genu (Hprt v buňkách hlodavců, HPRT v lidských buňkách; v této zkušební metodě dále jen společně gen Hprt a zkouška HPRT) a xanthin-guaninfosforibosyltransferázového transgenu (gpt) (dále jen zkouška XPRT). Zkoušky na mutace HPRT a XPRT detekují různé spektrum genetických událostí. Kromě mutací detekovaných zkouškou HPRT (např. substituce párů bází, posunové mutace, malé delece a inserce) může autosomální lokace transgenu gpt umožnit detekci mutací vzniklých z velkých delecí a případně mitotickou rekombinací nezjištěnou zkouškou HPRT, protože se gen Hprt nachází v chromozomu X (2) (3) (4) (5) (6) (7). Pro účely regulace se zkouška XPRT v současnosti používá méně často než zkouška HPRT.
3. Použité definice jsou uvedeny v dodatku 1.

VÝCHOZÍ ÚVAHY A OMEZENÍ

4. Zkoušky prováděné *in vitro* obecně vyžadují použití vnějšího zdroje metabolické aktivace. Systém exogenní metabolické aktivace zcela nenapodobuje podmínky *in vivo*.
5. Je třeba zabránit vzniku podmínek, které by mohly vést k uměle pozitivním výsledkům (tj. možná interakce se zkušebním systémem), které nejsou způsobeny přímou interakcí mezi zkoušenými chemickými látkami a genetickým materiálem buňky; takové podmínky zahrnují změny pH nebo osmolality (8) (9) (10), interakci se složkami média (11) (12)

nebo nadměrné úrovně cytotoxicity (13). Pro zkoušku HPRT se cytotoxicita přesahující doporučené horní úrovně cytotoxicity stanovené v odstavci 19 považuje za nadměrnou.

6. Před použitím této zkušební metody ke zkoušení směsi s cílem získat údaje pro zamýšlené regulační účely by mělo být zváženo, zda tato metoda může pro tento účel poskytnout přiměřené výsledky, a pokud ano, proč tomu tak je. Takové posouzení není nutné, pokud existuje právní požadavek na zkoušení dané směsi.

PRINCIP ZKOUŠKY

7. Mutantní buňky s deficientní aktivitou enzymu Hprt při zkoušce HPRT nebo deficientní aktivitou enzymu xprt při zkoušce XPRT jsou rezistentní na cytostatické účinky 6-thioguaninu (TG), což je analog purinů. Buňky produkující Hprt (při zkoušce HPRT) nebo gpt (při zkoušce XPRT) jsou citlivé na TG, což způsobuje inhibici buněčného metabolismu a zastavuje další buněčné dělení. Mutantní buňky jsou tedy schopny proliferace za přítomnosti TG, zatímco normální buňky, které obsahují enzym Hprt (při zkoušce HPRT) nebo enzym gpt (při zkoušce XPRT), tuto schopnost nemají.
8. Buňky v suspenzi nebo jednovrstevné kultuře jsou po vhodné dobu (3–6 hodin) vystaveny zkoušené chemické látce jak s exogenním zdrojem metabolické aktivity (viz odstavec 14), tak bez něj, a poté subkultivovány za účelem stanovení cytotoxicity a za účelem exprese fenotypu před selekcí mutantů (14), (15), (16), (17). Cytotoxicita se stanoví podle relativního přežití, tj. účinnosti klonování měřené okamžitě po expozici a upravené podle případné ztráty buněk v průběhu expozice v porovnání s negativní kontrolou (odstavec 18 a dodatek 2). Exponované kultury se udržují v růstovém médiu po vhodné dobu charakteristickou pro každý typ buněk, aby nastala přibližně optimální fenotypová exprese indukovaných mutací (obvykle 7–9 dnů). Po fenotypové expresi se četnost mutantů stanoví tak, že se nasadí známý počet buněk do média obsahujícího selekční činidlo pro detekci mutantních kolonií a do média bez selekčního činidla, aby byla stanovena účinnost klonování (životaschopnost). Po vhodné inkubační době se spočítají kolonie. Četnost mutantů se vypočítá podle počtu mutantních kolonií korigovaného účinností klonování v době selekce mutantů.

POPIS METODY

Přípravky

Buňky

9. Typy buněk použité pro zkoušky HPRT a XPRT by měly vykazovat citlivost k chemickým mutagenům, vysokou klonovací schopnost, stabilní karyotyp a stabilní frekvenci spontánních mutací. Mezi nejčastěji používané buňky pro zkoušku HPRT patří buněčné linie CHO, CHL a V79 křečka čínské, buňky lymfomu L5178Y myši a lymfoblastoidní

buňky TK6 člověka (18) (19). Pro zkoušku XPRT se používají buňky AS52 odvozené z vaječníků křečka čínského obsahující transgen gpt (a které mají deletovaný gen Hprt) (20) (21); zkoušku HPRT nelze na buňkách AS52 provést, protože gen hprt je deletován. Použití jiných buněčných linií by mělo být zdůvodněno a validováno.

10. U buněčných linií by se měla pravidelně kontrolovat stabilita modální hodnoty počtu chromozomů a mělo by se zjišťovat, zda nejsou kontaminovány mykoplazmaty (22) (23). Pokud jsou kultury kontaminované nebo se modální hodnota počtu chromozomů změnila, neměly by se dotyčné kultury používat. Měla by být stanovena normální délka buněčného cyklu použitá ve zkušební laboratoři, která by měla být v souladu s buněčnými charakteristikami uvedenými v literatuře. Rovněž by měla být zkontrolována spontánní četnost mutací v zásobě základních buněk, a pokud četnost mutantů není přijatelná, zásoba by se neměla používat.
11. Před použitím v této zkoušce může být nezbytné odstranit z kultury již přítomné mutantní buňky, např. kultivací v médiu HAT pro zkoušku HPRT a v médiu MPA pro zkoušku XPRT (5) (24) (viz dodatek 1). Vyčištěné buňky mohou být uchovávány zmrazené a po rozmrazení použity jako pracovní zásoby. Právě rozmrazená pracovní zásoba může být použita pro zkoušku po dosažení normální rychlosti rozmnožování. Při provádění zkoušky XPRT by měla být rutinní kultura buněk AS52 použita za podmínek, které zajišťují zachování transgenu gpt (20).

Média a podmínky kultivace

12. Pro udržování kultur by mělo být použito vhodné kultivační médium a inkubační podmínky (kultivační nádoby, zvlhčená atmosféra s 5 % CO₂, inkubační teplota 37 °C). Buněčné kultury by měly být vždy uchovávány za podmínek, při nichž je zajištěn jejich logaritmický růst. Je zvláště důležité, aby byly média a podmínky kultivace zvoleny tak, aby byl zajištěn optimální růst buněk během období exprese a optimální účinnost klonování jak mutovaných, tak nemutovaných buněk.

Příprava kultur

13. Buněčné linie se pomnoží z kmenových kultur, nasadí se do kultivačního média v takové hustotě, aby u buněk v suspenzích nebo v monovrstvách pokračoval exponenciální růst v průběhu doby expozice a exprese (např. mělo by se zamezit konfluenci u buněk rostoucích v monovrstvách).

Metabolická aktivace

14. Při použití buněk, které mají nedostatečnou endogenní metabolickou schopnost, by se měly použít exogenní metabolizující systémy. Nejčastěji používaným systémem, který je standardně doporučován, pokud není zdůvodněno použití jiného systému, je kofaktorem dotovaná postmitochondriální frakce (S9) připravená z jater hlodavců (zpravidla potkanů)

zpracovaná činidlem indukujícím enzymy, jako je Aroclor 1254 (25) (26) (27) (28), nebo směsí fenobarbitalu a β -naftoflavonu (29) (30) (31) (32). Uvedená směs není v rozporu se Stockholmskou úmluvou o perzistentních organických znečišťujících látkách (33) a bylo prokázáno, že je stejně účinná jako Aroclor 1254 pro indukování oxidáz se smíšenou funkcí (29) (31). Frakce S9 je v konečném testovacím médiu obvykle používána v koncentracích od 1 % do 2 % obj., avšak koncentraci je možné zvýšit do 10 %. Volbu oprávněného typu a koncentrace systému exogenní metabolické aktivace nebo metabolického induktoru, který se použije, může ovlivnit třída zkoušených látek (34) (35) (36).

Příprava zkoušené chemické látky

15. Pevné zkoušené chemické látky by měly být před aplikací na buňky rozpuštěny ve vhodných rozpouštědlech a popřípadě zředěny (viz odstavec 16). Kapalné látky lze přidat přímo do zkušebních systémů a/nebo je lze před použitím k ošetření zkušebních systémů zředit. Plynné a těkavé zkoušené chemické látky by se měly zkoušet za použití vhodně upravených standardních protokolů, například prostřednictvím ošetření buněk v neprodyšně uzavřených kultivačních nádobách (37) (38). Měly by se používat čerstvě připravené zkoušené látky, pokud údaje o stálosti neprokazují možnost skladování.

ZKUŠEBNÍ PODMÍNKY

Rozpouštědla

16. Rozpouštědlo by mělo být zvoleno tak, aby optimalizovalo rozpustnost zkoušené chemické látky, aniž by nepříznivě ovlivnilo provádění zkoušky, např. měnilo růst buněk, ovlivňovalo integritu zkoušené chemické látky, reagovalo s kultivačními nádobami, narušovalo systém metabolické aktivace. Doporučuje se pokud možno nejprve zvážit použití vodného rozpouštědla (nebo kultivačního média). Dobře zavedenými rozpouštědly jsou například voda a dimethylsulfoxid. Podíl organických rozpouštědel by zpravidla neměl být větší než 1 % obj. a podíl vodných rozpouštědel (fyziologického roztoku nebo vody) v konečném expozičním médiu by neměl být větší než 10 % obj. Jsou-li použita jiná než osvědčená rozpouštědla (např. ethanol nebo aceton), mělo by být jejich použití podloženo údaji o jejich kompatibilitě se zkoušenými chemickými látkami a zkušebním systémem a o tom, že nejsou v použité koncentraci genotoxické. Pokud takové podpůrné údaje neexistují, je důležité přidat neexponované kontroly (viz dodatek 1) prokazující, že zvolené rozpouštědlo nevyvolává žádné škodlivé nebo mutagenní účinky.

Měření cytotoxicity a volba expozičních koncentrací

17. Při stanovení nejvyšší koncentrace zkoušené chemické látky by neměly být použity koncentrace, které jsou schopny vyvolat falešnou pozitivní odezvu, jako např. koncentrace, jež vyvolávají nadměrnou cytotoxicitu (viz odstavec 20), srážení kultivačního média (viz odstavec 21) nebo zřetelné změny pH nebo osmolality (viz odstavec 5). Pokud zkoušená

chemická látka v době jejího přidání způsobuje zřetelnou změnu hodnoty pH média, lze pH upravit pufováním konečného expozičního média tak, aby nedošlo k falešným pozitivním výsledkům a aby byly zachovány vhodné kultivační podmínky.

18. Volba koncentrace vychází z cytotoxicity a dalších faktorů (viz odstavce 20–22). Přestože hodnocení cytotoxicity při předběžné zkoušce může být užitečné a může napomoci k lepšímu určení koncentrací, jež mají být použity při hlavní zkoušce, předběžná zkouška není vyžadována. I v případě, že se provede předběžné hodnocení cytotoxicity, je při hlavním experimentu přesto požadováno měření cytotoxicity pro každou kulturu. Cytotoxicita by se měla hodnotit podle relativního přežití, tj. podle účinnosti klonování buněk umístěných na destičky okamžitě po expozici upravené podle případné ztráty buněk v průběhu expozice, a to podle počtu buněk, v porovnání s upravenou účinností klonování u negativních kontrol (s přiřazeným přežitím 100 %) (viz dodatek 2, kde je uveden vzorec).
19. Měly by se vyhodnotit nejméně čtyři zkušební koncentrace (nepočítaje v to kontroly s rozpouštědlem a pozitivní kontroly), které splňují kritéria přijatelnosti (vhodná cytotoxicita, počet buněk atd.). I když se doporučuje použít duplicitní kultury, lze pro každou zkušební koncentraci použít repliky nebo jednu exponovanou kulturu. Výsledky získané z duplicitních nezávislých kultur při dané koncentraci by měly být vykazovány samostatně, ale pro účely analýzy údajů je lze sloučit (17). U zkoušených látek, jež vykazují malou cytotoxicitu nebo nevykazují žádnou cytotoxicitu, budou obvykle vhodné přibližně dvojnásobné až trojnásobné intervaly koncentrací. V případě cytotoxicity by měly zvolené zkušební koncentrace pokrývat rozpětí od koncentrace vyvolávající cytotoxicitu po koncentrace, při nichž dochází ke střední a nízké cytotoxicitě nebo nedochází k žádné cytotoxicitě. Mnohé zkoušené chemické látky vykazují strmé křivky závislosti účinku na koncentraci, a aby bylo možné postihnout celý rozsah cytotoxicity nebo podrobně studovat závislost účinku na koncentraci, může být nezbytné zvolit menší rozdíly mezi jednotlivými koncentracemi a více než čtyři koncentrace, zejména v situacích, kdy je požadován opakovaný experiment (viz odstavec 43). Použití více než 4 koncentrací může být zvláště důležité, když se používá jedna kultura.
20. Je-li maximální koncentrace odvozena od cytotoxicity, měla by být nejvyšší koncentrace zvolena tak, aby se dosáhlo relativního přežití mezi 20 a 10 %. Je třeba dbát na to, aby byly interpretovány pouze ty pozitivní výsledky, které jsou vykazovány při relativním přežití 10 % nebo méně (odstavec 43).
21. V případě špatně rozpustných zkoušených chemických látek, které nejsou cytotoxické při koncentracích nižších, než je jejich rozpustnost, by nejvyšší analyzovaná koncentrace měla na konci expozice zkoušené chemické látky vyvolat zákal nebo sraženinu viditelnou pouhým okem nebo pomocí inverzního mikroskopu. Dokonce i v případech, kdy k výskytu cytotoxicity dochází při koncentracích vyšších, než je rozpustnost, se doporučuje testovat pouze při jedné koncentraci vyvolávající zákal nebo viditelné sraženiny, neboť sraženina

může vést k falešným účinkům. Při koncentraci, kdy vzniká sraženina, je třeba dbát na to, aby sraženina nemohla ovlivňovat provádění zkoušky. Užitečné může být stanovit rozpustnost v kultivačním médiu před pokusem.

22. Není-li pozorována sraženina nebo omezení cytotoxicity, měla by největší zkušební koncentrace odpovídat 10 mM, 2 mg/ml nebo 2 µl/ml, podle toho, která z uvedených hodnot je nejnižší (39) (40). Pokud u zkoušené chemické látky není stanoveno její složení, např. u látek s neznámým nebo proměnlivým složením, komplexních reakčních produktů nebo biologického materiálu (tj. chemické látky s neznámým nebo proměnlivým složením, (UVCB)) (41), přírodních extraktů atd., bude možná muset být při nedostatečné cytotoxicitě nejvyšší koncentrace vyšší (např. 5 mg/ml), aby se zvýšila koncentrace každé ze složek. Je však třeba poznamenat, že u humánních léčivých přípravků se tyto požadavky mohou lišit (42).

Kontroly

23. V okamžiku každého odběru by měly být použity souběžné negativní kontroly (viz odstavec 16) skládající se ze samotného rozpouštědla v kultivačním médiu, s nimiž se zachází stejným způsobem jako s exponovanými kulturami.
24. Souběžné pozitivní kontroly jsou nutné pro prokázání schopnosti laboratoře identifikovat mutageny za daných experimentálních podmínek a případně pro prokázání účinnosti exogenního systému metabolické aktivace. Příklady pozitivních kontrol jsou uvedeny v tabulce 1 níže. V odůvodněných případech mohou být k pozitivní kontrole použity jiné látky. Jelikož jsou zkoušky na buňkách savců *in vitro* za účelem stanovení genetické toxicity dostatečně standardizovány, mohou být provedeny zkoušky s použitím expozice s exogenní metabolickou aktivací a bez exogenní metabolické aktivace za použití pouze pozitivní kontroly vyžadující metabolickou aktivaci. V tomto případě tato reakce jediné pozitivní kontroly prokáže činnost systému metabolické aktivace i citlivost zkušebního systému. Každá pozitivní kontrola by měla být použita při jedné nebo více koncentracích, u nichž se očekává, že poskytnou reprodukovatelný a detekovatelný nárůst oproti pozadí, čímž se prokáže citlivost testovacího systému, a reakce by neměla být narušena cytotoxicitou přesahující limitní hodnoty stanovené v této zkušební metodě (viz odstavec 20).

Tabulka 1: Referenční látky doporučené pro posouzení způsobnosti laboratoře a pro výběr pozitivních kontrol.

Stav metabolické aktivace	Lokus	Látka a číslo CAS
Bez vnější metabolické aktivace	<i>Hprt</i>	ethyl-methansulfonát [CAS č. 62-50-0] 1-ethyl-1-nitrosomočovina [CAS č. 759-73-9] 4-nitrochinolin-1-oxid [CAS č. 56-57-5]

	<i>xprt</i>	streptonigrin [CAS č. 3930-19-6] mitomycin C [CAS č. 50-07-7]
S vnější metabolickou aktivací	<i>Hprt</i>	3-methylcholanthren [CAS č. 56-49-5] 7,12-dimethylbenzoanthracen [CAS č. 57-97-6] Benzo[e]pyren [CAS č. 50-32-8]
	<i>xprt</i>	Benzo[e]pyren [CAS č. 50-32-8]

POSTUP

Expozice zkoušené chemické látky

25. Proliferující buňky se vystaví zkoušené chemické látce jak za přítomnosti metabolického aktivačního systému, tak bez něho. Expozice by měla trvat vhodnou dobu (obvykle je postačující doba 3 až 6 hodin).
26. Minimální počet buněk použitých pro každou zkušební (kontrolní a exponovanou) kulturu v každém stádiu zkoušky by měl vycházet z četnosti spontánních mutací. Obecným pravidlem je exponovat a pasážovat dostatečný počet buněk, aby bylo v každé kultuře uchováno v každé fázi zkoušky 10 spontánních mutantů (17). Četnost spontánních mutací obvykle činí 5 až 20×10^{-6} . Aby byl při četnosti spontánních mutací 5×10^{-6} uchován dostatečný počet spontánních mutantů (10 nebo více) i v kulturách exponovaných při koncentracích, které vyvolávají při expozici 90% cytotoxicitu (10% relativní přežití), bylo by nutné exponovat alespoň 20×10^6 buněk. Kromě toho musí být v období exprese kultivován a umístěn na destičky pro výběr mutantů dostatečný počet buněk (nikdy však méně než 2 miliony) (17).

Doba exprese fenotypu a měření četnosti mutací

27. Na konci doby expozice se buňky kultivují za účelem umožnění exprese fenotypu mutantů. Obecně postačí minimálně 7 až 9 dnů, aby došlo k přibližně optimální fenotypové expresi nově indukovaných mutantů *Hprt* a *xprt* (43) (44). Během této doby jsou buňky pravidelně subkultivovány, aby se udržely ve fázi exponenciálního růstu. Po fenotypové expresi jsou buňky opět kultivovány v médiu se selekčním činidlem (6-thioguanin) a bez něj za účelem stanovení počtu mutantů, respektive účinnosti klonování v době selekce. Tato kultivace může být provedena pomocí misek u kultur v monovrstvách nebo pomocí mikrotitračních destiček u buněk v suspenzi. Pro selekci mutantů je třeba buňky kultivovat v takové hustotě, aby byla zajištěna optimální obnova mutací (tj. aby nedošlo k metabolické kooperaci) (17). Destičky se inkubují po dobu vhodnou pro optimální růst kolonie (např. 7–12 dnů) a kolonie se spočítají. Četnost mutantů se vypočítá podle počtu mutantních kolonií korigovaného účinností klonování v době selekce mutantů (viz dodatek 2, kde jsou uvedeny vzorce).

Způsobilost laboratoře

28. Aby bylo možné před zahájením rutinního zkoušení zjistit, zda laboratoř má s danou zkouškou dostatečné zkušenosti, měla by provést sérii experimentů s referenčními pozitivními látkami, jež působí prostřednictvím různých mechanismů (alespoň s jednou látkou účinnou s metabolickou aktivací a jednou účinnou bez metabolické aktivace, které se vyberou ze seznamu látek uvedeného v tabulce 1), a s různými negativními kontrolami (s použitím různých rozpouštědel/vehikul). Odezvy těchto pozitivních a negativních kontrol by měly být v souladu s odbornou literaturou. Tento požadavek neplatí pro laboratoře, které tuto zkušenost mají, tj. které mají k dispozici databázi historických údajů, jak je definována v odstavcích 30 až 33.
29. Výběr z látek pro pozitivní kontroly (viz tabulka 1 v odstavci 25) by měl být zkoumán bez metabolické aktivace a s metabolickou aktivací, aby byla prokázána způsobilost pro detekci mutagenních chemických látek, stanovení účinnosti systému metabolické aktivace a prokázání vhodnosti podmínek pro růst buněk v průběhu expozice, fenotypovou expresi a selekci mutantů a postupů hodnocení. Rozsah koncentrací by u vybraných látek měl být zvolen tak, aby poskytl opakovatelná zvýšení účinku v závislosti na dávce nad úroveň pozadí, aby se tak prokázala citlivost a dynamické rozpětí testovacího systému.

Historické kontrolní údaje

30. Laboratoř by měla stanovit:

- historické rozmezí a distribuci pozitivních kontrol,
- historické rozmezí a distribuci negativních kontrol (neexponovaných, s rozpouštědlem).

31. Při prvním získávání údajů o historické distribuci negativních kontrol by měly být výsledky souběžných negativních kontrol v souladu s publikovanými kontrolními údaji (22). S tím, jak je do distribuce kontrol přidáváno více údajů z experimentů, měly by být souběžné negativní kontroly v ideálním případě uvnitř 95 % kontrolních limitů této distribuce (17) (45) (46).
32. Nejprve by měla být vybudována historická databáze negativních kontrol dané laboratoře na základě nejméně 10 experimentů, avšak raději by měla zahrnovat nejméně 20 experimentů provedených za srovnatelných zkušebních podmínek. V laboratořích by měly být uplatňovány metody kontroly kvality, jako např. regulační diagramy (např. C-diagramy nebo diagramy X s pruhem (47)), z nichž je patrné, jak proměnlivé jsou jejich údaje o pozitivních a negativních kontrolách a že metodika je v dané laboratoři „pod kontrolou“ (46). Další doporučení, jak získat a používat historické údaje (tj. kritéria pro zařazení údajů do historické databáze a jejich vyřazení a kritéria přijatelnosti pro daný experiment), lze najít v literatuře (45).
33. Údaje o negativních kontrolách by měly zahrnovat četnost mutací z jedné kultury nebo raději z replikovaných kultur, jak je popsáno v odstavci 23. Výsledky souběžných

negativních kontrol by v ideálním případě měly spadat mezi 95 % kontrolních limitů distribuce v historické databázi negativních kontrol laboratoře (17) (45) (46). Pokud jsou údaje ze souběžných negativních kontrol mimo 95% rozmezí, může být přijatelné je zahrnout do dosavadní distribuce kontrol, pokud tyto údaje nejsou mimořádně odlehlé a pokud existují důkazy o tom, že testovací systém je „pod kontrolou“ (viz výše), a důkazy o tom, že nedošlo k technické nebo lidské chybě.

34. Jakékoli změny zkušebního protokolu by měly být zvažovány z hlediska jejich souladu se stávající historickou kontrolní databází laboratoře. Jakýkoli větší rozdíl ve zkušebním protokolu by měl vést k zavedení nové historické kontrolní databáze.

ÚDAJE A PŘEDKLÁDÁNÍ ZPRÁV

Vyjádření výsledků

35. Předložené výsledky by měly zahrnovat všechny údaje potřebné k výpočtu cytotoxicity (vyjádřené jako relativní přežití). Údaje za exponované i kontrolní kultury by měly zahrnovat počet buněk na konci expozice, počet buněk umístěných na destičky okamžitě po expozici a počet kolonií (nebo počet jamek bez kolonií u mikrotitrační metody). Relativní přežití u každé kultury by mělo být vyjádřeno jako procento ve vztahu k souběžné kontrole s rozpouštědlem (viz dodatek 1, kde jsou uvedeny definice).
36. Předložené výsledky by měly zahrnovat také všechny údaje potřebné k výpočtu četnosti mutací. Údaje za exponované i kontrolní kultury by měly zahrnovat: 1) počet buněk umístěných na destičky se selekčním činidlem a bez něj (v době, kdy jsou buňky umístěny na destičky pro selekci mutantů) a 2) počet spočtených kolonií (nebo počet jamek bez kolonií u mikrotitrační metody) z destiček se selekčním činidlem a bez něj. Četnost mutací se vypočítá podle počtu mutantních kolonií (na destičkách se selekčním činidlem) korigovaného účinností klonování (z destiček bez selekčního činidla). Četnost mutací by měla být vyjádřena jako počet mutantů na milion životaschopných buněk (viz dodatek 1, kde jsou uvedeny definice).
37. Měly by se uvést údaje za jednotlivé kultury. Kromě toho se všechny údaje shrnou do tabulky.

Kritéria přijatelnosti

38. Přijetí zkoušky je založeno na následujících kritériích:

- souběžná negativní kontrola je považována za přijatelnou pro přidání do historické databáze negativních kontrol laboratoře, jak je popsáno v odstavci 33,
- souběžné pozitivní kontroly (viz odstavec 24) by měly vyvolat odezvy, které jsou slučitelné s odezvami uvedenými v historické databázi pozitivních kontrol, a měly by vyvolat statisticky významný nárůst v porovnání se souběžnou negativní kontrolou,

- test se provede při dvou experimentálních uspořádáních (tj. s metabolickou aktivací a bez ní), pokud jedno z nich nevedlo k pozitivním výsledkům (viz odstavec 25),
- analyzovatelný je adekvátní počet buněk a koncentrací (odstavce 25, 26 a 19),
- kritéria pro výběr nejvyšší koncentrace jsou v souladu s kritérii popsány v odstavcích 20, 21 a 22.

Hodnocení a interpretace výsledků

39. Za předpokladu, že všechna kritéria přijatelnosti byla splněna, lze zkoušenou chemickou látku považovat za jasně pozitivní, pokud v některé ze zkoumaných experimentálních uspořádání:

- alespoň jedna ze zkušebních koncentrací vykazuje statisticky významný nárůst v porovnání se souběžnou negativní kontrolou,
- hodnocení pomocí vhodného trend-testu ukáže závislost tohoto nárůstu na koncentraci,
- všechny výsledky jsou mimo distribuci historických údajů o negativních kontrolách (např. mimo 95% rozmezí dle Poissonova rozdělení, viz odstavec 33).

Jsou-li splněna všechna tato kritéria, má se za to, že zkoušená chemická látka je schopna vyvolávat mutace genů v kultivovaných savčích buňkách v tomto testovacím systému. Doporučení ohledně nejvhodnějších statistických metod lze najít v literatuře (46) (48).

40. Za předpokladu, že všechna kritéria přijatelnosti byla splněna, je zkoušená chemická látka považována za jasně negativní, pokud ve všech zkoumaných zkušebních podmínkách:

- žádná ze zkušebních koncentrací nevykazuje statisticky významný nárůst v porovnání se souběžnou negativní kontrolou,
- hodnocení pomocí vhodného trend-testu ukáže, že nedochází k nárůstu účinku v závislosti na koncentraci,
- všechny výsledky spadají do rámce distribuce historických údajů o negativních kontrolách (např. 95% rozmezí dle Poissonova rozdělení, viz odstavec 33).

Pak se má za to, že zkoušená chemická látka není schopna vyvolávat mutace genů v kultivovaných savčích buňkách v tomto testovacím systému.

41. Ověření jasně pozitivní či jasně negativní odezvy není nutné.

42. V případech, kdy odezva není ani jasně negativní, ani jasně pozitivní, jak je popsáno výše, nebo s cílem napomoci při stanovení biologického významu výsledku, by měly být údaje vyhodnoceny na základě odborného posouzení a/nebo dalším šetřením. Užitečné by mohlo být provedení opakovaného experimentu, případně za použití upravených zkušebních

podmínek (např. rozsah koncentrací, jiné podmínky metabolické aktivace (např. koncentrace S9 nebo původ S9)).

43. Ve vzácných případech ani po dalším šetření nebude možné na základě daného souboru údajů dospět k závěru o pozitivitě či negativitě výsledku. Proto by měl být učiněn závěr, že odezva na zkoumanou chemickou látku je neurčitá (interpretováno jako stejná pravděpodobnost pozitivní nebo negativní odezvy).

Závěrečná zpráva

44. Závěrečná zpráva by měla obsahovat tyto informace:

Zkoušená chemická látka:

- zdroj, číslo šarže a je-li k dispozici, datum použitelnosti,
- stabilita zkoušené chemické látky samotné, je-li známa,
- rozpustnost a stabilita zkoušené chemické látky v rozpouštědle, jsou-li známy,
- měření pH, případně osmolality a sraženiny v kultivačním médiu, do něhož byla přidána zkoušená chemická látka.

Jednosložková látka:

- fyzický vzhled, rozpustnost ve vodě a další relevantní fyzikálně-chemické vlastnosti,
- chemická identifikace, např. název podle IUPAC nebo CAS, číslo CAS, kód SMILES nebo InChI, strukturní vzorec, čistota, případně chemická identita nečistot, je-li to prakticky možné, atd.

Vícesložková látka, látka s neznámým nebo proměnlivým složením, komplexní reakční produkt nebo biologický materiál a směsi:

- charakterizované v co možná nejvyšší míře chemickou identitou (viz výše), kvantitativním výskytem a relevantními fyzikálně-chemickými vlastnostmi složek.

Rozpouštědlo:

- zdůvodnění volby rozpouštědla,
- procentuální podíl rozpouštědla v konečném kultivačním médiu.

Buňky:

Pro základní laboratorní kultury:

- druh a zdroj buněčných linií,
- počet pasáží, je-li k dispozici, a historie v laboratoři,
- vlastnosti karyotypu a/nebo modální hodnota počtu chromozomů,

- metody udržování buněčných kultur,
- nepřítomnost mykoplasmat,
- doby zdvojnásobení buněk.

Zkušební podmínky:

- odůvodnění výběru koncentrací a počtu kultur, včetně např. údajů o cytotoxicitě a mezích rozpustnosti,
- složení média, koncentrace CO₂, vlhkost,
- koncentrace zkoušené chemické látky vyjádřená jako konečná koncentrace v kultivačním médiu (např. v µg nebo mg/ml nebo mM kultivačního média),
- koncentrace (a/nebo objem) rozpouštědla a zkoušené chemické látky přidaných do kultivačního média,
- inkubační teplota,
- inkubační doba,
- trvání expozice,
- hustota buněk během expozice,
- typ a složení použitého metabolického aktivačního systému (zdroj S9, metoda přípravy směsi S9, koncentrace nebo objem směsi S9 a S9 v konečném kultivačním médiu, kontroly jakosti S9),
- látky použité v pozitivních a negativních kontrolách, konečné koncentrace pro jednotlivé podmínky expozice,
- délka doby exprese (případně včetně počtu nasazených buněk, subkultur a výměny média),
- identifikace selekčního činidla a jeho koncentrace,
- kritéria přijatelnosti zkoušek,
- metody použité k počítání životaschopných a mutantních buněk;
- metody použité pro měření cytotoxicity,
- jakékoli doplňkové informace týkající se cytotoxicity a použité metody,
- délka inkubace po umístění na destičky;
- kritéria klasifikace studie na pozitivní, negativní nebo neurčitou;
- metody použité ke stanovení pH, osmolality a sraženiny.

Výsledky:

- počet exponovaných buněk a počet subkultivovaných buněk v každé kultuře,

- měření cytotoxicity, případně další pozorování,
- známky srážení a čas jejich stanovení,
- počet buněk kultivovaných v selektivním a neselektivním médiu;
- počet kolonií v neselektivním médiu a počet rezistentních kolonií v selektivním médiu a související četnosti mutací,
- závislost účinku na koncentraci, pokud je to možné,
- údaje o souběžných negativních kontrolách (rozpouštědlo) a pozitivních kontrolách (koncentrace a rozpouštědla),
- historické údaje o negativních (rozpouštědlo) a pozitivních kontrolách s rozpětími, středními hodnotami a směrodatnými odchylkami a interval spolehlivosti (např. 95 %) a rovněž počet údajů,
- statistické analýzy (pro jednotlivé kultury, případně spojené repliky) a případné p hodnoty.

Diskuse o výsledcích.

Závěr

LITERATURA

- (1) OECD (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, No. Series on Testing and Assessment, No 234, OECD, Paris.
- (2) Moore M.M., DeMarini D.M., DeSerres F.J. and Tindall, K.R. (Eds.) (1987). Banbury Report 28: Mammalian Cell Mutagenesis, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, New York.
- (3) Chu E.H.Y. and Malling H.V. (1968). Mammalian Cell Genetics. II. Chemical Induction of Specific Locus Mutations in Chinese Hamster Cells *In Vitro* , Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 61, 1306-1312.
- (4) Moore M.M., Harrington-Brock K., Doerr C.L. and Dearfield K.L. (1989). Differential Mutant Quantitation at the Mouse Lymphoma TK and CHO HGPRT Loci. *Mutagen. Res.*, 4, 394-403.
- (5) Aaron C.S. and Stankowski Jr. L.F. (1989). Comparison of the AS52/XPRT and the CHO/HPRT Assays: Evaluation of Six Drug Candidates. *Mutation Res.*, 223, 121-128.
- (6) Aaron C.S., Bolcsfoldi G., Glatt H.R., Moore M., Nishi Y., Stankowski L., Theiss J. and Thompson E. (1994). Mammalian Cell Gene Mutation Assays Working Group Report. Report of the International Workshop on Standardisation of Genotoxicity Test Procedures. *Mutation Res.*, 312, 235-239.
- (7) Li A.P., Gupta R.S., Heflich R.H. and Wasson J. S. (1988). A Review and Analysis of the Chinese Hamster Ovary/Hypoxanthine Guanine Phosphoribosyl Transferase System to Determine the Mutagenicity of Chemical Agents: A Report of Phase III of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-tox Program. *Mutation Res.*, 196, 17-36.
- (8) Scott D., Galloway S.M., Marshall R.R., Ishidate M., Brusick D., Ashby J. and Myhr B.C. (1991). Genotoxicity Under Extreme Culture Conditions. A Report from ICPEMC Task Group 9. *Mutation Res.*, 257, 147-204.
- (9) Morita T., Nagaki T., Fukuda I. and Okumura K. (1992). Clastogenicity of Low pH to Various Cultured Mammalian Cells. *Mutation Res.*, 268, 297-305.
- (10) Brusick D. (1986). Genotoxic Effects in Cultured Mammalian Cells Produced by Low pH Treatment Conditions and Increased Ion concentrations, *Environ. Mutagen.*, 8, 789-886.

- (11) Nesslany F., Simar-Meintieres S., Watzinger M., Talahari I. and Marzin D. (2008). Characterization of the Genotoxicity of Nitrilotriacetic Acid. *Environ. Mol. Mutation Res.*, 49, 439-452.
- (12) Long L.H., Kirkland D., Whitwell J. and Halliwell B. (2007). Different Cytotoxic and Clastogenic Effects of Epigallocatechin Gallate in Various Cell-Culture Media Due to Variable Rates of its Oxidation in the Culture Medium, *Mutation Res.*, 634, 177-183.
- (13) Kirkland D., Aardema M., Henderson L., and Müller L. (2005). Evaluation of the Ability of a Battery of Three *In Vitro* Genotoxicity Tests to Discriminate Rodent Carcinogens and Non-Carcinogens. I: Sensitivity, Specificity and Relative Predictivity. *Mutation Res.*, 584 1–256.
- (14) Li A.P., Carver J.H., Choy W.N., Hsie A.W., Gupta R.S., Loveday K.S., O'Neill J.P., Riddle J.C., Stankowski L.F. Jr. and Yang L.L. (1987). A Guide for the Performance of the Chinese Hamster Ovary Cell/Hypoxanthine-Guanine Phosphoribosyl Transferase Gene Mutation Assay. *Mutation Res.*, 189, 135-141.
- (15) Liber H.L., Yandell D.W. and Little J.B. (1989). A Comparison of Mutation Induction at the TK and HPRT Loci in Human Lymphoblastoid Cells; Quantitative Differences are Due to an Additional Class of Mutations at the Autosomal TK Locus. *Mutation Res.*, 216, 9-17.
- (16) Stankowski L.F. Jr., Tindall K.R. and Hsie A.W. (1986). Quantitative and Molecular Analyses of Ethyl Methanesulfonate- and ICR 191-Induced Molecular Analyses of Ethyl Methanesulfonate- and ICR 191-Induced Mutation in AS52 Cells. *Mutation Res.*, 160, 133-147.
- (17) Arlett C.F., Smith D.M., Clarke G.M., Green M.H.L., Cole J., McGregor D.B. and Asquith J.C. (1989). Mammalian Cell Gene Mutation Assays Based upon Colony Formation. In: *Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data*, Kirkland, D.J. (Eds.), Cambridge University Press, pp. 66-101.
- (18) Hsie A.W., Casciano D.A., Couch D.B., Krahn D.F., O'Neill J.P., and Whitfield B.L. (1981). The Use of Chinese Hamster Ovary Cells to Quantify Specific Locus Mutation and to Determine Mutagenicity of Chemicals; a Report of the Gene-Tox Program, *Mutation Res.*, 86, 193-214.
- (19) Li A.P. (1981). Simplification of the CHO/HGPRT Mutation Assay Through the Growth of Chinese Hamster Ovary Cells as Unattached Cultures, *Mutation Res.*, 85, 165-175.
- (20) Tindall K.R., Stankowski Jr., L.F., Machanoff R., and Hsie A.W. (1984). Detection of Deletion Mutations in pSV2gpt-Transformed Cells, *Mol. Cell. Biol.*, 4, 1411-1415.

- (21) Hsie A. W., Recio L., Katz D. S., Lee C. Q., Wagner M., and Schenley R. L. (1986). Evidence for Reactive Oxygen Species Inducing Mutations in Mammalian Cells. *Proc Natl Acad Sci.*, 83(24): 9616–9620.
- (22) Lorge E., Moore M., Clements J., Donovan M. O., Honma M., Kohara A., Van Benthem J., Galloway S., Armstrong M.J., Thybaud V., Gollapudi B., Aardema M., Kim J., Sutter A., Kirkland D.J. (2015). Standardized Cell Sources and Recommendations for Good Cell Culture Practices in Genotoxicity Testing. (Manuscript in preparation).
- (23) Coecke S., Balls M., Bowe G., Davis J., Gstraunthaler G., Hartung T., Hay R., Merten O.W., Price A., Schechtman L., Stacey G. and Stokes W. (2005). Guidance on Good Cell Culture Practice. A Report of the Second ECVAM Task Force on Good Cell Culture Practice, *ATLA*, 33, 261-287.
- (24) Rosen M.P., San R.H.C. and Stich H.F. (1980). Mutagenic Activity of Ascorbate in Mammalian Cell Cultures, *Can. Lett.* 8, 299-305.
- (25) Natarajan A.T., Tates A.D, Van Buul P.P.W., Meijers M. and de Vogel N. (1976). Cytogenetic Effects of Mutagens/Carcinogens after Activation in a Microsomal System *In Vitro*, I. Induction of Chromosomal Aberrations and Sister Chromatid Exchanges by Diethylnitrosamine (DEN) and Dimethylnitrosamine (DMN) in CHO Cells in the Presence of Rat-Liver Microsomes. *Mutation Res.*, 37, 83-90.
- (26) Abbondandolo A., Bonatti S., Corti G., Fiorio R., Loprieno N. and Mazzaccaro A. (1977). Induction of 6-Thioguanine-Resistant Mutants in V79 Chinese Hamster Cells by Mouse-Liver Microsome-Activated Dimethylnitrosamine. *Mutation Res.*, 46, 365-373.
- (27) Ames B.N., McCann J. and Yamasaki E. (1975). Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian-Microsome Mutagenicity Test. *Mutation Res.*, 31, 347-364.
- (28) Maron D.M. and Ames B.N. (1983). Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test. *Mutation Res.*, 113, 173, 215.
- (29) Elliott B.M., Combes R.D., Elcombe C.R., Gatehouse D.G., Gibson G.G., Mackay J.M. and Wolf R.C. (1992) Alternatives to Aroclor 1254-Induced S9 in *In Vitro* Genotoxicity Assays. *Mutagen.* 7, 175-177.
- (30) Matsushima T., Sawamura M., Hara K. and Sugimura T. (1976). A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems. In: *In Vitro Metabolic Activation in Mutagenesis Testing*, de Serres F.J., Fouts J.R., Bend J.R. and Philpot R.M. (Eds), Elsevier, North-Holland, pp. 85-88.

- (31) Ong T.-m., Mukhtar M., Wolf C.R. and Zeiger E. (1980). Differential Effects of Cytochrome P450-Inducers on Promutagen Activation Capabilities and Enzymatic Activities of S-9 from Rat Liver, *J. Environ. Pathol. Toxicol.*, 4, 55-65.
- (32) Johnson T.E., Umbenhauer D.R. and Galloway S.M. (1996). Human Liver S-9 Metabolic Activation: Proficiency in Cytogenetic Assays and Comparison with Phenobarbital/beta-Naphthoflavone or Aroclor 1254 Induced Rat S-9, *Environ. Mol. Mutagen.*, 28, 51-59.
- (33) UNEP. (2001). Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants, United Nations Environment Programme (UNEP). Dostupné na internetových stránkách: [<http://www.pops.int.html>].
- (34) Tan E.-L. and Hsie A.W. (1981). Effect of Calcium Phosphate and Alumina Gels on the Mutagenicity and Cytotoxicity of Dimethylnitrosamine as Studied in the CHO/HGPRT System. *Mutation Res.*, 84, 147-156.
- (35) O'Neill J.P., Machanoff R., San Sebastian J.R., Hsie A.W. (1982). Cytotoxicity and Mutagenicity of Dimethylnitrosamine in Camalian Cells (CHO/HGPRT system): Enhancement by Calcium Phosphate. *Environ. Mol. Mutation.*, 4, 7-18.
- (36) Li, A.P. (1984). Use of Aroclor 1254-Induced Rat Liver Homogenate in the Assaying of Promutagens in Chinese Hamster Ovary Cells. *Environ. Mol. Mutation*, 4, 7-18.
- (37) Krahn D.F., Barsky F.C. and McCooey K.T. (1982). CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids. In: Tice, R.R., Costa, D.L., Schaich, K.M. (eds.) *Genotoxic Effects of Airborne Agents*. New York, Plenum, pp. 91–103.
- (38) Zamora P.O., Benson J.M., Li A.P. and Brooks A.L. (1983). Evaluation of an Exposure System Using Cells Grown on Collagen Gels for Detecting Highly Volatile Mutagens in the CHO/HGPRT Mutation Assay. *Environ. Mutagen.* 5, 795-801.
- (39) OECD (2014). Document Supporting the WNT Decision to Implement Revised Criteria for the Selection of the Top Concentration in the *In Vitro* Mammalian Cell Assays on Genotoxicity (Test Guidelines 473, 476 and 487). K dispozici na požádání u Organizace pro hospodářskou spolupráci a rozvoj.
- (40) Brookmire L., Chen J.J. and Levy D.D. (2013). Evaluation of the Highest Concentrations Used in the *In Vitro* Chromosome Aberrations Assay, *Environ. Mol. Mutation*, 54, 36-43.

- (41) EPA, Office of Chemical Safety and Pollution Prevention. (2011). Chemical Substances of Unknown or Variable Composition, Complex Reaction Products and Biological Materials: UVCB Substances,
- (42) USFDA (2012). International Conference on Harmonisation (ICH) Guidance S2 (R1) on Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended for Human Use. Dostupné na internetových stránkách: [<https://federalregister.gov/a/2012-13774>].
- (43) O'Neill J.P. and Hsie A.W. (1979). Phenotypic Expression Time of Mutagen-Induced 6-thioguanine resistance in Chinese hamster ovary cells (CHO/HGPRT system), *Mutation, Res.*, 59, 109-118.
- (44) Chiewchanwit T., Ma H., El Zein R., Hallberg L., and Au W.W. (1995). Induction of Deletion Mutations by Methoxyacetaldehyde in Chinese Hamster Ovary (CHO)-AS52 cells. *Mutation, Res.*, 1335(2):121-8.
- (45) Hayashi M., Dearfield K., Kasper P., Lovell D., Martus H.J., and Thybaud V. (2011). Compilation and Use of Genetic Toxicity Historical Control Data, *Mutation, Res.*, 723, 87-90.
- (46) OECD (2014). Statistical Analysis Supporting the Revision of the Genotoxicity Test Guidelines. Environmental, Health and Safety, Series on testing and assessment (No 199), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (47) Richardson C., Williams D.A., Allen J.A., Amphlett G., Chanter D.O., and Phillips B. (1989). Analysis of Data from *In Vitro* Cytogenetic Assays. In: Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. Kirkland, D.J., (Ed) Cambridge University Press, Cambridge, pp. 141-154.
- (48) Fleiss J. L., Levin B., and Paik M. C. (2003). Statistical Methods for Rates and Proportions, Third Edition, New York: John Wiley & Sons.

Dodatek 1

DEFINICE

Mutageny substituce párů bází: chemické látky, které způsobují substituci párů bází v DNA.

Chemická látka: látka nebo směs.

Účinnost klonování: procento buněk kultivovaných v nízké hustotě, které jsou schopny se rozrůst do kolonií, jež mohou být spočítány.

Koncentrace: odkazuje na konečné koncentrace zkoušené chemické látky v kultivačním médiu.

Cytotoxicita: u zkoušek prováděných podle této zkušební metody se cytotoxicita vyjadřuje jako snížení relativního přežití exponovaných buněk v porovnání s negativní kontrolou (viz zvláštní odstavec).

Přímá mutace: genová mutace výchozího typu mutované formy, která způsobuje změnu nebo ztrátu enzymatické aktivity kódovaných bílkovin.

Posunové mutageny: chemické látky, které způsobují adici nebo delecí jednoho nebo více párů bází v molekule DNA.

Genotoxický: obecný termín zahrnující všechny typy poškození DNA nebo chromozomů včetně jejich rozlámání, aduktů, přestavby, mutací, chromozomálních aberací a aneuploidie. Ne všechny druhy genotoxických účinků způsobují mutace nebo stálé poškození chromozomů.

HAT médium: médium obsahující hypoxanthin, aminopterin a thymidin, které se používá na čištění mutantů Hprt.

Mitotická rekombinace: rekombinace mezi homologními chromatidami v průběhu mitózy, v jejímž důsledku může dojít k vyvolání zlomů dvojvláken DNA nebo ke ztrátě heterozygotnosti.

MPA médium: médium obsahující xanthin, adenin, thymidin, aminopterin a kyselinu mykofenolovou, které se používá na čištění mutantů Xprt.

Mutagenní: produkující dědičné změny sekvence (sekvencí) párů bází DNA v genech nebo struktury chromozomů (chromozomové aberace).

Četnost mutací: počet pozorovaných kolonií mutací dělený počtem buněk kultivovaných v selektivním médiu, korigovaný účinností klonování (nebo životaschopností) v době selekce.

Doba exprese fenotypu: doba po expozici, během níž v genomu vznikne genetická změna a všechny dříve existující genové produkty vymizí do té míry, že se změní fenotypová

vlastnost.

Relativní přežití: relativní přežití se používá jako míra cytotoxicity související s expozicí. Relativní přežití je účinnost klonování buněk umístěných na destičky okamžitě po expozici, upravené podle případné ztráty buněk v průběhu expozice v porovnání s upravenou účinností klonování u negativních kontrol (s přiřazeným přežitím 100 %).

Jaterní frakce S9: supernatant homogenátu jater po odstředění při 9 000 g, tj. surový jaterní extrakt.

Směs S9: směs jaterní frakce S9 a kofaktorů nezbytných pro metabolickou aktivaci enzymů.

Kontrola s rozpouštědlem: obecný termín k označení kontrolních kultur, ke kterým se přidává pouze rozpouštědlo používané k rozpuštění zkoušené chemické látky.

Zkoušená chemická látka: jakákoli látka nebo směs zkoušená touto zkušební metodou.

Neexponovaná kontrola: kultury, které se neexponují (tj. ani chemické látky, ani rozpouštědlo), ale zpracovávají se souběžně stejným způsobem jako kultury, k nimž se přidává zkoušená chemická látka.

UVCB: Chemické látky s neznámým nebo proměnlivým složením, komplexní reakční produkty nebo biologický materiál.

Dodatek 2**VZORCE PRO STANOVENÍ CYTOTOXICITY A ČETNOSTI MUTACÍ**

Cytotoxicita se hodnotí podle relativního přežití, tj. podle účinnosti klonování (CE) buněk umístěných na destičky okamžitě po expozici, upravené podle případné ztráty buněk v průběhu expozice v porovnání s upravenou účinností klonování u negativních kontrol (s přiřazeným přežitím 100 %) (viz vzorec pro relativní přežití níže).

Upravená účinnost klonování u kultury exponované zkoušené chemické látky se vypočítá jako:

$$\text{Upravená CE} = \frac{\text{Počet buněk na konci expozice}}{\text{Počet buněk na počátku expozice}}$$

Relativní přežití (RS) u kultury exponované zkoušené chemické látky se vypočítá jako:

$$\text{RS} = \frac{\text{Upravená CE v exponované kultuře}}{\text{Upravená CE v kontrole s rozpouštědlem}} \times 100$$

Četnost mutací je účinnost klonování kolonií mutací v selektivním médiu dělena účinností klonování v neselektivním médiu, měřená u stejné kultury v době selekce.

$$\text{Četnost mutací} = \frac{\text{Účinnost klonování kolonií mutací v selektivním médiu}}{\text{Účinnost klonování kolonií v neselektivním médiu}}$$

Když se pro účinnost klonování používají destičky:

CE = počet kolonií / počet buněk umístěných na destičky.

Když se pro účinnost klonování používají mikrotitrační destičky:

Počet kolonií na jamku v mikrotitračních destičkách odpovídá Poissonovu rozdělení.

Účinnost klonování = $-\ln P(0)$ / počet buněk na jamku,

kde $-\ln P(0)$ je pravděpodobný počet prázdných jamek z počtu jamek s nasazenými buňkami a popisuje se tímto vzorcem:

$\ln P(0) = -\ln (\text{počet prázdných jamek} / \text{počet jamek s buňkami})$

(3) V části B se kapitola B.22 nahrazuje tímto:

„B.22 DOMINANTNÍ LETÁLNÍ ZKOUŠKA NA HLODAVCÍCH

ÚVOD

1. Tato zkušební metoda je rovnocenná Pokynu OECD pro zkoušení (TG) č. 478 (2016). Zkušební metody se pravidelně přezkoumávají s ohledem na vědecký pokrok, měnící se potřeby regulace a dobré životní podmínky zvířat. Tato upravená verze zkušební metody odráží více než třicet let zkušeností s touto zkouškou a možnost integrovat nebo sloučit tuto zkoušku s jinými zkouškami toxicity, jako jsou studie vývojové toxicity, studie reprodukční toxicity nebo studie genotoxicity; avšak vzhledem k omezením této zkoušky a používání velkého počtu zvířat není zkouška určena pro použití jako hlavní metoda, ale spíše jako doplňková zkušební metoda, kterou lze použít pouze v případě, že regulační požadavky nelze splnit alternativním způsobem. Kombinování zkoušek toxicity může ušetřit použití velkého počtu zvířat na zkoušky toxicity. OECD vypracovala dokument, který obsahuje stručné informace o zkoušení v oblasti genetické toxikologie a přehled posledních změn, které OECD provedla ve svých pokynech ke zkoušení genotoxicity (1).
2. Účelem zkoušky dominantní letality (DL) je zkoumat, zda chemické látky vytvářejí mutace vznikající z chromozomových aberací v zárodečných buňkách. Zkouška dominantní letality je dále zvláště významná k posouzení genotoxicity, neboť zde probíhají procesy aktivního metabolismu *in vivo*, farmakokinetiky a reparace DNA, které přispívají k účinku testované látky, jakkoli mohou být různé u různých druhů. Indukce dominantních letálních mutací po expozici zkoušené chemické látky naznačuje, že tato chemická látka poškozuje zárodečné tkáně zkušebního zvířete.
3. Dominantní letální mutace způsobují embryonální nebo fetální smrt. Indukce dominantních letálních mutací po expozici zkoušené chemické látky naznačuje, že tato chemická látka poškozuje zárodečné buňky zkušebního zvířete.
4. Zkouška dominantní letality je užitečná pro potvrzení pozitivních výsledků zkoušek používajících somatické sledované vlastnosti *in vivo* a je významnou sledovanou vlastností pro predikci nebezpečnosti pro člověka a rizika genetických onemocnění přenášených prostřednictvím zárodečných buněk. Tato zkouška však vyžaduje velký počet zvířat a je velmi pracná; proto je velmi nákladná a časově náročná na provedení. Protože je spontánní četnost dominantních letálních mutací celkem vysoká, je citlivost zkoušky na detekci malých nárůstů četnosti mutací obvykle omezená.
5. Definice nejdůležitějších termínů jsou uvedeny v dodatku 1.

VÝCHOZÍ ÚVAHY

6. Zkouška se nejčastěji provádí na myších (2) (3) (4), avšak v některých případech, je-li to vědecky zdůvodněno, mohou být vhodné i jiné druhy, například potkani (5) (6) (7) (8). Dominantní letalita je obecně výsledkem velkých chromozomových aberací (strukturálních a numerických abnormalit) (9) (10) (11), ale nelze vyloučit ani genové mutace. Dominantní letální mutace je mutace vyskytující se v zárodečné buňce jako taková nebo vzniká po oplodnění v raném embryu, nepůsobí dysfunkci gamety, ale je letální pro oplodněné vajíčko nebo vyvíjející se embryo.
7. Jednotliví samci jsou ve vhodných intervalech opakovaně kříženi s dosud nepřipuštěnými samicemi. Počet páření po expozici závisí na konečném účelu studie dominantní letality (odstavec 23) a měl by zajišťovat, aby byla dominantní letalita hodnocena ve všech stádiích zrání samčích zárodečných buněk (12).
8. Jestliže existuje důkaz o tom, že se zkoušená chemická látka nebo její metabolit (metabolity) nedostanou do varlat, není vhodné tuto zkoušku použít.

PRINCIP ZKOUŠKY

9. Samci jsou zpravidla vhodnou cestou exponováni zkoušené chemické látce a páření s neexponovanými, dosud nepřipuštěnými samicemi. Různé druhy zárodečných buněk mohou být testovány použitím po sobě jdoucích intervalů páření. Po páření se samice po uplynutí vhodné doby utratí a obsah dělohy se vyšetří za účelem určení počtu implantací a živých a mrtvých embryí. Dominantní letalita zkoušené chemické látky se stanoví porovnáním počtu živých implantací na samici v exponované skupině s počtem živých implantací na samici v kontrolní skupině vehikulum/rozpouštědlo. Nárůst mrtvých implantací na samici v exponované skupině nad počet mrtvých implantací na samici v kontrolní skupině odpovídá postimplantačním ztrátám indukovaným zkoušenou chemickou látkou. Postimplantační ztráty se vypočítají stanovením poměru mrtvých implantací k celkovým implantacím v exponované skupině v porovnání s poměrem mrtvých implantací k celkovým implantacím v kontrolní skupině. Preimplantační ztráty lze odhadnout porovnáním počtu žlutých tělísek minus celkový počet implantací nebo porovnáním všech implantací na samici v exponované a kontrolní skupině.

OVĚŘENÍ ODBORNÉ ZPŮSOBILOSTI LABORATOŘE

10. Způsobilost pro tuto zkoušku by měla být stanovena na základě doložení schopnosti reprodukovat četnost dominantní letality ze zveřejněných údajů (např. (13) (14) (15) (16) (17) (18)) s látkami pozitivní kontroly (včetně slabých reakcí), např. s látkami uvedenými v tabulce 1, a kontrolami vehikula a získáním četností negativní kontroly, které odpovídají přijatelnému rozpětí údajů (viz výše uvedené odkazy) nebo dosavadní distribuci kontrol v laboratoři, je-li k dispozici.

POPIS METODY

Příprava

Výběr zvířecích druhů

11. Měly by být použity běžně používané laboratorní kmeny zdravých pohlavně dospělých zvířat. Běžně se používá myš, ale vhodný může být také potkan. Použit může být i jakýkoli jiný vhodný druh savce, je-li ve zprávě poskytnuto vědecké zdůvodnění.

Podmínky chovu a krmení zvířat

12. Teplota v místnosti pro zvířata by u hlodavců měla být 22 °C (± 3 °C). Relativní vlhkost vzduchu by v ideálním případě měla být 50–60 %, ale minimálně 40 %, a neměla by pokud možno přesáhnout 70 % kromě doby úklidu místnosti. Osvětlení by mělo být umělé a mělo by se střídát 12 hodin světla a 12 hodin tmy. Ke krmení lze použít konvenční laboratorní krmivo s neomezeným přísunem pitné vody. Výběr druhu potravy může být ovlivněn její dostatečnou mísitelností se zkoušenou chemickou látkou, je-li látka podávána tímto způsobem. Před expozicí nebo pářením by hlodavci měli být chováni v malých skupinách (nejvýše po pěti) téhož pohlaví, pokud se nepředpokládá nebo není pozorováno agresivní chování, přednostně v pevných klecích s vhodnou úpravou prostředí. Je-li to z vědeckého hlediska důvodné, mohou být zvířata v klecích individuálně.

Příprava zvířat

13. Zdraví a pohlavně zralí samci a dospělé samice se náhodným výběrem rozdělí na kontrolní skupinu a skupinu, která se exponuje. Jednotlivá zvířata se jednoznačně identifikují humánní, co nejméně invazivní metodou (např. kroužkováním, označením štítkem, pomocí mikročipu nebo biometrické identifikace, avšak nikoli nastříhnutím prstu dolní končetiny nebo ucha) a nechají se v laboratorních podmínkách alespoň pět dní aklimatizovat. Klece by měly být uspořádány tak, aby byl vliv umístění klecí minimalizován. Mělo by se zabránit vzájemné kontaminaci pozitivní kontroly a zkoušené chemické látky. V okamžiku zahájení studie by měla být odchylka v hmotnosti zvířat minimální a neměla by u obou pohlaví překročit ± 20 % střední hodnoty hmotnosti.

Příprava dávek

14. Pevné zkoušené chemické látky by se měly rozpustit nebo suspendovat ve vhodných rozpouštědlech nebo vehikulech nebo by měly být přimíchány do potravy nebo pitné vody před podáním dávky zvířatům. Kapalné zkoušené chemické látky mohou být podávány přímo nebo se před podáním zředí. Pro účely expozice inhalací lze zkoušené chemické látky v závislosti na jejich fyzikálně-chemických vlastnostech podávat jako plyn, páru nebo pevný/kapalný aerosol. Používat by se měla čerstvě připravená zkoušená chemická látka, pokud údaje o stabilitě neprokazují možnost skladování a nestanoví vhodné podmínky pro skladování.

Zkušební podmínky

Rozpouštědlo/vehikulum

15. Rozpouštědlo/vehikulum by nemělo mít při použitých objemech dávek toxické účinky a mělo by být vyloučeno podezření, že reaguje se zkoušenou chemickou látkou. Jsou-li použita jiná než známá rozpouštědla/vehikula, mělo by být jejich zařazení podloženo údaji o jejich kompatibilitě. Doporučuje se nejprve zvážit použití vodného rozpouštědla/vehikula. Jako příklad běžně používaných kompatibilních rozpouštědel/vehikul lze uvést vodu, fyziologický roztok, roztok methylcelulózy, roztok sodné soli karboxymethylcelulózy, olivový olej a kukuřičný olej.

Pozitivní kontroly

16. Pokud laboratoř neprokáže způsobilost k provádění zkoušky a nepoužívala zkoušku rutinně v nedávné minulosti (např. v posledních 5 letech), měla by být vždy používána zvířata pro souběžné pozitivní kontroly. Zvířata v pozitivní kontrolní skupině však nemusí být exponována stejným způsobem jako zvířata, kterým je podávána zkoušená chemická látka, a vzorky u nich nemusí být odebírány při všech intervalech páření. Látky používané pro pozitivní kontrolu by měly prokazatelně vyvolávat dominantní letalitu za podmínek používaných pro tuto zkoušku. S výjimkou expozice by měla zvířata kontrolní skupiny podstoupit identický proces jako zvířata ve skupinách, v nichž dojde k expozici.
17. Dávky pozitivních kontrolních látek by měly být vybrány tak, aby vyvolaly slabé nebo mírné účinky, které nejlépe dokládají správné provedení a citlivost zkoušky, ale které soustavně vyvolávají pozitivní dominantní letální účinky. Příklady pozitivních kontrolních látek a vhodných dávek jsou uvedeny v tabulce 1.

Tabulka 1: Příklady látek pro pozitivní kontroly.

Látka [č. CAS] (referenční č.)	Rozpětí efektivní dávky (mg/kg) (druhy hlodavců)	Délka podávání (dny)
triethylenmelamin [51-18-3] (15)	0,25 (myš)	1
cyklofosfamid [50-18-0] (19)	50–150 (myš)	5
cyklofosfamid [50-18-0] (5)	25–100 (potkan)	1
ethyl-methansulfonát [62-50-0] (13)	100–300 (myš)	5
monomer akrylamidu [79-06-1] (17)	50 (myš)	5
chlorambucil [305-03-3] (14)	25 (myš)	1

Negativní kontroly

18. Součástí každého odběru vzorků by měla být negativní kontrolní zvířata, jimž je aplikováno pouze rozpouštědlo nebo vehikulum, ale jinak se s nimi zachází stejně jako s experimentálními skupinami (20). Nejsou-li k dispozici historické nebo zveřejněné kontrolní údaje, které by ukazovaly, že vybrané rozpouštědlo/vehikulum nevyvolává žádné dominantní letální nebo jiné zhoubné účinky, měla by být do každého odběru vzorků zahrnuta neexponovaná kontrolní zvířata pro posouzení účinku vehikula.

POSTUP**Počet zvířat**

19. Jednotliví samci jsou ve vhodně stanovených intervalech (např. týdenní intervaly, odstavce 21 a 23) opakovaně kříženi nejlépe s jednou dosud nepřipuštěnou samicí. Počet samců ve skupině by měl být stanoven předem tak, aby stačil (v kombinaci s počtem připuštěných samic v každém intervalu páření) k dosažení statistické síly nezbytné pro zjištění nejméně zdvojnásobení četnosti dominantní letality (odstavec 44).
20. Také počet samic na jeden interval páření by měl být podle výpočtů statistické síly stanoven předem tak, aby umožnil zjištění nejméně dvojnásobné četnosti dominantní letality (tj. dostatečný počet březích samic, aby bylo možné získat alespoň 400 implantací celkem) (20) (21) (22) (23) a aby bylo možné očekávat alespoň jeden mrtvý zárodek na jednu jednotku analýzy (tj. skupina páření na jednu dávku) (24).

Doba podávání a intervaly páření

21. Počet intervalů páření po expozici se řídí plánem expozice a je třeba zajistit, aby byla hodnocena indukce dominantní letality ve všech fázích dozrávání samčích zárodečných buněk (12) (25). U jednorázového podání maximálně 5 denních dávek je třeba, aby došlo k 8 (myš) nebo 10 (potkan) páření v týdenních intervalech po poslední expozici. U podání většího počtu dávek se může počet intervalů páření snížit poměrně k delší době podávání, je však třeba zachovat cíl hodnocení všech fází spermatogeneze (např. po 28denní expozici postačí pouze 4 páření jednou týdně, aby bylo možné vyhodnotit všechny fáze spermatogeneze u myši). Všechny plány expozice a páření by měly být vědecky zdůvodněny.
22. Samice musí být u samců ponechány nejméně po dobu trvání jednoho estrálního cyklu (např. jeden týden zahrnuje jeden estrální cyklus u myši i potkanů). Samice, které se nepářily v týdenním intervalu, lze použít pro následující interval páření. Nebo dokud nedojde ke spáření prokázanému spermiemi ve vagíně nebo přítomností vaginální zátky.

23. Použitý režim expozice a páření závisí na konečném účelu studie dominantní letality. Jestliže je cílem stanovit, zda daná chemická látka indukuje dominantní letální mutace jako takové, vhodnou metodou je expozice po celý cyklus spermatogeneze (např. 7 týdnů u myši, 5–7 expozicí týdně) a jedno páření na konci. Jestliže je však cílem identifikovat citlivý typ zárodečných buněk pro indukci dominantní letality, je lepší jednorázová nebo 5denní expozice, po níž následuje jedno páření týdně.

Dávkování

24. Jestliže se provádí předběžná studie pro stanovení rozsahu dávek, poněvadž nejsou k dispozici vhodné údaje, jež by mohly při stanovení dávek pomoci, pak by měla být provedena ve stejné laboratoři, se stejným druhem, kmenem, pohlavím a za stejného režimu expozice, které se použijí v hlavní studii (26). Cílem studie by mělo být zjistit maximální tolerovanou dávku, která je definována jako nejvyšší dávka, která bude po dobu trvání zkoušky tolerována bez příznaků toxicity omezující studii (např. abnormální chování nebo reakce, menší pokles tělesné hmotnosti nebo cytotoxicity hematopoetického systému), avšak nikoli smrti nebo příznaků bolesti, utrpení nebo strádání, kdy je nezbytné zvířata humánně utratit (27).
25. Maximální tolerovaná dávka dále nesmí negativně ovlivnit úspěch páření (21).
26. Zkoušené chemické látky se specifickým biologickým působením při nízkých netoxických dávkách (jako jsou hormony a mitogeny) a chemické látky, které vykazují saturaci toxikokinetických vlastností, mohou představovat výjimky z kritérií stanovení dávek a každý případ by měl být hodnocen individuálně.
27. Aby bylo možné získat informace o odezvě na dávku, měla by úplná studie zahrnovat negativní kontrolní skupinu a minimálně tři úrovně dávek, které jsou zpravidla odstupňovány faktorem 2, avšak nepřevyšujícím 4. Pokud ve studii ke stanovení rozsahu dávek nebo na základě stávajících údajů zkoušená chemická látka nevyvolává toxicitu, měla by nejvyšší dávka při jednorázovém podávání odpovídat 2 000 mg/kg tělesné hmotnosti. Pokud však zkoušená chemická látka způsobuje toxicitu, měla by být největší podávanou dávkou maximální tolerovaná dávka a úrovně dávek by měly přednostně pokrývat rozmezí od maximální dávky až po dávku vyvolávající malou toxicitu nebo nevyvolávající žádnou toxicitu. U netoxických chemických látek je limitní dávka 1 000 mg/kg tělesné hmotnosti/den při době podávání 14 dní nebo delší, nebo 2 000 mg/kg tělesné hmotnosti/den při dobách podávání kratších než 14 dní.

Podávání dávek

28. Při plánování zkoušky by měl být zvážěn předpokládaný způsob expozice člověka. Proto lze zvolit odůvodněné způsoby expozice např. potravou, v pitné vodě, subkutánně, nitrožilně, lokálně, inhalací, orálně (pomocí žaludeční sondy) nebo implantací. Způsob podávání by měl být v každém případě zvolen tak, aby zajistil odpovídající expozici cílové

tkáně (tkání). Intraperitoneální injekce se obvykle nedoporučují, protože se nejedná o předpokládanou cestu expozice člověka, a měly by být použity pouze s konkrétním vědeckým zdůvodněním. Je-li zkoušená chemická látka přimíchána do potravy nebo pitné vody, zejména v případě jednorázové dávky, mělo by se dbát na to, že prodleva mezi příjmem krmiva a vody a pářením by měla být dostatečná, aby umožnila detekci účinků (odstavec 31). Maximální objem kapaliny, který lze najednou podán žaludeční sondou nebo injekčně, závisí na velikosti pokusného zvířete. Toto množství by obvykle nemělo překročit 1 ml/100g tělesné hmotnosti, s výjimkou vodných roztoků, kde lze použít maximálně 2 ml/100g tělesné hmotnosti. Použití větších objemů, než jsou tyto (pokud je povolují právní předpisy o šetrném zacházení se zvířaty), je třeba odůvodnit. Kolísání objemu zkoušené chemické látky by se mělo omezit nastavením koncentrace tak, aby se na všech úrovních dávek zajistil konstantní objem v závislosti na tělesné hmotnosti.

Pozorování

29. Všeobecné klinické pozorování a záznam klinických příznaků by se měly provádět nejméně jednou denně, přednostně ve stejnou dobu (stejně doby) a s uvažováním doby očekávaného maximálního účinku po podání látky. Nejméně dvakrát denně po dobu podávání dávek by měla být provedena prohlídka všech zvířat za účelem zjištění morbidit a mortality. Všechna zvířata by měla být zvážena na počátku studie a nejméně jednou týdně během studií s opakovanou dávkou a při utracení. Měření spotřeby potravy by se mělo provádět nejméně jednou týdně. Pokud je zkoušená chemická látka podávána v pitné vodě, měla by se spotřeba vody měřit při každé výměně vody a alespoň jednou týdně. Zvířata, která vykazují neletální indikátory nadměrné toxicity, by měla být utracena před uplynutím doby zkoušky (27).

Odběr a zpracování tkání

30. Samice se utratí v druhé polovině březosti, v 13. den gestace u myší a v 14.–15. den gestace u potkanů. Dělohy se vyšetří za účelem stanovení dominantních letálních účinků a určí se počet implantací, živých a mrtvých embryí a žlutých tělísek.
31. Obnaží se děložní rohy a vaječníky za účelem spočítání žlutých tělísek a plody se vyjmou, spočítají a zváží. Dělohy je třeba pečlivě vyšetřit, aby se nepřehlédly resorpce zakryté živými plody a aby bylo zajištěno, že budou všechny resorpce vyčísleny. Zaznamenaná se fetální mortalita. Dále se zaznamená počet úspěšně oplodněných samic a počet celkových implantací, preimplantačních ztrát a postimplantační mortalita (včetně časných a pozdních resorpcí). Kromě toho mohou být viditelné plody uchovány v Bouinově fixačním roztoku po dobu alespoň 2 týdnů, po nichž se prohlédnou, zda nevykazují větší vnější malformace (28), což poskytne další informace o reprodukčních a vývojových účincích zkoušené látky.

ÚDAJE A PŘEDKLÁDÁNÍ ZPRÁV

Zpracování výsledků

32. Údaje se zpracují v tabulkové formě a uvede se počet připuštěných samců, počet březích samic a počet nezabřezlých samic. Samostatně se uvedou výsledky každého páření, včetně identifikace každého samce a samice. Pro každou samici se uvede interval páření, dávka, kterou obdržel samec, a počet živých a mrtvých implantací.
33. Postimplantační ztráty se vypočítají stanovením poměru mrtvých implantací k celkovým implantacím z exponované skupiny v porovnání s poměrem mrtvých implantací k celkovým implantacím z kontrolní skupiny vehikulum/rozpouštědlo.
34. Preimplantační ztráty se vypočítají jako rozdíl mezi počtem žlutých tělísek a počtem implantací nebo jako snížení průměrného počtu implantací na samici ve srovnání s kontrolou. Odhadují-li se také preimplantační ztráty, uvedou se.
35. Dominantní letální faktor se odhadne jako: (postimplantační úhyn / celkové implantace na samici) x 100.
36. Měly by být uvedeny údaje o toxicitě a klinických příznacích (podle odstavce 29).

Kritéria přijatelnosti

37. Přijatelnost zkoušky určují tato kritéria.
 - Souběžná negativní kontrola odpovídá publikovaným normám pro historické údaje o negativní kontrole a historickým kontrolním údajům laboratoře, jsou-li k dispozici (viz odstavce 10 a 18).
 - Souběžné pozitivní kontroly vyvolávají odezvy, které jsou v souladu s publikovanými normami pro historické údaje o pozitivní kontrole nebo historickými pozitivními kontrolními údaji laboratoře, jsou-li k dispozici, a vyvolávají statisticky významný nárůst v porovnání s negativní kontrolou (viz odstavce 17 a 18).
 - Byl analyzován přiměřený počet celkových implantací a dávek (odstavec 20).
 - Kritéria pro výběr nejvyšší dávky jsou v souladu s kritérii popsány v odstavcích 24 a 27.

Hodnocení a interpretace výsledků

38. Aby byly k dispozici dostatečné údaje pro analýzu vztahu dávky a odezvy, měly by být analyzovány nejméně tři exponované skupiny.
39. Za předpokladu, že všechna kritéria přijatelnosti byla splněna, lze zkoušenou chemickou látku považovat za jasně pozitivní, pokud:
 - alespoň jedna ze zkoušených dávek vykazuje statisticky významný nárůst v porovnání se souběžně provedenou negativní kontrolou,

- při hodnocení pomocí vhodného testu je tento nárůst alespoň pro jedno experimentální uspořádání závislý na dávce (např. interval páření jednou týdně), a
- všechny výsledky jsou mimo přijatelné rozpětí negativních kontrolních údajů nebo distribuci historických údajů laboratoře o negativních kontrolách (např. mimo 95% rozmezí dle Poissonova rozdělení), pokud jsou k dispozici.

Pak se má za to, že zkoušená chemická látka je schopna vyvolávat dominantní letální mutace v zárodečných buňkách pokusných zvířat. Doporučení ohledně nejvhodnějších statistických metod jsou popsána v odstavci 44; v literatuře lze nalézt také další doporučené statistické přístupy (20) (21) (22) (24) (29). Použité statistické testy by měly brát v úvahu zvíře jako experimentální jednotku.

40. Za předpokladu, že všechna kritéria přijatelnosti byla splněna, lze zkoušenou chemickou látku považovat za jasně negativní, pokud:

- žádná ze zkušebních dávek nevykazuje statisticky významný nárůst v porovnání se souběžně provedenou negativní kontrolou,
- v žádném experimentálním uspořádání neexistuje nárůst v závislosti na dávce, a
- všechny výsledky jsou v přijatelném rozpětí negativních kontrolních údajů nebo distribuci historických údajů laboratoře o negativních kontrolách (např. v 95% rozmezí dle Poissonova rozdělení), pokud jsou k dispozici.

Pak se má za to, že zkoušená chemická látka není schopna vyvolávat dominantní letální mutace v zárodečných buňkách pokusných zvířat.

41. Ověření jasně pozitivní či jasně negativní odezvy se nepožaduje.

42. Jestliže odezva není jasně negativní nebo pozitivní a s cílem napomoci při stanovení biologického významu výsledku (např. slabý nebo okrajový nárůst), údaje by měly být vyhodnoceny na základě odborného posouzení a/nebo dalším vyšetřením s využitím stávajících experimentálních údajů, jako je skutečnost, zda je pozitivní výsledek mimo přijatelné rozpětí negativních kontrolních údajů nebo historických negativních kontrolních údajů laboratoře (30).

43. Ve vzácných případech ani po dalším šetření nebude možné na základě daného souboru údajů dospět k závěru o pozitivitě či negativitě výsledku, a bude proto učiněn závěr, že výsledek je neurčitý.

44. Použité statistické testy by měly brát v úvahu samce jako experimentální jednotku. I když je možné, že údaje o počtech (např. počet implantací na samici) mohou vykazovat Poissonovo rozdělení anebo podíly (např. podíl mrtvých implantací) mohou mít binomické rozdělení, často se stává, že jsou tyto údaje příliš rozptýlené (31). Podobně při statistické analýze by měl být nejprve použit test na nadměrný/nedostatečný rozptyl pomocí takových

testů rozptylu, jako je Cochranův binomický test rozptylu (32) nebo Taroneho $C(\alpha)$ test nadměrného binomického rozptylu (31) (33). Není-li zjištěna žádná odchylka od binomického rozptylu, mohou být testovány trendy podílů jednotlivých úrovní dávky pomocí Cochranova-Armitageova trend-testu (34) a párová porovnání s kontrolní skupinou mohou být otestována pomocí Fisherova exaktního testu (35). Podobně, není-li zjištěna žádná odchylka od Poissonova rozptylu, mohou být trendy počtů testovány pomocí Poissonovy regrese (36) a párová porovnání s kontrolní skupinou mohou být otestována v rámci Poissonova modelu s využitím párových kontrastů (36). Je-li zjištěn významný nadměrný nebo nedostatečný rozptyl, doporučují se neparametrické metody (23) (31). Zahrnují pořadové testy, jako jsou Jonckheerův-Terpstrův test trendů (37) a Mannovy-Whitneyovy testy (38) pro párová porovnání s kontrolní skupinou vehikulum/rozpouštědlo, jakož i permutační testy, převzorkování nebo bootstrap testy trendů a párová porovnání s kontrolní skupinou (31) (39).

45. Pozitivní zkouška dominantní letality poskytuje průkaz genotoxicity zkoušené chemické látky v zárodečných buňkách exponovaného samce pokusného druhu.
46. Při hodnocení biologického významu odezvy může být vodítkem posouzení, zda jsou zjištěné hodnoty uvnitř nebo vně rozsahu historických kontrolních hodnot (40).

Závěrečná zpráva

47. Závěrečná zpráva by měla obsahovat tyto informace.

Shrnutí.

Zkoušená chemická látka:

- zdroj, číslo šarže, a je-li k dispozici, datum použitelnosti,
- stabilita zkoušené chemické látky samotné, je-li známa,
- rozpustnost a stabilita zkoušené chemické látky v rozpouštědle, jsou-li známy,
- měření pH, případně osmolality a sraženiny v kultivačním médiu, do něhož byla přidána zkoušená chemická látka.

Jednosložková látka:

- fyzický vzhled, rozpustnost ve vodě a další relevantní fyzikálně-chemické vlastnosti,
- chemická identifikace, např. název podle IUPAC nebo CAS, číslo CAS, kód SMILES nebo InChI, strukturní vzorec, čistota, případně chemická identita nečistot, je-li to prakticky možné, atd.

Vícesložková látka, látka s neznámým nebo proměnlivým složením, komplexní reakční produkt nebo biologický materiál a směsi:

- charakterizované pokud možno chemickou identitou (viz výše), kvantitativním výskytem a relevantními fyzikálně-chemickými vlastnostmi složek.

Příprava zkoušené chemické látky:

- zdůvodnění volby vehikula,
- rozpustnost a stabilita zkoušené chemické látky v rozpouštědle/vehikulu, jsou-li známy,
- příprava potravy, pitné vody nebo inhalačních aplikačních forem,
- analytická stanovení aplikační formy (např. stabilita, homogenita, nominální koncentrace), jsou-li prováděna.

Pokusná zvířata:

- použitý druh/kmen a odůvodnění výběru,
- počet, věk a stáří zvířat,
- původ, podmínky chovu, strava atd.,
- metoda jednoznačného označení zvířat,
- u krátkodobých studií: hmotnost jednotlivých samců na začátku a na konci zkoušky, u studií trvajících déle než jeden týden: hmotnosti jednotlivých zvířat během studie a spotřeba potravy. Mělo by být uvedeno rozpětí tělesné hmotnosti, střední hodnota a směrodatná odchylka pro každou skupinu.

Zkušební podmínky:

- údaje o pozitivní a negativní (vehikulum/rozpouštědlo) kontrole,
- údaje ze studie pro stanovení rozmezí dávek,
- zdůvodnění zvolených úrovní dávek,
- podrobnosti o přípravě zkoušené chemické látky,
- podrobné údaje o podávání zkoušené chemické látky,
- zdůvodnění způsobu podávání,
- metody zjišťování toxicity, včetně případně histopatologických nebo hematologických analýz a četnosti, s jakou jsou prováděna pozorování zvířat, a četnosti vážení,
- metody ověřování, zda se zkoušená chemická látka dostala k cílové tkáni, nebo ověřování obecné cirkulace, pokud byly získány negativní výsledky,
- skutečná dávka (v mg na kg tělesné hmotnosti za den) vypočtená z koncentrace zkoušené chemické látky v potravě / pitné vodě (v ppm) a případně ze spotřeby;
- podrobnosti o jakosti krmení a vody,

- podrobnosti o úpravě klecového prostředí,
- podrobný popis harmonogramů expozice a odběru vzorků a odůvodnění výběru konkrétního schématu,
- metoda analgeze,
- způsob utracení,
- postupy izolace a uchovávání tkání,
- zdroje a čísla šarží všech sad a chemických činidel (je-li to relevantní),
- metody počítání dominantních letálních účinků,
- plán páření,
- metody průkazu spáření,
- doba utracení,
- kritéria hodnocení dominantních letálních účinků, včetně žlutých tělísek, implantací, resorpcí a preimplantačních ztrát, živých implantací, mrtvých implantací.

Výsledky:

- stav zvířat před zkouškou a během zkoušky, včetně známek toxicity,
- hmotnosti jednotlivých samců během expozice a období páření,
- počet připuštěných samic,
- podle možnosti závislost odezvy na dávce,
- souběžné a historické údaje o negativní kontrole s rozpětími, středními hodnotami a směrodatnými odchylkami,
- údaje o souběžné pozitivní kontrole,
- údaje ve formě tabulky o každé samici včetně: počet žlutých tělísek na samici, počet implantací na samici, počet resorpcí a preimplantačních ztrát na samici, počet živých implantací na samici, počet mrtvých implantací na samici, hmotnosti plodů,
- výše uvedené údaje shrnuté pro každé období páření a dávku s četností dominantní letality,
- použité statistické analýzy a metody.

Diskuse o výsledcích.

Závěr.

LITERATURA

- (1) OECD (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, No. Series on Testing and Assessment, No 234, OECD, Paris.
- (2) Bateman, A.J. (1977). The Dominant Lethal Assay in the Male Mouse, in Handbook of Mutagenicity Test Procedures B.J. Kilbey *et. al.*(Eds.) pp. 235-334, Elsevier, Amsterdam
- (3) Ehling U.H., Ehling, U.H., Machemer, L., Buselmaier, E., Dycka, D., Frohberg, H., Kratochvilova, J., Lang, R., Lorke, D., Muller, D., Pheh, J., Rohrborn, G., Roll, R., Schulze-Schencking, M., and Wiemann, H. (1978). Standard Protocol for the Dominant Lethal Test on Male Mice. Set up by the Work Group "Dominant lethal mutations of the ad hoc Committee Chemogenetics, Arch. *Toxicol.*, 39, 173-185
- (4) Shelby M.D. (1996). Selecting Chemicals and Assays for Assessing Mammalian Germ Cell Mutagenicity. *Mutation Res.*, 352:159-167.
- (5) Knudsen I., Knudsen, I., Hansen, E.V., Meyer, O.A. and Poulsen, E. (1977). A proposed Method for the Simultaneous Detection of Germ-Cell Mutations Leading to Fetal Death (Dominant Lethality) and of Malformations (Male Teratogenicity) in Mammals. *Mutation Res.*, 48:267-270.
- (6) Anderson D., Hughes, J.A., Edwards, A.J. and Brinkworth, M.H. (1998). A Comparison of Male-Mediated Effects in Rats and Mice Exposed to 1,3-Butadiene. *Mutation Res.*, 397:77-74.
- (7) Shively C.A., C.A., White, D.M., Blauch, J.L. and Tarka, S.M. Jr. (1984). Dominant Lethal Testing of Theobromine in Rats. *Toxicol. Lett.* 20:325-329.
- (8) Rao K.S., Cobel-Geard, S.R., Young, J.T., Hanley, T.R. Jr., Hayes, W.C., John, J.A. and Miller, R.R. (1983). Ethyl Glycol Monomethyl Ether II. Reproductive and dominant Lethal Studies in Rats. *Fundam. Appl. Toxicol.*, 3:80-85.
- (9) Brewen J.G., Payne, H.S., Jones, K.P., and Preston, R.J. (1975). Studies on Chemically Induced Dominant Lethality. I. The Cytogenetic Basis of MMS-Induced Dominant Lethality in Post-Meiotic Male Germ Cells, *Mutation Res.*, 33, 239-249.

- (10) Marchetti F., Bishop, J.B., Cosentino, L., Moore II, D. and Wyrobek, A.J. (2004). Paternally Transmitted Chromosomal Aberrations in Mouse Zygotes Determine their Embryonic Fate. *Biol. Reprod.*, 70:616-624.
- (11) Marchetti F. and Wyrobek, A.J. (2005). Mechanisms and Consequences of Paternally Transmitted Chromosomal Aberrations. *Birth Defects Res., C* 75:112-129.
- (12) Adler I.D. (1996). Comparison of the Duration of Spermatogenesis Between Rodents and Humans. *Mutation Res.*, 352:169-172.
- (13) Favor J., and Crenshaw J.W. (1978). EMS-Induced Dominant Lethal Dose Response Curve in DBA/1J Male Mice, *Mutation Res.*, 53: 21–27.
- (14) Generoso W.M., Witt, K.L., Cain, K.T., Hughes, L. Cacheiro, N.L.A., Lockhart, A.M.C. and Shelby, M.D. (1995). Dominant Lethal and Heritable Translocation Test with Chlorambucil and Melphalan. *Mutation Res.*, 345:167-180.
- (15) Hastings S.E., Huffman K.W. and Gallo M.A. (1976). The dominant Lethal Effect of Dietary Triethylenemelamine, *Mutation Res.*, 40:371-378.
- (16) James D.A. and Smith D.M. (1982). Analysis of Results from a Collaborative Study of the Dominant Lethal Assay, *Mutation Res.*, 99:303-314.
- (17) Shelby M.D., Cain, K.T., Hughes, L.A., Braden, P.W. and Generoso, W.M. (1986). Dominant Lethal Effects of Acrylamide in Male Mice. *Mutation Res.*, 173:35-40.
- (18) Sudman P.D., Rutledge, J.C., Bishop, J.B. and Generoso W.M. (1992). Bleomycin: Female-Specific Dominant Lethal Effects in Mice, *Mutation Res.*, 296: 143-156.
- (19) Holstrom L.M., Palmer A.K. and Favor, J. (1993). The Rodent Dominant Lethal Assay. In *Supplementary Mutagenicity Tests*. Kirkland D.J. and Fox M. (Eds.), Cambridge University Press, s. 129-156.
- (20) Adler I-D., Bootman, J., Favor, J., Hook, G., Schriever-Schwemmer, G., Welzl, G., Whorton, E., Yoshimura, I. and Hayashi, M. (1998). Recommendations for Statistical Designs of *In Vivo* Mutagenicity Tests with Regard to Subsequent Statistical Analysis, *Mutation Res.*, 417:19–30.
- (21) Adler I.D., Shelby M. D., Bootman, J., Favor, J., Generoso, W., Pacchierotti, F., Shibuya, T. and Tanaka N. (1994). International Workshop on Standardisation of Genotoxicity Test Procedures. Summary Report of the Working Group on Mammalian Germ Cell Tests. *Mutation Res.*, 312:313-318.

- (22) Generoso W.M. and Piegorsch W.W. (1993). Dominant Lethal Tests in Male and Female Mice. *Methods, Toxicol.*, 3A:124-141.
- (23) Haseman J.K. and Soares E.R. (1976). The Distribution of Fetal Death in Control Mice and its Implications on Statistical Tests for Dominant Lethal Effects. *Mutation. Res.*, 41: 277-288.
- (24) Whorton E.B. Jr. (1981). Parametric Statistical Methods and Sample Size Considerations for Dominant Lethal Experiments. The Use of Clustering to Achieve Approximate Normality, *Teratogen. Carcinogen. Mutagen.*, 1:353 – 360.
- (25) Anderson D., Anderson, D., Hodge, M.C.E., Palmer, S., and Purchase, I.F.H. (1981). Comparison of Dominant Lethal and Heritable Translocation Methodologies. *Mutation. Res.*, 85:417-429.
- (26) Fielder R. J., Allen, J. A., Boobis, A. R., Botham, P. A., Doe, J., Esdaile, D. J., Gatehouse, D. G., Hodson-Walker, G., Morton, D. B., Kirkland, D. J. and Richold, M. (1992). Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group: Dose Setting in *In Vivo* Mutagenicity Assays. *Mutagen.*, 7:313-319.
- (27) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No.19.), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (28) Barrow M.V., Taylor W.J and Morphol J. (1969). A Rapid Method for Detecting Malformations in Rat Fetuses, 127, 291–306.
- (29) Kirkland D.J., (Ed.)(1989) . Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data, Cambridge University Press.
- (30) Hayashi, M., Dearfield, K., Kasper P., Lovell D., Martus H.-J. and Thybaud V. (2011). “Compilation and Use of Genetic Toxicity Historical Control Data”, *Mutation. Res.*, 723:87-90.
- (31) Lockhart A.C., Piegorsch W.W. and Bishop J.B. (1992). Assessing Over Dispersion and Dose-Response in the Male Dominant Lethal Assay. *Mutation. Res.*, 272:35-58.
- (32) Cochran W.G. (1954). Some Methods for Strengthening the Common χ^2 Tests. *Biometrics*, 10: 417-451.
- (33) Tarone R.E. (1979). Testing the Goodness of Fit of the Binomial Distribution. *Biometrika*, 66: 585-590.

- (34) Margolin B.H. (1988). Test for Trend in Proportions. v *Encyclopedia of Statistical Sciences*, Volume 9, Kotz S. and Johnson N. L. (Edss.), pp. 334-336. John Wiley and Sons, New York.
- (35) Cox D.R., Analysis of Binary Data. Chapman and Hall, London (1970).
- (36) Neter J.M., Kutner, H.C., Nachtsheim, J. and Wasserman, W. (1996). Applied Linear Statistical Models, Fourth Edition, Chapters 14 and 17. McGraw-Hill, Boston
- (37) Jonckheere R. (1954). A Distribution-Free K-Sample Test Against Ordered Alternatives. *Biometrika*, 41:133-145.
- (38) Conover W.J. (1971). Practical Nonparametric Statistics. John Wiley and Sons, New York
- (39) Efron, B. (1982). The Jackknife, the Bootstrap and Other Resampling Plans. Society for Industrial and Applied Mathematics, Philadelphia, PA.
- (40) Fleiss J. (1973). Statistical Methods for Rates and Proportions. John Wiley and Sons, New York.

Dodatek 1

DEFINICE

Chemická látka: látka nebo směs.

Žluté tělísko: struktura hormonální sekrece vytvořená na vaječníku v místě folikulu, z něž se uvolnilo vajíčko. Počet žlutých tělísek ve vaječnících odpovídá počtu vajíček, které byly uvolněny z vaječníku.

Dominantní letální mutace: mutace, k níž došlo v zárodečné buňce nebo která vznikla po oplodnění a která působí úmrtí embrya nebo plodu.

Plodnost: počet připuštěných březích samic z počtu připuštěných samic.

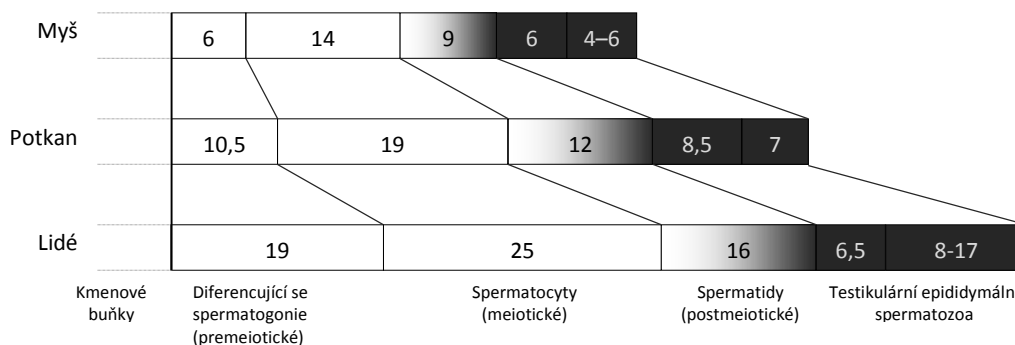
Interval páření: doba mezi koncem expozice a pářením exponovaných samců. Kontrolováním tohoto intervalu lze hodnotit účinky chemické látky na různé druhy zárodečných buněk. U myší párících se v průběhu týdne 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 a 8 po ukončení expozice se měří účinky na sperma, kondenzované spermatidy, kulaté spermatidy, pachyténní spermatocyty, rané spermatocyty, diferencované spermatogonie, diferencující se spermatogonie a spermatogoniální kmenové buňky.

Preimplantační ztráty: rozdíl mezi počtem implantací a počtem žlutých tělísek. Lze je také odhadnout porovnáním všech implantací na samici v exponované a kontrolní skupině.

Postimplantační ztráty: poměr mrtvých implantací v exponované skupině v porovnání s poměrem mrtvých implantací k celkovým implantacím v kontrolní skupině.

Zkoušená chemická látka: jakákoli látka nebo směs zkoušená touto zkušební metodou.

UVCB: chemická látka s neznámým nebo proměnlivým složením, komplexní reakční produkt nebo biologický materiál.

Dodatek 2**NAČASOVÁNÍ SPERMATOGENEZE U SAVCŮ**

Obr. 1: Srovnání délky (ve dnech) vývoje samčích zárodečných buněk u myší, potkanů a člověka. V průběhu dob vyznačených stínováním nedochází k opravě DNA.

Výše je znázorněno schéma spermatogeneze u myší, potkanů a u člověka (převzato z Adler, 1996). Nediferencované spermatogonie zahrnují: spermatogonie A_s (single), spermatogonie A_p (paired), a spermatogonie A_{al} (aligned) (Hess and de Franca, 2008). Spermatogonie A_s se považují za pravé kmenové buňky, aby tedy bylo možné posoudit účinky na kmenové buňky, musí uplynout alespoň 49 dnů (u myší) mezi poslední injekcí zkoušené chemické látky a pářením.

Odkazy

Adler, ID (1996). Comparison of the duration of spermatogenesis between rodents and humans. *Mutat Res*, 352:169-172.

Hess, RA, De Franca LR (2008). Spermatogenesis and cycle of the seminiferous epithelium. In: *Molecular Mechanisms in Spermatogenesis*, C. Yan Cheng (Ed), Landes Biosciences and Springer Science&Business Media:1-15.“

(4) V části B se kapitola B.23 nahrazuje tímto:

„B.23 ZKOUŠKA NA CHROMOZOMOVÉ ABERACE VE SPERMATOGONIÍCH SAVCŮ

ÚVOD

1. Tato zkušební metoda je rovnocenná Pokynu OECD pro zkoušení (TG) č. 483 (2016). Zkušební metody se pravidelně přezkoumávají s ohledem na vědecký pokrok, měnící se potřeby regulace a dobré životní podmínky zvířat. Tato upravená verze zkušební metody odráží mnoho let zkušeností s touto zkouškou a možnost integrovat nebo sloučit tuto zkoušku s jinými studiemi toxicity nebo genotoxicity. Kombinování studií toxicity může snížit počty zvířat používaných na zkoušky toxicity. Tato zkušební metoda je součástí série zkušebních metod genetické toxikologie. OECD vypracovala dokument, který obsahuje stručné informace o zkoušení v oblasti genetické toxikologie a přehled posledních změn, které OECD provedla ve svých pokynech ke zkoušení genotoxicity (1).
2. Účelem zkoušky na chromozomové aberace ve spermatogoniích savců *in vivo* je identifikovat takové chemické látky, které způsobují strukturní chromozomové aberace ve spermatogoniích savců (2) (3) (4). Zkouška je dále zvláště významná k posouzení genotoxicity, neboť zde probíhá aktivní metabolismus *in vivo*, farmakokinetika a procesy reparace DNA, které přispívají k účinku testované látky, jakkoli mohou být různé u různých druhů. Tato zkušební metoda není určena k měření numerických abnormalit; k tomuto účelu se tato zkouška nepoužívá rutinně.
3. Touto zkouškou se stanovují strukturní chromozomové aberace (chromozomového i chromatidového typu) v dělících se spermatogoniálních zárodečných buňkách a předpokládá se tedy, že tato zkouška poskytne předpověď indukce dědičných mutací v těchto zárodečných buňkách.
4. Definice nejdůležitějších výrazů jsou uvedeny v dodatku.

VÝCHOZÍ ÚVAHY

5. Při této zkoušce jsou běžně používáni hlodavci, avšak v některých případech, je-li to vědecky zdůvodněno, mohou být vhodné i jiné druhy. Standardní cytogenetické preparáty z varlat hlodavců generují mitotické (spermatogonie) a meiotické (spermatocyt) metafáze. Mitotické a meiotické metafáze se identifikují podle morfologie chromozomů (4). Touto cytogenetickou zkouškou *in vivo* se detekují strukturní chromozomové aberace při mitóze spermatogonií. Jiné cílové buňky nejsou předmětem této zkušební metody.
6. Pro detekci aberací chromatidového typu ve spermatogoniích by mělo být vyšetřeno první mitotické buněčné dělení, které následuje po expozici, než se tyto aberace přemění při dalším buněčném dělení na aberace chromozomového typu. Další informace z exponovaných

spermatocytů lze získat meiotickou chromozomovou analýzou strukturních aberací chromozomového typu v diakinese-metafázi I a metafázi II.

7. Ve varlatech je přítomna řada generací spermatogonií (5), přičemž tyto různé druhy zárodečných buněk mohou mít různou citlivost na expozici chemické látky. Detekované aberace tedy představují souhrnnou odezvu exponovaných populací spermatogonií. Většinu mitotických buněk v preparátech z varlat tvoří spermatogonie B, které mají buněčný cyklus přibližně 26 hodin (3).
8. Jestliže existuje důkaz o tom, že se zkoušená chemická látka nebo její metabolit (metabolity) nedostanou do varlat, není vhodné tuto zkoušku použít.

PRINCIP ZKUŠEBNÍ METODY

9. Zvířata jsou obvykle vhodným způsobem exponována zkoušené chemické látky a po vhodné době po expozici utracena. Před utracením se zvířatům podá látka zastavující metafázi (např. kolchicin nebo Colcemid®). Ze zárodečných buněk se poté připraví preparáty chromozomů, obarví se a analyzují se chromozomové aberace metafázujících buněk.

OVĚŘENÍ ODBORNÉ ZPŮSOBILOSTI LABORATOŘE

10. Způsobilost pro tuto zkoušku by měla být stanovena na základě doložení schopnosti reprodukovat očekávané výsledky četností strukturních chromozomálních aberací ve spermatogoniích s látkami pozitivní kontroly (včetně slabých reakcí), např. s látkami uvedenými v tabulce 1, a získáním četností negativní kontroly, které odpovídají přijatelnému rozpětí kontrolních údajů v publikované literatuře (např. (2)(3)(6)(7)(8)(9)(10)) nebo dosavadní distribuci kontrol v laboratoři, je-li k dispozici.

POPIS METODY

Příprava

Výběr zvířecích druhů

11. Měly by být použity běžně používané laboratorní kmeny zdravých mladých pohlavně dospělých zvířat. Obvykle se používají myši samci; mohou však být použiti i samci jiných vhodných savců, je-li to vědecky zdůvodněno a jestliže to umožňuje provedení této zkoušky ve spojení s jinou zkušební metodou. Vědecké zdůvodnění použití jiných druhů než hlodavců by mělo být uvedeno ve zprávě.

Podmínky chovu a krmení zvířat

12. Teplota v místnosti pro zvířata by u hlodavců měla být 22 °C ($\pm$ 3 °C). Relativní vlhkost vzduchu by v ideálním případě měla být 50–60 %, ale minimálně 40 %, a neměla by pokud možno přesáhnout 70 % kromě doby úklidu místnosti. Osvětlení by mělo být umělé a mělo by

se střídát 12 hodin světla a 12 hodin tmy. Ke krmení lze použít konvenční laboratorní krmivo s neomezeným přísunem pitné vody. Výběr druhu potravy může být ovlivněn její dostatečnou mísitelností se zkoušenou chemickou látkou, je-li látka podávána tímto způsobem. Hlodavci by měli být chováni v malých skupinách (nejvýše po pěti v každé kleci), pokud se nepředpokládá agresivní chování, přednostně v klecích s pevnou podlahou s vhodnou úpravou prostředí. Je-li to z vědeckého hlediska důvodné, mohou být zvířata v klecích individuálně.

Příprava zvířat

13. Obvykle se používají zdraví mladí dospělí samci (ve stáří 8–12 týdnů na začátku expozice), kteří se náhodně rozdělí do kontrolní a experimentální skupiny. Jednotlivá zvířata se jednoznačně identifikují humánní, co nejméně invazivní metodou (např. kroužkováním, označením štítkem, pomocí mikročipu nebo biometrické identifikace, avšak nikoli nastříhnutím ucha nebo prstu dolní končetiny) a nechají se v laboratorních podmínkách alespoň pět dní aklimatizovat. Klece by měly být uspořádány tak, aby byl vliv umístění klecí minimalizován. Mělo by se zabránit vzájemné kontaminaci pozitivní kontroly a zkoušené chemické látky. V okamžiku zahájení studie by měla být odchylka v hmotnosti zvířat minimální a neměla by překročit $\pm 20 \%$.

Příprava dávek

14. Pevné zkoušené chemické látky by se měly rozpustit nebo suspendovat ve vhodných rozpouštědlech nebo vehikulech nebo by měly být přimíchány do potravy nebo pitné vody před podáním dávky zvířatům. Kapalně zkoušené chemické látky mohou být podávány přímo nebo se před podáním zředí. Pro účely expozice inhalací lze zkoušené chemické látky v závislosti na jejich fyzikálně-chemických vlastnostech podávat jako plyn, páru nebo pevný/kapalný aerosol. Používat by se měla čerstvě připravená zkoušená chemická látka, pokud údaje o stabilitě neprokazují možnost skladování a nestanoví vhodné podmínky pro skladování.

Zkušební podmínky - rozpouštědlo/vehikulum

15. Rozpouštědlo/vehikulum by nemělo mít při použitých úrovních dávek toxické účinky a nemělo by být schopno chemické reakce se zkoušenými chemickými látkami. Jsou-li použita jiná než známá rozpouštědla/vehikula, mělo by být jejich zařazení podloženo údaji o jejich kompatibilitě. Doporučuje se pokud možno nejprve zvážit použití vodného rozpouštědla nebo vehikula. Jako příklad běžně používaných kompatibilních rozpouštědel/vehikul lze uvést vodu, fyziologický roztok, roztok methylcelulózy, roztok sodné soli karboxymethylcelulózy, olivový olej a kukuřičný olej. Neexistují-li historické nebo publikované kontrolní údaje prokazující, že zvolené atypické rozpouštědlo/vehikulum nevyvolává žádné strukturní chromozomové aberace a jiné zhoubné účinky, měla by být provedena počáteční studie za účelem stanovení přijatelnosti kontroly s tímto rozpouštědlem/vehikulem.

Pozitivní kontroly

16. Pokud laboratoř neprokáže způsobilost k provádění zkoušky a nepoužívala zkoušku rutinně v nedávné minulosti (např. v posledních 5 letech), měla by být vždy používána zvířata pro

souběžné pozitivní kontroly. Není-li zařazena souběžná pozitivní kontrolní skupina, měly by být v každém experimentu zařazeny hodnotící kontroly (fixované a neobarvené preparáty). Tyto hodnotící kontroly lze získat tak, že se do hodnocení studie zařadí vhodné referenční vzorky, které byly získány a uchovány ze samostatného experimentu s pozitivními kontrolami prováděného pravidelně (např. každých 6–18 měsíců) v laboratoři, kde se provádí daná zkouška; například během testování způsobilosti a poté pravidelně podle potřeby.

17. Látky pro pozitivní kontrolu by měly spolehlivě vyvolat pozorovatelné zvýšení výskytů buněk se strukturními chromozomovými aberacemi nad spontánní úroveň. Dávky pozitivní kontroly by měly být zvoleny tak, aby byly účinky zřetelné, ale aby hodnotitel okamžitě nezjistil identitu kódovaného preparátu. Příklady pozitivních kontrolních látek jsou uvedeny v tabulce 1.

Tabulka 1: Příklady látek pro pozitivní kontroly.

Látky [č. CAS] (referenční číslo)
cyklofosfamid (cyklofosfamid monohydrát) [CAS č. 50-18-0 (CAS č. 6055-19-2)] (9)
cyklohexylamin [CAS č. 108-91-8] (7)
mitomycin C [CAS č. 50-07-7] (6)
monomer akrylamidu [CAS 79-06-1] (10)
triethylenmelamin [CAS 51-18-3] (8)

Negativní kontroly

18. Součástí každého odběru vzorků by měla být negativní kontrolní zvířata, jimž je aplikováno pouze rozpouštědlo nebo vehikulum, ale jinak se s nimi zachází stejně jako s experimentálními skupinami. Nejsou-li k dispozici historické nebo zveřejněné kontrolní údaje, které by ukazovaly, že vybrané rozpouštědlo/vehikulum nevyvolává žádné chromozomové aberace nebo jiné zhoubné účinky, měla by být do každého odběru vzorků zahrnuta neexponovaná kontrolní zvířata pro posouzení účinku vehikula.

POSTUP

Počet zvířat

19. Velikost skupin při zahájení studie by měla být stanovena tak, aby poskytla minimálně pět samců na skupinu. Tento počet zvířat na skupinu se považuje za dostatečný k dosažení adekvátní statistické síly (tj. obvykle takové, aby bylo možno zjistit nejméně zdvojnásobení četnosti chromozomových aberací, když je úroveň negativní kontroly 1,0 % nebo více, s 80% pravděpodobností na hladině spolehlivosti 0,05) (3) (11). Určitým vodítkem pro typické maximální požadavky na počet zvířat může být, že studie při dvou odběrech se třemi skupinami exponovanými dávkou a s jednou souběžnou negativní kontrolní skupinou plus jednou pozitivní kontrolní skupinou (každá složená z pěti zvířat na skupinu) by vyžadovala 45 zvířat.

Plán expozice

20. Zkoušené chemické látky jsou zpravidla podávány jednorázově (tj. při jedné expozici); mohou být použity i jiné režimy dávkování za předpokladu, že jsou vědecky odůvodněné.
21. Ve skupině s nejvyšší dávkou by měly být po expozici provedeny dva odběry. Poněvadž doba nezbytná pro příjem a metabolismus zkoušené chemické látky (látek) a rovněž pro účinky na kinetiku buněčného cyklu může mít vliv na optimální časový interval pro detekci chromozomových aberací, provede se jeden časný odběr a jeden pozdější odběr přibližně 24 hodin a 48 hodin po expozici. V případě jiné než nejvyšší dávky by měl být časný odběr proveden po 24 hodinách (v době kratší nebo rovnající se buněčnému cyklu spermatogonie B, což umožňuje optimalizovat pravděpodobnost hodnocení prvních metafází po expozici) po expozici, pokud není známa a odůvodněna jiná vhodnější doba.
22. Odběry mohou být provedeny také v jiné době. Například v případě chemických látek, které mohou způsobovat S-nezávislé účinky, mohou být vhodnější časnější odběry (tj. po méně než 24 hodinách).
23. Může být použit režim opakované aplikace dávky, například ve spojení se zkouškou jiné sledované vlastnosti, který používá podávání po dobu 28 dnů (např. zkušební metoda B.58); bylo by však potřeba použít další skupiny zvířat, aby vyhovovaly různým dobám odběru vzorků. Vhodnost takového plánu pak musí být vědecky odůvodněna případ od případu.
24. Před usmrcením se zvířatům intraperitoneálně podá vhodná dávka chemické látky zastavující metafázi (např. Colcemid® nebo kolchicin). Poté se po vhodné době provede u zvířat odběr. U myši a potkanů je tato doba přibližně 3–5 h.

Dávkování

25. Provádí-li se předběžná studie ke stanovení rozsahu dávek, poněvadž ještě nejsou k dispozici vhodné údaje, které by mohly pomoci při stanovení dávek, měla by podle doporučení k provádění studií ke stanovení rozsahu dávek být provedena ve stejné laboratoři, se stejným druhem, kmenem a za stejného režimu expozice, které se použijí v hlavní studii (12). Cílem této studie by mělo být zjistit maximální tolerovanou dávku (MTD), která je definována jako dávka vyvolávající slabé toxické účinky po dobu trvání zkoušky (například nenormální chování nebo reakce, menší pokles tělesné hmotnosti nebo cytotoxicita hematopoetického systému), nikoli však smrt nebo důkazy o bolesti, utrpení nebo strádání vyžadující utracení zvířat (13).
26. Nejvyšší dávka může být také definována jako dávka vyvolávající ve spermatogoniích některé známky toxicity (např. snížení počtu spermatogonií v mitóze vzhledem k první a druhé meiotické metafázi). Toto snížení by nemělo překročit 50 %.
27. Zkoušené chemické látky se specifickým biologickým působením při nízkých netoxických dávkách (jako jsou hormony a mitogeny) a chemické látky, které vykazují saturaci

toxikokinetických vlastností, mohou představovat výjimky z kritérií stanovení dávek a každý případ by měl být hodnocen individuálně.

28. Aby bylo možné získat informace o odezvě na dávku, měla by úplná studie zahrnovat negativní kontrolní skupinu (odstavec 18) a minimálně tři úrovně dávek, které jsou zpravidla odstupňovány faktorem 2, avšak nepřevyšujícím 4. Pokud ve studii ke stanovení rozsahu dávek nebo na základě stávajících údajů zkoušená chemická látka nevyvolává toxicitu, měla by nejvyšší dávka při jednorázovém podávání odpovídat 2 000 mg/kg tělesné hmotnosti. Pokud však zkoušená chemická látka způsobuje toxicitu, měla by být největší podávanou dávkou maximální tolerovaná dávka a úrovně dávek by měly přednostně pokrývat rozmezí od maximální dávky až po dávku vyvolávající malou toxicitu nebo nevyvolávající žádnou toxicitu. Je-li toxicita pro cílovou tkáň (tj. varlata) pozorována na všech testovaných úrovních dávek, doporučuje se další studie s netoxickými dávkami. Studie, jejichž cílem je úplnější charakteristika kvantitativních informací o dávce a odezvě, mohou vyžadovat zařazení doplňkových skupin zvířat exponovaných dalším dávkám. Pro některé typy zkoušených chemických látek (např. humánních léčivých přípravků), na něž se vztahují specifické požadavky, se tyto limity mohou lišit. Pokud zkoušená chemická látka vyvolává toxicitu, měla by být zvolena limitní dávka plus dvě nižší dávky (jak je popsáno výše). Limitní dávka je 1 000 mg/kg tělesné hmotnosti/den při době podávání 14 dní, nebo delší nebo 2 000 mg/kg tělesné hmotnosti/den při dobách podávání kratších než 14 dní.

Podávání dávek

29. Při plánování zkoušky by měl být zvážěn předpokládaný způsob expozice člověka. Proto lze zvolit odůvodněné způsoby expozice např. potravou, v pitné vodě, lokálně, subkutánně, nitrožilně, orálně (pomocí žaludeční sondy), inhalací nebo implantací. Způsob podávání by měl být v každém případě zvolen tak, aby zajistil odpovídající expozici cílové tkáně. Intraperitoneální aplikace se většinou nedoporučuje, pokud to není vědecky odůvodněno, protože to obvykle není fyziologicky relevantní způsob expozice člověka. Je-li zkoušená chemická látka přimíchána do potravy nebo pitné vody, zejména v případě jednorázové dávky, mělo by se dbát na to, že prodleva mezi příjmem krmiva a vody a odběrem vzorku by měla být dostatečná, aby umožnila detekci účinků (viz odstavec 33). Maximální objem kapaliny, který lze najednou podat žaludeční sondou nebo injekčně, závisí na velikosti pokusného zvířete. Toto množství by obvykle nemělo překročit 1 ml/100g tělesné hmotnosti, s výjimkou vodných roztoků, kde lze použít maximálně 2 ml/100g tělesné hmotnosti. Použití větších objemů, než jsou tyto (pokud je povolují právní předpisy o šetrném zacházení se zvířaty), je třeba odůvodnit. Kolísání objemu zkoušené chemické látky by se mělo omezit nastavením koncentrace tak, aby se zajistil konstantní objem v závislosti na tělesné hmotnosti na všech úrovních dávek.

Pozorování

30. Všeobecné klinické pozorování pokusných zvířat a záznam klinických příznaků by se měly provádět nejméně jednou denně, přednostně ve stejnou dobu (stejně doby) a s uvážením doby očekávaného maximálního účinku po podání látky. Nejméně dvakrát denně by měla být

provedena prohlídka všech zvířat za účelem zjištění morbidity a mortality. Všechna zvířata by měla být zvážena na počátku studie, nejméně jednou týdně během studií s opakovanou dávkou a při utracení. Při studiích s alespoň týdenním trváním by se alespoň jednou týdně měla změřit spotřeba krmiva. Pokud je zkoušená chemická látka podávána v pitné vodě, měla by se spotřeba vody měřit při každé výměně vody a alespoň jednou týdně. Zvířata, která vykazují neletální indikátory nadměrné toxicity, by měla být utracena před uplynutím doby zkoušky (13).

Příprava preparátů pro analýzu chromosomů

31. Ihned po usmrcení se z jednoho nebo obou varlat získá suspenze zárodečných buněk, hypotonizuje se a fixuje podle stanovených protokolů (např. (2) (14) (15)). Poté se nanese na podložní sklička a obarví se (16) (17). Všechna sklička by měla být zakódována, aby hodnotitel neznal jejich identifikaci.

Analýza

32. U každého zvířete by mělo být posouzeno alespoň 200 buněk v dobře rozprostřené metafázi (3) (11). Jestliže je historická četnost negativních kontrol $< 1 \%$, mělo by být posouzeno více než 200 buněk / zvíře, aby se zvýšila statistická síla (3). Používat by se měly takové metody barvení, které umožňují identifikaci centromery.
33. Chromozomové a chromatidové aberace by měly být zaznamenávány odděleně a klasifikovány podle podtypů (zlomy, výměny). Při stanovení, zda chemická látka indukuje významné navýšení výskytu buněk s chromozomovými aberacemi, se zaznamenají gapy, ale neberou se v úvahu. Postupy používané v laboratoři by měly zajistit, aby analýzu chromozomových aberací prováděli dobře odborně připravení hodnotitelé. Vzhledem k tomu, že při přípravě preparátů často dochází k poškození části buněk v metafázi s následnou ztrátou chromozomů, měly by vyšetřované buňky obsahovat centromery v počtu nejméně $2n \pm 2$, kde n je haploidní počet chromozomů pro daný druh.
34. I když je účelem zkoušky detekovat strukturní chromozomové aberace, je důležité zaznamenat četnost polyploidních buněk a buněk s endoreduplikovanými chromozomy, pokud jsou tyto jevy pozorovány (viz odstavec 44).

ÚDAJE A PŘEDKLÁDÁNÍ ZPRÁV

Zpracování výsledků

35. Údaje pro jednotlivá zvířata by měly být zpracovány ve formě tabulky. Pro každé zvíře by měl být vyhodnocen počet buněk se strukturními chromozomovými aberacemi a počet chromozomových aberací na buňku. Chromatidové a chromozomové aberace klasifikované podle podtypů (zlomy, výměny) by měly být uvedeny odděleně spolu s jejich počty a četností v experimentálních a kontrolních skupinách. Gapy se zaznamenávají zvlášť. Četnost výskytu gapů se zaznamenává, ale do analýzy celkové četnosti strukturních chromozomových aberací se

nezahrnuje. Zaznamenaná se procentuální podíl polyploidie a/nebo endoreduplikovaných chromozomů, pokud jsou pozorovány.

36. Měly by být uvedeny údaje o toxicitě a klinických příznacích (podle odstavce 30).

Kritéria přijatelnosti

37. Přijatelnost zkoušky určují tato kritéria.

- Souběžná negativní kontrola odpovídá publikovaným normám pro historické údaje o negativní kontrole, které by obvykle měly být $> 0 \%$ a $\leq 1,5 \%$ buněk s chromozomovými aberacemi, a historickým kontrolním údajům laboratoře, jsou-li k dispozici (viz odstavce 10 a 18).
- Souběžné pozitivní kontroly vyvolávají odezvy, které odpovídají publikovaným normám pro historické údaje o pozitivní kontrole a historickým pozitivním kontrolním údajům laboratoře, jsou-li k dispozici, a vyvolávají statisticky významný nárůst v porovnání s negativní kontrolou (viz odstavce 17, 18).
- Byl analyzován průměrný počet buněk a dávek (viz odstavce 28 a 32).
- Kritéria pro výběr nejvyšší dávky jsou v souladu s kritérii popsány v odstavcích 25 a 26.

38. Je-li pozorována mitóza i meióza, měl by být jako míra cytotoxicity stanoven u všech exponovaných zvířat a zvířat sloužících jako negativní kontrola poměr spermatogonií v mitóze vzhledem k první a druhé meiotické metafázi, a to v celkovém vzorku 100 dělících se buněk na jedno zvíře. Pokud je sledována pouze mitóza, nejméně v 1 000 buňkách na zvíře by měl být stanoven mitotický index.

Hodnocení a interpretace výsledků

39. Aby byly k dispozici dostatečné údaje pro analýzu vztahu dávky a odezvy, měly by být analyzovány nejméně tři exponované skupiny.

40. Za předpokladu, že všechna kritéria přijatelnosti byla splněna, lze zkoušenou chemickou látku považovat za jasně pozitivní, pokud:

- alespoň jedna ze zkoušených dávek vykazuje statisticky významný nárůst v porovnání se souběžně provedenou negativní kontrolou,
- nárůst je závislý na dávce alespoň při jednom odběru vzorků, a
- všechny výsledky jsou mimo přijatelné rozpětí negativních kontrolních údajů nebo distribuci historických údajů laboratoře o negativních kontrolách (např. mimo 95% rozmezí dle Poissonova rozdělení), pokud jsou k dispozici.

Pak se má za to, že zkoušená chemická látka je schopna vyvolávat chromozomové aberace ve spermatogoniích pokusných zvířat. Doporučení ohledně nejvhodnějších statistických metod lze

těž najít v literatuře (11) (18). Použité statistické testy by měly brát v úvahu zvíře jako experimentální jednotku.

41. Za předpokladu, že všechna kritéria přijatelnosti byla splněna, lze zkoušenou chemickou látku považovat za jasně negativní, pokud:

- žádná ze zkušebních dávek nevykazuje statisticky významný nárůst v porovnání se souběžně provedenou negativní kontrolou,
- v žádném experimentálním uspořádání neexistuje nárůst v závislosti na dávce, a dále
- všechny výsledky jsou v přijatelném rozpětí negativních kontrolních údajů nebo distribuci historických údajů laboratoře o negativních kontrolách (např. v 95% rozmezí dle Poissonova rozdělení), pokud jsou k dispozici.

Pak se má za to, že zkoušená chemická látka není schopna vyvolávat chromozomové aberace ve spermatogoniích pokusných zvířat. Doporučení ohledně nejvhodnějších statistických metod lze též najít v literatuře (11) (18). Negativní výsledek nevylučuje možnost, že chemická látka může indukovat chromozomální aberace v pozdějších fázích vývoje, které nejsou studovány, nebo genové mutace.

42. Ověření jasně pozitivní či jasně negativní odezvy se nepožaduje.

43. Jestliže odezva není jasně negativní nebo pozitivní, a s cílem napomoci při stanovení biologického významu výsledku (např. slabý nebo okrajový nárůst), by měly být údaje vyhodnoceny na základě odborného posouzení a/nebo dalším vyšetřením s využitím stávajících experimentálních údajů, jako je skutečnost, zda je pozitivní výsledek mimo přijatelné rozpětí negativních kontrolních údajů nebo historických negativních kontrolních údajů laboratoře (19).

44. Ve vzácných případech ani po dalším šetření nebude možné na základě daného souboru údajů dospět k závěru o pozitivitě či negativitě výsledku, a bude proto učiněn závěr, že výsledek je neurčitý.

45. Nárůst počtu polyploidních buněk může znamenat, že zkoušená chemická látka má schopnost potlačit mitotické procesy a indukovat numerické chromozomové aberace (20). Nárůst počtu buněk s endoreduplikovanými chromozomy může znamenat, že zkoušená chemická látka má schopnost potlačit progresi buněčného cyklu (21) (22), což je jiný mechanismus indukování numerických chromozomových změn než inhibice mitotických procesů (viz odstavec 2). Výskyt polyploidních buněk a buněk s endoreduplikovanými chromozomy by se proto měl zaznamenat odděleně.

Závěrečná zpráva

46. Závěrečná zpráva by měla obsahovat tyto informace:

Shrnutí.

Zkoušená chemická látka:

- zdroj, číslo šarže, a je-li k dispozici, datum použitelnosti,
- stabilita zkoušené chemické látky samotné, je-li známa,
- rozpustnost a stabilita zkoušené chemické látky v rozpouštědle, jsou-li známy,
- měření pH, případně osmolality a sraženiny v kultivačním médiu, do něhož byla přidána zkoušená chemická látka.

Jednosložková látka:

- fyzický vzhled, rozpustnost ve vodě a další relevantní fyzikálně-chemické vlastnosti,
- chemická identifikace, např. název podle IUPAC nebo CAS, číslo CAS, kód SMILES nebo InChI, strukturní vzorec, čistota, případně chemická identita nečistot, je-li to prakticky možné, atd.

Vícesložková látka, látka s neznámým nebo proměnlivým složením, komplexní reakční produkt nebo biologický materiál a směsi:

- charakterizované pokud možno chemickou identitou (viz výše), kvantitativním výskytem a relevantními fyzikálně-chemickými vlastnostmi složek.

Příprava zkoušené chemické látky:

- zdůvodnění volby vehikula,
- rozpustnost a stabilita zkoušené chemické látky v rozpouštědle/vehikulu,
- příprava potravy, pitné vody nebo inhalačních aplikačních forem,
- analytická stanovení aplikační formy (např. stabilita, homogenita, nominální koncentrace),
- pokud se provádí.

Pokusná zvířata:

- použitý druh/kmen a odůvodnění jeho použití,
- počet a věk zvířat,
- původ, podmínky chovu, strava atd.,
- metoda jednoznačného označení zvířat,
- u krátkodobých studií: hmotnost jednotlivých zvířat na začátku a na konci zkoušky, u studií trvajících déle než jeden týden: hmotnosti jednotlivých zvířat během studie a spotřeba potravy. Mělo by být uvedeno rozpětí tělesné hmotnosti, střední hodnota a směrodatná odchylka pro každou skupinu.

Zkušební podmínky:

- údaje o pozitivní a negativní (vehikulum/rozpouštědlo) kontrole,
- údaje ze studie pro zjištění rozsahu dávek, pokud byla provedena,
- zdůvodnění zvolených úrovní dávek,
- zdůvodnění způsobu podávání,
- podrobnosti o přípravě zkoušené chemické látky,
- podrobné údaje o podávání zkoušené chemické látky,
- zdůvodnění dob usmrcení,
- metody zjišťování toxicity, včetně případně histopatologických nebo hematologických analýz a četnosti, s jakou jsou prováděna pozorování zvířat, a četnosti vážení,
- metody ověřování, zda se zkoušená chemická látka dostala k cílové tkáni, nebo ověřování obecné cirkulace, pokud byly získány negativní výsledky,
- skutečná dávka (v mg na kg tělesné hmotnosti za den) vypočtená z koncentrace zkoušené chemické látky v potravě / pitné vodě (v ppm) a případně ze spotřeby,
- podrobnosti o jakosti krmení a vody,
- podrobný popis harmonogramů aplikace a odběru vzorků a odůvodnění výběru konkrétního schématu,
- způsob utracení,
- způsob analgezie (pokud se používá),
- postupy izolace tkání,
- identifikace chemické látky zastavující metafázi, její koncentrace a délka aplikace,
- metody přípravy preparátů,
- kritéria hodnocení aberací,
- počet analyzovaných buněk na jedno zvíře,
- kritéria klasifikace studie na pozitivní, negativní nebo dvojznačnou.

Výsledky:

- stav zvířat před zkouškou a během zkoušky, včetně známek toxicity,
- tělesná hmotnost a hmotnost orgánů při utracení (pokud se používá více režimů expozice, tělesná hmotnost stanovená v průběhu režimu aplikace),
- známky toxicity,
- mitotický index,

- poměr spermatogonií v mitóze vzhledem k první a druhé metafázi meiózy nebo jiný průkaz expozice cílové tkáni,
- typ a počet aberací uvedený samostatně pro každé zvíře,
- celkový počet aberací ve skupině se středními hodnotami a směrodatnými odchylkami,
- počet buněk s aberacemi ve skupině se středními hodnotami a směrodatnými odchylkami.
- podle možnosti závislost odezvy na dávce,
- použité statistické analýzy a metody,
- údaje o souběžné negativní kontrole,
- historické údaje o negativních kontrolách s rozpětími, středními hodnotami a směrodatnými odchylkami a 95% interval spolehlivosti (je-li k dispozici), nebo publikované historické údaje o negativních kontrolách použité pro přijatelnost výsledků zkoušky,
- údaje o souběžné pozitivní kontrole,
- změny ploidie, byly-li pozorovány, včetně četností polyploidie a/nebo endoreduplikovaných buněk.

Diskuse o výsledcích

Závěr

LITERATURA

- (1) OECD (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, No. Series on Testing and Assessment, No 234, OECD, Paris
- (2) Adler, I.-D. (1984). Cytogenetic Tests in Mammals. In: Mutagenicity Testing: a Practical Approach. Ed. S. Venitt and J. M. Parry. IRL Press, Oxford, Washington DC, pp. 275-306.
- (3) Adler I.-D., Shelby M. D., Bootman, J., Favor, J., Generoso, W., Pacchierotti, F., Shibuya, T. and Tanaka N. (1994). International Workshop on Standardisation of Genotoxicity Test Procedures. Summary Report of the Working Group on Mammalian Germ Cell Tests. Mutation Res., 312, 313-318.
- (4) Russo, A. (2000). *In Vivo* Cytogenetics: Mammalian Germ Cells. Mutation Res., 455, 167-189.
- (5) Hess, R.A. and de Franca L.R. (2008). Spermatogenesis and Cycle of the Seminiferous Epithelium. In: Molecular Mechanisms in Spermatogenesis, Cheng C.Y. (Ed.) Landes Bioscience and Springer Science+Business Media, pp. 1-15.
- (6) Adler, I.-D. (1974). Comparative Cytogenetic Study after Treatment of Mouse Spermatogonia with Mitomycin C, Mutation. Res., 23(3): 368-379. Adler, I.D. (1986). Clastogenic Potential in Mouse Spermatogonia of Chemical Mutagens Related to their Cell-Cycle Specifications. In: Genetic Toxicology of Environmental Chemicals, Part B: Genetic Effects and Applied Mutagenesis, Ramel C., Lambert B. and Magnusson J. (Eds.) Liss, New York, pp. 477-484.
- (7) Cattanaach, B.M., and Pollard C.E. (1971). Mutagenicity Tests with Cyclohexylamine in the Mouse, Mutation Res., 12, 472-474.
- (8) Cattanaach, B.M., and Williams, C.E. (1971). A search for Chromosome Aberrations Induced in Mouse Spermatogonia by Chemical Mutagens, Mutation Res., 13, 371-375.
- (9) Rathenburg, R. (1975). Cytogenetic Effects of Cyclophosphamide on Mouse Spermatogonia, Humangenetik 29, 135-140.
- (10) Shiraishi, Y. (1978). Chromosome Aberrations Induced by Monomeric Acrylamide in Bone Marrow and Germ Cells of Mice, Mutation Res., 57(3): 313-324.
- (11) Adler I.-D., Bootman, J., Favor, J., Hook, G., Schriever-Schwemmer, G., Welzl, G., Whorton, E., Yoshimura, I. and Hayashi, M. (1998). Recommendations for

Statistical Designs of *In Vivo* Mutagenicity Tests with Regard to Subsequent Statistical Analysis, *Mutation Res.*, 417, 19–30.

- (12) Fielder, R. J., Allen, J. A., Boobis, A. R., Botham, P. A., Doe, J., Esdaile, D. J., Gatehouse, D. G., Hodson-Walker, G., Morton, D. B., Kirkland, D. J. and Richold, M. (1992). Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group: Dose setting in *In Vivo* Mutagenicity Assays. *Mutagenesis*, 7, 313-319.
- (13) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation, Series on Testing and Assessment, (No 19.), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (14) Yamamoto, K. and Kikuchi, Y. (1978). A New Method for Preparation of Mammalian Spermatogonial Chromosomes. *Mutation Res.*, 52, 207-209.
- (15) Hsu, T.C., Elder, F. and Pathak, S. (1979). Method for Improving the Yield of Spermatogonial and Meiotic Metaphases in Mammalian Testicular Preparations. *Environ. Mutagen.*, 1, 291-294.
- (16) Evans, E.P., Breckon, G., and Ford, C.E. (1964). An Air-Drying Method for Meiotic Preparations from Mammalian Testes. *Cytogenetics and Cell Genetics*, 3, 289-294.
- (17) Richold, M., Ashby, J., Bootman, J., Chandley, A., Gatehouse, D.G. and Henderson, L. (1990). *In Vivo* Cytogenetics Assays, In: D.J. Kirkland (Ed.) Basic Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report. Part I revised. Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 115-141.
- (18) Lovell, D.P., Anderson, D., Albanese, R., Amphlett, G.E., Clare, G., Ferguson, R., Richold, M., Papworth, D.G. and Savage, J.R.K. (1989). Statistical Analysis of *In Vivo* Cytogenetic Assays In: D.J. Kirkland (Ed.) Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing, Report, Part III. Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 184-232.
- (19) Hayashi, M., Dearfield, K., Kasper, P., Lovell, D., Martus, H.-J. and Thybaud, V. (2011). Compilation and Use of Genetic Toxicity Historical Control Data. *Mutation Res.*, 723, 87-90.
- (20) Warr T.J., Parry E.M. and Parry J.M. (1993). A Comparison of Two *In Vitro* Mammalian Cell Cytogenetic Assays for the Detection of Mitotic Aneuploidy Using 10 Known or Suspected Aneugens, *Mutation Res.*, 287, 29-46.
- (21) Huang, Y., Change, C. and Trosko, J.E. (1983). Aphidicolin-Induced Endoreduplication in Chinese Hamster Cells. *Cancer Res.*, 43, 1362-1364.

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

Dodatek

DEFINICE

Aneuploidie: jakákoli odchylka od normálního diploidního (nebo haploidního) počtu chromozomů o jeden nebo více chromozomů, avšak nikoli o celou sadu (nebo více sad) chromozomů (polyploidie).

Centromera: oblast (oblasti) chromozomu, k níž (k nimž) se během dělení buněk připojí dělicí vřeténko umožňující uspořádaný pohyb dceřiných chromozomů k pólům dceřiných buněk.

Chemická látka: látka nebo směs.

Rozmanitost chromozomů: rozmanitost tvarů (např. metacentrické, akrocentrické atd.) a velikosti chromozomů.

Chromatidová aberace: strukturní poškození chromozomu v podobě zlomu jedné chromatidy nebo zlomu a opětného spojení chromatid.

Chromozomová aberace: strukturní poškození chromozomu v podobě zlomu nebo zlomu a spojení obou chromatid v tomtéž místě.

Klastogen: jakákoli chemická látka, která způsobuje strukturní chromozomové aberace v populacích buněk nebo organismů.

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

Genotoxický: obecný termín zahrnující všechny typy poškození DNA nebo chromozomů včetně jejich rozlámání, delecí, aduktů, modifikací a propojení nukleotidů, přestavby, mutací, chromozomových aberací a aneuploidie. Ne všechny druhy genotoxických účinků způsobují mutace nebo stálé poškození chromozomů.

Mitotický index (MI): poměr buněk v metafázi vydělený celkovým počtem buněk zjištěných v populaci buněk; udává stupeň proliferace této populace.

Mitóza: proces dělení buněčného jádra, který se obvykle člení na profázi, prometafázi, metafázi, anafázi a telofázi.

Mutagenní: produkující dědičné změny sekvence (sekvencí) párů bází DNA v genech nebo struktury chromozomů (chromozomové aberace).

Numerická abnormalita: odchylka počtu chromozomů od normálního počtu obvyklého u použitých zvířat.

Polyploidie: násobek haploidního počtu chromozomových sad (n) jiný než diploidní (tj. $3n$, $4n$ atd.).

Strukturní aberace: mikroskopicky pozorovatelné změny struktury chromozomů při buněčném dělení ve stadiu metafáze; jeví se jako delece a fragmenty, výměny.

Zkoušená chemická látka: jakákoli látka nebo směs zkoušená touto zkušební metodou.

UVCB: chemické látky s neznámým nebo proměnlivým složením, komplexní reakční produkty
nebo biologický materiál.

(5) V části B se kapitola B.40 nahrazuje tímto:

„B.40 LEPTAVÉ ÚČINKY NA KŮŽI *IN VITRO*: ZKUŠEBNÍ METODA TRANSKUTÁNNÍHO ELEKTRICKÉHO ODPORU (TER)

ÚVOD

1. Tato zkušební metoda je rovnocenná Pokynu OECD pro zkoušení (TG) č. 430 (2015). Leptavými účinky na kůži se označuje vyvolání nevratného poškození kůže, které se projevuje jako viditelná, do koria zasahující nekróza pokožky, po aplikaci zkoušené chemické látky [jak ji definuje globálně harmonizovaný systém klasifikace a označování chemických látek Organizace spojených národů (GHS OSN) (1) a nařízení Evropské unie (EU) č. 1272/2008 o klasifikaci, označování a balení látek a směsí (dále jen „nařízení CLP“)¹]. Tato aktualizovaná zkušební metoda B.40 stanoví postup *in vitro*, který umožňuje určení nežiravých a žiravých látek a směsí podle systému GHS OSN a nařízení CLP.
2. Posuzování leptavých účinků na kůži obvykle zahrnovalo používání laboratorních zvířat (zkušební metoda B.4 ekvivalentní Pokynu OECD pro zkoušení č. 404 původně vydanému v roce 1981 a revidovanému v letech 1992, 2002 a 2015) (2). Kromě stávající zkušební metody B.40 byly validovány další zkušební metody *in vitro* pro zkoušení potenciálních leptavých účinků chemických látek na kůži, které byly přijaty jako zkušební metoda B.40a (ekvivalentní Pokynu OECD pro zkoušení č. 431) (3) a zkušební metoda B.65 (ekvivalentní Pokynu OECD pro zkoušení č. 435) (4), jež rovněž dokážou v případě potřeby určit podkategorie žiravých chemických látek. Několik validovaných zkušebních metod *in vitro* bylo přijato jako zkušební metoda B.46 (ekvivalentní Pokynu OECD pro zkoušení č. 439) (5) pro použití ke zkoušení dráždivosti pro kůži. Pokyny OECD k integrovanému přístupu ke zkouškám a posuzování (IATA) dráždivých/leptavých účinků na kůži popisují několik modulů obsahujících různé informační zdroje a analytické nástroje a poskytují návod (i) na integraci a používání stávajících údajů ze zkoušek i jiných údajů pro posouzení potenciálu dráždivých a leptavých účinků chemických látek na kůži a (ii) a navrhuji přístup, když je nutné další zkoušení (6).
3. Tato zkušební metoda se týká sledovaných vlastností leptavých účinků na kůži z hlediska lidského zdraví. Vychází ze zkušební metody transkutánního elektrického odporu kůže potkana

¹ Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1272/2008 ze dne 16. prosince 2008 o klasifikaci, označování a balení látek a směsí, o změně a zrušení směrnic 67/548/EHS a 1999/45/ES a o změně nařízení (ES) č. 1907/2006, Úř. věst. L 353, 31.12.2008, s. 1.

(TER), která využívá terčíky kůže k určení žíravých látek podle jejich schopnosti zapříčinit ztrátu normální integrity a bariérové funkce rohovité vrstvy (*stratum corneum*). Odpovídající pokyn OECD pro zkoušení byl původně přijat v roce 2004 a v roce 2015 byl aktualizován o odkazy na pokyny IATA.

4. Aby mohly být vyhodnoceny zkoušky leptavých účinků na kůži *in vitro* pro účely regulace, byly provedeny předběžné validační studie (7) a poté formální validační studie zkušební metody TER s využitím kůže potkana pro posouzení leptavých účinků na kůži (8) (9) (10) (11). Výsledek těchto studií vedl k doporučení, že by zkušební metoda TER (určená jako validovaná referenční metoda – VRM) mohla být používána pro účely regulace pro posouzení leptavých účinků na kůži *in vivo* (12) (13) (14).
5. Nežli lze pro regulační účely použít pro leptavé účinky na kůži navrhovanou podobnou nebo modifikovanou zkušební metodu TER *in vitro* jinou než VRM, je zapotřebí stanovit její spolehlivost, relevantnost (přesnost) a omezení týkající se jejího navrhovaného použití, aby se zajistila její podobnost s VRM v souladu s požadavky standardů funkčnosti (15). Vzájemné uznávání údajů bude v rámci OECD zaručeno až poté, co bude každá navrhovaná nebo aktualizovaná zkušební metoda podle standardů funkčnosti podrobena revizi a zahrnuta do odpovídajícího pokynu OECD ke zkoušení.

DEFINICE

6. Použité definice jsou uvedeny v dodatku.

VÝCHOZÍ ÚVAHY

7. Validační studie (10) a další zveřejněné studie (16) (17) ukazují, že zkušební metoda TER dokáže rozlišit známé látky s leptavými účinky na kůži od látek, které na kůži nemají leptavé účinky, při celkové citlivosti 94 % (51/54) a specifčnosti 71 % (48/68) u databáze 122 látek.
8. Tato zkušební metoda řeší leptavé účinky na kůži *in vitro*. Umožňuje určení nežíravých a žíravých zkoušených chemických látek podle systému GHS OSN a nařízení CLP. Jak prokazují validační studie (8) (9) (10) (11), omezením této zkušební metody je to, že neumožňuje klasifikaci žíravých látek a směsí do podkategorií podle systému GHS OSN / CLP. Platný právní rámec určí, jak bude tato zkušební metoda používána. I když tato zkušební metoda neposkytuje odpovídající informace o dráždivosti pro kůži, je třeba poznamenat, že zkušební metoda B.46 řeší konkrétně zdravotní účinky dráždivosti pro kůži *in vitro* (5). Pro úplné vyhodnocení lokálních účinků na kůži po jednotlivých kožních expozicích je třeba postupovat podle pokynů OECD k integrovanému přístupu ke zkouškám a posuzování dráždivých/leptavých účinků na kůži (6).
9. Při validaci této zkušební metody byla testována široká škála chemikálií (především chemických látek) a empirická databáze validační studie obsahovala celkem 60 látek z

nejrůznějších chemických tříd (8) (9). Podle všech dostupných údajů je tato zkušební metoda použitelná pro širokou škálu chemických tříd a skupenství, včetně kapalin, polotuhých látek, pevných látek a vosků. Protože však pro některá skupenství nejsou okamžitě k dispozici zkušební položky s vhodnými referenčními údaji, je třeba poznamenat, že při validaci byl posuzován srovnatelně malý počet vosků a žíravých pevných látek. Kapaliny mohou být vodné či nevodné; pevné látky mohou být ve vodě rozpustné či nerozpustné. V případech, kdy mohou být předloženy důkazy prokazující nepoužitelnost této zkušební metody ke zkoušení specifické kategorie látek, neměla by se tato zkušební metoda na tuto specifickou kategorii látek používat. Dále se předpokládá, že tato zkušební metoda je použitelná i pro směsi jako rozšíření její použitelnosti pro látky. Avšak vzhledem ke skutečnosti, že směsi zahrnují širokou škálu kategorií a složení a že v současné době jsou k dispozici pouze omezené údaje o zkoušení směsí, v případech, kdy lze prokázat nepoužitelnost této zkušební metody pro konkrétní kategorii směsí (*např.* podle strategie navržené v Eskes *et al.*, 2012) (18), by se tato zkušební metoda neměla pro tuto konkrétní kategorii směsí používat. Před použitím této zkušební metody ke zkoušení směsí s cílem získat údaje pro zamýšlené regulační účely by mělo být zváženo, zda tato metoda může pro tento účel poskytnout přiměřené výsledky, a pokud ano, proč tomu tak je. Takové úvahy nejsou nutné, pokud existuje právní požadavek na zkoušení dané směsi. Plyny a aerosoly dosud nebyly ve validačních studiích hodnoceny (8) (9). Ačkoli není jejich zkoušení pomocí zkušební metody TER teoreticky vyloučeno, současná zkušební metoda zkoušení plynů a aerosolů neumožňuje.

PRINCIP ZKOUŠKY

10. Zkoušená chemická látka je aplikována až 24 hodin na epidermální stranu terčíků kůže ve dvoukomorovém zkušebním systému, ve kterém terčíky kůže oddělují obě komory. Terčíky kůže jsou odebrány z humánně usmrcených potkanů starých 28–30 dní. Chemické látky s leptavými účinky jsou identifikovány schopností způsobit ztrátu normální integrity a bariérové funkce rohovité vrstvy (*stratum corneum*), která je měřena jako snížení vlastního TER pod určitou prahovou úroveň (16) (viz odstavec 32). Jako hraniční hodnota TER pro pokožku potkanů byla vybrána hodnota 5 k Ω a to na základě rozsáhlých údajů pro široké spektrum látek, pro něž hodnota TER v převážné většině případů byla buď značně nad (často > 10 k Ω), nebo značně pod (často < 3 k Ω) touto hraniční hodnotou (16). Všeobecně platí, že zkoušené chemické látky, které nejsou žíravé pro zvířata, ale jsou dráždivé nebo nedráždivé, nesnižují TER pod tuto hraniční hodnotu. Použití jiných kožních přípravků nebo jiného přístroje může změnit volbu hraniční hodnoty a vyžadovat její další validaci.
11. Do zkušebního postupu je pro potvrzující zkoušku pozitivních výsledků včetně hodnot TER okolo 5 k Ω zařazen stupeň pro stanovení vázání barviva. Tento stupeň pro stanovení vázání barviva určuje, zda zvýšení permeability iontů je důsledkem fyzikálního porušení rohovité vrstvy (*stratum corneum*). Ukázalo se, že metoda TER s využitím kůže potkana umožňuje předvídat výsledky zjišťování leptavých účinků *in vivo* s králíky podle zkušební metody B.4 (2).

PROKÁZÁNÍ ZPŮSOBILOSTI

12. Dříve než začnou laboratoře rutinně používat zkušební metodu TER s využitím kůže potkana, která dodržuje tuto zkušební metodu, měly by prokázat svou odbornou způsobilost správným určením klasifikace dvanácti vhodných látek doporučených v tabulce 1. V situacích, kdy některá z uvedených látek není k dispozici, lze v odůvodněných případech použít jinou látku, u níž jsou k dispozici odpovídající referenční údaje o použití *in vivo* a *in vitro* (např. ze seznamu referenčních chemických látek (16)), pokud budou použita stejná kritéria výběru jako kritéria popsaná v tabulce 1.

Tabulka 1: Seznam vhodných látek¹

Látka	Č. CAS	Třída chemických látek ²	Kategorie GHS OSN/CLP na základě výsledků <i>in vivo</i> ³	Kategorie VRM na základě výsledků <i>in vitro</i>	Skupenství	pH ⁴
Látky žíravé <i>in vivo</i>						
N,N'-dimethyl dipropylentriamin	10563-29-8	organická zásada	1A	6 x C	K	8,3
propan-1,2-diamin	78-90-0	organická zásada	1A	6 x C	K	8,3
kyselina sírová (10%)	7664-93-9	anorganická kyselina	(1A)/1B/1C	5 x C 1x NC	K	1,2
hydroxid draselný (10% aq)	1310-58-3	anorganická zásada	(1A)/1B/1C	6 x C	K	13,2
kyselina oktanová (kaprylová)	124-07-2	organická kyselina	1B/1C	4 x C 2 x NC	K	3,6
2-terc-butylfenol	88-18-6	fenol	1B/1C	4 x C 2 x NC	K	3,9
Látky nežíravé <i>in vivo</i>						
kyselina isostearová	2724-58-5	organická kyselina	NC	6 x NC	K	3,6
4-amino-1H-1,2,4-triazol	584-13-4	organická zásada	NC	6 x NC	P	5,5
fenethylbromid	103-63-9	elektrofilní	NC	6 x NC	K	3,6
4-(methylthio)benzaldehyd	3446-89-7	elektrofilní	NC	6 x NC	K	6,8
1,9-dekadien	1647-16-1	neutrální organická	NC	6 x NC	K	3,9
tetrachlorethen	127-18-4	neutrální organická	NC	6 x NC	K	4,5

Zkratky: aq = vodný; č. CAS = Chemical Abstracts Service Registry Number (registrační číslo CAS); VRM = validovaná referenční metoda; ND = neurčeno.

¹Látky pro zkoušení způsobilosti, rozříděné nejprve na žíravé a nežíravé, poté do podkategorií leptavých látek a poté podle chemické třídy, byly vybrány z látek použitých ve validační studii ECVAM zkušební metody TER s využitím kůže potkana (8) (9). Není-li uvedeno jinak, byly látky zkoušeny na úrovni čistoty dosažené při nákupu z komerčního

zdroje (8). Výběr zahrnoval pokud možno látky, které: i) jsou charakteristické pro celý rozsah poleptání (např. nežíravé; slabě až silně žíravé), jež validovaná referenční metoda dokáže změřit nebo predikovat; ii) jsou charakteristické pro chemické třídy použité ve validační studii; iii) vyjadřují funkční charakteristiky validované referenční metody; iv) mají chemickou strukturu, která je dobře definována; v) vyvolávají v referenční zkušební metodě *in vivo* definitivní výsledky; vi) jsou komerčně dostupné; a vii) nejsou spojeny s příliš vysokými náklady na likvidaci odpadu.

²Chemická třída přiřazená podle Barratt *et al.* (8).

³Odpovídající obalové skupiny jsou UN I, II a III pro kategorie GHS OSN/CLP 1A, 1B a 1C v tomto pořadí.

⁴Hodnoty pH převzaty z Fentem *et al.* (9) a Barratt *et al.* (8).

POSTUP

13. K dispozici jsou standardní prováděcí postupy pro zkušební metodu TER s využitím kůže potkana pro zjišťování leptavých účinků na kůži (19). Zkušební metody TER s využitím kůže potkana zahrnuté v této zkušební metodě musí splňovat následující podmínky:

Zvířata

14. Měli by být použiti potkani, protože citlivost jejich kůže k látkám v této zkušební metodě již byla prokázána (12) a jsou jediným zdrojem kůže, který je formálně validován (8) (9). Stáří (v době odběru kůže) a kmen potkanů jsou zvláště důležité pro zajištění toho, aby folikuly chlupů byly v latentní fázi, před začátkem růstu zralé srsti.
15. Hřbetní a boční srst mladých, přibližně 22denních samců nebo samic potkanů (z kmene příbuzného Wistaru nebo srovnatelného kmene) se opatrně odstraní holicím strojkem. Zvířata se poté umyjí opatrným otíráním, přičemž se oholená oblast ponoří do roztoku antibiotik (obsahujícího např. streptomycin, penicilin, chloramfenikol a amfotericin o koncentracích zastavujících růst bakterií). Zvířata se třetí nebo čtvrtý den po prvním omytí znovu omyjí roztokem antibiotik a použijí se do 3 dnů po druhém omytí, kdy jejich *stratum corneum* po odstranění srsti zregeneruje.

Příprava terčků kůže

16. Zvířata se humánně usmrtí ve stáří 28–30 dní; toto stáří je zásadně důležité. Z každého zvířete se poté odstraní hřbetní a boční kůže a nadbytečný tuk se z kůže opatrně seškrábne. Odeberou se terčiky kůže o průměru přibližně 20 mm. Kůže může být před použitím terčků uchovávána, je-li prokázáno, že pozitivní a negativní kontrolní údaje jsou ekvivalentní údajům získaným s kůží čerstvou.
17. Každý terčík kůže se přeloží přes jeden z konců teflonové (PTFE) trubičky tak, aby epidermis byla v kontaktu s trubičkou. Přes konec trubičky se těsně přetáhne pryžový O-kroužek, aby byla kůže upevněna, a přebytek tkáně se ořízne. Pryžový O-kroužek na teflonové trubičce se poté pečlivě utěsní ke konci teflonové trubičky vrstvou vazelíny. Trubička držaná pomocí pružinové svorky se umístí do receptorové komory obsahující roztok síranu hořečnatého MgSO_4 (154 mM) (obrázek 1). Terčík kůže musí být úplně ponořen do roztoku MgSO_4 . Z jedné kůže

potkana může být získáno 10 až 15 terčíků kůže. Rozměry trubičky a O-kroužku jsou uvedeny na obrázku 2.

18. Pro každou zvířecí kůži je před započítáním zkoušky změřena hodnota TER dvou terčíků kůže jako postup kontroly jakosti. Pro oba terčíky by měla být naměřena hodnota elektrického odporu větší než 10 k Ω , mají-li být pro tuto zkušební metodu použity ostatní terčíky. Pokud je hodnota odporu nižší než 10 k Ω , musí být ostatní terčíky z dotyčné kůže ze zkoušek vyřazeny.

Aplikace zkoušené chemické látky a kontrolních látek

19. Pro každou zkoušku (experiment) by měly být provedeny souběžné pozitivní a negativní kontroly k zajištění dostatečné účinnosti daného experimentálního modelu. V každé zkoušce (experimentu) by měly být použity terčíky kůže z téhož zvířete. Navrženými zkoušenými chemickými látkami pro pozitivní kontrolu je 10M kyselina chlorovodíková a pro negativní kontrolu destilovaná voda.
20. Kapalně zkoušené chemické látky (150 μ l) se aplikují stejnoměrně na epidermis uvnitř trubičky. Při zkoušení pevných materiálů se použije dostatečné množství tak, aby byla rovnoměrně pokryta celá epidermis. Poté se na povrch pevné látky přidá deionizovaná voda (150 μ l) a trubička se lehce protřepe. K zajištění maximálního styku látky s kůží může být nutné zahřát pevnou látku až na 30 °C, aby se zkoušená chemická látka roztavila či změkla, nebo ji rozemlít na zrnitý materiál či prášek.
21. Pro každou zkoušenou a kontrolní chemickou látku se použijí tři terčíky kůže pro každou zkoušku (experiment). Zkoušené chemické látky se aplikují po dobu 24 hodin při 20–23 °C. Zkoušená chemická látka se zcela odstraní proudem tekoucí vody o nejvýše pokojové teplotě.

Měření TER

22. Impedance kůže se měří jako TER nízkonapětovým impedančním Wheatstoneovým můstkem pro střídavý proud (18). Všeobecné specifikace můstku: provozní napětí 1 až 3 V, sinusový nebo pravoúhlý tvar kmitů střídavého proudu frekvence 50–1 000 Hz a rozsah měření nejméně 0,1–30 k Ω . Můstek použitý ve validační studii měří induktanci, kapacitanci a odpor až do hodnot 2 000 H, 2 000 μ F, a 2 M Ω při frekvencích 100 Hz nebo 1 kHz za použití sériových nebo paralelních hodnot. Pro účely měření TER v rámci zkoušky leptavých účinků se zaznamenávají hodnoty odporu při frekvenci 100 Hz a za použití sériových hodnot. Před měřením elektrického odporu se povrchové napětí kůže sníží přidáním dostatečného objemu 70% ethanolu tak, aby byla epidermis zakryta. Po několika sekundách se ethanol z trubice vylije a tkáň se zvlhčí přidáním 3 ml roztoku MgSO₄ (154 mM). Elektrody můstku se umístí na obě strany terčíku kůže za účelem odečtu odporu v k Ω /terčík kůže (obrázek 1). Rozměry elektrod a délky exponovaných částí elektrod pod krokosvorkou jsou uvedeny na obrázku 2. Svorka vnitřní elektrody je během měření odporu opřena o horní konec teflonové trubičky, aby bylo zajištěno, že se délka části elektrody ponořené v roztoku MgSO₄ nemění. Vnější elektroda je umístěna uvnitř receptorové komory tak, aby spočívala na dně komory. Vzdálenost mezi

pružinovou svorkou a dnem teflonové trubičky se udržuje konstantní (obrázek 2), neboť tato vzdálenost má vliv na naměřené hodnoty odporu. Proto by vzdálenost mezi vnitřní elektrodou a terčíkem kůže měla být konstantní a minimální (1–2 mm).

23. Je-li naměřená hodnota vyšší než 20 k Ω , může to být způsobeno zbytky vrstvy zkoušené látky na epidermální straně terčíku kůže. O odstranění této vrstvy se lze pokusit např. tím, že se teflonová trubička zakryje palcem v rukavici a přibližně 10 sekund se protřepává; roztok MgSO₄ se odstraní a měření se opakuje s čerstvým MgSO₄.
24. Vlastnosti a rozměry zkušebního přístroje a použitý experimentální postup mohou ovlivnit naměřené hodnoty TER. Prahová hodnota 5 k Ω pro leptavé účinky byla odvozena na základě údajů zjištěných se specifickým přístrojem a postupem popsány v této zkušební metodě. Pokud se změní podmínky zkoušky nebo je použit jiný přístroj, mohou platit jiné prahové a kontrolní hodnoty. Proto je nutné kalibrovat metodu a prahové hodnoty odporu zkoušením řady vhodných látek vybraných z látek použitých ve validační studii (8) (9) nebo z tříd chemických látek podobných zkoušeným látkám. Soubor vhodných látek je uveden v tabulce 1.

Metody stanovení vázání barviva

25. Expozice kůže některým nežiravým materiálům může snížit odpor pod hraniční hodnotu 5 k Ω , v důsledku čehož je umožněn průnik iontů přes *stratum corneum* a snižuje se elektrický odpor (9). Např. neutrální organické látky a povrchově aktivní látky (včetně detergentů, emulgátorů a jiných povrchově aktivních látek) mohou vést k odstranění kožních lipidů, čímž se bariéra stane pro ionty průchodnější. Proto pokud jsou při absenci viditelného poškození terčíků kůže hodnoty TER vyvolané těmito chemickými látkami okolo 5 k Ω , nebo jsou nižší než 5 k Ω , mělo by být na kontrolních a upravených tkáních provedeno posouzení průniku barviva ke zjištění, zda jsou naměřené hodnoty TER výsledkem zvýšené permeability kůže, nebo poleptání kůže (7) (9). V případě poleptání kůže, kdy *stratum corneum* je porušeno, barvivo sulforhodamin B při aplikaci na kůži rychle proniká a zbarvuje podložní tkáň. Toto konkrétní barvivo je stabilní v prostředí širokého rozsahu látek a nemá na něj vliv níže popsany extrakční postup.

Aplikace a odstranění barviva sulforhodaminu B

26. Po měření TER se roztok síranu hořečnatého vylije z trubičky a kůže se pečlivě přezkoumá, zda není zjevně poškozena. Pokud není patrné žádné zjevné větší poškození (např. perforace), aplikuje se na epidermální stranu každého terčíku kůže po dobu 2 hodin 150 μ l 10% roztoku (m/V) barviva sulforhodaminu B (Acid Red 52; C.I. 45100; č. CAS 3520-42-1) v destilované vodě. Terčíky kůže se poté přibližně 10 sekund omývají tekoucí vodou o nejvýše pokojové teplotě, aby se odstranilo veškeré volné barvivo. Všechny terčíky kůže se opatrně sejmou z teflonové trubičky a umístí se do lahvičky (např. 20 ml skleněné lahvičky pro scintilační spektrometrii) obsahující deionizovanou vodu (8 ml). Lahvičky se lehce 5 minut protřepávají, aby se odstranilo další volné barvivo. Tato metoda oplachování se poté zopakuje a pak se terčíky kůže vyjmou a vloží do lahviček obsahujících 5 ml 30% roztoku (m/V) natrium-dodecyl-sulfátu (SDS) v destilované vodě a inkubují se přes noc při 60 °C.

27. Po inkubaci se všechny terčíky kůže vyjmou a zlikvidují a zbylý roztok se odstředí 8 minut při 21 °C (při relativní odstředivé síle $\sim 175 \times g$). 1 ml vzorku supernatantu se poté zředí 4 ml 30% (m/V) roztoku SDS v destilované vodě. Absorbance (A) roztoku se měří přibližně při 565 nm.

Výpočet obsahu barviva

28. Obsah barviva sulforhodaminu B na terčík kůže se vypočte z hodnot absorbance A (9) (molární absorpční koeficient sulforhodaminu B při 565 nm = $8,7 \times 10^4$; molekulová hmotnost = 580). Obsah barviva sulforhodaminu B se vypočte pro každý terčík kůže využitím vhodné kalibrační křivky a poté se vypočte jeho střední hodnota.

Kritéria přijatelnosti

29. Střední hodnoty výsledků TER jsou přijatelné, pokud hodnoty pro paralelní pozitivní a negativní kontroly spadají do přijatelného rozmezí dané metody v dotyčné zkušební laboratoři. Pro popsanou metodiku a přístroje jsou přijatelné hodnoty rozmezí odporu uvedeny v následující tabulce:

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

30. Střední hodnoty výsledků vázání barviva jsou přijatelné, pokud hodnoty pro paralelní kontroly spadají do přijatelného rozmezí metody. Doporučené přijatelné hodnoty rozmezí obsahu barviva pro kontrolní látky pro popsanou metodiku a přístroje jsou uvedeny v následující tabulce:

Kontrola	Látka	Rozmezí obsahu barviva ($\mu\text{g/terčík kůže}$)
Pozitivní	10M kyselina chlorovodíková	40–100
Negativní	destilovaná voda	15–35

Interpretace výsledků

31. Hraniční hodnota TER odlišující žravé zkoušené chemické látky od nežravých byla stanovena během optimalizace zkušební metody, testována během předvalidační fáze a potvrzena ve formální validační studii.
32. Predikční model pro zkušební metodu TER s využitím kůže potkana (9) (19), související se systémem klasifikace GHS OSN/CLP, je uveden níže:

Zkoušená chemická látka je pokládána za látku, která nemá na kůži leptavé účinky (nežravá látka):

- i) je-li střední hodnota TER změřená pro tuto zkoušenou chemickou látku větší než 5 k Ω ; nebo
- ii) je-li střední hodnota TER naměřená u zkoušené chemické látky menší nebo rovna ($\leq$) 5 k Ω a
- terčíky kůže nevykazují žádné zjevné poškození (např. perforaci), a
- střední obsah barviva v terčíku kůže je nižší než ($<$) střední obsah barviva v terčíku kůže získaný souběžně při použití 10M HCl jako pozitivní kontroly (viz odstavec 30, kde jsou uvedeny hodnoty pozitivní kontroly).

Zkoušená chemická látka je pokládána za látku, která má na kůži leptavé účinky (žiravá látka):

- i) je-li střední hodnota TER naměřená u zkoušené chemické látky menší nebo rovna ($\leq$) 5 k Ω a terčíky kůže jsou zjevně poškozeny (např. perforovány); nebo
 - ii) je-li střední hodnota TER naměřená u zkoušené chemické látky menší nebo rovna ($\leq$) 5 k Ω a
 - terčíky kůže nejsou zjevně poškozeny (např. perforovány), ale
 - střední obsah barviva v terčíku kůže je větší nebo roven ($\geq$) střednímu obsahu barviva v terčíku kůže získanému souběžně při použití 10M HCl jako pozitivní kontroly (viz odstavec 30, kde jsou uvedeny hodnoty pozitivní kontroly).
33. U zkoušené látky s jednoznačnou klasifikací by mělo stačit jedno provedení zkoušky (experiment) za použití alespoň tří replikátů terčíků kůže. Avšak v případě hraničních výsledků, jako jsou například nesouhlasné výsledky opakovaných měření a/nebo střední hodnota TER rovnající se $5 \pm 0,5$ k Ω , by se mělo zvážit provedení druhé nezávislé zkoušky (experimentu), jakož i třetí zkoušky v případě nesouhlasných výsledků mezi prvními dvěma provedenými zkouškami (experimenty).

ÚDAJE A PŘEDKLÁDÁNÍ ZPRÁV

Údaje

34. Hodnoty odporu (k Ω) a případně hodnoty obsahu barviva ($\mu\text{g/terčík}$) pro zkoušenou chemickou látku a také pro pozitivní a negativní kontroly by měly být uvedeny ve formě tabulky, včetně údajů za jednotlivé replikované terčíky z jednotlivých zkoušek (experimentů) a jejich střední hodnoty spolu s jejich $\pm$ směrodatnou odchylkou. Uvádějí se všechny opakované experimenty. Pozorované poškození terčíků kůže je nutno uvádět za každou zkoušenou chemickou látku.

Závěrečná zpráva

35. Závěrečná zpráva by měla obsahovat tyto informace:

Zkoušené chemické látky a kontrolní látky

- jednosložková látka: chemická identifikace, např. název podle IUPAC nebo CAS, číslo CAS, kód SMILES nebo InChI, strukturní vzorec, čistota, případně chemická identita nečistot, je-li to prakticky možné, atd.,
- vícesložková látka, UVCB a směs: charakterizované pokud možno chemickou identitou (viz výše), kvantitativním výskytem a relevantními fyzikálně-chemickými vlastnostmi složek,
- fyzický vzhled, rozpustnost ve vodě a další relevantní fyzikálně-chemické vlastnosti,
- zdroj, číslo šarže, jsou-li k dispozici,
- případně ošetření zkoušených látek chemických/kontrolních látek před zkoušením (např. zahřátí, mletí),
- stabilita zkoušené chemické látky, datum použitelnosti nebo datum opětovné analýzy, je-li známo,
- podmínky skladování.

Pokusná zvířata:

- použitý kmen a pohlaví,
- stáří zvířat použitých jako dárcovská zvířata,
- zdroj, podmínky chovu, potrava atd.,
- podrobnosti přípravy kůže.

Zkušební podmínky:

- kalibrační křivky zkušebního přístroje,
- kalibrační křivky pro zkoušku účinnosti vázání barviva, pásmová propustnost použitá pro měření hodnot optické hustoty, případně rozsah linearity přístroje měřícího optické hustoty (např. spektrofotometru),
- podrobnosti zkušebního postupu pro měření TER,
- případně podrobnosti zkušebního postupu pro stanovení vázání barviva,
- použité zkušební dávky, doba (doby) expozice a teplota (teploty) expozice,
- informace o použitém postupu vymývání po expozici,
- počet replik terčíků kůže použitých na jednu zkoušenou chemickou látku a kontroly (pozitivní a negativní kontrola),
- popis jakýchkoli úprav zkušebního postupu,
- odkaz na historické údaje modelu. Ty by měly zejména zahrnovat:
 - i) přijatelnost hodnot TER pozitivních a negativních kontrol (v kΩ) s odkazem na rozsahy odporu pozitivních a negativních kontrol;

- ii) přijatelnost hodnot obsahu barviva u pozitivních a negativních kontrol (v $\mu\text{g/terčák}$) s odkazem na rozpětí obsahu barviva u pozitivních a negativních kontrol;
- iii) přijatelnost výsledků zkoušek s odkazem na historickou variabilitu mezi replikami terčáků kůže,
- popis použitých kritérií rozhodování / predikčního modelu.

Výsledky:

- údaje změřených hodnot TER a případně obsahu vázaného barviva pro jednotlivé zkoušené chemické látky a kontroly, pro každé provedení zkoušky (experiment) a každou repliku terčáků kůže (jednotlivá zvířata a jednotlivé vzorky kůže), střední hodnoty, směrodatné odchylky a variační koeficienty zpracované ve formě tabulky,
- popis jakýchkoli pozorovaných účinků,
- odvozená klasifikace s odkazem na použitý predikční model / kritéria rozhodování.

Diskuse o výsledcích

Závěry

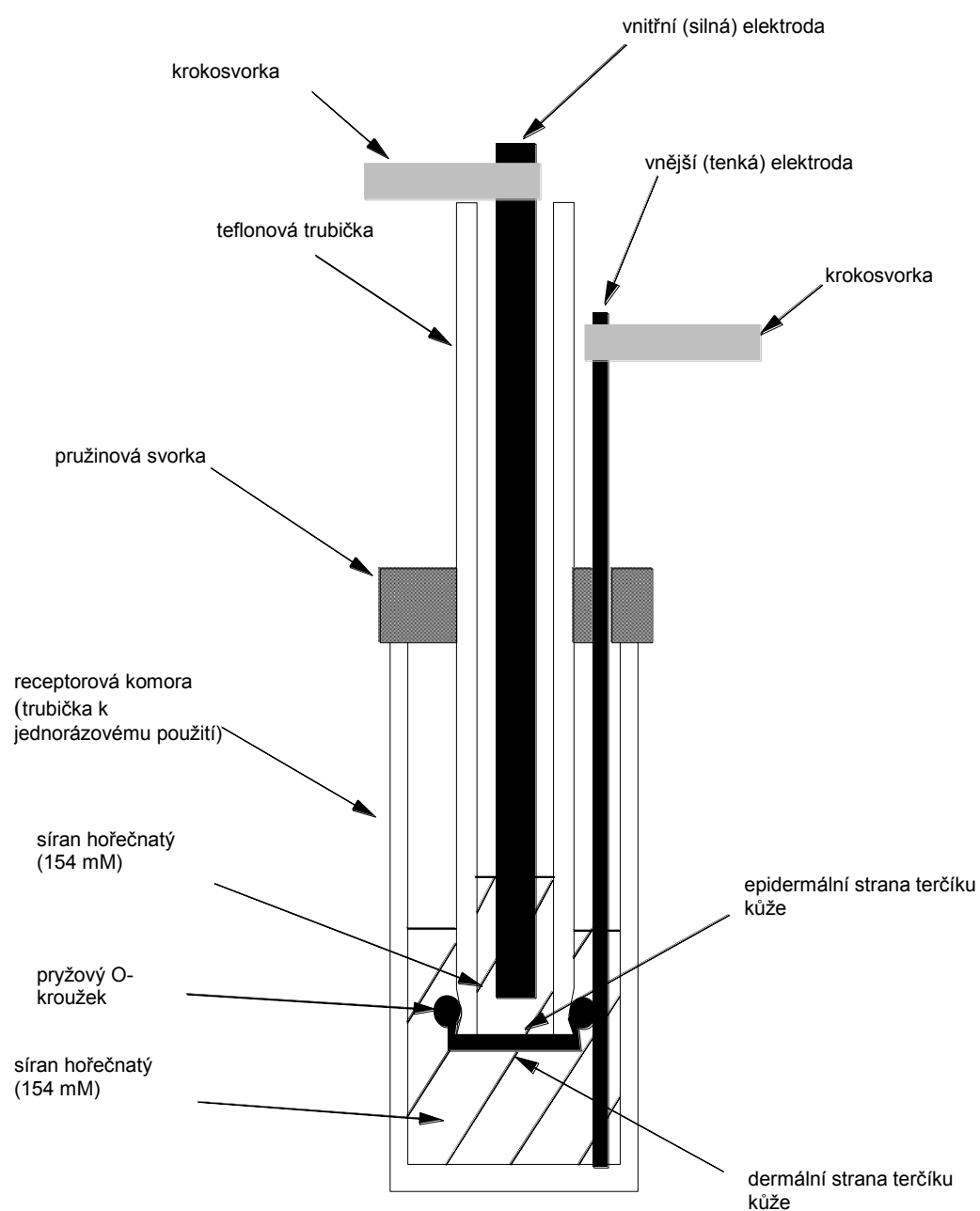
LITERATURA

- (1) United Nations (UN) (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Second Revised Edition, UN New York and Geneva, 2013. Dostupné na webových stránkách: [http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html].
- (2) Kapitola B.4 této přílohy, Akutní dráždivé/leptavé účinky na kůži.
- (3) Kapitola B.40a této přílohy, Kožní model *in vitro*.
- (4) Kapitola B.65 této přílohy, Zkušební metoda s využitím membránové bariéry *in vitro*.
- (5) Kapitola B.46 této přílohy, Dráždivost pro kůži *in vitro*: Zkušební metoda za použití rekonstruované lidské epidermis.
- (6) OECD (2014). Guidance document on Integrated Approaches to Testing and Assessment for Skin Irritation/Corrosion. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (No 203), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (7) Botham P.A., Chamberlain M., Barratt M.D., Curren R.D., Esdaile D.J., Gardner J.R., Gordon V.C., Hildebrand B., Lewis R.W., Liebsch M., Logemann P., Osborne R., Ponc M., Regnier J.F., Steiling W., Walker A.P., and Balls M. (1995). A Prevalidation Study on *In Vitro* Skin Corrosivity Testing. The Report and Recommendations of ECVAM Workshop 6. *ATLA* 23, 219-255.
- (8) Barratt M.D., Brantom P.G., Fentem J.H., Gerner I., Walker A.P., and Worth A.P. (1998). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Skin Corrosivity. 1. Selection and Distribution of the Test Chemicals. *Toxic.In Vitro* 12, 471-482.
- (9) Fentem J.H., Archer G.E.B., Balls M., Botham P.A., Curren R.D., Earl L.K., Esdaile D.J., Holzhütter H.-G., and Liebsch M. (1998). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests For Skin Corrosivity. 2. Results and Evaluation by the Management Team. *Toxic.In Vitro* 12, 483- 524.
- (10) Balls M., Blaauboer B.J., Fentem J.H., Bruner L., Combes R.D., Ekwall B., Fielder R.J., Guillouzo A., Lewis R.W., Lovell D.P., Reinhardt C.A., Repetto G., Sladowski D., Spielmann H., and Zucco F. (1995). Practical Aspects of the Validation of Toxicity Test Procedures. The Report and Recommendations of ECVAM Workshops. *ATLA* 23, 129-147.
- (11) ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods). (1997). Validation and Regulatory Acceptance of

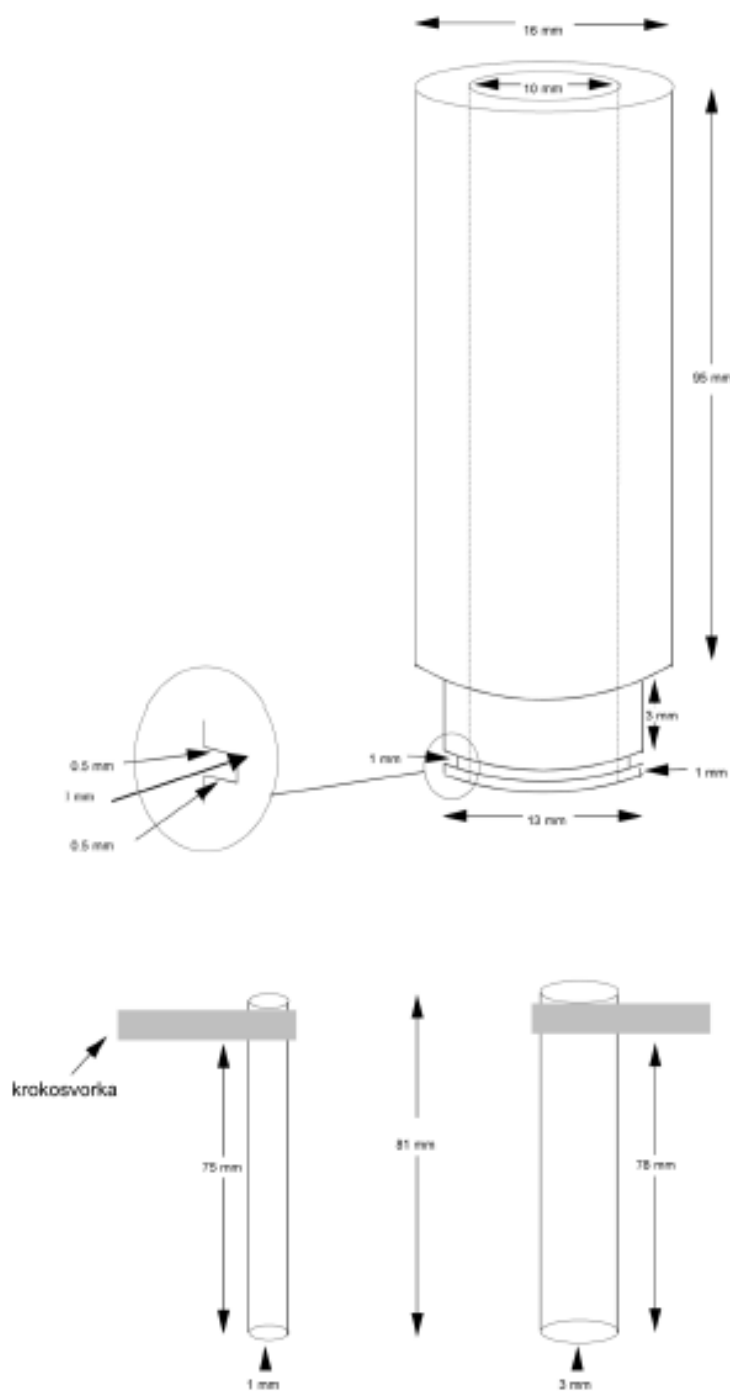
- Toxicological Test Methods. Publikace NIH č. 97-3981. National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA.
- (12) EC-ECVAM (1998). Statement on the Scientific Validity of the Rat Skin Transcutaneous Electrical Resistance (TER) Test (an *In Vitro* Test for Skin Corrosivity), Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC10), 3 April 1998.
 - (13) ECVAM (1998). ECVAM News & Views. ATLA 26, 275–280.
 - (14) ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods) (2002). ICCVAM Evaluation of EpiDerm™ (EPI-200), EPISKIN™ (SM), and the Rat Skin Transcutaneous Electrical Resistance (TER) Assay: *In Vitro* Test Methods for Assessing Dermal Corrosivity Potential of Chemicals. Publikace NIH č. 02-4502. National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods, National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA.
 - (15) OECD (2015). Performance Standards for the Assessment of Proposed Similar or Modified *In Vitro* Transcutaneous Electrical Resistance (TER) Test Method for Skin Corrosion in Relation to TG 430. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No 218. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
 - (16) Oliver G.J.A., Pemberton M.A., and Rhodes C. (1986). An *In Vitro* Skin Corrosivity Test -Modifications and Validation. *Fd. Chem. Toxicol.* 24, 507-512.
 - (17) Botham P.A., Hall T.J., Dennett R., McCall J.C., Basketter D.A., Whittle E., Cheeseman M., Esdaile D.J., and Gardner J. (1992). The Skin Corrosivity Test *In Vitro*: Results of an Interlaboratory Trial. *Toxicol. In Vitro* 6, 191-194.
 - (18) Eskes C., Detappe V., Koeter H., Kreysa J., Liebsch M., Zuang V., Amcoff P., Barroso J., Cotovio J., Guest R., Hermann M., Hoffmann S., Masson P., Alépée N., Arce L.A., Brüscheiler B., Catone T., Cihak R., Clouzeau J., D'Abrosca F., Delveaux C., Derouette J.P., Engelking O., Facchini D., Fröhlicher M., Hofmann M., Hopf N., Molinari J., Oberli A., Ott M., Peter R., Sá-Rocha V.M., Schenk D., Tomicic C., Vanparys P., Verdon B., Wallenhorst T., Winkler G.C. and Depallens O. (2012). Regulatory Assessment of *In Vitro* Skin Corrosion and Irritation Data Within the European Framework: Workshop Recommendations. *Regul.Toxicol.Pharmacol.* 62, 393-403.
 - (19) TER SOP (December 2008). *INVITTOX* Protocol (No 115) Rat Skin Transcutaneous Electrical Resistance (TER) Test.
 - (20) OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment.

Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment
(No 34), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

OBRÁZEK 1: PŘÍSTROJ PRO ZKOUŠKU TER NA KŮŽI POTKANA



OBRÁZEK 2: ROZMĚRY TEFLONOVÉ A RECEPTOROVÉ TRUBIČKY A POUŽITÝCH ELEKTROD



Kritické faktory přístroje uvedeného výše:

- vnitřní průměr teflonové trubičky,

- taková délka elektrod vzhledem k teflonové trubičce a receptorové trubičce, aby se elektrody nedotýkaly terčíku kůže a aby standardní délka elektrody byla ve styku s roztokem MgSO_4 ,
- objem roztoku MgSO_4 v receptorové trubičce musí vzhledem k hladině v teflonové trubičce dávat takovou výšku kapaliny, jak je znázorněno na obrázku 1,
- terčík kůže musí být k teflonové trubičce připevněn tak, aby elektrický odpor představoval skutečnou míru vlastností kůže.

DODATEK

DEFINICE

Přesnost: přesnost shody mezi výsledky zkušební metody a přijatými referenčními hodnotami. Je to míra funkčnosti zkušební metody a jeden z aspektů její relevantnosti. Tento pojem se často používá místo pojmu „soulad“ a rozumí se jím podíl správných výsledků zkušební metody (20).

C („corrosive“): žíravá látka.

Chemická látka: látka nebo směs.

Soulad: je měřítkem funkčnosti u zkušebních metod poskytujících kategorické výsledky a je jedním z aspektů její relevantnosti. Tento pojem se někdy používá místo pojmu „přesnost“ a je definován jako podíl všech zkoušených chemických látek, které jsou správně klasifikovány jako pozitivní nebo negativní. Soulad závisí do velké míry na prevalenci pozitivních výsledků u druhů studovaných zkoušených chemických látek (20).

GHS (Globálně harmonizovaný systém klasifikace a označování chemických látek (OSN)): systém navrhující klasifikaci chemických látek a směsí podle standardizovaných typů a úrovní fyzikální, zdravotní a environmentální nebezpečnosti a zabývající se příslušnými komunikačními prvky, jako jsou piktogramy, signální slova, výroky o nebezpečí, výroky o bezpečnostních opatřeních a bezpečnostní datové listy, které obsahují informace o jejich nežádoucích účincích s ohledem na ochranu lidí (včetně zaměstnavatelů, pracovníků, přepraveců, spotřebitelů a osob reagujících na nouzové situace) a životního prostředí (1).

IATA: integrovaný přístup ke zkoušení a posuzování.

Směs: směs nebo roztok složený ze dvou nebo více látek.

Jednosložková látka: látka definovaná svým kvantitativním složením, v níž je přítomna jedna hlavní složka v míře alespoň 80 % hmot.

Vícesložková látka: látka definovaná svým kvantitativním složením, v níž je přítomna více než jedna hlavní složka v koncentraci ≥ 10 % hmot. a < 80 % hmot. Vícesložková látka je výsledkem výrobního procesu. Rozdíl mezi směsí a vícesložkovou látkou spočívá v tom, že směs se získá smísením dvou nebo více látek bez chemické reakce. Vícesložková látka je výsledkem chemické reakce.

NC („non-corrosive“): nežíravá látka.

OD („optical density“): optická hustota (absorbance).

Pozitivní kontrola: replika obsahující všechny složky zkušebního systému a látku, o níž je známo, že způsobuje pozitivní reakci. Aby se zajistilo, že proměnlivost v reakci na pozitivní kontrolu bude možné časem vyhodnotit, rozsah pozitivní reakce by neměl být nadměrný.

Standardy funkčnosti: standardy založené na validované referenční metodě, které slouží jako základ pro hodnocení srovnatelnosti navrhované zkušební metody, která je mechanicky a funkčně podobná. Patří mezi ně: i) zásadní složky zkušební metody; ii) minimální seznam srovnávacích látek vybraných z chemických látek používaných k prokázání přijatelné funkčnosti validované referenční metody; a iii) srovnatelné hladiny spolehlivosti a přesnosti založené na hodnotách získaných u validované referenční metody, jež by navrhovaná zkušební metoda měla prokázat při vyhodnocení za použití minimálního seznamu srovnávacích látek.

Relevantnost: popis vztahu zkoušky k účinku, který je předmětem zájmu, a také toho, zda je zkouška smysluplná a použitelná pro konkrétní účel. Vyjadřuje, do jaké míry zkušební metoda správně měří nebo predikuje biologický účinek, který je předmětem zájmu. Relevantnost zahrnuje také posouzení přesnosti (shody) zkušební metody (20).

Spolehlivost: měření rozsahu, v jakém může být zkušební metoda časem reprodukovatelná v laboratořích a mezi laboratořemi, když se provádí s použitím stejného protokolu. Hodnotí se na základě výpočtu vnitrolaboratorní a mezilaboratorní reprodukovatelnosti (20).

Citlivost: podíl všech pozitivních/aktivních chemických látek, které jsou na základě zkušební metody správně klasifikovány. Je měřítkem přesnosti zkušební metody, která poskytuje kategorické výsledky, a je důležitým prvkem při hodnocení relevantnosti zkušební metody (20).

Leptavé účinky na kůži *in vivo*: vyvolání nevratného poškození kůže; zejména viditelné, do koria zasahující nekrózy pokožky do čtyř hodin po aplikaci zkoušené chemické látky. Reakce po poleptání se projevují vředy, krvácením, krvavými strupy a v závěru čtrnáctidenního pozorování ztrátou barvy v důsledku vyblednutí kůže, úplnými ložisky alopecie a jizvami. K vyhodnocení sporných lézí by se měla uvážit histopatologie.

Specifičnost: podíl všech negativních/neaktivních chemických látek, které jsou na základě zkušební metody správně klasifikovány. Je měřítkem přesnosti zkušební metody, která poskytuje kategorické výsledky, a je důležitým prvkem při hodnocení relevantnosti zkušební metody (20).

Látka: chemický prvek a jeho sloučeniny v přírodním stavu nebo získané výrobním postupem, včetně jakýchkoliv aditiv potřebných pro zachování stability výrobku a všech nečistot pocházejících z použitého postupu, ale s vyloučením všech rozpouštědel, která je možno oddělit bez ovlivnění stability dané látky nebo změny jejího složení.

(Provedení) zkoušky: jedna zkoušená chemická látka, která byla souběžně zkoušena na minimálně třech replikách terčíků kůže.

Zkoušená chemická látka: jakákoli látka nebo směs zkoušená touto zkušební metodou.

Transkutánní elektrický odpor (TER): je mírou elektrické impedance kůže, vyjádřenou hodnotou elektrického odporu v kiloohmech. Jednoduchá a robustní metoda posouzení bariérové funkce, která spočívá ve sledování průchodu iontů kůží užitím Wheatstoneova můstku.

UVCB: látky s neznámým nebo proměnlivým složením, komplexní reakční produkty nebo biologický materiál.“

(6) V části B se kapitola B.40a nahrazuje tímto:

„B.40a LEPTAVÉ ÚČINKY NA KŮŽI *IN VITRO*: ZKUŠEBNÍ METODA ZA POUŽITÍ REKONSTRUOVANÉ LIDSKÉ EPIDERMIS (RhE)

ÚVOD

1. Tato zkušební metoda je rovnocenná Pokynu OECD pro zkoušení (TG) č. 431 (2016). Leptavými účinky na kůži se označuje vyvolání nevratného poškození kůže, které se projevuje jako viditelná, do koria zasahující nekróza pokožky, po aplikaci zkoušené chemické látky [jak ji definuje globálně harmonizovaný systém klasifikace a označování chemických látek Organizace spojených národů (GHS OSN) (1) a nařízení Evropské unie (EU) č. 1272/2008 o klasifikaci, označování a balení látek a směsí (dále jen „nařízení CLP“)¹]. Tato aktualizovaná zkušební metoda B.40a stanovuje postup *in vitro*, který umožňuje určení nežiravých a žiravých látek a směsí podle systému GHS OSN a nařízení CLP. Umožňuje také částečnou klasifikaci žiravých látek do podkategorií.
2. Posuzování potenciálu leptavých účinků chemických látek na kůži bylo obvykle prováděno na pokusných zvířatech (zkušební metoda B.4 ekvivalentní Pokynu OECD pro zkoušení č. 404; původně vydané v roce 1981 a revidované v letech 1992, 2002 a 2015) (2). Kromě stávající zkušební metody B.40a byly validovány další zkušební metody *in vitro* pro zkoušení potenciálních leptavých účinků chemických látek na kůži, které byly přijaty jako zkušební metoda B.40 (ekvivalentní Pokynu OECD pro zkoušení č. 430) (3) a zkušební metoda B.65 (ekvivalentní Pokynu OECD pro zkoušení č. 435) (4). Dále byla přijata zkušební metoda B.46 *in vitro* (ekvivalentní Pokynu OECD pro zkoušení č. 439) (5) pro zkoušení potenciálu dráždivosti pro kůži. Pokyny OECD k integrovanému přístupu ke zkouškám a posuzování (IATA) dráždivých/leptavých účinků na kůži popisují několik modulů obsahujících informační zdroje a analytické nástroje a poskytují návod (i) na integraci a používání stávajících údajů ze zkoušek i jiných údajů pro posouzení potenciálu dráždivých a leptavých účinků chemických látek na kůži a (ii) a navrhuje přístup, když je nutné další zkoušení (6).
3. Tato zkušební metoda se týká sledovaných vlastností leptavých účinků na kůži z hlediska lidského zdraví. Využívá rekonstruované lidské *epidermis* (RhE) (získané z netransformovaných keratinocytů lidské epidermis), která věrně napodobuje histologické,

¹ Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1272/2008 ze dne 16. prosince 2008 o klasifikaci, označování a balení látek a směsí, o změně a zrušení směrnic 67/548/EHS a 1999/45/ES a o změně nařízení (ES) č. 1907/2006, Úř. věst. L 353/1, 31.12.2008, s. 1.

morfologické, biochemické a fyziologické vlastnosti svrchních částí lidské kůže, tj. *epidermis*. Odpovídající pokyn OECD pro zkoušení byl původně přijat v roce 2004 a v roce 2013 byl aktualizován o další zkušební metody používající model s rekonstruovanou lidskou epidermis a možnost používat metody na podporu klasifikace žíravých chemických látek do podkategorií, dále byl aktualizován v roce 2015 o odkazy na pokyny IATA a bylo zavedeno použití alternativního postupu k měření životaschopnosti.

4. Tato zkušební metoda zahrnuje čtyři validované komerčně dostupné modely RhE. Pro dva z těchto komerčně dostupných zkušebních modelů, EpiSkin™ Standard Model (SM) a EpiDerm™ Skin Corrosivity Test (SCT) (EPI-200), byly provedeny (11) (12) předvalidační studie (7) (v dalším textu jen validované referenční metody - VRM) s následnou formální validační studií pro posouzení leptavých účinků na kůži (8)(9)(10). Závěr z těchto studií vedl k doporučení, že pro rozlišení žíravých (C) a nežíravých látek (NC) pro regulační účely by mohly být použity tyto dvě validované referenční metody a že model EpiSkin™ by navíc mohl být používán na podporu třídění žíravých látek do podkategorií (13)(14)(15). Dva další komerčně dostupné modely *in vitro* pro zkoušení leptavých účinků na kůži za použití rekonstruované lidské epidermis vykazují podle validace na základě standardů funkčnosti podobné výsledky jako EpiDerm™ VRM (16) (17) (18). Jedná se o metody SkinEthic™ RHE¹ a epiCS® (dřívější název EST1000), které mohou být také použity pro regulační účely pro rozlišení žíravých a nežíravých látek (19) (20). Validační studie provedené výrobcí modelu RhE v letech 2012 až 2014 s vylepšeným protokolem korigujícím interference nespecifické redukce MTT zkoušenými chemickými látkami zlepšily funkční způsobilost pro rozlišení C/NC i podpůrnou klasifikaci žíravých látek do podkategorií (21) (22). Byly provedeny další statistické analýzy povalidačních údajů generovaných modely EpiDerm™ SCT, SkinEthic™ RHE a EpiCS® s cílem nalézt alternativní predikční modely, které by zlepšily prediktivní schopnost klasifikace do podkategorií (23).
5. Nežli lze pro regulační účely použít pro leptavé účinky na kůži navrhovanou podobnou nebo modifikovanou zkušební metodu RhE *in vitro* jinou než VRM, je zapotřebí stanovit její spolehlivost, relevantnost (přesnost) a omezení týkající se jejího navrhovaného použití, aby se zajistila její podobnost s VRM v souladu s požadavky standardů funkčnosti (24) stanovenými v souladu se zásadami uvedenými v pokynu OECD č. 34 (25). Vzájemné uznávání údajů bude zaručeno až poté, co bude každá navrhovaná nebo aktualizovaná zkušební metoda podle standardů funkčnosti podrobena revizi a zahrnuta do odpovídajícího pokynu ke zkoušení.

¹ Zkratka RhE („reconstructed human epidermis“ = rekonstruovaná lidská epidermis) se používá pro všechny modely na bázi technologie RhE. Zkratka RHE použitá ve spojení s modelem SkinEthic™ znamená totéž, ale jako součást obchodního názvu této konkrétní zkušební metody se všechna písmena píšou velká.

Zkušební modely zahrnuté do tohoto pokynu ke zkoušení mohou být použity pro účely požadavků jednotlivých zemí na výsledky zkoušek u zkušební metody pro leptavé účinky na kůži *in vitro*, přičemž může být využito vzájemné uznávání údajů.

DEFINICE

6. Použité definice jsou uvedeny v dodatku 1.

VÝCHOZÍ ÚVAHY

7. Tato zkušební metoda umožňuje určení nežiravých a žiravých látek a směsí podle systému GHS OSN a nařízení CLP. Dále tato zkušební metoda podporuje klasifikaci žiravých látek a směsí do podkategorií, a to na doplňkovou podkategorii 1A podle GHS OSN (1), jakož i kombinaci podkategorií 1B a 1C (21)(22)(23). Omezení této zkušební metody spočívá v tom, že neumožňuje rozlišení mezi leptavými účinky na kůži podkategorie 1B a podkategorie 1C podle systému GHS OSN a nařízení CLP vzhledem k omezenému množství dobře známých žiravých chemických látek *in vivo* podkategorie 1C. Zkušební modely EpiSkin™, EpiDerm™ SCT, SkinEthic™ RHE a epiCS® dokážou rozdělovat na podkategorie (tj. 1A proti 1B-a-1C proti NC).
8. Při validaci zkušebních modelů, které jsou zahrnuty v této zkušební metodě a používají se pro určení nežiravých a žiravých látek, byla testována široká škála chemických látek představujících zejména jednotlivé látky; empirická databáze validační studie obsahovala 60 chemických látek z nejrozličnějších chemických tříd (8) (9) (10). Vývojáři zkušební metody provedli zkoušení za účelem prokázání citlivosti, specifčnosti, přesnosti a vnitrolaboratorní reprodukovatelnosti analýzy pro klasifikaci do podkategorií a výsledky kontrolovala OECD (21) (22) (23). Podle všech dostupných údajů je tato zkušební metoda použitelná pro širokou škálu chemických tříd a skupenství, včetně kapalin, polotuhých látek, pevných látek a vosků. Kapaliny mohou být vodné či nevodné; pevné látky mohou být ve vodě rozpustné či nerozpustné. Pevné látky by měly být pokud možno před aplikací rozemlety na jemný prášek; žádná další úprava vzorku není vyžadována. V případech, kdy mohou být předloženy důkazy prokazující nepoužitelnost modelů zařazených do této zkušební metody pro specifickou kategorii zkoušených chemických látek, neměly by se pro tuto specifickou kategorii zkoušených chemických látek používat. Dále se předpokládá, že je tato zkušební metoda jako doplnění použitelnosti pro látky použitelná pro směsi. Avšak vzhledem ke skutečnosti, že směsi zahrnují širokou škálu kategorií a složení a že v současné době jsou k dispozici pouze omezené údaje o zkoušení směsí, v případech, kdy lze prokázat nepoužitelnost této zkušební metody pro konkrétní kategorii směsí (např. podle strategie navržené v (26)), by se tato zkušební metoda neměla používat pro tuto konkrétní kategorii směsí. Před použitím této zkušební metody ke zkoušení směsí s cílem získat údaje pro zamýšlené regulační účely by mělo být zváženo, zda tato metoda může pro tento účel poskytnout přiměřené výsledky, a pokud ano, proč tomu tak je. Takové úvahy nejsou nutné, pokud existuje právní požadavek na zkoušení dané směsi. Plyny a

aerosoly dosud nebyly ve validačních studiích hodnoceny (8) (9) (10). Ačkoli není jejich zkoušení postupem za použití rekonstruované lidské epidermis teoreticky vyloučeno, současná zkušební metoda zkoušení plynů a aerosolů neumožňuje.

9. Zkoušené chemické látky absorbující světlo ve stejném pásmu jako formazan MTT a zkoušené chemické látky schopné přímé redukce vitálního barviva MTT (na formazan MTT) mohou interferovat s měřením životaschopnosti tkání, proto je třeba pro korekce použít upravené kontroly. Druh upravených kontrol, které mohou být potřebné, se bude lišit v závislosti na druhu interference vyvolané zkoušenou chemickou látkou a na postupu použitým pro měření formazanu MTT (viz odstavce 25-31).
10. I když tato zkušební metoda neposkytuje odpovídající informace o dráždivosti pro kůži, je třeba poznamenat, že zkušební metoda B.46 řeší konkrétně zdravotní účinky dráždivosti pro kůži *in vitro* a je založena na tomtéž zkušebním systému RhE, i když podle jiného protokolu (5). Pro úplné vyhodnocení lokálních účinků na kůži po jednotlivých kožních expozicích je třeba postupovat podle pokynů OECD k integrovanému přístupu ke zkouškám a posuzování dráždivých/leptavých účinků na kůži (6). Tento integrovaný přístup ke zkouškám a posuzování zahrnuje provádění zkoušek leptavých účinků na kůži (jak je uvedeno v této zkušební metodě) a dráždivých účinků na kůži *in vitro* před zvažováním zkoušek na živých zvířatech. Je známo, že použití lidské kůže je předmětem vnitrostátních a mezinárodních etických úvah a podmínek.

PRINCIP ZKOUŠKY

11. Zkoušená látka se místně nanese na trojrozměrný model rekonstruované lidské epidermis tvořené netransformovanými keratinocyty získanými z lidské epidermis, které byly kultivovány tak, aby vytvořily vícevrstvý, vysoce diferenciovaný model lidské *epidermis*. Skládá se z uspořádaných bazálních, výběžkovitých a granulárních vrstev a vícevrstevného *stratum corneum*, jež obsahuje mezibuněčné lamelární lipidové vrstvy představující hlavní třídy lipidů analogické těm, které se nacházejí *in vivo*.
12. Zkušební metoda RhE je založena na předpokladu, že chemické látky s leptavými účinky jsou ty, jež jsou schopny proniknout rohovitou vrstvou (*stratum corneum*) difuzí nebo erozí a jsou cytotoxické pro buňky v hlubších buněčných vrstvách. Životaschopnost buněk se měří enzymatickou přeměnou vitálního barviva MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium-bromid, thiazolylová modř, tetrazolium-bromid; číslo CAS 298-93-1] na sůl modrého formazanu, jehož množství se změní po extrakci z tkání (27). Žíravé chemické látky se zjišťují na základě jejich schopnosti snižovat životaschopnost buněk pod definované prahové úrovně (viz odstavce 35 a 36). Ukázalo se, že zkušební metoda leptavých účinků na kůži na bázi RhE umožňuje předvídat leptavé účinky na kůži *in vivo* u králíků podle zkušební metody B.4 (2).

PROKÁZÁNÍ ZPŮSOBILOSTI

13. Dříve než začnou laboratoře rutinně používat kterýkoli ze čtyř validovaných zkušebních modelů RhE, který dodržuje tuto zkušební metodu, měly by prokázat svou odbornou způsobilost správným určením klasifikace dvanácti vhodných látek uvedených v tabulce 1. V případě použití metody pro podrobnou klasifikaci je třeba prokázat také správné zařazení do podkategorií. V situacích, kdy některá z uvedených látek není k dispozici, lze v odůvodněných případech použít jinou látku, u níž jsou k dispozici odpovídající referenční údaje o použití *in vivo* a *in vitro* (např. ze seznamu referenčních chemických látek (24)), pokud budou použita stejná kritéria výběru jako kritéria popsaná v tabulce 1.

Tabulka 1: Seznam vhodných látek¹

Látka	Č. CAS	Třída chemických látek ²	Kat. GHS OSN/CLP na základě výsledků <i>in vivo</i> ³	Kategorie VRM na základě výsledků <i>in vitro</i> ⁴	MTT redukční činidlo ⁵	Skupenství látky
Podkategorie 1A Žíravé látky <i>in vivo</i>						
Bromoctová kyselina	79-08-3	organická kyselina	1A	(3) 1A	--	P
Dihydrát fluoridu boritého	13319-75-0	anorganická kyselina	1A	(3) 1A	--	K
Fenol	108-95-2 Org.	Fenol	1A	(3) 1A	--	P
Dichloroacetylchlorid	79-36-7 Org.	elektrofil	1A	(3) 1A	--	K
Kombinace podkategorií 1B a 1C Žíravé látky <i>in vivo</i>						
Monohydrát kyseliny glyoxylové	563-96-2	organická kyselina	1B a 1C	(3) 1B a 1C	--	P
Kyselina mléčná	598-82-3	organická kyselina	1B a 1C	(3) 1B a 1C	--	K
Ethanolamin	141-43-5	organická zásada	1B	(3) 1B a 1C	Ano	viskózní
Kyselina chlorovodíková (14,4	7647-01-0	anorganická kyselina	1B a 1C	(3) 1B a 1C	--	K
Nežíravé látky <i>in vivo</i>						
Fenethylbromid	103-63-9	elektrofil	NC	(3) NC	Ano	K
4-amino-1H-1,2,4-triazol	584-13-4	organická zásada	NC	(3) NC	--	P
4-(methylthio)-benzaldehyd	3446-89-7	elektrofil	NC	(3) NC	Ano	K
Kyselina laurová	143-07-7	organická kyselina	NC	(3) NC	--	P

Zkratky: Č. CAS = Chemical Abstracts Service Registry Number (registrační číslo CAS) VRM = validovaná referenční metoda
NC = nežíravý

¹Látky pro zkoušení způsobilosti, rozříděné nejprve na žíravé a nežíravé, poté do podkategorií žíravých látek a poté podle chemické třídy, byly vybrány z látek použitých ve validačních studiích ECVAM modelů EpiSkin™ a EpiDerm™ (8) (9) (10) a z povalidačních studií vycházejících z údajů poskytnutých vývojáři modelů EpiSkin™ (22), EpiDerm™, SkinEthic™ a epiCS® (23). Není-li uvedeno jinak, byly látky zkoušeny na úrovni čistoty dosažené při nákupu z komerčního zdroje (8) (10). Výběr zahrnuje pokud možno látky, které: i) jsou charakteristické pro celý rozsah poleptání (např. nežíravé; slabě až silně žíravé), jež validované referenční metody dokážou změřit nebo predikovat; ii) jsou charakteristické pro chemické třídy použité ve validačních studiích; iii) mají chemické struktury, které jsou dobře definovány; iv) vyvolávají v referenční zkušební metodě reprodukovatelné výsledky; v) vyvolávají v referenční zkušební

metodě *in vivo* definitivní výsledky; vi) jsou komerčně dostupné; a vii) nejsou spojeny s příliš vysokými náklady na likvidaci odpadu.

² Chemická třída přiřazená podle Barratt *et al.* (8).

³ Odpovídající obalové skupiny jsou UN I, II a III pro GHS OSN/CLP 1A, 1B, respektive 1C.

⁴ Predikce pro validované referenční metody *in vitro* uvedené v této tabulce byly získány se zkušebními modely EpiSkin™ a EpiDerm™ (VRM) během povalidačního zkoušení provedeného vývojáři zkušebních metod.

⁵ Hodnoty životaschopnosti získané ve validačních studiích leptavých účinků na kůži ECVAM nebyly korigovány podle přímé redukce MTT (ve validačních studiích nebyly provedeny kontroly s utracenými zvířaty). Povalidační údaje generované vývojáři zkušebních metod, které jsou uvedeny v této tabulce, však byly získány s upravenými kontrolami (23).

14. V rámci prokazování způsobilosti se doporučuje, aby uživatel po obdržení modelu rekonstruované lidské epidermis ověřil bariérové vlastnosti tkáně uvedené jeho výrobcem. To je zvláště důležité v případě, že se tkáň zasílá na dlouhé vzdálenosti nebo že jejich přeprava trvá dlouhou dobu. Pokud je zkušební metoda úspěšně zavedena a je prokázána způsobilost tuto metodu správně používat, není nutno takové ověřování běžně provádět. Při běžném používání zkušební metody se však doporučuje i nadále v pravidelných intervalech bariérové vlastnosti posuzovat.

POSTUP

15. Následuje obecný popis složek a postupů zkušebních modelů s použitím rekonstruované lidské epidermis při hodnocení leptavých účinků na kůži, kterých se týká tato zkušební metoda. Modely RhE schválené jako vědecky validní pro použití v rámci této zkušební metody, tj. modely EpiSkin™ (SM), EpiDerm™ (EPI-200), SkinEthic™ RHE a epiCS® (16)(17)(19)(28)(29)(30)(31)(32)(33), lze získat z komerčních zdrojů. K dispozici jsou standardní pracovní postupy pro tyto čtyři modely RhE (34)(35)(36)(37), hlavní složky zkušebních metod jsou shrnuty v dodatku 2. Při provádění a používání jednoho z těchto modelů v laboratoři se doporučuje použít příslušný standardní pracovní postup. Zkoušení pomocí čtyř zkušebních modelů RhE zahrnutých v této zkušební metodě musí splňovat následující podmínky:

SLOŽKY ZKUŠEBNÍ METODY S POUŽITÍM REKONSTRUOVANÉ LIDSKÉ EPIDERMIS

Všeobecné podmínky

16. K rekonstrukci epitelu je zapotřebí použít netransformované lidské keratinocyty. Pod funkční svrchní vrstvou epidermis nazývanou *stratum corneum* by mělo být přítomno několik vrstev životaschopných epitelových buněk (bazální vrstva, *stratum spinosum*, *stratum granulosum*). *Stratum corneum* by mělo být vícevrstevné a obsahovat profil esenciálních lipidů k vytvoření funkční bariéry robustní natolik, aby vzdorovala rychlému průniku cytotoxických referenčních chemických látek, např. dodecylsulfátu sodného (SDS) nebo přípravku Triton X-100. Bariérová funkce by měla být prokázána a lze ji hodnotit buď určením koncentrace, při níž referenční chemická látka snižuje životaschopnost tkáně o 50 % (IC₅₀) po pevně stanovené expoziční době,

nebo stanovením expoziční doby potřebné ke snížení životaschopnosti buněk o 50 % (ET_{50}) po aplikaci referenční chemické látky v pevně stanovené koncentraci (viz odstavec 18). Zadržovací vlastnosti modelu rekonstruované lidské *epidermis* by měly zabránit průchodu materiálu v oblasti *stratum corneum* do životaschopné tkáně, což by vedlo k nesprávnému modelování expozice kůže. Model rekonstruované lidské *epidermis* by neměl být kontaminován bakteriemi, viry, mykoplazmaty ani houbovými mikroorganismy.

Funkční podmínky

Životaschopnost

17. K určení míry životaschopnosti tkání se používá zkouška MTT (27). Vitální buňky tkáňového modelu redukuje vitální barvivo MTT na modrou sraženinu formazanu, která je poté z tkáně extrahována pomocí isopropylalkoholu (nebo podobného rozpouštědla). Optická hustota samotného extrakčního rozpouštědla by měla být dostatečně malá, tzn. $OD < 0,1$. Extrahovaný formazan MTT může být kvantifikován pomocí standardního měření absorpance (OD) nebo spektrofotometrickým postupem HPLC/UPLC (38). Uživatelé modelu rekonstruované lidské *epidermis* by měli zajistit, aby každá použitá šarže modelu rekonstruované lidské *epidermis* splňovala stanovená kritéria pro negativní kontrolu. Rozsah přijatelnosti (horní a dolní mez) hodnot OD negativní kontroly je zapotřebí zjistit u subjektu, který model rekonstruované lidské *epidermis* vyvinul nebo dodává. Rozsahy přijatelnosti hodnot OD negativní kontroly pro čtyři validované zkušební modely RhE zařazené do této zkušební metody jsou uvedeny v tabulce 2. Uživatel spektrofotometrie HPLC/UPLC by měl jako kritérium přijatelnosti pro negativní kontrolu používat rozsahy OD negativní kontroly uvedené v tabulce 2. Je třeba doložit, že tkáň ošetřená negativní kontrolou jsou stabilně kultivovány (poskytují podobné naměřené hodnoty OD) po dobu trvání expozice.

Tabulka 2: Rozsahy přijatelnosti pro hodnoty OD negativní kontroly pro kontrolu kvality šarže

	Dolní mez přijatelnosti	Horní mez přijatelnosti
EpiSkin™ (SM)	> 0,6	< 1,5
EpiDerm™ SCT (EPI-200)	> 0,8	< 2,8
SkinEthic™ RHE	> 0,8	< 3,0
epiCS®	> 0,8	< 2,8

Bariérová funkce

18. *Stratum corneum* a jeho lipidové složení by mělo dostačovat na to, aby odolávalo rychlému průniku určitých cytotoxických referenčních chemických látek (např. SDS nebo Triton X-100) podle odhadu na základě hodnoty IC_{50} nebo ET_{50} (tabulka 3). Bariérovou funkci každé šarže použitého modelu RhE by měl prokázat vývojář/prodejce modelu RhE při dodávce tkání koncovému uživateli (viz odstavec 21).

Morfologie

19. Je třeba provést histologické vyšetření modelu RhE prokazující vícevrstevnou strukturu podobnou lidské epidermis, která obsahuje *stratum basale*, *stratum spinosum*, *stratum granulosum* a *stratum corneum* a má lipidový profil podobný lipidovému profilu lidské epidermis. Histologické vyšetření každé šarže použitého modelu RhE prokazující vhodnou morfologii tkání by měl poskytnout vývojář/prodejce modelu RhE při dodávce tkání koncovému uživateli (viz odstavec 21).

Reprodukovatelnost

20. Uživatelé zkušebních metod by měli prokázat jejich reprodukovatelnost v čase s pozitivními a negativními kontrolami. Kromě toho by zkušební metoda měla být používána pouze v případě, že vývojář/dodavatel modelu RhE poskytne údaje prokazující reprodukovatelnost v čase s žíravými a nežíravými chemickými látkami například ze seznamu vhodných látek (tabulka 1). V případě použití zkušební metody pro podrobnou kategorizaci je třeba prokázat také reprodukovatelnost s ohledem na zařazení do podkategorií.

Kontrola kvality

21. Model rekonstruované lidské epidermis by měl být použit pouze v případě, že subjekt, který jej vyvinul nebo dodává, prokáže, že každá použitá šarže modelu RhE splňuje stanovená produkční kritéria pro uvolnění do oběhu, přičemž mezi nejvýznamnější z nich patří kritéria *životaschopnosti* (odstavec 17), *bariérové funkce* (odstavec 18) a *morfologie* (odstavec 19). Tyto údaje se poskytnou uživatelům metody, aby je mohli uvést v závěrečné zprávě. Pro spolehlivou predikci klasifikace zkoušené látky jako látky s leptavými účinky mohou být přijatelné pouze výsledky získané za použití tkáňových šarží, které prošly kontrolou kvality. Rozsah přijatelnosti (horní a dolní mez) pro IC₅₀ nebo ET₅₀ stanoví subjekt, který model rekonstruované lidské epidermis vyvinul nebo dodává. V tabulce 3 jsou uvedeny rozsahy přijatelnosti pro čtyři validované zkušební modely.

Tabulka 3: Kritéria kontroly kvality pro uvolnění šarže do oběhu

	Dolní mez přijatelnosti	Horní mez přijatelnosti
EpiSkin™ (SM) (18 hodin expozice za použití SDS) (33)	IC ₅₀ = 1,0 mg/ml	IC ₅₀ = 3,0 mg/ml
EpiDerm™ SCT (EPI-200) (1% Triton X-100)(34)	ET ₅₀ = 4,0 hodiny	ET ₅₀ = 8,7 hodiny
SkinEthic™ RHE (1% Triton X-100)(35)	ET ₅₀ = 4,0 hodiny	ET ₅₀ = 10,0 hodin
epiCS® (1% Triton X-100)(36)	ET ₅₀ = 2,0 hodiny	ET ₅₀ = 7,0 hodin

Aplikace zkoušených a kontrolních chemických látek

22. Pro každou zkoušenou chemickou látku a pro kontroly pro jednotlivé expozice by se měly použít alespoň dva tkáňové replikáty. V případě kapalných a pevných chemických látek je zapotřebí nanést dostatečné množství zkoušené látky, aby rovnoměrně pokryla povrch epidermis, a současně se vyhnout nekonečné dávce, tzn. že je třeba použít nejméně $70 \mu\text{l}/\text{cm}^2$ nebo $30 \text{ mg}/\text{cm}^2$. V závislosti na modelech je nutno povrch epidermis před nanesením pevných chemických látek zvlhčit deionizovanou nebo destilovanou vodou, aby se zlepšil kontakt zkoušené chemické látky s povrchem epidermis (34) (35) (36) (37). Pevné látky by se měly pokud možno zkoušet ve formě jemného prášku. Aplikační metoda by měla být pro zkoušenou chemickou látku vhodná (viz např. odkazy (34–37)). Na konci expoziční doby je nutno zkoušenou látku pečlivě spláchnout z *epidermis* vodným pufrům nebo 0,9% roztokem NaCl. Podle toho, který ze čtyř validovaných zkušebních modelů RhE se používá, použijí se dvě nebo tři doby expozice na jednu zkoušenou chemickou látku (pro všechny čtyři platné modely RhE: 3 min. a 1 hodina; pro model EpiSkinTM čtyři další hodiny expozice). V závislosti na použitém zkušebním modelu RhE a posuzované době expozice se může inkubační teplota v průběhu expozice pohybovat v rozsahu od pokojové teploty do 37°C .
23. Při každém provedení zkoušky by se měly používat souběžné negativní kontroly a pozitivní kontroly, aby se prokázalo, že životaschopnost (při použití negativních kontrol), bariérová funkce a výsledná tkáňová citlivost tkání (při použití pozitivní kontroly) jsou v rámci stanoveného rozpětí dosavadních hodnot přijatelnosti. Navrženými chemickými látkami pro pozitivní kontrolu jsou ledová kyselina octová nebo 8N KOH v závislosti na použitém modelu RhE. Je třeba poznamenat, že 8N KOH přímo redukuje MTT, což může vyžadovat upravené kontroly, jak je popsáno v odstavcích 25 a 26. Navrženými látkami pro negativní kontrolu jsou 0,9% (m/V) roztok NaCl nebo voda.

Měření životaschopnosti buněk

24. K měření životaschopnosti buněk podle této zkušební metody by se měla používat zkouška MTT, což je kvantitativní zkouška (27). Vzorek tkáně se na dobu tří hodin vloží do roztoku MTT o vhodné koncentraci (0,3 nebo 1 mg/ml). Vysrážený modrý formazan se poté extrahuje z tkáně pomocí rozpouštědla (např. isopropylalkoholu nebo kyselého isopropylalkoholu) a koncentrace formazanu se změří určením OD při vlnové délce 570 nm za použití filtru o pásmové propustnosti nejvýše $\pm 30 \text{ nm}$ nebo spektrofotometrickým postupem HPLC/UPLC (viz odstavce 30 a 31) (38).
25. Zkoušené chemické látky mohou interferovat se zkouškou MTT, a to přímou redukcí MTT na modrý formazan, anebo barevnou interferencí, jestliže zkoušená chemická látka absorbuje, přirozeně nebo v důsledku experimentálních postupů, ve stejném rozsahu OD jako formazan ($570 \pm 30 \text{ nm}$, zejména modré a fialové chemické látky). Měly by se používat i další kontroly za účelem zjištění a korigování případné interference těchto zkoušených chemických látek, jako je kontrola na nespecifickou redukci MTT (NSMTT) a kontrola na nespecifické zbarvení (NSC) (viz odstavce 26 až 30). To je zvláště důležité v případě, že se určitá zkoušená chemická látka

opláchnutím z tkáně zcela neodstraní nebo že pronikne do *epidermis*, takže je přítomna v tkáních, když se provádí zkouška životaschopnosti MTT. Podrobný popis, jak korigovat přímou redukci MTT a interference způsobené barvivou, lze nalézt ve standardních prováděcích postupech zkušebních modelů (34) (35) (36) (37).

26. Aby bylo možné identifikovat přímá redukční činidla MTT, je třeba každou zkoušenou chemickou látku přidávat do čerstvě připraveného média MTT (34) (35) (36) (37). Jestliže směs MTT obsahující zkoušenou chemickou látku zmodrá/zfialoví, je zkoušená chemická látka považována za přímé redukční činidlo MTT, přičemž je třeba provést další funkční kontrolu na neživotaschopné *epidermis* nezávisle na použití standardního měření absorbance (OD) nebo spektrofotometrického postupu HPLC/UPLC. Tato další funkční kontrola využívá neživé tkáně, které mají pouze zbytkovou metabolickou aktivitu, ale absorbují zkoušenou chemickou látku v podobném množství jako životaschopné tkáně. Každá chemická látka redukující MTT se aplikuje na nejméně dva neživé tkáňové replikáty na každou dobu expozice, které se podrobí celé zkoušce leptavých účinků na kůži. Skutečná životaschopnost tkáně se poté vypočítá jako procentuální životaschopnost tkáně získaná z živých tkání vystavených působení redukčního činidla MTT minus procentuální nespecifická redukce MTT získaná z neživých tkání vystavených stejnému redukčnímu činidlu MTT, počítáno ve vztahu k negativní kontrole prováděné souběžně s korigovanou zkouškou (% NSMTT).
27. Aby bylo možné zjistit potenciální interferenci zabarvených zkoušených chemických látek nebo zkoušených chemických látek, které se zabarvily při kontaktu s vodou nebo isopropylalkoholem, a rozhodnout, zda je nutné provést další kontroly, je třeba provést spektrální analýzu zkoušené chemické látky ve vodě (prostředí v průběhu expozice) anebo v isopropylalkoholu (extrakční roztok). Jestliže zkoušená chemická látka ve vodě anebo isopropylalkoholu absorbuje světlo v pásmu 570 ± 30 nm, je třeba provést další kontroly s barvivou, případně použít spektrofotometrický postup HPLC/UPLC, přičemž v tomto případě nejsou tyto kontroly nutné (viz odstavce 30 a 31). Při provádění standardního měření absorbance (OD) se každá interferující zbarvená zkoušená chemická látka aplikuje na alespoň dva životaschopné tkáňové replikáty na jednu dobu expozice, které se podrobí celé zkoušce na leptavé účinky pro kůži, ale v průběhu inkubačního kroku MTT se inkubují v médiu místo roztoku MTT za účelem vytvoření kontroly nespecifického zbarvení (NSC_{living}). Vzhledem k inherentní biologické variabilitě živých tkání je třeba kontrolu NSC_{living} provádět souběžně na každou dobu expozice s každou zbarvenou zkoušenou chemickou látkou (při každém provedení zkoušky). Skutečná životaschopnost tkáně se poté vypočítá jako procentuální životaschopnost tkáně získaná z živých tkání vystavených působení interferující zkoušené chemické látky a inkubovaných v roztoku MTT minus procentuální nespecifické zbarvení získané z živých tkání vystavených působení interferující zkoušené chemické látky a inkubovaných v roztoku bez MTT, prováděno souběžně s korigovanou zkouškou (% NSC_{living}).
28. Zkoušené chemické látky, u nichž se zjistí, že přímo redukují MTT (viz odstavec 26) a působí barevné interference (viz odstavec 27), budou při provádění standardního měření absorbance

(OD) také vyžadovat třetí skupinu kontrol vedle kontrol NSMTT a NSC_{living} popsaných v předchozích odstavcích. Obvykle je tomu tak u tmavě zbarvených zkoušených chemických látek interferujících s analýzou MTT (např. modré, fialové, černé), protože jejich vlastní barva narušuje posouzení jejich schopnosti přímo redukovat MTT, jak je popsáno v odstavci 26. Tyto zkoušené chemické látky se mohou vázat na živé i neživé tkáně, a proto kontrola NSMTT musí nejen korigovat potenciální přímou redukci MTT způsobenou zkoušenou chemickou látkou, ale také barevnou interferenci vznikající z vazby zkoušené chemické látky na neživé tkáně. Mohlo by to vést k dvojí korekci barevné interference, protože kontrola NSC_{living} již koriguje barevnou interferenci vznikající z vazby zkoušené chemické látky na živé tkáně. Aby byla vyloučena možná dvojí korekce barevné interference, je třeba provést třetí kontrolu na nespecifické zbarvení u neživých tkání (NSC_{killed}). Při této další kontrole se zkoušená chemická látka aplikuje na alespoň dva neživé tkáňové replikáty na jednu dobu expozice, které se podrobí celé zkoušce, ale v průběhu inkubačního kroku MTT se inkubují v médiu místo roztoku MTT. Postačí jedna kontrola NSC_{killed} na zkoušenou chemickou látku bez ohledu na počet provedených nezávislých zkoušek/experimentů, ale tuto kontrolu je třeba provést souběžně s kontrolou NSMTT a pokud možno se stejnou šarží tkáně. Skutečná životaschopnost tkáně se poté vypočítá jako procentuální životaschopnost tkáně získaná z živých tkání vystavených působení zkoušené chemické látky minus % NSMTT minus % NSC_{living} plus procentuální nespecifické zbarvení získané z neživých tkání vystavených působení interferující zkoušené chemické látky a inkubovaných v roztoku bez MTT, počítáno ve vztahu k negativní kontrole prováděné souběžně s korigovanou zkouškou (% NSC_{killed}).

29. Je důležité uvést, že nespecifická redukce MTT a nespecifické barevné interference mohou zvýšit odečty tkáňového extraktu nad rozsah linearitu spektrofotometru. Z tohoto důvodu by měla každá laboratoř stanovit rozsah linearitu svého spektrofotometru s použitím formazanu MTT (č. CAS 57360-69-7) z komerčního zdroje, než zahájí testování zkoušených chemických látek pro regulační účely. Pro posouzení zkoušených chemikálií, které přímo redukují MTT a působí barevné interference, když je optická hustota tkáňových extraktů zjištěná za použití zkoušené chemikálie bez korekce přímé redukce MTT anebo barevné interference v lineárním rozsahu spektrofotometru nebo když již byla zkoušená chemická látka definována jako látka s leptavými účinky podle zjištěné nekorigované procentuální životaschopnosti (viz odstavce 35 a 36), je vhodné zejména standardní měření absorpance (OD) pomocí spektrofotometru. Výsledky u zkoušených chemických látek, které dávají % NSMTT anebo % NSC_{living} > 50 % negativní kontroly, je třeba posuzovat opatrně.
30. U barevných zkoušených chemických látek, které nejsou kompatibilní se standardním měřením absorpance (OD) vzhledem k příliš velké interferenci se zkouškou MTT, může být použit alternativní HPLC/UPLC spektrofotometrický postup měření formazanu MTT (viz odstavec 31) (37). Spektrofotometrický systém HPLC/UPLC umožňuje oddělit formazan MTT od zkoušené chemické látky před její kvantifikací (38). Z tohoto důvodu se při použití spektrofotometrie HPLC/UPLC nepožadují kontroly NSC_{living} ani NSC_{killed}, a to nezávisle na zkoušené chemické látce. Kontroly NSMTT by se však měly použít, pokud existuje podezření, že zkoušená

chemická látka přímo redukuje MTT, nebo v případě, že má barvu, která znesnadňuje posouzení schopnosti přímé redukce MTT (jak je popsáno v odstavci 26). Při použití spektrofotometrie HPLC/UPLC na měření formazanu MTT se procentuální životaschopnost tkáně vypočítá jako procentuální plocha píku formazanu MTT získaná z živých tkání vystavených působení zkoušené chemické látky ve vztahu k píku formazanu MTT získanému při souběžné negativní kontrole. U zkoušených chemických látek, které dokážou přímo redukovat MTT, se skutečná životaschopnost tkáně vypočítá jako procentuální životaschopnost tkáně získaná z živých tkání vystavených působení zkoušené chemické látky minus % NSMTT. Konečně je třeba uvést, že přímá redukční činidla MTT, jež mohou být také barevně interferující a která zůstanou v tkáních po expozici a redukují MTT tak silně, že to vede k takovým hodnotám optické hustoty (při využití standardního měření OD) nebo plochám píků (při použití spektrofotometrie UPLC/HPLC) zkoušených tkáňových extraktů, které spadají mimo rozsah linearity spektrofotometrie, nelze posuzovat, i když lze očekávat, že k tomu dochází velmi vzácně.

31. Spektrofotometrie HPLC/UPLC může být použita také u všech druhů zkoušených chemických látek (barevných, nebarevných, látek redukujících MTT i látek, které MTT neredukují) pro měření formazanu MTT (38). Vzhledem k různým spektrofotometrickým systémům HPLC/UPLC je třeba prokázat způsobilost spektrofotometrického systému HPLC/UPLC před jeho použitím pro kvantifikaci formazanu MTT z tkáňových extraktů splněním kritérií přijatelnosti pro skupinu standardních parametrů způsobilosti vycházejících z parametrů popsaných v pokynu amerického Úřadu pro potraviny a léčiva pro průmysl k validaci bioanalytických metod (38) (39). Tyto klíčové parametry a jejich kritéria přijatelnosti jsou uvedeny v dodatku 4. Po splnění kritérií přijatelnosti definovaných v dodatku 4 je spektrofotometrický systém HPLC/UPLC považován za způsobilý a připravený na měření formazanu MTT za experimentálních podmínek popsaných v této zkušební metodě.

Kritéria přijatelnosti

32. U každé zkušební metody s použitím platných modelů rekonstruované lidské epidermis by tkáně ošetřené negativní kontrolou měly vykazovat hodnoty OD odrážející kvalitu tkání, jak je popsáno v tabulce 2, a neměly by být pod dosud zjištěnými dolními hranicemi. Tkáně ošetřené pozitivní kontrolou, tj. ledovou kyselinou octovou nebo 8N KOH, by měly odrážet schopnost tkání reagovat na žíravou chemickou látku v podmínkách zkušebního modelu (viz dodatek 2). Variabilita mezi tkáňovými replikáty u zkoušené chemické látky a/nebo kontrolních chemických látek by měla spadat do přijatelných limitů pro každý požadavek platného modelu RhE (viz dodatek 2) (např. rozdíl životaschopnosti mezi dvěma tkáňovými replikáty by neměl přesahovat 30 %). Jestliže se negativní nebo pozitivní kontrola zařazená do zkoušky nachází mimo přijatelné rozsahy, je toto provedení zkoušky považováno za nezpůsobilé a zkoušku je třeba opakovat. Jestliže se variabilita zkoušených chemických látek pohybuje mimo definovaný rozsah, je třeba jejich zkoušení opakovat.

Interpretace výsledků a predikční model

33. Hodnoty absorbance OD dosažené pro každou zkoušenou chemickou látku by měly být použity k výpočtu životaschopnosti v procentech vzhledem k negativní kontrole, která je stanovena na úroveň 100 %. Při použití spektrofotometrie HPLC/UPLC se procentuální životaschopnost tkáně vypočítá jako procentuální plocha píku formazanu MTT získaná z živých tkání vystavených působení zkoušené chemické látky ve vztahu k píku formazanu MTT získanému při souběžné negativní kontrole. Hraniční procentuální hodnoty životaschopnosti buněk, kterými se rozlišují žíravé zkoušené chemické látky od nežíravých (nebo kterými se rozlišují různé podkategorie leptavých účinků), jsou definovány níže v odstavcích 35 a 36 pro jednotlivé modely zahrnuté do této zkušební metody a měly by se používat pro interpretaci výsledků.
34. U zkoušené chemické látky s jednoznačnou výslednou klasifikací by mělo stačit jedno provedení zkoušky za použití alespoň dvou tkáňových replikátů. Avšak v případě hraničních výsledků, jako jsou například nesouhlasné výsledky opakovaných měření, lze zvážit druhé provedení zkoušky, jakož i třetí provedení zkoušky v případě nesouhlasných výsledků mezi prvními dvěma provedeními zkoušky.
35. Predikční model pro zkušební model EpiSkin™ pro leptavé účinků na kůži (9) (34) (22), související se systémem klasifikace GHS OSN/CLP, je uveden v tabulce 4:

Tabulka 4: Predikční model EpiSkin™

Životaschopnost měřená po časových intervalech expozice (t=3, 60 a 240 minut)	Zvážit predikci
< 35 % po 3 minutách expozice	Žíravá: • Doplnčková podkategorie 1A*
≥ 35 % po 3 minutách expozice A < 35 % po 60 minutách expozice NEBO ≥ 35 % po 60 minutách expozice A < 35 % po 240 minutách expozice	Žíravá: • Kombinace doplnčkových podkategorií 1B a 1C
≥ 35 % po 240 minutách expozice	Nežíravá

*) Údaje vypracované za účelem posouzení užitečnosti zkušebních modelů RhE na podporu klasifikace do podkategorií ukázaly, že zhruba 22 % výsledků z podkategorie 1A u zkušebního modelu EpiSkin™ může ve skutečnosti představovat látky/směsi podkategorie 1B nebo podkategorie 1C (tj. nadhodnocené klasifikace) (viz dodatek 3).

36. Predikční modely pro zkušební modely leptavých účinků na kůži EpiDerm™ SCT (10) (23) (35), SkinEthic™ RHE (17) (18) (23) (36) a epiCS® (16) (23) (37), související se systémem klasifikace GHS OSN/CLP, jsou uvedeny v tabulce 5:

Tabulka 5: EpiDerm™ SCT, SkinEthic™ RHE a epiCS®

Životaschopnost měřená po časových intervalech expozice (t = 3 a 60 minut)	Zvážit predikci

KROK 1 pro EpiDerm™ SCT, SkinEthic™ RHE a epiCS®	
< 50 % po 3 minutách expozice	Žíravá
≥ 50 % po 3 minutách expozice A < 15 % po 60 minutách expozice	Žíravá
≥ 50 % po 3 minutách expozice A ≥ 15 % po 60 minutách expozice	Nežíravá
KROK 2 pro EpiDerm™ SCT - pro látky/směsi určené v kroku 1 jako žíravé	
< 25 % po 3 minutách expozice	Doplňková podkategorie 1A*
≥ 25 % po 3 minutách expozice	Kombinace doplňkových podkategorií 1B a 1C
KROK 2 pro SkinEthic™ RHE - pro látky/směsi určené v kroku 1 jako žíravé	
< 18 % po 3 minutách expozice	Doplňková podkategorie 1A*
≥ 18 % po 3 minutách expozice	Kombinace doplňkových podkategorií 1B a 1C
KROK 2 pro epiCS® - pro látky/směsi určené v kroku 1 jako žíravé	
< 15 % po 3 minutách expozice	Doplňková podkategorie 1A*
≥ 15 % po 3 minutách expozice	Kombinace doplňkových podkategorií 1B a 1C

ÚDAJE A PŘEDKLÁDÁNÍ ZPRÁV

Údaje

37. Za každou zkoušku by se údaje získané z jednotlivých tkáňových replikátů (např. hodnoty OD a vypočítaná životaschopnost buněk v procentech pro každou zkoušenou chemickou látku, a to včetně její klasifikace) měly vykazovat ve formě tabulky, popřípadě včetně údajů z opakovaných experimentů. Dále by měly být uvedeny střední hodnoty a rozsahy životaschopnosti a variační koeficienty mezi tkáňovými replikáty pro každou zkoušku. Pozorované interakce s činidlem MTT a látkami, které MTT přímo redukuje, nebo barevnými zkoušenými chemickými látkami je nutno uvádět za každou zkoušenou chemickou látku.

Závěrečná zpráva

38. Závěrečná zpráva by měla obsahovat tyto informace:

Zkoušená chemická látka a kontrolní chemické látky:

- jednosložková látka: chemická identifikace, např. název podle IUPAC nebo CAS, číslo CAS, kód SMILES nebo InChI, strukturní vzorec, čistota, případně chemická identita nečistot, je-li to prakticky možné, atd.

- vícesložková látka, UVCB a směs: charakterizované pokud možno chemickou identitou (viz výše), kvantitativním výskytem a relevantními fyzikálně-chemickými vlastnostmi složek,
- fyzický vzhled, rozpustnost ve vodě a další relevantní fyzikálně-chemické vlastnosti,
- zdroj, číslo šarže, jsou-li k dispozici,
- případně ošetření zkoušené chemické látky / kontrolní látky před zkoušením (např. zahřátí, mletí),
- stabilita zkoušené chemické látky, datum použitelnosti nebo datum opětovné analýzy, je-li známo,
- podmínky skladování.

Použitý model RhE a protokol a jeho (případné) zdůvodnění

Zkušební podmínky:

- použitý model rekonstruované lidské epidermis (včetně čísla šarže),
- kalibrační údaje o měřicím zařízení (např. spektrofotometrie), (případně) vlnová délka a pásmová propustnost použitá pro kvantifikaci formazanu MTT a rozsah linearit měřicího zařízení,
- popis metody použité pro kvantifikaci formazanu MTT,
- případně popis způsobilosti spektrofotometrického systému HPLC/UPLC,
- úplné podklady ke konkrétnímu použitému modelu rekonstruované lidské epidermis včetně jeho chování při zkoušce. Ty by měly zejména zahrnovat:
 - i) životaschopnost;
 - ii) bariérovou funkci;
 - iii) morfologii;
 - iv) reprodukovatelnost a prediktivní schopnost;
 - v) kontroly kvality modelu;
- odkaz na historické údaje modelu. Ten by měl zejména zahrnovat:
- přijatelnost údajů QC s odkazem na historické údaje šarže,
- prokázání způsobilosti při provádění zkušební metody před rutinním použitím při zkoušení látek pro prokázání způsobilosti.

Postup zkoušky:

- podrobnosti použitého zkušebního postupu (včetně postupů vymývání použitých po expozici),
- dávky zkoušené chemické látky a použitých kontrolních chemických látek,
- délka doby (dob) expozice a teploty (teplot) expozice,

- přehled kontrol použitých pro látky, které přímo redukují MTT, případně pro zbarvující zkoušené chemické látky,
- počet tkáňových replikátů použitých na jednu zkoušenou chemickou látku a kontroly (pozitivní kontrola, negativní kontrola a NSMTT, případně NSC_{living} a NSC_{killed}) na každou dobu expozice,
- popis použitých kritérií rozhodování / predikčního modelu podle použitého modelu RhE,
- popis jakýchkoli změn zkušební postupu (včetně postupů vymývání).

Kritéria přijatelnosti každého provedení zkoušky:

- střední hodnoty pozitivních a negativních kontrol a rozpětí přijatelnosti založené na porovnání s historickými údaji,
- přijatelná variabilita mezi tkáňovými replikáty pro pozitivní a negativní kontroly,
- přijatelná variabilita mezi tkáňovými replikáty pro zkoušenou chemickou látku.

Výsledky:

- tabulka s údaji o jednotlivých zkoušených chemických látkách a kontrolách pro každou dobu expozice, každé provedení zkoušky a každé měření replikátů včetně hodnot OD nebo plochy píku formazanu MTT, procentuální životaschopnosti tkáně, střední procentuální životaschopnosti tkáně, rozdílů mezi replikáty, případně běžných odchylek a variačních koeficientů,
- případně výsledky kontrol použitých pro přímá redukční činidla MTT anebo zbarvující zkoušené chemické látky včetně hodnot OD nebo plochy píku formazanu MTT, %NSMTT, %NSC_{living}, %NSC_{killed}, rozdílů mezi tkáňovými replikáty, (případně) běžných odchylek a variačních koeficientů a konečná korigovaná procentuální životaschopnost tkáně,
- výsledky získané u zkoušených chemických látek a kontrolních chemických látek ve vztahu k definovaným kritériím přijatelnosti každého provedení zkoušky,
- popis ostatních pozorovaných účinků,
- odvozená klasifikace s odkazem na použitý predikční model / kritéria rozhodování.

Diskuse o výsledcích

Závěry

LITERATURA

- (1) UN (2013). United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS) (Globálně harmonizovaný systém klasifikace a označování chemických látek Organizace spojených národů). Fifth Revised Edition, UN New York and Geneva. Dostupné na internetových stránkách: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html
- (2) Kapitola B.4 této přílohy, Akutní dráždivé/leptavé účinky na kůži.
- (3) Kapitola B.40 této přílohy, Leptavé účinky na kůži *in vitro*.
- (4) Kapitola B.65 této přílohy, Zkušební metoda s využitím membránové bariéry *in vitro*.
- (5) Kapitola B.46 této přílohy, Dráždivost pro kůži *in vitro*: Zkušební metoda za použití rekonstruované lidské epidermis.
- (6) OECD (2014). Guidance Document on Integrated Approaches to Testing and Assessment of Skin Irritation/Corrosion. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (No 203) Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (7) Botham P.A., Chamberlain M., Barratt M.D., Curren R.D., Esdaile D.J., Gardner J.R., Gordon V.C., Hildebrand B., Lewis R.W., Liebsch M., Logemann P., Osborne R., Ponc M., Regnier J.F., Steiling W., Walker A.P., and Balls M. (1995). A Prevalidation Study on *In Vitro* Skin Corrosivity Testing. The report and Recommendations of ECVAM Workshop 6. *ATLA* 23:219-255.
- (8) Barratt M.D., Brantom P.G., Fentem J.H., Gerner I., Walker A.P., and Worth A.P. (1998). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Skin Corrosivity. 1. Selection and distribution of the Test Chemicals. *Toxicol. In Vitro* 12:471-482.
- (9) Fentem J.H., Archer G.E.B., Balls M., Botham P.A., Curren R.D., Earl L.K., Esdaile D.J., Holzhutter H.-G., and Liebsch M. (1998). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Skin Corrosivity. 2. Results and Evaluation by the Management Team. *Toxicol. in Vitro* 12:483-524.
- (10) Liebsch M., Traue D., Barrabas C., Spielmann H., Uphill, P., Wilkins S., Wiemann C., Kaufmann T., Remmele M. and Holzhütter H. G. (2000). The ECVAM Prevalidation Study on the Use of EpiDerm for Skin Corrosivity Testing, *ATLA* 28: 371-401.
- (11) Balls M., Blaauboer B.J., Fentem J.H., Bruner L., Combes R.D., Ekwall B., Fielder R.J., Guillouzo A., Lewis R.W., Lovell D.P., Reinhardt C.A., Repetto G.,

- Sladowski D., Spielmann H. et Zucco F. (1995). Practical Aspects of the Validation of Toxicity Test Procedures. The Report and Recommendations of ECVAM Workshops, ATLA 23:129-147.
- (12) ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods) (1997). Validation and Regulatory Acceptance of Toxicological Test Methods. Publikace NIH č. 97-3981. National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA.
- (13) ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods) (2002). ICCVAM evaluation of EpiDerm™ (EPI-200), EPISKIN™ (SM), and the Rat Skin Transcutaneous Electrical Resistance (TER) Assay: *In Vitro* Test Methods for Assessing Dermal Corrosivity Potential of Chemicals. Publikace NIH č. 02-4502. National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods, National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA.
- (14) EC-ECVAM (1998). Statement on the Scientific Validity of the EpiSkin™ Test (an *In Vitro* Test for Skin Corrosivity), Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC10), 3 April 1998.
- (15) EC-ECVAM (2000). Statement on the Application of the EpiDerm™ Human Skin Model for Skin Corrosivity Testing, Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC14), 21 March 2000.
- (16) Hoffmann J., Heisler E., Karpinski S., Losse J., Thomas D., Siefken W., Ahr H.J., Vohr H.W. and Fuchs H.W. (2005). Epidermal-Skin-Test 1000 (EST-1000)-A New Reconstructed Epidermis for *In Vitro* Skin Corrosivity Testing. *Toxicol. In Vitro* 19: 925-929.
- (17) Kandárová H., Liebsch M., Spielmann, H., Genschow E., Schmidt E., Traue D., Guest R., Whittingham A., Warren N., Gamer A.O., Remmele M., Kaufmann T., Wittmer E., De Wever B., and Rosdy M. (2006). Assessment of the Human Epidermis Model SkinEthic RHE for *In Vitro* Skin Corrosion Testing of Chemicals According to New OECD TG 431. *Toxicol. In Vitro* 20: 547-559.
- (18) Tornier C., Roquet M. and Fraissinette A.B. (2010). Adaptation of the Validated SkinEthic™ Reconstructed Human Epidermis (RHE) Skin Corrosion Test Method to 0.5 cm² Tissue Sample. *Toxicol. Chem. In Vitro* 24: 1379-1385.
- (19) EC-ECVAM (2006). Statement on the Application of the SkinEthic™ Human Skin Model for Skin Corrosivity Testing, Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC25), 17 November 2006.
- (20) EC-ECVAM (2009). ESAC Statement on the Scientific Validity of an *In-Vitro* Test Method for Skin Corrosivity Testing: the EST-1000, Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC30), 12 June 2009.

- (21) OECD (2013). Summary Document on the Statistical Performance of Methods in OECD Test Guideline 431 for Sub-categorisation. Environment, Health, and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 190). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (22) Alépée N., Grandidier M.H., and Cotovio J. (2014). Sub-Categorisation of Skin Corrosive Chemicals by the EpiSkin™ Reconstructed Human Epidermis Skin Corrosion Test Method According to UN GHS: Revision of OECD Test Guideline 431. *Toxicol. Chem. In Vitro* 28:131-145.
- (23) Desprez B., Barroso J., Griesinger C., Kandárová H., Alépée N., and Fuchs, H. (2015). Two Novel Prediction Models Improve Predictions of Skin Corrosive Sub-categories by Test Methods of OECD Test Guideline No 431. *Toxicol. Chem. In Vitro* 29:2055-2080.
- (24) OECD (2015). Performance Standards for the Assessment of Proposed Similar or Modified *In Vitro* Reconstructed Human Epidermis (RHE) Test Methods For Skin Corrosion in Relation to OECD TG 431. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 219). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (25) OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. . Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (No 34) Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (26) Eskes C. *et al.* (2012). Regulatory Assessment of *In Vitro* Skin Corrosion and Irritation Data Within the European Framework: Workshop Recommendations. *Regul.Toxicol.Pharmacol.* 62:393-403.
- (27) Mosmann T. (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J. Immunol. Methods* 65:55-63.
- (28) Tinois E., *et al.* (1994). The Episkin Model: Successful Reconstruction of Human *Epidermis In Vitro*. In: *In Vitro* Skin Toxicology. Rougier A., Goldberg A.M and Maibach H.I. (Eds): 133-140.
- (29) Cannon C. L., Neal P.J., Southee J.A., Kubilus J. and Klausner M. (1994), New Epidermal Model for Dermal Irritancy Testing. *Toxicol.in Vitro* 8:889 - 891.
- (30) Ponc M., Boelsma E, Weerheim A, Mulder A, Bouwstra J and Mommaas M. (2000). Lipid and Ultrastructural Characterization of Reconstructed Skin Models. *Inter. J. Pharmaceu.* 203:211 - 225.
- (31) Tinois E., Tillier, J., Gaucherand, M., Dumas, H., Tardy, M. and Thivolet J. (1991). *In Vitro* and Post - Transplantation Differentiation of Human

Keratinocytes Grown on the Human Type IV Collagen Film of a Bilayered Dermal Substitute. *Exp. Cell Res.* 193:310-319.

- (32) Parenteau N.L., Bilbo P, Nolte CJ, Mason VS and Rosenberg M. (1992). The Organotypic Culture of Human Skin Keratinocytes and Fibroblasts to Achieve Form and Function. *Cytotech.* 9:163-171.
- (33) Wilkins L.M., Watson SR, Proskey SJ, Meunier SF and Parenteau N.L. (1994). Development of a Bilayered Living Skin Construct for Clinical Applications. *Biotech. Bioeng.* 43/8:747-756.
- (34) EpiSkin™ SOP (December 2011). *INVITTOX* Protocol (No 118). EpiSkin™ Skin Corrosivity Test.
- (35) EpiDerm™ SOP (February 2012). Version MK-24-007-0024 Protocol for: *In Vitro* EpiDerm™ Skin Corrosion Test (EPI-200-SCT), for Use with MatTek Corporation's Reconstructed Human Epidermal Model EpiDerm.
- (36) SkinEthic™ RHE SOP (January 2012). *INVITTOX* Protocol SkinEthic™ Skin Corrosivity Test.
- (37) EpiCS® SOP (January 2012). Version 4.1 *In Vitro* Skin Corrosion: Human Skin Model Test Epidermal Skin Test 1000 (epiCS®) CellSystems.
- (38) Alépée N., Barroso J., De Smedt A., De Wever B., Hibatallah J., Klaric M., Mewes K.R., Millet M., Pfannenbecker U., Tailhardat M., Templier M., and McNamee P. Use of HPLC/UPLC- spectrophotometry for Detection of MTT Formazan in *In Vitro* Reconstructed Human Tissue (RhT)- based Test Methods Employing the MTT Assay to Expand their Applicability to Strongly Coloured Test Chemicals. *Toxicol. Chem. In Vitro* 29: 741-761.
- (39) US FDA (2001). Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration. (May 2001). Dostupné na internetových stránkách: [\[http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070107.pdf\]](http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070107.pdf).

Dodatek 1

DEFINICE

Přesnost: přesnost shody mezi výsledky zkušební metody a přijatými referenčními hodnotami. Je to míra funkčnosti zkušební metody a jeden z aspektů její relevantnosti. Tento pojem se často používá místo pojmu „soulad“ a rozumí se jím podíl správných výsledků zkušební metody (25).

Životaschopnost buněk: parametr měřící celkovou aktivitu buněčné populace, např. jako schopnost buněčných mitochondriálních dehydrogenáz redukovat vitální barvivo MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyl-2H-tetrazolium-bromid, thiazolylová modř), které v závislosti na naměřené sledované vlastnosti a koncepci použité zkoušky koreluje s celkovým počtem a/nebo vitalitou živých buněk.

Chemická látka: Látka nebo směs.

Soulad: je měřítkem funkčnosti u zkušebních metod poskytujících kategorické výsledky a je jedním z aspektů její relevantnosti. Tento pojem se někdy používá místo pojmu „přesnost“ a je definován jako podíl všech zkoušených chemických látek, které jsou správně klasifikovány jako pozitivní nebo negativní. Soulad závisí do velké míry na prevalenci pozitivních výsledků u druhů studovaných zkoušených chemických látek (25).

ET₅₀: tuto hodnotu lze odhadnout na základě určení doby expozice potřebné k tomu, aby se životaschopnost buněk snížila o 50 % po aplikaci referenční chemické látky v pevně stanovené koncentraci, viz rovněž IC₅₀.

GHS (Globálně harmonizovaný systém klasifikace a označování chemických látek): systém navrhuje klasifikaci chemických látek a směsí podle standardizovaných typů a úrovní fyzikálních, zdravotních a environmentálních nebezpečí a zabývající se příslušnými komunikačními prvky, jako jsou piktogramy, signální slova, výroky o nebezpečí, výroky o bezpečnostních opatřeních a bezpečnostní datové listy, které obsahují informace o jejich nežádoucích účincích s ohledem na ochranu lidí (včetně zaměstnavatelů, pracovníků, přepravců, spotřebitelů a osob reagujících na nouzové situace) a životního prostředí (1).

HPLC: vysokoúčinná kapalinová chromatografie

IATA: integrovaný přístup ke zkoušení a posuzování.

IC₅₀: tuto hodnotu lze odhadnout na základě určení koncentrace, při níž referenční chemická látka snižuje životaschopnost tkání o 50 % (IC₅₀) po pevně stanovené době expozice, viz rovněž ET₅₀.

Nekonečná dávka: množství zkoušené látky nanesené na *epidermis*, které přesahuje množství potřebné k úplnému a rovnoměrnému pokrytí povrchu *epidermis*.

Směs: směs nebo roztok tvořený dvěma nebo více látkami, které v něm nereagují.

Jednosložková látka: látka definovaná svým kvantitativním složením, v níž je přítomna jedna hlavní složka v míře alespoň 80 % hmot.

MTT: 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyl-2H-tetrazolium-bromid, thiazolylová modř.

Vícesložková látka: látka definovaná svým kvantitativním složením, v níž je přítomna více než jedna hlavní složka v koncentraci > 10 % hmot. a < 80 % hmot. Vícesložková látka je výsledkem výrobního procesu. Rozdíl mezi směsí a vícesložkovou látkou spočívá v tom, že směs se získá smísením dvou nebo více látek bez chemické reakce. Vícesložková látka je výsledkem chemické reakce.

NC („non-corrosive“): nežíravá látka.

Kontrola NSC_{killed}: nespecifická barevná kontrola u neživých tkání.

Kontrola NSC_{living}: nespecifická barevná kontrola u živých tkání.

NSMTT: nespecifická redukce MTT.

OD: optická hustota.

Pozitivní kontrola: replika obsahující všechny složky zkušební metody a zkoušená s chemickou látkou, o níž je známo, že způsobuje pozitivní odezvu. Aby se zajistilo, že proměnlivost v odezvě na pozitivní kontrolu bude možné časem vyhodnotit, neměl by být rozsah pozitivní odezvy nadměrný.

Standardy funkčnosti: standardy založené na validované zkušební metodě, které slouží jako základ pro hodnocení srovnatelnosti navrhované zkušební metody, která je mechanicky a funkčně podobná. Patří mezi ně: i) zásadní složky zkušební metody; ii) minimální seznam srovnávacích látek vybraných z chemických látek používaných k prokázání přijatelné funkčnosti validované zkušební metody; a iii) srovnatelné úrovně spolehlivosti a přesnosti založené na hodnotách získaných u validované zkušební metody, jež by navrhovaná zkušební metoda měla prokázat při vyhodnocení za použití minimálního seznamu srovnávacích látek (25).

Relevantnost: popis vztahu zkušební metody k účinku, který je předmětem zájmu, a také toho, zda je zkušební metoda smysluplná a použitelná pro konkrétní účel. Vyjadřuje, do jaké míry zkušební metoda správně měří nebo predikuje biologický účinek, který je předmětem zájmu. Relevantnost zahrnuje také posouzení přesnosti (shody) zkušební metody (25).

Spolehlivost: měření rozsahu, v jakém může být zkušební metoda časem reprodukovatelná v laboratořích a mezi laboratořemi, když se provádí s použitím stejného protokolu. Hodnotí se na základě výpočtu vnitrolaboratorní a mezilaboratorní reprodukovatelnosti (25).

Provedení zkoušky: jedna či více zkoušených chemických látek se zkouší souběžně s negativní

kontrolou a s pozitivní kontrolou.

Citlivost: podíl všech pozitivních/aktivních chemických látek, které jsou na základě zkušební metody správně klasifikovány. Je měřítkem přesnosti zkušební metody, která poskytuje kategorické výsledky, a je důležitým prvkem při hodnocení relevantnosti zkušební metody (25).

Leptavé účinky na kůži *in vivo*: vyvolání nevratného poškození kůže, zejména viditelné, do koria zasahující nekrózy pokožky, do čtyř hodin po aplikaci zkoušené chemické látky. Reakce po poleptání se projevují vředy, krvácením, krvavými strupy a v závěru čtrnáctidenního pozorování ztrátou barvy v důsledku vyblednutí kůže, úplnými ložisky alopecie a jizvami. K vyhodnocení sporných lézí by se měla uvážit histopatologie.

Specifičnost: podíl všech negativních/neaktivních chemických látek, které jsou na základě zkušební metody správně klasifikovány. Je měřítkem přesnosti zkušební metody, která poskytuje kategorické výsledky, a je důležitým prvkem při hodnocení relevantnosti zkušební metody (25).

Látka: chemický prvek a jeho sloučeniny v přírodním stavu nebo získané výrobním postupem, včetně jakýchkoliv aditiv potřebných pro zachování stability výrobku a všech nečistot pocházejících z použitého postupu, ale s vyloučením všech rozpouštědel, která je možno oddělit bez ovlivnění stability dané látky nebo změny jejího složení.

Zkoušená chemická látka: jakákoli látka nebo směs zkoušená touto zkušební metodou.

UPLC: ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie.

UVCB: látky s neznámým nebo proměnlivým složením, komplexní reakční produkty nebo biologický materiál.

Dodatek 2

HLAVNÍ SLOŽKY ZKUŠEBNÍCH MODELŮ RHE VALIDOVANÝCH PRO ZKOUŠENÍ LEPTAVÝCH ÚČINKŮ NA KŮŽI

Složky zkušebních modelů	EpiSkin™	EpiDerm™ SCT	SkinEthic™ RHE	epiCS®
Povrch modelu	0,38 cm ²	0,63 cm ²	0,5 cm ²	0,6 cm ²
Počet tkáňových replikátů	Nejméně 2 na každou dobu expozice	2–3 na každou dobu expozice	Nejméně 2 na každou dobu expozice	Nejméně 2 na každou dobu expozice

Složky zkušebních modelů	EpiSkin™	EpiDerm™ SCT	SkinEthic™ RHE	epiCS®
Experimentální dávky a aplikace	<u>Kapaliny a viskózní látky:</u> 50 µl ± 3 µl (131,6 µl/cm²) <u>Pevné látky:</u> 20 ± 2 mg (52,6 mg/cm²) + 100 µl ± 5 µl roztoku NaCl (9 g/l) <u>Vosky/lepivé látky:</u> 50 ± 2 mg (131,6 mg/cm²) s nylonovou sítkou	<u>Kapaliny:</u> 50 µl (79,4 µl/cm²) s nylonovou sítkou nebo bez ní <i>Kompatibilita zkoušené chemické látky s nylonovou sítkou před zkouškou</i> <u>Polotuhé látky:</u> 50 µl (79,4 µl/cm²) <u>Pevné látky:</u> 25 µl H₂O (nebo více v případě potřeby) + 25 mg (39,7 mg/cm²) <u>Vosky:</u> ploché „kotouče“ o průměru přibližně 8 mm umístěné na tkáň zvlhčenou 15 µl H₂O.	<u>Kapaliny a viskózní látky:</u> 40 µl ± 3 µl (80 µl/cm²) s použitím nylonové sítky <i>Kompatibilita zkoušené chemické látky s nylonovou sítkou před zkouškou</i> <u>Pevné látky:</u> 20 µl ± 2 µl H₂O + 20 ± 3 mg (40 mg/cm²) <u>Vosky/lepivé látky:</u> 20 ± 3 mg (40 mg/cm²) s použitím nylonové sítky	<u>Kapaliny:</u> 50 µl (83,3 µl/cm²) s použitím nylonové sítky <i>Kompatibilita zkoušené chemické látky s nylonovou sítkou před zkouškou</i> <u>Polotuhé látky:</u> 50 µl (83,3 µl/cm²) <u>Pevné látky:</u> 25 mg (41,7 mg/cm²) + 25 µl H₂O (nebo více v případě potřeby) <u>Vosky:</u> ploché „kotouče“ o průměru přibližně 8 mm umístěné na tkáň zvlhčenou 15 µl H₂O.
Předběžná kontrola na přímou redukci MTT	50 µl (kapalina) nebo 20 mg (pevná látka) + 2 ml MTT roztoku 0,3 mg/ml po dobu 180 ± 5 min při 37 °C, 5 % CO₂, 95 % RH → jestliže roztok zmodrá/zfialoví, je třeba provést přizpůsobené kontroly na tkáň usmrcené vodou	50 µl (kapalina) nebo 25 mg (pevná látka) + 1 ml MTT roztoku 1 mg/ml po dobu 60 min při 37 °C, 5 % CO₂, 95 % RH → jestliže roztok zmodrá/zfialoví, je třeba provést přizpůsobené kontroly na tkáň usmrcené zmrazením	40 µl (kapalina) nebo 20 mg (pevná látka) + 1 ml MTT 1 mg/ml roztoku po dobu 180 ± 15 min při teplotě 37 °C, 5 % CO₂, 95 % RH → jestliže roztok zmodrá/zfialoví, je třeba provést přizpůsobené kontroly na tkáň usmrcené zmrazením	50 µl (kapalina) nebo 25 mg (pevná látka) + 1 ml MTT roztoku 1 mg/ml po dobu 60 min při 37 °C, 5 % CO₂, 95 % RH → jestliže roztok zmodrá/zfialoví, je třeba provést přizpůsobené kontroly na tkáň usmrcené zmrazením

Složky zkušebních modelů	EpiSkin™	EpiDerm™ SCT	SkinEthic™ RHE	epiCS®
Předběžná kontrola na barevnou interferenci	10 µl (kapalina) nebo 10 mg (pevná látka) + 90 µl H ₂ O mícháno po dobu 15 min při pokojové teplotě → jestliže se roztok zbarví, je třeba provést přizpůsobené kontroly na živé tkáni	50 µl (kapalina) nebo 25 mg (pevná látka) + 300 µl H ₂ O po dobu 60 min při teplotě 37 °C, 5 % CO ₂ , 95 % RH → jestliže se roztok zbarví, je třeba provést přizpůsobené kontroly na živé tkáni	40 µl (kapalina) nebo 20 mg (pevná látka) + 300 µl H ₂ O mícháno po dobu 60 min při pokojové teplotě → jestliže se zkoušená chemická látka zbarví, je třeba provést přizpůsobené kontroly na živé tkáni	50 µl (kapalina) nebo 25 mg (pevná látka) + 300 µl H ₂ O po dobu 60 min při teplotě 37 °C, 5 % CO ₂ , 95 % RH → jestliže se roztok zbarví, je třeba provést přizpůsobené kontroly na živé tkáni
Doba expozice a teplota	3 min, 60 min (± 5 min) a 240 min (± 10 min) Ve ventilované skříni Pokojová teplota (RT, 18–28°C)	3 min při pokojové teplotě a 60 min při 37 °C, 5 % CO ₂ , 95 % RH	3 min při pokojové teplotě a 60 min při 37 °C, 5 % CO ₂ , 95 % RH	3 min při pokojové teplotě a 60 min při 37 °C, 5 % CO ₂ , 95 % RH
Oplachování	25 ml 1 x PBS (2 ml/na ponoření)	20krát stálým mírným proudem 1 x PBS	20krát stálým mírným proudem 1 x PBS	20krát stálým mírným proudem 1 x PBS
Negativní kontrola	50 µl roztoku NaCl (9 g/l) Zkoušeno u každé doby expozice	50 µl H ₂ O Zkoušeno u každé doby expozice	40 µl H ₂ O Zkoušeno u každé doby expozice	50 µl H ₂ O Zkoušeno u každé doby expozice
Pozitivní kontrola	50 µl ledové kyseliny octové Zkoušeno pouze po dobu 4 hodin	50 µl 8N KOH Zkoušeno u každé doby expozice	40 µl 8N KOH Zkoušeno pouze po dobu 1 hodiny	50 µl 8N KOH Zkoušeno u každé doby expozice
Roztok MTT	2 ml 0,3 mg/ml	300 µl 1 mg/ml	300 µl 1 mg/ml	300 µl 1 mg/ml

Složky zkušebních modelů	EpiSkin™	EpiDerm™ SCT	SkinEthic™ RHE	epiCS®
Doba inkubace MTT a teplota	180 min (± 15 min) při 37 °C, 5 % CO ₂ , 95 % RH	180 min při 37 °C, 5 % CO ₂ , 95 % RH	180 min (± 15 min) při 37 °C, 5 % CO ₂ , 95 % RH	180 min při 37 °C, 5 % CO ₂ , 95 % RH
Extrakční rozpouštědlo	500 µl acidifikovaného isopropylalkoholu (0,04 N HCl v isopropylalkoholu) (izolovaná tkáň plně ponořená)	2 ml isopropylalkoholu (extrakce z horní a dolní části vložky)	1,5 ml isopropylalkoholu (extrakce z horní a dolní části vložky)	2 ml isopropylalkoholu (extrakce z horní a dolní části vložky)
Doba a teplota extrakce	Přes noc při pokojové teplotě, chráněno před světlem	Přes noc bez protřepávání při pokojové teplotě nebo 120 minut s protřepáváním (~120 rpm) při pokojové teplotě	Přes noc bez protřepávání při pokojové teplotě nebo 120 minut s protřepáváním (~120 rpm) při pokojové teplotě	Přes noc bez protřepávání při pokojové teplotě nebo 120 minut s protřepáváním (~120 rpm) při pokojové teplotě
Odečet OD	570 nm (545–595 nm) bez referenčního filtru	570 nm (nebo 540 nm) bez referenčního filtru	570 nm (540–600 nm) bez referenčního filtru	540–570 nm bez referenčního filtru
Kontrola kvality tkání	18 hodin expozice za použití SDS 1,0 mg/ml ≤ IC ₅₀ ≤ 3,0 mg/ml	Expozice za použití 1% Tritonu X-100 4,08 hodiny ≤ ET ₅₀ ≤ 8,7 hodiny	Expozice za použití 1% Tritonu X- 100 4,0 hodiny ≤ ET ₅₀ ≤ 10,0 hodin	Expozice za použití 1% Tritonu X- 100 2,0 hodiny ≤ ET ₅₀ ≤ 7,0 hodin

Složky zkušebních modelů	EpiSkin™	EpiDerm™ SCT	SkinEthic™ RHE	epiCS®
Kritéria přijatelosti	1. Střední hodnota OD tkáňových replikátů vystavených působení negativní kontroly (NaCl) by měla být $\geq 0,6$ a $\leq 1,5$ pro každou dobu expozice 2. Střední životaschopnost tkáňových replikátů vystavených působení pozitivní kontroly (ledová kyselina octová) po dobu 4 hodin, vyjádřeno jako % negativní kontroly, by měla být ≤ 20 % 3. V rozsahu 20–100 % životaschopnosti a pro hodnoty OD $\geq 0,3$ by rozdíl životaschopnosti mezi dvěma tkáňovými replikáty neměl přesahovat 30 %.	1. Střední hodnota OD tkáňových replikátů vystavených působení negativní kontroly (H₂O) by měla být $\geq 0,8$ a $\leq 2,8$ pro každou dobu expozice 2. Střední životaschopnost tkáňových replikátů vystavených působení pozitivní kontroly (8N KOH) po dobu 1 hodiny, vyjádřeno jako % negativní kontroly, by měla být < 15 % 3. V rozsahu 20–100 % životaschopnosti by variační koeficient (CV) mezi tkáňovými replikáty měl být ≤ 30 %	1. Střední hodnota OD tkáňových replikátů vystavených působení negativní kontroly (H₂O) by měla být $\geq 0,8$ a $\leq 3,0$ pro každou dobu expozice 2. Střední životaschopnost tkáňových replikátů vystavených působení pozitivní kontroly (8N KOH) po dobu 1 hodiny (a případně 4 hodin), vyjádřeno jako % negativní kontroly, by měla být < 15 % 3. V rozsahu 20–100 % životaschopnosti a pro hodnoty OD $\geq 0,3$ by rozdíl životaschopnosti mezi dvěma tkáňovými replikáty neměl přesahovat 30 %	1. Střední hodnota OD tkáňových replikátů vystavených působení negativní kontroly (H₂O) by měla být $\geq 0,8$ a $\leq 2,8$ pro každou dobu expozice 2. Střední životaschopnost tkáňových replikátů vystavených působení pozitivní kontroly (8N KOH) po dobu 1 hodiny, vyjádřeno jako % negativní kontroly, by měla být < 20 % 3. V rozsahu 20–100 % životaschopnosti a pro hodnoty OD $\geq 0,3$ by rozdíl životaschopnosti mezi dvěma tkáňovými replikáty neměl přesahovat 30 %

Dodatek 3

FUNKČNÍ ZPŮSOBILOST ZKUŠEBNÍCH MODELŮ PRO KLASIFIKACI DO PODKATEGORIÍ

V následující tabulce je uvedena funkční způsobilost čtyř zkušebních modelů vypočtená ze skupiny 80 chemických látek zkoušených čtyřmi dodavateli, kteří zkoušky vyvinuli. Výpočty provedl sekretariát OECD a zkontrolovala a schválila je podskupina odborníků (21) (23).

Zkušební modely EpiSkin™, EpiDerm™, SkinEthic™ a epiCS® lze rozdělovat na podkategorie (tj. 1A proti 1B-a-1C proti NC)

Funkční způsobilost, podíly nadhodnocené klasifikace do podkategorií, podíly podhodnocené klasifikace do podkategorií a přesnost (prediktivní schopnost) čtyř zkušebních modelů podle skupiny 80 chemických látek, z nichž všechny byly zkoušeny každým zkušebním modelem ve 2 nebo 3 zkouškách:

STATISTIKA PREDIKCÍ ZÍSKANÝCH Z CELÉ SKUPINY CHEMICKÝCH LÁTEK				
(n = 80 chemických látek zkoušených ve 2 nezávislých zkouškách u modelu epiCS® nebo ve 3 nezávislých zkouškách u modelů EpiDerm™ SCT, EpiSkin™ a SkinEthic™ RHE, tj. 159*, respektive 240 klasifikací)				
*jedna chemická látka byla zkoušena jednou v modelu epiCS® z důvodu nedostupnosti (23)				
	EpiSkin™	EpiDerm™	SkinEthic™	epiCS®
Nadhodnocená klasifikace do podkategorií:				
1B a 1C nadhodnoceně klasifikované jako 1A	21,50 %	29,0 %	31,2 %	32,8 %
negativní kontrola nadhodnoceně klasifikovaná do podkategorií 1B a 1C	20,7 %	23,4 %	27,0 %	28,4 %
negativní kontrola nadhodnoceně klasifikovaná do podkategorie 1A	0,00 %	2,7 %	0,0 %	0,00 %
nadhodnoceně klasifikovaná žravost	20,7 %	26,1 %	27,0 %	28,4 %
Celkový podíl nadhodnocené klasifikace (všechny kategorie)	17,9 %	23,3 %	24,5 %	25,8 %
Podhodnoceně klasifikované do podkategorií:				
1A podhodnoceně klasifikované do podkategorií 1B a 1C	16,7 %	16,7 %	16,7 %	12,5 %
1A nadhodnoceně klasifikované jako negativní kontrola	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %

1B a 1C podhodnoceně klasifikované jako negativní kontrola	2,2 %	0,00 %	7,5 %	6,6 %
Celkový podíl podhodnocené klasifikace (všechny kategorie)	3,3 %	2,5 %	5,4 %	4,4 %
Správné klasifikace:				
1A správně klasifikována	83,3 %	83,3 %	83,3 %	87,5 %
1B a 1C správně klasifikovány	76,3 %	71,0 %	61,3 %	60,7 %
negativní kontrola správně klasifikována	79,3 %	73,9 %	73,0 %	71,62 %
Celková přesnost	78,8 %	74,2 %	70 %	69,8 %

Negativní kontrola: Nežiravá

Dodatek 4

Klíčové parametry a kritéria přijatelnosti pro způsobilost spektrofotometrického systému HPLC/UPLC pro měření formazanu MTT extrahovaného z rekonstruované lidské epidermis

Parametr	Protokol vycházející z pokynu FDA (37)(38)	Kritéria přijatelnosti
Selektivita	Analýza isopropylalkoholu, slepý pokus s živou tkání (isopropylalkoholový extrakt z živých tkání RhE bez jakékoli expozice), slepý pokus s neživou tkání (isopropylalkoholový extrakt z neživých tkání RhE bez jakékoli expozice)	$\text{plocha}_{\text{interference}} \leq 20 \% \text{ plochy}_{\text{LLOQ}}^1$
Přesnost	Kontroly kvality (tj. formazan MTT při 1,6 µg/ml, 16 µg/ml a 160 µg/ml) v isopropylalkoholu (n=5)	$\text{CV} \leq 15 \% \text{ nebo } \leq 20 \% \text{ pro LLOQ}$
Přesnost	Kontroly kvality v isopropylalkoholu (n = 5)	$\% \text{Dev} \leq 15 \% \text{ nebo } \leq 20 \% \text{ pro LLOQ}$
Vlivy matrice	Kontroly kvality ve slepém pokusu s živou tkání (n = 5)	$85 \% \leq \text{vlivy matrice} \leq 115 \%$
Únik	Analýza isopropylalkoholu po standardu ULOQ ²	$\text{plocha}_{\text{interference}} \leq 20 \% \text{ plochy}_{\text{LLOQ}}$
Reprodukovatelnost (v rámci dne)	3 nezávislé kalibrační křivky (vycházející z 6 postupných třetinových ředění formazanu MTT v isopropylalkoholu s počátkem při ULOQ, tj. 200 µg/ml), Kontroly kvality v isopropylalkoholu (n = 5)	Kalibrační křivky: $\% \text{Dev} \leq 15 \% \text{ nebo } \leq 20 \% \text{ pro LLOQ}$ Kontroly kvality: $\% \text{Dev} \leq 15 \% \text{ a } \text{CV} \leq 15 \%$
Reprodukovatelnost (mezi dny)	1. den: 1 kalibrační křivka a kontroly kvality v isopropylalkoholu (n = 3) 2. den: 1 kalibrační křivka a kontroly kvality v isopropylalkoholu (n = 3) 3. den: 1 kalibrační křivka a kontroly kvality v isopropylalkoholu (n = 3)	
Krátkodobá stabilita formazanu MTT v tkáňovém extraktu RhE	Kontroly kvality ve slepém pokusu s živou tkání (n = 3) analyzované v den přípravy a po 24 hodinách uložení při pokojové teplotě	$\% \text{Dev} \leq 15 \%$
Dlouhodobá stabilita formazanu MTT v tkáňovém extraktu RhE, je-li požadována	Kontroly kvality ve slepém pokusu s živou tkání (n = 3) analyzované v den přípravy a po několika dnech uložení při stanovené teplotě (např. 4 °C, -20 °C, -80 °C)	$\% \text{Dev} \leq 15 \%$

1LLOQ: dolní mez stanovitelnosti, definovaná, aby postihla 1–2% tkáňovou životaschopnost, tj. 0,8 µg/ml.

2ULOQ: horní mez stanovitelnosti, definovaná tak, aby byla alespoň dvakrát vyšší než nejvyšší očekávaná koncentrace formazanu MTT v isopropylalkoholových extraktech z negativních kontrol, tj. 200 µg/ml.“

(7) V části B se kapitola B.46 nahrazuje tímto:

„B.46 DRÁŽDĚNÍ KŮŽE *IN VITRO*: ZKUŠEBNÍ METODA ZA POUŽITÍ REKONSTRUOVANÉ LIDSKÉ *EPIDERMIS*“

ÚVOD

1. Tato zkušební metoda je rovnocenná Pokynů OECD pro zkoušení (TG) č. 439 (2015). Dráždění kůže znamená tvorbu reverzibilního poškození kůže po aplikaci zkoušené látky v délce až 4 hodin [jak ji definuje globálně harmonizovaný systém klasifikace a označování chemických látek (GHS) OSN] (1) a nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1272/2008 o klasifikaci, označování a balení látek a směsí. (dále jen „nařízení CLP“)¹. Tato zkušební metoda stanoví postup *in vitro*, který lze použít k určení nebezpečnosti dráždivých chemikálií (látek a směsí) patřících v rámci systému GHS OSN a nařízení CLP do kategorie 2 (2). V oblastech, které nepřijaly volitelnou kategorii 3 systému GHS OSN (slabě dráždivé látky), se může tato zkušební metoda rovněž používat k identifikaci neklasifikovaných látek. Proto může být v závislosti na regulačním rámci a používaném systému klasifikace tato zkušební metoda užívaná k určení dráždivých účinků chemických látek na kůži jako samostatná zkouška nahrazující zkoušky dráždění kůže *in vivo*, nebo jako částečná náhradní zkouška v rámci strategie zkoušení (3).
2. Hodnocení dráždivých účinků na kůži obvykle zahrnovalo používání laboratorních zvířat [zkušební metoda B.4, rovnocenná Pokynů OECD pro zkoušení č. 404 původně vydanému v roce 1981 a revidovanému v letech 1992, 2002 a 2015] (4). Pro zkoušení leptavých účinků byly přijaty tři validované zkušební metody *in vitro* jako zkušební metoda OECD B.40 (rovnocenná Pokynů OECD pro zkoušení č. 430), zkušební metoda OECD B.40a (rovnocenná Pokynů OECD pro zkoušení č. 431) a zkušební metoda B.65 (rovnocenná Pokynů OECD pro zkoušení č. 435) (5) (6) (7). Pokyny OECD k integrovanému přístupu ke zkouškám a posuzování (IATA) dráždivých/leptavých účinků na kůži popisují několik modulů obsahujících informační zdroje a analytické nástroje a poskytují návod i) na integraci a používání stávajících údajů ze zkoušek i jiných údajů pro posouzení potenciálu dráždivých a leptavých účinků chemických látek na kůži a ii) navrhuje přístup, když je nutné další zkoušení (3).

¹ Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1272/2008 ze dne 16. prosince 2008 o klasifikaci, označování a balení látek a směsí, o změně a zrušení směrnic 67/548/EHS a 1999/45/ES a o změně nařízení (ES) č. 1907/2006, Úř. věst. L 353, 31.12.2008, s. 1.

3. Tato zkušební metoda se týká sledovaných vlastností dráždivých účinků na kůži z hlediska lidského zdraví. Vychází ze zkušebního systému *in vitro* s využitím rekonstruované lidské *epidermis* (RhE), která věrně napodobuje biochemické a fyziologické vlastnosti svrchních částí lidské kůže, tj. *epidermis*. Zkušební systém používá jako zdroje buněk netransformované keratinocyty získané z lidské *epidermis* na rekonstrukci epidermálního modelu s reprezentativní histologií a cytoarchitekturou. K dispozici jsou také standardy funkčnosti usnadňující validaci a posuzování podobných a modifikovaných metod založených na použití rekonstruované lidské *epidermis* v souladu se zásadami uvedenými v pokynů OECD č. 34 (8) (9). Odpovídající pokyn pro zkoušení byl původně přijat v roce 2010, v roce 2013 byl aktualizován o další zkušební modely používající rekonstruovanou lidskou *epidermis* a dále byl aktualizován v roce 2015 o odkazy na pokyny IATA a bylo zavedeno použití alternativního postupu na měření životaschopnosti.
4. Pro čtyři komerčně dostupné zkušební modely *in vitro* založené na zkušebním systému RhE (citlivost 80 %, specifická 70 % a přesnost 75 %) (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20) (21) (22) (23) (24) (25) (26) (27) (28) byly provedeny prevalidační, optimalizační a validační studie. Uvedené čtyři zkušební modely jsou zařazeny v tomto pokynů pro zkoušení a uvedeny v dodatku 2, kde jsou také informace o typu validační studie použité pro validaci příslušných zkušebních metod. Jak se uvádí v dodatku 2, byla pro vývoj stávající zkušební metody a standardů funkčnosti použita validovaná referenční metoda (VRM) (8).
5. Vzájemné uznávání údajů podle OECD bude zaručeno pouze u zkušebních modelů validovaných podle standardů funkčnosti (8), pokud tyto zkušební modely byly podrobeny revizi a pokud je OECD přijala. Zkušební modely zahrnuté do této zkušební metody a odpovídající pokyn OECD pro zkoušení mohou být použity bez rozdílu pro účely požadavků jednotlivých zemí na výsledky zkoušek u zkušebních metod pro dráždivé účinky na kůži *in vitro*, přičemž může být využito vzájemné uznávání údajů.
6. Definice výrazů použitých v tomto dokumentu jsou uvedeny v dodatku 1.

VÝCHOZÍ ÚVAHY A OMEZENÍ

7. Jak prokazuje úplná prospektivní validační studie hodnotící a charakterizující zkušební metody RhE (16), omezením této zkušební metody je to, že neumožňuje klasifikaci chemických látek do volitelné kategorie 3 v rámci systému GHS OSN (slabě dráždivé látky) (1). Jak bude tato zkušební metoda používána určí tedy platný právní rámec členských zemí. Pro EU není kategorie 3 zařazena do nařízení CLP. Pro úplné vyhodnocení lokálních účinků na kůži po jediné kožní expozici je třeba postupovat podle pokynů OECD k integrovanému přístupu ke zkouškám a posuzování (3). Je známo, že použití lidské kůže je předmětem vnitrostátních a mezinárodních etických úvah a podmínek.

8. Tato zkušební metoda se týká sledovaných vlastností dráždivých účinků na kůži z hlediska lidského zdraví. I když tato zkušební metoda neposkytuje odpovídající informace o poleptání kůže, je třeba poznamenat, že zkušební metoda B.40a (rovnocenná Pokynu OECD pro zkoušení č. 431) o poleptání kůže je založena na tomtéž zkušebním systému za použití rekonstruované lidské epidermis, i když podle jiného protokolu (6). Tato zkušební metoda je založena na modelech rekonstruované lidské epidermis s použitím lidských keratinocytů, které proto představují cílový orgán *in vitro* zájmového biologického druhu. Kromě toho se přímo týká prvního stupně zánětlivé kaskády/mechanismu účinku (poškození buněk a tkání vedoucí ke vzniku lokalizovaného traumatu), k němuž dochází při podráždění *in vivo*. Při validaci této zkušební metody byla testována široká škála chemických látek a databáze validační studie obsahuje celkem 58 látek (16) (18) (23). Zkušební metodu lze používat pro pevné látky, kapaliny, polotuhé látky a vosky. Kapaliny mohou být vodné či nevodné, pevné látky mohou být ve vodě rozpustné či nerozpustné. Pevné látky by měly být pokud možno před aplikací rozemlety na jemný prášek, žádná další předběžná úprava vzorku není vyžadována. Plyny a aerosoly dosud nebyly ve validační studii hodnoceny (29). Ačkoli není jejich zkoušení postupem za použití rekonstruované lidské epidermis teoreticky vyloučeno, současná zkušební metoda zkoušení plynů a aerosolů neumožňuje.
9. Před použitím této zkušební metody ke zkoušení směsi s cílem získat údaje pro zamýšlené regulační účely by mělo být zváženo, zda tato metoda může pro tento účel poskytnout přiměřené výsledky, a pokud ano, proč tomu tak je. Takové úvahy nejsou nutné, pokud existuje právní požadavek na zkoušení dané směsi. Avšak vzhledem ke skutečnosti, že směsi zahrnují širokou škálu kategorií a složení a že v současné době jsou k dispozici pouze omezené údaje o zkoušení směsí, v případech, kdy lze prokázat nepoužitelnost této zkušební metody pro konkrétní kategorii směsí (např. podle strategie navržené v Eskes *et al.*, 2012 (30)), by se tato zkušební metoda neměla používat pro tuto konkrétní kategorii směsí. Podobně opatrně je třeba postupovat v případě, kdy se zjistí, že konkrétní chemické třídy nebo fyzikálně chemické vlastnosti nejsou u stávající zkušební metody použitelné.
10. Zkoušené chemické látky absorbující světlo ve stejném pásmu jako formazan MTT a zkoušené chemické látky schopné přímé redukce vitálního barviva MTT (na formazan MTT) mohou interferovat s měřením životaschopnosti buněk, proto je třeba pro korekce použít upravené kontroly (viz odstavce 28–34).
11. U zkoušené látky s jednoznačnou klasifikací by mělo stačit jedno provedení zkoušky za použití tří tkáňových replikátů. Avšak v případě hraničních výsledků, jako jsou například nesouhlasné výsledky opakovaných měření a/nebo průměrná hodnota životaschopnosti ve výši $50 \pm 5\%$, by se mělo zvážet druhé provedení zkoušky, jakož i třetí provedení zkoušky v případě nesouhlasných výsledků mezi prvními dvěma provedeními zkoušky.

PRINCIP ZKOUŠKY

12. Zkoušená látka se místně nanese na trojrozměrný model rekonstruované lidské epidermis tvořené netransformovanými keratinocyty získanými z lidské epidermis, které byly kultivovány tak, aby vytvořily vícevrstvý, vysoce diferenciovaný model lidské *epidermis*. Skládá se z uspořádaných bazálních, výběžkovitých a granulárních vrstev a vícevrstevného *stratum corneum*, jež obsahuje mezibuněčné lamelární lipidové vrstvy představující hlavní třídy lipidů analogické těm, které se nacházejí *in vivo*.
13. Chemicky vyvolané podráždění kůže, které se projevuje zejména zarudnutím (erytém) a otokem (edém), je výsledkem kaskády událostí, která začíná proniknutím chemických látek přes *stratum corneum*, kde mohou poškodit pod ním se nacházející vrstvy keratinocytů a další kožní buňky. Poškozené buňky mohou uvolňovat zánětlivé mediátory, nebo indukovat zánětlivou kaskádu, jež působí také na buňky v *dermis*, zejména na stromatické a endoteliální buňky cév. Jedná se o rozšíření a zvýšení propustnosti endoteliálních buněk, při nichž vzniká pozorovaný erytém a edém (29). Zejména zkušební metody na bázi RhE měří při nepřítomnosti vaskularizace ve zkušebním systému *in vitro* počáteční události kaskády, např. poškození buněk/tkání (16) (17), s využitím životaschopnosti buněk jako odečítané hodnoty.
14. Životaschopnost buněk v modelech RhE se měří enzymatickou přeměnou vitálního barviva MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyl-2H-tetrazolium-bromid, thiazolylová modř, číslo CAS 298-93-1] na sůl modrého formazanu, jehož množství se změří po extrakci z tkání (31). Dráždivé látky se zjišťují na základě jejich schopnosti snižovat životaschopnost buněk pod definované prahové úrovně (tj. ≤ 50 % pro dráždivé látky patřící v rámci systému GHS OSN / nařízení CLP do kategorie 2). V závislosti na právním rámci a použitelnosti zkušební metody lze zkoušené chemické látky, při jejichž použití životaschopnost buněk přesahuje definovanou prahovou úroveň, považovat za nedráždivé (tzn. > 50 %, „bez kategorie“).

PROKÁZÁNÍ ZPŮSOBILOSTI

15. Dříve než začnou laboratoře rutinně používat kterýkoli ze čtyř validovaných zkušebních modelů, který dodržuje tuto zkušební metodu (dodatek 2), měly by prokázat svou odbornou způsobilost pomocí deseti vhodných látek uvedených v tabulce 1. V situacích, kdy některá z uvedených látek není k dispozici, lze použít jinou látku, u níž jsou k dispozici odpovídající referenční údaje o použití *in vivo* a *in vitro* (např. ze seznamu referenčních chemických látek (8)), pokud budou použita stejná kritéria výběru jako kritéria popsaná v tabulce 1. Použití alternativní vhodné látky je třeba zdůvodnit.
16. V rámci zkoušení způsobilosti se doporučuje, aby uživatelé po obdržení modelu rekonstruované lidské epidermis ověřili bariérové vlastnosti tkání uvedené jeho výrobcem. To je zvláště důležité v případě, že se tkáň zasílají na dlouhé vzdálenosti nebo že jejich přeprava trvá dlouhou dobu. Pokud je zkušební metoda úspěšně zavedena a je získána a

prokázána způsobilost správně tuto metodu používat, není nutno takové ověřování běžně provádět. Při běžném používání zkušební metody se však doporučuje i nadále v pravidelných intervalech posuzovat bariérové vlastnosti.

Tabulka 1: Vhodné látky¹

Látka	Číslo CAS	Skóre <i>in vivo</i> ²	Skupenství	Kategorie GHS OSN
NEKLASIFIKOVANÉ LÁTKY (bez kategorie GHS OSN)				
kyselina naftalen-1-octová	86-87-3	0	Pevná látka	Bez kategorie
isopropylalkohol	67-63-0	0,3	Kapalina	Bez kategorie
methyl-stearát	112-61-8	1	Pevná látka	Bez kategorie
heptyl-butyát	5870-93-9	1,7	Kapalina	Bez kategorie (Volitelná kat. 3) ³
hexyl-salicylát	6259-76-3	2	Kapalina	Bez kategorie (Volitelná kat. 3) ³
KLASIFIKOVANÉ LÁTKY (kategorie 2 GHS OSN)				
cyklamenaldehyd	103-95-7	2,3	Kapalina	Kat. 2
1-bromhexan	111-25-1	2,7	Kapalina	Kat. 2
hydroxid draselný (5% vod.)	1310-58-3	3	Kapalina	Kat. 2
3-fenyl-1-methylpiperazin	5271-27-2	3,3	Pevná látka	Kat. 2
heptanal	111-71-7	3,4	Kapalina	Kat. 2

1 Vhodné látky jsou podskupina látek používaných při validační studii a výběr vychází z těchto kritérií, i) chemické látky jsou komerčně dostupné; ii) jsou reprezentativními zástupci celého rozsahu Draizeho škály dráždivosti (od nedráždivých až po silně dráždivé látky); iii) mají jasně definovanou chemickou strukturu; iv) jsou typickým příkladem chemické funkčnosti používané ve validačním procesu; v) vykázaly reprodukovatelné výsledky *in vitro* v řadě zkoušek a laboratoří; vi) byly správně určeny *in vitro*; a vii) nejsou spojeny s mimořádně toxickým profilem (např. karcinogenní látky, nebo nejde o látky toxické pro reprodukční systém) a nejsou spojeny s neúnosnými náklady na likvidaci.

2 Skóre *in vivo* podle zkušební metody B.4 (4).

3 V rámci této zkušební metody se látky patřící podle systému GHS OSN do volitelné kategorie 3 (slabě dráždivé látky) (1) považují za látky s označením „bez kategorie“.

POSTUP

17. Následuje popis složek a postupů zkušební metody s použitím rekonstruované lidské epidermis při posouzení dráždění kůže (viz také dodatek 3, kde jsou uvedeny parametry týkající se jednotlivých zkušebních modelů). Pro čtyři modely vhodné pro tuto zkušební metodu jsou k dispozici standardní prováděcí postupy (32) (33) (34) (35).

SLOŽKY ZKUŠEBNÍ METODY S POUŽITÍM REKONSTRUOVANÉ LIDSKÉ EPIDERMIS

Obecné podmínky

18. K rekonstrukci epitelu je zapotřebí použít netransformované lidské keratinocyty. Pod funkční vrstvou *stratum corneum* by mělo být přítomno několik vrstev životaschopných

epitelových buněk (bazální vrstva, *stratum spinosum*, *stratum granulosum*). *Stratum corneum* by mělo být vícevrstevné a obsahovat profil esenciálních lipidů k vytvoření funkční bariéry robustní natolik, aby vzdorovala rychlému průniku cytotoxických referenčních látek, např. dodecylsulfátu sodného (SDS) nebo přípravku Triton X-100. Bariérová funkce by měla být prokázána a lze ji hodnotit buď určením koncentrace, při níž referenční chemická látka snižuje životaschopnost tkání o 50 % (IC_{50}) po pevně stanovené expoziční době, nebo stanovením expoziční doby potřebné ke snížení životaschopnosti buněk o 50 % (ET_{50}) po aplikaci referenční chemické látky v pevně stanovené koncentraci. Zadržovací vlastnosti modelu rekonstruované lidské *epidermis* by měly zabránit průchodu materiálu v oblasti *stratum corneum* do životaschopné tkáně, což by vedlo k nesprávnému modelování expozice kůže. Model rekonstruované lidské *epidermis* by neměl být kontaminován bakteriemi, viry, mykoplazmaty ani houbovými mikroorganismy.

Funkční podmínky

Životaschopnost

19. K určení životaschopnosti se používá zkouška MTT (31). Vitální buňky tkáňového modelu dokážou redukovat vitální barvivo MTT na modrou sraženinu formazanu, která je poté z tkáně extrahována pomocí isopropylalkoholu (nebo podobného rozpouštědla). Optická hustota (OD) samotného extrakčního rozpouštědla by měla být dostatečně malá, tzn. $OD < 0,1$. Extrahovaný formazan MTT může být kvantifikován pomocí standardního měření absorbance (OD) nebo spektrofotometrickým postupem HPLC/UPLC (36). Uživatelé modelu rekonstruované lidské *epidermis* by měli zajistit, aby každá použitá šarže modelu rekonstruované lidské *epidermis* splňovala stanovená kritéria pro negativní kontrolu. Rozsah přijatelnosti (horní a dolní mez) hodnot OD negativní kontroly (za podmínek zkušební metody pro dráždění kůže) stanoví subjekt, který model rekonstruované lidské *epidermis* vyvinul nebo dodává. Rozsahy přijatelnosti pro čtyři validované modely RhE zařazené do této zkušební metody jsou uvedeny v tabulce 2. Uživatel spektrofotometrie HPLC/UPLC by měl jako kritérium přijatelnosti pro negativní kontrolu používat rozsahy OD negativní kontroly uvedené v tabulce 2. Je třeba doložit, že tkáně ošetřené negativní kontrolou jsou stabilně kultivovány (poskytují podobné naměřené hodnoty životaschopnosti) po dobu trvání zkušební doby expozice.

Tabulka 2: Rozsahy přijatelnosti pro hodnoty OD negativní kontroly zkušebních modelů zařazených do této zkušební metody

	Dolní mez přijatelnosti	Horní mez přijatelnosti
EpiSkin™ (SM)	$\geq 0,6$	$\leq 1,5$
EpiDerm™ SIT (EPI-200)	$\geq 0,8$	$\leq 2,8$
SkinEthic™ RHE	$\geq 0,8$	$\leq 3,0$
LabCyte EPI-MODEL24 SIT	$\geq 0,7$	$\leq 2,5$

Bariérová funkce

20. Lipidové složení *stratum corneum* by mělo stačit na to, aby odolávalo rychlému průniku cytotoxických referenčních chemických látek (např. SDS nebo Triton X-100) podle odhadu na základě hodnoty IC_{50} nebo ET_{50} (tabulka 3).

Morfologie

21. Mělo by se provést histologické vyšetření modelu rekonstruované lidské epidermis, které prokáže strukturu podobnou lidské epidermis (včetně vícevrstevné vrstvy *stratum corneum*).

Reprodukovatelnost

22. Výsledky pozitivních a negativních kontrol zkušební metody by měly prokázat reprodukovatelnost v průběhu času.

Kontrola kvality

23. Model rekonstruované lidské epidermis by měl být použit pouze v případě, že subjekt, který jej vyvinul nebo dodává, prokáže, že každá použitá šarže modelu RhE splňuje stanovená produkční kritéria pro uvolnění do oběhu, přičemž mezi nejvýznamnější z nich patří kritéria *životaschopnosti* (odstavec 19), *bariérové funkce* (odstavec 20) a *morfologie* (odstavec 21). Tyto údaje by měly být poskytovány uživatelům zkušební metody, aby je mohli uvést v závěrečné zprávě. Rozsah přijatelnosti (horní a dolní mez) pro IC_{50} nebo ET_{50} by měl stanovit subjekt, který model rekonstruované lidské epidermis vyvinul nebo dodává. Pro spolehlivou predikci klasifikace zkoušené látky, pokud jde o dráždivost, mohou být přijatelné pouze výsledky získané za použití náležitých tkání. V tabulce 3 jsou uvedeny rozsahy přijatelnosti pro čtyři zkušební modely zařazené do tohoto pokynu pro zkoušení.

Tabulka 3: Kvalitativní kritéria pro propouštění šarží zkušebních modelů zařazených do této zkušební metody

	Dolní mez přijatelnosti	Horní mez přijatelnosti
EpiSkin™ (SM) (18 hodin expozice za použití SDS) (32)	$IC_{50} = 1,0 \text{ mg/ml}$	$IC_{50} = 3,0 \text{ mg/ml}$
EpiDerm™ SIT (EPI-200) (1% Triton X-100)(33)	$ET_{50} = 4,0 \text{ hod.}$	$ET_{50} = 8,7 \text{ hod.}$
SkinEthic™ RHE (1% Triton X-100)(34)	$ET_{50} = 4,0 \text{ hod.}$	$ET_{50} = 10,0 \text{ hod.}$
LabCyte EPI-MODEL24 SIT (18 hodin expozice za použití SDS) (35)	$IC_{50} = 1,4 \text{ mg/ml}$	$IC_{50} = 4,0 \text{ mg/ml}$

Aplikace zkoušených a kontrolních chemických látek

24. Pro každou zkoušenou chemickou látku a pro kontroly by se při každém provedení zkoušky měly použít alespoň tři replikáty. V případě kapalných a pevných chemických

látek je zapotřebí nanést dostatečné množství zkoušené látky, aby rovnoměrně pokryla povrch epidermis, a současně se vyhnout nekonečné dávce, tzn. od 26 do 83 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ nebo mg/cm^2 (viz dodatek 3). V případě pevných chemických látek je nutno povrch *epidermis* před nanesením zvlhčit deionizovanou nebo destilovanou vodou, aby se zlepšil kontakt zkoušené chemické látky s povrchem *epidermis*. Pevné látky by se měly pokud možno zkoušet ve formě jemného prášku. V některých případech lze použít jako aplikační pomůcku nylonovou síťku (viz dodatek 3). Na konci expoziční doby je nutno zkoušenou látku pečlivě spláchnout z povrchu epidermis vodným pufrům nebo 0,9% roztokem NaCl. V závislosti na použitém zkušební modelu RhE se doba expozice pohybuje v rozmezí od 15 do 60 minut a teplota inkubace v rozmezí od 20 do 37 °C. Tyto expoziční doby a teploty jsou optimalizovány pro každou zkušební metodu s použitím rekonstruované lidské epidermis a představují různé inherentní vlastnosti zkušebních modelů (např. bariérová funkce) (viz dodatek 3).

25. Při každém provedení zkoušky by se měly používat souběžné negativní kontroly (NC) a pozitivní kontroly (PC), aby se prokázalo, že životaschopnost (při použití negativních kontrol), bariérová funkce a výsledná tkáňová citlivost tkání (při použití pozitivní kontroly) jsou v rámci stanoveného rozpětí historických hodnot přijatelnosti. Navrhovanou pozitivní kontrolou je 5% vodný SDS. Navrhovanými látkami pro negativní kontrolu jsou voda nebo fosfátový pufrový fyziologický roztok (PBS).

Měření životaschopnosti buněk

26. Podle zkušební postupu je velmi důležité, aby se měření životaschopnosti neprovádělo okamžitě po expozici působení zkoušené chemické látky, ale až po dostatečně dlouhé inkubační době po ošetření po opláchnutí tkáně v čerstvém médiu. Tato doba umožňuje jak regeneraci po slabých dráždivých účincích, tak i vznik jasných známek cytotoxických účinků. V průběhu optimalizace zkoušek dvou zkušebních modelů na bázi RhE pro tuto zkušební metodu bylo zjištěno, že optimální inkubační doba je 42 hodin po expozici (11) (12) (13) (14) (15).
27. Zkouška MTT je standardizovaná kvantitativní metoda, která by se měla používat k měření životaschopnosti buněk podle této zkušební metody. Je slučitelná s použitím trojrozměrné tkáňové soustavy. Vzorek tkáně se na dobu 3 hodin vloží do roztoku MTT o vhodné koncentraci (např. 0,3–1 mg/ml). Životaschopné buňky přemění MTT na modrý formazan. Vysrážený modrý formazan se poté extrahuje z tkáně pomocí rozpouštědla (např. isopropylalkoholu nebo kyselého isopropylalkoholu) a koncentrace formazanu se změní určením OD při vlnové délce 570 nm za použití filtru o pásmové propustnosti nejvýše ± 30 nm, nebo spektrofotometrickým postupem HPLC/UPLC (viz odstavec 34) (36).
28. Optické vlastnosti zkoušené látky nebo její chemické působení na MTT (např. chemické látky mohou zabránit zabarvení, změnit zabarvení v opačné, nebo naopak mohou zabarvení

způsobit) mohou zkoušku ovlivnit, což vede k nepravdivému odhadu životaschopnosti. K tomu může dojít v případě, že se určitá zkoušená látka opláchnutím z tkáně zcela neodstraní nebo že pronikne do *epidermis*. Jestliže zkoušená látka působí přímo na MTT (např. redukuje MTT), má přirozené zabarvení nebo se zabarví během svého působení na tkáň, pak jsou ke zjištění interference zkoušené chemické látky s postupem měření životaschopnosti buněk a ke korekci této interference zapotřebí dodatečné kontroly (viz odstavce 29 a 33). Podrobný popis, jak korigovat přímou redukci MTT a interference způsobené barvivem, naleznete ve standardních prováděcích postupech výše uvedených čtyř validovaných modelů zařazených do této zkušební metody (32) (33) (34) (35).

29. Aby bylo možné identifikovat přímá redukční činidla MTT, je třeba každou zkoušenou chemickou látku přidávat do čerstvě připraveného roztoku MTT. Jestliže směs MTT obsahující zkoušenou chemickou látku zmodrá/zfialoví, je zkoušená chemická látka považována za přímé redukční činidlo MTT, přičemž je třeba provést další funkční kontrolu na neživotaschopné tkáni RhE nezávisle na použití standardního měření absorbance (OD) nebo spektrofotometrického postupu HPLC/UPLC. Tato další funkční kontrola využívá neživé tkáně, které mají pouze zbytkovou metabolickou aktivitu, ale absorbují zkoušenou chemickou látku podobně jako životaschopné tkáně. Každá zkoušená chemická látka redukující MTT se aplikuje na alespoň dva neživé tkáňové replikáty, které se podrobí celému zkušebnímu postupu, aby došlo k nespecifické redukci MTT (NSMTT) (32) (33) (34) (35). Postačí jedna kontrola NSMTT na zkoušenou chemickou látku bez ohledu na počet provedených nezávislých zkoušek/experimentů. Skutečná životaschopnost tkáně se poté vypočítá jako procentuální životaschopnost tkáně získaná z živých tkání vystavených působení redukčního činidla MTT minus procentuální nespecifická redukce MTT získaná z neživých tkání vystavených stejnému redukčnímu činidlu MTT, počítáno ve vztahu k negativní kontrole prováděné souběžně s korigovanou zkouškou (% NSMTT).
30. Aby bylo možné zjistit potenciální interferenci zabarvených zkoušených chemických látek nebo zkoušených chemických látek, které se zabarvily při kontaktu s vodou nebo isopropylalkoholem, a rozhodnout, zda je nutné provést další kontroly, je třeba provést spektrální analýzu zkoušené chemické látky ve vodě (prostředí v průběhu expozice) anebo v isopropylalkoholu (extrakční roztok). Jestliže zkoušená chemická látka ve vodě anebo isopropylalkoholu absorbuje světlo v pásmu 570 ± 30 nm, je třeba provést další kontroly s barvivem, případně použít spektrofotometrický postup HPLC/UPLC, přičemž v tomto případě nejsou tyto kontroly nutné (viz odstavce 33 a 34). Při provádění standardního měření absorbance (OD) se každá interferující zbarvená zkoušená chemická látka aplikuje na alespoň dva životaschopné tkáňové replikáty, které se podrobí celému zkušebnímu postupu, ale v průběhu inkubačního kroku MTT se inkubují v médiu místo v roztoku MTT za účelem vytvoření kontroly nespecifického zbarvení (NSC_{living}). Vzhledem k inherentní biologické variabilitě živých tkání je třeba kontrolu NSC_{living} provádět souběžně se zkoušením zbarvené chemické látky a v případě většího počtu zkoušek je třeba u každé

zkoušky (při každém provedení zkoušky) provést nezávislou kontrolu NSC_{living}. Skutečná životaschopnost tkáně se poté vypočítá jako procentuální životaschopnost tkáně získaná z živých tkání vystavených působení interferující zkoušené chemické látky a inkubovaných v roztoku MTT minus procentuální nespecifické zbarvení získané z živých tkání vystavených působení interferující zkoušené chemické látky a inkubovaných v médiu bez MTT, prováděno souběžně s korigovanou zkouškou (% NSC_{living}).

31. Zkoušené chemické látky, u nichž se zjistí, že přímo redukují MTT (viz odstavec 29) a působí barevné interference (viz odstavec 30), budou při provádění standardního měření absorbance (OD) také vyžadovat třetí sadu kontrol vedle kontrol NSMTT a NSC_{living} popsanych v předchozích odstavcích. Obvykle je tomu tak u tmavě zbarvených zkoušených chemických látek interferujících se zkouškou MTT (např. modré, fialové, černé), protože jejich vlastní barva narušuje posouzení jejich schopnosti přímo redukovat MTT, jak je popsáno v odstavci 29. Tyto zkoušené chemické látky se mohou vázat na živé i neživé tkáně, a proto kontrola NSMTT musí nejen korigovat potenciální přímou redukci MTT způsobenou zkoušenou chemickou látkou, ale také barevnou interferenci vznikající z vazby zkoušené chemické látky na neživé tkáně. Mohlo by to vést k dvojí korekci barevné interference, protože kontrola NSC_{living} již koriguje barevnou interferenci vznikající z vazby zkoušené chemické látky na živé tkáně. Aby byla vyloučena možná dvojí korekce barevné interference, je třeba provést třetí kontrolu na nespecifické zbarvení u neživých tkání (NSC_{killed}). Při této další kontrole se zkoušená chemická látka aplikuje na alespoň dva neživé tkáňové replikáty, které se podrobí celé zkoušce, ale v průběhu inkubačního kroku MTT se inkubují v médiu místo v roztoku MTT. Postačí jedna kontrola NSC_{killed} na zkoušenou chemickou látku bez ohledu na počet provedených nezávislých zkoušek/experimentů, ale tuto kontrolu je třeba provést souběžně s kontrolou NSMTT a pokud možno se stejnou šarží tkáně. Skutečná životaschopnost tkáně se poté vypočítá jako procentuální životaschopnost tkáně získaná z živých tkání vystavených působení zkoušené chemické látky minus % NSMTT minus % NSC_{living} plus procentuální nespecifické zbarvení získané z neživých tkání vystavených působení interferující zkoušené chemické látky a inkubovaných v roztoku bez MTT, počítáno ve vztahu k negativní kontrole prováděné souběžně s korigovanou zkouškou (% NSC_{killed}).
32. Je důležité uvést, že nespecifická redukce MTT a nespecifické barevné interference mohou zvýšit odečty tkáňového extraktu nad rozsah linearitu spektrofotometru. Z tohoto důvodu by měla každá laboratoř stanovit rozsah linearitu svého spektrofotometru s použitím formazanu MTT (č. CAS 57360-69-7) z komerčního zdroje, než zahájí testování zkoušených chemických látek pro regulační účely. Pro posouzení zkoušených chemikálií, které přímo redukují MTT a působí barevné interference, když je optická hustota tkáňových extraktů zjištěná za použití zkoušené chemikálie bez korekce přímé redukce MTT anebo barevné interference v lineárním rozsahu spektrofotometru, nebo když je nekorigovaná procentuální životaschopnost zjištěná u zkoušené chemické látky již $\leq 50\%$,

je vhodné standardní měření absorpance (OD) pomocí spektrofotometru. Výsledky u zkoušených chemických látek, které dávají % NSMTT anebo % NSC_{living} ≥ 50 % negativní kontroly, je třeba posuzovat opatrně, neboť je to hraniční hodnota používaná na odlišení klasifikovaných chemických látek od neklasifikovaných (viz odstavec 36).

33. U barevných zkoušených chemických látek, které nejsou kompatibilní se standardním měřením absorpance (OD) vzhledem k příliš velké interferenci se zkouškou MTT, může být použit alternativní spektrofotometrický postup HPLC/UPLC měření formazanu MTT (viz odstavec 34) (36). Spektrofotometrický systém HPLC/UPLC umožňuje oddělit formazan MTT od zkoušené chemické látky před její kvantifikací (36). Z tohoto důvodu se při použití spektrofotometrie HPLC/UPLC nepožadují kontroly NSC_{living} ani NSC_{killed}, a to nezávisle na zkoušené chemické látce. Kontroly NSMTT by se však měly použít, pokud existuje podezření, že zkoušená chemická látka přímo redukuje MTT, nebo v případě, že má barvu, která znesnadňuje posouzení schopnosti přímé redukce MTT (jak je popsáno v odstavci 29). Při použití spektrofotometrie HPLC/UPLC na měření formazanu MTT se procentuální životaschopnost tkáně vypočítá jako procentuální plocha píku formazanu MTT získaná z živých tkání vystavených působení zkoušené chemické látky ve vztahu k píku formazanu MTT získanému při souběžné negativní kontrole. U zkoušených chemických látek, které dokážou přímo redukovat MTT, se skutečná životaschopnost tkáně vypočítá jako procentuální životaschopnost tkáně získaná z živých tkání vystavených působení zkoušené chemické látky minus % NSMTT. Konečně je třeba uvést, že přímá redukční činidla MTT, jež mohou být také barevně interferující a která zůstanou v tkáních po expozici a redukují MTT tak silně, že to vede k takovým hodnotám optické hustoty (při využití standardního měření OD) nebo plochám píků (při použití spektrofotometrie UPLC/HPLC) zkoušených tkáňových extraktů, které spadají mimo rozsah linearity spektrofotometrie, nelze posuzovat, i když lze očekávat, že k tomu dochází velmi vzácně.
34. Spektrofotometrie HPLC/UPLC může být použita také u všech druhů zkoušených chemických látek (barevných, nebarevných, látek redukujících MTT i látek, které MTT neredukují) pro měření formazanu MTT (36). Vzhledem k různým spektrofotometrickým systémům HPLC/UPLC je třeba prokázat způsobilost spektrofotometrického systému HPLC/UPLC před jeho použitím pro kvantifikaci formazanu MTT z tkáňových extraktů splněním kritérií přijatelnosti pro sadu standardních parametrů způsobilosti vycházejících z parametrů popsaných v pokynu amerického Úřadu pro potraviny a léčiva pro průmysl k validaci bioanalytických metod (36) (37). Tyto klíčové parametry a jejich kritéria přijatelnosti jsou uvedeny v dodatku 4. Po splnění kritérií přijatelnosti definovaných v dodatku 4 je spektrofotometrický systém HPLC/UPLC považován za způsobilý a připravený na měření formazanu MTT za experimentálních podmínek popsaných v této zkušební metodě.

Kritéria přijatelnosti

35. U každé zkušební metody s použitím platných šarží modelu rekonstruované lidské epidermis (viz odstavec 23) by tkáň ošetřená negativní kontrolou měly vykazovat hodnoty OD odrážející kvalitu tkání, která vznikla po všech přepravních a přejímacích krocích a po všech procesech podle závěrečné zprávy. Hodnoty OD kontrol by neměly být pod dosud zjištěnými dolními hranicemi. Podobně by tkáň ošetřená pozitivní kontrolou, tj. 5% vodným SDS, měly odrážet svou schopnost reagovat na dráždivou chemickou látku v podmínkách zkušební metody (viz dodatek 3 a standardní prováděcí postupy čtyř zkušebních modelů zařazených do tohoto pokynu pro zkoušení (32) (33) (34) (35). Související vhodné hodnoty variability mezi tkáňovými replikáty, tj. směrodatné odchylky (SD), by měly být v mezích přijatelnosti stanovených pro použitý zkušební model (viz dodatek 3).

Interpretace výsledků a predikční model

36. Hodnoty OD získané s každou zkoušenou chemickou látkou lze použít k výpočtu procentuálního podílu životaschopnosti buněk normalizovaného podle negativní kontroly, která je stanovena na 100 %. Při použití spektrofotometrie HPLC/UPLC se procentuální životaschopnost tkáň vypočítá jako procentuální plocha píku formazanu MTT získaná z živých tkání vystavených působení zkoušené chemické látky ve vztahu k píku formazanu MTT získanému při souběžné negativní kontrole. Je zapotřebí jasně vymezit, zdokumentovat a v případě potřeby prokázat mezní hodnotu procentuálního podílu životaschopnosti buněk odlišující dráždivou látku od neklasifikovaných zkoušených chemických látek a statistický postup (statistické postupy) použitý k vyhodnocení výsledků a identifikaci dráždivých látek (viz standardní prováděcí postupy zkušebních modelů, kde jsou uvedeny informace). Mezní hodnoty pro predikci dráždění jsou uvedeny níže:

- Zkoušená chemická látka je považována za látku vyžadující klasifikaci a označení podle systému GHS OSN nebo podle nařízení CLP (kategorie 2 nebo kategorie 1), jestliže je střední procentuální životaschopnost tkáň po expozici a inkubaci po ošetření menší nebo rovna ($\leq$) 50 %. Protože zkušební modely RhE zahrnuté v této zkušební metodě nedokážou rozlišovat mezi kategorií 1 a kategorií 2 GHS OSN/CLP, budou nutné další informace o leptavých účincích na kůži, aby bylo možné rozhodnout o její konečné klasifikaci [viz také pokyny OECD k integrovanému přístupu ke zkouškám a posuzování (3)]. Pokud je zjištěno, že je zkoušená chemická látka nežíravá (např. podle zkušebních metod TM.40, B.40a nebo B.65) a vykazuje životaschopnost tkáň po expozici a inkubaci po ošetření menší než nebo rovnou ($\leq$) 50 %, považuje se tato zkoušená chemická látka za dráždivou pro kůži v souladu s kategorií 2 GHS OSN/CLP.
- V závislosti na právním rámci v členských zemích lze zkoušenou chemickou látku považovat za nedráždivou pro kůži v souladu s označením „bez kategorie“ v rámci systému GHS OSN nebo podle nařízení CLP, jestliže je životaschopnost tkáň po expozici a inkubaci po ošetření větší než ($>$) 50 %.

ÚDAJE A PŘEDKLÁDÁNÍ ZPRÁV

Údaje

37. Za každé provedení zkoušky by se údaje získané za použití jednotlivých tkáňových replikátů (např. hodnoty OD a vypočítané údaje procentuální životaschopnosti buněk pro každou zkoušenou chemickou látku, a to včetně její klasifikace) měly vykazovat ve formě tabulky, popřípadě včetně údajů z opakovaných experimentů. Navíc je za každé provedení zkoušky nutno vykázat průměr $\pm$ směrodatnou odchylku. Pozorované interakce s činidlem MTT a barevnými zkoušenými chemickými látkami je nutno uvádět za každou zkoušenou chemickou látku.

Závěrečná zpráva

38. Závěrečná zpráva by měla obsahovat tyto informace:

Zkoušená chemická látka a kontrolní chemické látky:

- jednosložková látka: chemická identifikace, např. název podle IUPAC nebo CAS, číslo CAS, kód SMILES nebo InChI, strukturní vzorec, čistota, případně chemická identita nečistot, je-li to prakticky možné, atd.
- vícesložková látka, UVCB a směs: charakterizované pokud možno chemickou identitou (viz výše), kvantitativním výskytem a relevantními fyzikálně-chemickými vlastnostmi složek,
- fyzický vzhled, rozpustnost ve vodě a další relevantní fyzikálně-chemické vlastnosti,
- zdroj, číslo šarže, jsou-li k dispozici,
- případně ošetření zkoušené chemické látky / kontrolních chemických látek před zkoušením (např. zahřátí, mletí),
- stabilita zkoušené chemické látky, datum použitelnosti nebo datum opětovné analýzy, je-li známo,
- podmínky skladování.

Použitý model RhE a protokol (a případné zdůvodnění jeho volby)

Zkušební podmínky:

- použitý model rekonstruované lidské epidermis (včetně čísla šarže),
- kalibrační údaje o měřicím zařízení (např. spektrofotometrie), (případně) vlnová délka a pásmová propustnost použitá pro kvantifikaci formazanu MTT a rozsah linearit měřicího zařízení, popis metody použité pro kvantifikaci formazanu MTT,

- případně popis způsobilosti spektrofotometrického systému HPLC/UPLC, úplné podklady ke konkrétnímu použitému modelu rekonstruované lidské epidermis včetně jeho chování při zkoušce. Ty by měly zejména zahrnovat:
 - i) životaschopnost;
 - ii) bariérovou funkci;
 - iii) morfologii;
 - iv) reprodukovatelnost a předvídatelnost;
 - v) kontroly kvality modelu,
- odkaz na historické údaje modelu. Ty by měly zahrnovat přinejmenším přijatelnost údajů z kontrol kvality s odkazem na historické údaje o šaržích,
- prokázání způsobilosti při provádění zkušební metody před rutinním použitím při zkoušení látek pro prokázání způsobilosti.

Postup zkoušky:

- podrobnosti použitého zkušebního postupu (včetně postupů vymývání použitých po expozici), dávka zkoušené chemické látky a použitých kontrolních chemických látek,
- doba a teplota expozice a doba inkubace po ošetření,
- přehled kontrol použitých pro látky, které přímo redukují MTT, případně pro zbarvující zkoušené chemické látky,
- počet tkáňových replikátů použitých na jednu zkoušenou chemickou látku a kontroly (pozitivní kontrola, negativní kontrola a NSMTT, případně NSC_{living} a NSC_{killed}),
- popis použitých kritérií rozhodování / predikčního modelu podle použitého modelu RhE,
- popis jakýchkoli změn zkušebního postupu (včetně postupů vymývání).

Kritéria přijatelnosti každého provedení zkoušky:

- střední hodnoty pozitivních a negativních kontrol a rozpětí přijatelnosti založené na porovnání s historickými údaji, přijatelná variabilita mezi tkáňovými replikáty pro pozitivní a negativní kontroly,
- přijatelná variabilita mezi tkáňovými replikáty pro zkoušenou chemickou látku.

Výsledky:

- tabulka s údaji o jednotlivých zkoušených chemických látkách pro každé provedení zkoušky a každé měření replikátů včetně hodnot OD nebo plochy píku formazanu MTT, procentuální životaschopnosti tkáně, střední procentuální životaschopnosti tkáně a běžných odchylek,

- případně výsledky kontrol použitých pro přímá redukční činidla MTT anebo zbarvující zkoušené chemické látky včetně hodnot OD nebo plochy píku formazanu MTT, % NSMTT, % NSC_{living}, % NSC_{killed}, směrodatné odchylky, konečná korigovaná procentuální životaschopnost tkáně,
- výsledky získané u zkoušené chemické látky / zkoušených chemických látek a kontrolních látek ve vztahu k definovaným kritériím přijatelnosti provedení zkoušky,
- popis ostatních pozorovaných účinků,
- odvozená klasifikace s odkazem na použitý predikční model / kritéria rozhodování.

Diskuse o výsledcích

Závěry

LITERATURA

- (1) United Nations (UN) (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Second Revised Edition, UN New York and Geneva, 2013 (Globálně harmonizovaný systém klasifikace a označování chemických látek (GHC), druhé revidované vydání, OSN New York a Ženeva). Dostupné na internetových stránkách: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html.
- (2) EC EURL-ECVAM (2009). Statement on the “Performance Under UN GHS of Three *In Vitro* Assays for Skin Irritation Testing and the Adaptation of the Reference Chemicals and Defined Accuracy Values of the ECVAM Skin Irritation Performance Standards”, Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC31), 9 April 2009. Dostupné na internetových stránkách: https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/about-ecvam/archive-publications/publication//ESAC31_skin-irritation-statement_20090922.pdf
- (3) OECD (2014). Guidance document on Integrated Approaches to Testing and Assessment for Skin Irritation/Corrosion. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (No 203) Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (4) Kapitola B.4 této přílohy, Akutní dráždivé/leptavé účinky na kůži.
- (5) Kapitola B.40 této přílohy, Leptavé účinky na kůži *in vitro*: Transkutánní elektrický odpor (TER).
- (6) Kapitola B.40a této přílohy, Leptavé účinky na kůži *in vitro*: Zkušební metoda za použití rekonstruované lidské epidermis (RHE).
- (7) Kapitola B.65 této přílohy, Zkušební metoda s využitím membránové bariéry *in vitro*.
- (8) OECD (2015). Performance Standards for the Assessment of Proposed Similar or Modified *In Vitro* Reconstructed Human *Epidermis* (RhE) Test Methods for Skin Irritation in Relation to TG 439. Environment, health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 220). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (9) OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 34) Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (10) Fentem, J.H., Briggs, D., Chesné, C., Elliot, G.R., Harbell, J.W., Heylings, J.R., Portes, P., Roguet, R., van de Sandt, J.J. M. and Botham, P. (2001). A

Prevalidation Study on *In Vitro* Tests for Acute Skin Irritation, Results and Evaluation by the Management Team, *Toxicol. in Vitro* 15, 57-93.

- (11) Portes, P., Grandidier, M.-H., Cohen, C. and Roguet, R. (2002). Refinement of the EPISKIN Protocol for the Assessment of Acute Skin Irritation of Chemicals: Follow-Up to the ECVAM Prevalidation Study, *Toxicol. in Vitro* 16, 765–770.
- (12) Kandárová, H., Liebsch, M., Genschow, E., Gerner, I., Traue, D., Slawik, B. and Spielmann, H. (2004). Optimisation of the EpiDerm Test Protocol for the Upcoming ECVAM Validation Study on *In Vitro* Skin Irritation Tests, *ALTEX* 21, 107–114.
- (13) Kandárová, H., Liebsch, M., Gerner, I., Schmidt, E., Genschow, E., Traue, D. and Spielmann, H. (2005), The EpiDerm Test Protocol for the Upcoming ECVAM Validation Study on *In Vitro* Skin Irritation Tests – An Assessment of the Performance of the Optimised Test, *ATLA* 33, 351-367.
- (14) Cotovio, J., Grandidier, M.-H., Portes, P., Roguet, R. and Rubinstein, G. (2005). The *In Vitro* Acute Skin Irritation of Chemicals: Optimisation of the EPISKIN Prediction Model Within the Framework of the ECVAM Validation Process, *ATLA* 33, 329-349.
- (15) Zuang, V., Balls, M., Botham, P.A., Coquette, A., Corsini, E., Curren, R.D., Elliot, G.R., Fentem, J.H., Heylings, J.R., Liebsch, M., Medina, J., Roguet, R., van De Sandt, J.J.M., Wiemann, C. and Worth, A. (2002). Follow-Up to the ECVAM Prevalidation Study on *In Vitro* Tests for Acute Skin Irritation, The European Centre for the Validation of Alternative Methods Skin Irritation Task Force report 2, *ATLA* 30, 109-129.
- (16) Spielmann, H., Hoffmann, S., Liebsch, M., Botham, P., Fentem, J., Eskes, C., Roguet, R., Cotovio, J., Cole, T., Worth, A., Heylings, J., Jones, P., Robles, C., Kandárová, H., Gamer, A., Remmele, M., Curren, R., Raabe, H., Cockshott, A., Gerner, I. and Zuang, V. (2007). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Acute Skin Irritation: Report on the Validity of the EPISKIN and EpiDerm Assays and on the Skin Integrity Function Test, *ATLA* 35, 559-601.
- (17) Hoffmann S. (2006). ECVAM Skin Irritation Validation Study Phase II: Analysis of the Primary Endpoint MTT and the Secondary Endpoint IL1- α .
- (18) Eskes C., Cole, T., Hoffmann, S., Worth, A., Cockshott, A., Gerner, I. and Zuang, V. (2007). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Acute Skin Irritation: Selection of Test Chemicals, *ATLA* 35, 603-619.
- (19) Cotovio, J., Grandidier, M.-H., Lelièvre, D., Roguet, R., Tinois-Tessonnaud, E. and Leclaire, J. (2007). *In Vitro* Acute Skin Irritancy of

Chemicals Using the Validated EPISKIN Model in a Tiered Strategy - Results and Performances with 184 Cosmetic Ingredients, *ALTEX*, 14, 351-358.

- (20) EC EURL-ECVAM (2007). Statement on the Validity of *In Vitro* Tests for Skin Irritation, Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC26), 27 April 2007. Dostupné na internetových stránkách: https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/about-ecvam/archive-publications/publication//ESAC26_statement_SkinIrritation_20070525_C.pdf
- (21) EURL-ECVAM. (2007). Performance Standards for Applying Human Skin Models to *In Vitro* Skin Irritation Testing. *Poznámka: Jsou to původní standardy funkčnosti použité pro validaci dvou zkušebních metod. Tyto standardy funkčnosti by se již neměly používat, protože nyní je k dispozici aktualizovaná verze (8).*
- (22) EURL-ECVAM. (2008). Statement on the Scientific Validity of *In Vitro* Tests for Skin Irritation Testing, Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC29), 5 November 2008. https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/about-ecvam/archive-publications/publication/ESAC_Statement_SkinEthic-EpiDerm-FINAL-0812-01.pdf
- (23) OECD (2010). Explanatory Background Document to the OECD Draft Test Guideline on *In Vitro* Skin Irritation Testing. Environment, Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment, (No 137), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (24) Katoh, M., Hamajima, F., Ogasawara, T. and Hata K. (2009). Assessment of Human Epidermal Model LabCyte EPI-MODEL for *In Vitro* Skin Irritation Testing According to European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM)-Validated Protocol, *J Toxicol Sci*, 34, 327-334
- (25) Katoh, M. and Hata K. (2011). Refinement of LabCyte EPI-MODEL24 Skin Irritation Test Method for Adaptation to the Requirements of OECD Test Guideline 439, *AATEX*, 16, 111-122
- (26) OECD (2011). Validation Report for the Skin Irritation Test Method Using LabCyte EPI-MODEL24. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (No 159) Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (27) OECD (2011). Peer Review Report of Validation of the Skin Irritation Test Using LabCyte EPI-MODEL24. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (No 155) Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

- (28) Kojima, H., Ando, Y., Idehara, K., Katoh, M., Kosaka, T., Miyaoka, E., Shinoda, S., Suzuki, T., Yamaguchi, Y., Yoshimura, I., Yuasa, A., Watanabe, Y. and Omori, T. (2012). Validation Study of the *In Vitro* Skin Irritation Test with the LabCyte EPI-MODEL24, *Altern Lab Anim*, 40, 33-50.
- (29) Welss, T., Basketter, D.A. and Schröder, K.R. (2004). *In Vitro* Skin Irritation: Fact and Future. State of the Art Review of Mechanisms and Models, *Toxicol. In Vitro* 18, 231-243.
- (30) Eskes, C. *et al.* (2012). Regulatory Assessment of *In Vitro* Skin Corrosion and Irritation Data within the European Framework: Workshop Recommendations. *Regul.Toxicol.Pharmacol.* 62, 393-403).
- (31) Mosmann, T. (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays, *J. Immunol. Methods* 65, 55-63.
- (32) EpiSkin™ (February 2009). SOP, Version 1.8 ECVAM Skin Irritation Validation Study: Validation of the EpiSkin™ Test Method 15 min - 42 hours for the Prediction of acute Skin Irritation of Chemicals
- (33) EpiDerm™ (Revised March 2009). SOP, Version 7.0, Protocol for: *In Vitro* EpiDerm™ Skin Irritation Test (EPI-200-SIT), for Use with MatTek Corporation's Reconstructed Human Epidermal Model EpiDerm (EPI-200).
- (34) SkinEthic™ RHE (February 2009) SOP, Version 2.0, SkinEthic Skin Irritation Test-42bis Test Method for the Prediction of Acute Skin Irritation of Chemicals: 42 Minutes Application + 42 Hours Post-Incubation.
- (35) LabCyte (June 2011). EPI-MODEL24 SIT SOP, Version 8.3, Skin Irritation Test Using the Reconstructed Human Model “LabCyte EPI-MODEL24”
- (36) Alépée, N., Barroso, J., De Smedt, A., De Wever, B., Hibatallah, J., Klaric, M., Mewes, K.R., Millet, M., Pfannenbecker, U., Tailhardat, M., Templier, M., and McNamee, P. Use of HPLC/UPLC-Spectrophotometry for Detection of MTT Formazan in *In Vitro* Reconstructed Human Tissue (RhT)-Based Test Methods Employing the MTT Assay to Expand their Applicability to Strongly Coloured Test Chemicals. (Připravovaný rukopis).
- (37) US FDA (2001). Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration. May 2001. Dostupné na internetových stránkách: [<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070107.pdf>].
- (38) Harvell, J.D., Lamminstausta, K., and Maibach, H.I. (1995). Irritant Contact Dermatitis, in: Practical Contact Dermatitis, pp 7-18, (Ed. Guin J. D.). Mc Graw-Hill, New York.

- (39) EC EURL-ECVAM (2009). Performance Standards for *In Vitro* Skin Irritation Test Methods Based on Reconstructed Human Epidermis (RhE). *Poznámka: Jde o aktuální verzi standardů funkčnosti ECVAM aktualizovanou v roce 2009 s ohledem na provedení GHS OSN. Tyto standardy funkčnosti by se již neměly používat, protože nyní je k dispozici aktualizovaná verze (8) týkající se tohoto pokynu.*
- (40) EURL-ECVAM. (2009). ESAC Statement on the Performance Standards (PS) for *In Vitro* Skin Irritation Testing Using Reconstructed Human Epidermis, Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC31), 8 July 2009.
- (41) EC (2001). Směrnice Komise 2001/59/ES ze dne 6. srpna 2001, kterou se po dvacáté osmé přizpůsobuje technickému pokroku směrnice Rady 67/548/EHS o sbližování právních a správních předpisů týkajících se klasifikace, balení a označování nebezpečných látek, *Úřední věstník Evropské unie* L 225, 21.8.2001, s. 1.

Dodatek 1

DEFINICE

Přesnost: blízkost shody mezi výsledky zkušební metody a přijatými referenčními hodnotami. Je to míra funkčnosti zkušební metody a jeden z aspektů její relevantnosti. Tento pojem se často používá místo pojmu „soulad“ a rozumí se jím podíl správných výsledků zkušební metody (9).

Životaschopnost buněk: parametr měřící celkovou aktivitu buněčné populace, např. jako schopnost buněčných mitochondriálních dehydrogenáz redukovat vitální barvivo MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyl-2H-tetrazolium-bromid, thiazolylová modř), které v závislosti na naměřené sledované vlastnosti a koncepci použité zkoušky koreluje s celkovým počtem a/nebo vitalitou živých buněk.

Chemická látka: látka nebo směs.

Soulad: je měřítkem funkčnosti u zkušebních modelů, které dává kategorický výsledek a je jedním z aspektů relevantnosti. Tento pojem se někdy používá místo pojmu „přesnost“ a je definován jako podíl všech zkoušených chemických látek, které jsou správně klasifikovány jako pozitivní nebo negativní. Soulad závisí do velké míry na prevalenci pozitivních výsledků u druhů studovaných zkoušených chemických látek (9).

ET₅₀: tuto hodnotu lze odhadnout na základě určení doby expozice potřebné k tomu, aby se životaschopnost buněk snížila o 50 % po aplikaci referenční chemické látky v pevně stanovené koncentraci, viz rovněž IC₅₀.

GHS (Globálně harmonizovaný systém klasifikace a označování chemických látek podle OSN): systém navrhuje klasifikaci chemických látek (látek a směsí) podle standardizovaných typů a úrovní fyzikálních, zdravotních a environmentálních nebezpečí a zabývající se příslušnými komunikačními prvky, jako jsou piktogramy, signální slova, výroky o nebezpečí, výroky o bezpečnostních opatřeních a bezpečnostní datové listy, které obsahují informace o jejich nežádoucích účincích s ohledem na ochranu lidí (včetně zaměstnavatelů, pracovníků, přepraveců, spotřebitelů a osob reagujících na nouzové situace) a životního prostředí (1).

HPLC: vysokoúčinná kapalinová chromatografie.

IATA: integrovaný přístup ke zkoušení a posuzování.

IC₅₀: tuto hodnotu lze odhadnout na základě určení koncentrace, při níž referenční chemická látka snižuje životaschopnost tkání o 50 % (IC₅₀) po pevně stanovené době expozice, viz rovněž ET₅₀.

Nekonečná dávka: množství zkoušené chemické látky nanesené na *epidermis*, které přesahuje množství potřebné k úplnému a rovnoměrnému pokrytí povrchu *epidermis*.

Směs: směs nebo roztok složený ze dvou nebo více látek.

Jednosložková látka: látka definovaná svým kvantitativním složením, v níž je přítomna jedna hlavní složka v míře alespoň 80 % hmot.

MTT: 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyl-2H-tetrazolium-bromid, thiazolylová modř.

Vícesložková látka: látka definovaná svým kvantitativním složením, v níž je přítomna více než jedna hlavní složka v koncentraci ≥ 10 % hmot. a < 80 % hmot. Vícesložková látka je výsledkem výrobního procesu. Rozdíl mezi směsí a vícesložkovou látkou spočívá v tom, že směs se získá smísením dvou nebo více látek bez chemické reakce. Vícesložková látka je výsledkem chemické reakce.

NSC_{killed}: nespecifická barva u neživých tkání.

NSC: nespecifická barva u živých tkání.

NSMTT: nespecifická redukce MTT.

Standardy funkčnosti: standardy založené na validované zkušební metodě, které slouží jako základ pro hodnocení srovnatelnosti navrhované zkušební metody, která je mechanicky a funkčně podobná. Patří mezi ně: i) zásadní složky zkušební metody; ii) minimální seznam referenčních látek vybraných z chemických látek používaných k prokázání přijatelné funkčnosti validované zkušební metody; a iii) srovnatelné úrovně přesnosti a spolehlivosti založené na hodnotách získaných u validované referenční metody, jež by navrhovaná zkušební metoda měla prokázat při vyhodnocení za použití minimálního seznamu referenčních látek (9).

Pozitivní kontrola (PC): replika obsahující všechny složky zkušebního systému a zkoušená s chemickou látkou, o níž je známo, že způsobuje pozitivní odezvu. Aby se zajistilo, že proměnlivost v odezvě na pozitivní kontrolu v průběhu času bude možné vyhodnotit, neměl by být rozsah pozitivní odezvy nadměrný.

Relevantnost: popis vztahu zkoušky k účinku, který je předmětem zájmu, a také toho, zda je zkouška smysluplná a použitelná pro konkrétní účel. Vyjadřuje, do jaké míry zkouška správně měří nebo predikuje biologický účinek, který je předmětem zájmu. Relevantnost zahrnuje také posouzení přesnosti (shody) zkušební metody (9).

Spolehlivost: měření rozsahu, v jakém může být zkušební metoda v průběhu času reprodukovatelná v laboratořích a mezi laboratořemi, když se provádí s použitím stejného protokolu. Hodnotí se na základě výpočtu vnitrolaboratorní a mezilaboratorní reprodukovatelnosti (9).

Náhradní zkouška: zkouška, která je koncipována tak, aby nahradila běžně používanou a uznávanou zkoušku, která slouží k určení nebezpečnosti a/nebo posouzení rizika a u níž je zjištěno, že poskytuje stejnou nebo lepší úroveň ochrany zdraví lidí nebo zvířat či případně ochrany životního prostředí ve srovnání s uznávanou zkouškou ve všech možných zkušebních situacích a pro všechny zkoušené chemické látky (9).

Provedení zkoušky: jedna či více zkoušených chemických látek se zkouší souběžně s negativní kontrolou a s pozitivní kontrolou.

Citlivost: podíl všech pozitivních/aktivních zkoušených chemických látek, které jsou na základě zkoušky správně klasifikovány. Je měřítkem přesnosti zkušební metody, která poskytuje kategorické výsledky, a je důležitým prvkem při hodnocení relevantnosti zkušební metody (9).

Dráždění kůže *in vivo*: vyvolání reverzibilního poškození kůže po aplikaci zkoušené chemické látky po dobu až 4 hodin. Dráždění kůže je lokálně vznikající reakce postižené kožní tkáně, která se objevuje krátce po stimulaci (38). Je způsobena lokální zánětlivou reakcí zahrnující vlastní (nespecifický) imunitní systém kožní tkáně. Její hlavní charakteristikou je reverzibilní proces zahrnující zánětlivé reakce a většinu klinických charakteristických příznaků dráždění (erytém, edém, svědění a bolest) v souvislosti se zánětlivým procesem.

Specifičnost: podíl všech negativních/neaktivních zkoušených látek, které jsou na základě zkoušky správně klasifikovány. Je měřítkem přesnosti zkušební metody, která poskytuje kategorické výsledky, a je důležitým prvkem při hodnocení relevantnosti zkušební metody (9).

Látka: chemický prvek a jeho sloučeniny v přírodním stavu nebo získané výrobním postupem, včetně jakýchkoliv aditiv potřebných pro zachování jeho stability a všech nečistot pocházejících z použitého postupu, ale s vyloučením všech rozpouštědel, která je možno oddělit bez ovlivnění stability dané látky nebo změny jejího složení.

Zkoušená chemická látka: jakákoli látka nebo směs zkoušená touto zkušební metodou.

UPLC: ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie.

UVCB: látky s neznámým nebo proměnlivým složením, komplexní reakční produkty nebo biologický materiál.

Dodatek 2

ZKUŠEBNÍ MODELY ZAHRNUTÉ DO TÉTO ZKUŠEBNÍ METODY

Č.	Název zkušebního modelu	Druh validační studie	Odkazy
1	EpiSkin™	Úplná prospektivní validační studie (2003–2007). Složky tohoto modelu byly použity na definování základních složek zkušební metody původních a aktualizovaných standardů funkčnosti ECVAM (39) (40) (21)*. Kromě toho tvořily údaje z této metody týkající se určení neklasifikovaných a klasifikovaných látek hlavní východisko pro definování hodnot specifčnosti a citlivosti původních standardů funkčnosti*.	(2) (10) (11) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20) (21) (23) (32) (39) (40)
2	EpiDerm™ SIT (EPI-200)	EpiDerm™ (<i>original</i>): Původně prošel tento zkušební model úplnou prospektivní validací společně s č. 1 z let 2003–2007. Složky tohoto modelu byly použity na definování základních složek zkušebních metod původních a aktualizovaných standardů funkčnosti ECVAM (39) (40) (21)*. EpiDerm™ SIT (EPI-200) : Modifikace původního modelu EpiDerm™ byla validována v roce 2008 s použitím původních standardů funkčnosti ECVAM (21)*	(2) ((10) (12) (13) (15) (16) (17) (18) (20) (21) (23) (33) (39) (40) (2) (21) (22) (23) (33)
3	SkinEthic™ RHE	Validační studie vycházející z původních standardů funkčnosti ECVAM (21) v roce 2008*.	(2) (21) (22) (23) (31)
4	LabCyte EPI-MODEL24 SIT	Validační studie (2011–2012) vycházející ze standardů funkčnosti podle Pokynu OECD pro zkoušení č. 439 (8), které jsou založeny na aktualizovaných standardech funkčnosti ECVAM* (39) (40).	(24) (25) (26) (27) (28) (35) (39) (40) a standardy funkčnosti tohoto pokynu pro zkoušení (8)*

*) Původní standardy funkčnosti ECVAM (21) byly vypracovány v roce 2007 po dokončení prospektivní validační studie (16), která hodnotila funkčnost zkušebních modelů č. 1 a 2 podle klasifikačního systému popsaného v 28. změně směrnice EU o nebezpečných látkách (41). V roce 2008 byly zavedeny globálně harmonizovaný systém klasifikace a označování chemických látek (GHS OSN) (1) a nařízení CLP, které ve skutečnosti posunuly mezní hodnotu pro rozlišování neklasifikovaných látek od klasifikovaných ze skóre *in vivo* 2,0 na 2,3. Za účelem přizpůsobení se tomuto změněnému regulačnímu požadavku byly v roce 2009 aktualizovány hodnoty přesnosti a seznam referenčních chemických látek podle standardů funkčnosti ECVAM (2) (39) (40). Stejně jako původní standardy funkčnosti také aktualizované standardy funkčnosti vycházely do značné míry z údajů z modelů č. 1 a 2 (16), ale kromě toho používaly také údaje o referenčních chemických látkách z modelu č. 3. V roce 2010 byly použity aktualizované standardy funkčnosti ECVAM pro stanovení standardů funkčnosti týkajících se tohoto pokynu pro zkoušení (8). Pro účely této zkušební metody se model EpiSkin™ považuje za validovanou referenční metodu, a to vzhledem ke skutečnosti, že byl použit na

vypracování všech kritérií standardů funkčnosti. Podrobné informace o validačních studiích, sbírku vytvořených údajů, jakož i obecné informace o potřebných úpravách standardů funkčnosti v důsledku používání systému GHS OSN/CLP lze najít ve vysvětlujícím podkladovém dokumentu ECVAM/BfR k odpovídajícímu Pokynu OECD pro zkoušení č. 439 (23).

SIT: Zkouška dráždivosti pro kůži

RHE: Rekonstruovaná lidská epidermis

Dodatek 3

PARAMETRY PROTOKOLU SPECIFICKÉ PRO JEDNOTLIVÉ ZKUŠEBNÍ MODELY ZAHRNUTÉ DO TÉTO ZKUŠEBNÍ METODY

Modely RhE mají velmi podobné protokoly a všechny tyto protokoly používají zejména dobu po inkubaci 42 hodin (32) (33) (34) (35). Odchytky se týkají hlavně tří parametrů souvisejících s různými bariérovými funkcemi zkušebních modelů, které jsou zde uvedeny: A) doba a objem před inkubací, B) aplikace zkoušených chemických látek a C) objem po inkubaci.

	EpiSkin™ (SM)	EpiDerm™ SIT (EPI-200)	SkinEthic RHE™	LabCyte EPI-MODEL24 SIT
A) Předběžná inkubace				
Inkubační doba	18–24 hodiny	18–24 hodiny	< 2 hodiny	15–30 hodin
Střední objem	2 ml	0,9 ml	0,3 nebo 1 ml	0,5 ml
B) Aplikace zkoušené chemické látky				
Na kapaliny	10 µl (26 µl/cm²)	30 µl (47 µl/cm²)	16 µl (32 µl/cm²)	25 µl (83 µl/cm²)
Na pevné látky	10 mg (26 mg/cm²) + DW (5 µl)	25 mg (39 mg/cm²) + DPBS (25 µl)	16 mg (32 mg/cm²) + DW (10 µl)	25 mg (83 mg/cm²) + DW (25 µl)
Použití nylonové sítě	Nepoužito	Pokud je třeba	Použito	Nepoužito
Celková doba aplikace	15 minut	60 minut	42 minut	15 minut
Teplota aplikace	RT	a) 25 minut při pokojové teplotě a) 35 minut při 37 °C	RT	RT
C) Objem po inkubaci				
Střední objem	2 ml	0,9 ml x 2	2 ml	1 ml
D) Maximální přípustná variabilita				
Směrodatná odchylka mezi tkáňovými replikáty	SD≤18	SD≤18	SD≤18	SD≤18

RT: pokojová teplota

DW: destilovaná voda

DPBS: Dulbeccův fyziologický roztok ve fosfátovém pufru

Dodatek 4

KLÍČOVÉ PARAMETRY A KRITÉRIA PŘIJATELNOSTI PRO ZPŮSOBILOST SPEKTROFOTOMETRICKÉHO SYSTÉMU HPLC/UPLC PRO MĚŘENÍ FORMAZANU MTT EXTRAHOVANÉHO Z REKONSTRUOVANÉ LIDSKÉ EPIDERMIS

Parametr	Protokol vycházející z pokynu FDA (36)(37)	Kritéria přijatelnosti
Selektivita	Analýza isopropylalkoholu, slepý pokus s živou tkání (isopropylalkoholový extrakt z živých tkání RhE bez jakékoli expozice), slepý pokus s neživou tkání (isopropylalkoholový extrakt z neživých tkání RhE bez jakékoli expozice)	$\text{plocha}_{\text{interference}} \leq 20 \% \text{ plochy}_{\text{LLOQ}}^1$
Přesnost	Kontroly kvality (tj. formazan MTT při 1,6 µg/ml, 16 µg/ml a 160 µg/ml) v isopropylalkoholu (n = 5)	$\text{CV} \leq 15 \% \text{ nebo } \leq 20 \% \text{ pro LLOQ}$
Přesnost	Kontroly kvality v isopropylalkoholu (n = 5)	$\% \text{Dev} \leq 15 \% \text{ nebo } \leq 20 \% \text{ pro LLOQ}$
Vlivy matrice	Kontroly kvality ve slepém pokusu s živou tkání (n = 5)	$85 \% \leq \% \text{ vlivu matrice} \leq 115 \%$
Únik	Analýza isopropylalkoholu podle standardu ULOQ ²	$\text{plocha}_{\text{interference}} \leq 20 \% \text{ plochy}_{\text{LLOQ}}$
Reprodukovatelnost (v rámci dne)	3 nezávislé kalibrační křivky (vycházející z 6 postupných třetinových ředění formazanu MTT v isopropylalkoholu s počátkem při ULOQ, tj. 200 µg/ml); Kontroly kvality v isopropylalkoholu (n = 5)	Kalibrační křivky: $\% \text{Dev} \leq 15 \% \text{ nebo } \leq 20 \% \text{ pro LLOQ}$ Kontroly kvality: $\% \text{Dev} \leq 15 \% \text{ a } \text{CV} \leq 15 \%$
Reprodukovatelnost (mezi dny)	1. den 1 kalibrační křivka a kontroly kvality v isopropylalkoholu (n = 3) 2. den 1 kalibrační křivka a kontroly kvality v isopropylalkoholu (n = 3) 3. den 1 kalibrační křivka a kontroly kvality v isopropylalkoholu (n = 3)	
Krátkodobá stabilita formazanu MTT v tkáňovém extraktu RhE	Kontroly kvality ve slepém pokusu s živou tkání (n = 3) analyzované v den přípravy a po 24 hodinách uložení při pokojové teplotě	$\% \text{Dev} \leq 15 \%$
Dlouhodobá stabilita formazanu MTT v tkáňovém extraktu RhE, v případě potřeby	Kontroly kvality ve slepém pokusu s živou tkání (n = 3) analyzované v den přípravy a po několika dnech uložení při stanovené teplotě (např. 4 °C, –20 °C, –80 °C)	$\% \text{Dev} \leq 15 \%$

¹LLOQ: dolní mez stanovitelnosti definovaná tak, aby postihla 1–2% tkáňovou životaschopnost, tj. 0,8 µg/ml.

²ULOQ: horní mez stanovitelnosti definovaná tak, aby byla alespoň dvakrát vyšší než nejvyšší očekávaná koncentrace formazanu MTT v isopropylalkoholových extraktech z negativních kontrol, tj. 200 µg/ml.“

(8) V části B se doplňují tyto kapitoly:

„B.63 SCREENINGOVÁ ZKOUŠKA NA REPRODUKČNÍ/VÝVOJOVOU TOXICITU

ÚVOD

1. Tato zkušební metoda je rovnocenná Pokynu OECD pro zkoušení (TG) č. 421 (2016). Pokyny OECD pro zkoušení chemických látek se pravidelně přezkoumávají s ohledem na vědecký pokrok. Pokyn č. 421 k původní screeningové zkoušce byl přijat v roce 1995 na základě protokolu pro „Předběžnou screeningovou zkoušku na reprodukční toxicitu“ projednaného na dvou zasedáních odborníků, a to v Londýně v roce 1990 (1) a v Tokiu v roce 1992 (2).
2. Tato zkušební metoda byla aktualizována o příslušné sledované vlastnosti pro endokrinní disruptory v návaznosti na činnost s vysokou prioritou, kterou organizace OECD zahájila v roce 1998 a která byla zaměřena na revizi stávajících pokynů ke zkoušení a vypracování nových pokynů pro zjišťování a zkoušení látek, které mohou narušovat činnost endokrinních žláz (3). Například do Pokynu OECD pro zkoušení č. 407 (Studie orální toxicity u hlodavců – 28denní opakovaná aplikace, kapitola B.7 této přílohy) byly v roce 2008 doplněny parametry vhodné k detekci endokrinního působení zkoušených chemických látek. Cílem aktualizace pokynu č. 421 bylo zahrnout do pokynu ke screeningové zkoušce některé relevantní sledované vlastnosti týkající se endokrinních disruptorů, pokud doby expozice zahrnují některá citlivá období v průběhu vývoje (prenatální nebo časně postnatální období).
3. Na základě studie proveditelnosti řešící vědecké a technické otázky spojené se zahrnutím relevantních sledovaných vlastností, jakož i možných úprav plánu zkoušky potřebných pro jejich zahrnutí (4) byly do pokynu č. 421 přidány vybrané další relevantní sledované vlastnosti související s endokrinními disruptory, které jsou rovněž součástí pokynu pro zkoušení č. 443 (Rozšířená jednogenerační studie toxicity pro reprodukci, kapitola B.56 této přílohy).
4. Tato zkušební metoda je určena pro získání omezeného množství informací týkajících se účinků zkoušené chemické látky na reprodukční výkonnost samců a samic, jako jsou funkce pohlavních žláz, chování při páření, početí, vývoj zárodku a vrh. Není alternativou pro stávající zkušební metody B.31, B.34, B.35 nebo B.56 a ani je nahrazuje.

VÝCHOZÍ ÚVAHY

5. Tuto screeningovou zkušební metodu lze použít na získání prvních informací o možných účincích na reprodukci anebo vývoj, a to v rané fázi posuzování toxikologických vlastností

chemických látek, nebo informací o chemických látkách, které jsou předmětem zájmu. Rovněž může být použita jako součást sady úvodních screeningových zkoušek u stávajících chemických látek, o nichž nejsou k dispozici žádné nebo jen omezené toxikologické informace, jako studie ke stanovení dávkování pro rozsáhlejší reprodukční/vývojové studie, nebo když je to jinak považováno za relevantní. Při realizaci studie by měly být respektovány hlavní zásady a aspekty stanovené v pokynu OECD č. 19 o uznávání, posuzování a používání klinických příznaků jako humánních sledovaných vlastností pro pokusná zvířata používaná při hodnocení bezpečnosti (5).

6. Tato zkušební metoda neposkytuje úplné informace o všech aspektech reprodukce a vývoje. Konkrétně nabízí jen omezené prostředky zjištění postnatálních projevů prenatální expozice nebo účinků, které mohou být vyvolány v průběhu postnatální expozice. Vzhledem (mimo jiné) k relativně malému počtu zvířat ve skupinách dávkování, selektivitě sledovaných vlastností a krátké době trvání studie neposkytuje tato metoda důkaz pro definitivní tvrzení, že nedochází k žádným účinkům. Navíc, pokud neexistují údaje z jiných zkoušek reprodukční/vývojové toxicity, jsou pozitivní výsledky užitečné pro první posouzení rizika a přispívají k rozhodnutím ohledně nezbytnosti a načasování dalších zkoušek.
7. Výsledky získané pro parametry související s endokrinním působením by se měly interpretovat v kontextu „konceptního rámce OECD pro zkoušky a hodnocení chemických látek způsobujících endokrinní poruchy“ (6). V tomto konceptním rámci je vylepšený Pokdyn OECD pro zkoušení č. 421 zařazena na úroveň 4 jako zkouška *in vivo* poskytující údaje o nežádoucích účincích na relevantní endokrinní sledované vlastnosti. Endokrinní signál sám o sobě však nemusí být považován za dostatečný důkaz, že zkoušená chemická látka je endokrinním disruptorem.
8. Tato zkušební metoda předpokládá orální aplikaci zkoušené chemické látky. Pokud jsou použity jiné cesty expozice, bude zřejmě nutné provést úpravy.
9. Před použitím této zkušební metody ke zkoušení směsi s cílem získat údaje pro zamýšlený regulační účel by mělo být zváženo, zda tato metoda může pro tento účel poskytnout odpovídající výsledky, a pokud ano, proč tomu tak je. Takové úvahy nejsou nutné, pokud existuje právní požadavek na zkoušení dané směsi.
10. Použité definice jsou uvedeny v dodatku 1.

PRINCIP ZKOUŠKY

11. Zkoušená chemická látka se podává v odstupňovaných dávkách několika skupinám samců a samic. Samcům se podává dávka minimálně čtyři týdny včetně dne před plánovaným usmrcením (zahrnuje to minimálně dva týdny před pářením, v průběhu období páření a přibližně dva týdny po páření). Vzhledem k omezené době podávání před pářením u samců

nemusí být fertilita zvláště citlivým ukazatelem toxicity pro varlata. Proto je velmi důležité provést podrobné histologické vyšetření varlat. Kombinace dvoutýdenní doby podávání před pářením a následné pozorování páření/fertility s celkovou dobou podávání alespoň čtyři týdny, po níž následuje podrobná histopatologie samčích gonád, se považuje za dostatečnou ke zjištění většiny účinků na fertilitu a spermatogenezi u samců.

12. Samicím je třeba podávat zkoušenou chemickou látku po celou dobu studie. Zahrnuje to dva týdny před pářením (s cílem pokrýt alespoň dva celé estrální cykly), variabilní dobu do početí, dobu březosti a alespoň třináct dnů po porodu, a to včetně dne před plánovaným usmrcením.
13. Délka studie následující po aklimatizaci a zhodnocení estrálního cyklu před zahájením podávání závisí na výkonnosti samice a činí přibližně 63 dnů [alespoň 14 dnů před pářením, (maximálně) 14 dnů páření, 22 dnů gestace, 13 dnů laktace].
14. V průběhu období podávání se zvířata každý den pečlivě pozorují, aby se zjistily příznaky toxicity. Zvířata, která v průběhu doby zkoušky uhynula nebo byla utracena, se pitvají a na konci zkoušky se přeživší zvířata utratí a rovněž pitvají.

POPIS METODY

Výběr zvířecích druhů

15. Tato zkušební metoda je určena k použití s potkany. Jestliže se parametry uvedené v této zkušební metodě zkoumají u jiných druhů hlodavců, mělo by se podat podrobné zdůvodnění. V mezinárodním validačním programu detekce endokrinních disruptorů pomocí Pokynu OECD pro zkoušení č. 407 (odpovídající kapitole B.7 této přílohy) byl jediným použitým druhem potkan. Není vhodné používat kmeny s nižší plodností nebo s typicky vysokým výskytem vývojových vad. Používají se zdravá, dosud nepřípuštěná zvířata ještě nepoužitá pro jiné experimenty. Pokusná zvířata by měla být plně charakterizována co do druhu, kmene, pohlaví, hmotnosti a věku. Na začátku studie by měly být odchylky hmotnosti zvířat minimální a neměly by překročit 20 % střední hodnoty pro každé pohlaví. Provádí-li se studie jako předběžná studie pro dlouhodobou nebo celogenerační studii, je vhodné použít v obou studiích nejlépe zvířata stejného kmene a stejného původu.

Umístění a krmení zvířat

16. Všechny postupy by měly splňovat místní standardy péče o laboratorní zvířata. Teplota v experimentálních zvířecích místnostech by měla být 22° C ($\pm$ 3°C). Ačkoli by relativní vlhkost vzduchu měla být minimálně 30 % a pokud možno nepřesáhnout 70 %, kromě doby úklidu místnosti, cílem by měla být hodnota 50–60 %. Osvětlení by mělo být umělé a mělo by se střídát 12 hodin světla a 12 hodin tmy. Ke krmení lze použít konvenční laboratorní krmivo s neomezeným přísunem pitné vody. Výběr potravy může být ovlivněn

potřebou zajistit dostatečné promísení s testovanou látkou, je-li látka podávána touto cestou.

17. Zvířata by měla být chována v malých skupinách stejného pohlaví; je-li to z vědeckého hlediska důvodné, mohou být zvířata chována individuálně. Při chovu zvířat v klecích by v jedné kleci nemělo být umístěno více než pět zvířat. Páření by mělo probíhat v klecích, které jsou k tomuto účelu vhodné. Březí samice je třeba chovat v klecích jednotlivě a poskytnout jim materiál pro vytvoření hnízda. Samice v době laktace se chovají v klecích jednotlivě společně s potomky.
18. Krmivo by se mělo pravidelně analyzovat, aby se zjistila přítomnost kontaminantů. Vzorek stravy by se měl uchovávat až do dokončení zprávy.

Příprava zvířat

19. Zdravá mladá dospělá zvířata se náhodným výběrem rozdělí na kontrolní skupinu a skupinu, která se exponuje. Klece by měly být uspořádány tak, aby byl vliv umístění klecí minimalizován. Zvířata se jednoznačně identifikují a před započítáním studie se nechají v laboratorních podmínkách alespoň pět dní aklimatizovat.

Příprava dávek

20. Není-li jiný způsob aplikace považován za vhodnější, doporučuje se orální podávání zkoušené chemické látky. Pokud je zvolena orální cesta, zkoušená chemická látka se obvykle podává žaludeční sondou; alternativně však lze zkoušené chemické látky podávat v potravě nebo v pitné vodě.
21. Je-li to nutné, je zkoušená chemická látka rozpuštěna nebo suspendována ve vhodném vehikulu. Je-li to možné, doporučuje se zvážit jako první variantu použití vodného roztoku/suspenze, poté použití roztoku/emulze v oleji (např. v kukuřičném oleji) a nakonec eventuální použití roztoku jiného vehikula. U jiného typu vehikula, než je voda, je třeba znát jeho toxické charakteristiky. Měla by být určena stabilita a homogenita zkoušené chemické látky v daném vehikulu.

POSTUP

Počet a pohlaví zvířat

22. Doporučuje se, aby každá skupina měla zpočátku alespoň 10 samců a 12–13 samic. U samic se hodnotí před expozicí estrální cykly a zvířata, která nevykazují typické 4–5denní cykly, nebudou do studie zařazena; proto se doporučují náhradní samice, aby v každé skupině zůstalo 10 samic. S výjimkou případu výrazně toxických účinků se očekává, že v každé skupině bude alespoň 8 březích samic, což je obvykle minimální přijatelný počet březích samic na skupinu. Cílem je získat dostatečný počet březích samic a potomstva, a tím zajistit smysluplné hodnocení schopnosti zkoušené chemické látky ovlivnit plodnost,

březost, chování samice a kojených mláďat a růst a vývoj potomstva generace F₁ od doby početí do 13. dne po porodu.

Dávkování

23. Obecně by měly být použity nejméně tři zkušební skupiny a kontrolní skupina. Úrovně dávek mohou vycházet z údajů ze zkoušek akutní toxicity nebo z výsledků studií po opakované dávce. S výjimkou podávání zkoušené chemické látky se se zvířaty v kontrolní skupině zachází stejně jako se zvířaty ve zkušební skupině. Používá-li se pro usnadnění aplikace zkoušené chemické látky vehikulum, podává se kontrolní skupině vehikulum v nejvyšším použitém objemu.
24. Při výběru úrovní dávek by se měly vzít v úvahu veškeré existující údaje o toxických a (toxiko)kinetických vlastnostech. Rovněž je třeba vzít v úvahu, že mohou existovat rozdíly v citlivosti mezi březími a nebřezími zvířaty. Nejvyšší úroveň dávky by se měla zvolit tak, aby vyvolala toxické účinky, ne však uhynutí nebo velké utrpení. Poté by se měla zvolit sestupná řada úrovní dávek, aby se prokázala odezva související s dávkou a nepřítomnost nepříznivých účinků (NOAEL) při nejnižší úrovni dávky. Pro nastavení sestupných úrovní dávek jsou obvykle optimální intervaly lišící se faktorem 2 až 4 a často je vhodnější přidání čtvrté zkušební skupiny než používání velkých intervalů mezi jednotlivými dávkami (např. lišících se faktorem vyšším než 10).
25. V přítomnosti pozorované obecné toxicity (např. snížená tělesná hmotnost, účinky na játra, srdce, plíce nebo ledviny atd.) nebo jiných změn, které nemusí být odezvou na toxicitu (např. snížený příjem krmiva, zvětšení jater), je třeba pozorované účinky na endokrinní citlivé sledované vlastnosti interpretovat obezřetně.

Limitní zkouška

26. Pokud orální studie s jednou úrovní dávky v množství alespoň 1 000 mg/kg tělesné hmotnosti a den nebo rovnocenné procento látky v potravě nebo pitné vodě při aplikaci dávky v potravě nebo pitné vodě pomocí postupů popsanych pro tuto studii nevyvolá žádnou zjištěnou toxicitu, a pokud se neočekává ani toxicita na základě existujících údajů o strukturně příbuzných látkách, pak není nutné uvažovat o kompletní studii využívající několika úrovní dávek. Limitní zkouška se použije, pokud expozice u člověka nevyžaduje použít vyšší úroveň orální dávky. U dalších způsobů podávání látky, jako je inhalační nebo kožní aplikace, může být maximální dosažitelná úroveň koncentrace často dána fyzikálně-chemickými vlastnostmi zkoušených chemických látek.

Podávání dávek

27. Zvířatům se denně podává zkoušená chemická látka po dobu sedmi dnů v rámci jednoho týdne. Pokud se zkoušená chemická látka podává nitrožaludečně, podává se zvířatům v jediné dávce za použití žaludeční sondy nebo vhodné intubační kanyly. Maximální objem

tekutiny, kterou lze podat najednou, závisí na velikosti pokusného zvířete. Tento objem by neměl překročit 1 ml na 100 g tělesné hmotnosti, s výjimkou vodných roztoků, kde lze použít 2 ml na 100 g tělesné hmotnosti. S výjimkou dráždivých a žíravých zkoušených chemických látek, které obvykle při vyšších koncentracích vykazují zesílené účinky, by měla být variabilita zkušebního objemu minimalizována nastavením koncentrace zajišťující konstantní objem při všech úrovních dávky.

28. U zkoušených chemických látek podávaných v potravě nebo v pitné vodě je důležité zajistit, aby množství použité zkoušené chemické látky neovlivňovalo normální výživu nebo vodní rovnováhu. Podává-li se zkoušená chemická látka v krmivu, může se použít buď konstantní koncentrace (v ppm), nebo konstantní dávkování vzhledem k tělesné hmotnosti zvířete; použitá možnost by měla být specifikována. Zkoušená chemická látka podávaná žaludeční sondou se podává každý den přibližně ve stejnou dobu a alespoň jednou týdně se přizpůsobí tak, aby se udržela konstantní úroveň dávky vzhledem k tělesné hmotnosti zvířete.

Harmonogram zkoušky

29. Podávání oběma pohlavím by mělo být zahájeno alespoň 2 týdny před pářením po minimálně pětidenní aklimatizaci a po screeningu samic, zda mají normální estrální cykly (v dvoutýdenním období před expozicí). Studii je třeba naplánovat tak, aby hodnocení estrálních cyklů začalo brzy poté, co zvířata dosáhnou plné pohlavní zralosti. U různých kmenů potkana v různých laboratořích se to může mírně lišit, např. potkan Sprague Dawley stárí 10 týdnů, potkan Wistar stárí přibližně 12 týdnů. Samice s potomstvem by měly být utráceny 13. den po porodu nebo krátce poté. Den porodu (tj. ten, kdy je dokončen vrh) je definován jako 0. den po porodu. Samice, které nevykazují žádné známky kopulace, se utratí 24–26 dnů po posledním dni období páření. S dávkováním se u obou pohlaví pokračuje i během období páření. U samců se dále pokračuje s podáváním zkoušené chemické látky i po období páření alespoň do doby, kdy je dokončeno minimální období podávání 28 dnů. Poté se utratí, nebo se případně uchovají a dále je jim podávána zkoušená chemická látka pro případné provedení druhého páření, je-li to považováno za vhodné.
30. V denním podávání samicím rodičovské generace by se poté mělo pokračovat po celou březost a alespoň do 13. dne po porodu včetně nebo do dne před utrácením. U studií, kde je zkoušená chemická látka podávána inhalací nebo dermální cestou, je třeba s dávkováním pokračovat alespoň do 19. dne gestace včetně, přičemž dávkování se obnoví co možná nejdříve, nejpozději však v PND 4.
31. Diagram časového sledu zkoušky je uveden v dodatku 2.

Páření

32. Obvykle se v této studii používá párování 1:1 (jeden samec a jedna samice). V případě náhodného úmrtí samců mohou nastat výjimky. Samice se umístí se stejným samcem až do doby, kdy budou pozorovány důkazy o spáření, nebo do uplynutí dvou týdnů. Každé ráno se samice vyšetří na přítomnost spermatu nebo vaginální zátky. Den 0 březosti je definován jako den, kdy je potvrzen důkaz o spáření (je nalezena vaginální zátky nebo sperma). V případě, že je páření neúspěšné, se zváží spáření se samci s osvědčenou plodností ze stejné skupiny.

Velikost vrhu

33. Čtvrtý den po vrhu se velikost všech vrhů upraví náhodným vyřazením nadbytečných jedinců tak, aby bylo pokud možno dosaženo počtu čtyř až pěti samců a čtyř až pěti samic z jednoho vrhu podle obvyklé početnosti vrhu u použitého kmene potkana. Od dvou nadbytečných mláďat se odeberou krevní vzorky, smíchají se a použijí pro stanovení sérových hladin T4. Selektivní eliminace jedinců, např. na základě tělesné hmotnosti nebo anogenitální vzdálenosti (AGD), není vhodná. Pokud počet mladých samců nebo samic neumožňuje ponechat čtyři až pět od každého pohlaví a vrhu, je možná částečná úprava (např. ponechat šest samců a čtyři samice). Jestliže velikost vrhu poklesne pod cílový počet pro utracení (8 nebo 10 mláďat/vrh), nevyřazují se žádná mláďata. Jestliže zbývá pouze jedno mládě nad cílový počet pro utracení, vyřadí se pouze jedno mládě, které se použije pro odběr krve pro případné vyšetření sérové hladiny T4.
34. Jestliže se velikost vrhu neupravuje, 4. den po porodu se utratí dvě mláďata na vrh a odeberou se krevní vzorky pro stanovení sérové koncentrace hormonů štítné žlázy. Těmito dvěma mláďaty na vrh by měly být pokud možno samice, aby se uchovali samci pro hodnocení retenčních mléčných cyst, s výjimkou případu, že by po odstranění těchto mláďat nezbyly žádné samice pro vyšetření při ukončení zkoušky. Jestliže velikost vrhu poklesne pod 8 nebo 10 mláďat/vrh (podle normální velikosti vrhu u použitého kmene potkana), nevyřazují se žádná mláďata. Jestliže zbývá pouze jedno mládě nad normální velikost vrhu, vyřadí se pouze jedno mládě, které se použije pro odběr krve pro případné vyšetření sérové hladiny T4.

Pozorování živých zvířat

Poznámky z klinického pozorování

35. Po celou dobu zkoušky by se mělo provádět všeobecné klinické pozorování nejméně jednou denně a častěji, pokud jsou pozorovány příznaky toxicity. Pozorování se provádí denně, pokud možno ve stejnou dobu a s přihlédnutím k době očekávaného maxima účinku po podání látky. Zaznamenávají se významné změny chování, příznaky ztíženého nebo prodlouženého vrhu a všechny příznaky toxicity, včetně mortality. Tyto záznamy by měly zahrnovat čas nástupu, stupeň a délku trvání známek toxicity.

Tělesná hmotnost a spotřeba potravy a vody

36. Samci a samice se váží první den podávání, poté týdně a při ukončení zkoušky. V průběhu březosti se samice zváží 0., 7., 14. a 20. den a do 24 hodin po vrhu (0. den nebo 1. den po porodu) a alespoň 4. den a 13. den po porodu. Tato pozorování se zaznamenají individuálně u každého dospělého zvířete.
37. Před obdobím páření a během březosti a laktace se alespoň jednou týdně měří příjem potravy. Měření příjmu potravy v průběhu páření je volitelné. Pokud se zkoušená chemická látka podává v pitné vodě, měří se v průběhu těchto období také spotřeba vody.

Estrální cykly

38. Estrální cykly je třeba sledovat před zahájením expozice, aby bylo možné vybrat pro studii samice s pravidelným cyklem (viz odstavec 22). Od začátku období expozice až do průkazu o páření je třeba také každý den sledovat vaginální stěry. V případě obav z účinků akutního stresu, které by při zahájení podávání zkoušené chemické látky mohly změnit estrální cykly, mohou laboratoře exponovat pokusná zvířata po dobu dvou týdnů, poté denně odebírat vaginální stěry za účelem sledování estrálního cyklu po dobu minimálně dvou týdnů před obdobím páření a dále je sledovat až do období páření, dokud prokazatelně nedojde k páření. Při získávání vaginálních/cervikálních buněk je třeba dávat pozor, aby se neporušila sliznice, což by mohlo vyvolat stav falešné březosti (7) (8).

Parametry potomstva

39. Doba gestace se zaznamená a počítá se ode dne 0 březosti. Každý vrh se co nejdříve po porodu vyšetří a stanoví se počty a pohlaví mláďat, počet mrtvčů a živě narozených mláďat, počet zakrslých mláďat (mláďat, která jsou výrazně menší než odpovídající kontrolní mláďata) a přítomnost nápadných abnormalit.
40. Do 24 hodin po porodu (0. den nebo 1. den po porodu) a alespoň 4. den a 13. den po porodu se živá mláďata spočítají, stanoví se jejich pohlaví a zváží se. Kromě pozorování popsanych v odstavci 35 je třeba zaznamenat jakékoli abnormální chování potomstva.
41. U každého mláděte je třeba ve stejný den po porodu v době od PND 0 do PND 4 změřit anogenitální vzdálenost (AGD). V den měření AGD by měla být zjištěna tělesná hmotnost mláděte a AGD by měla být normalizována na nějakou míru velikosti mláďat, nejlépe třetí odmocninu tělesné hmotnosti (9). Podle doporučení pokynu OECD č. 151 se v PND 12 nebo 13 spočítá počet bradavek/prsních dvorců u mladých samců (10).

Biochemické vyšetření

42. Krevní vzorky z určeného místa se odebírají podle tohoto rozvrhu:
- od alespoň dvou mláďat na vrh 4. den po porodu, pokud to umožňuje počet mláďat (viz odstavce 33-34)
 - od všech samic a alespoň dvou mláďat na vrh při ukončení zkoušky 13. den a

- od všech dospělých samců při ukončení zkoušky.

Všechny krevní vzorky se uchovávají za vhodných podmínek. Krevní vzorky odebrané mláďatům 13. den a dospělým samcům se vyšetří na sérové hladiny hormonů štítné žlázy (T4). Ve vhodných případech se provede další vyšetření T4 v krevních vzorcích odebraných samicím a mláďatům 4. den. Je-li to vhodné, mohou být volitelně stanoveny také hladiny jiných hormonů: Krev mláďat z vrhu lze pro potřeby analýzy hormonů štítné žlázy smíchat. Hormony štítné žlázy (T4 a TSH) se měří nejlépe jako „celkové“.

43. Následující faktory mohou ovlivnit variabilitu a absolutní koncentrace stanovovaných hormonů:

- doba utracení vzhledem k diurnálním odchylkám v koncentracích hormonů,
- způsob utracení – mělo by se zabránit zbytečnému stresu zvířat, který může ovlivnit koncentrace hormonů,
- testovací soupravy pro stanovení hormonů, jejichž standardní křivky se mohou lišit.

44. Vzorky plazmy určené speciálně k stanovení hormonů by se měly odebírat zhruba ve stejnou denní dobu. Číselné hodnoty získané při analýze koncentrací hormonů se u různých komerčních testovacích souprav liší.

Patologie

Celková pitva

45. Dospělá zvířata se v okamžiku usmrcení nebo úhynu během studie makroskopicky vyšetří na abnormality nebo patologické změny. Speciální pozornost je třeba věnovat orgánům rozmnožovací soustavy. Zaznamená se počet implantací. Ráno v den pitvy se vyšetří vaginální stěry s cílem určit stadium estrálního cyklu a umožnit korelaci s histopatologickým vyšetřením vaječníků.

46. Varlata, nadvarlata a prostata a semenné vajíčky s Cowperovými žlázami jako celek se u všech dospělých samců podle potřeby zbaví všech přirostlých tkání a co nejdříve po pitvě se ve vlhkém stavu zváží, aby nedošlo k vyschnutí. Kromě toho mohou být volitelně zváženy další orgány, jako jsou svaly m. levator ani a m. bulbocavernosus, Cowperovy žlázy a žalud penisu u samců a párové vaječníky (vlhká hmotnost) a děloha (včetně děložního hrdla) u samic; je-li toto vážení prováděno, mělo by k němu dojít co nejdříve po pitvě.

47. Mrtvá mláďata a mláďata utracená 13. den po porodu nebo krátce poté je třeba alespoň pečlivě externě vyšetřit na závažné abnormality. Zvláštní pozornost je třeba věnovat vnějším rozmnožovacím orgánům, které se vyšetří na přítomnost známek změněného vývoje. 13. den se uchová štítná žláza od 1 mladého samce a 1 mladé samice z každého vrhu.

48. Vaječníky a varlata, přídatné pohlavní orgány (děloha a děložní hrdlo, nadvarlata, prostata, semenné vaky s Cowperovými žlázami), štítná žláza a všechny orgány od všech dospělých zvířat vykazující makroskopické léze se uchovávají. Pro rutinní vyšetření varlat a nadvarlat se nedoporučuje fixace ve formalínu. Přípustnou metodou pro tyto tkáně je použití Bouinova fixačního roztoku nebo modifikovaného Davidsonova fixačního roztoku (11). Tunica albuginea se může jemně a mělce propíchnout jehlou na obou koncích orgánu, aby se umožnilo rychlé proniknutí fixativa.

Histopatologie

49. Podrobné histologické vyšetření je třeba provést u vaječníků, varlat a nadvarlat (se zvláštním důrazem na stadia spermatogeneze a histopatologii struktury intersticiálních buněk varlat) zvířat ve skupině s nejvyšší dávkou a v kontrolní skupině. V případě potřeby mohou být vyšetřeny i další uchované orgány včetně štítné žlázy od mláďat a dospělých zvířat. Hmotnost štítné žlázy lze stanovit po fixaci. Odříznutí by se mělo rovněž provádět velmi opatrně a teprve po fixaci, aby se zamezilo poškození tkáně. Poškození tkáně by mohlo narušit histopatologickou analýzu. Vyšetření by měla být provedena také u zvířat ostatních dávkových skupin, pokud jsou u skupiny s nejvyšší dávkou pozorovány změny. Pokyny k histopatologickému vyšetření (11) podrobně popisují pitvu, fixaci, tvorbu řezů a histopatologické vyšetření endokrinních tkání.

ÚDAJE A PŘEDKLÁDÁNÍ ZPRÁV

Údaje

50. Měly by být uvedeny údaje pro každé jednotlivé zvíře. Dále se všechny údaje shrnou do tabulek tak, aby byl u každé experimentální skupiny uveden počet zvířat na začátku zkoušky, počet zvířat uhynulých během zkoušky nebo utracených z humanitních důvodů, doba úhynu nebo humanitního utracení, počet plodných samic, počet březích samic, počet zvířat vykazujících příznaky toxicity, popis pozorovaných příznaků toxicity včetně doby nástupu, trvání a závažnosti veškerých toxických účinků, druhy histopatologických změn a všechny významné údaje o vrhu. Souhrnná zpráva ve formě tabulky, která se ukázala jako velmi užitečná pro hodnocení reprodukčního/vývojového účinku, je uvedena v dodatku 3.
51. Vzhledem k omezené velikosti studie mají statistické analýzy ve formě testů „významnosti“ pro mnoho sledovaných vlastností, zejména pro reprodukční sledované vlastnosti, omezenou hodnotu. Pokud se používají statistické analýzy, pak by měla být zvolena metoda vhodná pro distribuci zkoumané proměnné a měla by být zvolena před zahájením studie. Statistická analýza AGD a retenčních mléčných cyst by měla vycházet z údajů o jednotlivých mláďatech se zohledněním účinků na vrh. Ve vhodných případech je jednotkou analýzy vrh. Statistická analýza tělesné hmotnosti mláďat by měla vycházet z údajů o jednotlivých mláďatech se zohledněním velikosti vrhu. Vzhledem k malé velikosti

skupin může být jako pomůcka pro interpretaci studie také užitečné použití historických kontrolních údajů (např. o velikosti vrhu), pokud jsou tyto údaje k dispozici.

Vyhodnocení výsledků

52. Výsledky této studie reprodukční toxicity se vyhodnotí z hlediska pozorovaných účinků, pitvy a mikroskopických nálezů. V hodnocení musí být uveden vztah mezi dávkou zkoušené chemické látky a přítomností nebo nepřítomností, výskytem a závažností abnormalit včetně makroskopických lézí, stanovených cílových orgánů, neplodnosti, klinických abnormalit, vlivu na reprodukční výkonnost a schopnost vrhu, změny tělesné hmotnosti, vlivu na úmrtnost a další toxické účinky.
53. Vzhledem ke krátké době expozice samců je třeba histopatologii varlat a nadvarlat zvažovat při posuzování reprodukčních účinků u samců společně s údaji o fertilitě. Jako pomůcka pro interpretaci studie může být také užitečné použití historických kontrolních údajů o reprodukci/vývoji (např. o velikosti vrhu, AGD, retenčních mléčných cystách, sérových hladinách T4), pokud jsou tyto údaje k dispozici.
54. Za účelem kontroly jakosti se navrhuje, aby se shromáždily historické kontrolní údaje a vypočítaly se koeficienty rozptylu pro číselné údaje, zejména pro parametry spojené s detekcí endokrinních disruptorů. Tyto údaje pak lze použít pro účely srovnání při hodnocení stávajících studií.

Závěrečná zpráva

55. Závěrečná zpráva by měla obsahovat tyto informace:

Zkoušená chemická látka:

- zdroj, číslo šarže a je-li k dispozici, datum použitelnosti,
- stabilita zkoušené chemické látky, je-li známa.

Jednosložková látka:

- fyzický vzhled, rozpustnost ve vodě a další relevantní fyzikálně-chemické vlastnosti,
- chemická identifikace, např. název podle IUPAC nebo CAS, číslo CAS, kód SMILES nebo InChI, strukturní vzorec, čistota, případně chemická identita nečistot, je-li to prakticky možné, atd.

Vícesložkové látky, UVBC a směsi:

- charakterizované pokud možno chemickou identitou (viz výše), kvantitativním výskytem a relevantními fyzikálně-chemickými vlastnostmi složek.

Vehikulum (je-li použito):

- zdůvodnění výběru vehikula, pokud není použita voda.

Pokusná zvířata:

- použitý druh/kmen,
- počet, věk a pohlaví zvířat,
- původ, podmínky chovu, strava atd.,
- hmotnost jednotlivých zvířat na začátku zkoušky.
- zdůvodnění použití druhu, pokud je jiný než potkan.

Zkušební podmínky:

- zdůvodnění zvolených úrovní dávek,
- podrobnosti o složení zkoušené chemické látky/úpravě potravy, o použitých koncentracích, stálosti a homogenitě přípravku,
- podrobné údaje o podávání zkoušené chemické látky,
- popřípadě přepočet koncentrace zkoušené chemické látky v krmivu/pitné vodě (ppm) na skutečnou denní dávku (mg/kg tělesné hmotnosti/den),
- podrobnosti o jakosti krmení a vody,
- podrobný popis postupů randomizace při výběru mláďat pro třídění, jsou-li tříděna.

Výsledky:

- tělesná hmotnost/změny tělesné hmotnosti,
- spotřeba potravy a popřípadě spotřeba vody, je-li údaj k dispozici,
- údaje o toxických reakcích podle pohlaví a dávky, včetně ukazatelů plodnosti, gestace a všech dalších známek toxicity,
- délka gestace,
- toxické nebo jiné účinky na reprodukci, potomstvo, postnatální růst atd.,
- povaha, závažnost a trvání klinických projevů (ať vratných, či nevratných),
- počet dospělých samic s normálním nebo abnormálním estrálním cyklem a trváním cyklu,
- počet živě narozených mláďat a postimplantačních ztrát,
- údaje o tělesné hmotnosti mláďat,
- AGD všech mláďat (a tělesná hmotnost v den měření AGD),
- retenční mléčné cysty u mláďat samců,

- hladiny hormonů štítné žlázy u 13denních mláďat a dospělých samců (a u samic a 4denních mláďat, jsou-li tyto hodnoty měřeny),
- počet mláďat s makroskopicky viditelnými abnormalitami, orientační hodnocení vnějších genitálií, počet zakrslých mláďat,
- den úhynu během studie nebo údaj, že zvířata přežila až do dne utracení,
- počet implantovaných plodů, velikost vrhu a hmotnost vrhu v době pořízení záznamu,
- tělesná hmotnost při utracení a údaje o hmotnosti orgánů u rodičovských zvířat,
- pitevní nálezy,
- podrobný popis histopatologických nálezů,
- údaje o absorpci (jsou-li k dispozici),
- statistické vyhodnocení výsledků, je-li to možné.

Rozbor výsledků.

Závěry.

Interpretace výsledků

56. Studie poskytne hodnocení reprodukční/vývojové toxicity spojené s podáváním opakovaných dávek (viz odstavce 5 a 6). Mohla by naznačit nutnost provést další výzkum a poskytnout vodítko pro návrh dalších studií. Jako pomůcka při interpretaci výsledků v oblasti reprodukce a vývoje by měl posloužit pokyn OECD č. 43 (12). Pokyn OECD č. 106 týkající se histologického hodnocení endokrinních a reprodukčních zkoušek u hlodavců (11) poskytuje informace o přípravě a hodnocení (endokrinních) orgánů a vaginálních stěrů, což může být pro tento pokyn užitečné.

LITERATURA

- (1) OECD (1990). Room Document No 1 for the 14th Joint Meeting of the Chemicals Group and Management Committee. K dispozici na vyžádání u Organizace pro hospodářskou spolupráci a rozvoj, Paříž.
- (2) OECD (1992). Chairman's Report of the ad hoc Expert Meeting on Reproductive Toxicity Screening Methods, Tokyo, 27th-29th October, 1992. K dispozici na vyžádání u Organizace pro hospodářskou spolupráci a rozvoj, Paříž.
- (3) OECD (1998). Report of the First Meeting of the OECD Endocrine Disrupter Testing and Assessment (EDTA) Task Force, 10th-11th March 1998. K dispozici na vyžádání u Organizace pro hospodářskou spolupráci a rozvoj, Paříž.
- (4) OECD (2015). Feasibility Study for Minor Enhancements of TG 421/422 with ED Relevant Endpoints. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (No 217) Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (5) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment, and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluations. Series on Testing and Assessment, (No 19), Organisation for Economic Cooperation and Development, .Paris.
- (6) OECD (2011). Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment(No 150), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (7) Goldman, J.M., Murr A.S., Buckalew A.R., Ferrell J.M. and Cooper R.L. (2007). The Rodent Estrous Cycle: Characterization of Vaginal Cytology and its Utility in Toxicological Studies, Birth Defects Research, Part B, 80 (2), 84-97.
- (8) Sadleir R.M.F.S (1979). Cycles and Seasons, in Auston C.R. and Short R.V. (eds.), Reproduction in Mammals: I. Germ Cells and Fertilization, Cambridge, New York.
- (9) Gallavan R.H. Jr , Holson J.F., Stump D.G., Knapp J.F. and Reynolds V.L. (1999). Interpreting the Toxicologic Significance of Alterations in Anogenital Distance: Potential for Confounding Effects of Progeny Body Weights, Reproductive Toxicology, 13: 383-390.
- (10) OECD (2013). Guidance Document in Support of the Test Guideline on the Extended One Generation Reproductive Toxicity Study. Environment,

Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 151), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

- (11) OECD (2009). Guidance Document for Histologic Evaluation of Endocrine and Reproductive Tests in Rodents. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No106), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (12) OECD (2008). Guidance Document on Mammalian Reproductive Toxicity Testing and Assessment. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 43), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

Dodatek 1

DEFINICE (VIZ TAKÉ POKYNY OECD Č. 150 (6))

Androgenicita je schopnost chemické látky působit v organismu savců jako přirozený androgenní hormon (např. testosteron).

Antiandrogenicita je schopnost chemické látky potlačit v organismu savců působení přirozeného androgenního hormonu (např. testosteronu).

Antiestrogenicita je schopnost chemické látky potlačit v organismu savců působení přirozeného estrogenního hormonu (např. estradiolu 17β).

Antityreoidální působení je schopnost chemické látky potlačit v organismu savců působení přirozeného hormonu štítné žlázy (např. T₃).

Chemická látka je látka nebo směs.

Vývojová toxicita: projev reprodukční toxicity představující prenatální, perinatální, postnatální, strukturální nebo funkční poruchy u potomstva.

Dávkováním se rozumí obecný termín zahrnující dávku, četnost a trvání doby, po kterou je látka podávána.

Dávkou se rozumí množství podané zkoušené chemické látky. Dávka se vyjadřuje jako hmotnost zkoušené chemické látky na jednotku tělesné hmotnosti zvířete za den (např. mg/kg tělesné hmotnosti/den) nebo jako konstantní koncentrace v krmivu.

Zřejmá toxicita je obecný termín popisující jasné příznaky toxicity po podání zkoušené chemické látky. Ty by měly být dostačující pro posouzení nebezpečnosti a měly by být takové, že při zvýšení podávané dávky lze očekávat rozvoj závažných toxických příznaků a pravděpodobnou mortalitu.

Porucha plodnosti představuje poruchy samčích nebo samičích reprodukčních funkcí nebo schopnosti.

Mateřská toxicita: nežádoucí účinky na březí samice vyskytující se buď specificky (přímý účinek), nebo nespecificky (nepřímý účinek).

NOAEL je zkratka pro angl. „no-observed-adverse-effect level“. Je to nejvyšší úroveň dávky, při které nejsou pozorovány žádné nepříznivé účinky spojené se zkouškou.

Estrogenicita je schopnost chemické látky působit v organismu savců jako přirozený estrogenní hormon (např. estradiol 17β).

Reprodukční toxicita představuje škodlivé účinky na potomstvo a/nebo poruchy samčích nebo samičích reprodukčních funkcí nebo schopnosti.

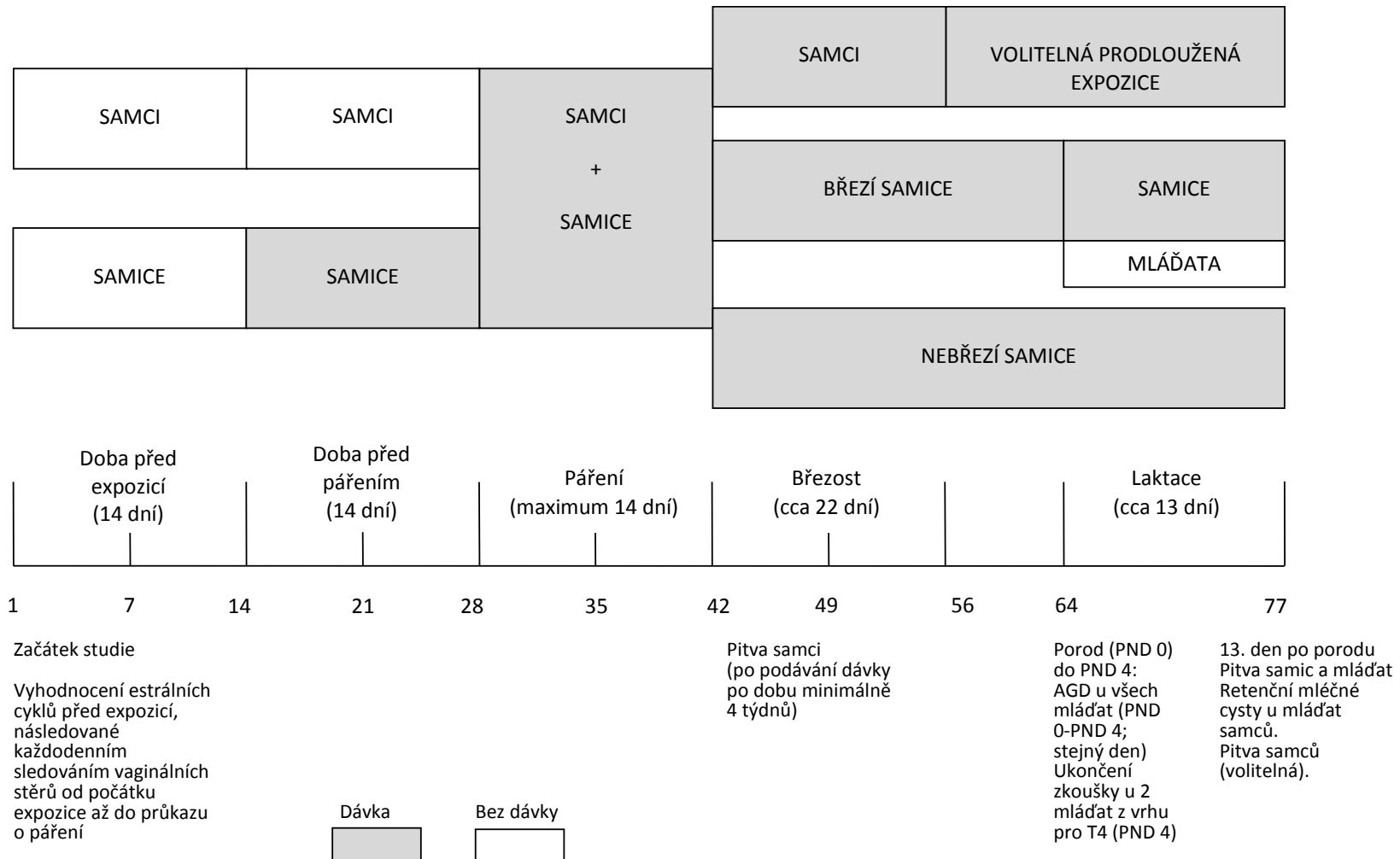
Zkoušená chemická látka je jakákoli látka nebo směs zkoušená touto zkušební metodou.

Tyreoidální působení je schopnost chemické látky působit jako přirozený hormon štítné žlázy (např. T₃) v savčím organismu.

Validace je vědecký proces, jehož cílem je charakterizovat provozní požadavky a provozní omezení zkušební metody a prokázat její spolehlivost a relevantnost pro určitý konkrétní účel.

Dodatek 2

DIAGRAM ČASOVÉHO PLÁNU EXPERIMENTU SE ZNÁZORNĚNÍM MAXIMÁLNÍ DÉLKY STUDIE, NA ZÁKLADĚ CELÉHO ČTRNÁCTIDENNÍHO OBDOBÍ PÁŘENÍ



Dodatek 3

SOUHRNNÁ ZPRÁVA O ÚČINCÍCH NA REPRODUKCI/VÝVOJ VE FORMĚ TABULKY

POZOROVÁNÍ	HODNOTY				
Dávka (jednotky)	0 (kontrola)	.. .	.. .	.. .	.. .
Páry na začátku (N)					
Estrální cyklus (alespoň střední délka a frekvence nepravidelných cyklů)					
Samice vykazující známky kopulace (N)					
Zabřezlé samice (N)					
Dny zabřeznutí 1–5 (N)					
Dny zabřeznutí 6–. . . ⁽¹⁾ (N)					
Březost ≤ 21 dnů (N)					
Březost = 22 dnů (N)					
Březost ≥ 23 dnů (N)					
Samice s živými novorozenými mláďaty (N)					
Samice s živými novorozenými mláďaty 4. den po porodu (N)					
Implantace/samice (průměr)					
Živá mláďata/samice při narození (průměr)					
Živá mláďata/samice 4. den (průměr)					
Poměr pohlaví (samec/samice) při narození (průměr)					
Poměr pohlaví (samec/samice) 4. den (průměr)					
Hmotnost vrhu při narození (průměr)					
Hmotnost vrhu 4. den (průměr)					
Hmotnost mláďat při narození (průměr)					

⁽¹⁾ poslední den období páření

Hmotnost mlád'at v době měření AGD (průměr samců, průměr samic)					
AGD mlád'at ve stejný postnatální den, při narození – 4. den (průměr samců, průměr samic, uvést PND)					
Hmotnost mlád'at 4. den (průměr)					
Retenční mléčné cysty u mladých samců 13. den (průměr)					
Hmotnost mlád'at 13. den (průměr)					
ABNORMÁLNÍ MLÁĎATA					
Samice s 0					
Samice s 1					
Samice s ≥ 2					
ZTRÁTA POTOMSTVA					
Prenatální/postimplantační (implantace minus živě narozená mláďata)					
Samice s 0					
Samice s 1					
Samice s 2					
Samice s ≥ 3					
Postnatální (živě narozená mláďata minus živá mláďata 13. den po porodu)					
Samice s 0					
Samice s 1					
Samice s 2					
Samice s ≥ 3					

B.64 KOMBINOVANÁ STUDIE TOXICITY PO OPAKOVANÝCH DÁVKÁCH SE SCREENINGOVOU ZKOUŠKOU NA REPRODUKČNÍ/VÝVOJOVOU TOXICITU

ÚVOD

1. Tato zkušební metoda je rovnocenná Pokynů OECD pro zkoušení č. 422 (2016). Pokyny OECD pro zkoušení chemických látek se pravidelně přezkoumávají s ohledem na vědecký pokrok. Pokyn č. 422 k původní screeningové zkoušce byl přijat v roce 1996 na základě protokolu pro „Kombinovanou screeningovou zkoušku na reprodukční/vývojovou toxicitu po opakovaných dávkách“ projednaného na dvou zasedáních odborníků, a to v Londýně v roce 1990 (1) a v Tokiu v roce 1992 (2).
2. Tato zkušební metoda kombinuje screeningovou část na reprodukční/vývojovou toxicitu, která vychází ze zkušeností získaných v členských zemích při používání původní metody u stávajících chemických látek vyráběných ve velkém objemu a při průzkumném testování látek pozitivní kontroly (3) (4), a část zkoušení toxicity po opakovaných dávkách v souladu s Pokynem OECD pro zkoušení č. 407 (Studie orální toxicity u hlodavců s opakovaným podáváním dávky v 28denním cyklu, odpovídající kapitole B.7 této přílohy).
3. Tato zkušební metoda byla aktualizována o příslušné sledované vlastnosti endokrinních disruptorů v návaznosti na činnost s vysokou prioritou, kterou organizace OECD zahájila v roce 1998 a která byla zaměřena na revizi stávajících pokynů pro zkoušení a vypracování nových pokynů pro zjišťování a zkoušení látek, které mohou narušovat činnost endokrinních žláz (5). V této souvislosti byly do pokynu č. 407 (odpovídajícího kapitole B.7 této přílohy) v roce 2008 doplněny parametry vhodné k detekci endokrinního působení zkoušených chemických látek. Cílem aktualizace pokynu č. 422 bylo zahrnout do pokynu ke screeningové zkoušce některé relevantní sledované vlastnosti endokrinních disruptorů, pokud doby expozice zahrnují některá citlivá období v průběhu vývoje (prenatální nebo časně postnatální období).
4. Na základě studie proveditelnosti řešící vědecké a technické otázky spojené se zahrnutím relevantních sledovaných vlastností, jakož i možných úprav plánu zkoušky potřebných pro jejich zahrnutí (6) byly do pokynu č. 422 přidány vybrané další relevantní sledované vlastnosti související s endokrinními disruptory, které jsou rovněž součástí pokynu pro zkoušení č. 443 (Rozšířená jednogenerační studie toxicity pro reprodukci, odpovídající kapitole B.56 této přílohy).
5. Tato zkušební metoda je určena pro získání omezeného množství informací týkajících se účinků zkoušené chemické látky na reprodukční výkonnost samců a samic, jako je funkce pohlavních žláz, chování při páření, početí, vývoj zárodku a vrh. Není alternativou pro stávající zkušební metody B.31, B.34, B.35 nebo B.56 a ani je nahrazuje.

VÝCHOZÍ ÚVAHY

6. Při posuzování a hodnocení toxických vlastností chemické látky lze po získání prvních informací o toxicitě z akutních zkoušek stanovit orální toxicitu pomocí opakované aplikace dávek. Tato studie poskytuje informace o možném nebezpečí pro zdraví, které by se mohlo projevit na základě opakované expozice během relativně omezeného časového období. Tato metoda se skládá ze základní studie toxicity po opakovaných dávkách, kterou lze použít u chemických látek, u nichž není důvod pro 90denní studii (např. když objem výroby nepřekračuje určité limity), nebo jako předběžnou studii k dlouhodobé studii. Při realizaci studie by měly být respektovány hlavní zásady a aspekty stanovené v pokynu OECD č. 19 o uznávání, posuzování a používání klinických příznaků jako humánních sledovaných vlastností pro pokusná zvířata používaná při hodnoceních bezpečnosti (7).
7. Dále zahrnuje screeningovou zkoušku na reprodukční/vývojovou toxicitu, a proto může být použita také na získání prvních informací o možných účincích na reprodukční výkonnost samců a samic, jako je funkce pohlavních žláz, chování při páření, početí, vývoj zárodku a vrh, a to v rané fázi posuzování toxikologických vlastností zkoušených chemických látek, nebo informací o chemických látkách, které jsou předmětem zájmu. Tato zkušební metoda neposkytuje úplné informace o všech aspektech reprodukce a vývoje. Konkrétně nabízí jen omezené prostředky zjištění postnatálních projevů prenatální expozice nebo účinků, které mohou být vyvolány v průběhu postnatální expozice. Vzhledem (mimo jiné) k selektivitě sledovaných vlastností a krátké době trvání studie neposkytuje tato metoda důkaz pro definitivní tvrzení, že nedochází k žádným reprodukčním/vývojovým účinkům. Navíc, pokud neexistují údaje z jiných zkoušek reprodukční/vývojové toxicity, jsou pozitivní výsledky užitečné pro první posouzení rizika a přispívají k rozhodnutím ohledně nezbytnosti a načasování dalších zkoušek.
8. Výsledky získané pro parametry související s endokrinním působením by se měly interpretovat v kontextu „konceptního rámce OECD pro zkoušky a hodnocení chemických látek způsobujících endokrinní poruchy“ (8). V tomto konceptním rámci je vylepšený Pokyn OECD pro zkoušení č. 422 zařazen na úroveň 4 jako zkouška *in vivo* poskytující údaje o nežádoucích účincích na relevantní endokrinní sledované vlastnosti. Endokrinní signál sám o sobě však nemusí být považován za dostatečný důkaz, že zkoušená chemická látka je endokrinním disruptorem.
9. Tato zkušební metoda klade rovněž větší důraz na neurologické účinky jako na specifické sledované vlastnosti; důraz je kladen na potřebu pečlivého klinického pozorování zvířat, aby bylo získáno co nejvíce informací. Metoda by měla odhalit chemické látky s neurotoxickým potenciálem, u nichž může být nezbytné další hlubší zkoumání tohoto aspektu. Dále může tato metoda poskytnout základní indikaci imunologických účinků.
10. Pokud neexistují údaje z jiných studií systémové toxicity, reprodukční/vývojové toxicity, neurotoxicity anebo imunotoxicity, jsou pozitivní výsledky užitečné pro první posouzení

rizika a přispívají k rozhodnutím ohledně nezbytnosti a načasování dalších zkoušek. Zkouška však může být zvláště užitečná jako součást souboru údajů pro hodnocení OECD (SIDS) pro posouzení stávajících chemických látek, o nichž nejsou k dispozici žádné nebo jen omezené toxikologické informace, a může sloužit jako alternativa k provedení dvou samostatných zkoušek toxicity po opakovaných dávkách (Pokyn OECD pro zkoušení č. 407, odpovídající kapitole B.7 této přílohy), respektive reprodukční/vývojové toxicity (Pokyn OECD pro zkoušení č. 421, odpovídající kapitole B.63 této přílohy). Rovněž může být použita jako studie ke stanovení dávkování pro rozsáhlejší reprodukční/vývojové studie, nebo když je to jinak považováno za relevantní.

11. Obecně se předpokládá, že existují rozdíly v citlivosti mezi březími a nebřezími zvířaty. Proto může být složitější stanovit úroveň dávek v této kombinované zkoušce, která bude adekvátní pro posouzení jak obecné systémové toxicity, tak i specifické reprodukční/vývojové toxicity, než když se jednotlivé zkoušky provádějí zvlášť. Navíc může být obtížnější interpretovat výsledky zkoušek s ohledem na obecnou systémovou toxicitu, než když se provádí samostatná studie s opakovanými dávkami, zejména když se sérové a histopatologické parametry nehodnotí ve studii současně. Vzhledem k uvedeným technickým problémům jsou pro provádění této kombinované screeningové zkoušky nutné značné zkušenosti v oblasti zkoušení toxicity. Na druhé straně může kombinovaná zkouška nabídnout kromě menšího počtu použitých zvířat lepší prostředky pro rozlišení přímých účinků na reprodukci/vývoj od účinků, které jsou sekundární k jiným (systémovým) účinkům.
12. V této zkoušce je období podávání zkoušené chemické látky delší než v klasické 28denní studii s opakovanou dávkou. V porovnání se stavem, kdy se provádí klasická 28denní studie s opakovanou dávkou kromě screeningové zkoušky reprodukční/vývojové toxicity, se však používá méně zvířat každého pohlaví na skupinu.
13. Tato zkušební metoda předpokládá orální aplikaci zkoušené chemické látky. Pokud jsou použity jiné cesty expozice, bude zřejmě nutné provést úpravy.
14. Před použitím této zkušební metody ke zkoušení směsi s cílem získat údaje pro zamýšlený regulační účel by mělo být zváženo, zda tato metoda může pro tento účel poskytnout odpovídající výsledky, a pokud ano, proč tomu tak je. Takové úvahy nejsou nutné, pokud existuje právní požadavek na zkoušení dané směsi.
15. Použité definice jsou uvedeny v dodatku 1.

PRINCIP ZKOUŠKY

16. Zkoušená chemická látka se podává v odstupňovaných dávkách několika skupinám samců a samic. Samcům se podává dávka minimálně čtyři týdny včetně dne před plánovaným usmrcením (zahrnuje to minimálně dva týdny před pářením, v průběhu období páření a

přibližně dva týdny po páření). Vzhledem k omezené době podávání před pářením u samců nemusí být fertilita zvláště citlivým ukazatelem toxicity pro varlata. Proto je velmi důležité provést podrobné histologické vyšetření varlat. Kombinace dvoutýdenní doby podávání před pářením a následné pozorování páření/fertility s celkovou dobou podávání alespoň čtyři týdny, po níž následuje podrobná histopatologie samčích gonád, se považuje za dostatečnou ke zjištění většiny účinků na fertilitu a spermatogenezi u samců.

17. Samicím je třeba podávat zkoušenou chemickou látku po celou dobu studie. Zahrnuje to dva týdny před pářením (s cílem pokrýt alespoň dva celé estrální cykly), variabilní dobu do početí, dobu březosti a alespoň třináct dnů po porodu, a to včetně dne před plánovaným usmrcením.
18. Délka studie následující po aklimatizaci a zhodnocení estrálního cyklu před zahájením podávání závisí na výkonnosti samice a činí přibližně 63 dnů [alespoň 14 dnů před pářením, (maximálně) 14 dnů páření, 22 dnů gestace, 13 dnů laktace].
19. V průběhu období podávání se zvířata každý den pečlivě pozorují, aby se zjistily příznaky toxicity. Zvířata, která v průběhu zkoušky uhynula nebo byla utracena, se pitvají a na konci zkoušky se přeživší zvířata utratí a rovněž pitvají.

POPIS METODY

Výběr zvířecích druhů

20. Tato zkušební metoda je určena k použití s potkany. Jestliže se parametry uvedené v tomto pokynu pro zkoušení č. 422 zkoumají u jiných druhů hlodavců, mělo by se podat podrobné zdůvodnění. V mezinárodním validačním programu detekce endokrinních disruptorů pomocí pokynu pro zkoušení č. 407 byl jediným použitým druhem potkan. Není vhodné používat kmeny s nízkou plodností nebo s typicky vysokým výskytem vývojových vad. Používají se zdravá, dosud nepřipuštěná zvířata ještě nepoužitá pro jiné experimenty. Pokusná zvířata by měla být plně charakterizována co do druhu, kmene, pohlaví, hmotnosti a věku. Na začátku studie by měly být odchylky hmotnosti zvířat minimální a neměly by překročit $\pm 20\%$ střední hodnoty pro každé pohlaví. Provádí-li se studie jako předběžná studie pro dlouhodobou nebo celogenerační studii, je vhodné použít v obou studiích nejlépe zvířata stejného kmene a stejného původu.

Umístění a krmení zvířat

21. Všechny postupy by měly splňovat místní standardy péče o laboratorní zvířata. Teplota v místnosti pro pokusná zvířata by měla být $22\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($\pm 3^{\circ}$). Relativní vlhkost vzduchu by měla být alespoň 30% a neměla by pokud možno přesáhnout 70% kromě doby úklidu místnosti. Osvětlení by mělo být umělé a mělo by se střídát 12 hodin světla a 12 hodin tmy. Ke krmení lze použít konvenční laboratorní krmivo s neomezeným přísunem pitné

vody. Výběr potravy může být ovlivněn potřebou zajistit dostatečné promísení s testovanou látkou, je-li látka podávána touto cestou.

22. Zvířata by měla být chována v malých skupinách stejného pohlaví; je-li to z vědeckého hlediska důvodné, mohou být zvířata chována individuálně. Při chovu zvířat v klecích by v jedné kleci nemělo být umístěno více než pět zvířat. Páření by mělo probíhat v klecích, které jsou k tomuto účelu vhodné. Březí samice je třeba chovat v klecích jednotlivě a poskytnout jim materiál pro vytvoření hnízda. Samice v době laktace se chovají v klecích jednotlivě společně s potomky.
23. Krmivo by se mělo pravidelně analyzovat, aby se zjistila přítomnost kontaminantů. Vzorek stravy by se měl uchovávat až do dokončení zprávy.

Příprava zvířat

24. Zdravá mladá dospělá zvířata se náhodně vyberou a rozdělí do experimentálních skupin a klecí. Klece by měly být uspořádány tak, aby byl vliv umístění klecí minimalizován. Zvířata se jednoznačně identifikují a před započítáním studie se nechají v laboratorních podmínkách alespoň pět dní aklimatizovat.

Příprava dávek

25. Není-li jiný způsob aplikace považován za vhodnější, doporučuje se orální podávání zkoušené chemické látky. Pokud je zvolena orální cesta, zkoušená chemická látka se obvykle podává žaludeční sondou; alternativně však lze zkoušené chemické látky podávat také v potravě nebo v pitné vodě.
26. Je-li to nutné, je zkoušená chemická látka rozpuštěna nebo suspendována ve vhodném vehikulu. Kdykoli je to možné, doporučuje se zvážit nejprve použití vodného roztoku/suspenze, poté použití olejového roztoku/emulze (např. kukuřičného oleje) a nakonec roztoku v jiných vehikulech. U jiného typu vehikula, než je voda, je třeba znát jeho toxické charakteristiky. Měla by být určena stabilita a homogenita zkoušené chemické látky v daném vehikulu.

POSTUP

Počet a pohlaví zvířat

27. Doporučuje se, aby každá skupina měla zpočátku alespoň 10 samců a 12–13 samic. U samic se hodnotí před expozicí estrální cykly a zvířata, která nevykazují typické 4–5denní cykly, nebudou do studie zařazena; proto se doporučují náhradní samice, aby v každé skupině zůstalo 10 samic. S výjimkou případu výrazně toxických účinků se očekává, že v každé skupině bude alespoň 8 březích samic, což je obvykle minimální přijatelný počet březích samic na skupinu. Cílem je získat dostatečný počet březích samic a potomstva, a tím zajistit smysluplné hodnocení schopnosti zkoušené chemické látky ovlivnit plodnost,

březost, chování samice a kojených mláďat a růst a vývoj potomstva generace F₁ od doby početí do dne 13 po porodu. Pokud se budou zvířata usmrcovat v průběhu studie, je nutno zvýšit celkový počet zvířat o počet zvířat, která budou usmrcena před ukončením studie. Mělo by se zvážit přidání další satelitní skupiny pěti zvířat od každého pohlaví do kontrolní skupiny a do skupiny s nejvyšší dávkou, aby se po dobu nejméně 14 dní po ukončení aplikace mohla sledovat vratnost, přetrvávání nebo opožděný nástup systémových toxických účinků. Zvířata ze satelitních skupin se nepáří, a proto se nepoužívají pro posouzení reprodukční/vývojové toxicity.

Dávkování

28. Obecně by měly být použity nejméně tři zkušební skupiny a kontrolní skupina. Nejsou-li dostupné žádné vhodné obecné údaje o toxicitě, může se provést předběžná studie (na zvířatech stejného kmene a původu) pro stanovení rozmezí dávek, které mají být použity. S výjimkou podávání zkoušené chemické látky se se zvířaty v kontrolní skupině zachází stejně jako se zvířaty ve zkušební skupině. Používá-li se pro usnadnění aplikace zkoušené chemické látky vehikulum, podává se kontrolní skupině vehikulum v nejvyšším použitém objemu.
29. Při výběru úrovně dávek by se měly vzít v úvahu veškeré existující údaje o toxických a (toxiko)kinetických vlastnostech. Rovněž je třeba vzít v úvahu, že mohou existovat rozdíly v citlivosti mezi březími a nebřezími zvířaty. Nejvyšší úroveň dávky by se měla zvolit tak, aby vyvolala toxické účinky, nikoli však uhynutí ani velké utrpení. Dále by měla být zvolena sestupná řada dávek s cílem prokázat, že existuje odezva související s dávkou a že nejnižší dávka nevyvolává žádné nežádoucí účinky. Obvykle jsou optimální dvoj- až čtyřnásobné intervaly mezi dávkami a často je vhodnější přidání čtvrté zkušební skupiny než používání příliš velkých intervalů mezi jednotlivými dávkami (např. lišících se faktorem větším než 10).
30. V přítomnosti pozorované obecné toxicity (např. snížená tělesná hmotnost, účinky na játra, srdce, plíce nebo ledviny atd.) nebo jiných změn, které nemusí být odezvou na toxicitu (např. snížený příjem krmiva, zvětšení jater), je třeba pozorované účinky na endokrinní citlivé sledované vlastnosti interpretovat obezřetně.

Limitní zkouška

31. Pokud orální studie provedená podle postupů popsaných pro tuto studii při jedné dávce nejméně 1 000 mg na kg tělesné hmotnosti na den nebo v případě podávání v potravě nebo v pitné vodě v rovnocenné koncentraci (na základě stanovení tělesné hmotnosti) nevyvolá pozorovatelné toxické účinky a pokud se na základě údajů o látkách s podobnou strukturou nepředpokládá toxicita, není úplná studie za použití několika úrovní dávek nutná. Limitní zkouška se použije s výjimkou případu, kdy údaje o expozici člověka naznačují, že je nezbytné použití vyšší úrovně dávek. U dalších způsobů podávání látky, jako je inhalační

nebo kožní aplikace, může být maximální dosažitelná expozice často dána fyzikálně-chemickými vlastnostmi zkoušených chemických látek.

Podávání dávek

32. Zvířatům se denně podává zkoušená chemická látka po dobu sedmi dnů v rámci jednoho týdne. Pokud se zkoušená chemická látka podává nitrožaludečně, podává se zvířatům v jediné dávce za použití žaludeční sondy nebo vhodné intubační kanyly. Maximální objem tekutiny, kterou lze podat najednou, závisí na velikosti pokusného zvířete. Tento objem by neměl překročit 1 ml na 100 g tělesné hmotnosti, s výjimkou vodných roztoků, kde lze použít 2 ml na 100 g tělesné hmotnosti. S výjimkou dráždivých a žíravých zkoušených chemických látek, které obvykle při vyšších koncentracích vykazují zesílené účinky, by měla být variabilita zkušebního objemu minimalizována nastavením koncentrace zajišťující konstantní objem při všech úrovních dávky.
33. U zkoušených chemických látek podávaných v potravě nebo v pitné vodě je důležité zajistit, aby množství použité zkoušené chemické látky neovlivňovalo normální výživu nebo vodní rovnováhu. Podává-li se zkoušená chemická látka v krmivu, může se použít buď konstantní koncentrace (v ppm), nebo konstantní dávkování vzhledem k tělesné hmotnosti zvířete; použitá možnost by měla být specifikována. Zkoušená chemická látka podávaná žaludeční sondou se podává každý den přibližně ve stejnou dobu a alespoň jednou týdně se přizpůsobí tak, aby se udržela konstantní úroveň dávky vzhledem k tělesné hmotnosti zvířete. Pokud je kombinovaná studie prováděna jako předběžná studie k dlouhodobé nebo úplné studii reprodukční toxicity, měla by být v obou studiích použita stejná potrava.

Harmonogram zkoušky

34. Podávání oběma pohlavím by mělo být zahájeno 2 týdny před pářením po minimálně pětidenní aklimatizaci a po screeningu samic, zda mají normální estrální cykly (v dvoutýdenním období před expozicí). Studii je třeba naplánovat tak, aby hodnocení estrálních cyklů začalo brzy poté, co zvířata dosáhnou plné pohlavní zralosti. U různých kmenů potkana v různých laboratořích se to může mírně lišit, např. potkan Sprague Dawley stárí 10 týdnů, potkan Wistar stárí přibližně 12 týdnů. Samice s potomstvem by měly být utraceny 13. den po porodu nebo krátce poté. Aby bylo možné odebrat krev samicím nalačno (pokud je dávana přednost této možnosti), není nutné, aby byly samice a jejich potomstvo utraceny ve stejný den. Den porodu (tj. ten, kdy je dokončen vrh) je definován jako 0. den po porodu. Samice, které nevykazují žádné známky kopulace, se utratí 24–26 dnů po posledním dni období páření. S dávkováním se u obou pohlaví pokračuje i během období páření. U samců se dále pokračuje s podáváním zkoušené chemické látky i po období páření alespoň do doby, kdy je dokončeno minimální období podávání 28 dnů. Poté se utratí, nebo se případně uchovají a dále je jim podávána zkoušená chemická látka pro případné provedení druhého páření, je-li to považováno za vhodné.

35. V denním podávání samicím rodičovské generace by se poté mělo pokračovat po celou březost a alespoň do 13. dne po porodu včetně nebo do dne před utracením. U studií, kde je zkoušená chemická látka podávána inhalací nebo dermální cestou, je třeba s dávkováním pokračovat alespoň do 19. dne gestace včetně, přičemž dávkování se obnoví co možná nejdříve, nejpozději však 4. postnatální den (PND).
36. Pokud je zařazena satelitní skupina, pak zvířata v této skupině, která mají být podle plánu dále sledována, se nepáří. Měla by být po dalších nejméně 14 dnů po prvním naplánovaném utracení samic bez aplikace, aby se zachytil opožděný nástup či přetrvávání toxických účinků nebo zotavení se z nich.
37. Diagram časového sledu zkoušky je uveden v dodatku 2.

Estrální cykly

38. Estrální cykly je třeba sledovat před zahájením expozice, aby bylo možné vybrat pro studii samice s pravidelným cyklem (viz odstavec 27). Od začátku období expozice až do průkazu o páření je třeba také každý den sledovat vaginální stěry. V případě obav z účinků akutního stresu, které by při zahájení podávání zkoušené chemické látky mohly změnit estrální cykly, mohou laboratoře exponovat pokusná zvířata po dobu dvou týdnů, poté denně odebírat vaginální stěry za účelem sledování estrálního cyklu po dobu minimálně dvou týdnů před obdobím páření a dále je sledovat až do období páření, dokud prokazatelně nedojde k páření. Při získávání vaginálních/cervikálních buněk je třeba neporušit sliznice, což by mohlo vyvolat stav falešné březosti (8) (9).

Páření

39. Obvykle se v této studii používá párování 1:1 (jeden samec a jedna samice). V případě náhodného úmrtí samců mohou nastat výjimky. Samice se umístí se stejným samcem až do doby, kdy budou pozorovány důkazy o spáření, nebo do uplynutí dvou týdnů. Každé ráno se samice vyšetří na přítomnost spermatu nebo vaginální zátky. Den 0 březosti je definován jako den, kdy je potvrzen důkaz o spáření (je nalezena vaginální zátka nebo sperma). V případě, že páření bylo neúspěšné, se zváží spáření se samci s osvědčenou plodností ze stejné skupiny.

Velikost vrhu

40. Čtvrtý den po vrhu se velikost všech vrhů upraví náhodným vyřazením nadbytečných jedinců tak, aby bylo pokud možno dosaženo počtu čtyř až pěti samců a čtyř až pěti samic z jednoho vrhu podle obvyklé početnosti vrhu u použitého kmene potkana. Od dvou nadbytečných mláďat se odeberou krevní vzorky, smíchají se a použijí pro stanovení sérových hladin T4. Selektivní eliminace jedinců, např. na základě tělesné hmotnosti nebo anogenitální vzdálenosti (AGD), není vhodná. Pokud počet mladých samců nebo samic neumožňuje ponechat čtyři až pět od každého pohlaví a vrhu, je možná částečná úprava

(např. ponechat šest samců a čtyři samice). Jestliže velikost vrhu poklesne pod cílový počet pro utracení (8 nebo 10 mlád'at/vrh), nevyřazují se žádná mlád'ata. Jestliže zbývá pouze jedno mládě nad cílový počet pro utracení, vyřadí se pouze jedno mládě, které se použije pro odběr krve pro případné vyšetření sérové hladiny T4.

41. Jestliže se velikost trhu neupravuje, 4. den po porodu se utratí dvě mlád'ata na vrh a odeberou se krevní vzorky pro stanovení sérové koncentrace hormonů štítné žlázy. Těmito dvěma mlád'aty na vrh by měly být pokud možno samice, aby se uchovali samci pro hodnocení retenčních mléčných cyst, s výjimkou případu, že by po odstranění těchto mlád'at nezbyly žádné samice pro vyšetření při ukončení zkoušky. Jestliže velikost vrhu poklesne pod 8 nebo 10 mlád'at/vrh (podle normální velikosti vrhu u použitého kmene potkana), nevyřazují se žádná mlád'ata. Jestliže zbývá pouze jedno mládě nad normální velikost vrhu, vyřadí se pouze jedno mládě, které se použije pro odběr krve pro případné vyšetření sérové hladiny T4.

Pozorování

42. Všeobecné klinické pozorování by se mělo provádět nejméně jednou denně, nejlépe ve stejnou dobu (stejně doby) a s uvažováním doby očekávaného maxima účinku po podání látky. Zaznamenává se zdravotní stav zvířat. Nejméně dvakrát denně se provede prohlídka všech zvířat za účelem zjištění morbidit a mortality.
43. Před expozicí látky a dále nejméně jednou týdně by se mělo provést důkladné klinické vyšetření všech rodičovských zvířat (za účelem intraindividuálního porovnání). Toto pozorování by se mělo provádět mimo chovnou klec ve standardním pozorovacím prostoru a nejlépe každý den ve stejnou dobu. Pozorování je třeba pečlivě zaznamenat, nejlépe za použití systému bodování explicitně definovaného ve zkušební laboratoři. Mělo by se usilovat o to, aby rozdíly ve zkušebních podmínkách byly co nejmenší a aby vyšetření prováděly nejlépe osoby, které nevědí, jakým testem zvířata procházejí. Vyšetření by mělo mimo jiné zahrnovat změny kůže, srsti, očí a sliznic, výskyt sekretů a exkretů a vegetativních funkcí (např. slzení, zjevení srsti, velikost zornic, nezvyklé dýchání). Zaznamenávat by se měly také změny chůze, držení těla a reakce na manipulaci, dále přítomnost klonických a tonických pohybů, stereotypů v chování (např. nadměrného čištění nebo opakovaného kroužení), ztížený nebo prodlužovaný vrh nebo bizarní chování (např. sebepoškozování, chůze pozpátku) (10).
44. Jednou v průběhu studie by se měly u pěti samců a pěti samic náhodně vybraných z každé skupiny vyšetřit reakce na smyslové podněty různého druhu (např. sluchové, zrakové, proprioceptivní), (8), (9), (11), síla úchopu (12) a motorická aktivita (13). Další informace o postupech, které lze použít, jsou uvedeny v příslušné literatuře. Místo postupů popsanych v této literatuře však lze použít alternativní postupy. U samců by měla tato funkční pozorování proběhnout ke konci období, kdy je jim podávána zkušební chemická látka, krátce před naplánovaným utracením, ale před odběrem krve pro hematologické vyšetření

nebo stanovení klinických biochemických ukazatelů (viz odstavce 53–56, včetně poznámky pod čarou č. 1). Samice by měly být v průběhu těchto funkčních zkoušek ve fyziologicky podobném stavu a měly by být testovány nejlépe jednou v průběhu posledního týdne laktace (např. LD 6–13), krátce před plánovaným utracením. V maximálně možné míře minimalizujte dobu oddělení samic od mláďat.

45. Pozorování funkčních poruch provedené jednou ke konci studie lze případně vynechat, pokud je studie prováděna jako předběžná pro následnou subchronickou (90denní) nebo dlouhodobou studii. V takovém případě by se mělo pozorování funkčních poruch zahrnout do této dlouhodobé studie. Dostupnost údajů o pozorovaných funkčních poruchách z této studie opakovaného podávání dávky může na druhé straně usnadnit výběr úrovní dávek pro následnou subchronickou nebo dlouhodobou studii.
46. Pozorování funkčních poruch lze výjimečně vynechat u skupin, které vykazují příznaky toxicity v takové míře, že by při posuzování funkčního stavu vadily.
47. Doba gestace se zaznamená a počítá se ode dne 0 březosti. Každý vrh se co nejdříve po porodu vyšetří a stanoví se počty a pohlaví mláďat, počet mrtvčů a živě narozených mláďat, počet zakrslých mláďat (mláďat, která jsou výrazně menší než odpovídající kontrolní mláďata) a přítomnost nápadných abnormalit.
48. Do 24 hodin po porodu (0. den nebo 1. den po porodu) a alespoň 4. den a 13. den po porodu se živá mláďata spočítají, stanoví se jejich pohlaví a zváží se. Kromě pozorování zvířat rodičovské generace (viz odstavce 43 a 44) je třeba zaznamenat jakékoli abnormální chování potomstva.
49. U každého mláděte je třeba ve stejný den po porodu v době od PND 0 do PND 4 změřit anogenitální vzdálenost (AGD). V den měření AGD by měla být zjištěna tělesná hmotnost mláděte a AGD by měla být normalizována na nějakou míru velikosti mláďat, nejlépe třetí odmocninu tělesné hmotnosti (14). Podle doporučení pokynu OECD č. 151 se v PND 12 nebo 13 spočítá počet bradavek/prsních dvorců u mladých samců (15).

Tělesná hmotnost a spotřeba potravy a vody

50. Samci a samice se váží první den podávání, poté týdně a při ukončení zkoušky. V průběhu březosti se samice zváží 0., 7., 14. a 20. den a do 24 hodin po vrhu (0. den nebo 1. den po porodu) a alespoň 4. den a 13. den po porodu. Tato pozorování se zaznamenají individuálně u každého dospělého zvířete.
51. Před obdobím páření a během březosti a laktace se alespoň jednou týdně měří příjem potravy. Měření příjmu potravy v průběhu páření je volitelné. Pokud se zkoušená chemická látka podává ve vodě, měří se v průběhu těchto období také spotřeba tohoto média.

Hematologická vyšetření

52. Jednou v průběhu studie by se měla u pěti samců a pěti samic náhodně vybraných z každé skupiny tato hematologická provést vyšetření: stanovení hematokritu, koncentrace hemoglobinu, počtu erytrocytů, retikulocytů, celkového počtu a diferenciálního rozpočtu leukocytů a trombocytů a stanovení protrombinového času. Jestliže zkoušená chemická látka nebo její domnělé metabolity mají oxidační vlastnosti nebo existuje podezření, že je mají, měly by se stanovit také koncentrace methemoglobinu a Heinzových tělísek.
53. Krevní vzorky by se měly odebírat z určeného místa. Samice by měly být při odběru ve fyziologicky podobném stavu. Za účelem vyloučení praktických problémů spojených s variabilitou při nástupu gestace se může samicím odebírat krev na konci období před pářením jako alternativa k odběru těsně před utracením zvířat nebo jako součást tohoto postupu. U samců se krev odebírá nejlépe těsně před utracením zvířat nebo jako součást tohoto postupu. Alternativně lze samcům odebírat krev také na konci období před pářením, pokud byla tato doba vybrána pro samice.
54. Krevní vzorky je třeba skladovat za vhodných podmínek.

Biochemické vyšetření

55. Klinické biochemické analýzy za účelem vyšetření hlavních toxických účinků na tkáň, a zejména na játra a ledviny, by se měly provést na krevních vzorcích od pěti vybraných samců a pěti vybraných samic z každé skupiny. Před odebráním krevních vzorků se doporučuje ponechat zvířata přes noc nalačno¹. Vyšetření plazmy a séra by mělo obsahovat stanovení sodíku, draslíku, glukózy, celkového cholesterolu, močoviny, kreatininu, celkových bílkovin a albuminu, nejméně dvou enzymů indikujících účinky na jaterní buňky (jako je alaninaminotransferáza, aspartátaminotransferáza, a sorbitoldehydrogenáza) a žlučových kyselin. Stanovení dalších enzymů (jaterního nebo jiného původu) a bilirubinu může za určitých okolností poskytnout užitečné informace.
56. Krevní vzorky z určeného místa se odebírají podle tohoto rozvrhu:

¹ Pro řadu vyšetření séra a plazmy, zejména na glukózu, by bylo vhodné ponechat zvířata nalačno přes noc. Hlavním důvodem je, že u nehladovějících zvířat je vyšší variabilita výsledků, která by mohla maskovat jemné změny a ztížit interpretaci. Na druhé straně může mít hladovění přes noc vliv na celkový metabolismus (březích) zvířat, narušovat laktaci a chování při kojení a může narušit každodenní expozici zkoušené chemické látky, zejména ve studiích s podáváním látky v krmivu. Pokud se krev odebírá nalačno, měla by se klinická biochemická vyšetření provést až po pozorování funkčních poruch ve 4. týdnu studie u samců. Samice by se měly ponechat jeden další den po odejmutí mláďat například v den PND 13). Od 13.–14. dne laktace by samicím měly být nalačno odebrány závěrečné vzorky krve pro provedení závěrečných klinických biochemických vyšetření.

- od alespoň dvou mládřat na vrh 4. den po porodu, pokud to umožňuje počet mládřat (viz odstavce 40–41),
- od všech samic a alespoň dvou mládřat na vrh při ukončení zkoušky 13. den a
- od všech dospělých samců při ukončení zkoušky.

Všechny krevní vzorky se uchovávají za vhodných podmínek. Krevní vzorky odebrané mládřatům 13. den a dospělým samcům se vyšetří na sérové hladiny hormonů štítné žlázy (T4). Ve vhodných případech se provede další vyšetření T4 v krevních vzorcích odebraných samicím a mládřatům 4. den. Je-li to vhodné, mohou být volitelně stanoveny také hladiny jiných hormonů. Krev mládřat z vrhu lze pro potřeby analýzy hormonů štítné žlázy smíchat. Hormony štítné žlázy (T4 a TSH) se měří nejlépe jako „celek“.

57. Volitelně mohou být provedena tato vyšetření moči u pěti náhodně vybraných samců z každé skupiny v průběhu posledního týdne studie za použití časově definovaného sběru moči; vyšetření se týkají vzhledu, objemu, osmolality nebo specifické hmotnosti, pH, bílkovin, glukózy a krve/krvinek.
58. Dále by se mělo uvážit vyšetření indikátorů celkového poškození tkání v séru. Další vyšetření by mělo být provedeno, pokud mohou známé vlastnosti zkoušené chemické látky ovlivnit odpovídající metabolické profily, včetně vápníku, fosforu, triglyceridů na lačno a glukózy na lačno, specifických hormonů, methemoglobinu a cholinesterázy. To je třeba stanovit individuálně.
59. Následující faktory mohou ovlivnit variabilitu a absolutní koncentrace stanovovaných hormonů:
 - doba utracení vzhledem k diurnálním odchylkám v koncentracích hormonů,
 - způsob utracení – mělo by se zabránit zbytečnému stresu zvířat, který může ovlivnit koncentrace hormonů,
 - testovací soupravy pro stanovení hormonů, jejichž standardní křivky se mohou lišit.
60. Vzorky plazmy určené speciálně k stanovení hormonů by se měly odebírat zhruba ve stejnou denní dobu. Číselné hodnoty získané při analýze koncentrací hormonů se u různých komerčních testovacích souprav liší.
61. Pokud nejsou údaje o výchozích hodnotách z dřívějších pozorování dostatečné, mělo by se zvážit stanovení hematologických a klinických biochemických parametrů před začátkem podávání dávky nebo přednostně u skupiny zvířat nezahrnutých do experimentálních skupin. U samic musí být údaje od zvířat v laktaci.

PATOLOGIE

Celková pitva

62. U všech dospělých zvířat zařazených do studie by měla být provedena celková, podrobná pitva, zahrnující pečlivé vyšetření vnějšího povrchu těla, všech otvorů a lebeční, hrudní a břišní dutiny a jejich obsahu. Speciální pozornost je třeba věnovat orgánům rozmnožovací soustavy. Zaznamená se počet implantací. V den pitvy se vyšetří vaginální stěry s cílem určit stádium estrálního cyklu a umožnit korelaci s histopatologickým vyšetřením samičích reprodukčních orgánů.
63. Varlata, nadvarlata a prostata a semenné vajíčky s Cowperovými žlázami jako celek se u všech dospělých samců podle potřeby zbaví všech přirostlých tkání a co nejdříve po pitvě se ve vlhkém stavu zváží, aby nedošlo k vyschnutí. Kromě toho mohou být volitelně zváženy další orgány, jako jsou svaly m. levator ani a m. bulbocavernosus, Cowperovy žlázy a žalud penisu u samců a párové vaječníky (vlhká hmotnost) a děloha (včetně děložního hrdla) u samic; je-li toto vážení prováděno, mělo by k němu dojít co nejdříve po pitvě. Vaječníky, varlata, nadvarlata, přídatné pohlavní orgány a všechny orgány od všech dospělých zvířat vykazující makroskopické léze se uchovají.
64. Pro účely následného histopatologického vyšetření se uchovají v nejvhodnějším fixačním médiu štítné žlázy od všech dospělých samců a samic a od jednoho 13denního samce a jedné 13denní samice z každého vrhu. Hmotnost štítné žlázy lze stanovit po fixaci. Odříznutí by se mělo rovněž provádět velmi opatrně a teprve po fixaci, aby se zamezilo poškození tkáně. Poškození tkáně by mohlo narušit histopatologickou analýzu. Krevní vzorky by se měly odebírat z určeného místa těsně před utracením zvířat nebo v jeho průběhu a měly by se skladovat za vhodných podmínek (viz odstavec 56).
65. Dále se játra, ledviny, nadledvinky, brzlík, slezina, mozek a srdce od alespoň pěti dospělých samců a samic náhodně vybraných z každé skupiny (kromě zvířat nalezených v agónii a/nebo zvířat utracených před ukončením studie) podle potřeby zbaví všech ulpělých tkání a co nejdříve po sekci se ve vlhkém stavu zváží, aby nedošlo k vyschnutí. Následující tkáně by se měly konzervovat v nejvhodnějším fixačním médiu s ohledem na typ tkáně a plánovaná následná histopatologická vyšetření: všechny makroskopicky viditelné léze, mozek (reprezentativní oblasti zahrnující hemisféry, mozeček a most), mícha, oko, žaludek, tenké a tlusté střevo (včetně Peyerových plátů), játra, ledviny, nadledvinky, slezina, srdce, brzlík, průdušnice a plíce (konzervované naplněním fixačním roztokem a následným ponořením), gonády (varlata a vaječníky), přídatné pohlavní orgány (děloha a hrdlo děložní, nadvarlata, prostata, semenné vajíčky s Cowperovými žlázami), vagina, močový měchýř, lymfatické uzliny (kromě nejproximálnější svodné uzliny by se měla odebrat ještě jedna uzlina dle laboratorních zkušeností (16)), periferní nerv (n. ischiadicus nebo n. tibialis) přednostně v blízkosti svalu, kosterní sval a kost, s kostní dření (řez nebo čerstvý nátěr z aspirované kostní dřeně). Doporučuje se fixovat varlata ponořením do Bouinova nebo modifikovaného Davidsonova fixačního média (16) (17) (18); pro tyto tkáně se nedoporučuje fixace ve formalínu. Tunica albuginea se může jemně a mělce propíchnout jehlou na obou koncích orgánu, aby se umožnilo rychlé proniknutí

fixativa. Na základě klinických nebo jiných nálezů může být nezbytné zkoumat i další tkáně. Také by se měly uchovat všechny orgány považované na základě známých vlastností zkoušené chemické látky za možné cílové orgány.

66. Následující tkáně mohou poskytnout cenné svědectví o endokrinních účincích: gonády (vaječníky a varlata), přídatné pohlavní orgány (děloha včetně děložního hrdla, nadvarlata, semenné vajíčky s Cowperovými žlázami, dorzolaterální a ventrální prostata), vagina, hypofýza, samčí prsní žláza a nadledvinka. Změny na samčích prsních žlázách nebyly dostatečně zdokumentovány, avšak tento parametr může být velmi citlivý na látky s estrogenním působením. Pozorování orgánů/tkání, které nejsou uvedeny v odstavci 65, jsou volitelná.
67. Mrtvá mláďata a mláďata utracená 13. den po porodu nebo krátce poté je třeba alespoň pečlivě externě vyšetřit na závažné abnormality. Zvláštní pozornost je třeba věnovat vnějším rozmnožovacím orgánům, které se vyšetří na přítomnost známek změněného vývoje.

Histopatologie

68. U vybraných zvířat z kontrolní skupiny a skupiny s vysokou dávkou by mělo být provedeno celkové histologické vyšetření uchovaných orgánů a tkání (se zvláštním důrazem na stádia spermatogeneze samčích gonád a histopatologii struktury intersticiálních buněk varlat). V případě potřeby může být vyšetřena štítná žláza od mláďat a zbývajících dospělých zvířat. Toto vyšetření by mělo být rozšířeno na zvířata z ostatních dávkových skupin, pokud jsou u skupiny s vysokou dávkou pozorovány změny orgánů vyvolané zkoušenou dávkou. Pokyny k histopatologickému vyšetření (10) podrobně popisují pitvu, fixaci, tvorbu řezů a histopatologické vyšetření endokrinních tkání.
69. Měly by být zkoumány všechny makroskopické léze. Za účelem objasnění hodnot dávky bez pozorovaného nepříznivého účinku (NOAEL) je třeba vyšetřit cílové orgány v jiných dávkových skupinách, zejména ve skupinách, které údajně vykazují hodnotu dávky bez pozorovaného nepříznivého účinku.
70. V případě použití satelitní skupiny by mělo být provedeno histopatologické vyšetření tkání a orgánů, na kterých byly pozorovány účinky u exponovaných skupin.

ÚDAJE A PŘEDKLÁDÁNÍ ZPRÁV

Údaje

71. Měly by být uvedeny údaje pro každé jednotlivé zvíře. Dále se všechny údaje shrnou do tabulek tak, aby byl u každé experimentální skupiny uveden počet zvířat na začátku zkoušky, počet zvířat uhynulých během zkoušky nebo utracených z humanitních důvodů, doba úhynu nebo utracení, počet plodných samic, počet březích samic, počet zvířat

vykazujících příznaky toxicity, popis pozorovaných příznaků toxicity včetně doby nástupu, trvání a závažnosti veškerých toxických účinků, druhy histopatologických změn a všechny významné údaje o vrhu. Souhrnná zpráva ve formě tabulky, která se ukázala jako velmi užitečná pro hodnocení reprodukčního/vývojového účinku, je uvedena v dodatku 3.

72. Je-li to možné, je třeba vyhodnotit číselné výsledky vhodnou a obecně uznávanou statistickou metodou. Srovnáním účinků v celém rozpětí dávkování by se mělo zamezit použití mnohonásobných t-testů. Statistické metody je třeba zvolit během plánování studie. Statistická analýza AGD a retenčních mléčných cyst by měla vycházet z údajů o jednotlivých mláďatech se zohledněním účinků na vrh. Ve vhodných případech je jednotkou analýzy vrh. Statistická analýza tělesné hmotnosti mláďat by měla vycházet z údajů o jednotlivých mláďatech se zohledněním velikosti vrhu. Vzhledem k omezené velikosti studie mají statistické analýzy ve formě testů „významnosti“ pro mnoho sledovaných vlastností, zejména pro reprodukční sledované vlastnosti, omezenou hodnotu. Některé nejčastěji používané metody, zejména parametrické testy na měření středního trendu, jsou nevhodné. Pokud se používají statistické analýzy, pak by měla být zvolena metoda vhodná pro distribuci zkoumané proměnné a měla by být zvolena před zahájením studie.

Vyhodnocení výsledků

73. Výsledky této studie reprodukční toxicity se vyhodnotí z hlediska pozorovaných účinků, pitvy a mikroskopických nálezů. V hodnocení musí být uveden vztah mezi dávkou zkoušené chemické látky a přítomností nebo nepřítomností, výskytem a závažností abnormalit včetně makroskopických lézí, stanovených cílových orgánů, neplodnosti, klinických abnormalit, vlivu na reprodukční výkonnost a schopnost vrhu, změny tělesné hmotnosti, vlivu na úmrtnost a další toxické účinky.
74. Vzhledem ke krátké době expozice samců je třeba histopatologii varlat a nadvarlat zvažovat při posuzování reprodukčních účinků u samců společně s údaji o fertilitě. Jako pomůcka pro interpretaci studie může být také užitečné použití historických kontrolních údajů o reprodukci/vývoji (např. o velikosti vrhu, AGD, retenčních mléčných cystách, sérových hladinách T4), pokud jsou tyto údaje k dispozici.
75. Za účelem kontroly jakosti se navrhuje, aby se shromáždily historické kontrolní údaje a vypočítaly se koeficienty rozptylu pro číselné údaje, zejména pro parametry spojené s detekcí endokrinních disruptorů. Tyto údaje pak lze použít pro účely srovnání při hodnocení stávajících studií.

Závěrečná zpráva

76. Závěrečná zpráva by měla obsahovat tyto informace:

Zkoušená chemická látka:

- zdroj, číslo šarže a, je-li k dispozici, datum použitelnosti,
- stabilita zkoušené chemické látky, je-li známa.

Jednosložková látka:

- fyzický vzhled, rozpustnost ve vodě a další relevantní fyzikálně-chemické vlastnosti,
- chemická identifikace, např. název podle IUPAC nebo CAS, číslo CAS, kód SMILES nebo InChI, strukturní vzorec, čistota, případně chemická identita nečistot, je-li to prakticky možné, atd.

Vícesložkové látky, UVBC a směsi:

- charakterizované pokud možno chemickou identitou (viz výše), kvantitativním výskytem a relevantními fyzikálně-chemickými vlastnostmi složek.

Vehikulum (je-li použito):

- zdůvodnění výběru vehikula, pokud není použita voda.

Pokusná zvířata:

- použitý druh/kmen,
- počet, věk a pohlaví zvířat,
- původ, podmínky chovu, strava atd.,
- hmotnost jednotlivých zvířat na začátku zkoušky,
- zdůvodnění použití druhu, pokud je jiný než potkan.

Zkušební podmínky:

- zdůvodnění zvolených úrovní dávek,
- podrobnosti o složení zkoušené chemické látky/úpravě potravy, o použité koncentraci, stálosti a homogenitě přípravku,
- podrobné údaje o podávání zkoušené chemické látky,
- popřípadě přepočet koncentrace zkoušené chemické látky v krmivu/pitné vodě (ppm) na skutečnou denní dávku (mg/kg tělesné hmotnosti/den),
- podrobnosti o jakosti krmení a vody,
- podrobný popis postupů randomizace při výběru mláďat pro třídění, jsou-li tříděna.

Výsledky:

- tělesná hmotnost/změny tělesné hmotnosti,
- spotřeba krmiva, popřípadě spotřeba vody,

- údaje o toxických reakcích podle pohlaví a dávky, včetně ukazatelů plodnosti, gestace a všech dalších známek toxicity,
- délka gestace,
- toxické nebo jiné účinky na reprodukci, potomstvo, postnatální růst atd.,
- povaha, závažnost a trvání klinických projevů (ať vratných, či nevratných),
- posouzení reaktivity na smyslové podněty, úchopové síly a motorické aktivity,
- hematologická vyšetření s příslušnými základními hodnotami (normami),
- klinická biochemická vyšetření s příslušnými výchozími hodnotami (normami),
- počet dospělých samic s normálním nebo abnormálním estrálním cyklem a trváním cyklu,
- počet živě narozených mláďat a postimplantačních ztrát,
- počet mláďat s nápadnými strukturálními abnormalitami, orientační hodnocení vnějších genitálií, počet zakrslých mláďat,
- den úhynu během studie nebo údaj, že zvířata přežila až do dne utracení,
- počet implantovaných plodů, velikost vrhu a hmotnost vrhu v době pořízení záznamu,
- údaje o tělesné hmotnosti mláďat,
- AGD všech mláďat (a tělesná hmotnost v den měření AGD),
- retenční mléčné cysty u mláďat samců,
- hladiny hormonů štítné žlázy u 13denních mláďat a dospělých samců (a u samic a 4denních mláďat, jsou-li tyto hodnoty měřeny),
- tělesná hmotnost při utracení a údaje o hmotnosti orgánů u rodičovských zvířat,
- pitevní nálezy,
- podrobný popis histopatologických nálezů,
- údaje o absorpci (jsou-li k dispozici),
- statistické vyhodnocení výsledků, je-li to možné.

Rozbor výsledků.

Závěry.

Interpretace výsledků

77. Studie poskytne hodnocení reprodukční/vývojové toxicity spojené s podáváním opakovaných dávek. Vzhledem k tomu, že důraz je kladen na sledované vlastnosti všeobecné toxicity i na sledované vlastnosti reprodukční/vývojové toxicity, umožní výsledky této studie rozlišení mezi reprodukčními/vývojovými účinky vyskytujícími se za

nepřítomnosti všeobecné toxicity a účinky projevujícími se pouze při úrovních, které jsou toxické i pro rodičovská zvířata (viz odstavce 7–11). Mohla by naznačit nutnost provést další výzkum a poskytnout vodítko pro návrh dalších studií. Jako pomůcka při interpretaci výsledků v oblasti reprodukce a vývoje by měl posloužit pokyn OECD č. 43 (19). Pokyn OECD č. 106 týkající se histologického hodnocení endokrinních a reprodukčních zkoušek u hlodavců (16) poskytuje informace o přípravě a hodnocení (endokrinních) orgánů a vaginálních stěrů, což může být pro tuto zkušební metodu užitečné.

LITERATURA

- (1) OECD (1990). Room Document No 1 for the 14th Joint Meeting of the Chemicals Group and Management Committee. K dispozici na vyžádání u Organizace pro hospodářskou spolupráci a rozvoj, Paříž.
- (2) OECD (1992). Chairman's Report of the ad hoc Expert Meeting on Reproductive Toxicity Screening Methods, Tokyo, 27th-29th October, 1992. K dispozici na vyžádání u Organizace pro hospodářskou spolupráci a rozvoj, Paříž.
- (3) Mitsumori K., Kodama Y., Uchida O., Takada K., Saito M. Naito K., Tanaka S., Kurokawa Y., Usami M., Kawashima K., Yasuhara K., Toyoda K., Onodera H., Furukawa F., Takahashi M. and Hayashi Y. (1994). Confirmation Study, Using Nitro-Benzene, of the Combined Repeat Dose and Reproductive/ Developmental Toxicity Test Protocol Proposed by the Organization for Economic Cooperation and Development (OECD). *J. Toxicol, Sci.*, 19, 141-149.
- (4) Tanaka S., Kawashima K., Naito K., Usami M., Nakadate M., Imaida K., Takahashi M., Hayashi Y., Kurokawa Y. and Tobe M. (1992). Combined Repeat Dose and Reproductive/Developmental Toxicity Screening Test (OECD): Familiarization Using Cyclophosphamide. *Fundam. Environ. Toxicol.*, 18, 89-95.
- (5) OECD (1998). Report of the First Meeting of the OECD Endocrine Disrupter Testing and Assessment (EDTA) Task Force, 10th-11th March 1998, Available upon request at Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris
- (6) OECD (2015). Feasibility Study for Minor Enhancements of TG 421/422 with ED Relevant Endpoints. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 217), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (7) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment, and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluations, Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (No 19), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (8) Goldman J.M., Murr A.S., Buckalew A.R., Ferrell J.M. and Cooper R.L. (2007). The Rodent Estrous Cycle: Characterization of Vaginal Cytology and its Utility in Toxicological Studies, *Birth Defects Research*, Part B, 80 (2), 84-97.

- (9) Sadleir R.M.F.S. (1979). Cycles and Seasons, in Auston C.R. and Short R.V. (Eds.), *Reproduction in Mammals: I. Germ Cells and Fertilization*, Cambridge, New York.
- (10) IPCS (1986). Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals. Environmental Health Criteria Document (No 60).
- (11) Moser V.C., McDaniel K.M. and Phillips P.M. (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of Amitraz. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 108, 267-283.
- (12) Meyer O.A., Tilson H.A., Byrd W.C. and Riley M.T. (1979). A Method for the Routine Assessment of Fore- and Hindlimb Grip Strength of Rats and Mice. *Neurobehav. Toxicol.*, 1, 233-236.
- (13) Crofton K.M., Howard J.L., Moser V.C., Gill M.W., Reiter L.W., Tilson H.A., MacPhail R.C. (1991). Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. *Neurotoxicol. Teratol.* 13, 599-609.
- (14) Gallavan R.H. Jr, J.F. Holson, D.G. Stump, J.F. Knapp and V.L. Reynolds. (1999). "Interpreting the Toxicologic Significance of Alterations in Anogenital Distance: Potential for Confounding Effects of Progeny Body Weights", *Reproductive Toxicology*, 13: 383-390.
- (15) OECD (2013). Guidance Document in Support of the Test Guideline on the Extended One Generation Reproductive Toxicity Study. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 151). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (16) OECD (2009). Guidance Document for Histologic Evaluation of Endocrine and Reproductive Tests in Rodents. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 106) Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (17) Hess RA and Moore BJ. (1993). Histological Methods for the Evaluation of the Testis. V: Methods in Reproductive Toxicology, Chapin RE and Heindel JJ (Eds.). Academic Press: San Diego, CA, pp. 52-85.
- (18) Latendresse JR, Warbritton AR, Jonassen H, Creasy DM. (2002). Fixation of Testes and Eyes Using a Modified Davidson's Fluid: Comparison with Bouin's Fluid and Conventional Davidson's fluid. *Toxicol. Pathol.* 30, 524-533.
- (19) OECD (2008). Guidance Document on Mammalian Reproductive Toxicity Testing and Assessment. Environment, Health and Safety Publications,

Series on Testing and Assessment (No 43), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

- (20) OECD (2011), Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption (No 150), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

Dodatek 1

DEFINICE (VIZ TAKÉ (20) POKYN OECD Č. 150)

Androgenicita je schopnost chemické látky působit v organismu savců jako přirozený androgenní hormon (např. testosteron).

Antiandrogenicita je schopnost chemické látky potlačit v organismu savců působení přirozeného androgenního hormonu (např. testosteronu).

Antiestrogenicita je schopnost chemické látky potlačit v organismu savců působení přirozeného estrogenního hormonu (např. estradiolu 17β).

Antityreoidální působení je schopnost chemické látky potlačit v organismu savců působení přirozeného hormonu štítné žlázy (např. T₃).

Chemická látka je látka nebo směs.

Vývojová toxicita: projev reprodukční toxicity představující prenatalní, perinatální, postnatální, strukturální nebo funkční poruchy u potomstva.

Dávkou se rozumí množství podané zkoušené chemické látky. Dávka se vyjadřuje jako hmotnost zkoušené chemické látky na jednotku tělesné hmotnosti zvířete za den (např. mg/kg tělesné hmotnosti/den) nebo jako konstantní koncentrace v krmivu.

Dávkováním se rozumí obecný termín zahrnující dávku, četnost a trvání doby, po kterou je látka podávána.

Zřejmá toxicita je obecný termín popisující jasné příznaky toxicity po podání zkoušené chemické látky. Ty by měly být dostačující pro posouzení nebezpečnosti a měly by být takové, že při zvýšení podávané dávky lze očekávat rozvoj závažných toxických příznaků a pravděpodobnou mortalitu.

Porucha plodnosti představuje poruchy samčích nebo samičích reprodukčních funkcí nebo schopnosti.

Mateřská toxicita: nežádoucí účinky na březí samice vyskytující se buď specificky (přímý účinek), nebo nespecificky (nepřímý účinek), které souvisí s graviditou.

NOAEL je zkratka pro angl. „no-observed-adverse-effect level“. Je to nejvyšší úroveň dávky, při které nejsou pozorovány žádné nepříznivé účinky spojené se zkouškou.

Estrogenicita je schopnost chemické látky působit v organismu savců jako přirozený estrogenní hormon (např. estradiol 17β).

Reprodukční toxicita představuje škodlivé účinky na potomstvo a/nebo poruchy samčích

nebo samičích reprodukčních funkcí nebo schopnosti.

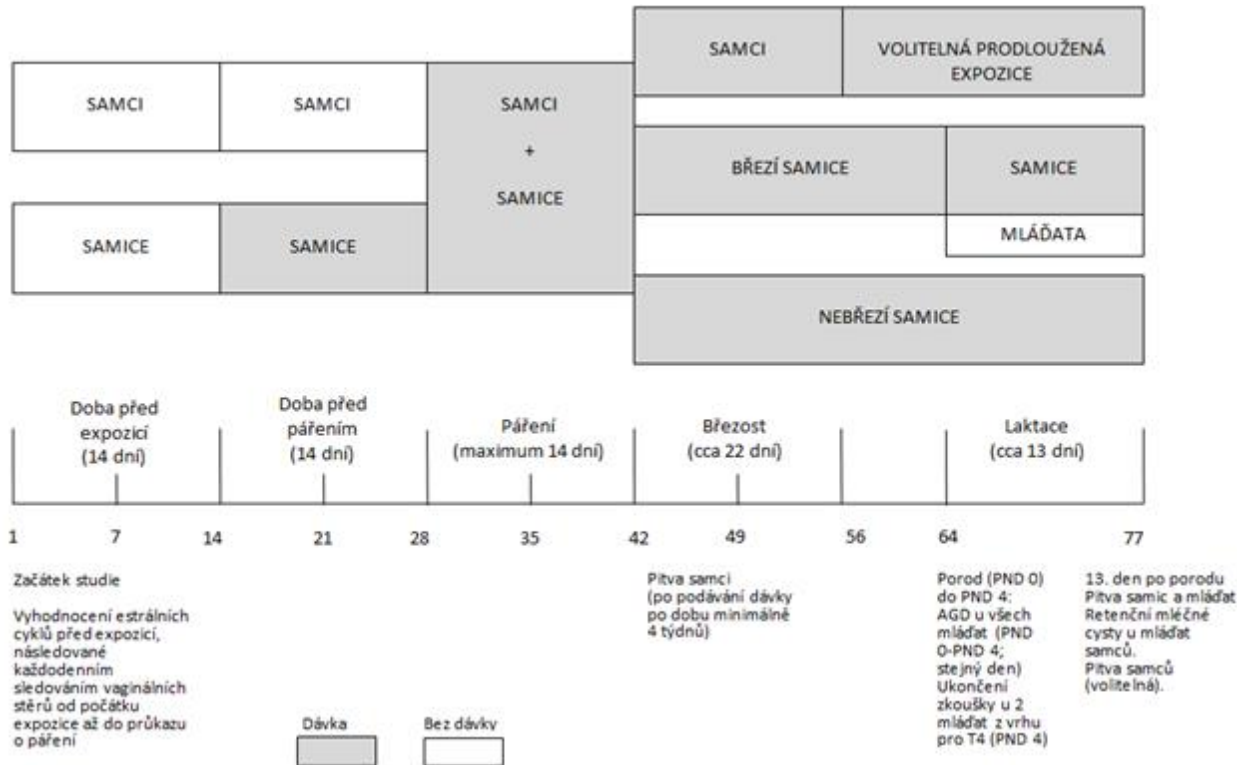
Zkoušená chemická látka je jakákoli látka nebo směs zkoušená touto zkušební metodou.

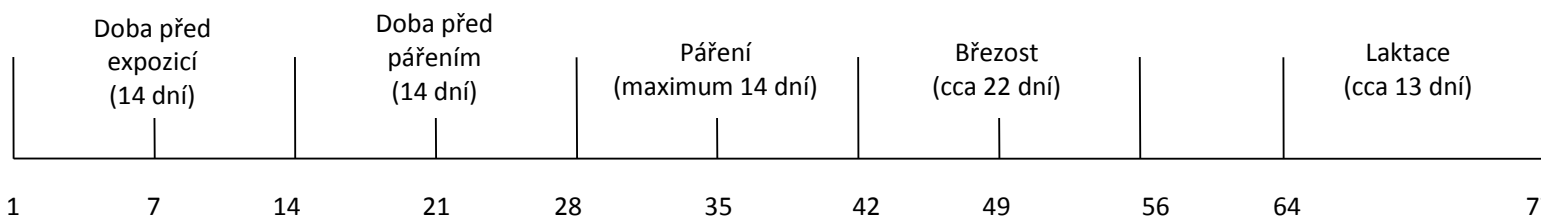
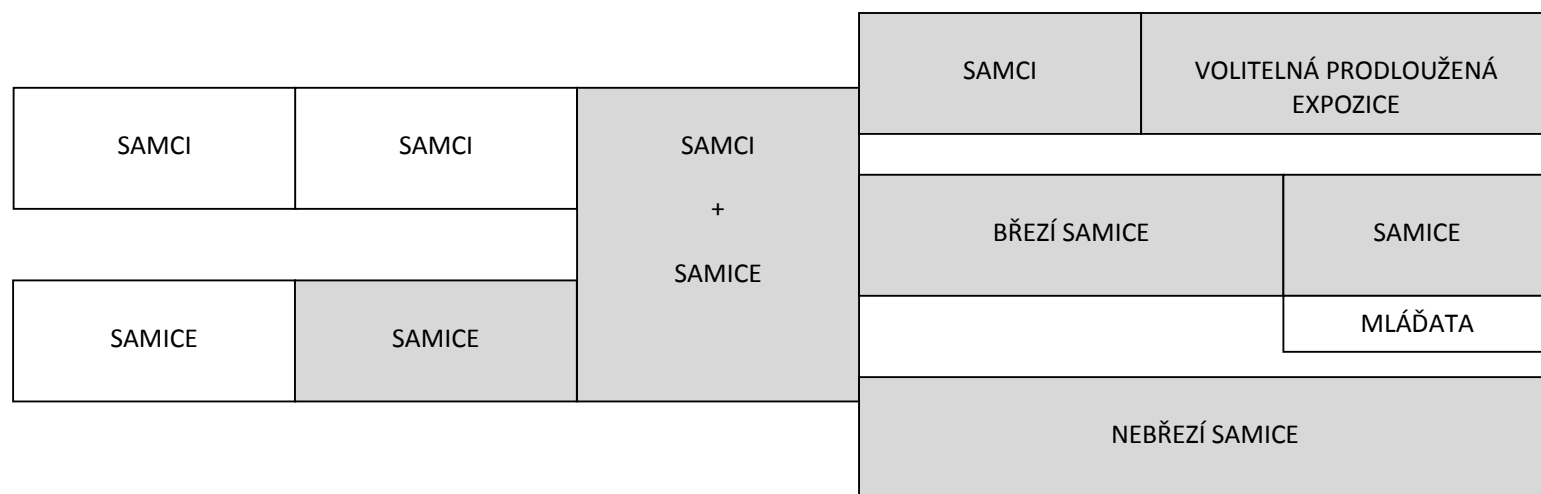
Tyreoidální působení je schopnost chemické látky působit jako přirozený hormon štítné žlázy (např. T_3) v organismu savců.

Validace je vědecký proces, jehož cílem je charakterizovat provozní požadavky a provozní omezení zkušební metody a prokázat její spolehlivost a relevantnost pro určitý konkrétní účel.

Dodatek 2

DIAGRAM ČASOVÉHO PLÁNU EXPERIMENTU SE ZNÁZORNĚNÍM MAXIMÁLNÍ DÉLKY STUDIE NA ZÁKLADĚ CELÉHO ČTRNÁCTIDENNÍHO OBDOBÍ PÁŘENÍ





Začátek studie

Vyhodnocení estrálních cyklů před expozicí, následované každodenním sledováním vaginálních stěrů od počátku expozice až do průkazu o páření

Hematologické vyšetření/ klinické biochem. ukazatele u samců i samic (volitelné)

Pitva samci
Funkční pozorování u samců (volitelné), hematologické vyšetření/ klinické biochem. ukazatele u samců po utracení (po podávání dávky po dobu minimálně 4 týdnů)

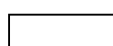
Porod (PND 0) do PND 4: AGD u všech mláďat (PND 0-PND 4; stejný den) Ukončení zkoušky u 2 mláďat z vrhu pro T4 (PND 4)

13. den po porodu Pitva samic a mláďat Pitva samců (volitelná). Funkční pozorování u samců (volitelné) a samic, hematologické vyšetření/ klinické biochem. ukazatele u samců po utracení samic (volitelné). Retenční mléčné cysty u mláďat samců.

Dávka



Bez dávky



Dodatek 3

SOUHRNNÁ ZPRÁVA O ÚČINCÍCH NA REPRODUKCI/VÝVOJ VE FORMĚ TABULKY

POZOROVÁNÍ		HODNOTY			
Dávka (jednotky).....	0 (kontrola)	...	...	...	...
Páry na začátku (N)					
Estrální cyklus (alespoň střední délka a frekvence nepravidelných cyklů)					
Samice vykazující známky kopulace (N)					
Zabřezlé samice (N)					
Dny zabřeznutí 1–5 (N)					
Dny zabřeznutí 6–... ⁽¹⁾ (N)					
Březost ≤ 21 dnů (N)					
Březost = 22 dnů (N)					
Březost ≥ 23 dnů (N)					
Samice s živými novorozenci mláďaty (N)					
Samice s živými novorozenci mláďaty 4. den po porodu (N)					
Implantace/samice (průměr)					
Živá mláďata/samice při narození (průměr)					
Živá mláďata/samice 4. den (průměr)					
Poměr pohlaví (samec/samice) při narození (průměr)					
Poměr pohlaví (samec/samice) 4. den (průměr)					
Hmotnost vrhu při narození (průměr)					
Hmotnost vrhu 4. den (průměr)					
Hmotnost mláďat při narození (průměr)					
Hmotnost mláďat v době měření AGD (průměr samců, průměr samic)					
AGD mláďat ve stejný postnatální den, při narození – 4. den (průměr samců, průměr samic, uvést PND)					
Hmotnost mláďat 4. den (průměr)					
Hmotnost mláďat 13. den (průměr)					
Retenční mléčné cysty u mladých samic 13. den (průměr)					
ABNORMÁLNÍ MLÁĎATA					

⁽¹⁾ poslední den období páření

Samice s 0					
Samice s 1					
Samice s ≥ 2					
ZTRÁTA POTOMSTVA					
Prenatální (implantace minus živě narozená mláďata)					
Samice s 0					
Samice s 1					
Samice s 2					
Samice s ≥ 3					
Postnatální (živě narozená mláďata minus živá mláďata 13. den po porodu)					
Samice s 0					
Samice s 1					
Samice s 2					
Samice s ≥ 3					

B.65 ZKUŠEBNÍ METODA S VYUŽITÍM MEMBRÁNOVÉ BARIÉRY *IN VITRO* PRO LEPTAVÉ ÚČINKY NA KŮŽI

ÚVOD

1. Tato zkušební metoda je rovnocenná Pokynu OECD pro zkoušení č. 435 (2015). Leptavými účinky na kůži se označuje vyvolání nevratného poškození kůže, které se projevuje jako viditelná, do koria zasahující nekróza pokožky, po aplikaci zkoušené chemické látky, jak ji definuje globálně harmonizovaný systém klasifikace a označování chemických látek Organizace spojených národů (GHS OSN) (1) a nařízení Evropské unie (EU) č. 1272/2008 o klasifikaci, označování a balení látek a směsí (dále jen „nařízení CLP“)¹. Tato zkušební metoda, rovnocenná aktualizovanému Pokynu OECD pro zkoušení č. 435, představuje zkušební metodu s využitím membránové bariéry *in vitro*, kterou lze použít na určení žíravých chemických látek. Zkušební metoda využívá umělou membránu navrženou tak, aby reagovala na žíravé chemické látky podobně jako zvířecí kůže *in situ*.
2. Leptavé účinky na kůži se tradičně posuzují aplikací zkoušené chemické látky na kůži živých zvířat, kdy se vyhodnotí rozsah poškození tkáně po stanoveném časovém období (2). Kromě této zkušební metody byla přijata řada jiných zkušebních metod *in vitro* jako alternativy (3) (4) ke standardnímu postupu zkoušení na kůži králíka *in vivo* (kapitola B.4 této přílohy, rovnocenná Pokynu OECD pro zkoušení č. 104), který se používá na určení žíravých chemických látek (2). Strategie odstupňovaného zkoušení a hodnocení podle systému GHS OSN pro hodnocení a klasifikaci leptavých účinků na kůži a dokument OECD k integrovanému přístupu ke zkouškám a posuzování (IATA) látek dráždivých/leptavých pro kůži doporučuje použití validovaných a uznávaných zkušebních metod *in vitro* podle modulů 3 a 4 (1) (5). Integrované přístupy ke zkouškám a posuzování popisují několik modulů, které seskupují informační zdroje a analytické nástroje, a poskytují návod i) na integraci a používání stávajících údajů ze zkoušek i jiných údajů pro posouzení potenciálu dráždivých a leptavých účinků chemických látek na kůži a ii) navrhuje přístup, když je nutné další zkoušení, včetně případů, kdy jsou zjištěny negativní výsledky (5). V tomto modulárním přístupu mohou být pozitivní výsledky zkušebních metod *in vitro* použity pro klasifikaci chemické látky jako žíravé bez nutnosti zkoušek na

¹ Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1272/2008 ze dne 16. prosince 2008 o klasifikaci, označování a balení látek a směsí, o změně a zrušení směrnic 67/548/EHS a 1999/45/ES a o změně nařízení (ES) č. 1907/2006, Úř. věst. L 353, 31.12.2008, s. 1.

zvířatech, čímž se snižuje a kultivuje použití zvířat a vyloučí se bolest a stres, k nimž může dojít, když jsou pro tento účel používána zvířata.

3. Byly dokončeny validační studie pro model s membránovou bariérou *in vitro*, které jsou komerčně dostupné jako Corrositex® (6)(7)(8), vykazující celkovou přesnost predikce leptavých účinků na kůži 79 % (128/163), citlivost 85 % (76/89) a specifčnost 70 % (52/74) u databáze 163 látek a směsí (7). Na základě uznávané validity byla tato validovaná referenční metoda (VRM) doporučena pro použití jako součást strategie odstupňovaného zkoušení pro hodnocení potenciálního rizika leptavých účinků chemických látek na kůži (5) (7). Před použitím použít modelu s membránovou bariérou *in vitro* pro leptavé účinky na kůži pro regulační účely, je zapotřebí stanovit jeho spolehlivost, relevantnost (přesnost) a omezení týkající se jeho navrhovaného použití, aby se zajistila jeho podobnost s VRM (9) v souladu se stanovenými požadavky standardů funkčnosti (10). Vzájemné uznávání údajů bude v rámci OECD zaručeno až poté, co bude každá navrhovaná nebo aktualizovaná metoda podle standardů funkčnosti podrobena revizi a zahrnuta do rovnocenného pokynu OECD pro zkoušení. V současnosti se Pokyn OECD pro zkoušení č. 435 a tato zkušební metoda týká pouze jedné metody *in vitro*, a to komerčně dostupného modelu Corrositex®.
4. Jiné zkušební metody pro zkoušení leptavých účinků na kůži vycházejí z použití rekonstruované lidské kůže (Pokyn OECD pro zkoušení č. 431) (3) a izolované kůže potkana (Pokyn OECD pro zkoušení č. 430) (4). Tento pokyn také stanoví podrobnější klasifikaci žravých chemických látek do tří podkategorií žravých látek podle systému GHS OSN a tří přepravních obalových skupin podle systému OSN pro nebezpečí žravé látky. Tento pokyn byl původně přijat v roce 2006 a v roce 2015 byl aktualizován o odkazy na pokyny IATA a aktualizaci seznamu vhodných látek.

DEFINICE

5. Použité definice jsou uvedeny v dodatku.

VÝCHOZÍ ÚVAHY A OMEZENÍ

6. Zkouška popsaná v této zkušební metodě umožňuje určení žravých zkoušených látek a dále umožňuje podrobnou klasifikaci žravých zkoušených chemických látek podle systému GHS OSN/CLP (tabulka 1). Kromě toho může být taková zkušební metoda použita pro rozhodnutí o žravosti a nežravosti konkrétních tříd chemických látek, např.

organických a anorganických kyselin, derivátů kyselin¹ a zásad pro některé účely zkoušení v oblasti přepravy (7)(11)(12). Tato zkušební metoda popisuje obecný postup podobný validované referenční zkušební metodě (7). I když tato zkušební metoda neposkytuje odpovídající informace o dráždivosti pro kůži, je třeba poznamenat, že zkušební metoda B.46 (rovnocenná Pokynu OECD pro zkoušení č. 439) řeší konkrétně zdravotní účinky dráždivosti pro kůži *in vitro* (13). Pro úplné vyhodnocení lokálních účinků na kůži po jednotlivých kožních expozicích je třeba postupovat podle pokynů OECD k integrovanému přístupu ke zkouškám a posuzování (5).

Tabulka 1: Kategorie a podkategorie leptavých účinků na kůži podle systému GHS OSN (1)

Kategorie žíravých látek (kategorie 1) (pro orgány nepoužívající podkategorie)	Podkategorie potenciálně žíravých látek ² (pro orgány používající podkategorie, včetně nařízení CLP)	Žíravá u ≥ 1 ze 3 zvířat	
		Expozice	Pozorované příznaky
Žíravá	Podkategorie žíravosti 1A	≤ 3 minuty	≤ 1 hodina
	Podkategorie žíravosti 1B	> 3 minuty / ≤ 1 hodina	≤ 14 dnů
	Podkategorie žíravosti 1C	> 1 hodina / ≤ 4 hodiny	≤ 14 dnů

- Omezení této validované referenční metody (7) spočívá v tom, že mnoho nežíravých chemických látek a některé žíravé chemické látky nemusí být vhodné pro zkoušení na základě výsledků úvodního testu kompatibility (viz odstavec 13). Vodné chemické látky s pH v rozsahu 4,5 až 8,5 často nejsou pro zkoušení vhodné; 85 % chemických látek zkoušených v tomto rozmezí pH však nemělo ve zkouškách na zvířatech leptavé účinky (7). Metoda s membránovou bariérou *in vitro* může být použita na zkoušení pevných látek (rozpustných nebo nerozpustných ve vodě), kapalin (vodných a nevodných) a emulzí. Zkoušené chemické látky nevyvolávající zjistitelnou změnu při testu kompatibility (tj. barevná změna v chemickém detekčním systému (CDS) validované referenční zkušební metody) však nemohou být testovány metodou s membránovou bariérou a je třeba je testovat pomocí jiných zkušebních metod.

¹ „Derivát kyseliny“ je nespecifické označení třídy a obecně je definován jako kyselina vzniklá z chemické látky buď přímo, anebo v důsledku úpravy či částečné substituce. Tato třída zahrnuje anhydridy, halogenové kyseliny, soli a jiné druhy chemických látek.

² Pro EU používá nařízení CLP tři podkategorie látek s leptavými účinky na kůži 1A, 1B a 1C.

PRINCIP ZKOUŠKY

8. Zkušební systém sestává ze dvou komponentů: syntetické makromolekulární biobariéry a chemického detekčního systému (CDS); tato zkušební metoda detekuje přes CDS poškození membránové bariéry způsobené žíravými zkoušenými chemickými látkami po aplikaci zkoušené chemické látky na povrch syntetické makromolekulární membránové bariéry (7), pravděpodobně stejným mechanismem (mechanismy) žíravosti, který působí na živou kůži.
9. Penetraci membránové bariéry (neboli proniknutí) lze měřit podle počtu zákroků nebo pomocí chemického detekčního systému, včetně změny barvy pH indikačního barviva či některé jiné vlastnosti indikačního roztoku pod bariérou.
10. Membránová bariéra by měla být stanovena jako validní, tj. relevantní a spolehlivá, pro zamýšlené použití. Zahrnuje to zajištění, aby byly různé přípravky shodné, pokud jde o bariérové vlastnosti, např. aby dokázaly zachovat bariéru proti nežíravým chemickým látkám a aby umožňovaly klasifikaci leptavých vlastností chemických látek do různých podkategorií žíravosti podle systému GHS OSN (1). Klasifikace vychází z doby, která je potřebná k tomu, aby chemická látka pronikla přes membránovou bariéru do indikačního roztoku.

PROKÁZÁNÍ ZPŮSOBILOSTI

11. Dříve než začnou laboratoře rutinně používat metodu s membránovou bariérou *in vitro*, která dodržuje tuto zkušební metodu, měly by prokázat svou odbornou způsobilost správným určením klasifikace dvanácti vhodných látek doporučených v tabulce 2. V situacích, kdy některá z uvedených látek není k dispozici, lze v odůvodněných případech použít jinou látku, u níž jsou k dispozici odpovídající referenční údaje o použití *in vivo* a *in vitro* (např. ze seznamu referenčních chemických látek (10)), pokud budou použita stejná kritéria výběru jako kritéria popsaná v tabulce 1.

Tabulka 2: Vhodné látky¹

Látka ²	Číslo CAS	Třída chemických látek	Podkategorie GHS OSN <i>in vivo</i> ³	Podkategorie GHS OSN <i>in vitro</i> ³
Dihydrát fluoridu boritého	13319-75-0 Org.	Anorganické kyseliny	1A	1A
Kyselina dusičná	7697-37-2	Anorganické kyseliny	1A	1A
Chlorid fosforečný	10026-13-8	Anorganické kyseliny	1A	1A
Valerylchlorid	638-29-9	Chloridy kyselin	1B	1B

Hydroxid sodný	1310-73-2	Anorganické zásady	1B	1B
1-(2-aminoethyl) piperazin	140-31-8	Alifatické aminy	1B	1B
Benzensulfonylchlorid	98-09-9	Chloridy kyselin	1C	1C
N,N-dimethylbenzylamin	103-83-3	Aniliny	1C	1C
Tetraethylenepentamin	112-57-2	Alifatické aminy	1C	1C
Eugenol	97-53-0	Fenoly	NC	NC
Nonylakrylát	2664-55-3	Akryláty/methakryláty	NC	NC
Hydrouhličitan sodný	144-55-8	Anorganické soli	NC	NC

¹Dvanáct látek uvedených výše obsahuje tři látky z každé ze tří podkategorií GHS OSN pro žíravé látky a tři nežíravé látky, které jsou běžně dostupné u komerčních dodavatelů, přičemž podkategorie GHS OSN vychází z výsledků kvalitního testování *in vivo*. Tyto látky jsou převzaty ze seznamu 40 referenčních látek, které jsou uvedeny v minimálním seznamu chemických látek určených pro prokázání přesnosti a spolehlivosti zkušebních metod, jež jsou strukturálně a funkčně podobné validované referenční zkušební metodě, a byly vybrány ze 163 referenčních chemických látek, které byly původně použity pro validaci referenční zkušební metody (Corrositex®) (7) (10) (14). Cílem tohoto výběru bylo zahrnout pokud možno chemické látky, které: byly charakteristické pro celý rozsah poleptání (např. nežíravé látky, žíravé látky přepravních obalových skupin I, II a III podle systému OSN), jež validovaná referenční metoda dokáže změřit nebo predikovat, byly charakteristické pro chemické třídy použité v průběhu validačního procesu, mají chemickou strukturu, která byla dobře definována, vyvolávaly ve validované referenční zkušební metodě reprodukovatelné výsledky, vyvolávaly v referenční zkoušce *in vivo* definitivní výsledky, byly komerčně dostupné a nebyly spojeny s příliš vysokými náklady na likvidaci odpadu (14).

²Látky zkoušené v čistém stavu nebo s čistotou ≥ 90 %.

³Odpovídající obalové skupiny jsou UN I, II a III pro podkategorie GHS OSN 1A, 1B, respektive 1C.

NC („non-corrosive“): nežíravá.

POSTUP

12. V dalších odstavcích jsou popsány složky a postupy zkušební metody využívající umělou membránovou bariéru na posouzení leptavosti (7) (15) a vycházející ze stávající validované referenční metody, tj. komerčně dostupného testu Corrositex®. Membránová bariéra a kompatibilní/indikační a kategorizační roztoky mohou být zhotoveny, připraveny nebo pořízeny komerčně, jako je tomu v případě validované referenční metody Corrositex®. Protokol vzorové zkušební metody pro validovanou referenční zkušební metodu je k dispozici (7). Zkoušení je třeba provádět při teplotě okolí (17–25 °C) a jednotlivé složky by měly splňovat tyto podmínky.

Zkouška kompatibility zkoušené chemické látky

13. Před provedením zkoušky s membránovou bariérou se provádí zkouška kompatibility za účelem stanovení, zda chemický detekční systém dokáže zkoušenou chemickou látku detekovat. Jestliže chemický detekční systém nedetekuje zkoušenou chemickou látku, není

zkušební metoda využívající membránovou bariéru vhodná pro posouzení potenciálních leptavých účinků této konkrétní zkoušené chemické látky a je třeba použít jinou zkušební metodu. Chemický detekční systém a podmínky expozice použité pro zkoušku kompatibility by měly odrážet expozici při následné zkoušce s membránovou bariérou.

Zkouška časové kategorie zkoušené chemické látky

14. Pokud je to pro zkušební metodu vhodné, měla by být zkoušená chemická látka, která prošla zkouškou kompatibility, podrobena zkoušce časové kategorie, tj. screeningové zkoušce na rozlišení slabých a silných kyselin nebo zásad. Například ve validované referenční zkušební metodě se časová kategorizační zkouška používá na zjištění, který ze dvou časových rámců má být použit, a to podle toho, zda je detekována významná kyselá nebo zásaditá rezerva. Na stanovení žíravosti a podkategorie leptavých účinků na kůži podle systému GHS OSN by se měly použít dva různé limitní časové rámce, a to podle kyselé nebo zásadité rezervy zkoušené chemické látky.

SLOŽKY ZKUŠEBNÍ METODY S MEMBRÁNOVOU BARIÉROU

Membránová bariéra

15. Membránová bariéra sestává ze dvou komponentů: bílkovinného makromolekulárního vodného gelu a propustné nosné membrány. Bílkovinný gel by měl být nepropustný pro kapaliny a pevné látky, ale při naleptání by měl začít propouštět. Kompletně zhotovená membránová bariéra by měla být uchovávána za předem určených podmínek, které prokazatelně vylučují znehodnocení gelu, např. vysušení, mikrobiální růst, posun, prasknutí, které by mohlo degradovat jeho funkčnost. Je třeba stanovit přijatelnou dobu uchovávání a po jejím uplynutí přípravky s membránovou bariérou nepoužívat.
16. Propustná nosná membrána představuje mechanickou oporu pro bílkovinný gel v průběhu procesu vzniku gelu a expozice zkoušené chemické látky. Nosná membrána by měla zabránit průhybu nebo posunu gelu a měla by být dobře prostupná pro všechny zkoušené chemické látky.
17. Bílkovinný gel složený z bílkovin, např. keratinu, kolagenu nebo směsí bílkovin, který vytváří gelovou matici, slouží jako cíl pro zkoušenou chemickou látku. Bílkovinný materiál se umístí na povrch nosné membrány a umožní se prostup do gelu, než se membránová bariéra umístí na indikační roztok. Bílkovinný gel by měl mít všude stejnou tloušťku a hustotu a neměly by v něm být žádné vzduchové bublinky ani vady, které by mohly ovlivnit jeho funkční neporušenost.

Chemický detekční systém (CDS)

18. Indikační roztok, což je stejný roztok, jaký se používá pro zkoušku kompatibility, by měl reagovat na přítomnost zkoušené chemické látky. Používá se pH indikační barvivo nebo

kombinace barviv, *např.* kresolová červeň a methyloaranž, které ukážou změnu barvy v reakci na přítomnost zkoušené chemické látky. Systém měření může být vizuální nebo elektronický.

19. Je třeba posoudit relevantnost a spolehlivost detekčních systémů, které jsou vyvinuty pro detekci průchodu zkoušené chemické látky přes bariérovou membránu, aby bylo možné prokázat rozsah chemických látek, které lze detekovat, a kvantitativní limity detekce.

POSTUP ZKOUŠKY

Sestavení komponentů zkušební metody

20. Membránová bariéra se vloží do lavičky (nebo zkumavky) obsahující indikační roztok tak, aby byla nosná membrána úplně v kontaktu s indikačním roztokem a aby na ní nebyly žádné vzduchové bublinky. Je třeba dbát na to, aby bariéra nebyla porušena.

Aplikace zkoušené chemické látky

21. Na horní povrch membránové bariéry se pečlivě nanese a rovnoměrně rozprostře vhodné množství zkoušené chemické látky, *např.* 500 μ l kapaliny nebo 500 mg jemně rozdrcené pevné látky (7). Pro každou zkoušenou chemickou látku a odpovídající kontroly se připraví vhodný počet replikátů, *např.* čtyři (7) (viz odstavce 23 až 25). Čas nanesení zkoušené chemické látky na membránovou bariéru se zaznamená. Aby bylo zajištěno přesné zaznamenání krátkých dob leptání, časy aplikace zkoušené chemické látky do lahvíček s replikáty se rozloží.

Měření průniku přes membránovou bariéru

22. Každá lahvička se řádně sleduje a zaznamená se čas první změny indikačního roztoku, tj. průnik přes bariéru, a určí se doba, která uplynula mezi aplikací a průnikem přes membránovou bariéru.

Kontroly

23. U zkoušek, které zahrnují použití vehikula nebo rozpouštědla se zkoušenou chemickou látkou, by vehikulum nebo rozpouštědlo mělo být kompatibilní se systémem membránové bariéry, tj. nemělo by narušit neporušenost systému membránové bariéry a měnit leptavé účinky zkoušené chemické látky. V případě potřeby je třeba kontrolu s rozpouštědlem (nebo vehikulem) zkoušet souběžně se zkoušenou chemickou látkou, aby se prokázala kompatibilita rozpouštědla se systémem membránové bariéry.
24. Pozitivní (leptavé účinky) kontrolu se střední žíravostí, *např.* 110 ± 15 mg hydroxidu sodného (podkategorie žíravých látek 1B podle systému GHS OSN) (7), je třeba provádět souběžně se zkoušenou chemickou látkou, aby bylo možné posoudit, zda zkušební systém funguje přijatelným způsobem. Pro hodnocení relativního leptavého potenciálu žíravé

zkoušené chemické látky může být užitečná druhá pozitivní kontrola s látkou ze stejné chemické třídy jako zkoušená chemická látka. Pozitivní kontrolu (kontroly) je třeba volit tak, aby byly její leptavé účinky střední (např. podkategorie 1B podle GHS OSN), aby bylo možné detekovat změny doby průniku, které by mohly být nepříjemně delší nebo kratší než stanovená referenční hodnota, což by naznačovalo, že zkušební systém nefunguje správně. Pro tento účel jsou extrémně žíravé (podkategorie 1A podle GHS OSN) nebo nežíravé chemické látky jen málo vhodné. Žíravá chemická látka podkategorie 1B podle GHS OSN by umožňovala detekci příliš rychlé nebo příliš pomalé doby průniku. Pro pozitivní kontrolu by mohla být použita slabě žíravá látka (podkategorie 1C podle GHS OSN) pro měření schopnosti zkušební metody konzistentně rozlišovat mezi slabě žíravými a nežíravými chemickými látkami. Bez ohledu na použitý přístup by měl být přijatelný rozsah odezvy pozitivní kontroly stanoven podle dosavadního rozsahu dob průniku u použité pozitivní kontroly (kontrol), například střední hodnota $\pm 2-3$ směrodatné odchylky. V každé studii by měla být přesná doba průniku stanovena pro pozitivní kontrolu tak, aby mohly být detekovány odchylky mimo přijatelný rozsah.

25. Jako další opatření pro kontrolu kvality za účelem prokázání funkčnosti membránové bariéry by měla být souběžně se zkoušenou chemickou látkou provedena také negativní (látka bez leptavých účinků) kontrola, např. 10% kyselina citronová, 6% kyselina propionová (7).

Kritéria přijatelnosti studie

26. Na predikci leptavých účinků zkoušené chemické látky se podle stanovených časových parametrů pro jednotlivé podkategorie leptavých účinků GHS OSN použije doba (v minutách), která uplynula mezi aplikací zkoušené chemické látky na membránovou bariéru a průnikem přes bariéru. Aby mohla být studie považována za přijatelnou, měla by souběžná pozitivní kontrola ukázat očekávanou dobu průniku (např. pokud je jako pozitivní kontrola použit hydroxid sodný, je doba průniku 8–16 minut), souběžná negativní kontrola by neměla vykazovat leptavé účinky, a pokud je zařazena souběžná kontrola s rozpouštědlem, neměla by tato kontrola vykazovat leptavé účinky ani by neměla měnit potenciál žíravosti zkoušené chemické látky. Před rutinním používáním metody, která se řídí touto zkušební metodou, by laboratoře měly prokázat odbornou způsobilost při použití dvanácti látek doporučených v tabulce 2. U nových metod typu „mee-too“ vyvinutých podle této zkušební metody, které jsou strukturálně a funkčně podobné validované referenční metodě (14), by měly být použity předem definované standardy funkčnosti na prokázání spolehlivosti a přesnosti nové metody, než bude tato metoda použita pro zkoušení pro regulační účely (10).

Interpretace výsledků a klasifikace žíravosti zkoušených chemických látek

27. Pro klasifikaci zkoušené chemické látky do podkategorií žíravosti podle systému GHS OSN (1), případně podle přepravních obalových skupin OSN (16) se používá doba (v

minutách), která uplynula mezi aplikací zkoušené chemické látky na membránovou bariéru a průnikem přes bariéru. Pro každou navrhovanou zkušební metodu jsou stanoveny hraniční časové hodnoty pro každou ze tří podkategorií žíravosti. Konečné rozhodnutí o hraničních časových hodnotách by mělo vzít v úvahu nutnost minimalizovat podhodnocenou klasifikaci rizika leptavých účinků (tj. falešně negativní výsledky). V současném pokynu pro zkoušení by měly být použity hraniční časové hodnoty testu Corrositex® uvedené v tabulce 3, neboť tento test představuje jedinou zkušební metodu, která v současnosti odpovídá pokynu pro zkoušení (7).

Tabulka 3: Predikční model Corrositex®

Střední doba průniku (min)		Predikce podle GHS OSN ³
Zkoušené chemické látky kategorie 1 ¹ (stanovené podle kategorizační zkoušky metody)	Zkoušené chemické látky kategorie 2 ² (stanovené podle kategorizační zkoušky metody)	
0–3 min	0–3 min	Žíravá doplňková podkategorie 1A
> 3 až 60 min	> 3 až 30 min	Žíravá doplňková podkategorie 1B
> 60 až 240 min	> 30 až 60 min	Žíravá doplňková podkategorie 1C
> 240 min	> 60 min	Nežíravá

¹ Zkoušené chemické látky s vysokou kyselou/zásaditou rezervou (6)

² Zkoušené chemické látky s nízkou kyselou/zásaditou rezervou (6)

³ Podkategorie 1A, 1B a 1C podle systému GHS OSN odpovídají obalovým skupinám OSN I, II, respektive III.

ÚDAJE A PŘEDKLÁDÁNÍ ZPRÁV

Údaje

28. Doba (v minutách), která uplynula mezi aplikací a průnikem přes bariéru u zkoušené chemické látky a pozitivní kontroly (kontrol), se vykazuje ve formě tabulky jako údaje o jednotlivých replikátech a střední hodnoty $\pm$ směrodatné odchylky pro každou zkoušku.

Závěrečná zpráva

29. Závěrečná zpráva by měla obsahovat tyto informace:

Zkoušené chemické látky a kontrolní látky

- jednosložková látka: chemická identifikace, např. název podle IUPAC nebo CAS, číslo CAS, kód SMILES nebo InChI, strukturní vzorec, čistota, případně chemická identita nečistot, je-li to prakticky možné, atd.
- vícesložková látka, UVCB a směs: charakterizované pokud možno chemickou identitou (viz výše), kvantitativním výskytem a relevantními fyzikálně-chemickými vlastnostmi složek,
- fyzický vzhled, rozpustnost ve vodě a další relevantní fyzikálně-chemické vlastnosti,
- zdroj, číslo šarže, jsou-li k dispozici,
- případně ošetření zkoušené chemické látky / kontrolní látky před zkoušením (např. zahřátí, mletí),
- stabilita zkoušené chemické látky, datum použitelnosti nebo datum opětovné analýzy, je-li známo,
- podmínky skladování.

Vehikulum:

- identifikace, koncentrace (podle potřeby), použitý objem,
- zdůvodnění výběru vehikula.

Model s membránovou bariérou in vitro a použitý protokol, včetně prokázané přesnosti a spolehlivosti

Zkušební podmínky:

- popis použitého zařízení a postupů přípravy,
- zdroj a složení použité membránové bariéry *in vitro*,
- složení a vlastnosti indikačního roztoku,
- metoda detekce,
- množství zkoušené chemické látky a kontrolní látky,
- počet opakování,
- popis a odůvodnění časové kategorizační zkoušky,
- způsob aplikace,
- doby pozorování,
- popis použitých hodnotících kritérií a klasifikačních kritérií,
- prokázání způsobilosti při provádění zkušební metody před rutinním použitím při zkoušení chemických látek pro prokázání způsobilosti.

Výsledky:

- jednotlivá nezpracovaná data z jednotlivých zkoušek a kontrolních vzorků pro každý replikát ve formě tabulky,
- popis ostatních pozorovaných účinků,
- odvozená klasifikace s odkazem na použitý predikční model / kritéria rozhodování.

Diskuse o výsledcích

Závěry

LITERATURA

- (1) United Nations (UN) (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), First Revised Edition, UN New York and Geneva, 2013. Dostupné na internetových stránkách: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html.
- (2) Kapitola B.4 této přílohy, Akutní dráždivé/leptavé účinky na kůži.
- (3) Kapitola B.40a této přílohy, Leptavé účinky na kůži *in vitro*: zkušební metoda za použití rekonstruované lidské epidermis (RHE).
- (4) Kapitola B.40 této přílohy, Leptavé účinky na kůži *in vitro*: Transkutánní elektrický odpor (TER).
- (5) OECD (2015). Guidance Document on Integrated Approaches to Testing and Assessment of Skin Irritation/Corrosion. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (No 203). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (6) Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdaile, D.J., Holzhutter, H.-G. and Liebsch, M. (1998). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Skin Corrosivity. 2. Results and Evaluation by the Management Team. Toxicology *In Vitro* 12, 483-524.
- (7) ICCVAM (1999). Corrositex®. An *In Vitro* Test Method for Assessing Dermal Corrosivity Potential of Chemicals. The Results of an Independent Peer Review Evaluation Coordinated by ICCVAM, NTP and NICEATM. NIEHS, NIH Publication (No 99-4495.)
- (8) Gordon V.C., Harvell J.D. and Maibach H.I. (1994). Dermal Corrosion, the Corrositex® System: A DOT Accepted Method to Predict Corrosivity Potential of Test Materials. *In vitro* Skin Toxicology-Irritation, Phototoxicity, Sensitization. Alternative Methods in Toxicology 10, 37-45.
- (9) OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environmental, Health and Safety Publications. Series on testing and Assessment (No 34).
- (10) OECD (2014). Performance Standards for the Assessment of Proposed Similar or Modified *In Vitro* Membrane Barrier Test Method for Skin Corrosion in Relation to TG 435. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Dostupné na webových stránkách: <http://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/PerfStand-TG430-June14.pdf>.

- (11) ECVAM (2001). Statement on the Application of the CORROSITEX® Assay for Skin Corrosivity Testing. 15th Meeting of ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC), Ispira, Italy. ATLA 29, 96-97.
- (12) U.S. DOT (2002). Exemption DOT-E-10904 (Fifth Revision). (September 20, 2002). Washington, D.C., U.S. DOT.
- (13) Kapitola B.46 této přílohy, Dráždivost pro kůži *in vitro*: Zkušební metoda za použití rekonstruované lidské epidermis. ICCVAM (2004). ICCVAM Recommended Performance Standards for *In Vitro* Test Methods for Skin Corrosion. NIEHS, NIH Publication No 04-4510. Dostupné na internetových stránkách:
http://www.ntp.niehs.nih.gov/iccvam/docs/dermal_docs/ps/ps044510.pdf.
- (14) U.S. EPA (1996). Method 1120, Dermal Corrosion. Dostupné na internetových stránkách:
<http://www.epa.gov/osw/hazard/testmethods/sw846/pdfs/1120.pdf>.
- (15) United Nations (UN) (2013). UN Recommendations on the Transport of Dangerous Goods, Model Regulations, 18th Revised Edition (Part, Chapter 2.8), UN, 2013. Dostupné na internetových stránkách:
http://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/unrec/rev18/English/Rev18_Volume1_Part2.pdf.

Dodatek

DEFINICE

Přesnost: přesnost shody mezi výsledky zkušební metody a přijatými referenčními hodnotami. Je to míra funkčnosti zkušební metody a jeden z aspektů její relevantnosti. Tento pojem se často používá místo pojmu „soulad“ a rozumí se jím podíl správných výsledků zkušební metody (9).

Chemická látka: látka nebo směs.

Chemický detekční systém (CDS): vizuální nebo elektronický měřicí systém s indikačním roztokem, který reaguje na přítomnost zkoušené chemické látky, *např.* změnou indikačního barviva pH nebo kombinace barviv, jež ukáže barevnou změnu v reakci na přítomnost zkoušené chemické látky, nebo jinými druhy chemické či elektrochemické reakce.

Soulad: je měřítkem funkčnosti u zkušebních metod poskytujících kategorické výsledky a je jedním z aspektů relevantnosti. Tento pojem se někdy používá místo pojmu „přesnost“ a je definován jako podíl všech zkoušených chemických látek, které jsou správně klasifikovány jako pozitivní nebo negativní. Soulad závisí do velké míry na prevalenci pozitivních výsledků u druhů studovaných zkoušených chemických látek (9).

GHS (Globálně harmonizovaný systém klasifikace a označování chemických látek): systém navrhuje klasifikaci chemických látek (látek a směsí) podle standardizovaných typů a úrovní fyzikální, zdravotní a environmentální nebezpečnosti a zabývající se příslušnými komunikačními prvky, jako jsou piktogramy, signální slova, výroky o nebezpečí, výroky o bezpečnostních opatřeních a bezpečnostní datové listy, které obsahují informace o jejich nežádoucích účincích s ohledem na ochranu lidí (včetně zaměstnavatelů, pracovníků, přepraveců, spotřebitelů a osob reagujících na nouzové situace) a životního prostředí (1).

IATA: integrovaný přístup ke zkoušení a posuzování.

Směs: směs nebo roztok složený ze dvou nebo více látek.

Jednosložková látka: látka definovaná svým kvantitativním složením, v níž je přítomna jedna hlavní složka v míře alespoň 80 % hmot.

Vícesložková látka: látka definovaná svým kvantitativním složením, v níž je přítomna více než jedna hlavní složka v koncentraci ≥ 10 % hmot. a < 80 % hmot. Vícesložková látka je výsledkem výrobního procesu. Rozdíl mezi směsí a vícesložkovou látkou spočívá v tom, že směs se získá smísením dvou nebo více látek bez chemické reakce. Vícesložková látka je výsledkem chemické reakce.

NC („non-corrosive“): nežíravá.

Standardy funkčnosti: standardy založené na validované referenční metodě, které slouží jako základ pro hodnocení srovnatelnosti navrhované zkušební metody, která je mechanicky a funkčně podobná. Zahrnují i) zásadní složky zkušební metody; ii) minimální seznam referenčních chemických látek vybraných z chemických látek používaných k prokázání přijatelné funkčnosti validované referenční metody; a iii) srovnatelné hladiny spolehlivosti a přesnosti založené na hodnotách získaných u validované referenční metody, jež by navrhovaná zkušební metoda měla prokázat při vyhodnocení za použití minimálního seznamu referenčních chemických látek (9).

Relevantnost: popis vztahu zkoušky k účinku, který je předmětem zájmu, a také toho, zda je zkouška smysluplná a použitelná pro konkrétní účel. Vyjadřuje, do jaké míry zkušební metoda správně měří nebo predikuje biologický účinek, který je předmětem zájmu. Relevantnost zahrnuje také posouzení přesnosti (shody) zkušební metody (9).

Spolehlivost: měření rozsahu, v jakém může být zkušební metoda v průběhu času reprodukovatelná v laboratořích a mezi laboratořemi, když se provádí s použitím stejného protokolu. Hodnotí se na základě výpočtu vnitrolaboratorní a mezilaboratorní reprodukovatelnosti (9).

Citlivost: podíl všech pozitivních/aktivních chemických látek, které jsou na základě zkušební metody správně klasifikovány. Je měřítkem přesnosti zkušební metody, která poskytuje kategorické výsledky, a je důležitým prvkem při hodnocení relevantnosti zkušební metody (9).

Leptavé účinky na kůži *in vivo*: vyvolání nevratného poškození kůže; zejména viditelné, do koria zasahující nekrózy pokožky do čtyř hodin po aplikaci zkoušené chemické látky. Reakce po poleptání se projevují vředy, krvácením, krvavými strupy a v závěru čtrnáctidenního pozorování ztrátou barvy v důsledku vyblednutí kůže, úplnými ložisky alopecie a jizvami. K vyhodnocení sporných lézí by se měla uvážit histopatologie.

Specifičnost: podíl všech negativních/neaktivních chemických látek, které jsou na základě zkušební metody správně klasifikovány. Je měřítkem přesnosti zkušební metody, která poskytuje kategorické výsledky, a je důležitým prvkem při hodnocení relevantnosti zkušební metody (9).

Látka: chemický prvek a jeho sloučeniny v přírodním stavu nebo získané výrobním postupem, včetně jakýchkoliv aditiv potřebných pro zachování jeho stability a všech nečistot pocházejících z použitého postupu, ale s vyloučením všech rozpouštědel, která je možno oddělit bez ovlivnění stability dané látky nebo změny jejího složení.

Zkoušená chemická látka: jakákoli látka nebo směs zkoušená touto zkušební metodou.

UVCB: látky s neznámým nebo proměnlivým složením, komplexní reakční produkty nebo biologický materiál.“

B.66 ZKOUŠKY *IN VITRO* FORMOU STABILNĚ TRANSFEKOVANÉ TRANSAKTIVACE SLOUŽÍCÍ K DETEKCI AGONISTŮ A ANTAGONISTŮ ESTROGENOVÝCH RECEPTORŮ

VŠEOBECNÝ ÚVOD

Pokyn OECD vycházející z funkční způsobilosti

1. Tato zkušební metoda odpovídá pokynu OECD pro zkoušení (TG) 455 (2016). Pokyn č. 455 je pokyn vycházející z funkční způsobilosti (PBTG), který popisuje metodiku zkoušek *in vitro* formou stabilně transfekované transaktivace sloužící k detekci agonistů a antagonistů estrogenových receptorů (analýzy ER TA). Skládá se z několika mechanisticky a funkčně podobných zkušebních metod zjišťování agonistů a antagonistů estrogenových receptorů (tj. ER α a/nebo ER β) a měl by usnadnit vypracování nových podobných nebo modifikovaných zkušebních metod podle zásad pro validaci stanovených v dokumentu OECD o validaci a mezinárodním uznání nových nebo aktualizovaných zkušebních metod pro posuzování nebezpečnosti (1). Plně validovanými referenčními zkušebními metodami (dodatek 2 a dodatek 3), které představují základ pro tento pokyn vycházející z funkční způsobilosti, jsou:
 - analýza STTA (2) s využitím buněčné linie (h) ER α -HeLa-9903, a
 - analýza VM7Luc ER TA (3) s využitím buněčné linie¹ VM7Luc4E2, která převážně exprimuje hER α s určitým příspěvkem od hER β (4)(5).

Pro vývoj a validaci podobných analýz stejného rizika jsou k dispozici standardy funkčnosti (PS) (6)(7), které by se měly používat. Umožňují včasnou změnu pokynu PBTG 455, aby mohly být do aktualizovaného pokynu přidány nové podobné analýzy; podobné analýzy však budou přidány až po přezkumu a dohodě s OECD, že splňují standardy funkčnosti. Analýzy zařazené do pokynu 455 mohou být použity libovolně pro řešení požadavků členských zemí OECD na výsledky zkoušek na

¹ Do června 2016 byla tato buněčná linie označována za buněčnou linii BG1Luc. Buňky BG-1 původně popsal Geisinger et al. (1998) (35) a později je charakterizovali výzkumníci v Národním ústavu věd o zdraví a životním prostředí (NIEHS) (36). Relativně nedávno bylo objeveno, že existují dvě různé varianty buněk BG-1, které používají výzkumníci, a to BG-1 Fr a BG-1 NIEHS. Hlubková analýza zahrnující testování DNA těchto dvou variantních buněčných linií BG-1, kterou provedl Li a spolupracovníci (2014) (37), ukázala, že buněčná linie BG-1 Fr je jedinečná a že buněčná linie BG-1 NIEHS, tj. původní buněčná linie použitá při vývoji analýzy, není buněčná linie lidského karcinomu vaječníku BG1, ale že jde o variantu buněčné linie lidského karcinomu prsu MCF7. Buněčná linie použitá při analýze, původně nazývaná BG1Luc4E2 (38), se bude nyní označovat jako VM7Luc4E2 („V“ = variantní; „M7“ = buňky MCF7). Podobně se bude analýza nyní označovat jako VM7Luc ER TA. I když se mění původ buněčné linie, z níž analýza vychází, nejsou tím dotčeny publikované validační studie ani využitelnost a použití této analýzy pro screening estrogenních/antiestrogenních chemických látek.

transaktivaci estrogenových receptorů při využití vzájemného uznávání údajů podle postupu dohodnutého v rámci OECD.

Obecné informace a principy analýz zahrnutých do této zkušební metody

2. V roce 1998 zahájila OECD činnost vysoké priority, jejíž podstatou je revize stávajících a vytvoření nových pokynů pro screening a zkoušení potenciálních endokrinních disruptorů. V roce 2012 byl revidován koncepční rámec OECD pro zkoušky a hodnocení potenciálních endokrinních disruptorů. Původní i revidovaný koncepční rámec je uveden v přílohách dokumentu OECD o standardizovaných pokynech pro zkoušení a posuzování endokrinních disruptorů (*Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption*) (8). Koncepční rámec je tvořen pěti úrovněmi, které odpovídají různým úrovním biologické komplexnosti. Analýzy ER transaktivace (TA) popsané v této zkušební metodě představují úroveň 2, která zahrnuje „analýzy *in vivo* poskytující údaje o vybraných endokrinních mechanismech/drahách“. Tato zkušební metoda je pro analýzy transaktivace (TA) *in vitro* určené na zjištění agonistů a antagonistů estrogenových receptorů (ER).
3. Interakce estrogenů s estrogenovými receptory může ovlivnit transkripci estrogenem kontrolovaných genů, což může vést k indukci nebo inhibici buněčných procesů, včetně procesů nezbytných pro buněčnou proliferaci, normální vývoj plodu a reprodukční funkci (9)(10)(11). Narušení normálních estrogenních systémů může spustit nežádoucí účinky v oblasti normálního vývoje (ontogeneze), reprodukčního zdraví a správné funkce reprodukčního systému.
4. Analýzy TA *in vitro* vycházejí z přímé nebo nepřímé interakce látek se specifickým receptorem, který reguluje transkripci reportérového genového produktu. Tyto analýzy se široce používají na hodnocení genové exprese regulované specifickými jadernými receptory, jako jsou estrogenové receptory (12)(13)(14)(15)(16). Byly navrženy pro detekci estrogenní transaktivace regulované estrogenovým receptorem (17)(18)(19). Existují minimálně dva hlavní podtypy jaderných estrogenových receptorů, α a β , které jsou kódovány odlišnými geny. Příslušné bílkoviny mají různé biologické funkce i různou distribuci v tkáních a vazebnou afinitu ligandů (20)(21)(22)(23)(24)(25)(26). Jaderné ER α zprostředkovávají klasickou estrogenní odpověď (27)(28)(29)(30), a proto je většina modelů, které jsou v současnosti vyvíjeny na měření aktivace nebo inhibice estrogenových receptorů, specifická pro ER α . Analýzy se používají k určení chemických látek, které aktivují (nebo inhibují) estrogenové receptory po vazbě na ligandy, kdy se poté komplex receptor–ligand naváže na specifické responzivní elementy DNA a transaktivuje reportérový gen, přičemž výsledkem je zvýšená buněčná exprese proteinového markeru. V těchto analýzách mohou být použity různé odpovědi reportérových genů. V systémech na bázi luciferázy transformuje enzym luciferáza substrát luciferin na bioluminiscenční produkt, který může být kvantitativně změřen luminometrem. Mezi další příklady

běžných reportérových genů patří fluorescenční protein a gen *LacZ*, který kóduje β -galaktosidázu, enzym, který dokáže transformovat bezbarvý substrát X-gal (5-bromo-4-chloro-indolyl-galaktopyranosid) na modrý produkt, který lze kvantifikovat pomocí spektrofotometru. Tyto reportérové geny lze rychle a levně vyhodnotit pomocí komerčně dostupných testů.

5. Validační studie analýz STTA a VM7Luc TA prokázaly svoji relevanci a spolehlivost pro zamýšlený účel (3)(4)(5)(30). Standardy funkčnosti pro analýzy ER TA na bázi luminiscence využívající buněčné linie prsu jsou uvedeny v hodnotící zprávě výboru ICCVAM týkající se zkušební metody LUMI-CELL[®] ER (VM7Luc ER TA): *An In Vitro Assay for Identifying Human Estrogen Receptor Agonist and Antagonist Activity of Chemicals* (3). Tyto standardy funkčnosti byly upraveny, aby je bylo možné použít na analýzu STTA i analýzu VM7Luc TA (2).
6. Definice a zkratky používané v této zkušební metodě jsou popsány v dodatku 1.

Platnost a omezení analýz TA

7. Tyto analýzy jsou navrženy pro účely screeningu a stanovení priorit, ale mohou také poskytovat mechanistické informace, které lze použít při analýze průkaznosti výsledků. Týkají se transaktivace indukované chemickou vazbou na estrogenové receptory v systému *in vitro*. Výsledky proto nelze přímo extrapolovat na komplexní signalizaci a regulaci intaktního endokrinního systému *in vivo*.
8. Transaktivace zprostředkovaná estrogenovými receptory se považuje za jeden z klíčových mechanismů narušení endokrinního systému (ED), i když existují i jiné mechanismy, jejichž prostřednictvím může k tomuto narušení dojít, včetně i) interakcí s jinými receptory a enzymatickými systémy v endokrinním systému, ii) syntézy hormonů, iii) metabolické aktivace anebo inaktivace hormonů, iv) distribuce hormonů do cílových tkání a v) clearance hormonů z těla. Žádná z analýz podle této zkušební metody se nezabývá těmito způsoby účinku.
9. Tato zkušební metoda se zabývá schopností chemických látek aktivovat (tj. účinkovat jako agonisté) a také potlačovat (tj. účinkovat jako antagonisté) transkripci závislou na estrogenových receptorech. Některé chemické látky mohou v závislosti na druhu buněk vykazovat agonistické i antagonistické účinky a jsou známy jako selektivní modulátory estrogenových receptorů (SERM). Chemické látky, které jsou v těchto analýzách negativní, by před vyvozením závěru, že daná chemická látka se na receptor neváže, mohly být posouzeny v testu vazby na estrogenové receptory. Dále je pravděpodobné, že tyto analýzy budou informovat pouze o účinku původní molekuly, přičemž nelze zapomínat na omezenou metabolizační kapacitu buněčných systémů *in vitro*. Vzhledem k tomu, že při validaci byly použity pouze jednotlivé látky, nebyla řešena použitelnost na zkoušené směsi. Zkušební metoda je nicméně teoreticky použitelná i na zkoušení

vícesložkových látek, UVCB a směsí. Před použitím této zkušební metody ke zkoušení vícesložkové látky, UVCB nebo směsi s cílem získat údaje pro zamýšlené regulační účely by mělo být zváženo, zda tato metoda může pro tento účel poskytnout přiměřené výsledky, a pokud ano, proč je tomu tak. Takové úvahy nejsou nutné, pokud existuje právní požadavek na zkoušení dané směsi.

10. V tabulce 1 jsou pro informaci uvedeny výsledky testu na agonistické účinky 34 látek, které byly zkoušeny oběma plně validovanými referenčními zkušebními metodami popsány v této zkušební metodě. Z těchto látek je na základě publikovaných zpráv, včetně analýz na vazbu na ER a TA *in vitro*, anebo uterotrofní analýzy 26 klasifikováno s určitostí jako agonisté ER a 8 negativně (2)(3)(18)(31)(32)(33)(34). V tabulce 2 uvedeny výsledky testu na antagonistické účinky 15 látek, které byly zkoušeny oběma plně validovanými referenčními zkušebními metodami popsány v této zkušební metodě. Z těchto látek jsou na základě publikovaných zpráv, včetně analýz na vazbu na ER a TA *in vitro*, 4 klasifikovány s určitostí/pravděpodobností jako antagonisté ER a 10 negativně (2)(3)(18)(31). Pokud jde o údaje uvedené v tabulce 1 a v tabulce 2, byla mezi oběma referenčními zkušebními metodami u klasifikace všech látek s výjimkou jedné (Mifepristone) 100% shoda u analýz antagonistů, přičemž každá látka byla správně klasifikována jako agonista/antagonista ER nebo negativně. Doplnkové informace o této skupině chemických látek i o dalších chemických látkách zkoušených v analýzách STTA a VM7Luc ER TA v průběhu validačních studií jsou uvedeny ve standardech funkčnosti pro zkoušku ERTA (6)(7), dodatek 2 (tabulky 1, 2 a 3).

Tabulka 1: Přehled výsledků z analýz STTA a VM7Luc ER TA u látek zkoušených pomocí obou analýz na agonistické účinky a klasifikovaných jako agonisté ER (POS) nebo negativní (NEG)

	Látka	Číslo CAS	STTA Assay ¹			VM7Luc ER TA Assay ²		Zdroj údajů pro klasifikaci ⁴		
			ER TA aktivita	Hodnota PC ₁₀ (M)	Hodnota PC ₅₀ ^b (M)	ER TA aktivita	Hodnota EC ₅₀ ^{b,3} (M)	Jiné ER TA	ER vazba	Uterotrofní
1	17β-estradiol ^a	50-28-2	POS	$<1,00 \times 10^{-11}$	$<1,00 \times 10^{-11}$	POS	$5,63 \times 10^{-12}$	POS (227/227)	POS	POS
2	17α-estradiol ^a	57-91-0	POS	$7,24 \times 10^{-11}$	$6,44 \times 10^{-10}$	POS	$1,40 \times 10^{-9}$	POS(11/11)	POS	POS
3	17-alfa-ethinylestradiol ^a	57-63-6	POS	$<1,00 \times 10^{-11}$	$<1,00 \times 10^{-11}$	POS	$7,31 \times 10^{-12}$	POS(22/22)	POS	POS
4	17β-trenbolon	10161-33-8	POS	$1,78 \times 10^{-8}$	$2,73 \times 10^{-7}$	POS	$4,20 \times 10^{-8}$	POS (2/2)	NT	NT
5	19-nortestosteron ^a	434-22-0	POS	$9,64 \times 10^{-9}$	$2,71 \times 10^{-7}$	POS	$1,80 \times 10^{-6}$	POS(4/4)	POS	POS
6	4-kumylfenol ^a	599-64-4	POS	$1,49 \times 10^{-7}$	$1,60 \times 10^{-6}$	POS	$3,20 \times 10^{-7}$	POS(5/5)	POS	NT
7	4-terc-oktylfenol ^a	140-66-9	POS	$1,85 \times 10^{-9}$	$7,37 \times 10^{-8}$	POS	$3,19 \times 10^{-8}$	POS(21/24)	POS	POS
8	Apigenin ^a	520-36-5	POS	$1,31 \times 10^{-7}$	$5,71 \times 10^{-7}$	POS	$1,60 \times 10^{-6}$	POS(26/26)	POS	NT
9	Atrazin ^a	1912-24-9	NEG	-	-	NEG	-	NEG (30/30)	NEG	NT
10	Bisfenol A ^a	80-05-7	POS	$2,02 \times 10^{-8}$	$2,94 \times 10^{-7}$	POS	$5,33 \times 10^{-7}$	POS(65/65)	POS	POS
11	Bisfenol B ^a	77-40-7	POS	$2,36 \times 10^{-8}$	$2,11 \times 10^{-7}$	POS	$1,95 \times 10^{-7}$	POS(6/6)	POS	POS
12	Butylbenzylftalát ^a	85-68-7	POS	$1,14 \times 10^{-6}$	$4,11 \times 10^{-6}$	POS	$1,98 \times 10^{-6}$	POS(12/14)	POS	NEG
13	Kortikosteron ^a	50-22-6	NEG	-	-	NEG	-	NEG(6/6)	NEG	NT
14	Kumestrol ^a	479-13-0	POS	$1,23 \times 10^{-9}$	$2,00 \times 10^{-8}$	POS	$1,32 \times 10^{-7}$	POS(30/30)	POS	NT
15	Daidzein ^a	486-66-8	POS	$1,76 \times 10^{-8}$	$1,51 \times 10^{-7}$	POS	$7,95 \times 10^{-7}$	POS(39/39)	POS	POS
16	Diethylstilbestrol ^a	56-53-1	POS	$<1,00 \times 10^{-11}$	$2,04 \times 10^{-11}$	POS	$3,34 \times 10^{-11}$	POS(42/42)	POS	NT
17	Di-n-butylftalát	84-74-2	POS	$4,09 \times 10^{-6}$		POS	$4,09 \times 10^{-6}$	POS(6/11)	POS	NEG
18	Ethylparaben	120-47-8	POS	$5,00 \times 10^{-6}$	(žádná hodnota PC ₅₀)	POS	$2,48 \times 10^{-5}$	POS		NT
19	Estron ^a	53-16-7	POS	$3,02 \times 10^{-11}$	$5,88 \times 10^{-10}$	POS	$2,34 \times 10^{-10}$	POS(26/28)	POS	POS
20	Genistein ^a	446-72-0	POS	$2,24 \times 10^{-9}$	$2,45 \times 10^{-8}$	POS	$2,71 \times 10^{-7}$	POS(100/102)	POS	POS
21	Haloperidol	52-86-8	NEG	-	-	NEG	-	NEG (2/2)	NEG	NT
22	Kaempferol ^a	520-18-3	POS	$1,36 \times 10^{-7}$	$1,21 \times 10^{-6}$	POS	$3,99 \times 10^{-6}$	POS(23/23)	POS	NT

23	Kepon ^a	143-50-0	POS	$7,11 \times 10^{-7}$	$7,68 \times 10^{-6}$	POS	$4,91 \times 10^{-7}$	POS(14/18)	POS	NT
24	Ketokonazol	65277-42-1	NEG	-	-	NEG	-	NEG (2/2)	NEG	NT
25	Linuron ^a	330-55-2	NEG	-	-	NEG	-	NEG (8/8)	NEG	NT
26	meso-Hexestrol ^a	84-16-2	POS	$<1,00 \times 10^{-11}$	$2,75 \times 10^{-11}$	POS	$1,65 \times 10^{-11}$	POS(4/4)	POS	NT
27	Methyltestosteron ^a	58-18-4	POS	$1,73 \times 10^{-7}$	$4,11 \times 10^{-6}$	POS	$2,68 \times 10^{-6}$	POS(5/6)	POS	NT
28	Morin	480-16-0	POS	$5,43 \times 10^{-7}$	$4,16 \times 10^{-6}$	POS	$2,37 \times 10^{-6}$	POS (2/2)	POS	NT
29	Norethynodrel ^a	68-23-5	POS	$1,11 \times 10^{-11}$	$1,50 \times 10^{-9}$	POS	$9,39 \times 10^{-10}$	POS (5/5)	POS	NT
30	<i>p,p'</i> -Methoxychlor ^a	72-43-5	POS	$1,23 \times 10^{-6}$	(žádná hodnota PC ₅₀) ^b	POS	$1,92 \times 10^{-6}$	POS (24/27)	POS	POS
31	Fenobarbital ^a	57-30-7	NEG	-	-	NEG	-	NEG (2/2)	NEG	NT
32	Reserpin	50-55-5	NEG	-	-	NEG	-	NEG (4/4)	NEG	NT
33	Spironolakton ^a	52-01-7	NEG	-	-	NEG	-	NEG (4/4)	NEG	NT
34	Testosteron	58-22-0	POS	$2,82 \times 10^{-8}$	$9,78 \times 10^{-6}$	POS	$1,75 \times 10^{-5}$	POS (5/10)	POS	NT

Zkratky: CASRN = Chemical Abstracts Service Registry Number (registrační číslo CAS); M = molární; EC₅₀ = poloviční maximální účinná koncentrace zkoušené látky; NEG = negativní; POS = pozitivní; NT = nezkoušeno; PC₁₀ (a PC₅₀) = koncentrace zkoušené látky, při níž je odpověď 10 % (nebo 50 % u PC₅₀) odpovědi indukované pozitivní kontrolou (E2, 1nM) na každé destičce.

^aBěžné látky zkoušené v analýzách STTA a VM7Luc ER TA, které byly označeny jako agonisté ER nebo negativní a použity na hodnocení přesnosti ve validační studii VM7Luc ER TA (hodnotící zpráva ICCVAM VM7Luc ER TA, tabulka 4-1 (3)).

^bMaximální koncentrace zkoušená bez omezení způsobených cytotoxicitou nebo nerozpustností byla 1×10^{-5} M (analýza STTA) a 1×10^{-3} M (analýza VM7Luc ER TA).

^cČíslo v závorce představuje výsledky zkoušky klasifikované jako pozitivní (POS) nebo negativní (NEG) z celého počtu citovaných studií.

¹Hodnoty uvedené v návrhu zprávy o předběžné validaci a mezilaboratorní validaci pro analýzu stabilně transfekované transaktivace (TA) na detekci estrogenní aktivity – Analýza reportérového genu zprostředkovaného lidským estrogenovým receptorem alfa pomocí buněčné linie hER-HeLa-9903 (2).

²Hodnotící zpráva výboru ICCVAM o zkušební metodě LUMI-CELL® ER (VM7Luc ER TA): Metoda *in vitro* na identifikaci agonistů a antagonistů ER (3).

³Střední hodnoty EC₅₀ byly vypočteny pomocí hodnot uvedených laboratořemi, které prováděly validační studii VM7Luc ER TA (XDS, ECVAM a Hiyoshi) (3).

⁴Klasifikace agonisty ER nebo negativní vycházela z informací uvedených v dokumentech výboru ICCVAM (BRD) pro zkušební metody na vazbu ER a TA (31) a z informací získaných z publikací zveřejněných a kontrolovaných po dokončení dokumentů BRD výboru ICCVAM (2) (3) (18) (31) (33) (34).

Poznámky: Ne každá analýza v rámci této zkušební metody měla stejná měření. V některých situacích nelze vypočítat hodnotu EC₅₀, protože není generována celá křivka dávka-účinek. Zatímco u analýzy STTA je hlavním měřítkem hodnota PC₁₀, mohou existovat i další příklady, kde PC_x poskytne užitečné informace.

Tabulka 2: Porovnání výsledků z analýz STTA a VM7Luc ER TA u látek zkoušených pomocí obou analýz na antagonistické účinky a klasifikovaných jako antagonisté ER (POS) nebo negativní (NEG)

	Látka ^a	CASRN	Analýza ER STTA ¹		Analýza VM7Luc ER TA ²		Kandidát na účinky ER STTA ⁴	ICCVAM ⁵ Dohoda o klasifikaci	MeSH ⁶ Třída chemických látek	Třída produktu ⁷
			ER TA Činnost	Hodnota IC ₅₀ ^b (M)	ER TA Činnost	Hodnota IC ₅₀ ^{b,3} (M)				
1	4-Hydroxytamoxifen	68047-06-3	POS	$3,97 \times 10^{-9}$	POS	$2,08 \times 10^{-7}$	středně POS	POS	Uhlovodík (cyklický)	Léčivý přípravek
2	Dibenzo[a,h]anthracen	53-70-3	POS	žádná hodnota IC ₅₀	POS	žádná hodnota IC ₅₀	POS	PP	Polycyklická sloučenina	Laboratorní chemická látka, přírodní produkt
3	Mifepriston	84371-65-3	POS	$5,61 \times 10^{-6}$	NEG	-	mírně POS	NEG	Steroid	Léčivý přípravek
4	Raloxifen-hydrochlorid	82640-04-8	POS	$7,86 \times 10^{-10}$	POS	$1,19 \times 10^{-9}$	středně POS	POS	Uhlovodík (cyklický)	Léčivý přípravek
5	Tamoxifen	10540-29-1	POS	$4,91 \times 10^{-7}$	POS	$8,17 \times 10^{-7}$	POS	POS	Uhlovodík (cyklický)	Léčivý přípravek
6	17β-estradiol	50-28-2	NEG	-	NEG	-	PN	PN	Steroid	Léčivý přípravek, veterinární látka
7	Apigenin	520-36-5	NEG	-	NEG	-	NEG	NEG	Heterocyklická sloučenina	Barvivo, přírodní produkt, farmaceutický meziprodukt
8	Atrazin	1912-24-9	NEG	-	NEG	-	NEG	PN	Heterocyklická sloučenina	Herbicide
9	Di-n-butylftalát	84-74-2	NEG	-	NEG	-	NEG	NEG	Ester, kyselina ftalová	Kosmetická složka, průmyslová chemická látka, plastifikátor
10	Fenarimol	60168-88-9	NEG	-	NEG	-	nezkoušeno	PN	Heterocyklická sloučenina, pyrimidin	Fungicid
11	Flavon	525-82-6	NEG	-	NEG	-	PN	PN	Flavonoid, heterocyklická sloučenina	Přírodní produkt, léčivý přípravek
12	Flutamid	13311-84-7	NEG	-	NEG	-	NEG	PN	Amid	Léčivý přípravek, veterinární látka
13	Genistein	446-72-0	NEG	-	NEG	-	PN	NEG	Flavonoid, heterocyklická sloučenina	Přírodní produkt, léčivý přípravek

14	p-n-nonylfenol	104-40-5	NEG	-	NEG	-	nezkoušeno	NEG	Fenol	Chemický meziprodukt
15	Resveratrol	501-36-0	NEG	-	NEG	-	PN	NEG	Uhlovodík (cyklický)	Přírodní produkt

Zkratky: CASRN = Chemical Abstracts Service Registry Number (registrační číslo CAS); M = molární; IC₅₀ = poloviční maximální inhibiční koncentrace zkoušené chemické látky; NEG = negativní; PN = pravděpodobně negativní; POS = pozitivní; PP = pravděpodobně pozitivní.

^a Běžné látky zkoušené v analýzách STTA a VM7Luc ER TA, které byly označeny jako antagonisté ER nebo negativní a použity na hodnocení přesnosti ve validační studii VM7Luc ER TA (2) (3).

^b Maximální koncentrace zkoušená bez omezení způsobených cytotoxicitou nebo nerozpustností byla 1 x 10⁻³ M (analýza STTA) a 1 x 10⁻⁵ M (analýza VM7Luc ER TA).

¹ Zpráva o validaci analýzy stabilně transfekované transaktivace na detekci aktivity zprostředkované estrogenovými receptory, část B (2).

² Hodnotící zpráva výboru ICCVAM týkající se zkušební metody LUMI-CELL ER (VM7Luc ER TA): Metoda in vitro na identifikaci agonistů a antagonistů ER (3).

³ Střední hodnoty EC₅₀ byly vypočteny pomocí hodnot uvedených laboratořemi, které prováděly validační studii VM7Luc ER TA (XDS, ECVAM a Hiyoshi) (3).

⁴ ER STTA aktivita se předpokládá na základě hlášených účinků známých z dosavadních údajů CERI o testování vazby na ER receptor, uterotrofní analýzy a informací shromážděných z otevřených zdrojů literatury (2).

⁵ Klasifikace antagonisty ER nebo negativní vycházela z informací uvedených v dokumentech výboru ICCVAM (BRD) pro analýzy vazby ER a TA (31) a z informací získaných z publikací zveřejněných a kontrolovaných po dokončení dokumentů BRD výboru ICCVAM (2) (3) (18) (31).

⁶ Látky byly zařazeny do jedné nebo několika chemických tříd s použitím klasifikačního systému Národní knihovny názvů léků a léčivých látek (MeSH), mezinárodně uznávané standardizované klasifikace (k dispozici na <http://www.nlm.nih.gov/mesh>).

⁷ Látky byly zařazeny do jedné nebo několika produktových tříd podle databanky nebezpečných látek americké Národní lékařské knihovny (k dispozici na <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB>).

SLOŽKY ANALÝZY ER TA

Zásadní složky zkoušky

11. Tato zkušební metoda se vztahuje na analýzy využívající stabilně transfekovaný nebo endogenní receptor ER α a stabilně transfekovanou reportérovou genovou konstrukci pod kontrolou jednoho nebo několika estrogenových responzivních elementů; mohou však být přítomny i jiné receptory, jako je ER β . Jsou to zásadní složky analýzy.

Kontroly

12. Je třeba popsat východisko pro navrhované souběžné referenční standardy pro každou analýzu agonistů a antagonistů. Souběžné kontroly (negativní, rozpouštědlo a pozitivní) slouží podle potřeby jako indikace, že analýza je za zkušebních podmínek funkční a poskytuje základ pro porovnání jednotlivých experimentů; obvykle jsou součástí kritérií přijatelnosti pro daný experiment (1).

Standardní postupy kontroly kvality

13. Standardní postupy kontroly kvality by měly být prováděny tak, jak je popsáno pro každou analýzu, aby bylo zajištěno, že buněčná linie zůstane stabilní i po opakovaných pasážích, nebudou v ní mykoplazmata (tj. nebude obsahovat bakteriální kontaminaci) a uchová si schopnost podávat očekávané odpovědi zprostředkované estrogenovými receptory v průběhu času. U buněčných linií je třeba dále zkontrolovat správnou identitu a další kontaminanty (např. houby, kvasinky a viry).

Prokázání odborné způsobilosti laboratoře

14. Před zkoušením neznámých chemických látek pomocí některé z analýz v rámci této zkušební metody by měla každá laboratoř prokázat odbornou způsobilost v používání analýzy. Aby laboratoř prokázala svou odbornou způsobilost, měla by analyzovat 14 vhodných látek uvedených v tabulce 3 na agonistické účinky a 10 vhodných látek z tabulky 4 na antagonistické účinky. Toto vyzkoušení odborné způsobilosti rovněž potvrdí reakční schopnost zkušebního systému. Seznam vhodných látek představuje podmnožinu referenčních látek uvedených ve standardech funkčnosti pro analýzy ER TA (6). Tyto látky jsou komerčně dostupné, představují třídy chemických látek běžně souvisejících s ER agonistickými nebo antagonistickými účinky, vykazují vhodný rozsah síly očekávané od ER agonistů/antagonistů (tj. silné až slabé) a zahrnují negativní kontroly. Zkoušení vhodných látek by mělo být alespoň dvakrát zopakováno, a to v různé dny. Odborná způsobilost je prokázána správnou klasifikací (pozitivní/negativní) každé vhodné látky. Zkoušení odborné způsobilosti by měl zopakovat každý technik, který se analýzy učí. Podle typu buňky se mohou některé z těchto vhodných látek chovat jako selektivní modulátory estrogenových

receptorů a vykazovat agonistické i antagonistické účinky. Vhodné látky jsou však v tabulce 3 a 4 klasifikovány podle známé převažující aktivity, která by měla být použita při hodnocení odborné způsobilosti.

15. Pro prokázání funkčnosti a pro účely kontroly kvality by si měla každá laboratoř sestavovat historické databáze agonistů a antagonistů s údaji o referenčním standardu (např. 17 β -estradiol a tamoxifen), chemických látkách pro pozitivní a negativní kontrolu a kontrolu rozpouštědla (např. DMSO). Na začátku by měla být databáze vytvořena z alespoň 10 nezávislých zkoušek na agonistické účinky (např. 17 β -estradiol) a 10 nezávislých zkoušek na antagonistické účinky (např. tamoxifen). Dále se přidají výsledky z budoucích analýz těchto referenčních standardů a kontrol rozpouštědla, aby se databáze rozšířila a byla tak zajištěna konzistence a funkčnost bioanalýz prováděných v laboratoři v průběhu času.

Tabulka 3: Seznam (14) vhodných látek pro analýzu agonistických účinků⁸

č. ⁷	Látka	CASRN	Předpokládaná odpověď ¹	Analýza STTA			Analýza VM7Luc ER TA		Třída chemických látek MeSH ⁵	Třída produktu ⁶
				Hodnota PC ₁₀ (M) ²	Hodnota PC ₅₀ (M) ²	Rozpětí zkušebních konc. (M)	Hodnota VM7Luc EC ₅₀ (M) ³	Nejvyšší konc. pro zjištění rozmezí (M)		
14	Diethylstilbestrol	56-53-1	POS	$< 1,00 \times 10^{-11}$	$2,04 \times 10^{-11}$	$10^{-14} \times 10^{-8}$	$3,34 \times 10^{-11}$	$3,73 \times 10^{-4}$	Uhlovodík (cyklický)	Léčivý přípravek, veterinární látka
12	17 α -estradiol	57-91-0	POS	$4,27 \times 10^{-11}$	$6,44 \times 10^{-10}$	$10^{-11} \times 10^{-5}$	$1,40 \times 10^{-9}$	$3,67 \times 10^{-3}$	Steroid	Léčivý přípravek, veterinární látka
15	meso-Hexestrol	84-16-2	POS	$< 1,00 \times 10^{-11}$	$2,75 \times 10^{-11}$	$10^{-11} \times 10^{-5}$	$1,65 \times 10^{-11}$	$3,70 \times 10^{-3}$	Uhlovodík (cyklický), fenol	Léčivý přípravek, veterinární látka
11	4-terc-oktylfenol	140-66-9	POS	$1,85 \times 10^{-9}$	$7,37 \times 10^{-8}$	$10^{-11} \times 10^{-5}$	$3,19 \times 10^{-8}$	$4,85 \times 10^{-3}$	Fenol	Chemický meziprodukt
9	Genistein	446-72-0	POS	$2,24 \times 10^{-9}$	$2,45 \times 10^{-8}$	$10^{-11} \times 10^{-5}$	$2,71 \times 10^{-7}$	$3,70 \times 10^{-4}$	Flavonoid, heterocyklická sloučenina	Přírodní produkt, léčivý přípravek
6	Bisfenol A	80-05-7	POS	$2,02 \times 10^{-8}$	$2,94 \times 10^{-7}$	$10^{-11} \times 10^{-5}$	$5,33 \times 10^{-7}$	$4,38 \times 10^{-3}$	Fenol	Chemický meziprodukt
2	Kaempferol	520-18-3	POS	$1,36 \times 10^{-7}$	$1,21 \times 10^{-6}$	$10^{-11} \times 10^{-5}$	$3,99 \times 10^{-6}$	$3,49 \times 10^{-3}$	Flavonoid, heterocyklická sloučenina	Přírodní produkt
3	Butylbenzylftalát	85-68-7	POS	$1,14 \times 10^{-6}$	$4,11 \times 10^{-6}$	$10^{-11} \times 10^{-5}$	$1,98 \times 10^{-6}$	$3,20 \times 10^{-4}$	Kyselina karboxylová, ester, kyselina ftalová	Plastifikátor, průmyslová chemická látka
4	p,p'-Methoxychlor	72-43-5	POS	$1,23 \times 10^{-6}$	–	$10^{-11} \times 10^{-5}$	$1,92 \times 10^{-6}$	$2,89 \times 10^{-3}$	Uhlovodík (halogenovaný)	Léčivý přípravek, veterinární látka
1	Ethylparaben	120-47-8	POS	$5,00 \times 10^{-6}$	–	$10^{-11} \times 10^{-5}$	$2,48 \times 10^{-5}$	$6,02 \times 10^{-3}$	Kyselina karboxylová, fenol	Léčivý přípravek, konzervant
17	Atrazin	1912-24-9	NEG	–	–	$10^{-10} - 10^{-4}$	–	$4,64 \times 10^{-4}$	Heterocyklická sloučenina	Herbicid
20	Spironolakton	52-01-7	NEG	–	–	$10^{-11} - 10^{-5}$	–	$2,40 \times 10^{-3}$	Lakton, steroid	Léčivé přípravky
21	Ketokonazol	65277-42-1	NEG	–	–	$10^{-11} - 10^{-5}$	–	$9,41 \times 10^{-5}$	Heterocyklická sloučenina	Léčivé přípravky
22	Reserpin	50-55-5	NEG	–	–	$10^{-11} - 10^{-5}$	–	$1,64 \times 10^{-3}$	Heterocyklická sloučenina, indol	Léčivý přípravek, veterinární látka

Zkratky: CASRN = Chemical Abstracts Service Registry Number (registrační číslo CAS); EC₅₀ = poloviční maximální účinná koncentrace zkoušené látky; NEG = negativní; POS = pozitivní;

PC₁₀ (a PC₅₀) = koncentrace zkoušené látky, při níž je odpověď 10 % (nebo 50 % u PC₅₀) odpovědi indukované pozitivní kontrolou (E2, 1nM) na každé destičce.

¹Klasifikace jako pozitivní nebo negativní u ER agonistických účinků vycházela z dokumentů výboru ICCVAM (BRD) pro analýzy vazby ER a TA (31) a z empirických údajů a dalších informací získaných z citovaných studií zveřejněných a kontrolovaných po dokončení dokumentů BRD výboru ICCVAM (2) (3) (18) (31) (32) (33) (34).

²Hodnoty uvedené v návrhu zprávy o předběžné validaci a mezilaboratorní validaci pro analýzu stabilně transfekované transaktivace (TA) na detekci estrogenní aktivity - Analýza reportérového genu zprostředkovaného lidským estrogenovým receptorem alfa pomocí buněčné linie hER-HeLa-9903 (30).

³Střední hodnoty EC₅₀ byly vypočteny pomocí hodnot uvedených laboratořemi, které prováděly validační studii VM7Luc ER TA (XDS, ECVAM a Hiyoshi) (3).

⁴Uvedené koncentrace byly nejvyšší zkoušené koncentrace (ke zjištění rozsahu) v průběhu validace analýzy VM7Luc ER TA. Když se koncentrace v různých laboratořích lišily, je uvedena nejvyšší koncentrace. Viz tabulka 4-10 hodnotící zprávy výboru ICCVAM o zkušební metodě; Zkušební metoda LUMI-Cell®ER (VM7Luc ER TA): Analýza *in vitro* na zjištění agonistických a antagonistických účinků chemických látek na lidské estrogenové receptory (3).

⁵Látky byly zařazeny do jedné nebo několika chemických tříd s použitím klasifikačního systému Národní knihovny názvů léků a léčivých látek (MeSH), mezinárodně uznávané standardizované klasifikace (k dispozici na <http://www.nlm.nih.gov/mesh>).

⁶Látky byly zařazeny do jedné nebo několika produktových tříd podle databáze nebezpečných látek americké Národní lékařské knihovny (k dispozici na: <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB>).

⁷Z tabulky 1 (Seznam referenčních chemických látek (22) pro hodnocení přesnosti ER agonistů) standardů funkčnosti (6).

⁸Jestliže vhodná látka již není komerčně dostupná, může být použita látka se stejnou klasifikací a srovnatelnou silou, způsobem účinku a ze stejné chemické třídy.

Tabulka 4: Seznam (10) vhodných látek pro analýzu antagonistů

	Látka ^a	CASRN	Analýza ER STTA ¹			Analýza VM7Luc ER TA ²			Kandidát na účinky ER STTA ¹	ICCVAM ⁵ Dohoda o klasifikaci	MeSH ⁶ Třída chemických látek	Třída produktu ⁷
			ER TA aktivita	IC ₅₀ (M)	Rozpětí zkušebních konc. (M)	ER TA aktivita	IC ₅₀ ³ (M)	Nejvyšší konc. pro zjištění rozmezí (M) ⁴				
1	4-Hydroxytamoxifen	68047-06-3	POS	$3,97 \times 10^{-9}$	10^{-12} – 10^{-7}	POS	$2,08 \times 10^{-7}$	$2,58 \times 10^{-4}$	středně POS	POS	Uhlovodík (cyklický)	Léčivé přípravky
2	Raloxifen-hydrochlorid	82640-04-8	POS	$7,86 \times 10^{-10}$	10^{-12} – 10^{-7}	POS	$1,19 \times 10^{-9}$	$1,96 \times 10^{-4}$	středně POS	POS	Uhlovodík (cyklický)	Léčivé přípravky
3	Tamoxifen	10540-29-1	POS	$4,91 \times 10^{-7}$	10^{-10} – 10^{-5}	POS	$8,17 \times 10^{-7}$	$2,69 \times 10^{-4}$	POS	POS	Uhlovodík (cyklický)	Léčivé přípravky
4	17β-estradiol	50-28-2	NEG	–	10^{-9} – 10^{-4}	NEG	–	$3,67 \times 10^{-3}$	negativní*	PN	Steroid	Léčivý přípravek, veterinární látka
5	Apigenin	520-36-5	NEG	–	10^{-9} – 10^{-4}	NEG	–	$3,70 \times 10^{-4}$	NEG	NEG	Heterocyklická sloučenina	Barvivo, přírodní produkt, farmaceutický meziprodukt
6	Di-n-butylftalát	84-74-2	NEG	–	10^{-8} – 10^{-3}	NEG	–	$3,59 \times 10^{-3}$	NEG	NEG	Ester, kyselina ftalová	Kosmetická složka, průmyslová chemická látka, plastifikátor
7	Flavon	525-82-6	NEG	–	10^{-8} – 10^{-3}	NEG	–	$4,50 \times 10^{-4}$	negativní*	PN	Flavonoid, heterocyklická sloučenina	Přírodní produkt, léčivý přípravek
8	Genistein	446-72-0	NEG	–	10^{-9} – 10^{-4}	NEG	–	$3,70 \times 10^{-4}$	negativní*	NEG	Flavonoid, heterocyklická sloučenina	Přírodní produkt, léčivý přípravek
9	p-n-nonylfenol	104-40-5	NEG	–	10^{-9} – 10^{-4}	NEG	–	$4,54 \times 10^{-4}$	nezkoušeno	NEG	Fenol	Chemický meziprodukt
10	Resveratrol	501-36-0	NEG	–	10^{-8} – 10^{-3}	NEG	–	$4,38 \times 10^{-4}$	negativní*	NEG	Uhlovodík	Přírodní produkt

											(cyklický)	

Zkratky: CASRN = Chemical Abstracts Service Registry Number (registrační číslo CAS); M = molární; IC₅₀ = poloviční maximální inhibiční koncentrace zkoušené chemické látky; NEG = negativní; PN = pravděpodobně negativní; POS = pozitivní.

* klasifikováno negativně podle kontroly literatury (2).

^aBěžné látky zkoušené v analýzách STTA a VM7Luc ER TA, které byly označeny jako antagonisté ER nebo negativní a použity na hodnocení přesnosti ve validační studii VM7Luc ER TA (2) (3).

¹ Zpráva o validaci analýzy stabilně transfekované transaktivace na detekci aktivity zprostředkované estrogenovými receptory, část B (2)

² Hodnotící zpráva výboru ICCVAM týkající se zkušební metody LUMI-CELL ER (VM7Luc ER TA): Metoda *in vitro* na identifikaci agonistů a antagonistů ER (3).

³ Střední hodnoty EC50 byly vypočteny pomocí hodnot uvedených laboratořemi, které prováděly validační studii VM7Luc ER TA (XDS, ECVAM a Hiyoshi) (3).

⁴ Uvedené koncentrace byly nejvyšší zkoušené koncentrace (ke zjištění rozsahu) v průběhu validace analýzy VM7Luc ER TA. Když se koncentrace v různých laboratořích lišily, je uvedena nejvyšší koncentrace. Viz tabulka 4-11 hodnotící zprávy výboru ICCVAM o zkušební metodě; Zkušební metoda LUMI-Cell®ER (VM7Luc ER TA): Analýza *in vitro* na zjištění agonistických a antagonistických účinků chemických látek na lidské estrogenové receptory (3).

⁵ Klasifikace antagonisty ER nebo negativní vycházela z informací uvedených v dokumentech výboru ICCVAM (BRD) pro zkušební metody vazby ER a TA (31) a z informací získaných z publikací zveřejněných a kontrolovaných po dokončení dokumentů BRD výboru ICCVAM (2) (3) (18) (31).

⁶ Látky byly zařazeny do jedné nebo několika chemických tříd s použitím klasifikačního systému Národní knihovny názvů léků a léčivých látek (MeSH), což je mezinárodně uznávaná standardizovaná klasifikace (k dispozici na <http://www.nlm.nih.gov/mesh>).

⁷ Látky byly zařazeny do jedné nebo několika produktových tříd podle databanky nebezpečných látek americké Národní knihovny léčiv (k dispozici na <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB>).

Kritéria přijatelnosti provedení zkoušky

16. Přijetí nebo odmítnutí provedené zkoušky vychází z hodnocení výsledků získaných pro referenční standardy a kontroly použité pro každý experiment. Hodnoty pro PC_{50} (EC_{50}) nebo IC_{50} pro referenční standardy by měly splňovat kritéria přijatelnosti stanovená pro zvolenou analýzu (pro STTA viz dodatek 2, pro VM7Luc ER TA viz dodatek 3) a všechny pozitivní/negativní kontroly by měly být pro každý přijatý experiment správně klasifikovány. Schopnost konzistentního provedení analýzy by měla být prokázána vytvořením a údržbou historické databáze referenčních standardů a kontrol (viz odstavec 15). Jako měřítko vnitrolaboratorní reprodukovatelnosti mohou být použity směrodatné odchylky (SD) nebo variační koeficienty (CV) pro střední hodnoty parametrů stanovené křivky referenčních standardů z vícečetných experimentů. Kromě toho by měly být splněny tyto zásady, pokud jde o kritéria přijatelnosti:

- Údaje by měly být dostačující pro kvantitativní posouzení aktivace (u analýzy agonistů) nebo suprese (u analýzy antagonistů) ER (tj. účinnost a síla).
- Střední aktivita reportérových genů pro referenční koncentraci referenčního estrogenu by měla dosahovat alespoň minima stanoveného v analýzách týkajících se aktivity kontroly s vehikulem (rozpouštědlem), aby byla zajištěna adekvátní citlivost. Pro analýzy STTA a VM7Luc ER TA je to čtyřnásobek střední kontroly s vehikulem na každé destičce.
- Zkoušené koncentrace by měly zůstat v rozmezí rozpustnosti zkoušených chemických látek a neměly by vykazovat cytotoxicitu.

Analýza údajů

17. Pro klasifikaci pozitivní a negativní odpovědi by měl být použit definovaný postup interpretace údajů pro každou analýzu.
18. Splnění kritérií přijatelnosti (odstavec 16) ukazuje, že analýza funguje správně, ale nezaručuje to, že konkrétní provedení zkoušky podá přesné údaje. Opakování výsledků první zkoušky je nejlepším důkazem, že údaje byly přesné. Jestliže jsou při dvou provedeních zkoušky získány reprodukovatelné výsledky (např. výsledky z obou provedení ukazují, že zkoušená chemická látka je pozitivní), není nutné provádět zkoušku potřetí.
19. Jestliže dvě provedení zkoušky nepodají reprodukovatelné výsledky (např. zkoušená chemikálie je při jednom provedení pozitivní a při druhém provedení negativní) nebo jestliže je potřebný větší stupeň jistoty, pokud jde o výsledek této analýzy, je třeba provést alespoň tři nezávislé zkoušky. V takovém případě vychází klasifikace ze dvou shodných výsledků ze tří.

Obecná kritéria interpretace údajů

20. V současné době neexistuje žádná univerzálně akceptovaná metoda pro interpretaci údajů ER TA. Kvalitativní (např. pozitivní/negativní) anebo kvantitativní (např. EC₅₀, PC₅₀, IC₅₀) posouzení aktivity zprostředkované estrogenovými receptory by však mělo vycházet z empirických údajů a fundovaného vědeckého úsudku. Pokud je to možné, měly by být pozitivní výsledky charakterizovány jak intenzitou účinku v porovnání s kontrolou vehikulem (rozpouštědlem) nebo referenčním estrogenem, tak i koncentrací, při níž k účinku dochází (např. EC₅₀, PC₅₀, RPC_{Max}, IC₅₀ atd.).

Závěrečná zpráva

21. Závěrečná zpráva by měla obsahovat tyto informace:

Analýza:

- Použitá analýza,
- kontrola / referenční standard / zkoušená chemická látka,
- zdroj, číslo šarže a datum použitelnosti, je-li k dispozici,
- stabilita zkoušené chemické látky samotné, je-li známa,
- rozpustnost a stabilita zkoušené chemické látky v rozpouštědle, jsou-li známy,
- měření pH, případně osmolality a sraženiny v kultivačním médiu, do něhož byla přidána zkoušená chemická látka.

Jednosložková látka:

- fyzický vzhled, rozpustnost ve vodě a další relevantní fyzikálně-chemické vlastnosti,
- chemická identifikace, např. název podle IUPAC nebo CAS, číslo CAS, kód SMILES nebo InChI, strukturní vzorec, čistota, případně chemická identita nečistot, je-li to prakticky možné, atd.

Vícesložková látka, látka s neznámým nebo proměnlivým složením, komplexní reakční produkt nebo biologický materiál a směsi:

- charakterizované pokud možno chemickou identitou (viz výše), kvantitativním výskytem a relevantními fyzikálně-chemickými vlastnostmi složek.

Rozpouštědlo/vehikulum:

- charakterizace (povaha, dodavatel a šarže),
- zdůvodnění volby rozpouštědla/vehikula,

- rozpustnost a stabilita zkoušené chemické látky v rozpouštědle/vehikulu, jsou-li známy.

Buňky:

- typ a zdroj buněk:
 - Je ER endogenně exprimován? Pokud není, které receptory byly transfekovány?
 - použitá (použité) reportérová (reportérové) konstrukce (včetně zdrojových druhů),
 - metoda transfekce,
 - selekční metoda pro udržení stabilní transfekce (ve vhodných případech),
 - je metoda transfekce relevantní pro stabilní linie?
- počet pasáží (z rozmrazených buněk),
- číslo pasáže buněk při rozmrazení,
- metody udržování buněčných kultur.

Zkušební podmínky:

- omezení rozpustnosti,
- popis použitých metod posuzování životaschopnosti,
- složení média, koncentrace CO₂,
- koncentrace zkoušené chemické látky,
- objem vehikula a přidané zkoušené chemické látky,
- inkubační teplota a vlhkost,
- trvání expozice,
- hustota buněk na začátku expozice a během expozice,
- pozitivní a negativní referenční standardy,
- reportérové reagenty (název přípravku, dodavatel a šarže),
- kritéria klasifikace jednotlivých provedení zkoušky na pozitivní, negativní nebo neurčitou.

Kontrola přijatelnosti:

- násobné indukce pro každou destičku, a zda splňují minimum požadované pro analýzu na základě dosavadních kontrol,

- skutečné hodnoty pro kritéria přijatelnosti, např. $\log_{10}EC_{50}$, $\log_{10}PC_{50}$, $\log IC_{50}$ a hodnoty Hillova koeficientu pro souběžné pozitivní kontroly / referenční standardy.

Výsledky:

- nezpracovaná a normalizovaná data,
- maximální úroveň násobku indukce,
- údaje o cytotoxicitě,
- pokud existuje, nejnižší účinná koncentrace (LEC),
- hodnoty RPC_{Max} , PC_{Max} , PC_{50} , IC_{50} a/nebo EC_{50} podle potřeby,
- závislost účinku na koncentraci, pokud je to možné,
- případné statistické analýzy společně s měřítkem chyby a spolehlivosti (např. SEM, SD, CV nebo 95% CI) a popis, jak byly tyto hodnoty získány.

Diskuse o výsledcích

Závěr

LITERATURA

- (1) OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 34.), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (2) OECD (2015). Report of the Inter-Laboratory Validation for Stably Transfected Transactivation Assay to detect Estrogenic and Anti-estrogenic Activity. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 225), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (3) ICCVAM (2011). ICCVAM Test Method Evaluation Report on the LUMI-CELL® ER (BG1Luc ER TA) Test Method, an *In Vitro* Method for Identifying ER Agonists and Antagonists, National Institute of Environmental Health Sciences: Research Triangle Park, NC.
- (4) Pujol P. *et al.* (1998). Differential Expression of Estrogen Receptor-Alpha and -Beta Messenger RNAs as a Potential Marker of Ovarian Carcinogenesis, *Cancer. Res.*, 58(23): s. 5367-73.
- (5) Rogers J.M. and Denison M.S. (2000). Recombinant Cell Bioassays for Endocrine Disruptors: Development of a Stably Transfected Human Ovarian Cell Line for the Detection of Estrogenic and Anti-Estrogenic Chemicals, *In Vitro and Molecular Toxicology: Journal of Basic and Applied Research*, 13(1): s. 67-82.
- (6) OECD (2012). Performance Standards For Stably Transfected Transactivation *In Vitro* Assay to Detect Estrogen Receptor Agonists (for TG 455). Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 173.), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (7) OECD (2015). Performance Standards For Stably Transfected Transactivation *In Vitro* Assay to Detect Estrogen Receptor Antagonists. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 174.), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (8) OECD (2012). Guidance Document on Standardized Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 150.), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

- (9) Cavailles V. (2002). Estrogens and Receptors: an Evolving Concept. *Climacteric*, 5 Suppl 2: s. 20- 6.
- (10) Welboren W.J. *et al.* (2009). Genomic Actions of Estrogen Receptor Alpha: What are the Targets and how are they Regulated? *Endocr. Relat. Cancer*, 16(4): s. 1073-89.
- (11) Younes M. and Honma N. (2011). Estrogen Receptor Beta, *Arch. Pathol. Lab. Med.*, 135(1): s. 63- 6.
- (12) Jefferson W.N., *et al.* (2002). Assessing Estrogenic Activity of Phytochemicals Using Transcriptional Activation and Immature Mouse Uterotrophic Responses, *Journal of Chromatography B*, 777(1-2): s. 179-189.
- (13) Sonneveld E. *et al.* (2006). Comparison of *In Vitro* and *In Vivo* Screening Models for Androgenic and Estrogenic Activities, *Toxicol. Sci.*, 89(1): s. 173-187.
- (14) Takeyoshi M. *et al.* (2002). The Efficacy of Endocrine Disruptor Screening Tests in Detecting Anti- Estrogenic Effects Downstream of Receptor-Ligand Interactions, *Toxicology Letters*, 126(2): s. 91- 98.
- (15) Combes R.D. (2000). Endocrine Disruptors: a Critical Review of *In Vitro* and *In Vivo* Testing Strategies for Assessing their Toxic Hazard to Humans, *ATLA Alternatives to Laboratory Animals*, 28(1): s. 81-118.
- (16) Escande A. *et al.* (2006). Evaluation of Ligand Selectivity Using Reporter Cell Lines Stably Expressing Estrogen Receptor Alpha or Beta, *Biochem. Pharmacol.*, 71(10): s. 1459-69.
- (17) Gray L.E. Jr. (1998). Tiered Screening and Testing Strategy for Xenoestrogens and Antiandrogens, *Toxicol. Lett.*, 102-103, 677-680.
- (18) EDSTAC (1998). Endocrine Disruptor Screening and Testing Advisory Committee (EDSTAC) Final Report.
- (19) ICCVAM (2003). ICCVAM Evaluation of *In Vitro* Test Methods for Detecting Potential Endocrine Disruptors: Estrogen Receptor and Androgen Receptor Binding and Transcriptional Activation Assays.
- (20) Gustafsson J.Ö. (1999). Estrogen Receptor β - A New Dimension in Estrogen Mechanism of Action, *Journal of Endocrinology*, 163(3): s. 379-383.
- (21) Ogawa S. *et al.* (1998). The Complete Primary Structure of Human Estrogen Receptor β (hER β) and its Heterodimerization with ER α *In Vivo* and *In*

- Vitro*, Biochemical and Biophysical Research Communications, 243(1): s. 122-126.
- (22) Enmark E. *et al.* (1997). Human Estrogen Receptor β -Gene Structure, Chromosomal Localization, and Expression Pattern, *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 82(12): s. 4258-4265.
 - (23) Ball L.J. *et al.* (2009). Cell Type- and Estrogen Receptor-Subtype Specific Regulation of Selective Estrogen Receptor Modulator Regulatory Elements, *Molecular and Cellular Endocrinology*, 299(2): s. 204-211.
 - (24) Barkhem T. *et al.* (1998). Differential Response of Estrogen Receptor Alpha and Estrogen Receptor Beta to Partial Estrogen Agonists/Antagonists, *Mol. Pharmacol*, 54(1): s. 105-12.
 - (25) Deroo B.J. and Buensuceso A.V. (2010). Minireview: Estrogen Receptor- β : Mechanistic Insights from Recent Studies, *Molecular Endocrinology*, 24(9): s. 1703-1714.
 - (26) Harris D.M. *et al.* (2005). Phytoestrogens Induce Differential Estrogen Receptor Alpha- or Beta- Mediated Responses in Transfected Breast Cancer Cells, *Experimental Biology and Medicine*, 230(8): s. 558-568.
 - (27) Anderson J.N. Clark J.H. and Peck E.J.Jr. (1972). The Relationship Between Nuclear Receptor- Estrogen Binding and Uterotrophic Responses, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 48(6): s. 1460-1468.
 - (28) Toft D. (1972). The Interaction of Uterine Estrogen Receptors with DNA, *Journal of Steroid Biochemistry*, 3(3): s. 515-522.
 - (29) Gorski J. *et al.* (1968), Hormone Receptors: Studies on the Interaction of Estrogen with the Uterus, *Recent Progress in Hormone Research*, 24: s. 45-80.
 - (30) Jensen E.V. *et al.* (1967), Estrogen-Receptor Interactions in Target Tissues, *Archives d'Anatomie Microscopique et de Morphologie Experimentale*, 56(3): s. 547-569.
 - (31) ICCVAM (2002). Background Review Document: Estrogen Receptor Transcriptional Activation (TA) Assay. Appendix D, Substances Tested in the ER TA Assay, NIH Publication Report (No 03-4505.).
 - (32) Kanno J. *et al.* (2001). The OECD Program to Validate the Rat Uterotrophic Bioassay to Screen Compounds for *In Vivo* Estrogenic Responses: Phase 1, *Environ. Health Persp.*, 109:785-94.

- (33) Kanno J. *et al.* (2003). The OECD Program to Validate the Rat Uterotrophic Bioassay: Phase Two Dose -Response Studies, *Environ. Health Persp.*, 111:1530-1549.
- (34) Kanno J. *et al.* (2003), The OECD Program to Validate the Rat Uterotrophic Bioassay: Phase Two – Coded Single-Dose Studies, *Environ. Health Persp.*, 111:1550-1558.
- (35) Geisinger *et al.* (1989) Characterization of a human ovarian carcinoma cell line with estrogen and progesterone receptors, *Cancer* 63, 280-288.
- (36) Baldwin *et al.* (1998) BG-1 ovarian cell line: an alternative model for examining estrogen-dependent growth *in vitro*, *In Vitro Cell. Dev. Biol. – Animal*, 34, 649-654.
- (37) Li, Y. *et al.* (2014) Research resource: STR DNA profile and gene expression comparisons of human BG-1 cells and a BG-1/MCF-7 clonal variant, *Mol. Endo.* 28, 2072-2081.
- (38) Rogers, J.M. and Denison, M.S. (2000) Recombinant cell bioassays for endocrine disruptors: development of a stably transfected human ovarian cell line for the detection of estrogenic and anti-estrogenic chemicals, *In Vitro & Molec. Toxicol. Chem.* 13, 67-82.

Dodatek 1

DEFINICE A ZKRATKY

Kritéria přijatelnosti: Minimální pravidla pro výkonnost experimentálních kontrol a referenčních standardů. Aby se experiment mohl považovat za platný, měla by být splněna všechna kritéria přijatelnosti.

Přesnost (soulad): Přesnost shody mezi výsledky analýzy a přijatými referenčními hodnotami. Je to měřítko funkčnosti analýzy a jeden z aspektů relevance. Tento pojem se často používá místo pojmu „soulad“ a rozumí se jím podíl správných výsledků analýzy (1).

Agonista: Látka, která vyvolá odpověď, např. transkripci, když se naváže na specifický receptor.

Antagonista: Druh receptorového ligandu nebo chemická látka, která sama nevyvolává biologickou odpověď po navázání na receptor, ale blokuje nebo tlumí odpovědi zprostředkované agonisty.

Antiestrogenní aktivita je schopnost chemické látky potlačit působení 17 β -estradiolu zprostředkované přes estrogenové receptory.

Buněčná morfologie: Tvar a vzhled buněk rostoucích v monovrstvě v jedné jamce destičky pro tkáňové kultury. Buňky, které odumírají, často vykazují abnormální buněčnou morfologii.

CF: Konceptní rámec OECD pro zkoušky a hodnocení endokrinních disruptorů.

Ošetření aktivním uhlím/dextranem: Ošetření séra použitého v buněčné kultuře. Ošetření aktivním uhlím/dextranem (často označované jako „stripping“) odstraňuje endogenní hormony a bílkoviny, na které se hormony vážou.

Chemická látka: Látka nebo směs.

Cytotoxicita: Škodlivé účinky pro buněčnou strukturu nebo funkci, které mohou nakonec způsobit buněčnou smrt a vyvolat snížení počtu buněk přítomných v jamce na konci doby expozice nebo snížení kapacity pro měření buněčné funkce při porovnání se souběžnou kontrolou vehikulem.

CV: Variační koeficient.

DCC-FBS: Fetální bovinní sérum ošetřené aktivním uhlím, které je potaženo dextranem.

DMEM: Dulbeccova modifikace Eaglova média.

DMSO: Dimethylsulfoxid.

E2: 17 β -estradiol.

EC₅₀: Poloviční maximální účinná koncentrace zkoušené chemické látky.

ED: Narušení endokrinní činnosti.

hER α : Lidský estrogenní receptor alfa.

hER β : Lidský estrogenní receptor beta.

EFM: Médium bez estrogenů Dulbeccova modifikace Eaglova média (DMEM) doplněná 4,5 % FBS ošetřeného aktivním uhlím/dextranem, 1,9 % L-glutaminu a 0,9 % Pen-Strepu.

ER: Estrogenový receptor.

ERE: Estrogen responzivní element.

Estrogenní aktivita: Schopnost chemické látky napodobit schopnost 17 β -estradiolu vázat se na estrogenové receptury a aktivovat je. Touto zkušební metodou lze detekovat estrogenní aktivitu zprostředkovanou hER α .

ERTA: Transaktivace estrogenových receptorů.

FBS: Fetální bovinní sérum.

HeLa: Imortalizovaná buněčná linie z lidského děložního hrdla.

HeLa9903: Subklon buněk HeLa, do nichž byly stabilně transfekovány hER α a reportérový gen luciferázy.

IC₅₀: Poloviční maximální účinná koncentrace inhibiční zkoušené chemické látky.

ICCVAM: Meziagenturní koordinační výbor pro validaci alternativních metod.

Mezilaboratorní reprodukovatelnost: Míra, v jaké mohou různé kvalifikované laboratoře za použití stejného protokolu a při testování stejných látek získat kvalitativně a kvantitativně podobné výsledky. Mezilaboratorní reprodukovatelnost se určuje během předvalidačních a validačních postupů a ukazuje, do jaké míry lze analýzu úspěšně přenášet mezi různými laboratořemi (1).

Vnitrolaboratorní reprodukovatelnost: Určení míry, v jaké může kvalifikovaný personál ve stejné laboratoři jindy úspěšně dosáhnout stejných výsledků za použití určitého protokolu. Označuje se také jako „reprodukovatelnost v rámci laboratoře“ (1).

LEC: Nejnižší účinná koncentrace je nejnižší koncentrace zkoušené chemické látky, která

vyvolává odpověď (tj. nejnižší koncentrace zkoušené chemické látky, při níž je násobná indukce statisticky odlišná od souběžné kontroly vehikulem).

Zkouška typu „me-too“: Hovorový výraz pro analýzu, která je strukturálně a funkčně podobná validované a uznávané referenční zkušební metodě. Používá se namísto podobné zkušební metody.

MT: Metallothionein.

MMTV: Virus myšího nádoru prsní žlázy.

OHT: 4-Hydroxytamoxifen.

PBTG: Pokyn vycházející z funkční způsobilosti.

PC (pozitivní kontrola): Silně aktivní látka, nejlépe 17 β -estradiol, která je zařazena do všech zkoušek, a pomáhá tak zajistit správné fungování analýzy.

PC₁₀: Koncentrace zkoušené chemické látky, při níž činí naměřená aktivita v analýze agonistů 10 % maximální aktivity indukované pozitivní kontrolou (E2 při 1nM pro analýzu STTA) na každé destičce.

PC₅₀: Koncentrace zkoušené chemické látky, při níž činí naměřená aktivita v analýze agonistů 50 % maximální aktivity indukované pozitivní kontrolou (E2 při referenční koncentraci stanovené ve zkušební metodě) na každé destičce.

PC_{Max}: Koncentrace zkoušené chemické látky vyvolávající RPC_{Max}.

Standardy funkčnosti: Standardy založené na validované analýze, které slouží jako základ pro hodnocení srovnatelnosti navrhované analýzy, která je mechanicky a funkčně podobná. Zahrnují 1) zásadní složky analýzy; 2) minimální seznam srovnávacích látek vybraných z chemických látek používaných k prokázání přijatelné funkčnosti validované referenční metody; a 3) srovnatelné hladiny přesnosti a spolehlivosti založené na hodnotách získaných u validované zkušební metody, jež by navrhovaná analýza měla prokázat při vyhodnocení za použití minimálního seznamu srovnávacích látek (1).

Vhodné látky: Podsoubor ze seznamu referenčních látek zařazených do standardů funkčnosti, které mohou laboratoře použít k prokázání způsobilosti k provádění standardizované zkušební metody. Kritéria výběru u těchto látek obvykle zahrnují to, že reprezentují celou škálu odpovědí, jsou komerčně dostupné a jsou k nim dostupné kvalitní referenční údaje.

Způsobilost: Prokázaná schopnost řádně provést analýzu před zkoušením neznámých látek.

Referenční estrogen (pozitivní kontrola, PC): 17 β -estradiol (E2, CAS 50-28-2).

Referenční standard: Referenční látka použitá na prokázání vhodnosti analýzy. Pro analýzy STTA a VM7Luc ER TA je referenčním standardem 17 β -estradiol.

Referenční zkušební metody: Analýzy, z nichž vychází pokyn PBTG č. 455.

Relevantnost: Popis vztahu analýzy k účinku, který je předmětem zájmu, a také toho, zda je analýza smysluplná a použitelná pro konkrétní účel. Vyjadřuje, do jaké míry analýza správně měří nebo predikuje biologický účinek, který je předmětem zájmu. Relevantnost zahrnuje také posouzení přesnosti (shody) analýzy (1).

Spolehlivost: Míra rozsahu, v jakém může být analýza časem reprodukovatelná v laboratořích a mezi laboratořemi, když se provádí s použitím stejného protokolu. Hodnotí se to výpočtem laboratorní a mezilaboratorní reprodukovatelnosti.

RLU: Relativní luminiscenční jednotky.

RNA: Kyselina ribonukleová.

RPC_{Max}: Maximální úroveň odpovědi indukované zkoušenou chemickou látkou, vyjádřená jako % odpovědi indukované 1 nM E2 na stejné destičce.

RPMI: Médium RPMI 1640 doplněné 0,9 % Pen-Strepu a 8,0 % fetálního bovinního séra (FBS).

Provedení zkoušky: Individuální experiment, kterým se hodnotí chemické působení na biologický výsledek analýzy. Každé provedení představuje úplný experiment provedený v replikovaných jamkách s buňkami kultivovanými ze stejného zdroje buněk ve stejném čase.

Nezávislé provedení zkoušky: Samostatný nezávislý experiment, při němž se hodnotí chemické působení na biologický výsledek analýzy s použitím buněk z jiného zdroje, čerstvě naředěných chemických látek, provedený v jiné dny nebo ve stejný den jiným pracovníkem.

SD: Směrodatná odchylka.

Citlivost: Podíl všech pozitivních/aktivních látek, které jsou na základě analýzy správně klasifikovány. Je to měřítko přesnosti analýzy, která dává kategorické výsledky, a je důležitým prvkem při hodnocení relevance analýzy (1).

Specifičnost: Podíl všech negativních/neaktivních látek, které jsou na základě zkoušky správně klasifikovány. Je to měřítko přesnosti analýzy, která dává kategorické výsledky, a je důležitým prvkem při hodnocení relevance analýzy (1).

Stabilní transfekce: Když je do kultivovaných buněk transfekována DNA takovým způsobem, aby byla stabilně integrována do genomu buněk, čímž dojde ke stabilní expresi transfekovaných genů. Klony stabilně transfekovaných buněk se selektují stabilními markery

(např. resistance na G418).

Analýza STTA: Analýza stabilně transfekované transaktivace, analýza transkripční aktivity ER α s využitím buněčné linie HeLa 9903.

Studie: Experimentální práce v plném rozsahu provedená za účelem hodnocení jedné specifické látky s využitím specifické analýzy. Studie zahrnuje všechny kroky včetně testů ředění zkoušené látky ve zkušebním médiu, předběžné zkoušky ke stanovení rozsahu, všechny nezbytné komplexní zkoušky, analýzy údajů, zajištění kvality, posouzení cytotoxicity atd. Provedení studie umožňuje klasifikovat aktivitu zkoušené chemické látky z hlediska toxicity (tj. účinná, neúčinná nebo neprůkazná), což se hodnotí použitou analýzou a odhadem síly ve vztahu k pozitivní referenční chemické látce.

Látka: Podle nařízení REACH¹² je látka definována jako chemický prvek a jeho sloučeniny v přírodním stavu nebo získané výrobním procesem, včetně všech přídatných látek nezbytných k uchování jeho stability a všech nečistot vznikajících v použitém procesu, avšak s vyloučením všech rozpouštědel, která lze oddělit bez ovlivnění stability látky nebo změny jejího složení. Velmi podobná definice se používá v rámci GHS OSN (1).

TA (transaktivace): Iniciací syntézy mRNA v reakci na specifický chemický signál, jako je navázání estrogenu na estrogenový receptor.

Analýza: V souvislosti s touto zkušební metodou je analýza jednou z metodik, která je uznávána jako validní z hlediska plnění stanovených kritérií výkonnosti. Složky analýzy zahrnují například specifickou buněčnou linii se souvisejícími růstovými podmínkami, specifické médium, v němž je zkouška prováděna, podmínky uspořádání destiček, sestavu a ředění zkoušených chemických látek společně s dalšími požadovanými opatřeními v oblasti kontroly kvality a související kroky při hodnocení údajů.

Zkoušená chemická látka: Jakákoli látka nebo směs zkoušená touto zkušební metodou.

Transkripce: Syntéza mRNA.

UVCB: Chemické látky s neznámým nebo proměnlivým složením, komplexní reakční

¹² Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1907/2006 ze dne 18. prosince 2006 o registraci, hodnocení, povolování a omezování chemických látek, o zřízení Evropské agentury pro chemické látky, o změně směrnice 1999/45/ES a o zrušení nařízení Rady (EHS) č. 793/93, nařízení Komise (ES) č. 1488/94, směrnice Rady 76/769/EHS a směrnic Komise 91/155/EHS, 93/67/EHS, 93/105/ES a 2000/21/ES (Úř. věst. L 304, 22.11.2007, s. 1).

produkty nebo biologický materiál.

Validovaná zkušební metoda: Analýza, u níž byly provedeny validační studie k určení její relevantnosti (včetně přesnosti) a spolehlivosti pro konkrétní účel. Je důležité si uvědomit, že validovaná zkušební metoda nemusí mít dostatečnou funkčnost, pokud jde o přesnost a spolehlivost, aby mohla být shledána přijatelnou pro navrhovaný účel (1).

Validace: Proces, při němž je stanovena spolehlivost a relevance konkrétního přístupu, metody, analýzy, procesu nebo hodnocení pro definovaný účel (1).

VC (kontrola s vehikulem): Rozpouštědlo, které se používá na rozpuštění zkoušené chemické látky a kontrolních chemických látek a zkouší se výhradně jako vehikulum bez rozpuštěné chemické látky.

VM7: Imortalizovaná buňka adenokarcinomu, která endogenně exprimuje estrogenový receptor.

VM7Luc4E2: Buněčná linie VM7Luc4E2 byla odvozena z imortalizovaných buněk získaných z lidského adenokarcinomu VM7, které endogenně exprimují obě formy estrogenového receptoru ($ER\alpha$ a $ER\beta$) a jsou stabilně transfekovány plasmidem pGudLuc7.ERE. Tento plasmid obsahuje čtyři kopie syntetického oligonukleotidu obsahujícího estrogen responzivní element před promotorem viru myšího nádoru prsní žlázy a genu luciferázy světlušek.

Slabá pozitivní kontrola: Slabě aktivní látka vybraná ze seznamu referenčních chemických látek, která je zařazena do všech zkoušek, a pomáhá tak zajistit správné fungování analýzy.

Dodatek 2

ANALÝZA STABILNĚ TRANSFEKOVANÉ TRANSAKTIVACE ESTROGENOVÉHO RECEPTORU A PRO DETEKCI ESTROGENOVÝCH AGONISTICKÝCH A ANTAGONISTICKÝCH ÚČINKŮ CHEMICKÝCH LÁTEK S POUŽITÍM BUNĚČNÉ LINIE HERA-HELA-9903

VÝCHOZÍ ÚVAHY A OMEZENÍ (VIZ TAKÉ VŠEOBECNÝ ÚVOD)

1. Při této transaktivační analýze (TA) se používá buněčná linie hER α -HeLa-9903 na detekci estrogenní agonistické aktivity zprostředkované lidským estrogenovým receptorem alfa (hER α). Validační studie analýzy stabilně transfekované transaktivace (STTA) provedená japonským Ústavem pro hodnocení a výzkum chemických látek (CERI) s použitím buněčné linie hER α -HeLa-9903 na detekci estrogenových agonistických a antagonistických účinků zprostředkovaných lidským estrogenovým receptorem alfa (hER α) prokázala relevanci a spolehlivost analýzy pro zamýšlený účel (1).
2. Tato analýza je specificky určena na detekci TA zprostředkované hER α měřením chemiluminiscence jako sledované vlastnosti. Při koncentracích fytoestrogenů vyšších než 1 μ M však byly hlášeny luminiscenční signály nezprostředkované receptorem v důsledku nadměrné aktivace reportérového genu luciferázy (2) (3). Přestože křivka závislosti odpovědi na dávce naznačuje, že ke skutečné aktivaci systému ER dochází při nižších koncentracích, je nutné v systémech analýzy stabilně transfekované ER TA pečlivě zkoumat exprese luciferázy získané při vysoké koncentraci fytoestrogenů nebo podobných sloučenin, u nichž existuje podezření, že vyvolávají nadměrnou aktivaci reportérového genu luciferázy podobně jako fytoestrogeny (dodatek 1).
3. Před použitím této analýzy pro regulační účely je třeba přečíst si části „VŠEOBECNÝ ÚVOD“ a „SLOŽKY ANALÝZY ER TA“. Definice a zkratky používané v této zkušební metodě jsou popsány v dodatku 2.1.

PRINCIP ANALÝZY (VIZ TAKÉ VŠEOBECNÝ ÚVOD)

4. Analýza se používá na signalizaci vazby ligandu na estrogenový receptor. Po vazbě na ligandy se komplex receptor-ligand přesune do jádra, kde se naváže na specifické responzivní elementy DNA a transaktivuje reportérový gen luciferázy světlušek, přičemž výsledkem je zvýšená buněčná exprese enzymu luciferáza. Luciferin je substrát, který enzym luciferáza transformuje na bioluminiscenční produkt, jenž může být kvantitativně změřen

luminometrem. Aktivitu luciferázy lze rychle a levně vyhodnotit pomocí řady komerčně dostupných testů.

5. Zkušební systém používá buněčnou linii hER α -HeLa-9903, která je odvozena z lidského tumoru děložního hrdla, se dvěma stabilně vloženými konstrukcemi: (i) konstrukcí pro expresi hER α (kódující lidský receptor v celé délce) a (ii) reportérovou konstrukcí luciferázy světlušek nesoucí pět tandemových repeticí vitelogeninového estrogen-responzivního elementu (ERE) řízeného myším methalothioneinovým (MT) promotorem TATA elementu. Prokázalo se, že myší genová konstrukce MT TATA podává nejlepší výkon, a proto se běžně používá. Proto může tato buněčná linie hER α -HeLa-9903 měřit schopnost testované chemické látky indukovat hER α -zprostředkovanou transaktivaci exprese luciferázového genu.
6. V případě analýzy ER agonistů vychází interpretace údajů z toho, zda je maximální úroveň odpovědi indukované zkoušenou chemickou látkou rovná nebo vyšší než odpověď agonisty rovnající se 10% odpovědi indukované maximálně indukující (1 nM) koncentrací pozitivní kontroly (PC) 17 β -estradiol (E2) (tj. PC₁₀). V případě analýzy ER antagonistů vychází interpretace údajů z toho, zda odpověď vykazuje alespoň 30% snížení aktivity oproti odpovědi indukované obohacenou kontrolou (25 pM E2) bez cytotoxicity. Analýza a interpretace údajů je podrobně probrána v odstavcích 34–48.

POSTUP

Buněčné linie

7. Pro analýzu by se měla používat stabilně transfekovaná buněčná linie hER α -HeLa-9903. Buněčnou linii lze získat z buněčné banky Japonské sbírky výzkumných biozdrojů (*Japanese Collection of Research Bioresources* (JCRB))¹³ po podpisu smlouvy o prodeji materiálu.
8. Při zkoušení by měly být používány pouze buňky charakterizované jako buňky bez mykoplazmat. Metodou volby pro citlivou detekci mykoplazmové infekce je RT-PCR (polymerázová řetězová reakce v reálném čase) (4)(5)(6).

Stabilita buněčné linie

¹³ JCRB Cell Bank: National Institute of Biomedical Innovation, 7-6-8 Asagi Saito, Ibaraki-shi, Osaka 567-0085, Japonsko Fax: +81-72-641-9812.

9. Pro monitorování stability buněčné linie by se jako referenční standardy pro analýzu agonistů měly používat E2, 17 α -estradiol, 17 α -methyltestosteron a kortikosteron a alespoň jednou je třeba při každém provedení analýzy změřit kompletní křivku závislosti odpovědi na koncentraci v rozsahu zkoušených koncentrací uvedených v tabulce 1, přičemž výsledky by měly být v souladu s výsledky uvedenými v tabulce 1.
10. V případě analýzy antagonistů je třeba změřit současně s každým provedením zkoušky úplné křivky koncentrace pro dva referenční standardy, tamoxifen a flutamid. U obou chemických látek je třeba sledovat správnou kvalitativní klasifikaci na pozitivní nebo negativní.

Buněčná kultura a podmínky na destičce

11. Buňky se udržují v Eaglově minimálním esenciálním médiu (EMEM) bez fenolové červeně, doplněném 60 mg/l antibiotika kanamycinu a 10 % fetálního bovinního séra ošetřeného aktivním uhlím, které je potaženo dextranem (DCC-FBS) v inkubátoru s CO₂ (5% CO₂) při 37 $\pm$ 1°C. Po dosažení 75–90% konfluence mohou být buňky pasážovány s 10 ml 0,4 x 10⁵ – 1 x 10⁵ buněk/ml pro 100 mm nádobu s buněčnou kulturou. Buňky by měly být suspendovány s 10 % FBS-EMEM (což je stejné médium jako EMEM s DCC-FBS) a poté umístěny do jamek mikrotitrační destičky v hustotě 1 x 10⁴ jamek/(100 μ l x jamka). Dále by měly být buňky předběžně inkubovány v inkubátoru s 5% CO₂ při teplotě 37 $\pm$ 1°C po dobu 3 hodin před expozicí chemické látky. Plastové pomůcky by neměly vykazovat estrogení aktivitu.
12. Aby se zachovala integrita odpovědi, měly by buňky růst více než jednu pasáž ze zmrazené zásoby v upraveném médiu a neměly by být kultivovány déle než 40 pasáží. Pro buněčnou linii hER α -HeLa-9903 to bude méně než tři měsíce. Výkonnost buněk však může být snížena, pokud jsou kultivovány v nevhodných podmínkách.
13. Médium DCC-FBS lze připravit podle popisu v dodatku 2.2 nebo pořídit z komerčních zdrojů.

Kritéria přijatelnosti

Pozitivní a negativní referenční standardy pro analýzu agonistů ER

14. Před provedením studie a v jejím průběhu je třeba ověřit reaktivitu zkušebního systému pomocí vhodných koncentrací silného estrogenu: E2, slabého estrogenu (17 α -estradiol), velmi slabého agonisty (17 α -methyltestosteron) a negativní látky (kortikosteron). Hodnoty rozsahu přijatelnosti odvozené od validované studie (1) jsou uvedeny v tabulce 1. Tyto 4 souběžné referenční standardy by měly být zařazeny do každého experimentu a výsledky by měly spadat do uvedených přijatelných mezí. Pokud tomu tak není, je třeba stanovit příčinu nesplnění kritérií přijatelnosti (např. manipulace s buňkami a kvalita a koncentrace séra a

antibiotik) a analýzu zopakovat. Po dosažení kritérií přijatelnosti je pro zajištění minimální variability hodnot EC_{50} , PC_{50} a PC_{10} zásadně důležité konzistentní používání materiálů pro kultivaci buněk. Čtyři souběžné referenční standardy, které by měly být zařazeny do každého experimentu (provedeného za stejných podmínek včetně materiálů, úrovně pasážování a techniků), mohou zajistit citlivost analýzy, protože hodnoty PC_{10} tří pozitivních referenčních standardů by měly spadat do přijatelného rozsahu, stejně jako hodnoty PC_{50} a EC_{50} , pokud je lze vypočítat (viz tabulka 1).

Tabulka 1: Rozsah přijatelných hodnot čtyř referenčních standardů pro analýzu agonistů ER

Název	$\log PC_{50}$	$\log PC_{10}$	$\log EC_{50}$	Hillův koeficient	Zkušební rozsah
17 β -estradiol (E2) CAS č.: 50-28-2	-11,4 ~ -10,1	< -11	-11,3 ~ -10,1	0,7 ~ 1,5	$10^{-14} \sim 10^{-6} M$
17 α -estradiol CAS č.: 57-91-0	-9,6 ~ -8,1	-10,7 ~ -9,3	-9,6 ~ -8,4	0,9 ~ 2,0	$10^{-12} \sim 10^{-6} M$
Kortikosteron CAS č.: 50-22-6	–	–	–	–	$10^{-10} \sim 10^{-3} M$
17 α -methyltestosteron CAS č.: 58-18-4	-6,0 ~ -5,1	-8,0 ~ -6,2	–	–	$10^{-11} \sim 10^{-3} M$

Pozitivní a negativní referenční standardy pro analýzu antagonistů ER

15. Před provedením studie a v jejím průběhu je třeba ověřit reaktivitu zkušebního systému pomocí vhodných koncentrací pozitivní látky (tamoxifen) a negativní látky (flutamid). Hodnoty rozsahu přijatelnosti odvozené od validované studie (1) jsou uvedeny v tabulce 2. Tyto dva souběžné referenční standardy by měly být zařazeny do každého experimentu a výsledky by měly být správně posouzeny, jak je uvedeno v kritériích. Pokud tomu tak není, je třeba stanovit příčinu nesplnění kritérií (např. manipulace s buňkami a kvalita a koncentrace séra a antibiotik) a analýzu zopakovat. Dále by měly být vypočítány hodnoty IC_{50} pro pozitivní látku (tamoxifen) a výsledky by měly spadat do uvedených přijatelných mezí. Po dosažení kritérií přijatelnosti je pro zajištění minimální variability hodnot EC_{50} zásadně důležité konzistentní používání materiálů pro kultivaci buněk. Dva souběžné referenční standardy, které by měly být zařazeny do každého experimentu (provedeného za stejných podmínek včetně materiálů, úrovně pasážování a techniků), mohou zajistit citlivost analýzy (viz tabulka 2).

Tabulka 2: Kritéria a rozsah přijatelných hodnot dvou referenčních standardů pro analýzu antagonistů ER

Název	Kritéria	$\log IC_{50}$	Zkušební rozsah

Tamoxifen CAS č.: 10540-29-1	Pozitivní: IC50 nemohla být vypočtena	—5,942~7,596	$10^{-10} \sim 10^{-5} \text{M}$
Flutamid CAS č.: 13311-84-7	Negativní: IC30 nemohla být vypočtena	-	$10^{-10} \sim 10^{-5} \text{M}$

Pozitivní a negativní kontroly

16. Pozitivní kontrola (PC) pro analýzu agonistů ER (1 nM E2) a pro analýzu antagonistů ER (10 μM TAM) by měla být testována na každé destičce alespoň třikrát. Rozpouštědlo, které se používá na rozpuštění zkoušené chemické látky, by mělo být testováno jako kontrola vehikula (VC) na každé destičce alespoň třikrát. Kromě této kontroly vehikula by měla být kontrola vehikula provedena na stejné destičce alespoň třikrát se stejnou pozitivní kontrolou, pokud se u pozitivní kontroly používá jiné vehikulum než u zkoušené chemické látky.

Kvalitativní kritéria pro analýzu agonistů ER

17. Střední aktivita luciferázy u pozitivní kontroly (1 nM E2) by měla být alespoň čtyřnásobná oproti střední aktivitě kontroly vehikula na každé destičce. Toto kritérium je stanoveno na základě spolehlivosti hodnot cílových ukazatelů z validační studie (historicky mezi čtyřnásobkem a třicetinasobkem).
18. Pokud jde o kontrolu kvality analýzy, měla by být násobná indukce odpovídající hodnotě PC_{10} souběžné pozitivní kontroly (1 nM E2) větší než $1+2SD$ hodnoty násobné indukce (=1) souběžné kontroly vehikula. Za účelem stanovení priorit může být hodnota PC_{10} užitečná pro zjednodušení analýzy dat potřebné na porovnání se statistickou analýzou. Ačkoli statistická analýza poskytuje informace o významnosti, tato analýza není kvantitativním parametrem, pokud jde o potenciál vycházející z koncentrace, a proto je méně užitečná pro účely stanovení priorit.

Kvalitativní kritéria pro analýzu antagonistů ER

19. Střední aktivita luciferázy u obohacené kontroly (25 pM E2) by měla být alespoň čtyřnásobná oproti střední aktivitě kontroly vehikula na každé destičce. Toto kritérium je stanoveno na základě spolehlivosti hodnot cílových ukazatelů z validační studie.
20. Pokud jde o kontrolu kvality analýzy, měla by být relativní transkripční aktivace (RTA) 1 nM E2 větší než 100 %, RTA 1 μM 4-hydroxytamoxifenu (OHT) by měla být menší než 40,6 % a RTA 100 μM Digitoninu (Dig) by měla být menší než 0 %.

Prokázání odborné způsobilosti laboratoře (viz odstavec 14 a tabulky 3 a 4 v části «SLOŽKY ANALÝZY ER TA» této zkušební metody).

Vehikulum

21. Jako souběžná kontrola vehikula by měl být použit dimethylsulfoxid (DMSO) nebo vhodné rozpouštědlo ve stejné koncentraci použité pro různé pozitivní a negativní kontroly a zkoušené chemické látky. Zkoušené chemické látky by měly být rozpuštěny v rozpouštědle, které danou zkoušenou chemickou látku rozpouští a je mísitelné s kultivačním médiem. Vhodnými vehikuly jsou voda, etanol (čistota 95 % až 100 %) a DMSO. Jestliže se používá DMSO, neměla by úroveň překročit 0,1 % (obj.). Pro každé vehikulum je třeba prokázat, že maximální použitý objem není cytotoxický a nenarušuje provedení analýzy.

Příprava zkoušených chemických látek

22. Obecně je třeba zkoušené chemické látky rozpustit v DMSO nebo jiném vhodném rozpouštědle, postupně naředit stejným rozpouštědlem ve společném poměru 1:10, a připravit tak roztoky pro ředění médiem.

Rozpustnost a cytotoxicita: Důvody pro zjištění rozsahu

23. Měla by být provedena předběžná zkouška, aby bylo možné stanovit vhodný rozsah koncentrace chemické látky, jež má být testována, a zkontrolovat, zda zkoušená chemická látka nevykazuje nějaké problémy v oblasti rozpustnosti a cytotoxicity. Nejdříve se chemické látky zkoušejí do maximální koncentrace 1 µl/ml, 1 mg/ml, nebo 1 mM podle toho, která z uvedených hodnot je nejnižší. Podle rozsahu cytotoxicity nebo nerozpustnosti pozorované při předběžné zkoušce by se chemická látka měla při prvním definitivním provedení zkoušky testovat v log-sériovém ředění, počínaje maximální přijatelnou koncentrací (např. 1 mM, 100µM, 10µM atd.) a měla by se zaznamenat přítomnost zákalu nebo sraženiny či cytotoxicity. Při druhém a v případě potřeby i třetím provedení zkoušky by se měla podle potřeby upravit koncentrace, aby lépe charakterizovala křivku závislosti odpovědi na koncentraci a aby byly vyloučeny koncentrace, které byly zjištěny jako nerozpustné nebo vyvolávající nadměrnou cytotoxicitu.
24. U agonistů a antagonistů ER může přítomnost zvyšujících se úrovní cytotoxicity významně změnit nebo eliminovat typickou sigmoidní odpověď, což je třeba vzít v úvahu při interpretaci dat. Měly by se používat metody zkoušení cytotoxicity, které mohou poskytnout informace o 80% životaschopnosti buněk, s využitím vhodné analýzy na základě zkušeností laboratoře.
25. Pokud výsledky zkoušky cytotoxicity ukazují, že koncentrace zkoušené chemické látky snížila počet buněk o 20 % nebo více, je třeba tuto koncentraci považovat za cytotoxickou a koncentrace na cytotoxické úrovni nebo vyšší je třeba z hodnocení vyloučit.

Expozice chemické látce a organizace testovacích destiček

26. Postup ředění chemických látek (kroky 1 a 2) a expozici buněk (krok 3) lze provést takto:

Krok 1: Každou zkoušenou chemickou látku je třeba postupně naředit v DMSO nebo vhodném rozpouštědle a přidat do jamek mikrotitrační destičky, aby byla dosažena finální sériová koncentrace stanovená při předběžné zkoušce ke stanovení rozsahu (obvykle v sérii například 1 mM, 100 μ M, 10 μ M, 1 μ M, 100 nM, 10 nM, 1 nM, 100 pM a 10 pM (10^{-3} – 10^{-11} M)) pro trojí testování.

Krok 2: Ředění chemické látky: Nejprve rozpustíte 1,5 μ l zkoušené chemické látky v rozpouštědle na koncentraci 500 μ l média.

Krok 3: Expozice buněk chemické látce: Přidejte 50 μ l roztoku s médiem (připraveného v kroku 2) do testovací jamky obsahující 10^4 buněk/100 μ l/ jamku.

Doporučený konečný objem média potřebného pro každou jamku je 150 μ l. Zkušební vzorky a referenční standardy lze zařadit tak, jak je uvedeno v tabulce 3 a v tabulce 4.

Tabulka 3: Příklad uspořádání koncentrací referenčních standardů na testovací destičce při analýze agonistů ER

Řádek	17 α -methyltestosteron			Kortikosteron			17 α -estradiol			E2		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	konc. 1 (10 μ M)	→	→	100 μ M	→	→	1 μ M	→	→	10 nM	→	→
B	konc. 2 (1 μ M)	→	→	10 μ M	→	→	100 nM	→	→	1 nM	→	→
C	konc. 3 (100 nM)	→	→	1 μ M	→	→	10 nM	→	→	100 pM	→	→
D	konc. 4 (10 nM)	→	→	100 nM	→	→	1 nM	→	→	10 pM	→	→
E	konc. 5 (1 nM)	→	→	10 nM	→	→	100 pM	→	→	1 pM	→	→
F	konc. 6 (100 pM)	→	→	1 nM	→	→	10 pM	→	→	0,1 pM	→	→
G	konc. 7 (10 pM)	→	→	100 pM	→	→	1 pM	→	→	0,01 pM	→	→
H	VC	→	→	→	→	→	PC	→	→	→	→	→

VC: Kontrola vehikulem (0,1% DMSO); PC: Pozitivní kontrola (1 nM E2)

27. Při každém provedení zkoušky by měly být testovány referenční standardy (E2, 17 α -estradiol, 17-methyltestosteron a kortikosteron) (tabulka 3). Na každé testovací destičce by měly být zařazeny jamky PC exponované 1 nM E2, který dokáže vyvolat maximální indukci E2, a jamky VC exponované pouze DMSO (nebo vhodným rozpouštědlem) (tabulka 4). Pokud jsou použity ve stejném experimentu buňky z různých zdrojů (například různý počet pasáží, různá šarže atd.), je třeba referenční standardy testovat pro každý zdroj buněk.

Tabulka 4: Příklad uspořádání koncentrací zkoušených a kontrolních chemických látek na testovací destičce při analýze agonistů ER

Řádek	Zkoušená chemická látka 1			Zkoušená chemická látka 2			Zkoušená chemická látka 3			Zkoušená chemická látka 4		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	konc. 1 (10 μ M)	→	→	1 mM	→	→	1 μ M	→	→	10 nM	→	→

B	konc. 2 (1 μ M)	→	→	100 μ M	→	→	100 nM	→	→	1 nM	→	→
C	konc. 3 (100 nM)	→	→	10 μ M	→	→	10 nM	→	→	100 pM	→	→
D	konc. 4 (10 nM)	→	→	1 μ M	→	→	1 nM	→	→	10 pM	→	→
E	konc. 5 (1 nM)	→	→	100 nM	→	→	100 pM	→	→	1 pM	→	→
F	konc. 6 (100 nM)	→	→	10 nM	→	→	10 pM	→	→	0,1 pM	→	→
G	konc. 7 (10 pM)	→	→	1 nM	→	→	1 pM	→	→	0,01 pM	→	→
H	VC	→	→	→	→	→	PC	→	→	→	→	→

VC: Kontrola vehikule (0,1% DMSO); Pozitivní kontrola: Pozitivní kontrola (1 nM E2)

Tabulka 5: Příklad uspořádání koncentrací referenčních standardů na testovací destičce při analýze antagonistů ER

Řádek	Tamoxifen			Flutamid			Zkoušená chemická látka 1			Zkoušená chemická látka 2		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	konc. 1 (10 μ M)	→	→	10 μ M	→	→	10 μ M	→	→	10 μ M	→	→
B	konc. 2 (1 μ M)	→	→	1 μ M	→	→	1 μ M	→	→	1 μ M	→	→
C	konc. 3 (100 nM)	→	→	100 nM	→	→	100 nM	→	→	100 nM	→	→
D	konc. 4 (10 nM)	→	→	10 nM	→	→	10 nM	→	→	10 nM	→	→
E	konc. 5 (1 nM)	→	→	1 nM	→	→	1 nM	→	→	1 nM	→	→
F	konc. 6 (100 pM)	→	→	100 pM	→	→	100 pM	→	→	100 pM	→	→
G	0,1% DMSO	→	→	→	→	→	1 μ M OHT	→	→	100 μ M Dig	→	→
H	VC	→	→	→	→	→	PC	→	→	→	→	→

VC: Kontrola vehikule (0,1% DMSO), PC: Pozitivní kontrola:(1 nM E2), OHT :4-Hydroxytamoxifen, Dig: Digitonin.

 = obohaceno 25pM E2

28. Aby mohla být posouzena antagonistická aktivita chemických látek, je třeba jamky umístěné v řadách A až G obohatit 25pM E2. Při každém provedení zkoušky by měly být testovány referenční standardy (tamoxifen a flutamid). Na každé testovací destičce by měly být zařazeny jamky s PC exponované 1 nM E2, který může být použit jako kontrola kvality buněčné linie hER α -HeLa-9903, jamky s VC exponované DMSO (nebo vhodným rozpouštědlem), jamky s 0,1% DMSO exponované přidavkem DMSO do obohaceného E2 odpovídající „obohacené kontrole“, jamky exponované finální koncentrací 1 μ M OHT a jamky exponované 100 μ M Dig (tabulka 5). Další testovací destička by měla mít stejné uspořádání bez buněk s referenčními standardy (tabulka 6). Pokud jsou použity ve stejném experimentu buňky z různých zdrojů (například různý počet pasáží, různá šarže atd.), je třeba referenční standardy testovat pro každý zdroj buněk.

Tabulka 6: Příklad uspořádání koncentrací zkoušených a kontrolních chemických látek na testovací destičce při analýze antagonistů ER

Řádek	Zkoušená chemická látka 1			Zkoušená chemická látka 2			Zkoušená chemická látka 3			Zkoušená chemická látka 4		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	konc. 1 (10 μ M)	→	→	10 μ M	→	→	10 μ M	→	→	10 μ M	→	→
B	konc. 2 (1 μ M)	→	→	1 μ M	→	→	1 μ M	→	→	1 μ M	→	→
C	konc. 3 (100 nM)	→	→	100 nM	→	→	100 nM	→	→	100 nM	→	→
D	konc. 4 (10 nM)	→	→	10 nM	→	→	10 nM	→	→	10 nM	→	→
E	konc. 5 (1 nM)	→	→	1 nM	→	→	1 nM	→	→	1 nM	→	→
F	konc. 6 (100 pM)	→	→	100 pM	→	→	100 pM	→	→	100 pM	→	→
G	0,1% DMSO	→	→	→	→	→	1 μ M OHT	→	→	100 μ M Dig	→	→
H	VC	→	→	→	→	→	PC	→	→	→	→	→

VC: Kontrola vehikule (0,1% DMSO), PC: Pozitivní kontrola (1 nM E2), OHT: 4-Hydroxytamoxifen, Dig: Digitonin.

 : obohaceno 25pM E2

29. Podle potřeby je třeba potvrdit nepřítomnost okrajových účinků, a pokud je podezření na takové účinky, je třeba uspořádání destičky změnit, aby k nim nedocházelo. Může být například použito uspořádání destičky s vyloučením okrajových jamek.
30. Po přidání chemických látek by testovací destičky měly být inkubovány v inkubátoru s 5 % CO₂ při teplotě 37°±1°C po dobu 20–24 hodin, aby se indukovaly reportérové genové produkty.
31. Zvláštní pozornost je třeba věnovat sloučeninám, které jsou vysoce těkavé. V těchto případech mohou vedlejší kontrolní jamky generovat falešně pozitivní výsledky, což je třeba vzít v úvahu s ohledem na očekávané a dosavadní kontrolní hodnoty. V ojedinělých případech, kdy může být těkavost problémem, může pomoci použití „zapečetěných destiček“ účinně izolovat jednotlivé jamky v průběhu zkoušení, a proto je v těchto případech doporučováno.
32. Opakované definitivní testy pro stejnou chemickou látku by měly být prováděny v různé dny, aby byla zajištěna nezávislost.

Luciferázová analýza

33. Pro analýzu může být použito komerční luciferázové činidlo [např. systém Steady-Glo® Luciferase Assay (Promega, E2510 nebo ekvivalentní)] nebo standardní luciferázový systém (např. Promega, E1500 nebo ekvivalentní), pokud jsou splněna kritéria přijatelnosti. Činidla pro analýzu je třeba zvolit podle citlivosti luminometru, který bude použit. Když se používá standardní luciferázový systém, mělo by být před přidáním substrátu použito lyzační činidlo na buněčnou kulturu (např. Promega, E1531 nebo ekvivalentní). Luciferázové činidlo je třeba aplikovat podle pokynů výrobce.

ANALÝZA ÚDAJŮ

Analýza agonistů ER

34. Aby byla získána relativní transkripční aktivita u PC (1 nM E2), mohou být v případě analýzy agonistů ER luminiscenční signály ze stejné destičky analyzovány podle těchto kroků (přijatelné jsou i jiné ekvivalentní matematické procesy):

Krok 1. Vypočítejte střední hodnotu pro VC.

Krok 2. Odečtěte střední hodnotu VC od hodnoty každé jamky, abyste normalizovali data.

Krok 3. Vypočítejte střední hodnotu pro normalizovanou PC.

Krok 4. Vydělte normalizovanou hodnotu každé jamky na destičce střední hodnotou normalizované PC (PC = 100 %).

Konečná hodnota každé jamky je relativní transkripční aktivita pro tuto jamku v porovnání s odpovědí PC.

Krok 5. Vypočítejte střední hodnotu relativní transkripční aktivity pro každou skupinu koncentrace zkoušené chemické látky. Odpověď má dva rozměry: zprůměrovaná transkripční aktivita (odpověď) a koncentrace, při níž dochází k odpovědi (viz následující část).

Poznámky k indukci EC₅₀, PC₅₀ a PC₁₀

35. Pro výpočet EC₅₀ je nutná celá křivka závislosti koncentrace na odpovědi, ale to nemusí být vždy dosažitelné nebo praktické vzhledem k mezím rozsahu zkušebních koncentrací (například v důsledku problémů s cytotoxicitou nebo rozpustností). Protože jsou však EC₅₀ a maximální indukční úroveň (odpovídající horní hodnotě Hillovy rovnice) informativními parametry, měly by být tyto parametry pokud možno uvedeny. Pro výpočet EC₅₀ a maximální indukční úrovně by měl být použit vhodný statistický software (např. statistický software Graphpad Prism). Jestliže lze na údaje o koncentraci a odpovědi aplikovat Hillovu logistickou rovnici, je třeba vypočítat EC₅₀ takto (7):

$$Y = \text{dolní} + (\text{horní} - \text{dolní}) / (1 + 10^{\exp((\log EC_{50} - X) \times \text{Hillův koeficient})})$$
 Kde:

X je logaritmus koncentrace; a

Y je odpověď, přičemž Y začíná na dolní hranici a pokračuje nahoru sigmoidní křivkou. Dolní hranice je v Hillově logistické rovnici pevně stanovena na nule.

36. Pro každou zkoušenou chemickou látku by měly být zajištěny tyto podmínky:

RPC_{Max} , což je maximální úroveň odpovědi indukované zkoušenou chemickou látkou, vyjádřená jako procento odpovědi indukované 1 nM E2 na stejné destičce, stejně jako PC_{Max} (koncentrace související s RPC_{Max}); a

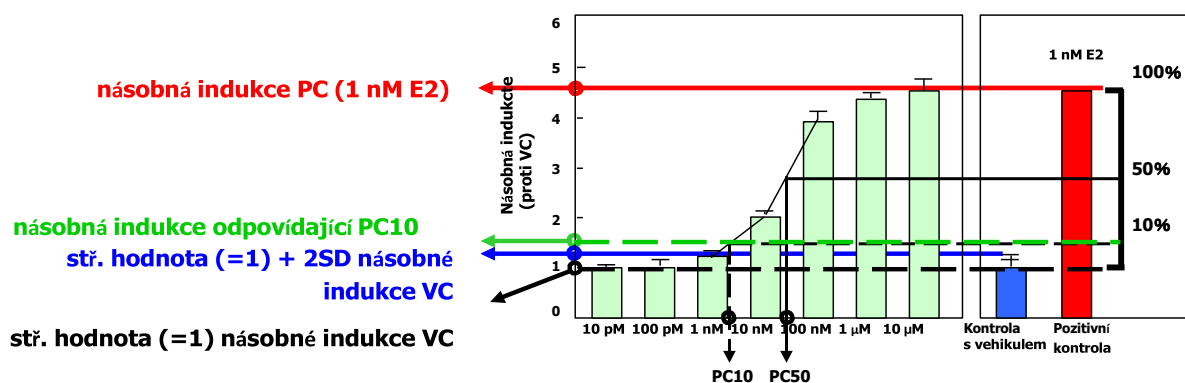
u pozitivních chemických látek koncentrace, které indukují PC_{10} , případně PC_{50} .

37. Hodnotu PC_x lze vypočítat interpolací mezi 2 body do bodu o souřadnici X–Y, přičemž jeden je bezprostředně nad a jeden bezprostředně pod hodnotou PC_x . Pokud mají datové body ležící bezprostředně nad a pod hodnotou PC_x souřadnice (a,b), respektive (c,d), pak lze vypočítat hodnotu PC_x podle této rovnice:

$$\log[PC_x] = \log[c] + (x-d)/(d-b)$$

38. Popisy hodnot PC jsou uvedeny níže na obrázku 1.

Obrázek 1: Příklad odvození hodnot PC . Na každé testovací destičce je zařazena PC (1 nM E2)



Analýza antagonistů ER

39. Aby byla získána relativní transkripční aktivita (RTA) u obohacené kontroly (25 pM E2), mohou být v případě analýzy antagonistů ER luminiscenční signály ze stejné destičky analyzovány podle těchto kroků (přijatelné jsou i jiné ekvivalentní matematické procesy):

Krok 1. Vypočítejte střední hodnotu pro VC.

Krok 2. Odečtete střední hodnotu VC od hodnoty každé jamky, abyste normalizovali data.

Krok 3. Vypočítejte střední hodnotu pro normalizovanou obohacenou kontrolu.

Krok 4. Vydělte normalizovanou hodnotu každé jamky na destičce střední hodnotou normalizované obohacené kontroly (obohacená kontrola = 100 %).

Konečná hodnota každé jamky je relativní transkripční aktivita pro tuto jamku v porovnání s odpovědí obohacené kontroly.

Krok 5. Vypočtete střední hodnotu relativní transkripční aktivity pro každou expozici.

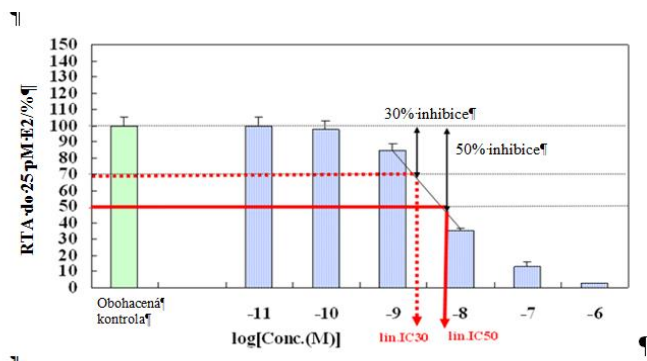
Poznámky k indukci IC₃₀ a IC₅₀

40. U pozitivních chemických látek je třeba uvést koncentrace, které indukují IC₃₀, případně IC₅₀.

41. Hodnotu ICx lze vypočítat interpolací mezi 2 body do bodu o souřadnici X–Y, přičemž jeden je bezprostředně nad a jeden bezprostředně pod hodnotou ICx. Pokud mají datové body ležící bezprostředně nad a pod hodnotou ICx souřadnice (c,d), respektive (a,b), pak lze vypočítat hodnotu ICx podle této rovnice:

$$\text{lin IC}_x = a - (b - (100 - x)) (a - c) / (b - d)$$

Obrázek 2: Příklad odvození hodnot IC. Na každé testovací destičce je zařazena obohacená kontrola (25 nM E2)



RTA: relativní transkripční aktivita

42. Výsledky by měly vycházet ze dvou (nebo tří) nezávislých provedení zkoušek. Jestliže jsou při dvou provedeních zkoušky získány srovnatelné, a tedy reprodukovatelné výsledky, není nutné provádět zkoušku potřetí. Aby byly výsledky přijatelné, měly by:

- splňovat kritéria přijatelnosti (viz kritéria přijatelnosti v odstavcích 14–20),
- být reprodukovatelné.

Kritéria interpretace údajů

Tabulka 7: Pozitivní a negativní kritéria rozhodování při analýze agonistů ER

Pozitivní	Jestliže je získána RPC_{Max} , která se rovná nebo je vyšší než 10 % odpovědi pozitivní kontroly alespoň dvou ze dvou nebo dvou ze tří provedení zkoušek.
Negativní	Jestliže RPC_{Max} nedosáhne alespoň 10 % odpovědi pozitivní kontroly ve dvou ze dvou nebo dvou ze tří provedení zkoušek.

Tabulka 8: Pozitivní a negativní kritéria rozhodování při analýze antagonistů ER

Pozitivní	Jestliže je vypočtena IC_{30} alespoň ve dvou ze dvou nebo dvou ze tří provedení zkoušek.
Negativní	Jestliže IC_{30} není vypočtena alespoň ve dvou ze dvou nebo dvou ze tří provedení zkoušek.

43. Kritéria interpretace údajů jsou uvedena v tabulkách 7 a 8. Pozitivní výsledky budou charakterizovány jak intenzitou účinku, tak i koncentrací, při níž k účinku dochází. Oba tyto cíle splňuje vyjádření výsledků jako koncentrace, při níž je u analýzy agonistů dosaženo 50 % (PC50) nebo 10 % (PC10) hodnot PC a u analýzy antagonistů je 50 % (IC50) nebo 30 % (IC30) hodnoty obohacené kontroly inhibováno. Zkoušená chemická látka je však určena jako pozitivní, jestliže se maximální odpověď indukovaná touto zkoušenou chemickou látkou (RPC_{Max}) rovná nebo je vyšší než 10 % odpovědi PC alespoň ve dvou ze dvou nebo dvou ze tří provedení zkoušek, zatímco za negativní je zkoušená chemická látka považována, jestliže RPC_{Max} nedosáhne alespoň 10 % odpovědi pozitivní kontroly ve dvou ze dvou nebo dvou ze tří provedení zkoušek.

44. Výpočty PC_{10} , PC_{50} a PC_{Max} v analýze agonistů ER a IC_{30} a IC_{50} v analýze antagonistů ER mohou být provedeny pomocí tabulkového kalkulátoru, který je dostupný u příslušného pokynu na veřejných webových stránkách OECD¹.
45. Získání hodnot PC_{10} nebo PC_{50} a IC_{30} nebo IC_{50} alespoň dvakrát by mělo stačit. Pokud však výsledná výchozí hodnota pro data ve stejném rozsahu koncentrace vykazují variabilitu s nepřijatelně vysokým variačním koeficientem (CV; %), nelze tato data považovat za spolehlivá a je třeba najít zdroj vysoké variability. Variační koeficient prvních tří opakování (tj. údaje o intenzitě luminiscence) datových bodů, které jsou použity pro výpočet PC_{10} , by měl být menší než 20 %.
46. Splnění kritérií přijatelnosti ukazuje, že analytický systém funguje správně, ale nezaručuje to, že konkrétní provedení zkoušky podá přesné údaje. Opakování výsledků první zkoušky je nejlepším důkazem, že údaje byly přesné.
47. V případě analýzy agonistů ER, kdy jsou potřebné další informace kromě informací pro účely screeningu a stanovení priorit tohoto pokynu pro pozitivní zkoušené chemické látky, zvláště pro chemické látky PC_{10} – PC_{49} , jakož i chemické látky, u nichž existuje podezření, že nadměrně stimulují luciferázu, může být potvrzeno, že pozorovaná aktivita luciferázy je výhradně ER α -specifická odpověď pomocí antagonisty ER α (viz dodatek 2.1).

ZÁVĚREČNÁ ZPRÁVA

48. Viz odstavec 20 „SLOŽKY ANALÝZY ER TA“.

¹ <http://www.oecd.org/env/testguidelines>.

LITERATURA

- (1) OECD (2015). Report of the Inter-Laboratory Validation for Stably Transfected Transactivation Assay to detect Estrogenic and Anti-estrogenic Activity. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 225), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (2) Escande A., *et al.* (2006). Evaluation of Ligand Selectivity Using Reporter Cell Lines Stably Expressing Estrogen Receptor Alpha or Beta, *Biochem. Pharmacol.*, 71, 1459-1469.
- (3) Kuiper G.G., *et al.* (1998). Interaction of Estrogenic Chemicals and Phytoestrogens with Estrogen Receptor Beta, *Endocrinol.*, 139, 4252-4263.
- (4) Spaepen M., *et al.* (1992). Detection of Bacterial and Mycoplasma Contamination in Cell Cultures by Polymerase Chain Reaction, *FEMS Microbiol. Lett.*, 78(1), 89-94.
- (5) Kobayashi H., *et al.* (1995). Rapid Detection of Mycoplasma Contamination in Cell Cultures by Enzymatic Detection of Polymerase Chain Reaction (PCR) Products, *J. Vet. Med. Sci.*, 57(4), 769- 71.
- (6) Dussurget O. and Roulland-Dussoix D. (1994). Rapid, Sensitive PCR-Based Detection of Mycoplasmas in Simulated Samples of Animal Sera, *Appl. Environ. Microbiol.*, 60(3), 953-9.
- (7) De Lean A., Munson P.J. and Rodbard D. (1978). Simultaneous Analysis of Families of Sigmoidal Curves: Application to Bioassay, Radioligand Assay, and Physiological Dose-Response Curves, *Am. J. Physiol.*, 235, E97-E102.

Dodatek 2.1

FALEŠNĚ POZITIVNÍ: POSOUZENÍ LUMINISCENČNÍCH SIGNÁLŮ NEZPROSTŘEDKOVANÝCH RECEPTOREM

1. Falešně pozitivní výsledky mohou být při analýze agonistů ER generovány aktivací luciferázového genu nezprostředkovanou ER nebo přímou aktivací genového produktu či nesouvisející fluorescencí. Tyto účinky indikuje neúplná nebo neobvyklá křivka závislosti odpovědi na dávce. V případě podezření na tyto účinky je třeba vyšetřit účinek antagonisty ER (např. 4-hydroxytamoxifen (OHT) při netoxické koncentraci) na odpověď. K tomuto účelu nemusí být vhodný čistý antagonist ICI 182780, neboť dostatečná koncentrace ICI 182780 může snížit hodnotu VC, což ovlivní analýzu dat.
2. Aby byla zajištěna validita tohoto přístupu, je třeba na stejné destičce otestovat:
 - agonistickou aktivitu neznámé chemické látky s/bez 10 μ M OHT
 - VC (tři opakování)
 - OHT (tři opakování)
 - 1 nM E2 (tři opakování) jako agonistická PC
 - 1 nM E2 + OHT (tři opakování)

Kritéria interpretace údajů

Poznámka: Do všech jamek by měla být aplikována stejná koncentrace vehikula.

- Jestliže aplikace antagonisty ER NEOVLIVNÍ agonistickou aktivitu neznámé chemické látky, klasifikuje se jako „negativní“.
- Jestliže je agonistická aktivita neznámé chemické látky zcela inhibována, použijte kritéria rozhodování.
- Jestliže se agonistická aktivita při nejnižší koncentraci rovná nebo je vyšší než odpověď PC_{10} , je neznámá chemická látka inhibována při odpovědi rovnající se nebo vyšší než PC_{10} . Vypočte se rozdíl odpovědí mezi jamkami neošetřenými a ošetřenými antagonistou ER a jamkami, do nichž antagonist ER byl aplikován, a tento rozdíl je třeba považovat za skutečnou odpověď a použít jej pro výpočet vhodných parametrů, aby mohlo být rozhodnuto o klasifikaci.

Analýza údajů

Zkontrolujte standard funkčnosti.

Zkontrolujte variační koeficient mezi jamkami ošetřenými za stejných podmínek.

1. Vypočítejte střední hodnotu VC.
2. Odečtete střední hodnotu VC od hodnoty každé jamky **neošetřené** OHT.
3. Vypočítejte střední hodnotu OHT.
4. Odečtete střední hodnotu VC od hodnoty každé jamky ošetřené OHT.
5. Vypočítejte střední hodnotu PC.
6. Vypočítejte relativní transkripční aktivitu všech ostatních jamek ve vztahu k PC.

Dodatek 2.2

PŘÍPRAVA SÉRA OŠETŘENÉHO AKTIVNÍM UHLÍM POTAŽENÝM DEXTRANEM (DCC)

1. Ošetření séra aktivním uhlím potaženým dextranem (DCC) je obecná metoda na odstranění estrogenních sloučenin ze séra, které se přidává do kultivačního média, aby se vyloučila zkreslená odpověď související s reziduálními estrogeny v séru. Tímto postupem lze ošetřit 500 ml fetálního bovinního séra (FBS).

Složky

2. Potřebné budou tyto materiály a vybavení:

Materiály

Aktivní uhlí

Dextran

Hexahydrát chloridu hořečnatého ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)

Sacharóza

1 M HEPES pufrační roztok (pH 7,4)

Ultračistá voda z filtračního systému

Vybavení

Sterilizovaná skleněná nádoba (velikost podle potřeby) běžná laboratorní odstředivka (s možností nastavení teploty na 4 °C)

Postup

3. Při použití 50ml odstředivkových zkumavek se upraví tento postup:

[Den 1] Připravte suspenzi aktivního uhlí potaženého dextranem s 1 litrem ultračisté vody obsahující 1,5 mM MgCl_2 , 0,25 M sacharózy, 2,5 g aktivního uhlí, 0,25 g dextranu a 5 mM HEPES a nechte promíchávat přes noc při 4 °C.

[Den 2] Nadávkujte suspenzi do 50ml odstředivkových zkumavek a odstřed'ujte při 10 000 ot./min. při 4 °C po dobu 10 minut. Odstraňte supernatant a uložte polovinu sedimentu

aktivního uhlí při 4 °C pro použití 3. den. Druhou polovinu aktivního uhlí rozpustíte v FBS, které jste nechali pomalu roztát, aby nevznikla sraženina, a inaktivovali teplem při teplotě 56 °C po dobu 30 minut, poté přemístíte do sterilizované nádoby, například Erlenmeyerovy baňky. Tuto suspenzi nechte lehce promíchávat přes noc při teplotě 4 °C.

[Den 3] Nadávkujte suspenzi s FBS do odstředivkových zkumavek a odstřed'ujte při 10 000 ot./min. při 4 °C po dobu 10 minut. Seberte FBS a uložte jej do nového sedimentu aktivního uhlí připraveného a uloženého 2. den. Rozpusťte sediment aktivního uhlí a tuto suspenzi nechte přes noc lehce promíchávat ve sterilizované nádobě při teplotě 4 °C.

[Den 4] Nadávkujte suspenzi k odstřed'ování při 10 000 ot./min. při teplotě 4 °C po dobu 10 minut a sterilizujte supernatant filtrací přes sterilní filtr 0,2 µm. Tento FBS ošetřený DCC by měl být uchováván při teplotě –20 °C a může být používán po dobu jednoho roku.

DODATEK 3

ANALÝZA TRANSAKTIVACE ESTROGENOVÝCH RECEPTORŮ VM7LUC KE ZJIŠTĚNÍ AGONISTŮ A ANTAGONISTŮ ESTROGENOVÝCH RECEPTORŮ

VÝCHOZÍ ÚVAHY A OMEZENÍ (VIZ TAKÉ VŠEOBECNÝ ÚVOD)

1. Při této analýze se používá buněčná linie VM7Luc4E2¹. Byla validována Meziagenturním střediskem pro hodnocení alternativních toxikologických metod Národního toxikologického programu (*National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods* – NICEATM) a Meziagenturním koordinačním výborem pro validaci alternativních metod (*Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods* – ICCVAM) (1). Buněčné linie VM7Luc exprimují převážně endogenní ER α a menší množství endogenního ER β (2) (3) (4).
2. Tuto analýzu lze použít u široké škály látek, pokud mohou být rozpuštěny v dimethylsulfoxidu (DMSO; CASRN 67-68-5), nereagují s DMSO ani s kultivačním médiem a nejsou cytotoxické ve zkoušených koncentracích. Pokud není možné použít DMSO, může být použito jiné vehikulum, jako je etanol nebo voda (viz odstavec 12). Prokázaná funkční způsobilost analýzy (ant)agonistů VM7Luc ER TA naznačuje, že údaje získané při této analýze mohou poskytnout informace o mechanismech působení zprostředkovaných ER a mohou být vzaty v úvahu při určování priorit látek k dalšímu zkoušení.
3. Tato analýza je specificky určena na detekci TA zprostředkované hER α a hER β měřením chemiluminiscence jako sledované vlastnosti. Použití chemiluminiscence při bioanalýzách je

¹ Do června 2016 byla tato buněčná linie označována za buněčnou linii BG1Luc. Buňky BG-1 původně popsal Geisinger et al. (1998) (12) a později je charakterizovali výzkumníci v Národním ústavu věd o zdravém životním prostředí (NIEHS) (13). Relativně nedávno bylo objeveno, že existují dvě různé varianty buněk BG-1, které používají výzkumníci, a to BG-1 Fr a BG-1 NIEHS. Hluboková analýza zahrnující testování DNA těchto dvou variantních buněčných linií BG-1, kterou provedl Li a spolupracovníci (2014) (14), ukázala, že buněčná linie BG-1 Fr je jedinečná a že buněčná linie BG-1 NIEHS, tj. původní buněčná linie použitá při vývoji analýzy, není buněčná linie lidského karcinomu vaječníku BG1, ale že jde o variantu buněčné linie lidského karcinomu prsu MCF7. Buněčná linie použitá při analýze, původně nazývaná BG1Luc4E2 (15), se bude nyní označovat jako VM7Luc4E2 („V“ = variantní; „M7“ = buňky MCF7). Podobně se bude analýza nyní označovat jako VM7Luc ER TA. I když se mění původ buněčné linie, z níž analýza vychází, nejsou tím dotčeny publikované validační studie ani využitelnost a použití této analýzy pro screening estrogenních/antiestrogenních chemických látek.

rozšířené, protože luminiscence má vysoký poměr odstupu signálu od pozadí (10). Aktivitu luciferázy světlušek v buněčných testech však mohou zkreslovat látky, které inhibují enzym luciferázu, a vyvolávají tak zdánlivou inhibici nebo vyšší luminiscenci v důsledku stabilizace proteinů (10). Kromě toho v některých analýzách reportérového genu ER na bázi luciferázy byly při koncentracích fytoestrogenů vyšších než 1 μ M hlášeny luminiscenční signály neprostředkované receptorem v důsledku nadměrné aktivace reportérového genu luciferázy (9) (11). Přestože křivka závislosti odpovědi na dávce naznačuje, že ke skutečné aktivaci systému ER dochází při nižších koncentracích, je nutné v systémech analýzy stabilně transfekované ER TA pečlivě zkoumat exprese luciferázy získané při vysoké koncentraci fytoestrogenů nebo podobných sloučenin, u nichž existuje podezření, že vyvolávají nadměrnou aktivaci reportérového genu luciferázy podobně jako fytoestrogeny (viz dodatek 2).

4. Před použitím této analýzy pro regulační účely je třeba přečíst si „VŠEOBECNÝ ÚVOD“ a „SLOŽKY ANALÝZY ER TA“. Definice a zkratky používané v této zkušební metodě jsou popsány v dodatku 1.

PRINCIP ANALÝZY (VIZ TAKÉ VŠEOBECNÝ ÚVOD)

5. Analýza se používá na indikaci vazby ligandu na estrogenový receptor, po níž následuje přesun komplexu receptor-ligand do jádra. V jádru se komplex receptor-ligand naváže na specifické responzivní elementy DNA a transaktivuje reportérový gen (*luc*), což vyvolá tvorbu luciferázy a následnou emisi světla, které lze kvantifikovat pomocí luminometru. Aktivitu luciferázy lze rychle a levně vyhodnotit pomocí řady komerčně dostupných testů. Test VM7Luc ER TA využívá ER responzivní buněčnou linii lidského adenokarcinomu prsu, VM7, která je stabilně transfekována reportérovou konstrukcí světlušek *luc* pod kontrolou čtyř estrogenových responzivních elementů umístěných před promotorem viru myšího nádoru prsní žlázy (MMTV), k detekci látek s agonistickou nebo antagonistickou aktivitou ER *in vitro*. Tento promotor MMTV vykazuje jen malou křížovou reaktivitu s jinými steroidními a nesteroidními hormony (8). Kritéria pro interpretaci údajů jsou podrobně popsána v odstavci 41. Stručně řečeno, pozitivní odpověď se určuje podle křivky závislosti odpovědi na koncentraci obsahující alespoň tři body s nepřekrývajícími se chybovými úsečkami (střední hodnota $\pm$ SD) a podle změny amplitudy (normalizovaná relativní luminiscenční jednotka [RLU]) ve výši alespoň 20 % maximální hodnoty pro referenční standard (17 β -estradiol [E2; CASRN 50-28-2] při analýze agonistů, raloxifen-hydrochlorid [Ral; CASRN 84449-90-1]/E2 při analýze antagonistů).

POSTUP

Buněčná linie

6. Pro analýzu by se měla používat stabilně transfekovaná buněčná linie VM7Luc4E2. Tato buněčná linie je v současnosti k dispozici pouze na základě technické licenční smlouvy od Kalifornské univerzity, Davis, Kalifornie, USA¹ a společnosti Xenobiotic Detection Systems Inc., Durham, North Carolina, USA².

Stabilita buněčné linie

7. Aby se zachovala stabilita a integrita buněčné linie, měly by buňky růst více než jednu pasáž ze zmrazené zásoby v udržovacím médiu (viz odstavec 9). Buňky by neměly být kultivovány déle než 30 pasáží. Pro buněčnou linii VM7Luc4E2 bude 30 pasáží trvat zhruba tři měsíce.

Buněčná kultura a podmínky na destičce

8. Měly být dodržovány postupy uvedené v pokynu ke správné praxi při kultivaci buněk (5)(6), aby byla zajištěna kvalita všech materiálů a metod a zachována integrita, validita a reprodukovatelnost veškeré provedené práce.
9. Buňky VM7Luc4E2 se uchovávají v médiu RPMI 1640 doplněném 0,9% přípravkem Pen-Strep a 8,0% fetálním bovinním sérem (FBS) v inkubátoru vyhrazeném pro tkáňové kultury při teplotě 37 °C ± 1 °C, vlhkosti vzduchu 90 % ± 5 % a 5,0 % ± 1 % CO₂/vzduch.
10. Po dosažení konfluence ~ 80 % se buňky VM7Luc4E2 subkultivují a po dobu 48 hodin upravují v prostředí bez estrogenů, než jsou umístěny na 96jamkovou mikrotitrační destičku, kde jsou exponovány zkoušenými chemickými látkami a analyzovány na indukci luciferázové aktivity závislé na estrogenu. Médium bez estrogenů (EFM) obsahuje Dulbeccovu modifikaci Eaglova média bez fenolové červeně (DMEM), doplněného 4,5 % FBS ošetřeného aktivním uhlím/dextranem, 1,9 % L-glutaminu a 0,9 % Pen-Strepu. Žádné plastové pomůcky by neměly vykazovat estrogení aktivitu [viz podrobný protokol (7)].

Kritéria přijatelnosti

¹ Michael S. Denison, Ph.D. Professor, Dept. of Environmental Toxicology, 4241 Meyer Hall, One Shields Ave, University of California, Davis, CA 95616, E: msdenison@ucdavis.edu, (530) 754-8649.

² Xenobiotic Detection Systems Inc. 1601 East Geer Street, Suite S, Durham NC, 27704 USA, email: info@dioxins.com, Telefon: 919-688-4804, Fax: 919-688-4404 Org.

11. Přijetí nebo odmítnutí zkoušky vychází z hodnocení referenčního standardu a kontrolních výsledků z každého experimentu na 96jamkové destičce. Každý referenční standard se zkouší v několika koncentracích a na několika vzorcích každé referenční i kontrolní koncentrace. Výsledky se porovnají s kvalitativními kontrolami (QC) u těch parametrů, které byly odvozeny z dosavadních databází agonistů a antagonistů, které si každá laboratoř vypracovala při prokazování způsobilosti. Dosavadní databáze se průběžně aktualizují o hodnoty referenčních standardů a kontrol. Při změnách vybavení nebo podmínek v laboratoři může být nutná aktualizace dosavadních databází.

Zkouška agonistů

Zkouška ke stanovení rozsahu

- Indukce: Indukce na destičce se měří vydělením průměrné nejvyšší referenční standardní hodnoty relativní luminiscenční jednotky (RLU) E2 průměrnou kontrolní hodnotou RLU DMSO. Obvykle je dosažena pětinašobná indukce, ale pro účely přijetí by měla být indukce větší než nebo rovna čtyřnásobku.
- Výsledky kontroly DMSO: Kontrolní hodnoty RLU rozpouštědla by měly být v rozsahu 2,5násobku směrodatné odchylky dosavadní kontrolní střední hodnoty RLU rozpouštědla.
- Experiment, při němž není splněno ani jedno kritérium, je třeba vyřadit a zopakovat.

Souhrnný test

Zahrnuje kritéria přijatelnosti ze zkoušky ke stanovení rozsahu agonistů a tyto údaje:

- Referenční standardní výsledky: Tvar křivky závislosti odpovědi na koncentraci u referenčního standardu E2 by měl být sigmoidní a křivka by měla mít alespoň tři hodnoty v lineární části křivky závislosti odpovědi na koncentraci.
- Výsledky pozitivní kontroly: Kontrolní hodnoty RLU methoxychloru by měly být větší než střední hodnota DMSO plus trojnásobek směrodatné odchylky od střední hodnoty DMSO.
- Experiment, při němž není splněno některé z kritérií přijatelnosti, je třeba vyřadit a zopakovat.

Zkouška antagonistů

Zkouška ke stanovení rozsahu

- Redukce: Redukce na destičce se měří vydělením průměrné nejvyšší referenční standardní hodnoty RLU Ral/E2 průměrnou kontrolní hodnotou RLU DMSO. Obvykle je dosažena pětinašobná redukce, ale pro účely přijetí by měla být redukce větší než nebo rovna trojnásobku.

- Výsledky kontroly E2: Kontrolní hodnoty RLU E2 by měly být v rozsahu 2,5násobku směrodatné odchylky dosavadní kontrolní střední hodnoty RLU E2.
- Výsledky kontroly DMSO: Kontrolní hodnoty RLU DMSO by měly být v rozsahu 2,5násobku směrodatné odchylky dosavadní kontrolní střední hodnoty RLU rozpouštědla.
- Experiment, při němž není splněno některé z kritérií přijatelnosti, se vyřadí a zopakuje.

Souhrnný test

Zahrnuje kritéria přijatelnosti ze zkoušky ke stanovení rozsahu antagonistů a tyto údaje:

- Referenční standardní výsledky: Tvar křivky závislosti odpovědi na koncentraci u referenčního standardu Ral/E2 by měl být sigmoidní a křivka by měla mít alespoň tři hodnoty v lineární části křivky závislosti odpovědi na koncentraci.
- Výsledky pozitivní kontroly: Kontrolní hodnoty RLU tamoxifenu/E2 by měly být menší než kontrolní střední hodnota E2 minus trojnásobek směrodatné odchylky od střední hodnoty E2.
- Experiment, při němž není splněno některé z kritérií přijatelnosti, se vyřadí a zopakuje.

Referenční standardy, pozitivní kontrola a kontrola vehikula

Kontrola vehikula (analýzy agonistů a antagonistů)

12. Rozpouštědlo, které se používá na rozpuštění zkoušených chemických látek, by mělo být testováno jako kontrola s vehikulem. Vehikulem použitým při validaci analýzy VM7Luc ER TA byl 1% (obj.) dimethylsulfoxid (DMSO, CASRN 67-68-5) (viz odstavec 24). Jestliže je použito jiné vehikulum než DMSO, měly by být všechny referenční standardy, kontroly a zkoušené chemické látky testovány podle potřeby ve stejném vehikulu.

Referenční standardy (zjištění rozsahu agonistů)

13. Referenčním standardem je E2 (CASRN 50-28-2). Při zkouškách ke stanovení rozsahu sestává referenční standard z postupného ředění čtyř koncentrací E2 ($1,84 \times 10^{-10}$, $4,59 \times 10^{-11}$, $1,15 \times 10^{-11}$ a $2,87 \times 10^{-12}$ M), přičemž každá koncentrace se zkouší v duplikátních jamkách.

Referenční standardy (souhrnný test agonistů)

14. E2 pro souhrnný test sestává z postupného ředění 1 : 2 a zahrnuje 11 koncentrací (v rozsahu od $3,67 \times 10^{-10}$ do $3,59 \times 10^{-13}$ M) E2 v duplikátních jamkách.

Referenční standardy (zjištění rozsahu antagonistů)

15. Referenčním standardem je kombinace Ral (CASRN 84449-90-1) a E2 (CASRN 50-28-2). Ral/E2 pro zkoušky ke stanovení rozsahu sestává z postupného ředění tří koncentrací Ral

($3,06 \times 10^{-9}$, $7,67 \times 10^{-10}$ a $1,92 \times 10^{-10}$ M) plus fixní koncentrace E2 ($9,18 \times 10^{-11}$ M) v duplikátních jamkách.

Referenční standard (souhrnný test antagonistů)

16. Ral/E2 pro souhrnný test sestává z postupného ředění Ral 1 : 2 (v rozsahu od $2,45 \times 10^{-8}$ do $9,57 \times 10^{-11}$ M) plus fixní koncentrace ($9,18 \times 10^{-11}$ M) E2 zahrnujícího devět koncentrací Ral/E2 v duplikátních jamkách.

Slabá pozitivní kontrola (agonista)

17. Slabá pozitivní kontrola je $9,06 \times 10^{-6}$ M *p,p'*-methoxychlor (methoxychlor; CASRN 72-43-5) v EFM.

Slabá pozitivní kontrola (antagonista)

18. Slabá pozitivní kontrola sestává z tamoxifenu (CASRN 10540-29-1) $3,36 \times 10^{-6}$ M s $9,18 \times 10^{-11}$ M E2 v EFM.

Kontrola E2 (pouze analýza antagonistů)

19. Kontrola E2 je $9,18 \times 10^{-11}$ M E2 v EFM a používá se jako výchozí negativní kontrola.

Násobná indukce (agonista)

20. Indukce luciferázové aktivity referenčního standardu (E2) se měří vydělením průměrné nejvyšší referenční standardní hodnoty RLU E2 průměrnou kontrolní hodnotou RLU DMSO, přičemž výsledek by měl být větší než čtyřnásobek.

Násobná indukce (antagonista)

21. Střední luciferázová aktivita referenčního standardu (Ral/E2) se měří vydělením průměrné nejvyšší referenční standardní hodnoty RLU Ral/E2 průměrnou kontrolní hodnotou RLU DMSO a měla by být větší než trojnásobek.

Prokázání odborné způsobilosti laboratoře (viz odstavec 14 a tabulky 3 a 4 v části «SLOŽKY ANALÝZY ER TA» této zkušební metody)

Vehikulum

22. Zkoušené chemické látky by měly být rozpuštěny v rozpouštědle, které zkoušenou chemickou látku rozpouští a je mísitelné s kultivačním médiem. Vhodnými vehikuly jsou voda, etanol (čistota 95 % až 100 %) a DMSO. Jestliže se používá DMSO, neměla by úroveň překročit 1 % (obj.). Pro každé vehikulum je třeba prokázat, že maximální použitý objem není cytotoxický a nenarušuje provedení analýzy. Referenční standardy a kontroly se rozpustí ve 100% rozpouštědle a poté naředí na vhodné koncentrace v EFM.

Příprava zkoušených chemických látek

23. Zkoušené chemické látky se rozpustí ve 100% DMSO (nebo vhodném rozpouštědle) a poté naředí na vhodné koncentrace v EFM. Před rozpuštěním a naředěním by se měly všechny zkoušené chemické látky nechat ustálit na pokojovou teplotu. Pro každý experiment by se měly připravit čerstvé roztoky zkoušených chemických látek. V roztocích by neměla být znatelná žádná sraženina ani zákal. Zásoba referenčních standardů a kontrol může být připravována hromadně; pro každý experiment by však měly být připraveny čerstvé konečné referenční standardní a kontrolní roztoky a zkoušené chemické látky a měly by být použity do 24 hodin od přípravy.

Rozpustnost a cytotoxicita: Důvody pro zjištění rozmezí dávek

24. Zkoušky ke stanovení rozsahu zahrnují sedmibodové postupné ředění – 1:10 a provádějí se dvakrát. Nejdříve se chemické látky zkoušejí do maximální koncentrace 1 mg/ml (~1 mM) u zkoušek agonistů a 20 µg/ml (~10 µM) u zkoušek antagonistů. Experimenty ke stanovení rozsahu se používají k určení:
- počátečních koncentrací zkoušené chemické látky, jež mají být použity při souhrnném testování,
 - ředění zkoušených chemických látek (1 : 2 nebo 1 : 5), jež mají být použity při souhrnném testování.
25. Posouzení životaschopnosti buněk / cytotoxicity je zahrnuto v protokolech o zkouškách agonistů a antagonistů (7) a je součástí zkoušek ke stanovení rozsahu a souhrnného testování. Metodou posouzení cytotoxicity, která byla použita pro posouzení životaschopnosti buněk při validaci analýzy VM7Luc ER TA (1), byla škálovaná kvalitativní vizuální observační metoda; ke stanovení cytotoxicity však může být použita kvantitativní metoda (viz protokol (7). Údaje z koncentrací zkoušených chemických látek, které vyvolávají více než 20% redukci životaschopnosti, nelze použít.

Expozice zkoušené chemické látky a organizace testovacích destiček

26. Buňky se spočítají a umístí na 96jamkové mikrotitrační destičky (2 x 10⁵ buněk na jamku) v EFM a ponechají se inkubovat po dobu 24 hodin, aby se umožnilo přichycení buněk na destičku. EFM se odstraní a nahradí zkoušenými a referenčními chemickými látkami v EFM a ponechají se inkubovat po dobu 19–24 hodin. Zvláštní pozornost je třeba věnovat sloučeninám, které jsou vysoce těkavé, neboť vedlejší kontrolní jamky mohou generovat falešně pozitivní výsledky. V těchto případech může pomoci použití „zapečetěných destiček“ účinně izolovat jednotlivé jamky v průběhu zkoušení, a proto je doporučováno.

Zkoušky ke stanovení rozsahu

27. Při zkouškách ke stanovení rozsahu se používají všechny jamky 96jamkové mikrotitrační destičky na testování až šesti zkoušených chemických látek v sedmibodovém postupném ředění 1:10 duplicitně (viz obrázky 1 a 2).

- Při zkouškách ke stanovení rozsahu *agonistů* se používají čtyři koncentrace E2 duplicitně jako referenční standard a čtyři replikované jamky pro kontrolu DMSO.
- Při zkouškách ke stanovení rozsahu *antagonistů* se používají tři koncentrace Ral/E2 s $9,18 \times 10^{-11}$ M E2 duplicitně jako referenční standard a tři replikované jamky pro kontrolu E2 a DMSO.

Obrázek 1: Uspořádání 96jamkové mikrotitrační destičky při zkoušce ke stanovení rozsahu agonistů

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TC1-1	TC1-1	TC2-1	TC2-1	TC3-1	TC3-1	TC4-1	TC4-1	TC5-1	TC5-1	TC6-1	TC6-1
B	TC1-2	TC1-2	TC2-2	TC2-2	TC3-2	TC3-2	TC4-2	TC4-2	TC5-2	TC5-2	TC6-2	TC6-2
C	TC1-3	TC1-3	TC2-3	TC2-3	TC3-3	TC3-3	TC4-3	TC4-3	TC5-3	TC5-3	TC6-3	TC6-3
D	TC1-4	TC1-4	TC2-4	TC2-4	TC3-4	TC3-4	TC4-4	TC4-4	TC5-4	TC5-4	TC6-4	TC6-4
E	TC1-5	TC1-5	TC2-5	TC2-5	TC3-5	TC3-5	TC4-5	TC4-5	TC5-5	TC5-5	TC6-5	TC6-5
F	TC1-6	TC1-6	TC2-6	TC2-6	TC3-6	TC3-6	TC4-6	TC4-6	TC5-6	TC5-6	TC6-6	TC6-6
G	TC1-7	TC1-7	TC2-7	TC2-7	TC3-7	TC3-7	TC4-7	TC4-7	TC5-7	TC5-7	TC6-7	TC6-7
H	E2-1	E2-2	E2-3	E2-4	VC	VC	VC	VC	E2-1	E2-2	E2-3	E2-4

Zkratky: E2-1 až E2-4 = koncentrace referenčního standardu E2 (od vysoké po nízkou); TC1-1 až TC1-7 = koncentrace (od vysoké po nízkou) zkoušené chemické látky 1 (TC1); TC2-1 až TC2-7 = koncentrace (od vysoké po nízkou) zkoušené chemické látky 2 (TC2); TC3-1 až TC3-7 = koncentrace (od vysoké po nízkou) zkoušené chemické látky 3 (TC3); TC4-1 až TC4-7 = koncentrace (od vysoké po nízkou) zkoušené chemické látky 4 (TC4); TC5-1 až TC5-7 = koncentrace (od vysoké po nízkou) zkoušené chemické látky 5 (TC5); TC6-1 až TC6-7 = koncentrace (od vysoké po nízkou) zkoušené chemické látky 6 (TC6); VC = kontrola vehikula (DMSO [1 % obj. EFM.]).

Obrázek 2: Uspořádání 96jamkové mikrotitrační destičky při zkoušce ke stanovení rozsahu antagonistů

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TC1-1	TC1-1	TC2-1	TC2-1	TC3-1	TC3-1	TC4-1	TC4-1	TC5-1	TC5-1	TC6-1	TC6-1
B	TC1-2	TC1-2	TC2-2	TC2-2	TC3-2	TC3-2	TC4-2	TC4-2	TC5-2	TC5-2	TC6-2	TC6-2
C	TC1-3	TC1-3	TC2-3	TC2-3	TC3-3	TC3-3	TC4-3	TC4-3	TC5-3	TC5-3	TC6-3	TC6-3
D	TC1-4	TC1-4	TC2-4	TC2-4	TC3-4	TC3-4	TC4-4	TC4-4	TC5-4	TC5-4	TC6-4	TC6-4
E	TC1-5	TC1-5	TC2-5	TC2-5	TC3-5	TC3-5	TC4-5	TC4-5	TC5-5	TC5-5	TC6-5	TC6-5
F	TC1-6	TC1-6	TC2-6	TC2-6	TC3-6	TC3-6	TC4-6	TC4-6	TC5-6	TC5-6	TC6-6	TC6-6
G	TC1-7	TC1-7	TC2-7	TC2-7	TC3-7	TC3-7	TC4-7	TC4-7	TC5-7	TC5-7	TC6-7	TC6-7
H	Ral-1	Ral-2	Ral-3	VC	VC	VC	E2	E2	E2	Ral-1	Ral-2	Ral-3

Zkratky: E2 = E2 kontrola; Ral-1 až Ral-3 = koncentrace raloxifenu/referenčního standardu E2 (od vysoké po nízkou); TC1-1 až TC1-7 = koncentrace (od vysoké po nízkou) zkoušené chemické látky 1 (TC1); TC2-1 až TC2-7 = koncentrace (od vysoké po nízkou) zkoušené chemické látky 2 (TC2); TC3-1 až TC3-7 = koncentrace (od vysoké po nízkou) zkoušené chemické látky 3 (TC3); TC4-1 až TC4-7 = koncentrace (od vysoké po nízkou) zkoušené chemické látky 4 (TC4); TC5-1 až TC5-7 = koncentrace (od vysoké po nízkou) zkoušené chemické látky 5 (TC5); TC6-1 až TC6-7 = koncentrace (od vysoké po nízkou) zkoušené chemické látky 6 (TC6); VC = kontrola vehikula (DMSO [1 % obj. EFM.]).

Poznámka: Všechny zkoušené chemické látky jsou testovány v přítomnosti $9,18 \times 10^{-11}$ M E2.

28. Doporučený konečný objem média potřebného pro každou jamku je 200 μ l. Používejte pouze testovací destičky, v nichž buňky ve všech jamkách vykazují životaschopnost 80 % a více.

29. Stanovení počátečních koncentrací pro souhrnné testování **agonistů** je podrobně popsáno v protokolu pro agonisty (7). Stručně řečeno, použijí se tato kritéria:

- Jestliže na křivce koncentrace zkoušené chemické látky nejsou žádné body, které by byly větší než střední hodnota plus trojnásobek směrodatné odchylky kontroly DMSO, provede se souhrnné testování s použitím 11bodového postupného ředění 1 : 2, počínaje maximální rozpustnou koncentrací.
- Jestliže na křivce koncentrace zkoušené chemické látky jsou body větší než střední hodnota plus trojnásobek směrodatné odchylky kontroly DMSO, měla by být počáteční koncentrace, která se použije pro 11bodové postupné ředění při souhrnném testování o jeden logaritmus vyšší než koncentrace vykazující nejvyšší upravenou hodnotu RLU ve zkoušce ke zjištění rozsahu. 11bodové ředění vychází z ředění 1 : 2 nebo 1 : 5 podle těchto kritérií:

Postupné 11bodové ředění 1 : 2 by se mělo používat, pokud bude výsledné rozmezí koncentrace zahrnovat celý rozsah odpovědí vycházejících z křivky závislosti odpovědi na koncentraci vytvořené při zkoušce ke zjištění rozsahu. Jinak používejte ředění 1 : 5.

- Jestliže zkoušená chemická látka vykazuje při zkoušce ke zjištění rozsahu dvoufázovou křivku závislosti odpovědi na koncentraci, měly by být při souhrnném testování vyřešeny také obě fáze.

30. Stanovení počátečních koncentrací pro souhrnné testování **antagonistů** je podrobně popsáno v protokolu pro antagonisty (7). Stručně, použijí se tato kritéria:

- Jestliže na křivce koncentrace zkoušené chemické látky nejsou žádné body, které by byly menší než střední hodnota minus trojnásobek směrodatné odchylky kontroly E2, provede se souhrnné testování s použitím 11bodového postupného ředění 1 : 2, počínaje maximální rozpustnou koncentrací.
- Jestliže na křivce koncentrace zkoušené chemické látky jsou body menší než střední hodnota minus trojnásobek směrodatné odchylky kontroly E2, měla by počáteční koncentrace, která se použije pro 11bodové postupné ředění při souhrnném testování, odpovídat jedné z těchto možností:

- Koncentrace vykazující při zkoušce ke zjištění rozsahu nejnižší upravenou hodnotou RLU

- Maximální rozpustná koncentrace (viz protokol pro antagonisty (7), obrázek 14-2)
 - Nejnižší cytotoxická koncentrace (viz protokol pro antagonisty (7), obrázek 14-3, kde je uveden podobný příklad).
- 11bodové ředění vychází z postupného ředění 1 : 2 nebo 1 : 5 podle těchto kritérií:

Postupné 11bodové ředění 1 : 2 by se mělo používat, pokud bude výsledné rozmezí koncentrace zahrnovat celý rozsah odpovědí vycházejících z křivky závislosti odpovědi na koncentraci vytvořené při zkoušce ke zjištění rozsahu. Jinak se použije ředění 1 : 5.

Souhrnné testování

31. Souhrnné testování sestává z jedenáctibodového postupného ředění (postupné ředění buď 1 : 2, nebo 1 : 5 na základě počáteční koncentrace pro kritéria souhrnného testování), přičemž každá koncentrace se testuje ve třech jamkách 96jamkové mikrotitrační destičky (viz obrázky 3 a 4).
- Při souhrnném testování *agonistů* se používá 11 koncentrací E2 duplicitně jako referenční standard. Na každé destičce jsou zahrnuty čtyři replikované jamky pro kontrolu s DMSO a čtyři replikované jamky pro kontrolu s methoxychlorem ($9,06 \times 10^{-6}$ M).
 - Při zkouškách ke stanovení rozsahu *antagonistů* se používá devět koncentrací Ral/E2 s $9,18 \times 10^{-11}$ M E2 duplicitně jako referenční standard a čtyři replikované jamky pro kontrolu E2 $9,18 \times 10^{-11}$ M, čtyři replikované jamky pro kontrolu DMSO a čtyři replikované jamky pro tamoxifen $3,36 \times 10^{-6}$ M.

Obrázek 3: Uspořádání 96jamkové mikrotitrační destičky při souhrnném testování agonistů

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	VC
B	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	VC
C	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	VC
D	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	VC
E	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	Meth
F	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	Meth
G	E2-1	E2-2	E2-3	E2-4	E2-5	E2-6	E2-7	E2-8	E2-9	E2-10	E2-11	Meth
H	E2-1	E2-2	E2-3	E2-4	E2-5	E2-6	E2-7	E2-8	E2-9	E2-10	E2-11	Meth

Zkratky: TC11-1 až TC1-11 = koncentrace (od vysoké po nízkou) zkoušené chemické látky 1; TC2-1 až TC2-11 = koncentrace (od vysoké po nízkou) zkoušené chemické látky 2; E2-1 až E2-11 = koncentrace referenčního standardu E2 (od vysoké po nízkou); Meth = p,p' methoxychlor slabá pozitivní kontrola; VC = DMSO (1 % obj.) EFM kontrola vehikula

Obrázek 4: Uspořádání 96jamkové mikrotitrační destičky při souhrnném testování antagonistů

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	VC
B	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	VC
C	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	VC
D	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	VC
E	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	Tam
F	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	Tam
G	Ral-1	Ral-2	Ral-3	Ral-4	Ral-5	Ral-6	Ral-7	Ral-8	Ral-9	E2	E2	Tam
H	Ral-1	Ral-2	Ral-3	Ral-4	Ral-5	Ral-6	Ral-7	Ral-8	Ral-9	E2	E2	Tam

Zkratky: E2 = E2 kontrola; Ral-1 až Ral-9 = koncentrace raloxifenu/referenčního standardu E2 (od vysoké po nízkou); Tam = tamoxifen/E2 slabá pozitivní kontrola; TC1-1 až TC1-11 = koncentrace (od vysoké po nízkou) zkoušené chemické látky 1 (TC1); TC2-1 až TC2-11 = koncentrace (od vysoké po nízkou) zkoušené chemické látky 2 (TC2); VC = kontrola vehikula (DMSO [1 % obj. EFM.]).

Poznámka: Jak bylo uvedeno, všechny referenční a testovací jamky obsahují pevně stanovenou koncentraci E2 ($9,18 \times 10^{-11}$ M).

32. Opakované souhrnné testy pro stejnou chemickou látku by měly být prováděny v různé dny, aby byla zajištěna nezávislost. Měly by být provedeny nejméně dva souhrnné testy. Jestliže jsou výsledky testů vzájemně rozporné (například jeden test je pozitivní, druhý negativní) nebo jestliže jeden z testů není adekvátní, měl by být proveden dodatečný třetí test.

Měření luminiscence

33. Luminiscence se měří v rozsahu 300 až 650 nm, a to pomocí injekčního luminometru a softwaru, který řídí objem vstřikování a interval měření (7). Světelné emise z každé jamky se vyjadřují jako RLU na jamku.

ANALÝZA ÚDAJŮ

Stanovení EC₅₀ /IC₅₀

34. Hodnota EC₅₀ (poloviční maximální účinná koncentrace zkoušené chemické látky [agonisté]) a hodnota IC₅₀ (poloviční maximální inhibiční koncentrace zkoušené chemické látky [antagonisté]) se stanoví z údajů o závislosti odpovědi na koncentraci. U zkoušených chemických látek, které jsou pozitivní při jedné nebo několika koncentracích, se koncentrace zkoušené chemické látky, která vyvolává poloviční maximální odpověď (IC₅₀ nebo EC₅₀) vypočítá pomocí analýzy Hillovy funkce nebo vhodným alternativním způsobem. Hillova funkce je čtyřparametrový logistický matematický model týkající se závislosti odpovědi na koncentraci zkoušené chemické látky (obvykle podle sigmoidní křivky) s využitím níže uvedené rovnice:

$$Y = Bottom + \frac{(Top - Bottom)}{1 + 10^{(lgEC_{50} - X)Hill\ Slope}}$$

kde:

Y = odpověď (tj. RLU);

X = logaritmus koncentrace;

Bottom = minimální odpověď;

Top = maximální odpověď;

log EC₅₀ (nebo log IC₅₀) = logaritmus X jako odpověď uprostřed mezi maximální a minimální;

Hillův koeficient = sklon křivky.

Model počítá nejlépe odpovídající hodnoty pro parametry maximální odpovědi, minimální odpovědi, sklon křivky a IC₅₀ a EC₅₀. Pro výpočet hodnot EC₅₀ a IC₅₀ by měl být použit vhodný statistický software (např. statistický software Graphpad Prism^R).

Stanovení odlehklých hodnot

35. Správné statistické posouzení by mohlo být usnadněno zařazením (například) Q-testu (viz protokoly pro agonisty a antagonisty (7) pro stanovení „nepoužitelných“ jamek, které budou vyřazeny z analýzy dat.
36. U referenčních standardních replikátů E2 (velikost vzorku dva) se každá upravená hodnota RLU pro replikáty při dané koncentraci E2 považuje za odlehlou hodnotu, jestliže je více než 20 % nad nebo pod upravenou hodnotou RLU pro tuto koncentraci v dosavadní databázi.

Sběr a korekce dat z luminometru pro testování ke stanovení rozsahu

37. Nezpracovaná data z luminometru je třeba převést do vzorového tabulkového editoru určeného pro analýzu. Mělo by být stanoveno, zda jsou zde odlehlé datové body, které je třeba odstranit. (Viz kritéria přijatelnosti zkoušky, kde jsou uvedeny parametry určované v analýzách.) Provádějí se tyto výpočty:

Agonista

- Krok 1 Vypočítejte střední hodnotu pro kontrolu s vehikulem DMSO (VC).
- Krok 2 Odečtěte střední hodnotu VC DMSO od hodnoty každé jamky, abyste normalizovali data.
- Krok 3 Vypočítejte střední hodnotu násobné indukce pro referenční standard (E2).
- Krok 4 Vypočítejte střední hodnotu EC₅₀ pro zkoušené chemické látky.

Antagonista

- Krok 1 Vypočítejte střední hodnotu pro VC DMSO.
- Krok 2 Odečtěte střední hodnotu VC DMSO od hodnoty každé jamky, abyste normalizovali data.
- Krok 3 Vypočítejte střední násobnou redukci pro referenční standard (Ral/E2).
- Krok 4 Vypočítejte střední hodnotu pro referenční standard E2.
- Krok 5 Vypočítejte střední hodnotu IC₅₀ pro zkoušené chemické látky.

Sběr a korekce dat z luminometru pro souhrnné testování

38. Nezpracovaná data z luminometru je třeba převést do vzorového tabulkového editoru určeného pro analýzu. Mělo by být stanoveno, zda jsou zde odlehlé datové body, které je třeba odstranit. (Viz kritéria přijatelnosti zkoušky, kde jsou uvedeny parametry určované v analýzách.) Provádějí se tyto výpočty:

Agonista

- Krok 1 Vypočítejte střední hodnotu pro VC DMSO.
- Krok 2 Odečtěte střední hodnotu VC DMSO od hodnoty každé jamky, abyste normalizovali data.

- Krok 3 Vypočítejte střední hodnotu násobné indukce pro referenční standard (E2).
 Krok 4 Vypočítejte střední hodnotu EC₅₀ pro E2 a zkoušené chemické látky.
 Krok 5 Vypočítejte střední upravenou hodnotu RLU pro methoxychlor.

Antagonista

- Krok 1 Vypočítejte střední hodnotu pro VC DMSO.
 Krok 2 Odečtěte střední hodnotu VC DMSO od hodnoty každé jamky, abyste normalizovali data.
 Krok 3 Vypočítejte střední násobnou indukci pro referenční standard (Ral/E2).
 Krok 4 Vypočítejte střední hodnotu IC₅₀ pro Ral/E2 a zkoušené chemické látky.
 Krok 5 Vypočítejte střední upravenou hodnotu RLU pro tamoxifen.
 Krok 6 Vypočítejte střední hodnotu pro referenční standard E2.

Kritéria interpretace údajů

39. Analýza VM7Luc ER TA je součástí přístupu založeného na průkazných důkazech a má pomoci stanovit priority u látek pro zkoušení ED *in vivo*. Součástí tohoto postupu stanovení priorit bude klasifikace zkoušené chemické látky jako pozitivní nebo negativní pro ER agonistickou nebo antagonistickou aktivitu. Pozitivní a negativní rozhodovací kritéria použitá ve validační studii analýzy VM7Luc ER TA jsou popsána v tabulce 1.

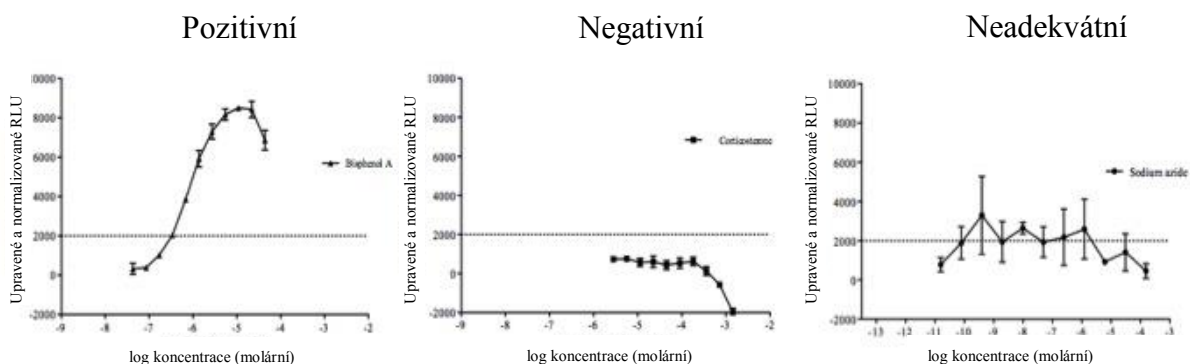
Tabulka 1: Pozitivní a negativní kritéria rozhodování

AGONISTICKÁ AKTIVITA	
Pozitivní	- Všechny zkoušené chemické látky klasifikované jako <i>pozitivní</i> u ER agonistické aktivity by měly mít křivku závislosti odpovědi na koncentraci sestávající z výchozí hodnoty, po níž následuje pozitivní sklon a křivku ukončuje plató nebo vrchol. V některých případech mohou být definovány pouze dvě z těchto charakteristik (výchozí hodnota – sklon nebo sklon – vrchol). - Přímka definující pozitivní sklon by měla obsahovat alespoň tři body s nepřekrývajícími se chybovými úsečkami (střední hodnota $\pm$ SD). Body vytvářející výchozí hodnotu se vyloučí, ale lineární část křivky může zahrnovat vrchol prvního bodu plató. - Pozitivní klasifikace vyžaduje amplitudu odpovědi, rozdíl mezi výchozí hodnotou a vrcholem, alespoň 20 % maximální hodnoty pro referenční standard, E2 (tj. 2 000 RLU nebo více, když je hodnota maximální odpovědi referenčních standardů [E2] upravena na 10 000 RLU). - Pro každou pozitivní zkoušenou chemickou látku by měla být vypočítána pokud možno hodnota EC₅₀.

Negativní	Průměrná upravená hodnota RLU pro danou koncentraci je na nebo pod střední hodnotou RLU kontroly DMSO plus trojnásobek směrodatné odchylky hodnoty RLU DMSO.
Neadekvátní	Data, která nelze interpretovat jako platná podle vykazované přítomnosti nebo nepřítomnosti aktivity vzhledem k velkým kvalitativním nebo kvantitativním omezením, se považují za neadekvátní a nelze je použít na stanovení, zda je zkoušená chemická látka pozitivní nebo negativní. Chemické látky je třeba otestovat znovu.
ANTAGONISTICKÁ AKTIVITA	
Pozitivní	- Data zkoušené chemické látky vytvářejí křivku závislosti odpovědi na koncentraci sestávající z výchozí hodnoty, po níž následuje negativní sklon. - Přímka definující negativní sklon by měla obsahovat alespoň tři body s nepřekrývajícími se chybovými úsečkami; body vytvářející výchozí hodnotu se vyloučí, ale lineární část křivky může zahrnovat první bod plató. - Mělo by zde být alespoň 20% snížení aktivity oproti maximální hodnotě pro referenční standard, Ral/E2 (tj. 8 000 RLU nebo méně, když je hodnota maximální odpovědi referenčních standardů [Ral/E2] upravena na 10 000 RLU). - Nejvyšší necytotoxické koncentrace zkoušené chemické látky by měly být menší než nebo rovny 1×10^{-5} M. - Pro každou pozitivní zkoušenou chemickou látku by měla být vypočítána pokud možno hodnota IC_{50}.
Negativní	Všechny datové body nad hodnotou ED_{80} (80 % odpovědi E2, nebo 8 000 RLU) při koncentracích menších než $1,0 \times 10^{-5}$ M.
Neadekvátní	Data, která nelze interpretovat jako platná podle vykazované přítomnosti nebo nepřítomnosti aktivity vzhledem k velkým kvalitativním nebo kvantitativním omezením, se považují za neadekvátní a nelze je použít na stanovení, zda je zkoušená chemická látka pozitivní nebo negativní. Chemickou látku je třeba otestovat znovu.

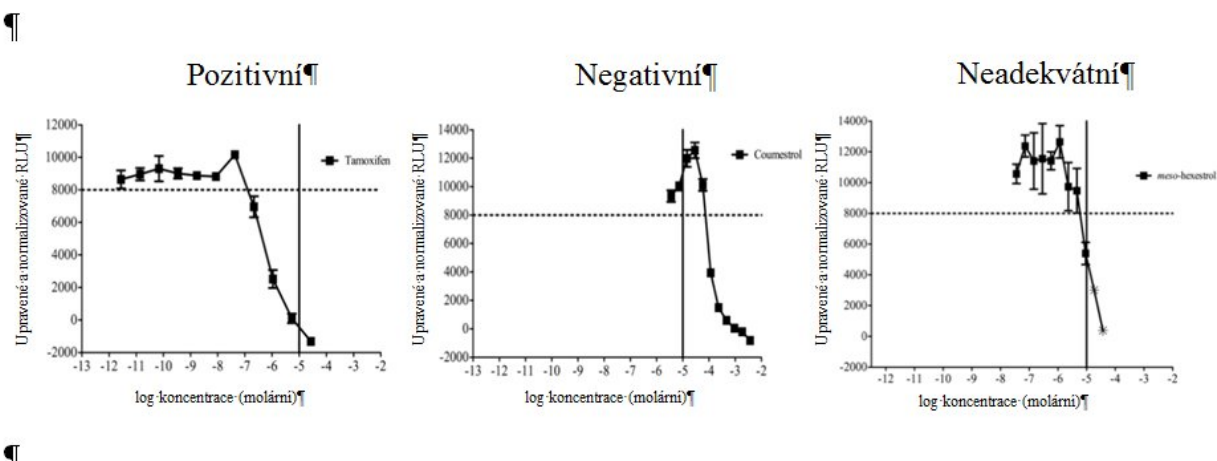
40. Pozitivní výsledky budou pokud možno charakterizovány jak intenzitou účinku, tak i koncentrací, při níž k účinku dochází. Příklady pozitivních, negativních a neadekvátních dat jsou uvedeny na obrázcích 5 a 6.

Obrázek 5: Příklady agonistů: Pozitivní, negativní a neadekvátní data



Tečkovaná čára označuje 20 % odpovědi E2, 2 000 upravených a normalizovaných RLU.

Obrázek 6: Příklady antagonistů: Pozitivní, negativní a neadekvátní data



Tečkovaná čára označuje 80 % odpovědi Ral/E2, 8 000 upravených a normalizovaných RLU.

Plná čára označuje $1,00 \times 10^{-5}$ M. Aby byla odpověď považována za pozitivní, měla by být pod čarou 8 000 RLU, a to při koncentracích menších než $1,00 \times 10^{-5}$ M.

Koncentrace označené hvězdičkou na grafu meso-hexestrolu označují skóre životaschopnosti „2“ nebo větší.

Výsledky zkoušek u meso-hexestrolu se považují za neadekvátní data, protože jediná odpověď, která je pod 8 000 RLU, se vyskytuje při $1,00 \times 10^{-5}$ M.

41. Výpočty EC_{50} a IC_{50} lze provést pomocí čtyřparametrové Hillovy funkce (viz protokol pro agonisty a protokol pro antagonisty, kde jsou uvedeny podrobnější informace (7)). Splnění kritérií přijatelnosti ukazuje, že systém funguje správně, ale nezaručuje to, že konkrétní provedení zkoušky podá přesné údaje. Opakování výsledků první zkoušky je nejlepším důkazem, že byly získány přesné údaje (viz odstavec 19 „SLOŽKY ANALÝZY ER TA“).

ZÁVĚREČNÁ ZPRÁVA

42. Viz odstavec 20 „SLOŽKY ANALÝZY ER TA“.

LITERATURA

- (1) ICCVAM. (2011). ICCVAM Test Method Evaluation Report on the LUMI-CELL[®] ER (BG1Luc ER TA) Test Method: An *In Vitro* Method for Identifying ER Agonists and Antagonists, National Institute of Environmental Health Sciences: Research Triangle Park, NC.
- (2) Monje P., Boland R. (2001). Subcellular Distribution of Native Estrogen Receptor α and β Isoforms in Rabbit Uterus and Ovary, *J. Cell Biochem.*, 82(3): 467-479.
- (3) Pujol P., *et al.* (1998). Differential Expression of Estrogen Receptor-Alpha and -Beta Messenger RNAs as a Potential Marker of Ovarian Carcinogenesis, *Cancer Res.*, 58(23): 5367-5373.
- (4) Weihua Z., *et al.* (2000). Estrogen Receptor (ER) β , a Modulator of ER α in the Uterus, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97(11): 936-5941.
- (5) Balls M., *et al.* (2006). The Importance of Good Cell Culture Practice (GCCP), *ALTEX*, 23(Suppl): 270-273.
- (6) Coecke S., *et al.* (2005). Guidance on Good Cell Culture Practice: a Report of the Second ECVAM Task Force on Good Cell Culture Practice, *Alternatives to Laboratory Animals*, 33: 261-287.
- (7) ICCVAM (2011). ICCVAM Test Method Evaluation Report, The LUMI-CELL[®] ER (BG1Luc ER TA) Test Method: An *In Vitro* Assay for Identifying Human Estrogen Receptor Agonist and Antagonist Activity of Chemicals, NIH Publication No 11-7850.
- (8) Rogers J.M., Denison M.S. (2000). Recombinant Cell Bioassays for Endocrine Disruptors: Development of a Stably Transfected Human Ovarian Cell Line for the Detection of Estrogenic and Anti-Estrogenic Chemicals, *In Vitro Mol. Toxicol.*, 13(1):67-82.
- (9) Escande A., *et al.* (2006). Evaluation of Ligand Selectivity Using Reporter Cell Lines Stably Expressing Estrogen Receptor Alpha or Beta, *Biochem. Pharmacol.*, 71(10):1459-69.

- (10) Thorne N., Inglese J., Auld D.S. (2010). Illuminating Insights into Firefly Luciferase and Other Bioluminescent Reporters Used in Chemical Biology, Chemistry and Biology, 17(6):646-57.
- (11) Kuiper G.G, *et al.* (1998). Interaction of Estrogenic Chemicals and Phytoestrogens with Estrogen Receptor Beta, Endocrinology, 139(10):4252-63.
- (12) Geisinger, *et al.* (1989). Characterization of a human ovarian carcinoma cell line with estrogen and progesterone receptors, Cancer 63, 280-288.
- (13) Baldwin, *et al.* (1998). BG-1 ovarian cell line: an alternative model for examining estrogen-dependent growth *in vitro*, *In Vitro Cell. Dev. Biol. – Animal*, 34, 649-654.
- (14) Li, Y., *et al.* (2014). Research resource: STR DNA profile and gene expression comparisons of human BG-1 cells and a BG-1/MCF-7 clonal variant, Mol. Endo. 28, 2072-2081.
- (15) Rogers, J.M. and Denison, M.S. (2000). Recombinant cell bioassays for endocrine disruptors: development of a stably transfected human ovarian cell line for the detection of estrogenic and anti-estrogenic chemicals, *In Vitro & Molec. Toxicol. Chem.* 13, 67-82.

DODATEK 4

ANALÝZA STABILNĚ TRANSFEKOVANÉ TRANSAKTIVACE ESTROGENOVÉHO RECEPTORU A PRO DETEKCI ESTROGENOVÝCH AGONISTICKÝCH A ANTAGONISTICKÝCH ÚČINKŮ CHEMICKÝCH LÁTEK S POUŽITÍM BUNĚČNÉ LINIE ERA CALUX

VÝCHOZÍ ÚVAHY A OMEZENÍ (VIZ TAKÉ VŠEOBECNÝ ÚVOD)

1. Při transaktivační analýze ER α CALUX se používá buněčná linie U2OS na detekci estrogenní agonistické a antagonistické aktivity zprostředkované lidským estrogenovým receptorem alfa (hER α). Relevanci a spolehlivost analýzy pro zamýšlený účel prokázala validační studie biotestu stabilně transfekovaného ER α CALUX od společnosti BioDetection Systems BV (Amsterdam, Nizozemsko) (1). Buněčná linie ER α CALUX exprimuje pouze stabilně transfekovaný lidský ER α (2)(3).
2. Tato analýza je specificky určena k detekci transaktivace zprostředkované hER α měřením bioluminiscence jako sledované vlastnosti. Použití bioluminiscence je v biotestech běžné vzhledem k vysokému poměru signálu k šumu (4).
3. Bylo hlášeno, že koncentrace fytoestrogenů vyšší než 1 μ M nadměrně aktivují reportérový gen luciferázy, přičemž výsledkem je luminiscence nezprostředkovaná receptorem (5)(6)(7). Proto je třeba vyšší koncentrace fytoestrogenů nebo podobných sloučenin, které mohou nadměrně aktivovat expresi luciferázy, pečlivě prozkoumat v analýzách stabilně transfekované transaktivace ER (viz dodatek 2).
4. Před použitím této analýzy pro regulační účely je třeba přečíst si „VŠEOBECNÝ ÚVOD“ a „SLOŽKY ANALÝZY ER TA“. Definice a zkratky používané v této zkušební metodě jsou popsány v dodatku 1.

PRINCIP ANALÝZY (VIZ TAKÉ VŠEOBECNÝ ÚVOD)

5. Biotest se používá k posouzení vazby ligandu na estrogenový receptor a následného přesunu komplexu receptor-ligand do jádra. V jádru se komplex receptor-ligand naváže na specifické responzivní elementy DNA a transaktivuje reportérový gen luciferázy světlušek, přičemž výsledkem je zvýšená buněčná exprese enzymu luciferáza. Po přidání substrátu luciferázy

luciferinu se luciferin transformuje na bioluminiscenční produkt. Vzniklé světlo lze snadno detekovat a kvantifikovat pomocí luminometru.

6. Zkušební systém využívá stabilně transfekované buňky ER α CALUX. Buňky ER α CALUX pocházejí z buněčné linie lidského osteoblastického osteosarkomu U2OS. Lidské buňky U2OS byly stabilně transfekovány 3xHRE-TATA-Luc a pSG5-neo-hER α pomocí koprecipitace s využitím fosforečnanu vápenatého. Buněčná linie U2OS byla vybrána jako nejlepší kandidát na estrogen- (a jiný steroidní hormon) responzivní reportérovou buněčnou linii na základě pozorování, že buněčná linie U2OS vykazovala jen malou nebo žádnou endogenní receptorovou aktivitu. Absence endogenních receptorů byla hodnocena pouze pomocí luciferázových reportérových plazmidů, kdy po přidání ligandů pro receptory nebyla vykazována žádná aktivita. Navíc tato buněčná linie podporovala silné, hormonem zprostředkované odpovědi, když byly přechodně vneseny příbuzné receptory (2)(3)(8).
7. Testování chemických látek na estrogenní nebo antiestrogenní aktivitu pomocí buněčné linie ER α CALUX zahrnuje předběžnou screeningovou zkoušku a souhrnné zkoušky. Při předběžné screeningové zkoušce se stanoví rozpustnost a cytotoxicita a přesně se určí rozmezí koncentrace zkoušených chemických látek pro souhrnné testování. V průběhu souhrnného testování se zkouší přesně určené rozmezí koncentrace zkoušených chemických látek v biotestech ER α CALUX, po nichž následuje klasifikace zkoušených chemických látek na agonistickou nebo antagonistickou aktivitu.
8. Kritéria pro interpretaci údajů jsou podrobně popsána v odstavci 59. Stručně řečeno, zkoušená chemická látka se považuje za pozitivní na agonistickou aktivitu v případě, že alespoň dvě po sobě jdoucí koncentrace zkoušené chemické látky vykazují odpověď, která se rovná nebo je vyšší než 10 % maximální odpovědi referenčního standardu 17 β -estradiolu (PC₁₀). Zkoušená chemická látka se považuje za pozitivní na antagonistickou aktivitu v případě, že alespoň dvě po sobě jdoucí koncentrace zkoušené chemické látky vykazují odpověď, která se rovná nebo je menší než 80 % maximální odpovědi referenčního standardu tamoxifenu (PC₈₀).

POSTUP

Buněčné linie

9. Pro analýzu by se měla používat stabilně transfekovaná buněčná linie U2OS ER α CALUX. Buněčnou linii lze získat od společnosti BioDetection Systems BV, Amsterdam, Nizozemsko na základě technické licenční smlouvy.

10. Používat by se měly pouze buněčné kultury bez mykoplazmat. Použité šarže buněk by měly být certifikovány jako negativní na kontaminaci mykoplazmatem, nebo by měl být před použitím proveden test na mykoplasma. Pro citlivou detekci mykoplazmové infekce se používá RT-PCR (polymerázová řetězová reakce v reálném čase) (9).

Stabilita buněčné linie

11. Aby se udržela stabilita a integrita buněk CALUX, měly by být buňky uchovávány v tekutém dusíku ($-80\text{ }^{\circ}\text{C}$). Po rozmrazení je třeba buňky pro přípravu nové kultury subkultivovat alespoň dvakrát, než se použijí pro hodnocení estrogení agonistické a antagonistické aktivity chemických látek. Buňky by neměly být subkultivovány déle než 30 pasáží.
12. Pro monitorování stability buněčné linie v čase by měla být reaktivita zkušebního systému agonistické a antagonistické aktivity ověřena hodnocením EC_{50} nebo IC_{50} referenčního standardu. Dále by měla být monitorována relativní indukce pozitivního kontrolního vzorku (PC) a negativního kontrolního vzorku (NC). Výsledky by měly odpovídat kritériím přijatelnosti pro biotest ER α CALUX agonistické (tabulka 3C) nebo antagonistické (tabulka 4C) aktivity. Referenční standardy, pozitivní a negativní kontroly jsou uvedeny v tabulce 1 a v tabulce 2 pro agonistický, respektive antagonistický režim.

Buněčná kultura a podmínky na destičce

13. Buňky U2OS se kultivují v růstovém médiu (médiu DMEM/F12 (1:1) s fenolovou červení jako indikátorem pH, doplněném fetálním bovinním sérem (7,5 %), neesenciálními aminokyselinami (1 %), 10 jednotkami/ml penicilinu, streptomycinu a geneticinu (G-418) jako selekčním markerem). Buňky se umístí do inkubátoru CO_2 (5 % CO_2) při teplotě $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ a 100% vlhkosti vzduchu. Když buňky dosáhnou konfluencí 85–95 %, buď se subkultivují, nebo připraví pro nasazení do 96jamkových mikrotitračních destiček. Ve druhém případě je třeba buňky resuspendovat ve zkušebním médiu 1×10^5 buněk/ml (DMEM/F12 (1:1) neobsahujícím estrogeny bez fenolové červeně, doplněném fetálním bovinním sérem ošetřeným aktivním uhlím, které je potaženo dextranem (5 % obj.), neesenciálními aminokyselinami (1% obj.), 10 jednotkami/ml penicilinu a streptomycinu) a umístit do jamek 96jamkových mikrotitračních destiček (100 μl homogenizované buněčné suspenze). 24 hodin před expozicí by buňky měly být předběžně inkubovány v inkubátoru (5 % CO_2 , $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 100% vlhkost vzduchu). Plastové pomůcky by neměly obsahovat estrogen.

Kritéria přijatelnosti

14. Agonistická a antagonistická aktivita zkoušených chemických látek se testuje ve zkušební sérii. Zkušební série sestává maximálně z 6 mikrotitračních destiček. Každá zkušební série obsahuje alespoň 1 celou sérii ředění referenčního standardu, pozitivní kontrolní vzorek,

negativní kontrolní vzorek a kontroly s rozpouštědlem. Na obrázku 1 a 2 je znázorněno uspořádání destiček pro agonistickou a antagonistickou zkušební sérii.

15. Každé ředění referenčních standardů, zkoušených chemických látek, všechny kontroly s rozpouštědlem a pozitivní a negativní kontroly by měly být analyzovány třikrát. Každá ze tří analýz by měla splňovat požadavky uvedené v tabulce 3A v tabulce 4A.
16. Na první destičce v každé zkušební sérii se měří celá série ředění referenčního standardu (17 β -estradiol na agonistickou aktivitu; tamoxifen na antagonistickou aktivitu). Aby bylo možné porovnat výsledky analýzy zbývajících 5 mikrotitračních destiček s první mikrotitrační destičkou obsahující celou křivku závislosti odpovědi referenčního standardu na koncentraci, měly by všechny destičky obsahovat 3 kontrolní vzorky: kontrolu s rozpouštědlem, nejvyšší koncentraci zkoušeného referenčního standardu a přibližnou koncentraci referenčního standardu EC₅₀ (agonistická aktivita) nebo IC₅₀ (antagonistická aktivita). Poměr průměrných kontrolních vzorků na první destičce a na zbývajících 5 destičkách by měl splňovat požadavky uvedené v tabulce 3C (agonistická aktivita) nebo v tabulce 4C (antagonistická aktivita).
17. Pro každou mikrotitrační destičku ve zkušební sérii se vypočítá faktor z (10). Faktor z se počítá s použitím odpovědi při nejvyšší a nejnižší koncentraci referenčního standardu. Mikrotitrační destička se považuje za platnou v případě, že splňuje požadavky uvedené v tabulce 3C (agonistická aktivita) nebo v tabulce 4C (antagonistická aktivita).
18. Referenční standard by měl vykazovat sigmoidní křivku závislosti odpovědi na dávce. Hodnoty EC₅₀ nebo IC₅₀ odvozené od odpovědi při sérii ředění referenčního standardu by měly splňovat požadavky uvedené v tabulce 3C (agonistická aktivita) nebo v tabulce 4C (antagonistická aktivita).
19. Každá zkušební série by měla obsahovat pozitivní kontrolní a negativní kontrolní vzorek. Vypočtená relativní indukce pozitivního i negativního kontrolního vzorku by měla splňovat požadavky uvedené v tabulce 3C (agonistická aktivita) nebo v tabulce 4C (antagonistická aktivita).
20. V průběhu všech měření se indukční faktor nejvyšší koncentrace referenčního standardu měří vydělením průměrné nejvyšší referenční standardní hodnoty relativní luminiscenční jednotky (RLU) 17 β -estradiolu průměrnou odpovědí RLU referenční kontroly s rozpouštědlem. Tento indukční faktor by měl splňovat formální požadavky na násobnou indukci uvedené v tabulce 3C (agonistická aktivita) nebo v tabulce 4C (antagonistická aktivita).

21. Za platné se považují pouze mikrotitrační destičky, které splňují všechna výše uvedená kritéria přijatelnosti, a tyto mikrotitrační destičky mohou být použity pro hodnocení odpovědi zkoušených chemických látek.
22. Kritéria přijatelnosti jsou použitelná pro předběžné screeningové zkoušky i pro souhrnné zkoušky.

Tabulka 1: Koncentrace referenčního standardu, pozitivní kontroly (PC) a negativní kontroly (NC) pro biotest agonistické aktivity CALUX

	Látka	Číslo CAS	Zkušební rozsah (M)
Referenční standard	17 β -estradiol	50-28-2	1,0*10 ⁻¹³ –1,0*10 ⁻¹⁰
Pozitivní kontrola (PC)	17 α -methyltestosteron	58-18-4	3,0*10 ⁻⁰⁶
Negativní kontrola (NC)	kortikosteron	50-22-6	1,0*10 ⁻⁰⁸

Tabulka 2: Koncentrace referenčního standardu, pozitivní kontroly (PC) a negativní kontroly (NC) pro biotest antagonistické aktivity CALUX

	Látka	Číslo CAS	Zkušební rozsah (M)
Referenční standard	tamoxifen	10540-29-1	3,0*10 ⁻⁰⁹ –1,0*10 ⁻⁰⁵
Pozitivní kontrola (PC)	4-hydroxytamoxifen	68047-06-3	1,0*10 ⁻⁰⁹
Negativní kontrola (NC)	resveratrol	501-36-0	1,0*10 ⁻⁰⁵

Tabulka 3: Kritéria přijatelnosti pro biotest agonistické aktivity ER α CALUX

A – individuální vzorky na destičce		Kritérium
1	Maximální % SD trojích jamek (pro NC, PC, každé ředění zkoušené chemické látky a referenčního standardu s výjimkou C0)	< 15 %
2	Maximální % SD trojích jamek (pro referenční standard a kontroly zkoušené chemické látky s rozpouštědlem (C0, SC))	< 30 %
3	Maximální průnik LDH jako míra cytotoxicity.	< 120 %
B – v rámci jedné mikrotitrační destičky		
4	Poměr kontroly referenčního standardu s rozpouštědlem (C0; destička 1) a kontroly zkoušené chemické látky s rozpouštědlem; destičky 2 až x)	0,5 až 2,0

5	Poměr přibl. hodnoty EC ₅₀ a nejvyšších koncentrací referenčního standardu na destičce 1 a přibl. hodnoty EC ₅₀ a nejvyšších koncentrací referenčního standardu na destičkách 2 až x (C4, C8)	0,70 až 1,30
6	Faktor Z pro každou destičku	> 0,6

C – v rámci jedné série analýz (všechny destičky v rámci jedné série)

7	Sigmoidní křivka referenčního standardu	ano (17β-estradiol)
8	Rozsah EC50 referenčního standardu 17β-estradiol	4*10 ⁻¹² –4*10 ⁻¹¹ M
9	Minimální násobná indukce nejvyšší koncentrace 17β-estradiolu vzhledem ke kontrole referenčního standardu s rozpouštědlem.	5
10	Relativní indukce (%) PC.	> 30 %
11	Relativní indukce (%) NC	< 10 %

PC: pozitivní kontrola; NC: negativní kontrola; SC: kontrola s rozpouštědlem chemické látky; C0: kontrola referenčního standardu s rozpouštědlem; SD: směrodatná odchylka; LDH: laktát dehydrogenáza

Tabulka 4: Kritéria přijatelnosti pro biotest antagonistické aktivity ERα CALUX

A – individuální vzorky na destičce		Kritérium
1	Maximální % SD trojích jamek (pro NC, PC, každé ředění zkoušené chemické látky a referenčního standardu, kontrola s rozpouštědlem (C0))	< 15 %
2	Maximální % SD trojích jamek (pro kontrolu s vehikulem (VC) a nejvyšší koncentrace referenčního standardu (C8))	< 30 %
3	Maximální průnik LDH jako míra cytotoxicity.	≥ 120%

B – v rámci jedné mikrotitrační destičky

4	Poměr kontroly referenčního standardu s rozpouštědlem (C0; destička 1) a kontroly zkoušené chemické látky s rozpouštědlem; destičky 2 až x)	0,70 až 1,30
5	Poměr přibl. hodnoty IC ₅₀ koncentrací referenčního standardu na destičce 1 a přibl. hodnoty IC ₅₀ koncentrací referenčního standardu na destičkách 2 až x (C4)	0,70 až 1,30

6	Poměr nejvyšších koncentrací referenčního standardu na destičce 1 a nejvyšších koncentrací referenčního standardu na destičkách 2 až x (C8)	0,50 až 2,0
7	Faktor z pro každou destičku	> 0,6

C – v rámci jedné série analýz (všechny destičky v rámci jedné série)

8	Sigmoidní křivka referenčního standardu	ano (tamoxifen)
9	Rozsah IC50 referenčního standardu (tamoxifen)	$1 \cdot 10^{-8}$ – $1 \cdot 10^{-7}$ M
10	Minimální násobná indukce kontroly referenčního standardu s rozpouštědlem vzhledem k nejvyšší koncentraci tamoxifenu.	2,5
11	Relativní indukce (%) PC.	< 70 %
12	Relativní indukce (%) NC	> 85 %

PC: pozitivní kontrola; NC: negativní kontrola; VC: kontrola s vehikulem (kontrola s rozpouštědlem bez pevné koncentrace agonistického referenčního standardu); SC: kontrola s rozpouštědlem chemické látky; C0: kontrola referenčního standardu s rozpouštědlem; SD: směrodatná odchylka; LDH: laktát dehydrogenáza

Kontrola s rozpouštědlem/vehikulem, referenční standardy, pozitivní kontroly, negativní kontroly

23. Při předběžných screeningových zkouškách i souhrnných zkouškách by se měla používat stejná kontrola s rozpouštědlem/vehikulem, referenční standardy, pozitivní kontroly a negativní kontroly. Dále by měla být stejná koncentrace referenčních standardů, pozitivních kontrol a negativních kontrol.

Kontrola s rozpouštědlem

24. Rozpouštědlo, které se používá na rozpuštění zkoušených chemických látek, by mělo být testováno jako kontrola s rozpouštědlem. Při validaci biotestu ER α CALUX byl jako vehikulum použit dimethylsulfoxid (DMSO, 1 % (obj.); CASRN 67-68-5). Jestliže je použito jiné rozpouštědlo než DMSO, měly by být všechny referenční standardy, kontroly a zkoušené chemické látky testovány ve stejném vehikulu. Nezapomeňte, že kontrola s rozpouštědlem u antagonistických studií obsahuje pevnou koncentraci agonistického referenčního standardu 17 β -estradiol (přibližně koncentrace EC₅₀). Pro testování rozpouštědla použitého pro antagonistické studie je třeba připravit a otestovat kontrolu s vehikulem.

Kontrola s vehikulem (antagonistická aktivita)

25. Při testování antagonistické aktivity se zkušební médium doplňuje pevnou koncentrací agonistického referenčního standardu 17 β -estradiol (přibližně koncentrace EC₅₀). Pro testování rozpouštědla použitého k rozpuštění zkoušených chemických látek při zkoušce na antagonistickou aktivitu je třeba připravit zkušební médium bez pevné koncentrace agonistického referenčního standardu 17 β -estradiol. Tento kontrolní vzorek se označuje jako kontrola s vehikulem. Při validaci biotestu ER α CALUX byl jako vehikulum použit dimethylsulfoxid (DMSO, 1 % (obj.); CASRN 67-68-5). Jestliže je použito jiné rozpouštědlo než DMSO, měly by být všechny referenční standardy, kontroly a zkoušené chemické látky testovány ve stejném vehikulu.

Referenční standardy

26. Agonistickým referenčním standardem je 17 β -estradiol (tabulka 1). Referenční standardy sestávají ze série ředění osmi koncentrací 17 β -estradiolu ($1,0 \cdot 10^{-13}$, $3,0 \cdot 10^{-13}$, $1,0 \cdot 10^{-12}$, $3,0 \cdot 10^{-12}$, $6,0 \cdot 10^{-12}$, $1,0 \cdot 10^{-11}$, $3,0 \cdot 10^{-11}$, $1,0 \cdot 10^{-10}$ M).
27. Antagonistickým referenčním standardem je tamoxifen (tabulka 2). Referenční standardy sestávají ze série ředění osmi koncentrací tamoxifenu ($3,0 \cdot 10^{-9}$, $1,0 \cdot 10^{-8}$, $3,0 \cdot 10^{-8}$, $1,0 \cdot 10^{-7}$, $3,0 \cdot 10^{-7}$, $1,0 \cdot 10^{-6}$, $3,0 \cdot 10^{-6}$, $1,0 \cdot 10^{-5}$ M). Každá koncentrace antagonistického

referenčního standardu se inkubuje společně s pevnou koncentrací agonistického referenčního standardu 17β-estradiol ($3,0 \cdot 10^{-12}$ M).

Pozitivní kontrola

28. Pozitivní kontrolou pro agonistické studie je 17α-methyltestosteron (tabulka 1).
29. Pozitivní kontrolou pro antagonistické studie je 4-hydroxytamoxifen (tabulka 2). Antagonistická pozitivní kontrola se inkubuje společně s pevnou koncentrací agonistického referenčního standardu 17β-estradiol ($3,0 \cdot 10^{-12}$ M).

Negativní kontrola

30. Negativní kontrolou pro agonistické studie je kortikosteron (tabulka 1).
31. Negativní kontrolou pro antagonistické studie je resveratrol (tabulka 2). Antagonistická negativní kontrola se inkubuje společně s pevnou koncentrací agonistického referenčního standardu 17β-estradiol ($3,0 \cdot 10^{-12}$ M).

Prokázání odborné způsobilosti laboratoře (viz odstavec 14 a tabulky 3 a 4 v části «SLOŽKY ANALÝZY ER TA» této zkušební metody)

Vehikulum

32. Rozpouštědlo použité na rozpuštění zkoušených chemických látek by mělo zkoušenou chemickou látku zcela rozpustit a mělo by být mísitelné s kultivačním médiem. Vhodnými rozpouštědly jsou DMSO, voda a etanol (čistota 95 % až 100 %). Jestliže se jako rozpouštědlo používá DMSO, neměla by maximální koncentrace DMSO při inkubaci překročit 1% (obj.). Před použitím by rozpouštědlo mělo být otestováno, zda není cytotoxické a zda neinterferuje s provedením analýz.

Příprava referenčních standardů, pozitivních kontrol, negativních kontrol a zkoušených chemických látek

33. Referenční standardy, pozitivní kontroly, negativní kontroly a zkoušené chemické látky se rozpustí ve 100% DMSO (nebo ve vhodném rozpouštědle). Poté se ve stejném rozpouštědle připraví příslušná (postupná) ředění. Před rozpuštěním by se měly všechny látky nechat ustálit na pokojovou teplotu. V čerstvě připravené zásobě roztoků referenčních standardů, pozitivních kontrol, negativních kontrol a zkoušených chemických látek by neměla být znatelná sraženina ani zákal. Zásoba referenčních standardů a kontrol může být připravována hromadně. Před každým experimentem by se měly připravit čerstvé roztoky zkoušených chemických látek. Konečná ředění referenčních standardů, pozitivních kontrol, negativních

kontrol a zkoušených chemických látek by se měla připravit čerstvá pro každý experiment a použít do 24 hodin od přípravy.

Rozpustnost, cytotoxicita a zjištění rozsahu

34. Při předběžné screeningové zkoušce se stanoví rozpustnost zkoušených chemických látek ve zvoleném rozpouštědle. Připraví se zásoba v maximální koncentraci 0,1 M. Pokud tato koncentrace vykazuje problémy s rozpustností, je třeba připravit zásobní roztoky s nižší koncentrací, dokud nebudou zkoušené chemické látky zcela rozpustné. Při předběžné screeningové zkoušce se testují postupná ředění zkoušené chemické látky 1:10. Maximální koncentrace pro testování agonistů nebo antagonistů je 1 mM. Po předběžné screeningové zkoušce se odvodí vhodný upřesněný rozsah koncentrací pro zkoušené chemické látky, jež mají být testovány v souhrnných zkouškách. Ředění použitá pro souhrnné testování by měla být 1x, 3x, 10x, 30x, 100x, 300x, 1 000x a 3 000x.
35. V protokolu analýzy agonistů a antagonistů je zařazeno testování cytotoxicity (11). Testování cytotoxicity je začleněno do předběžné screeningové zkoušky i do souhrnných zkoušek. Při validaci biotestu ER α CALUX se pro posouzení cytotoxicity použila zkouška na průnik laktát dehydrogenázy v kombinaci s kvalitativní vizuální kontrolou buněk (viz dodatek 4.1) po expozici zkoušeným chemickým látkám. Mohou však být použity i jiné kvantitativní metody pro stanovení cytotoxicity (např. kolorimetrická analýza na bázi tetrazolia (MTT) nebo biotest cytotoxicity CALUX). Obecně, koncentrace zkoušených chemických látek, které vykazují více než 20% redukci životaschopnosti, se považují za cytotoxické, a proto nemohou být použity pro hodnocení dat. Pokud jde o analýzu průniků LDH, považuje se koncentrace zkoušené chemické látky za cytotoxickou, když je procento průniku LDH větší než 120 %.

Expozice zkoušené chemické látky a organizace testovacích destiček

36. Po přidání trypsinu do konfluentní lahve s kultivovanými buňkami se buňky resuspendují na 1×10^5 buněk/ml ve zkušebním médiu bez estrogenů. 100 μ l resuspendovaných buněk se umístí do vnitřních jamek 96jamkové mikrotitrační destičky. Vnější jamky se naplní 200 μ l fosfátového pufru (PBS) (viz obrázky 1 a 2). Buňky na destičkách se předběžně inkubují po dobu 24 hodin dne v inkubátoru s CO₂ (5 % CO₂, 37 °C, 100% vlhkost vzduchu).
37. Po předběžné inkubaci se destičky prohlédnou, zda nejeví vizuální známky cytotoxicity (viz dodatek 4.1), kontaminace a konfluence. Pro testování se použijí pouze destičky, které nejeví žádné vizuální známky cytotoxicity a kontaminace a které mají minimálně 85% konfluenci. Médium z vnitřních jamek se opatrně odstraní a nahradí 200 μ l zkušebního média bez estrogenu obsahujícího příslušnou sérii ředění referenčních standardů, zkoušených

chemických látek, pozitivních kontrol, negativních kontrol a kontrol s rozpouštědlem (tabulka 5: studie agonistů; tabulka 6: studie antagonistů). Všechny referenční standardy, zkoušené chemické látky, pozitivní kontroly, negativní kontroly a kontroly s rozpouštědlem se testují třikrát. Na obrázku 1 je uvedeno uspořádání destičky pro zkoušení agonistů. Na obrázku 2 je uvedeno uspořádání destičky pro zkoušení antagonistů. Uspořádání destičky pro předběžné screeningové testování a souhrnné testování je stejné. Při testování antagonistů obsahují všechny vnitřní jamky, s výjimkou jamek pro kontrolu vehikula (VC), také pevnou koncentraci agonistického referenčního standardu 17β -estradiolu ($3,0 \cdot 10^{-12}$ M). Nezapomeňte, že na každou destičku TC je třeba přidat referenční standardy C8 a C4.

38. Po expozici buněk všem chemickým látkám se 96jamkové mikrotitrační destičky inkubují po dobu dalších 24 hodin v inkubátoru s CO₂ (5 % CO₂, 37 °C, 100% vlhkost vzduchu).

Obrázek 1: Uspořádání 96jamkových mikrotitračních destiček pro předběžné screeningové testování a posouzení agonistického účinku

Destička 1

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	PC	
C		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	PC	
D		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	PC	
E		SC	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	NC	
F		SC	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	NC	
G		SC	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	NC	
H												

Další destičky

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (max)	
C		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (max)	
D		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (max)	
E		SC	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C4 (EC50)	
F		SC	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C4 (EC50)	
G		SC	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C4 (EC50)	
H												

C0 = referenční standardní rozpouštědlo

C(1–8) = série ředění (1–8, koncentrace od nízké po vysokou) referenčního standardu

PC = pozitivní kontrola

NC = negativní kontrola

TCx-(1–8) = ředění (1–8, koncentrace od nízké po vysokou) zkoušené chemické látky pro předběžnou screeningovou zkoušku a posouzení agonistického účinku zkoušené chemické látky x

SC = kontrola zkoušené chemické látky s rozpouštědlem (optimálně stejné rozpouštědlo jako v C0, ale může být z jiné šarže)

Šedé buňky: = vnější buňky, naplněné 200 µl PBS

Obrázek 2: Uspořádání 96jamkových mikrotitračních destiček pro předběžné screeningové testování a posouzení antagonistického účinku

Destička 1

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	VC	
C		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	VC	
D		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	VC	
E		NC	TC1-	TC1-2	TC1-3	TC	TC1-5	TC1-	TC1-	TC1-	PC	
F		NC	TC1-	TC1-2	TC1-3	TC	TC1-5	TC1-	TC1-	TC1-	PC	
G		NC	TC1-	TC1-2	TC1-3	TC	TC1-5	TC1-	TC1-	TC1-	PC	
H												

Další destičky

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (max)	
C		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (max)	
D		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (max)	
E		C4 (IC50)	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C8 (max)	
F		C4 (IC50)	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C8 (max)	
G		C4 (IC50)	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C8 (max)	
H												

C0 = referenční standardní rozpouštědlo

C(1–8) = série ředění (1–8, koncentrace od nízké po vysokou) referenčního standardu

NC = negativní kontrola

PC = pozitivní kontrola

TCx–(1–8) = ředění (1–8, koncentrace od nízké po vysokou) zkoušené chemické látky pro předběžnou screeningovou zkoušku a posouzení agonistického účinku zkoušené chemické látky x

SC = kontrola zkoušené chemické látky s rozpouštědlem (optimálně stejné rozpouštědlo jako v C0, ale může být z jiné šarže)

VC = kontrola s vehikulem (kontrola s rozpouštědlem bez pevné koncentrace agonistického referenčního standardu 17β-estradiolu)

Šedé buňky: = vnější buňky, naplněné 200 µl PBS

Poznámka: Všechny vnitřní jamky, s výjimkou jamek pro kontrolu vehikula (VC), obsahují také pevnou koncentraci agonistického referenčního standardu 17β-estradiolu ($3,0 \cdot 10^{-12}$ M).

Měření luminiscence

39. Měření luminiscence je podrobně popsáno v protokolu analýzy agonistů a antagonistů (10). Médium by se mělo z jamek odstranit a buňky by se po 24 hodinách inkubace měly štěpit, aby se otevřela buněčná membrána a umožnilo měření luciferázové aktivity.
40. Pro měření luminiscence vyžaduje tento postup luminometr vybavený dvěma injektory. Reakce luciferázy začíná vstříknutím substrátu luciferin. Reakce se zastaví přidáním 0,2 M NaOH. Reakce je zastavena, aby nedocházelo k přenosu luminiscence z jedné jamky do druhé.
41. Světlo emitované z každé jamky se vyjadřuje v relativních luminiscenčních jednotkách (RLU) na jamku.

Předběžná screeningová zkouška

42. Výsledky předběžné screeningové analýzy se použijí k určení přesného rozmezí koncentrace zkoušených chemických látek pro souhrnné testování. Hodnocení výsledků předběžné screeningové analýzy a určení přesného rozmezí koncentrace zkoušených chemických látek pro souhrnné testování je podrobně popsáno v protokolech pro analýzu agonistů a antagonistů (10). Zde je uveden stručný souhrn postupů pro určení rozmezí koncentrace zkoušených chemických látek pro analýzu agonistů a antagonistů. Viz tabulky 5 a 6, kde je uveden návod na způsob postupného ředění.

Volba koncentrací pro posouzení agonistických účinků

43. Při předběžné screeningové zkoušce se zkoušené chemické látky testují pomocí série ředění, jak je uvedeno v tabulce 5 (agonistická aktivita) a v tabulce 6 (antagonistická aktivita). Všechny koncentrace je třeba testovat v trojích jamkách podle rozvržení destičky, jak je znázorněno na obrázku 1 (agonistická aktivita) nebo 2 (antagonistická aktivita).
44. Za platné se považují pouze výsledky analýzy, které splňují kritéria přijatelnosti (tabulka 3), a tyto výsledky mohou být použity pro hodnocení odpovědi zkoušených chemických látek. V případě, že jedna nebo více mikrotitračních destiček v sérii analýz nesplní kritéria přijatelnosti, je třeba příslušné mikrotitrační destičky analyzovat znovu. Pokud první destička obsahující celou sérii ředění referenčního standardu nesplní kritéria přijatelnosti, je třeba znovu analyzovat celou zkušební sérii (6 destiček).
45. Původní rozmezí koncentrací zkoušených chemických látek se upraví a předběžná screeningová zkouška se zopakuje v případě, že:
- je pozorována cytotoxicita. Předběžný screeningový postup se zopakuje s nižšími necytotoxickými koncentracemi zkoušené chemické látky,

- předběžný screening zkoušené chemické látky nevykazuje celou křivku závislosti odpovědi na dávce, protože testované koncentrace generují maximální indukci. Předběžná screeningová zkouška se zopakuje s nižšími koncentracemi zkoušené chemické látky.
46. Když je pozorována platná odpověď ve vztahu k dávce, zvolí se (nejnižší) koncentrace, při níž je pozorována maximální indukce a která nevykazuje cytotoxicitu. Nejvyšší koncentrace zkoušené chemické látky, která se testuje v souhrnných zkouškách, by měla být trojnásobkem této zvolené koncentrace.
47. Připraví se celá upřesněná série ředění zkoušené chemické látky, a to podle kroků ředění uvedených v tabulce 5, počínaje nejvyšší koncentrací, jak je stanoveno výše.
48. Zkoušená chemická látka, která nevyvolává žádný agonistický účinek, se testuje v souhrnných zkouškách počínaje nejvyšší necytotoxickou koncentrací určenou v průběhu předběžného screeningu.

Volba koncentrací pro posouzení antagonistických účinků

49. Za platné se považují pouze výsledky analýzy, které splňují kritéria přijatelnosti (tabulka 4), a tyto výsledky mohou být použity pro hodnocení odpovědi zkoušených chemických látek. V případě, že jedna nebo více mikrotitračních destiček v sérii analýz nesplní kritéria přijatelnosti, je třeba příslušné mikrotitrační destičky analyzovat znovu. Pokud první destička obsahující celou sérii ředění referenčního standardu nesplní kritéria přijatelnosti, je třeba znovu analyzovat celou zkušební sérii (6 destiček).
50. Původní rozmezí koncentrací zkoušených chemických látek se upraví a předběžná screeningová zkouška se zopakuje v případě, že:
- je pozorována cytotoxicita. Předběžný screeningový postup se zopakuje s nižšími necytotoxickými koncentracemi zkoušené chemické látky,
 - předběžný screening zkoušené chemické látky nevykazuje celou křivku závislosti odpovědi na dávce, protože testované koncentrace generují maximální inhibici. Předběžná screeningová zkouška se zopakuje s nižšími koncentracemi zkoušené chemické látky.
51. Když je zjištěna platná odpověď ve vztahu k dávce, zvolí se (nejnižší) koncentrace, při níž je pozorována maximální inhibice a která nevykazuje cytotoxicitu. Nejvyšší koncentrace zkoušené chemické látky, která se testuje v souhrnných zkouškách, by měla být trojnásobkem této zvolené koncentrace.
52. Připraví se celá upřesněná série ředění zkoušené chemické látky, a to podle kroků ředění uvedených v tabulce 6, počínaje nejvyšší koncentrací, jak je stanoveno výše.

53. Zkoušené chemické látky, které nevyvolávají žádný antagonistický účinek, se testují v souhrnných zkouškách počínaje nejvyšší necytotoxickou koncentrací otestovanou v průběhu předběžného screeningu.

Souhrnné zkoušky

54. Po výběru zpřesněných rozmezí koncentrací se zkoušené chemické látky testují souhrnně pomocí série ředění, jak je uvedeno v tabulce 5 (agonistická aktivita) a v tabulce 6 (antagonistická aktivita). Všechny koncentrace je třeba testovat v trojích jamkách podle rozvržení destičky, jak je znázorněno na obrázku 1 (agonistická aktivita) nebo 2 (antagonistická aktivita).

55. Za platné se považují pouze výsledky analýzy, které splňují kritéria přijatelnosti (tabulka 3 a 4), a tyto výsledky mohou být použity pro hodnocení odpovědi zkoušených chemických látek. V případě, že jedna nebo více mikrotitračních destiček v sérii analýz nesplní kritéria přijatelnosti, je třeba příslušné mikrotitrační destičky analyzovat znovu. Pokud první destička obsahující celou sérii ředění referenčního standardu nesplní kritéria přijatelnosti, je třeba znovu analyzovat celou zkušební sérii (6 destiček).

Tabulka 5: Koncentrace a ředění referenčních standardů, kontrol a zkoušených chemických látek použité pro testování agonistů

Referenční 17β-estradiol konc. (M)		TCx – předběžná screeningová zkouška ředění		TCx – souhrnná zkouška ředění		Kontroly konc. (M)	
C0	0	TCx-1	10 000 000 x	TCx-1	3 000 x	PC	3,0*10 ⁻⁰⁶
C1	1,0*10 ⁻¹³	TCx-2	1 000 000 x	TCx-2	1 000 x	NC	1,0*10 ⁻⁰⁸
C2	3,0*10 ⁻¹³	TCx-3	100 000 x	TCx-3	300 x	C0	0
C3	1,0*10 ⁻¹²	TCx-4	10 000 x	TCx-4	100 x	SC	0
C4	3,0*10 ⁻¹²	TCx-5	1 000 x	TCx-5	30 x		
C5	6,0*10 ⁻¹²	TCx-6	100 x	TCx-6	10 x		
C6	1,0*10 ⁻¹¹	TCx-7	10 x	TCx-7	3 x		
C7	3,0*10 ⁻¹¹	TCx-8	1 x	TCx-8	1 x		
C8	1,0*10 ⁻¹⁰						

TCx – zkoušená chemická látka x

PC – pozitivní kontrola (17α-methyltestosteron)

NC – negativní kontrola (kortikosteron)

C0 – kontrola referenčního standardu s rozpouštědlem

SC – kontrola zkoušené chemické látky s rozpouštědlem

Tabulka 6: Koncentrace a ředění referenčních standardů, kontrol a zkoušených chemických látek použité pro testování antagonistů

Referenční tamoxifen konc. (M)		TCx – předběžná screeningová zkouška zředění		TCx – souhrnná zkouška zředění		Kontroly konc. (M)	
C0	0	TCx-1	10 000 000 x	TCx-1	3 000 x	PC	1,0*10 ⁻⁰⁹
C1	3,0*10 ⁻⁰⁹	TCx-2	1 000 000 x	TCx-2	1 000 x	NC	1,0*10 ⁻⁰⁵
C2	1,0*10 ⁻⁰⁸	TCx-3	100 000 x	TCx-3	300 x	C0	0
C3	3,0*10 ⁻⁰⁸	TCx-4	10 000 x	TCx-4	100 x	SC	0
C4	1,0*10 ⁻⁰⁷	TCx-5	1 000 x	TCx-5	30 x	Doplněný agonista konc. (M)	
C5	3,0*10 ⁻⁰⁷	TCx-6	100 x	TCx-6	10 x		
C6	1,0*10 ⁻⁰⁶	TCx-7	10 x	TCx-7	3 x		
C7	3,0*10 ⁻⁰⁶	TCx-8	1 x	TCx-8	1 x	17β- estradiol	3,0*10 ⁻¹²
C8	1,0*10 ⁻⁰⁵						

TCx – zkoušená chemická látka x

PC – pozitivní kontrola (4-hydroxytamoxifen)

NC – negativní kontrola (resveratrol)

C0 – kontrola referenčního standardu s rozpouštědlem

SC – kontrola zkoušené chemické látky s rozpouštědlem

VC – kontrola s vehikulem (neobsahuje pevnou koncentraci agonistického referenčního standardu 17β-estradiol (3,0*10⁻¹² M))

Sběr a analýza dat

56. Po předběžné screeningové zkoušce a souhrnných zkouškách se stanoví EC₁₀, EC₅₀, PC₁₀, PC₅₀ a maximální indukce (TCx_{max}) zkoušené chemické látky pro testování agonistických účinků. Pro testování antagonistických účinků se stanoví IC₂₀, IC₅₀, PC₈₀, PC₅₀ a minimální indukce (TCx_{min}). Na obrázku 3 (agonistická aktivita) a 4 (antagonistická aktivita) jsou tyto parametry znázorněny graficky. Potřebné parametry se vypočítají podle relativní indukce každé zkoušené chemické látky (ve vztahu k maximální indukci referenčního standardu (= 100 %)). Pro hodnocení dat se použije nelineární regrese (variabilní sklon, 4 parametry), a to podle následující rovnice:

$$Y = Bottom + \frac{(Top - Bottom)}{(1 + 10^{((\log EC_{50} - X) * Hill\ Slope)})}$$

kde:

X = logaritmus dávky nebo koncentrace

Y = odpověď (relativní indukce (%))

Top = maximální indukce (%)

Bottom = minimální indukce (%)

logEC₅₀ = logaritmus koncentrace, při níž je pozorováno 50 % maximální odpovědi

Hillův koeficient = míra sklonu Hillovy křivky

57. Nezpracovaná data z luminometru, vyjádřená jako relativní luminiscenční jednotky (RLU), je třeba převést do tabulkového editoru pro analýzu dat určeného pro předběžné screeningové a souhrnné zkoušky. Nezpracovaná data by měla splňovat kritéria přijatelnosti uvedená v tabulce 3A a 3B (agonistická aktivita) nebo 4A a 4B (antagonistická aktivita). V případě, že nezpracovaná data splňují kritéria přijatelnosti, provede se výpočet v následujících krocích pro stanovení potřebných parametrů:

Agonistická aktivita

- Odečtete průměrné jednotky RLU kontroly referenčního standardu s rozpouštědlem od každé analýzy nezpracovaných dat referenčních standardů.
- Odečtete průměrné jednotky RLU kontroly zkoušené chemické látky s rozpouštědlem od každé analýzy nezpracovaných dat zkoušených chemických látek.
- Vypočtete relativní indukci každé koncentrace referenčního standardu. Stanovte indukci nejvyšší koncentrace referenčního standardu na 100 %.
- Vypočtete relativní indukci každé koncentrace zkoušené chemické látky v porovnání s nejvyšší koncentrací referenčního standardu jako 100 %.
- Vyhodnoťte výsledky analýzy podle nelineární regrese (variabilní sklon, 4 parametry).
- Určete hodnoty EC_{50} a EC_{10} referenčního standardu.
- Určete hodnoty EC_{50} a EC_{10} zkoušených chemických látek.
- Určete maximální relativní indukci zkoušené chemické látky (TC_{max}).
- Určete hodnoty PC_{10} a PC_{50} zkoušených chemických látek.

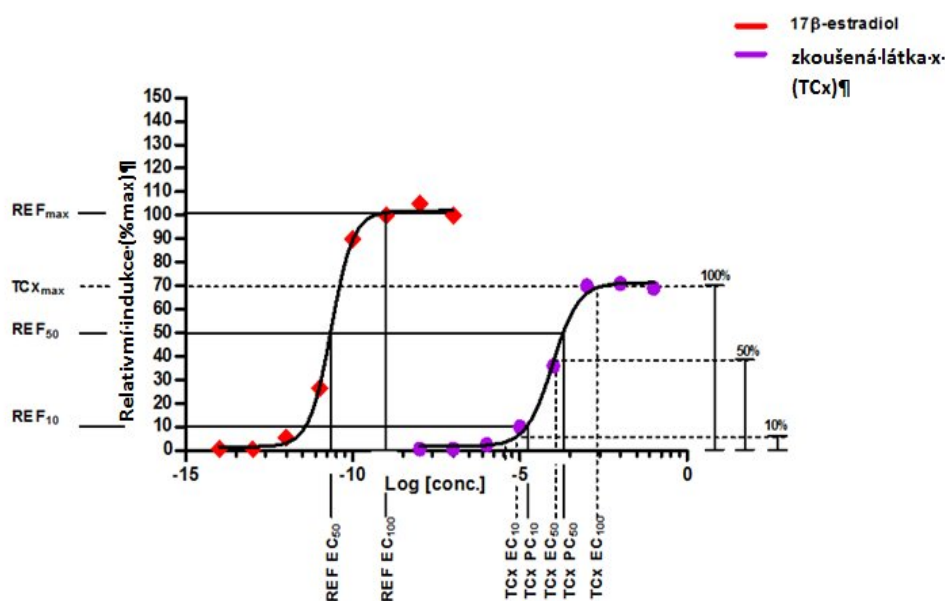
U zkoušených chemických látek nemusí být vždy dosažena celá křivka závislosti odpovědi na dávce, např. vzhledem k cytotoxicitě nebo problémům s rozpustností. Proto nelze určit hodnoty EC_{50} , EC_{10} a PC_{50} . V takovém případě lze určit pouze hodnoty PC_{10} and TC_{max} .

Antagonistická aktivita

- Odečtete průměrné jednotky RLU nejvyšší koncentrace referenčního standardu od každé analýzy nezpracovaných dat referenčních standardů.
- Odečtete průměrné jednotky RLU nejvyšší koncentrace referenčního standardu od každé analýzy nezpracovaných dat zkoušených chemických látek.
- Vypočtete relativní indukci každé koncentrace referenčního standardu. Stanovte indukci nejnižší koncentrace referenčního standardu na 100 %.

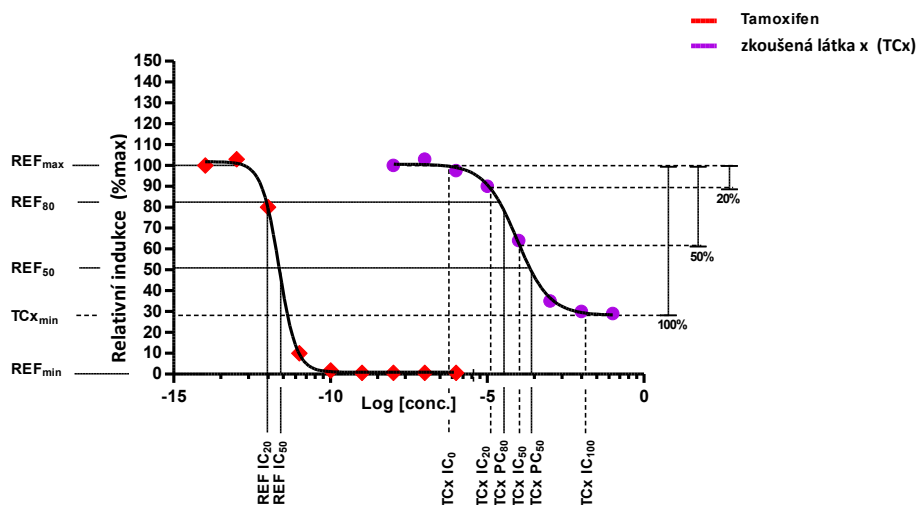
- Vypočtete relativní indukci každé koncentrace zkoušené chemické látky v porovnání s nejnižší koncentrací referenčního standardu jako 100 %.
- Vyhodnotíte výsledky analýzy podle nelineární regrese (variabilní sklon, 4 parametry).
- Určete hodnoty IC_{50} a IC_{20} referenčního standardu.
- Určete hodnoty IC_{50} a IC_{20} zkoušených chemických látek.
- Určete maximální relativní indukci zkoušené chemické látky (TC_{min}).
- Určete hodnoty PC_{80} a PC_{50} zkoušených chemických látek.

Obrázek 3: Přehled parametrů stanovených v analýze agonistů



- EC_{10} = koncentrace látky, při níž je pozorováno 10 % její maximální odpovědi
- EC_{50} = koncentrace látky, při níž je pozorováno 50 % její maximální odpovědi
- PC_{10} = koncentrace zkoušené chemické látky, při níž se její odpověď rovná EC_{10} referenčního standardu
- PC_{50} = koncentrace zkoušené chemické látky, při níž se její odpověď rovná EC_{50} referenčního standardu
- TCX_{max} = maximální relativní indukce zkoušené chemické látky.

Obrázek 4: Přehled parametrů stanovených v analýze antagonistů



IC₂₀ = koncentrace látky, při níž je pozorováno 80 % její maximální odpovědi (20% inhibice)

IC₅₀ = koncentrace látky, při níž je pozorováno 50 % její maximální odpovědi (50% inhibice)

PC₈₀ = koncentrace zkoušené chemické látky, při níž se její odpověď rovná IC₂₀ referenčního standardu

PC₅₀ = koncentrace zkoušené chemické látky, při níž se její odpověď rovná IC₅₀ referenčního standardu

TC_{xmin} = minimální relativní indukce zkoušené chemické látky.

U zkoušených chemických látek nemusí být vždy dosažena celá křivka závislosti odpovědi na dávce, např. vzhledem k cytotoxicitě nebo problémům s rozpustností. Proto nelze určit hodnoty IC₅₀, IC₂₀ a PC₅₀. V takovém případě lze určit pouze hodnoty PC₂₀ a TC_{min}.

58. Výsledky by měly vycházet ze dvou (nebo tří) nezávislých provedení zkoušek. Jestliže jsou při dvou provedeních zkoušky získány srovnatelné, a tedy reprodukovatelné výsledky, není nutné provádět zkoušku potřetí. Aby byly výsledky přijatelné, měly by:

- splňovat kritéria přijatelnosti (viz kritéria přijatelnosti, odstavce 14–22),
- být reprodukovatelné.

Kritéria interpretace údajů

59. Pro interpretaci údajů a rozhodnutí, zda je zkoušená chemická látka považována za pozitivní, nebo negativní, se používají tato kritéria:

Agonistická aktivita

U každé souhrnné zkoušky se zkoušená chemická látka považuje za **pozitivní** v případě:

- 1 TC_{max} se rovná nebo je vyšší než 10 % maximální odpovědi referenčního standardu (REF_{10}).
- 2 Alespoň 2 po sobě jdoucí koncentrace zkoušené chemické látky se rovnají nebo jsou vyšší než REF_{10} .

U každé souhrnné zkoušky se zkoušená chemická látka považuje za **negativní** v případě:

- 1 TC_{max} není vyšší než 10 % maximální odpovědi referenčního standardu (REF_{10}).
- 2 Méně než 2 koncentrace zkoušené chemické látky se rovnají nebo jsou vyšší než REF_{10} .

Antagonistická aktivita

U každé souhrnné zkoušky se zkoušená chemická látka považuje za **pozitivní** v případě:

- 1 TC_{min} se rovná nebo je nižší než 80 % maximální odpovědi referenčního standardu ($REF_{80} = 20\%$ inhibice).
- 2 Alespoň 2 po sobě jdoucí koncentrace zkoušené chemické látky se rovnají nebo jsou nižší než REF_{80} .

U každé souhrnné zkoušky se zkoušená chemická látka považuje za **negativní** v případě:

- 1 TC_{min} je vyšší než 80 % maximální odpovědi referenčního standardu ($REF_{80} = 20\%$ inhibice).
- 2 Méně než 2 koncentrace zkoušené chemické látky se rovnají nebo jsou nižší než REF_{80} .

60. Aby bylo možné charakterizovat sílu pozitivní odpovědi zkoušené chemické látky, uvedou se velikost účinku (agonistická aktivita: TC_{max} ; antagonistická aktivita: TC_{min}) a koncentrace, při níž k účinku dochází (agonistická aktivita: EC_{10} , EC_{50} , PC_{10} , PC_{50} ; antagonistická aktivita: IC_{20} , IC_{50} , PC_{80} , PC_{50}).

ZÁVĚREČNÁ ZPRÁVA

61. Viz odstavec 20 „SLOŽKY ANALÝZY ER TA“.

LITERATURA

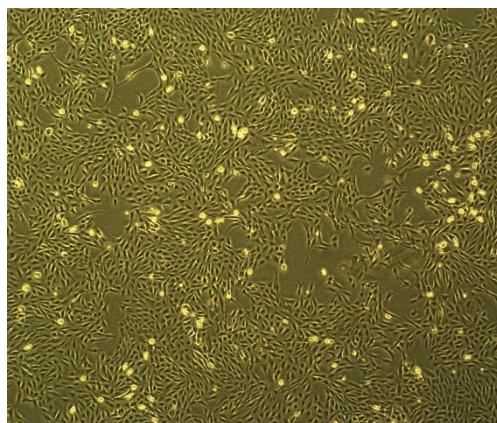
- (1) OECD (2016). Draft Validation report of the (anti-) ER α CALUX bioassay - transactivation bioassay for the detection of compounds with (anti)estrogenic potential. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 240). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (2) Sonneveld E, Jansen HJ, Riteco JA, Brouwer A, van der Burg B. (2005). Development of androgen- and estrogen-responsive bioassays, members of a panel of human cell line-based highly selective steroid-responsive bioassays. *Toxicol Sci.* 83(1), 136-148.
- (3) Quaedackers ME, van den Brink CE, Wissink S, Schreurs RHMM, Gustafsson JA, van der Saag PT, and van der Burg B. (2001). 4-Hydroxytamoxifen trans-represses nuclear factor-kB Activity in human osteoblastic U2OS cells through estrogen receptor (ER) α and not through ER β . *Endocrinology* 142(3), 1156-1166.
- (4) Thorne N, Inglese J and Auld DS. (2010). Illuminating Insights into Firefly Luciferase and Other Bioluminescent Reporters Used in Chemical Biology, *Chemistry and Biology* 17(6):646-57.
- (5) Escande A, Pillon A, Servant N, Cravedi JP, Larrea F, Muhn P, Nicolas JC, Cavaillès V and Balaguer P. (2006). Evaluation of ligand selectivity using reporter cell lines stably expressing estrogen receptor alpha or beta. *Biochem. Pharmacol.*, 71, 1459-1469.
- (6) Kuiper GG, Lemmen JG, Carlsson B, Corton JC, Safe SH, van der Saag PT, van der Burg B and Gustafsson JA. (1998). Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinol.*, 139, 4252-4263.
- (7) Sotoca AM, Bovee TFH, Brand W, Velikova N, Boeren S, Murk AJ, Vervoort J, Rietjens IMCM. (2010). Superinduction of estrogen receptor mediated gene expression in luciferase based reporter gene assays is mediated by a post-transcriptional mechanism. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.*, 122, 204–211.
- (8) Sonneveld E, Riteco JAC, Jansen HJ, Pieterse B, Brouwer A, Schoonen WG, and van der Burg B. (2006). Comparison of *in vitro* and *in vivo* screening models for androgenic and estrogenic activities. *Toxicol. Sci.*, 89(1), 173–187.

- (9) Kobayashi H, Yamamoto K, Eguchi M, Kubo M, Nakagami S, Wakisaka S, Kaizuka M and Ishii H. (1995). Rapid detection of mycoplasma contamination in cell cultures by enzymatic detection of polymerase chain reaction (PCR) products. *J. Vet. Med. Sci.*, 57(4), 769-771.
- (10) Zhang J-H, Chung TDY, and Oldenburg KR. (1999). A simple statistical parameter for use in evaluation and validation of high throughput screening assays. *J. Biomol. Scr.*, 4, 67-73
- (11) Besselink H, Middelhof I, and Felzel, E. (2014). Transactivation assay for the detection of compounds with (anti)estrogenic potential using ER α CALUX cells. BioDetection Systems BV (BDS). Amsterdam, the Netherlands.

Dodatek 4.1: Vizuální kontrola životaschopnosti buněk

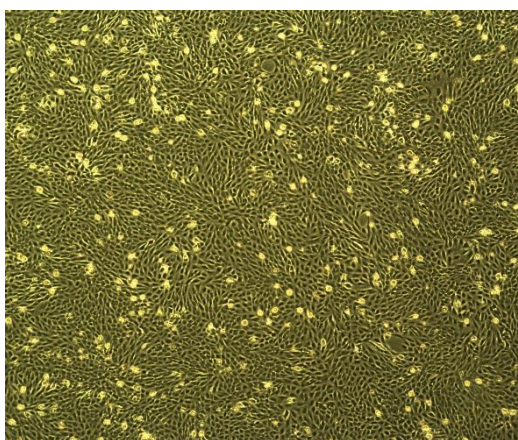


< 5% konfluence. Buňky byly právě nasazeny.
100% životaschopnost buněk.
Klasifikace: „žádná cytotoxicita“



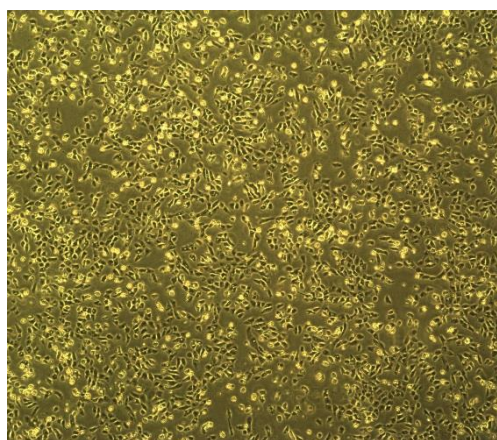
> 85% konfluence. V tomto stádiu jsou buňky
exponovány zkoušeným chemickým látkám. >
95% životaschopnost buněk.

Klasifikace: „žádná cytotoxicita“

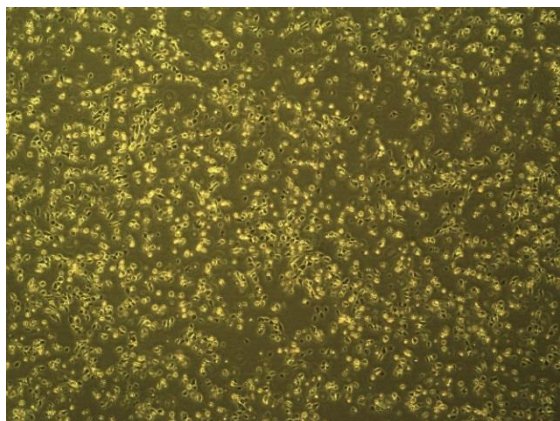


> 95% konfluence. Buňky jsou hustě směstnány a
začínají přerůstat. > 95% životaschopnost buněk.

Klasifikace: „žádná cytotoxicita“



< 25% životaschopnost buněk. Buňky se od sebe
oddělují a kontakt mezi nimi se snižuje. Buňky
jsou zakulacené. Klasifikace: „cytotoxicita“



< 5% životaschopnost buněk. Buňky jsou od sebe zcela odděleny a kontakt mezi nimi je porušen. Buňky jsou zakulacené. Klasifikace: „cytotoxicita“

B.67 ZKOUŠKA NA GENOVÉ MUTACE V BUŇKÁCH SAVCŮ *IN VITRO* S POUŽITÍM GENU THYMIDINKINÁZY

ÚVOD

1. Tato zkušební metoda je rovnocenná Pokynu OECD pro zkoušení (TG) č. 490 (2016). Zkušební metody se pravidelně přezkoumávají a revidují s ohledem na vědecký pokrok, potřeby regulace a dobré životní podmínky zvířat. Test myšího lymfomu (MLA) a test TK6 využívající lokus thymidinkinázy (TK) byly původně obsaženy ve zkušební metodě B.17. Následně expertní pracovní skupina pro MLA Mezinárodního semináře o zkoušení genotoxicity (IWGT) vyvinula mezinárodní harmonizovaná doporučení pro kritéria přijatelnosti tohoto testu a interpretaci dat MLA (1)(2)(3)(4)(5) a uvedená doporučení jsou začleněna do této nové zkušební metody B.67. Tato zkušební metoda je napsána pro test MLA, a protože využívá také lokus TK, pro test TK6. Zatímco test MLA se používá běžně pro regulační účely, test TK6 se používá mnohem méně často. Je třeba uvést, že i přes podobnost mezi cílovými parametry nejsou tyto dvě buněčné linie vzájemně zaměnitelné a regulační programy mohou platně vyjádřit preferenci jedné nebo druhé pro konkrétní regulační použití. Například validace testu MLA prokázala jeho vhodnost pro detekci nejen genových mutací, ale také schopnosti zkoušené chemické látky indukovat strukturální chromozomální poškození. Tato zkušební metoda je součástí série zkušebních metod genetické toxikologie. Byl vypracován dokument, který obsahuje stručné informace o zkoušení v oblasti genetické toxikologie a přehled posledních změn, které OECD provedla ve svých pokynech ke zkoušení genotoxicity (6).
2. Účelem zkoušek na genové mutace v buňkách savců *in vitro* je detekce genových mutací indukovaných chemickými látkami. Buněčné linie používané při těchto zkouškách měří přímé mutace reportérových genů, a to endogenního genu thymidinkinázy (*TK* pro lidské buňky a *Tk* pro buňky hlodavců, společně v této zkušební metodě nazývané jen *TK*). Tato zkušební metoda je určena k použití se dvěma buněčnými liniemi: buněčnou linií myšího lymfomu L5178Y TK^{+/+}-3.7.2C (obecně nazývanou L5178Y) a buněčnou linií lidského lymfoblastoidu TK6 (obecně nazývanou TK6). I když se tyto dvě buněčné linie liší vzhledem ke svému původu, růstu buněk, stavu p53 atd., mohou být testy genových mutací *TK* prováděny podobným způsobem u obou typů buněk, jak je popsáno v této zkušební metodě.
3. Autozomální a heterozygotní povaha genu thymidinkinázy umožňuje detekci životaschopných kolonií, jejichž buňky jsou deficitní na enzym thymidinkinázu po mutaci z *TK*^{+/+} na *TK*^{-/-}. Tento deficit může vyplývat z genetických jevů ovlivňujících gen *TK* včetně genových mutací (bodové mutace, posunové mutace, malé delece atd.) i chromozomálních změn (velké delece, přestavby chromozomu a mitotické

rekombinace). Posledně jmenované změny se projevují jako ztráta heterozygotnosti, což je běžná genetická změna genů tlumících nádory v lidské tumorigenezi. Teoreticky může být testem MLA detekována ztráta celého chromozomu nesoucího gen *TK* v důsledku poškození vřetene a/nebo mitotické nondisjunkce. Kombinace cytogenetické a molekulární analýzy jasně ukazuje, že některé mutace MLA *TK* jsou výsledkem nondisjunkce. Průkazné důkazy však ukazují, že testy genové mutace *TK* nemohou spolehlivě detekovat aneugeny při aplikaci standardních kritérií cytotoxicity (jak je popsáno v této zkušební metodě), a proto není vhodné používat tyto testy na detekci aneugenů (7)(8)(9).

4. Při testech genových mutací *TK* se generují dvě odlišné fenotypové třídy mutantů *TK*; normálně rostoucí mutanti rostoucí stejnou rychlostí jako heterozygotní buňky *TK* a pomalu rostoucí mutanti rostoucí s prodlouženou dobou zdvojení. Normálně rostoucí i pomalu rostoucí mutanti se v testu MLA rozpoznávají jako mutanti tvořící velké kolonie a mutanti tvořící malé kolonie a v testu *TK6* jako mutanti tvořící časně kolonie a mutanti tvořící pozdní kolonie. Podrobně byla zkoumána molekulární a cytogenetická povaha mutantů MLA tvořících jak velké kolonie, tak malé kolonie (8)(10)(11)(12)(13). Rovněž byla rozsáhle studována molekulární a cytogenetická povaha mutantů *TK6* tvořících časně kolonie i pozdní kolonie (14)(15)(16)(17). Pomalu rostoucí mutanti u obou buněčných druhů vykazovali genetické poškození, které zahrnuje putativní gen(y) regulující růst v blízkosti lokusu *TK*, což má za následek prodlouženou dobu zdvojení a vznik pozdních nebo malých kolonií (18). Indukce pomalu rostoucích mutantů se spojuje s chemickými látkami, které indukují silné strukturální změny na úrovni chromozomů (26). Buňky, jejichž poškození nezahrnuje putativní gen(y) regulující růst v blízkosti lokusu *TK*, rostou podobnou rychlostí jako mateřské buňky a vzniknou z nich normálně rostoucí mutanti. Indukce primárně normálně rostoucích mutantů se spojuje s chemickými látkami, které primárně působí jako bodové mutageny. Proto je velmi důležité spočítat jak pomalu rostoucí, tak i normálně rostoucí mutanty, aby se zjistily všechny mutace a získaly informace o druhu (druzích) poškození (mutageny oproti klastogenům) indukovaného zkoušenou chemickou látkou (10)(12)(18)(19).
5. Zkušební metoda podle tohoto pokynu je uspořádána tak, aby poskytla obecné informace, které platí pro test MLA i *TK6*, a specializovaný návod pro individuální testy.
6. Použité definice jsou uvedeny v dodatku 1.

VÝCHOZÍ ÚVAHY A OMEZENÍ

7. Zkoušky prováděné *in vitro* obecně vyžadují použití vnějšího zdroje metabolické aktivace. Systém exogenní metabolické aktivace zcela nenapodobuje podmínky *in vivo*.
8. Je třeba zabránit vzniku podmínek, které by mohly vést k uměle pozitivním výsledkům (tj. možná interakce se zkušebním systémem), které nejsou způsobeny interakcí mezi zkoušenou chemickou látkou a genetickým materiálem buňky; takové podmínky zahrnují změny pH nebo osmolality, interakce se složkami média (20) (21) nebo nadměrné úrovně cytotoxicity (22)(23)(24). Pro testy MLA a TK6 se cytotoxicita přesahující doporučené horní úrovně cytotoxicity stanovené v odstavci 28 považuje za nadměrnou. Dále je třeba poznamenat, že zkoušené chemické látky, které jsou analogy thymidinu nebo které se chovají jako analogy thymidinu, mohou zvyšovat frekvenci mutací selektivním růstem spontánních mutantů na pozadí při ošetření buněk a vyžadovat tak další zkušební metody pro adekvátní hodnocení (25).
9. Při zkoušení vyráběných nanomateriálů mohou být potřebné určité úpravy metody, které však v této zkušební metodě nejsou popsány.
10. Před použitím této zkušební metody ke zkoušení směsi za účelem získání údajů pro zamýšlené použití v právních předpisech by mělo být zváženo, zda tato metoda může pro tento účel poskytnout přiměřené výsledky, a pokud ano, proč je tomu tak. Takové posouzení není nutné, pokud existuje právní požadavek na zkoušení dané směsi.
11. Mutantní buňky, které v důsledku mutace $TK^{+/-}$ na $TK^{-/-}$ vykazují deficit aktivity enzymu thymidinkináza, jsou rezistentní k cytostatickým účinkům analogu pyrimidinu trifluorthymidinu (TFT). Buňky produkující TK jsou citlivé na TFT, což způsobuje inhibici buněčného metabolismu a zastavuje další buněčné dělení. Mutantní buňky jsou tedy schopny proliferace za přítomnosti TFT a tvoří viditelné kolonie, zatímco buňky, které obsahují TK , tuto schopnost nemají.

PRINCIP ZKOUŠKY

12. Buňky v suspenzi jsou vhodnou dobu (viz odstavec 33) vystaveny zkoušené chemické látce jak s exogenním zdrojem metabolické aktivace (viz odstavec 19), tak bez něj a poté subkultivovány za účelem stanovení cytotoxicity a za účelem exprese fenotypu před selekcí mutantů. Cytotoxicita se stanoví podle relativního celkového růstu (RTG – viz odstavec 25) v testu MLA a podle relativního přežití (RS – viz odstavec 26) v testu TK6. Exponované kultury se udržují v růstovém médiu po vhodnou dobu charakteristickou pro každý zvolený typ buněk (viz odstavec 37), aby nastala přibližně optimální fenotypová exprese indukovaných mutací. Po fenotypové expresi

se četnost mutantů stanoví tak, že se nasadí známý počet buněk do média obsahujícího selekční činidlo pro detekci mutantních kolonií a do média bez selekčního činidla, aby byla stanovena účinnost klonování (životaschopnost). Po vhodné inkubační době se spočítají kolonie. Četnost mutantů se vypočítá podle počtu mutantních kolonií korigovaného účinností klonování v době selekce mutantů.

POPIS METODY

Přípravky

Buňky

13. Pro test MLA: Protože test MLA byl vyvinut a charakterizován pomocí sublinie $TK^{+/-}$ -3.7.2C buněk L5178Y, musí být pro test MLA použita tato specifická sublinie. Buněčná linie L5178Y byla odvozena od lymfomu brzlíku indukovaného methylcholanthrenem z DBA-2 myši (26). Clive a spolupracovníci ošetřili buňky L5178Y (které Clive označil jako $TK^{+/+}$ -3) ethyl-metansulfonátem a izolovali klon $TK^{-/-}$ (označený jako $TK^{-/-}$ -3.7) pomocí bromodeoxyuridinu jako selekčního činidla. Z klonu $TK^{-/-}$ byly izolovány spontánní klon $TK^{+/-}$ (označený jako $TK^{+/-}$ -3.7.2.) a subklon (označený jako $TK^{+/-}$ -3.7.2C) a charakterizovány pro použití v testu MLA (27). Karyotyp pro buněčnou linii byl zveřejněn (28)(29)(30)(31). Modální hodnota počtu chromozomů je 40. Je zde jeden metacentrický chromozom (t12;13), který by se měl počítat jako jeden chromozom. Myší lokus *TK* je umístěn na distálním konci chromozomu 11. Buněčná linie L5178Y $TK^{+/-}$ -3.7.2C má mutace v obou alelách p53 a vytváří mutantní protein p53 (32)(33). Za schopnost testu detekovat rozsáhlé poškození je pravděpodobně odpovědný stav p53 buněčné linie $TK^{+/-}$ -3.7.2C (17).
14. Pro TK6: TK6 je buněčná linie lidského lymfoblastoidu. Mateřskou buněčnou linií je transformovaná buněčná linie viru Epstein-Barrové, WI-L2, která byla původně získána od pětiletého chlapce s hereditární sférocytózou. První izolovaný klon, HH4, byl zmutován ICR191 a byla vytvořena heterozygotní *TK* buněčná linie, TK6 (34). Buňky TK6 jsou téměř diploidní a reprezentativní karyotyp je 47, XY, 13+, t(14; 20), t(3; 21) (35). Na dlouhém rameni chromozomu 17 se nachází lidský lokus *TK*. TK6 je p53-kompetentní buněčná linie, protože má v obou alelách sekvenci p53 divokého typu a exprimuje pouze protein p53 divokého typu (36).
15. Pro MLA i TK6 se doporučuje, aby zkoušející laboratoř při prvním vytváření nebo doplňování základní zásoby zkontrolovala nepřítomnost mykoplazmové kontaminace, určila karyotyp buněk nebo obarvila chromozomy s lokusem *TK* a zkontrolovala dobu zdvojení populace. Pro buňky použité ve zkušební laboratoři by měla být stanovena normální délka buněčného cyklu, která by měla být v souladu s buněčnými

charakteristikami uvedenými v literatuře (16)(19)(37). Tuto základní zásobu je třeba skladovat při -150°C nebo méně a používat na přípravu veškeré pracovní zásoby buněk.

16. Buď před vytvořením velkého množství zmrazené pracovní zásoby, nebo bezprostředně před použitím v experimentu může být nutné očistit kulturu od již existujících mutantních buněk [pokud již není frekvence mutací (MF) v kontrole s rozpouštědlem v přijatelném rozsahu – viz tabulka 2 pro MLA)]. Provádí se to pomocí methotrexátu (aminopterin), kterým se vyselektují TK-deficitní buňky, a přidáním thymidinu, hypoxanthinu a glycinu (L5178Y) nebo 2'-deoxycytidinu (TK6) do kultury pro zajištění optimálního růstu TK-kompetentních buněk (19)(38)(39) a (40) pro TK6). Obecné rady týkající se správného postupu udržování buněčných kultur i konkrétní rady pro buňky L5178Y a TK6 lze nalézt v (19)(31)(37)(39)(41). Laboratoře, které potřebují základní zásobu buněk, aby mohly iniciovat MLA nebo TK6, nebo si chtějí pořídit novou základní zásobu buněk, mají k dispozici buněčný archív s dobře charakterizovanými buňkami (37).

Média a podmínky kultivace

17. U obou zkoušek by pro udržování kultur mělo být použito vhodné kultivační médium a inkubační podmínky (např. kultivační nádoby, zvlhčená atmosféra s 5% CO_2 , inkubační teplota 37°C). Buněčné kultury by měly být vždy uchovávány za podmínek, při nichž je zajištěn jejich logaritmický růst. Je zvláště důležité zvolit média a podmínky kultivace tak, aby byly zajištěny optimální růst buněk během období exprese a klonování jak mutovaných, tak nemutovaných buněk. Pro MLA i TK6 je také důležité, aby podmínky kultivace zajišťovaly optimální růst velkých kolonií/časných kolonií i malých kolonií/pozdních kolonií mutantů TK. Podrobnější informace o kultivaci, včetně nutnosti správně tepelně inaktivovat koňské sérum, jestliže se při selekci mutantů používá médium RPMI, lze nalézt v (19)(31)(38)(39)(40)(42).

Příprava kultur

18. Buňky se pomnoží z kmenových kultur a nasadí se do kultivačního média v takové hustotě, aby kultury v suspenzích pokračovaly v exponenciálním růstu po celou dobu expozice a exprese.

Metabolická aktivace

19. Při použití buněk L5178Y and TK6 by se měly použít exogenní metabolizující systémy, protože tyto buňky mají nedostatečnou endogenní metabolickou schopnost. Nejčastěji používaným systémem, který je standardně doporučován, pokud není

zdůvodněno použití jiného systému, je kofaktorem dotovaná postmitochondriální frakce (S9) připravená z jater hlodavců (zpravidla potkanů) zpracovaná činidlem indukujícím enzymy, jako je Aroclor 1254 (43)(44)(45) nebo kombinace fenobarbitalu a β -naftoflavonu (46)(47)(48)(49)(50)(51). Posledně jmenovaná kombinace není v rozporu se Stockholmskou úmluvou o perzistentních organických znečišťujících látkách (52) a bylo prokázáno, že je stejně účinná jako Aroclor 1254 pro indukování oxidáz se smíšenou funkcí (45)(46)(47)(48)(49). Frakce S9 je obvykle používána v koncentracích od 1–2 % obj., avšak v konečném testovacím médiu je možné koncentraci zvýšit do 10 % obj. Volbu typu a koncentrace systému exogenní metabolické aktivace nebo metabolického induktoru, který se použije, může ovlivnit třída zkoušených chemických látek.

Příprava zkoušených chemických látek

20. Pevné zkoušené chemické látky by měly být před aplikací na buňky rozpuštěny ve vhodných rozpouštědlech a popřípadě zředěny (viz odstavec 21). Kapalné látky lze přidat přímo do zkušebních systémů a/nebo je lze před použitím k ošetření zkušebních systémů zředit. Plynné a těkavé zkoušené chemické látky by se měly zkoušet za použití vhodně upravených standardních protokolů, například prostřednictvím ošetření buněk v neprodyšně uzavřených kultivačních nádobách (53)(54)(55). Měly by se používat čerstvě připravené zkoušené látky, pokud údaje o stálosti neprokazují možnost skladování.

ZKUŠEBNÍ PODMÍNKY

Rozpouštědla

21. Rozpouštědlo by mělo být zvoleno tak, aby optimalizovalo rozpustnost zkoušené chemické látky, aniž by nepříznivě ovlivnilo provádění zkoušky, např. měnilo růst buněk, ovlivňovalo integritu zkoušené chemické látky, reagovalo s kultivačními nádobami, narušovalo systém metabolické aktivace. Doporučuje se pokud možno nejprve zvážit použití vodného rozpouštědla (nebo kultivačního média). Dobře zavedenými rozpouštědly jsou voda nebo dimethylsulfoxid. Podíl organických rozpouštědel by zpravidla neměl být větší než 1 % obj. a podíl vodných rozpouštědel (fyziologického roztoku nebo vody) v konečném expozičním médiu by neměl být větší než 10 % obj. Jsou-li použita jiná než osvědčená rozpouštědla (např. ethanol nebo aceton), mělo by být jejich použití podloženo údaji o jejich kompatibilitě se zkoušenými chemickými látkami, zkušebním systémem a o tom, že nejsou v použité koncentraci genotoxická. Pokud takové podpůrné údaje neexistují, je důležité přidat neexponované kontroly (viz dodatek 1, Definice) prokazující, že zvolené rozpouštědlo nevyvolává žádné škodlivé nebo mutagenní účinky.

MĚŘENÍ CYTOTOXICITY A VOLBA EXPOZIČNÍCH KONCENTRACÍ

22. Při stanovení nejvyšší koncentrace zkoušené chemické látky by neměly být použity koncentrace, které jsou schopny vyvolat falešnou pozitivní odpověď, jako např. koncentrace, jež vyvolávají nadměrnou cytotoxicitu (viz odstavec 28), srážení (viz odstavec 29) kultivačního média nebo zřetelné změny pH nebo osmolality (viz odstavec 8). Pokud zkoušená chemická látka v době jejího přidání způsobuje zřetelnou změnu hodnoty pH média, bylo by možné pH upravit pufováním konečného expozičního média tak, aby nedošlo k falešným pozitivním výsledkům a aby byly zachovány vhodné kultivační podmínky.
23. Volba koncentrace vychází z cytotoxicity a dalších faktorů (viz odstavce 27–30). Hodnocení cytotoxicity při předběžné zkoušce může být užitečné a může napomoci k lepšímu určení koncentrací, jež mají být použity při hlavní zkoušce, avšak předběžná zkouška není vyžadována. I v případě, že se provede předběžné hodnocení cytotoxicity, je při hlavním experimentu přesto požadováno měření cytotoxicity pro každou kulturu. Jestliže se provádí experiment ke zjištění rozsahu, měl by zahrnovat široké rozmezí koncentrací, přičemž může být ukončen buď v den 1 po expozici, nebo pokračovat expresí v den 2 a k selekci mutantů (pokud se budou použité koncentrace jevit jako vhodné).
24. Cytotoxicita by měla být stanovena pro každou jednotlivou zkoušenou kulturu i kontrolní kulturu: metody pro MLA (2) a TK6 (15) jsou definovány podle mezinárodně dohodnuté praxe.
25. Pro obě verze testu MLA, s použitím agaru i mikrotitračních destiček: Cytotoxicita se hodnotí podle relativního celkového růstu (RTG), který původně definoval v roce 1975 Clive a Spector (2). Toto měření zahrnuje relativní růst v suspenzi (RSG: zkoušená kultura v porovnání s kontrolou s rozpouštědlem) v průběhu expozice buněk, dobu exprese a relativní účinnost klonování (RCE: zkoušená kultura v porovnání s kontrolou s rozpouštědlem) v době, kdy jsou selektováni mutantní (2). Je třeba poznamenat, že RSG zahrnuje každou ztrátu buněk, k níž dojde ve zkoušené kultuře v průběhu expozice (viz dodatek 2, kde jsou uvedeny vzorce).
26. Pro TK6: Cytotoxicita by se měla hodnotit podle relativního přežití (RS), tj. podle účinnosti klonování buněk umístěných na destičky okamžitě po expozici, upravené podle případné ztráty buněk v průběhu expozice, a to podle počtu buněk, v porovnání s negativní kontrolou (s přiřazeným přežitím 100 %) (viz dodatek 2, kde je uveden vzorec).

27. Měly by se vyhodnotit nejméně čtyři zkušební koncentrace (nepočítaje v to kontroly s rozpouštědlem a pozitivní kontroly), které splňují kritéria přijatelnosti (vhodná cytotoxicita, počet buněk atd.). I když se doporučuje použít duplicitní kultury, lze pro každou zkušební koncentraci použít repliky nebo jednu exponovanou kulturu. Výsledky získané z duplicitních kultur při dané koncentraci by měly být vykazovány samostatně, ale pro účely analýzy údajů je lze sloučit (55). U zkoušených látek, jež vykazují malou cytotoxicitu nebo nevykazují žádnou cytotoxicitu, budou obvykle vhodné přibližně dvojnásobné až trojnásobné intervaly koncentrací. V případě cytotoxicity by měly zvolené koncentrace pokrývat rozpětí od koncentrace vyvolávající cytotoxicitu, jak je popsáno v odstavci 28, po koncentrace, při nichž dochází ke střední a nízké cytotoxicitě nebo nedochází k žádné cytotoxicitě. Mnohé zkoušené chemické látky vykazují strmé křivky závislosti odezvy na koncentraci, a aby bylo možné postihnout celý rozsah cytotoxicity nebo podrobně studovat závislost odpovědi na koncentraci, může být nezbytné zvolit menší rozdíly mezi jednotlivými koncentracemi a více než čtyři koncentrace, zejména v situacích, kdy je požadován opakovaný experiment (viz odstavec 70). Použití více než 4 koncentrací může být zvláště důležité, když se používá jedna kultura.
28. Je-li maximální koncentrace odvozena od cytotoxicity, měla by být nejvyšší koncentrace zvolena tak, aby se dosáhlo relativního přežití mezi 20 a 10 % RTG u MLA a mezi 20 a 10 % RS u TK6 (odstavec 67).
29. V případě špatně rozpustných zkoušených chemických látek, které nejsou cytotoxické při koncentracích nižších, než je jejich rozpustnost, by nejvyšší analyzovaná koncentrace měla na konci expozice zkoušené chemické látky vyvolat zákal nebo sraženinu viditelnou pouhým okem nebo pomocí inverzního mikroskopu. Dokonce i v případech, kdy k výskytu cytotoxicity dochází při koncentracích vyšších, než je rozpustnost, se doporučuje testovat pouze při jedné koncentraci vyvolávající zákal nebo viditelné sraženiny, neboť sraženina může vést k falešným účinkům. Protože testy MLA i TK6 používají kultury v suspenzi, je třeba zvláště dbát na to, aby provádění zkoušky nemohla ovlivňovat sraženina. Užitečné může být také stanovení rozpustnosti v kultivačním médiu před pokusem.
30. Není-li pozorována sraženina nebo omezení cytotoxicity, měla by největší zkušební koncentrace odpovídat 10 mM, 2 mg/ml nebo 2 µl/ml, podle toho, která z uvedených hodnot je nejnižší (57) (58). Pokud u zkoušené chemické látky není stanoveno její složení, např. u látek s neznámým nebo proměnlivým složením, komplexních reakčních produktů nebo biologického materiálu [tj. chemické látky s neznámým nebo proměnlivým složením, (UVCB)], přírodních extraktů atd., bude možná muset být při nedostatečné cytotoxicitě nejvyšší koncentrace vyšší (např. 5 mg/ml), aby se zvýšila

koncentrace každé ze složek. Je však třeba poznamenat, že u humánních léčivých přípravků se tyto požadavky mohou lišit (59).

Kontroly

31. V okamžiku každého odběru by měly být použity souběžné negativní kontroly (viz odstavec 21) skládající se ze samotného rozpouštědla v kultivačním médiu, s nimiž se zachází stejným způsobem jako s exponovanými kulturami.
32. K prokázání schopnosti laboratoře stanovit mutageny za podmínek použitého zkušebního protokolu, (případně) účinnosti exogenního systému metabolické aktivace a k prokázání adekvátní detekce malých/pozdních a velkých/časných *TK* mutantů jsou nutné souběžné pozitivní kontroly. Příklady pozitivních kontrol jsou uvedeny v tabulce 1 níže. V odůvodněných případech mohou být k pozitivní kontrole použity jiné látky. Jelikož zkoušky genetické toxicity savčích buněk *in vitro* při krátkodobé expozici (3–4 hodiny) prováděné souběžně s metabolickou aktivací a bez metabolické aktivace s použitím stejné doby trvání expozice jsou již dostatečně standardizovány, je možné použití pozitivních kontrol omezit na testování mutagenu vyžadujícího metabolickou aktivaci. V tomto případě tato reakce jediné pozitivní kontroly prokáže činnost systému metabolické aktivace i citlivost zkušebního systému. Pokud se však používá dlouhodobá expozice (tj. 24 hodin bez S9), měla by mít svou vlastní pozitivní kontrolu, protože doba trvání expozice bude odlišná než při zkoušce za použití metabolické aktivace. Každá pozitivní kontrola by měla být použita při jedné nebo více koncentracích, u nichž se očekává, že poskytnou reprodukovatelný a detekovatelný nárůst oproti pozadí, čímž se prokáže citlivost testovacího systému, a reakce by neměla být narušena cytotoxicitou přesahující limitní hodnoty stanovené v této zkušební metodě (viz odstavec 28).

Tabulka 1: Referenční látky doporučené pro posouzení způsobilosti laboratoře a pro výběr pozitivních kontrol.

Kategorie	Látka	CASRN
1. Mutageny působící bez metabolické aktivace		
methyI-methansulfonát	66-27-3	
mitomycin C	50-07-7	
4-nitrochinolin-1-oxid	56-57-5	
2. Mutageny vyžadující metabolickou aktivaci		
benzo[a]pyren	50-32-8	
cyklofosfamid (cyklofosfamid monohydrát)	50-18-0 R60/6055/-19-2	

7,12-dimethylbenzoanthracen	57-97-6
3-methylcholanthren	56-49-5

POSTUP

Expozice zkoušené chemické látky

33. Proliferující buňky se vystaví zkoušené chemické látce jak za přítomnosti metabolického aktivačního systému, tak bez něho. Expozice by měla trvat vhodnou dobu (obvykle je postačující doba 3 až 4 hodin). Je však třeba poznamenat, že u humánních léčivých přípravků se tyto požadavky mohou lišit (59). Pro MLA, v případech, kdy krátkodobá expozice dává negativní výsledky a existují informace naznačující nutnost dlouhodobější expozice [např. analoga nukleosidů, špatně rozpustné chemické látky (5)(59)], je třeba zvážit provedení zkoušky s delší expozicí, tj. 24 hodin bez S9.
34. Minimální počet buněk použitých pro každou zkušební (kontrolní a exponovanou) kulturu v každém stádiu zkoušky by měl vycházet z četnosti spontánních mutací. Obecným pravidlem je exponovat a pasážovat v každé experimentální kultuře dostatečný počet buněk, aby bylo uchováno v každé fázi zkoušky alespoň 10, ideálně však 100 spontánních mutantů (expozice, fenotypová exprese a selekce mutantů) (56).
35. Pro MLA je doporučená přijatelná frekvence spontánních mutací mezi $35\text{--}140 \times 10^{-6}$ (verze s agarem) a $50\text{--}170 \times 10^{-6}$ (verze s mikrotitračními destičkami) (viz tabulka 2). Pro získání alespoň 10 a ideálně 100 spontánních mutantů, kteří v každé zkoušené kultuře přežijí expozici, je nezbytné exponovat alespoň 6×10^6 buněk. Exponování takového počtu buněk a zachování dostatečného počtu buněk v průběhu exprese a klonování pro selekci mutantů poskytuje dostatečný počet spontánních mutací (10 nebo více) ve všech fázích experimentu, a to i u kultur exponovaných při koncentracích, jejichž výsledkem je 90% cytotoxicita (měřeno podle 10% RTG) (19)(38)(39).
36. U TK6 činí četnost spontánních mutací obvykle $2 \text{ až } 10 \times 10^{-6}$. Pro získání alespoň 10 spontánních mutantů, kteří v každé kultuře přežijí expozici, je nezbytné exponovat alespoň 20×10^6 buněk. Expozice tohoto počtu buněk zajistí dostatečný počet spontánních mutantů (10 nebo více) i v kulturách exponovaných při koncentracích, které vyvolávají při expozici 90% cytotoxicitu (10% relativní přežití). Kromě toho musí být v období exprese kultivován a umístěn na destičky pro výběr mutantů dostatečný počet buněk (60).

Doba exprese fenotypu a měření cytotoxicity a četnosti mutací

37. Na konci expoziční doby se buňky po stanovenou dobu kultivují, aby se umožnila téměř optimální fenotypová exprese nově indukovaných mutantů, specifická pro každou buněčnou linii. U testu MLA je doba fenotypové exprese 2 dny. U testu TK6 činí doba fenotypové exprese 3–4 dny. Jestliže se použije 24hodinová expozice, začíná doba exprese po ukončení expozice.
38. V průběhu doby fenotypové exprese se buňky počítají každý den. U testu MLA se denní počet buněk použije pro výpočet denního růstu v suspenzi (SG). Po dvoudenním období exprese se buňky suspendují v médiu se selekčním činidlem a bez něj za účelem stanovení počtu mutantů (destičky pro selekci), respektive účinnosti klonování (destičky pro životaschopnost). Pro test MLA existují dvě stejně přijatelné metody pro selektivní klonování mutantů; jedna s použitím měkkého agaru a druhá s použitím kapalného média v 96jamkových destičkách (19)(38)(39). Klonování v testu TK6 se provádí s použitím kapalného média v 96jamkových destičkách (16).
39. Jediným doporučeným selekčním činidlem pro mutanty *TK* je triflurothymidin (TFT) (61).
40. U testu MLA se agarové destičky a mikrotitrační destičky počítají po 10–12 dnech inkubace. U testu TK6 se po 10–14 dnech stanoví skóre časných kolonií mutantů v mikrotitračních destičkách. Za účelem obnovení pomalu rostoucích (pozdních kolonií) mutantů TK6 je třeba po spočítání časných kolonií mutantů dodat buňkám růstové médium a TFT a poté destičky inkubovat dalších 7–10 dnů (62). Viz odstavce 42 a 44, kde je uvedena diskuze o vyčíslení mutantů *TK* s pomalým a normálním růstem.
41. Příslušné výpočty pro tyto dva testy včetně obou metod (agar a mikrodestičky) pro test MLA jsou uvedeny v dodatku 2. U testu MLA s použitím agarové metody se spočítají kolonie a počet mutantních kolonií se upraví podle účinnosti klonování, aby bylo možné vypočítat četnost mutací. U testu MLA ve verzi s mikrodestičkami a u testu TK6 se stanoví účinnost klonování u destiček pro selekci i destiček pro účinnost klonování podle Poissonova rozdělení (63). Z těchto dvou hodnot účinnosti klonování se vypočítá četnost mutací.

Charakterizace mutantních kolonií

42. Je-li u testu MLA zkoušená chemická látka pozitivní (viz odstavce 62–63), charakterizace podle velikosti nebo růstu kolonií by měla být provedena alespoň na jedné ze zkušebních kultur (obvykle na kultuře s nejvyšší pozitivní koncentrací) a na negativních a pozitivních kontrolách. Je-li zkoušená látka negativní (viz odstavec 64), měla být charakterizace mutantních kolonií provedena na negativních a pozitivních kontrolách. U metody testu MLA s využitím mikrodestiček se mutanti tvořící malé

kolonie definují jako kolonie pokrývající méně než 25 % průměru jamky a mutanti tvořící velké kolonie jako kolonie pokrývající více než 25 % průměru jamky. U agarové metody se na vyčíslení kolonií mutantů a stanovení jejich velikosti používá automatické počítadlo kolonií. Způsoby stanovení velikosti kolonií jsou podrobně popsány v literatuře (19)(38)(40). Aby bylo prokázáno, že studie se provádějí správně, je třeba charakterizovat kolonie na negativní a pozitivní kontrole.

43. Zkoušenou chemickou látku nelze určit jako negativní, pokud nejsou v pozitivní kontrole adekvátně detekováni mutanti tvořící velké i malé kolonie. Charakterizace kolonií může sloužit k poskytnutí obecných informací o schopnosti zkoušené chemické látky způsobit bodové mutace anebo chromozomální jevy (odstavec 4).
44. TK6: Normálně rostoucí a pomalu rostoucí mutanti se diferencují podle rozdílu v době inkubace (viz odstavec 40). U testu TK6 se obvykle stanoví skóre časných i pozdních mutantů pro všechny kultury včetně negativních a pozitivních kontrol. Aby bylo prokázáno, že studie se provádějí správně, je třeba charakterizovat kolonie u negativní a pozitivní kontroly. Zkoušenou chemickou látku nelze určit jako negativní, pokud nejsou v pozitivní kontrole adekvátně detekováni časní i pozdní mutanti. Charakterizace kolonií může sloužit k poskytnutí obecných informací o schopnosti zkoušené chemické látky způsobit bodové mutace anebo chromozomální jevy (odstavec 4).

Způsobnost laboratoře

45. Aby bylo možné před zahájením rutinního zkoušení prokázat, zda laboratoř má s danou zkouškou dostatečné zkušenosti, měla by provést sérii experimentů s referenčními pozitivními látkami, jež působí prostřednictvím různých mechanismů (alespoň s jednou látkou účinnou s metabolickou aktivací a jednou účinnou bez metabolické aktivace, které se vyberou ze seznamu látek uvedeného v tabulce 1), a s různými negativními kontrolami (včetně neexponovaných kultur a různých rozpouštědel/vehikul). Odpovědi těchto pozitivních a negativních kontrol by měly být v souladu s odbornou literaturou. Tento požadavek se nepoužije na laboratoře, které tuto zkušenost mají, tj. které mají k dispozici databázi historických údajů, jak je definována v odstavcích 47–50. V testu MLA by hodnoty dosažené u pozitivní i negativní kontroly měly odpovídat doporučením IWGT (viz tabulka 2).
46. Výběr z látek pro pozitivní kontroly (viz tabulka 1) by měl být zkoumán s krátkou i dlouhou expozicí (pokud se používají dlouhé expozice) bez metabolické aktivace a také s krátkou expozicí a s metabolickou aktivací, aby byla prokázána způsobnost pro detekci mutagenních chemických látek, stanovena účinnost systému metabolické aktivace a prokázána vhodnost podmínek pro růst buněk v průběhu expozice,

fenotypovou expresi a selekci mutantů a postupů hodnocení. Rozsah koncentrací by u vybraných látek měl být zvolen tak, aby poskytl opakovatelná zvýšení účinku v závislosti na dávce nad úroveň pozadí, aby se tak prokázala citlivost a dynamické rozpětí testovacího systému.

Historické kontrolní údaje

47. Laboratoř by měla stanovit:

- historické rozmezí a distribuci pozitivních kontrol,
- historické rozmezí a distribuci negativních kontrol (neexponovaných, s rozpouštědlem).

48. Při prvním získávání údajů o historické distribuci negativních kontrol by měly být výsledky souběžných negativních kontrol v souladu s publikovanými negativními kontrolními údaji. S tím, jak je do distribuce kontrol přidáváno více údajů z experimentů, měly by aktuální negativní kontroly v ideálním případě spadat do 95% rozmezí této distribuce (64)(65).

49. Nejprve by měla být vybudována historická databáze negativních kontrol dané laboratoře na základě nejméně 10 experimentů, avšak raději by měla zahrnovat nejméně 20 experimentů provedených za srovnatelných zkušebních podmínek. V laboratořích by měly být uplatňovány metody kontroly jakosti, jako např. regulační diagramy (např. C-diagramy nebo diagramy X s pruhem (65)), z nichž je patrné, jak proměnlivé jsou jejich údaje o pozitivních a negativních kontrolách a že metodika je v dané laboratoři „pod kontrolou“ (66). Další podrobnosti a doporučení jak vytvářet a používat historická data lze najít v literatuře (64).

50. Údaje o negativních kontrolách by měly zahrnovat četnost mutací z jedné kultury nebo raději z replikovaných kultur, jak je popsáno v odstavci 27. Výsledky souběžných negativních kontrol by v ideálním případě měly být uvnitř 95 % kontrolních limitů distribuce v historické databázi negativních kontrol laboratoře. Pokud jsou údaje z negativních kontrol mimo 95% rozmezí, může být přijatelné je zahrnout do dosavadní distribuce kontrol, pokud tyto údaje nejsou mimořádně odlehlé, je to důkaz, že testovací systém je „pod kontrolou“ (viz odstavec 49), a důkaz, že nedošlo k technické nebo lidské chybě.

51. Jakékoli změny zkušebního protokolu by měly být zvažovány z hlediska jejich souladu se stávajícími historickými kontrolními databázemi laboratoře. Jakýkoli větší rozdíl ve zkušebním protokolu by měl vést k zavedení nové historické kontrolní databáze.

ÚDAJE A PŘEDKLÁDÁNÍ ZPRÁV

Vyjádření výsledků

52. Prezentace údajů pro test MLA i TK6 by měla zahrnovat údaje za exponované i kontrolní kultury potřebné pro výpočet cytotoxicity (RTG, respektive RS) a četnosti mutací, jak je popsáno níže.
53. U testu MLA by měly být uvedeny údaje za jednotlivé kultury pro RSG, RTG, účinnost klonování v době selekce mutantů a počet mutantních kolonií (u agarové verze) nebo počet prázdných jamek (u mikrodestičkové verze). Četnost mutantů by měla být vyjádřena jako počet mutantních buněk na milion přeživších buněk. Je-li odpověď pozitivní, měly by se uvést četnosti mutací tvořících malé a velké kolonie (anebo procento z celkové četnosti mutací) u alespoň jedné koncentrace zkoušené chemické látky (obvykle látky s nejvyšší pozitivní koncentrací) a negativní a pozitivní kontroly. V případě negativní odpovědi by se měla uvést četnost mutací tvořících malé a velké kolonie pro negativní a pozitivní kontrolu.
54. U testu TK6 by měly být uvedeny údaje za jednotlivé kultury pro RS, účinnost klonování v době selekce mutantů a počet prázdných jamek u časných a pozdních mutací. Četnost mutací (MF) se vyjadřuje jako počet mutantních buněk na počet přeživších buněk a měla by zahrnovat celkovou MF i MF (anebo procento z celkové MF) časných a pozdních mutantů.

Kritéria přijatelnosti

55. Pro test MLA i test TK6 by měla být splněna tato kritéria před stanovením celkových výsledků za konkrétní zkoušenou chemickou látku:
- Test se provedl za dvou experimentálních uspořádání (krátká expozice s metabolickou aktivací a bez ní – viz odstavec 33), pokud jedno z nich nevedlo k pozitivním výsledkům.
 - Měl by být analyzovatelný adekvátní počet buněk a koncentrací (viz odstavce 27, 34–36).
 - Kritéria pro výběr nejvyšší koncentrace jsou v souladu s kritérii popsány v odstavcích 28–30.

Kritéria přijatelnosti pro negativní a pozitivní kontroly

56. Na základě analýzy expertní pracovní skupiny IWGT pro MLA zahrnující velké množství údajů o MLA byl dosažen mezinárodní konsensus ohledně specifických kritérií přijatelnosti pro MLA (1)(2)(3)(4)(5). Proto tato zkušební metoda poskytuje

konkrétní doporučení pro určení přijatelnosti negativních a pozitivních kontrol a pro hodnocení výsledků jednotlivých látek v testu MLA. Test TK6 má mnohem menší databázi a nebyl hodnocen pracovní skupinou.

57. V testu MLA by se mělo u každého experimentu hodnotit, zda neexponovaná kontrola / kontrola s rozpouštědlem splňuje kritéria přijatelnosti pracovní skupiny IWGT pro MLA ((4) a níže uvedená tabulka) pro: 1) četnost mutací (nezapomeňte, že přijatelné MF podle IWGT jsou jiné pro verzi testu MLA s agarem a verzi s mikrodestičkami), 2) účinnost klonování (CE) v době selekce mutantů a 3) růst v suspenzi (SG) pro kontrolu s rozpouštědlem (viz dodatek 2, kde jsou uvedeny vzorce).

Tabulka 2: Kritéria přijatelnosti pro MLA

Parametr	Metoda s použitím měkkého agaru	Metoda s použitím mikrodestiček
Četnost mutantů	35–140 x 10 ⁻⁶	50–170 x 10 ⁻⁶
Účinnost klonování	65–120 %	65–120 %
Růst v suspenzi	8–32násobek (3–4 hodiny expozice) 32–180násobek (24 hodin expozice, je-li prováděna)	8–32násobek (3–4 hodiny expozice) 32–180násobek (24 hodin expozice, je-li prováděna)

58. V testu MLA by se u každé zkoušky mělo hodnotit také, zda pozitivní kontrola/y splňuje/í alespoň jedno z těchto dvou kritérií přijatelnosti stanovených pracovní skupinou IWGT:
- Pozitivní kontrola by měla prokázat absolutní nárůst celkové četnosti mutací, to znamená zvýšení nad spontánní četnost mutací na pozadí [indukovaná četnost mutací (IMF)] alespoň 300 x 10⁻⁶. Alespoň 40 % IMF by se mělo projevit v četnosti mutací tvořících malé kolonie.
 - Pozitivní kontrola má zvýšenou četnost mutací tvořících malé kolonie alespoň 150 x 10⁻⁶ nad MF pozorovanou u souběžné neexponované kontroly / kontroly s rozpouštědlem (IMF tvořících malé kolonie 150 x 10⁻⁶).
59. U testu TK6 bude zkouška přijatelná, jestliže se souběžná negativní kontrola považuje za přijatelnou pro přidání do databáze historických negativních kontrol laboratoře, jak je popsáno v odstavcích 48–49. Kromě toho by souběžné pozitivní kontroly (viz odstavec 32) měly vyvolat odpovědi, které jsou slučitelné s odpověďmi uvedenými v historické databázi pozitivních kontrol, a měly by vyvolat statisticky významný nárůst v porovnání se souběžnou negativní kontrolou.

60. U obou testů by horní mez cytotoxicity pozorovaná v kultuře pozitivní kontroly měla být stejná jako v experimentálních kulturách. To znamená, že poměr RTG/RS by neměl být menší než 10 %. K prokázání, že kritéria přijatelnosti byla u pozitivní kontroly splněna, postačí použít jednu koncentraci (nebo jednu z koncentrací kultur pozitivní kontroly, jestliže je použita více než jedna koncentrace). Dále musí být četnost mutací pozitivní kontroly v rámci přijatelného rozmezí stanoveného pro laboratoř.

Hodnocení a interpretace výsledků

61. Pro test MLA vykonala významnou práci v oblasti biologické relevance a kritérií pro pozitivní odpověď expertní pracovní skupina IWGT pro myši lymfom (4). Proto tato zkušební metoda poskytuje konkrétní doporučení pro interpretaci výsledků zkoušené chemické látky v testu MLA (viz odstavce 62–64). Test TK6 má mnohem menší databázi a nebyl hodnocen pracovní skupinou. Proto jsou doporučení pro interpretaci dat v testu TK6 uvedena obecněji (viz odstavce 65–66). Další doporučení se vztahují na oba testy (viz odstavce 67–71).

MLA

62. Doporučuje se, aby způsob definování pozitivní a negativní odpovědi zajišťoval, že zvýšená četnost mutací bude biologicky relevantní. Místo statistické analýzy, která se obvykle používá u jiných testů, vychází z použití předem definované indukované frekvence mutací (tj. zvýšení frekvence mutací nad souběžnou kontrolu), určeného globálního hodnotícího faktoru (GEF), který vychází z analýzy distribuce dat o četnosti mutací u negativních kontrol od zúčastněných laboratoří (4). Pro agarovou verzi testu MLA je faktor GEF 90×10^{-6} a pro mikrodestičkovou verzi testu MLA je faktor GEF 126×10^{-6} .
63. Za předpokladu, že všechna kritéria přijatelnosti byla splněna, lze zkoušenou chemickou látku považovat za jasně pozitivní, pokud v některém ze zkoumaných experimentálních uspořádání (viz odstavec 33), přesahuje zvýšení četnosti mutací nad souběžné pozadí faktor GEF a toto zvýšení souvisí s koncentrací (např. s použitím trend testu). Pak se má za to, že zkoušená chemická látka je schopna vyvolávat mutaci v tomto testovacím systému.
64. Za předpokladu, že byla splněna všechna kritéria přijatelnosti, lze zkoušenou chemickou látku považovat za jasně negativní, pokud za všech zkoumaných experimentálních uspořádání (viz odstavec 33), nedochází k žádné odpovědi v závislosti na koncentraci nebo četnost mutací, jestliže se zvýšila, nepřevyšuje faktor GEF. Pak se má za to, že zkoušená chemická látka není schopna vyvolávat mutace v tomto testovacím systému.

TK6

65. Za předpokladu, že všechna kritéria přijatelnosti byla splněna, lze zkoušenou chemickou látku považovat za jasně pozitivní, pokud v některém ze zkoumaných experimentálních uspořádání (viz odstavec 33):

- alespoň jedna ze zkušebních koncentrací vykazuje statisticky významný nárůst v porovnání se souběžnou negativní kontrolou,
- hodnocení pomocí vhodného trend-testu ukáže závislost tohoto nárůstu na koncentraci (viz odstavec 33),
- všechny výsledky jsou mimo distribuci historických údajů o negativních kontrolách (např. mimo 95% rozmezí dle Poissonova rozdělení; viz odstavec 48).

Jsou-li splněna všechna tato kritéria, má se za to, že zkoušená chemická látka je schopna vyvolávat mutace v tomto testovacím systému. Doporučení ohledně nejvhodnějších statistických metod lze najít v literatuře (66)(67).

66. Za předpokladu, že byla splněna všechna kritéria přijatelnosti, lze zkoušenou chemickou látku považovat za jasně negativní, pokud za všech zkoumaných experimentálních uspořádání (viz odstavec 33):

- žádná ze zkušebních koncentrací nevykazuje statisticky významný nárůst v porovnání se souběžně provedenou negativní kontrolou,
- hodnocení pomocí vhodné zkoušky trendu ukáže, že nedochází k nárůstu v závislosti na koncentraci,
- všechny výsledky spadají do rámce distribuce dosavadních údajů o negativních kontrolách (např. 95% rozmezí dle Poissonova rozdělení, viz odstavec 48).

Pak se má za to, že zkoušená chemická látka není schopna vyvolávat mutace v tomto testovacím systému.

Pro MLA i TK6:

67. Je-li maximální koncentrace odvozena od cytotoxicity, měla by být nejvyšší koncentrace zvolena tak, aby se dosáhlo mezi 20 a 10 % RTG/RS. Podle konsensu je třeba dbát na to, aby byly interpretovány pouze ty pozitivní výsledky, které jsou vykazovány mezi 20 a 10 % RTG/RS, přičemž výsledek se nepovažuje za pozitivní, jestliže ke zvýšení četnosti dotací došlo pouze při 10 % RTG/RS nebo nižším poměru (pokud byl hodnocen) (2)(59).

68. Existují některé okolnosti, za nichž mohou pomoci další informace určit, že zkoušená chemická látka není mutagenní, když žádná kultura nevykazuje hodnotu RTG mezi

10–20 % RTG/RS. Jde o tyto situace: 1) V sérii datových bodů v rozmezí od 100 % do 20 % RTG/RS není žádný důkaz o mutagenitě (např. žádná závislost odpovědi na dávce, žádné četnosti mutací nad četnost pozorovanou při souběžné negativní kontrole nebo v historických rozsazích pozadí atd.) a alespoň jeden datový bod je mezi 20 % a 25 % RTG/RS. 2) V sérii datových bodů od 100 % do 25 % RTG/RS není žádný důkaz o mutagenitě (např. žádná závislost odpovědi na dávce, žádné četnosti mutací nad četnost pozorovanou při souběžné negativní kontrole nebo v historických rozsazích pozadí atd.) a také jeden datový bod je mírně pod 10 % RTG/RS. V obou těchto situacích lze zkoušenou chemickou látku posoudit jako negativní.

69. Ověření jasně pozitivního či jasně negativního účinku není nutné.

70. V případech, kdy odpověď není ani jasně negativní, ani jasně pozitivní, jak je popsáno výše, nebo s cílem napomoci při stanovení biologického významu výsledku by měly být údaje vyhodnoceny na základě odborného posouzení a/nebo dalším šetřením. Užitečné by mohlo být provedení opakovaného experimentu, případně za použití upravených zkušebních podmínek [např. rozsahu koncentrací, aby se zvýšila pravděpodobnost dosažení datových bodů v rozmezí 10–20 % RTG/RS, použití jiných podmínek metabolické aktivace (např. koncentrace S9 nebo původ S9) a délky expozice].

71. Ve vzácných případech ani po dalším šetření nebude možné na základě daného souboru údajů dospět k závěru o pozitivitě či negativitě výsledku. Proto by měl být učiněn závěr, že odpověď na zkoumanou chemickou látku je neurčitá (interpretováno jako stejná pravděpodobnost pozitivní nebo negativní odpovědi).

ZÁVĚREČNÁ ZPRÁVA

72. Závěrečná zpráva by měla obsahovat tyto informace:

Zkoušená chemická látka:

- zdroj, číslo šarže a je-li k dispozici, datum použitelnosti,
- stabilita zkoušené chemické látky samotné, je-li známa,
- rozpustnost a stabilita zkoušené chemické látky v rozpouštědle, jsou-li známy,
- měření pH, případně osmolality a sraženiny v kultivačním médiu, do něhož byla přidána zkoušená chemická látka.

Jednosložková látka:

- fyzický vzhled, rozpustnost ve vodě a další relevantní fyzikálně-chemické vlastnosti,
- chemická identifikace, např. název podle IUPAC nebo CAS, číslo CAS, kód SMILES nebo InChI, strukturní vzorec, čistota, případně chemická identita nečistot, je-li to prakticky možné, atd.

Vícesložková látka, látka s neznámým nebo proměnlivým složením, komplexní reakční produkt nebo biologický materiál a směsi:

- charakterizované pokud možno chemickou identitou (viz výše), kvantitativním výskytem a relevantními fyzikálně-chemickými vlastnostmi složek.

Rozpouštědlo:

- zdůvodnění volby rozpouštědla,
- procentuální podíl rozpouštědla v konečném kultivačním médiu.

Buňky:

Pro základní laboratorní kultury:

- druh a zdroj buněk a historie ve zkušební laboratoři,
- vlastnosti karyotypu a/nebo modální hodnota počtu chromozomů,
- metody udržování buněčných kultur,
- nepřítomnost mykoplasmat,
- doby zdvojnásobení buněk.

Zkušební podmínky:

- zdůvodnění volby koncentrací a počtu buněčných kultur, včetně např. údajů o cytotoxicitě a mezích rozpustnosti,
- složení média, koncentrace CO₂, vlhkost,
- koncentrace zkoušené chemické látky vyjádřená jako konečná koncentrace v kultivačním médiu (např. v µg nebo mg/ml nebo mM kultivačního média),
- koncentrace (a/nebo objem) rozpouštědla a zkoumané chemické látky přidávaných do kultivačního média,
- inkubační teplota,
- inkubační doba,
- trvání expozice,

- hustota buněk během expozice;
- typ a složení použitého metabolického aktivačního systému (zdroj S9, metoda přípravy směsi S9, koncentrace nebo objem směsi S9 a S9 v konečném kultivačním médiu, kontroly jakosti S9),
- látky použité v pozitivních a negativních kontrolách, konečné koncentrace pro jednotlivé podmínky expozice,
- délka doby exprese (případně včetně počtu nasazených buněk, subkultur a výměny média),
- identifikace selekčního činidla a jeho koncentrace,
- u testu MLA by měla být uvedena použitá verze (agar nebo mikrodestička),
- kritéria přijatelnosti zkoušek,
- metody použité k počítání životaschopných a mutantních buněk,
- metody použité pro měření cytotoxicity,
- jakékoli doplňkové informace týkající se cytotoxicity a použité metody,
- délka inkubace po umístění na destičky,
- definice kolonií podle velikosti a typu (případně včetně kritérií pro „malé“ a „velké“ kolonie),
- kritéria klasifikace studie na pozitivní, negativní nebo neurčitou,
- metody použité ke stanovení pH, osmolality, je-li test proveden, a v příslušných případech sraženiny.

Výsledky:

- počet exponovaných buněk a počet subkultivovaných buněk v každé kultuře,
- parametry toxicity (RTG pro MLA a RS pro TK6),
- známky srážení a čas jejich stanovení,
- počet buněk kultivovaných v selektivním a neselektivním médiu,
- počet kolonií v neselektivním médiu a počet rezistentních kolonií v selektivním médiu a související četnosti mutací,
- stanovení velikosti kolonií u negativních a pozitivních kontrol a v případě, že je zkoušená chemická látka pozitivní, alespoň jedna koncentrace a související četnosti mutací,

- závislost účinku na koncentraci, pokud je to možné,
- údaje o souběžných negativních kontrolách (rozpouštědlo) a pozitivních kontrolách (koncentrace a rozpouštědla),
- dosavadní údaje o negativní (rozpouštědlo) a pozitivní kontrole (koncentrace a rozpouštědla) s rozmezími, středními hodnotami a směrodatnými odchylkami, počet zkoušek, z nichž vychází historické kontroly,
- statistické analýzy (pro jednotlivé kultury, případně spojené repliky) a případné p hodnoty; a pro test MLA hodnocení GEF.

Diskuse o výsledcích

Závěr

LITERATURA

- (1) Moore, M.M., Honma, M., Clements, J. (Rapporteur), Awogi, T., Bolcsfoldi, G., Cole, J., Gollapudi, B., Harrington-Brock, K., Mitchell, A., Muster, W., Myhr, B., O'Donovan, M., Ouldelhkim, M-C., San, R., Shimada, H. and Stankowski, L.F. Jr. (2000). Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Locus (TK) Gene Mutation Assay: International Workshop on Genotoxicity Test Procedures (IWGTP) Workgroup Report, *Environ. Mol. Mutagen.*, 35 (3): 185-190.
- (2) Moore, M.M., Honma, M., Clements, J., Harrington-Brock, K., Awogi, T., Bolcsfoldi, G., Cifone, M., Collard, D., Fellows, M., Flanders, K., Gollapudi, B., Jenkinson, P., Kirby, P., Kirchner, S., Kraycer, J., McEnaney, S., Muster, W., Myhr, B., O'Donovan, M., Oliver, Ouldelhkim, M-C., Pant, K., Preston, R., Riach, C., San, R., Shimada, H. and Stankowski, L.F. Jr. (2002). Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Locus Gene Mutation Assay: Follow-Up International Workshop on Genotoxicity Test Procedures, New Orleans, Louisiana, (April 2000), *Environ. Mol. Mutagen.*, 40 (4): 292-299.
- (3) Moore, M.M., Honma, M., Clements, J., Bolcsfoldi, G., Cifone, M., Delongchamp, R., Fellows, M., Gollapudi, B., Jenkinson, P., Kirby, P., Kirchner, S., Muster, W., Myhr, B., O'Donovan, M., Ouldelhkim, M-C., Pant, K., Preston, R., Riach, C., San, R., Stankowski, L.F. Jr., Thakur, A., Wakuri, S. and Yoshimura, I. (2003). Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Locus Gene Mutation Assay: International Workshop (Plymouth, UK) on Genotoxicity Test Procedures Workgroup Report, *Mutation Res.*, 540: 127-140.
- (4) Moore, M.M., Honma, M., Clements, J., Bolcsfoldi, G., Burlinson, B., Cifone, M., Clarke, J., Delongchamp, R., Durward, R., Fellows, M., Gollapudi, B., Hou, S., Jenkinson, P., Lloyd, M., Majeska, J., Myhr, B., O'Donovan, M., Omori, T., Riach, C., San, R., Stankowski, L.F. Jr., Thakur, A.K., Van Goethem, F., Wakuri, S. and Yoshimura, I. (2006). Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Gene Mutation Assay: Follow-Up Meeting of the International Workshop on Genotoxicity Tests – Aberdeen, Scotland, 2003 – Assay Acceptance Criteria, Positive Controls, and Data Evaluation, *Environ. Mol. Mutagen.*, 47 (1): 1-5.
- (5) Moore, M.M., Honma, M., Clements, J., Bolcsfoldi, G., Burlinson, B., Cifone, M., Clarke, J., Clay, P., Doppalapudi, R., Fellows, M., Gollapudi, B., Hou, S., Jenkinson, P., Muster, W., Pant, K., Kidd, D.A., Lorge, E., Lloyd, M., Myhr, B., O'Donovan, M., Riach, C., Stankowski, L.F. Jr., Thakur A.K. and Van Goethem, F. (2007). Mouse

Lymphoma Thymidine Kinase Mutation Assay: Meeting of the International Workshop on Genotoxicity Testing, San Francisco, 2005, Recommendations for 24-h Treatment, *Mutation. Res.*, 627 (1): 36-40.

- (6) OECD (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, No. Series on Testing and Assessment, No 234, OECD, Paris.
- (7) Fellows M.D., Luker, T., Cooper, A. and O'Donovan, M.R. (2012). Unusual Structure-Genotoxicity Relationship in Mouse Lymphoma Cells Observed with a Series of Kinase Inhibitors. *Mutation, Res.*, 746 (1): 21-28.
- (8) Honma, M., Momose, M., Sakamoto, H., Sofuni, T. and Hayashi, M. (2001). Spindol Poisons Induce Allelic Loss in Mouse Lymphoma Cells Through Mitotic Non-Disjunction. *Mutation Res.*, 493 (1-2): 101-114.
- (9) Wang, J., Sawyer, J.R., Chen, L., Chen, T., Honma, M., Mei, N. and Moore, M.M. (2009). The Mouse Lymphoma Assay Detects Recombination, Deletion, and Aneuploidy, *Toxicol. Sci.*, 109 (1): 96-105.
- (10) Applegate, M.L., Moore, M.M., Broder, C.B., Burrell, A., and Hozier, J.C. (1990). Molecular Dissection of Mutations at the Heterozygous Thymidine Kinase Locus in Mouse Lymphoma Cells. *Proc. National. Academy. Sci. USA*, 87 (1): 51-55.
- (11) Hozier, J., Sawyer, J., Moore, M., Howard, B. and Clive, D. (1981). Cytogenetic Analysis of the L5178Y/TK^{+/-} Leads to TK^{-/-} Mouse Lymphoma Mutagenesis Assay System, *Mutation Res.*, 84 (1): 169-181.
- (12) Hozier, J., Sawyer, J., Clive, D. and Moore, M.M. (1985). Chromosome 11 Aberrations in Small Colony L5178Y TK^{-/-} Mutants Early in their Clonal History, *Mutation Res.*, 147 (5): 237-242.
- (13) Moore, M.M., Clive, D., Hozier, J.C., Howard, B.E., Batson, A.G., Turner, N.T. and Sawyer, J. (1985). Analysis of Trifluorothymidine-Resistant (TFTr) Mutants of L5178Y/TK^{+/-} Mouse Lymphoma Cells. *Mutation Res.*, 151 (1): 161-174.
- (14) Liber H.L., Call K.M. and Little J.B. (1987). Molecular and Biochemical Analyses of Spontaneous and X-Ray-Induced Mutants in Human Lymphoblastoid Cells. *Mutation Res.*, 178 (1): 143-153.

- (15) Li C.Y., Yandell D.W. and Little J.B. (1992). Molecular Mechanisms of Spontaneous and Induced Loss of Heterozygosity in Human Cells *In Vitro*. *Somat. Cell Mol. Genet.*, 18 (1): 77-87.
- (16) Honma M., Hayashi M. and Sofuni T. (1997). Cytotoxic and Mutagenic Responses to X-Rays and Chemical Mutagens in Normal and P53-Mutated Human Lymphoblastoid Cells. *Mutation. Res.*, 374 (1): 89-98.
- (17) Honma, M., Momose, M., Tanabe, H., Sakamoto, H., Yu, Y., Little, J.B., Sofuni, T. and Hayashi, M. (2000). Requirement of Wild-Type P53 Protein for Maintenance of Chromosomal Integrity. *Mol. Carcinogen.*, 28 (4): 203-14.
- (18) Amundson S.A. and Liber H.L. (1992). A Comparison of Induced Mutation at Homologous Alleles of the TK Locus in Human Cells. II. Molecular Analysis of Mutants. *Mutation Res.*, 267 (1): 89-95.
- (19) Schisler M.R., Moore M.M. and Gollapudi B.B. (2013). *In Vitro* Mouse Lymphoma (L5178Y TK^{+/+}-3.7.2C) Forward Mutation Assay. In *Protocols in Genotoxicity Assessment* A. Dhawan and M. Bajpayee (Eds.), Springer Protocols, Humana Press: 27-50.
- (20) Long L.H., Kirkland D., Whitwell J. and Halliwell B. (2007). Different Cytotoxic and Clastogenic Effects of Epigallocatechin Gallate in Various Cell-Culture Media Due to Variable Rates of its Oxidation in the Culture Medium, *Mutation Res.*, 634 (1-2): 177-183.
- (21) Nessler, F., Simar-Meintieres, S., Watzinger, M., Talahari, I. and Marzin, D. (2008). Characterization of the Genotoxicity of Nitrotriacetic Acid. *Environ. Mol. Mutagen.*, 49 (6): 439-452.
- (22) Brusick D. (1986). Genotoxic Effects in Cultured Mammalian Cells Produced by Low pH Treatment Conditions and Increased Ion Concentrations. *Environ. Mutagen.*, 8 (6): 879-886.
- (23) Morita, T., Nagaki, T., Fukuda, I. and Okumura, K., (1992). Clastogenicity of Low pH to Various Cultured Mammalian Cells. *Mutation Res.*, 268 (2): 297-305.
- (24) Scott, D., Galloway, S.M., Marshall, R.R., Ishidate, M.Jr, Brusick, D., Ashby, J. and Myhr, B.C. (1991). Genotoxicity Under Extreme Culture Conditions. A report from ICPEMC Task Group 9. *Mutation Res.*, 257: 147-204.

- (25) Wang J., Heflich R.H. and Moore M.M. (2007). A Method to Distinguish Between the *De Novo* Induction of Thymidine Kinase Mutants and the Selection of Pre-Existing Thymidine Kinase Mutants in the Mouse Lymphoma Assay. *Mutation Res.*, 626 (1-2): 185-190.
- (26) Fischer, G.A. (1958). Studies on the Culture of Leukemic Cells *In Vitro*. *Ann. N.Y. Academy Sci.*, 76: 673-680.
- (27) Clive, D., Johnson, K.O., Spector, J.F.S., Batson, A.G. and Brown, M.M.M. (1979). Validation and Characterization of the L5178Y/TK^{+/-} - Mouse Lymphoma Mutagen Assay System. *Mutation Res.*, 59(1): 61-108.
- (28) Sawyer, J., Moore, M.M., Clive, D. and Hozier, J. (1985). Cytogenetic Characterization of the L5178Y TK^{+/-} 3.7.2C Mouse Lymphoma Cell Line, *Mutation Res.*, 147 (5): 243-253.
- (29) Sawyer J.R., Moore M.M. and Hozier J.C. (1989). High-Resolution Cytogenetic Characterization of the L5178Y TK^{+/-} Mouse Lymphoma Cell Line, *Mutation Res.*, 214 (2): 181-193.
- (30) Sawyer, J.R., Binz, R.L., Wang, J. and Moore, M.M. (2006). Multicolor Spectral Karyotyping of the L5178Y TK^{+/-}-3.7.2C Mouse Lymphoma Cell Line, *Environ. Mol. Mutagen.*, 47 (2): 127-131.
- (31) Fellows, M.D., McDermott, A., Clare, K.R., Doherty, A. and Aardema, M.J. (2014). The Spectral Karyotype of L5178Y TK^{+/-} Mouse Lymphoma Cells Clone 3.7.2C and Factors Affecting Mutant Frequency at the Thymidine Kinase (TK) Locus in the Microtitre Mouse Lymphoma Assay, *Environ. Mol. Mutagen.*, 55 (1): 35-42.
- (32) Storer, R.D., Jaynak, A.R., McKelvey, T.W., Elia, M.C., Goodrow, T.L. and DeLuca, J.G. (1997). The Mouse Lymphoma L5178Y TK^{+/-} Cell Line is Heterozygous for a Codon 170 Mutation in the P53 Tumor Suppressor Gene. *Mutation. Res.*, 373 (2): 157-165.
- (33) Clark L.S., Harrington-Brock, K., Wang, J., Sargent, L., Lowry, D., Reynolds, S.H. and Moore, M.M. (2004). Loss of P53 Heterozygosity is not Responsible for the Small Colony Thymidine Kinase Mutant Phenotype in L5178Y Mouse Lymphoma Cells. *Mutagen.*, 19 (4): 263-268.
- (34) Skopek T.R., Liber, H.L., Penman, B.W. and Thilly, W.G. (1978). Isolation of a Human Lymphoblastoid Line Heterozygous at the Thymidine Kinase Locus: Possibility for a Rapid Human Cell Mutation Assay. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 84 (2): 411-416.

- (35) Honma M. (2005). Generation of Loss of Heterozygosity and its Dependency on P53 Status in Human Lymphoblastoid Cells. *Environ. Mol. Mutagen.*, 45, 2-3. 162-176.
- (36) Xia, F., Wang, X., Wang, Y.H., Tsang, N.M., Yandell, D.W., Kelsey, K.T. and Liber, H.L. (1995). Altered P53 Status Correlates with Differences in Sensitivity to Radiation-Induced Mutation and Apoptosis in Two Closely Related Human Lymphoblast Lines. *Cancer. Res.*, 55 (1): 12-15.
- (37) Lorge, E., M. Moore, J. Clements, M. O Donovan, M. Honma, A. Kohara, J. van Benthem, S. Galloway, M.J. Armstrong, V. Thybaud, B. Gollapudi, M. Aardema, J. Kim, A. Sutter, D.J. Kirkland (2015). Standardized Cell Sources and Recommendations for Good Cell Culture Practices in Genotoxicity Testing. (Manuscript in preparation).
- (38) Lloyd M. and Kidd D. (2012). The Mouse Lymphoma Assay. *Springer Protocols: Methods in Molecular Biology* 817, Genetic Toxicology Principles and Methods, ed. Parry and Parry, Humana Press. ISBN, 978-1-61779-420-9, 35-54.
- (39) Mei N., Guo X. and Moore M.M. (2014). Methods for Using the Mouse Lymphoma Assay to Screen for Chemical Mutagenicity and Photo-Mutagenicity. In: Optimization in Drug Discover: *In Vitro* Methods: Yan Z and Caldwell(Eds) , 2nd Edition, GW; Humana Press, Totowa, NJ.
- (40) Liber H.L. and Thilly W.G. (1982). Mutation Assay at the Thymidine Kinase Locus in Diploid human Lymphoblasts. *Mutation Res.*, 94 (2): 467-485.
- (41) Coecke, S., Balls, M., Bowe, G., Davis, J., Gstraunthaler, G., Hartung, T., Hay, R., Merten, OW., Price, A., Schechtman, L., Stacey, G. and Stokes, W. (2005). Guidance on Good Cell Culture Practice. A Report of the Second ECVAM Task Force on Good Cell Culture Practice. *ATLA*, 33 (3): 261-287.
- (42) Moore M.M. and Howard B.E. (1982). Quantitation of Small Colony Trifluorothymidine-Resistant Mutants of L5178Y/TK+/- Mouse Lymphoma Cells in RPMI-1640 Medium, *Mutation Res.*, 104 (4-5): 287-294.
- (43) Ames B.N., McCann J. and Yamasaki E. (1975). Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian-Microsome Mutagenicity Test. *Mutation Res.*, 31 (6): 347-364.

- (44) Maron D.M. and Ames B.N. (1983). Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test. *Mutation Res.*, 113 (3-4): 173-215.
- (45) Natarajan, A.T., Tate, A.D, Van Buul, P.P.W., Meijers, M. and De Vogel, N. (1976). Cytogenetic Effects of Mutagens/Carcinogens After Activation in a Microsomal System *In Vitro*, I. Induction of Chromosomal Aberrations and Sister Chromatid Exchanges by Diethylnitrosamine (DEN) and Dimethylnitrosamine (DMN) in CHO Cells in the Presence of Rat-Liver Microsomes. *Mutation Res.*, 37 (1): 83-90.
- (46) Matsuoka A., Hayashi M. and Ishidate M. Jr. (1979). Chromosomal Aberration Tests on 29 Chemicals Combined with S9 Mix *In Vitro*. *Mutation Res.*, 66 (3): 277-290.
- (47) Ong T.M., *et al.* (1980). Differential Effects of Cytochrome P450-Inducers on Promutagen Activation Capabilities and Enzymatic Activities of S-9 from Rat Liver, *J. Environ. Pathol. Toxicol.*, 4 (1): 55-65
- (48) Elliott, B.M., Combes, R.D., Elcombe, C.R., Gatehouse, D.G., Gibson, G.G., Mackay, J.M. and Wolf, R.C. (1992). Report of UK Environmental Mutagen Society Working Party. Alternatives to Aroclor 1254-Induced S9 in *In Vitro* Genotoxicity Assays. *Mutagen.*, 7 (3): 175-177.
- (49) Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. and Sugimura, T. (1976). A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems. In: *In Vitro* Metabolic Activation in Mutagenesis Testing. de Serres F.J., *et al.* (Eds, Elsevier, North-Holland, pp. 85-88.
- (50) Galloway S.M., *et al.* (1994). Report from Working Group on *In Vitro* Tests for Chromosomal Aberrations. *Mutation Res.*, 312 (3): 241-261.
- (51) Johnson T.E., Umbenhauer D.R. and Galloway S.M. (1996). Human Liver S-9 Metabolic Activation: Proficiency in Cytogenetic Assays and Comparison with Phenobarbital/Beta-Naphthoflavone or Aroclor 1254 Induced Rat S-9, *Environ. Mol. Mutagen.*, 28 (1): 51-59.
- (52) UNEP (2001). Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants, United Nations Environment Programme (UNEP).
- (53) Krahn D.F., Barsky F.C. and McCooey K.T. (1982). CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids. In:

Genotoxic Effects of Airborne Agents Tice R.R., Costa D.L. and Schaich K.M. (Eds.). New York, Plenum, pp. 91–103.

- (54) Zamora, P.O., Benson, J.M., Li, A.P. and Brooks, A.L. (1983). Evaluation of an Exposure System Using Cells Grown on Collagen Gels for Detecting Highly Volatile Mutagens in the CHO/HGPRT Mutation Assay. *Environ. Mutagen.*, 5 (6): 795-801.
- (55) Asakura M., Sasaki T., Sugiyama T., Arito H., Fukushima, S. and Matsushima, T. (2008). An Improved System for Exposure of Cultured Mammalian Cells to Gaseous Compounds in the Chromosomal Aberration Assay. *Mutation Res.*, 652 (2): 122-130.
- (56) Arlett C.F., *et al.* (1989). Mammalian Cell Gene Mutation Assays Based upon Colony Formation. V: Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data, Kirkland, D.J. (Ed.), Cambridge University Press, pp. 66-101.
- (57) Morita T., Honma M. and Morikawa K. (2012). Effect of Reducing the Top Concentration Used in the *In Vitro* Chromosomal Aberration Test in CHL Cells on the Evaluation of Industrial Chemical Genotoxicity. *Mutation Res.*, 741 (1-2): 32-56.
- (58) Brookmire L., Chen J.J. and Levy D.D. (2013). Evaluation of the Highest Concentrations Used in the *In Vitro* Chromosome Aberrations Assay. *Environ. Mol. Mutagen.*, 54 (1): s. 36-43.
- (59) USFDA (2012). International Conference on Harmonisation (ICH) Guidance S2 (R1) on Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended For Human Use. Dostupné na webových stránkách: [<https://www.federalregister.gov/a/2012-13774>].
- (60) Honma M. and Hayashi M. (2011). Comparison of *In Vitro* Micronucleus and Gene Mutation Assay Results for P53-Competent Versus P53-Deficient Human Lymphoblastoid Cells. *Environ. Mol. Mutagen.*, 52 (5): 373-384.
- (61) Moore-Brown, M.M., Clive, D., Howard, B.E., Batson, A.G. and Johnson, K.O. (1981). The Utilization of Trifluorothymidine (TFT) to Select for Thymidine Kinase-Deficient (TK^{-/-}) Mutants from L5178Y/TK^{+/-} Mouse Lymphoma Cells, *Mutation Res.*, 85 (5): 363-378.
- (62) Liber H.L., Yandell D.W. and Little J.B. (1989). A Comparison of Mutation Induction at the TK and HRPT Loci in Human Lymphoblastoid Cells; Quantitative Differences are Due to an

Additional Class of Mutations at the Autosomal TK locus. *Mutation Res.*, 216 (1): 9-17.

- (63) Furth E.E., Thilly, W.G., Penman, B.W., Liber, H.L. and Rand, W.M. (1981). Quantitative Assay for Mutation in Diploid Human Lymphoblasts Using Microtiter Plates. *Chem. Biochem.*, 110 (1): 1-8.
- (64) Hayashi, M, Dearfield, K., Kasper, P., Lovell, D., Martus, H. J. and Thybaud, V. (2011). Compilation and Use of Genetic Toxicity Historical Control Data, *Mutation Res.*, 723 (2): 87-90.
- (65) Ryan T.P. (2000). *Statistical Methods for Quality Improvement*. John Wiley and Sons, New York 2nd Edition.
- (66) OECD (2014). Statistical analysis supporting the revision of the genotoxicity Test Guidelines. Environmental, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 199.), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (67) Fleiss J.L., Levin B. and Paik M.C. (2003). *Statistical Methods for Rates and Proportions*, Third Edition, New York: John Wiley & Sons.

Dodatek 1

DEFINICE

Aneugen: Jakákoli chemická látka nebo proces, který v interakci se složkami mitotického a meiotického cyklu buněčného dělení vede k aneuploidii v buňkách nebo organismech.

Aneuploidie: Jakákoli odchylka od normálního diploidního (nebo haploidního) počtu chromozomů o jeden nebo více chromozomů, avšak nikoli o celou sadu (nebo více sad) chromozomů (polyploidie).

Mutageny substituce párů bází: Chemické látky, které způsobují substituci jednoho nebo více párů bází v DNA.

Chemická látka: Látka nebo směs.

Účinnost klonování: Procento buněk kultivovaných v nízké hustotě, které jsou schopny se rozrůst do kolonií, jež mohou být spočítány.

Klastogen: Jakákoli chemická látka nebo proces, které způsobují strukturní chromozomové aberace v populacích buněk nebo organismů.

Cytotoxicita: U zkoušek prováděných podle této zkušební metody se cytotoxicita vyjadřuje jako snížení relativního celkového růstu (RTG) nebo relativního přežití (RS) v testu MLA, respektive TK6.

Přímá mutace: Genová mutace výchozího typu mutované formy, která způsobuje změnu nebo ztrátu enzymatické aktivity nebo funkce kódovaných bílkovin.

Posunové mutageny: Chemické látky, které způsobují adici nebo delecii jednoho nebo více párů bází v molekule DNA.

Genotoxický: Obecný termín zahrnující všechny typy poškození DNA nebo chromozomů včetně jejich rozlámání, přestavby aduktů, mutací, chromozomálních aberací a aneuploidie. Ne všechny druhy genotoxických účinků způsobují mutace nebo stálé poškození chromozomů.

Mitotická rekombinace: Rekombinace mezi homologními chromatidami v průběhu mitózy, v jejímž důsledku může dojít k indukci dvojných zlomů vláken DNA nebo ke ztrátě heterozygotnosti.

Mutagenní: Produkující dědičné změny sekvence (sekvencí) párů bází DNA v genech

nebo struktury chromozomů (chromozomové aberace).

Četnost mutací (MF): Počet pozorovaných mutantních buněk dělený počtem životaschopných buněk.

Doba exprese fenotypu: Doba po expozici, během níž v genomu vznikne genetická změna a všechny dříve existující genové produkty vymizí do té míry, že se změní fenotypová vlastnost.

Relativní přežití: Relativní přežití se u TK6 používá jako míra cytotoxicity související s expozicí. Je to relativní účinnost klonování (CE) buněk umístěných na destičky okamžitě po jejich expozici, upravená podle případné ztráty buněk v průběhu expozice v porovnání s účinností klonování u negativní kontroly.

Relativní růst v suspenzi (RSG): V testu MLA se relativní celkový dvoudenní růst zkoušené kultury v suspenzi porovná s celkovým dvoudenním růstem negativní kontroly/kontroly s rozpouštědlem v suspenzi (Clive a Spector, 1975). RSG by měl zahrnovat relativní růst zkoušené kultury v porovnání s negativní kontrolou/kontrolou s rozpouštědlem v průběhu expozice.

Relativní celkový růst (RTG): Relativní celkový růst se u MLA používá jako míra cytotoxicity související s expozicí. Je to míra relativního (ke kontrole s vehikulem) růstu zkoušených kultur v průběhu expozice, ve fázi dvoudenní exprese a ve fázi selekce mutantních klonů. RSG každé zkoušené kultury se vynásobí relativní účinností klonování zkoušené kultury v době selekce mutantů a vyjadřuje se ve vztahu k účinnosti klonování negativní kontroly/kontroly s rozpouštědlem (Clive a Spector, 1975).

Jaterní frakce S9: Supernatant homogenátu jater po odstředění při 9 000g, tj. surový jaterní extrakt

Směs S9: Směs jaterní frakce S9 a kofaktorů nezbytných pro metabolickou aktivaci enzymů.

Růst v suspenzi (SG): Násobné zvýšení počtu buněk v průběhu expozice a fáze exprese v testu MLA. SG se vypočítá vynásobením násobného zvýšení v den 1 násobným zvýšením v den 2 u krátkodobé (3 nebo 4 hodiny) expozice. Jestliže se použije 24hodinová expozice, je SG násobné zvýšení v průběhu 24hodinové expozice vynásobené násobným zvýšením v dny exprese 1 a 2.

Kontrola s rozpouštědlem: Obecný termín k označení kontrolních kultur, ke kterým se přidává pouze rozpouštědlo používané k rozpuštění zkoušené chemické látky.

Zkoušená chemická látka: Jakákoli látka nebo směs zkoušená touto zkušební metodou.

Neexponované kontroly: Neexponované/neošetřené kontroly jsou kultury, které se

neexponují (tj. ani chemické látky, ani rozpouštědla), ale zpracovávají se stejným způsobem jako kultury, k nimž se přidává zkoušená chemická látka.

Dodatek 2

VZORCE

Cytotoxicita

Pro obě verze testu MLA (s použitím agaru i mikrotitračních destiček)

Cytotoxicita je definována jako relativní celkový růst (RTG), který zahrnuje relativní růst v suspenzi (RSG) v průběhu dvoudenní exprese a relativní účinnost klonování (RCE) dosaženou v době selekce mutantů. RTG, RSG a RCE jsou vyjádřeny v procentech.

Výpočet RSG: Růst v suspenzi jedna (SG₁) je rychlost růstu mezi dnem 0 a dnem 1 (koncentrace buněk v den 1 / koncentrace buněk v den 0) a růst v suspenzi dva (SG₂) je rychlost růstu mezi dnem 1 a dnem 2 (koncentrace buněk v den 2 / koncentrace buněk v den 1). RSG je celkový růst SG (SG₁ x SG₂) pro exponovanou kulturu v porovnání s neexponovanou kulturou / kulturou s rozpouštědlem. To znamená: $RSG = [SG_{1(test)} \times SG_{2(test)}] / [SG_{1(control)} \times SG_{2(control)}]$ SG₁ se vypočítá z počáteční koncentrace buněk použité na začátku expozice buněk. Zahrnuje to případnou diferenciální cytotoxicitu, k níž dochází ve zkoušené kultuře (kulturách) v průběhu expozice buněk.

RCE je relativní účinnost klonování zkoušené kultury v porovnání s relativní účinností klonování neexponované kontroly / kontroly s rozpouštědlem zjištěné v době selekce mutantů.

Relativní celkový růst (RTG): $RTG = RSG \times RCE$

TK6

Relativní přežití (RS):

Cytotoxicita se hodnotí podle relativního přežití, tj. účinnosti klonování (CE) buněk umístěných na destičky okamžitě po expozici, upravené podle případné ztráty buněk v průběhu expozice v porovnání s účinností klonování u negativních kontrol (s přiřazeným přežitím 100 %). Korekci ztráty buněk v průběhu expozice lze vypočítat jako:

$$\text{Upravená CE} = \frac{\text{Počet buněk na konci expozice}}{\text{Počet buněk na počátku expozice}}$$

Relativní přežití u kultury exponované zkoušené chemické látce se vypočítá jako:

$$RS = \frac{\text{Upravená CE v exponované kultuře}}{\text{Upravená CE v kontrole s rozpouštědlem}} \times 100$$

Četnost mutací pro MLA i TK6

Četnost mutací (MF) je účinnost klonování kolonií mutací v selektivním médiu (CE_M) upraveno podle účinnosti klonování v neselektivním médiu v době selekce mutací (CE_V). To znamená $MF = CE_M / CE_V$. Výpočet těchto dvou účinností klonování je popsán níže pro metodu klonování s použitím agarů a metodu s použitím mikrodestiček.

Verze testu MLA s použitím agarů: Ve verzi testu MLA s použitím měkkého agarů se počet kolonií na destičce pro selekci mutantů (C_M) a počet kolonií na neselektované destičce nebo destičce pro účinnost klonování (životaschopný počet) (C_V) zjistí přímým spočítáním klonů. Když se umístí 600 buněk pro účinnost klonování (CE) na destičky pro selekci mutantů (CE_M) a neselektované destičky nebo destičky pro účinnost klonování (životaschopný počet) (CE_V) a 3×10^6 buněk se použije pro selekci mutantů,

$$CE_M = C_M / (3 \times 10^6) = (C_M / 3) \times 10^{-6}$$

$$CE_V = C_V / 600$$

Verze testu MLA a TK6 s použitím mikrodestiček: Ve verzi testu MLA s použitím mikrodestiček se hodnoty C_M a C_V určí jako součin celkového počtu mikrodestiček (TW) a pravděpodobného počtu kolonií na jamku (P) na mikrotitračních destičkách.

$$C_M = P_M \times TW_M$$

$$C_V = P_V \times TW_V$$

Od nulového výrazu Poissonova rozdělení (Furth et al., 1981) je P dáno vztahem

$$P = -\ln(EW / TW)$$

kde EW jsou prázdné jamky a TW je celkový počet jamek. Proto,

$$CE_M = C_M / T_M = (P_M \times TW_M) / T_M$$

$$CE_V = C_V / T_V = (P_V \times TW_V) / T_V$$

Ve verzi testu MLA s použitím mikrodestiček se četnosti mutací tvořících malé a velké kolonie vypočítají stejným způsobem s použitím příslušného počtu prázdných jamek pro malé a velké kolonie.

V testu TK6 vycházejí četnosti mutací tvořících malé a velké kolonie z časné a pozdně

se objevujících mutantů.

B.68 ZKUŠEBNÍ METODA VYUŽÍVAJÍCÍ KRÁTKODOBOU EXPOZICI *IN VITRO* PRO IDENTIFIKACI i) CHEMICKÝCH LÁTEK VYVOLÁVAJÍCÍCH VÁŽNÉ POŠKOZENÍ OČÍ A ii) CHEMICKÝCH LÁTEK, KTERÉ NENÍ NUTNÉ KLASIFIKOVAT JAKO LÁTKY MAJÍCÍ DRÁŽDIVÉ ÚČINKY NA OČI NEBO VYVOLÁVAJÍCÍ VÁŽNÉ POŠKOZENÍ OČÍ

ÚVOD

1. Tato zkušební metoda je rovnocenná Pokynu OECD pro zkoušení (TG) č. 491 (2017). Zkušební metoda využívající krátkodobou expozici (STE) je metoda *in vitro*, kterou lze použít za určitých okolností a se specifickými omezeními pro klasifikaci a označování nebezpečnosti chemických látek (látek a směsí), které vyvolávají vážné poškození očí, i chemických látek, které není nutné klasifikovat jako látky vyvolávající vážné poškození očí nebo mající dráždivé účinky na oči, jak je definuje Globálně harmonizovaný systém klasifikace a označování chemických látek (GHS) Organizace spojených národů (OSN) (1) a nařízení Evropské unie (EU) č. 1272/2008 o klasifikaci, označování a balení látek a směsí (nařízení CLP)¹.
2. Po řadu let byl potenciál nebezpečnosti chemických látek pro oči posuzován primárně pomocí oční zkoušky *in vivo* na králících (zkušební metoda B.5 (8), ekvivalentní zkušební metodice OECD č. 405). Obecně se uznává, že v dohledné budoucnosti nebude moci žádný alternativní test *in vitro* plně nahradit oční zkoušku na králících *in vivo*, pokud jde o předpověď celé škály závažného poškození očí / dráždivosti u různých tříd chemických látek. Oční zkouška na králících by však mohla být nahrazena strategickou kombinací alternativních zkušebních metod použitých v rámci strategie (odstupňovaného) zkoušení (2). Pro zkoušení chemických látek, u nichž lze na základě stávajících informací očekávat, že budou mít vysoký potenciál dráždivosti nebo že budou vyvolávat závažné poškození očí, je navržen přístup shora dolů. Naopak přístup zdola nahoru je navržen pro zkoušení chemických látek, u nichž lze na základě stávajících informací očekávat, že nebudou působit takové podráždění očí, aby to vyžadovalo klasifikaci. Ačkoli není zkušební metoda STE považována za

¹ Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1272/2008 ze dne 16. prosince 2008 o klasifikaci, označování a balení látek a směsí, o změně a zrušení směrnic 67/548/EHS a 1999/45/ES a o změně nařízení (ES) č. 1907/2006, Úř. věst. L 353, 31.12.2008.

úplnou náhradu očního testu *in vivo* na králících, je vhodná pro použití jako součást odstupňované strategie zkoušení pro klasifikaci a označování pro regulační účely, například v rámci přístupu shora dolů / zdola nahoru, aby bylo možné určit bez dalšího zkoušení i) chemické látky vyvolávající závažné poškození očí (kategorie 1 podle GHS OSN/CLP) a ii) chemické látky (s výjimkou vysoce těkavých látek a všech pevných chemických látek jiných než povrchově aktivních látek), které nevyžadují klasifikaci jako látky dráždivé pro oči nebo vyvolávající vážné poškození očí (kategorie 2 podle GHS OSN/CLP) (1)(2). U chemické látky, o níž se na základě použití zkušební metody STE nepředpokládá, že vyvolává vážné poškození očí (kategorie 1 podle GHS OSN/CLP) ani není klasifikována jako „bez kategorie podle GHS OSN/CLP“ (nevyvolává vážné poškození očí ani podráždění očí), by však pro stanovení konečné klasifikace bylo nutné další zkoušení. Použití zkušební metody STE v rámci postupu „zdola nahoru“ podle jiných klasifikačních systémů než GHS OSN/CLP by mělo být předem konzultováno s příslušnými regulačními orgány. Výběr nejvhodnější zkušební metody a její použití je třeba posuzovat v souvislosti s Pokynem OECD k integrovanému přístupu ke zkoušení a posuzování vážného poškození očí a podráždění očí (14).

3. Účelem této zkušební metody je popsat postupy používané k hodnocení potenciálních nebezpečných účinků zkoušené chemické látky na oči podle její schopnosti vyvolávat toxicitu při použití zkušební metody s krátkodobou expozicí. Cytotoxický účinek chemických látek na epitelové buňky rohovky je důležitým způsobem účinku (MOA) vedoucím k poškození epitelu rohovky a podráždění očí. Životaschopnost buněk se ve zkušební metodě STE posuzuje kvantitativním měřením po extrakci soli modrého formazanu z buněk produkovaného živými buňkami enzymatickou konverzí vitálního barviva MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium-bromid), které se také nazývá bromthiazolová modř (3). Zjištěná životaschopnost buněk se porovná s kontrolou s rozpouštědlem (relativní životaschopnost) a použije se na odhad potenciální nebezpečnosti zkoušené chemické látky pro oči. Zkoušená chemická látka je klasifikována jako kategorie 1 podle systému GHS OSN/CLP, když je životaschopnost buněk při koncentraci 5 % i 0,05 % menší nebo rovna ($\leq$) 70 %. Naopak, u zkoušené chemické látky lze předpokládat klasifikaci bez kategorie podle systému GHS OSN/CLP, když je životaschopnost buněk při koncentraci 5 % i 0,05 % větší než ($>$) 70 %.
4. Termín „zkoušená chemická látka“ se v této zkušební metodě používá k označení toho, co se zkouší, a netýká se použitelnosti zkušební metody STE ke zkoušení látek a/nebo směsí. Definice jsou uvedeny v dodatku.

VÝCHOZÍ ÚVAHY A OMEZENÍ

5. Tato zkušební metoda je založena na protokolu, který vyvinula společnost Kao Corporation (4) a který byl validován ve dvou různých studiích: jednu studii provedl validační výbor Japonské společnosti pro alternativy experimentů na zvířatech (JSAAE) (5) a druhou japonské středisko pro validaci alternativních metod (JaCVAM) (6). Vzájemné hodnocení provedl NICEATM/ICCVAM na základě zpráv o validační studii a všeobecných dokumentů o kontrole této zkušební metody (7).
6. Když byla zkušební metoda STE použita pro zjišťování chemických látek (látek a směsí) vyvolávajících vážné poškození očí (kategorie 1 GHS OSN/CLP (1), vykazala data zjištěná u 125 chemických látek (včetně látek i směsí) celkovou přesnost 83 % (104/125), míru falešné pozitivivity 1 % (1/86) a míru falešné negativity 51 % (20/39) ve srovnání se zkouškou *in vivo* na očích králíků (7). Zjištěná míra falešné negativity není v této souvislosti kriticky důležitá, protože všechny zkoušené chemické látky, které indukují životaschopnost buněk ≤ 70 % při 5% koncentraci a > 70 % při 0,05% koncentraci by byly následně zkoušeny dalšími náležitě validovanými zkouškami *in vitro* nebo jako poslední možnost oční zkouškou *in vivo* na králících, v závislosti na požadavcích právních předpisů a v souladu se strategií postupného zkoušení a podle analýzy průkaznosti výsledků, která je v současnosti doporučena (1)(8). Zkoušeny byly hlavně jednosložkové látky, ačkoli určité omezené množství údajů existuje i o zkoušení směsí. Zkušební metoda je nicméně technicky použitelná i na zkoušení vícesložkových látek a směsí. Před použitím této zkušební metody ke zkoušení směsi za účelem získání údajů pro zamýšlené použití v právních předpisech by však mělo být zváženo, zda tato metoda může pro tento účel poskytnout přiměřené výsledky, a pokud ano, proč je tomu tak. Takové posouzení není nutné, pokud existuje právní požadavek na zkoušení dané směsi. Když byla zkušební metoda STE použita na zjištění chemických látek klasifikovaných jako kategorie 1 GHS OSN, nevykazovala žádné jiné konkrétní nedostatky. Zkoušející by mohli zvážit použití této zkušební metody na všechny zkoušené chemické látky, přičemž životaschopnost buněk ≤ 70 % při koncentraci 5 % i 0,05 % by měla být považována za odpověď indukující vážné poškození očí, které je třeba klasifikovat v kategorii 1 GHS OSN/CLP bez dalšího zkoušení.
7. Když byla zkušební metoda STE použita pro zjišťování chemických látek (látek a směsí) nevyžadujících klasifikaci jako látky vyvolávající podráždění očí a závažné poškození očí (tj. bez kategorie GHS OSN/CLP), vykazala data zjištěná u 130 chemických látek (včetně látek i směsí) celkovou přesnost 85 % (110/130), míru falešné negativity 12 % (9/73) a míru falešné pozitivivity 19 % (11/57) ve srovnání se zkouškou *in vivo* na očích králíků (7). Pokud se z datového souboru vyloučí vysoce

těkavé látky a pevné látky jiné než povrchově aktivní látky, celková přesnost se zlepšila na 90 % (92/102), míra falešné negativity na 2 % (1/54) a míra falešné pozitivivity na 19 % (9/48) (7). Potenciálním nedostatkem zkušební metody STE použité pro zjištění zkoušených chemických látek, které nevyžadují klasifikaci jako látky vyvolávající podráždění očí a závažné poškození očí (bez kategorie GHS OSN/CLP), tedy je vysoká míra falešné negativity u i) vysoce těkavých látek s tlakem výparů nad 6 kPa a ii) pevných chemických látek (látek a směsí) jiných než povrchově aktivních látek a směsí složených pouze z povrchově aktivních látek. Tyto chemické látky jsou ze sféry použitelnosti zkušební metody STE vyloučeny (7).

8. Kromě chemických látek uvedených v odstavcích 6 a 7 obsahuje datový soubor generovaný pomocí zkušební metody STE také interní údaje o 40 směsích, které při porovnání s Draizovou oční zkouškou *in vivo* vykázaly přesnost 88 % (35/40), míru falešné pozitivivity 50 % (5/10) a míru falešné negativity 0 % (0/30) při predikci směsí, které nevyžadují klasifikaci podle klasifikačních systémů GHS OSN/CLP (9). Zkušební metoda STE tedy může být použita pro zjištění směsí klasifikovaných jako směsi bez kategorie GHS OSN/CLP při použití přístupu zdola nahoru s výjimkou pevných směsí jiných než směsí složených pouze z povrchově aktivních látek navíc k jejímu omezení u pevných látek. Dále směsi obsahující látky s tenzí par vyšší než 6 kPa by měly být hodnoceny opatrně, aby nedošlo k případnému podcenění, přičemž každý případ by měl být individuálně odůvodněn.
9. Zkušební metodu STE nelze použít pro identifikaci zkoušených chemických látek klasifikovaných jako látky kategorie 2 GHS OSN/CLP nebo kategorie 2A GHS OSN (podráždění očí) nebo kategorie 2B GHS OSN (mírné podráždění očí), a to vzhledem k značnému počtu chemických látek kategorie 1 GHS OSN/CLP podhodnoceně klasifikovaných v kategorii 2, 2A nebo 2B a látek bez kategorie GHS OSN/CLP nadhodnoceně klasifikovaných v kategorii 2, 2A nebo 2B (7). Pro tento účel může být nezbytné další zkoušení s použitím jiné vhodné metody.
10. Zkušební metoda STE je vhodná pro zkoušené chemické látky, které jsou rozpuštěny nebo rovnoměrně suspendovány po dobu alespoň 5 minut ve fyziologickém roztoku, 5% dimethylsulfoxidu (DMSO) ve fyziologickém roztoku nebo v minerálním oleji. Zkušební metoda STE není vhodná pro zkoušené chemické látky, které jsou nerozpustné nebo které nelze rovnoměrně suspendovat po dobu alespoň 5 minut ve fyziologickém roztoku, 5% DMSO ve fyziologickém roztoku nebo v minerálním oleji. Použití minerálního oleje ve zkušební metodě STE je možné vzhledem ke krátkodobé expozici. Zkušební metoda STE je tedy vhodná pro predikci potenciálu nebezpečnosti zkoušených chemických látek nerozpustných ve vodě pro oči (např.

mastné alkoholy nebo ketony s dlouhým řetězcem), pokud jsou mísitelné alespoň s jedním ze tří výše uvedených navrhovaných rozpouštědel (4).

11. Termín „zkoušená chemická látka“ se v této zkušební metodě používá k označení toho, co se zkouší¹, a netýká se použitelnosti zkušební metody STE ke zkoušení látek a/nebo směsí.

PRINCIP ZKOUŠKY

12. Zkušební metoda STE je zkouška *in vitro* založená na cytotoxicitě, která se provádí na konfluentní monovrstvě buněk rohovky králíka (Statens Seruminstitut Rabbit Cornea – SIRC), které se kultivují na 96jamkové polykarbonátové mikrotitrační destičce (4). Po pětiminutové expozici zkoušené chemické látky se pomocí zkoušky MTT kvantitativně změří cytotoxicita jako relativní životaschopnost buněk SIRC (4). Snížená životaschopnost buněk se použije na predikci potenciálních nežádoucích účinků vedoucích k poškození oka.
13. Bylo hlášeno, že 80 % roztoku nakapaného do oka králíka se vyloučí přes spojivkový vak do tří až čtyř minut, zatímco více než 80 % roztoku nakapaného do lidského oka se vyloučí do jedné až dvou minut (10). Zkušební metoda STE se pokouší aproximovat tyto doby expozice a využít cytotoxicitu jako sledovanou vlastnost pro posouzení rozsahu poškození buněk SIRC po pětiminutové expozici zkoušené chemické látky.

PROKÁZÁNÍ ZPŮSOBILOSTI

14. Dříve, než začnou laboratoře rutinně používat zkoušku STE popsanou v této zkušební metodě, měly by prokázat svou odbornou způsobilost správným určením klasifikace jedenácti vhodných látek doporučených v tabulce 1. Tyto látky byly vybrány tak, aby představovaly celý rozsah odpovědí u závažného poškození očí nebo podráždění očí na základě výsledků oční zkoušky *in vivo* na králících (TG 405) a klasifikačního systému GHS OSN (1). Dalšími kritérii výběru bylo, aby látky byly komerčně dostupné, aby k nim byly k dispozici kvalitní referenční údaje *in vivo* a aby existovaly kvalitní údaje *in vitro* ze zkoušky STE (3). V situacích, kdy některá z uvedených látek

¹ V červnu 2013 bylo na společné schůzi dohodnuto, že nyní by měl být v nových a aktualizovaných zkušebních metodách používán výraz „zkoušená chemická látka“ popisující to, co se zkouší, jednodušeji.

není k dispozici, lze v odůvodněných případech použít jinou látku, u níž jsou k dispozici odpovídající referenční údaje o použití *in vivo* a *in vitro*, pokud budou použita stejná kritéria jako kritéria zde popsána.

Tabulka 1: Seznam vhodných látek

Látka	CASRN	Třída chemických látek ¹	Skupenství	Kat. GHS OSN/CLP <i>in vivo</i> ²	Rozpouštědlo ve zkoušce STE	Kat. GHS OSN/CLP
benzalkoniumchlorid (10%, vodný)	8001-54-5	oniová sloučenina	kapalina	kategorie 1	fyzilogický roztok	kategorie 1
triton X-100 (100%)	9002-93-1	ether	kapalina	kategorie 1	fyzilogický roztok	kategorie 1
kyselá červeň 92	18472-87-2	heterocyklická sloučenina; sloučenina bromu; sloučenina chloru	pevná látka	kategorie 1	fyzilogický roztok	kategorie 1
hydroxid sodný	1310-73-2	zásada; anorganická chemická látka	pevná látka	kategorie 1 ³	fyzilogický roztok	kategorie 1
butyrolakton	96-48-0	lakton; heterocyklická sloučenina	kapalina	kategorie 2A (kategorie 2 v CLP)	fyzilogický roztok	nelze předpovědět
oktan-1-ol	111-87-5	alkohol	kapalina	kategorie 2A/B ⁴ (kategorie 2 v CLP)	minerální olej	nelze předpovědět
cyklopentanol	96-41-3	alkohol; uhlovodík, cyklický	kapalina	kategorie 2A/B ⁵ (kategorie 2 v CLP)	fyzilogický roztok	nelze předpovědět
2-ethoxyethyl-acetát	111-15-9	alkohol; ether	kapalina	bez kategorie	fyzilogický roztok	bez kategorie
dodekan	112-40-3	uhlovodík, acyklický	kapalina	bez kategorie	minerální olej	bez kategorie
methyl(isobutyl)keton	108-10-1	keton	kapalina	bez kategorie	minerální olej	bez kategorie
n,n-dimethylguanidin-sulfát	598-65-2	amidin; sloučenina síry	pevná látka	bez kategorie	fyzilogický roztok	bez kategorie

Zkratky: CAS RN = registrační číslo CAS (Chemical Abstracts Service)

¹Chemické třídy byly přiřazeny s použitím informací získaných z předchozích publikací NICEATM, a pokud tyto informace nebyly k dispozici, s použitím klasifikačního systému Národní knihovny názvů léků a léčivých látek (MeSH®) (přes ChemIDplus® [National Library of Medicine], k dispozici na <http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/>), přičemž určení

struktury bylo provedeno podle NICEATM.

²Na základě výsledků zkoušky na oku králíka *in vivo* (Pokyn OECD (TG) č. 405) a s použitím GHS OSN/CLP (1).

³Klasifikace jako kategorie 1 vychází z potenciálních leptavých účinků na kůži 100% hydroxidu sodného (uvedeného na seznamu pokynu OECD TG 435 jako vhodná chemická látka s potenciálními leptavými účinky pro kůži) a z kritéria pro kategorii 1 podle GHS OSN/CLP (1).

⁴Klasifikace 2A nebo 2B závisí na interpretaci kritéria GHS OSN pro rozlišování mezi těmito dvěma kategoriemi, tj. pro stanovení klasifikace v kategorii 2A jsou nutné 2 ze 6 oproti 4 ze 6 zvířat s účinky v den 7. Datový soubor *in vivo* zahrnoval 2 studie po 3 zvířatech. V jedné studii vykazovala dvě ze tří zvířat účinky v den 7, což si vyžádalo klasifikaci jako kat. 2A (11), zatímco ve druhé studii se všechny sledované vlastnosti u všech tří zvířat vrátily do dne 7 na skóre nula, což odpovídá klasifikaci 2B (12).

⁵Klasifikace 2A nebo 2B závisí na interpretaci kritéria GHS OSN pro rozlišování mezi těmito dvěma kategoriemi, tj. pro stanovení klasifikace v kategorii 2A jsou nutné 1 ze 3 oproti 2 ze 3 zvířat s účinky v den 7. Studie *in vivo* byla provedena na 3 zvířatech. Všechny sledované vlastnosti kromě zákalu rohovky a zčervenání spojivek u jednoho zvířete se ke dni 7 nebo dříve vrátily zpět na nulovou hodnotu. Toto jedno zvíře, které se ke dni 7 zcela neuzdravilo, mělo skóre zákalu rohovky 1 a skóre zčervenání spojivek 1 (v den 7) a plně se uzdravilo v den 14 (11).

POSTUP

Příprava monovrstvy buněk

15. Zkušební metoda STE se používá s buněčnou linií z rohovky králíka SIRC. Doporučuje se, aby byly buňky SIRC pořízeny z kvalifikované buněčné banky, jako je například Americká sbírka typových kultur CCL60.
16. Buňky SIRC se kultivují při teplotě 37 °C ve zvlhčené atmosféře s 5% CO₂ v kultivační lahvi obsahující kultivační médium, které sestává z Eaglova minimálního esenciálního média (MEM) doplněného 10 % fetálního bovinního séra (FBS), 2 mM L-glutaminu, 50–100 jednotkami/ml penicilinu a 50–100 µg/ml streptomycinu. Buňky, které v kultivační lahvi splynuly, je třeba rozdělit pomocí roztoku trypsinu a kyseliny ethylendiamintetraoctové, s použitím nebo bez použití stěrky. Před použitím k rutinním zkouškám se buňky nechají rozmnožit (např. 2 až 3 pasáže) v kultivační lahvi, přičemž by neměly být pasážovány více než 25krát od rozmrazení.
17. Buňky připravené k použití ke zkoušce STE se poté upraví na vhodnou hustotu a nasadí do 96jamkových destiček. Doporučená hustota nasazování buněk je $6,0 \times 10^3$ buněk na jamku, když jsou buňky používány čtyři dny po nasazení, nebo $3,0 \times 10^3$ buněk na jamku, když jsou buňky používány pět dnů po nasazení, v 200 µl kultivačního média. Buňky použité ke zkoušce STE, které jsou nasazeny do kultivačního média ve vhodné hustotě, dosáhnou konfluence v době zkoušení více než 80 %, tj. čtyři nebo pět dnů od nasazení.

Aplikace zkoušených chemických látek a kontrolních látek

18. Rozpouštědlem první volby pro ředění nebo rozpuštění chemických látek je fyziologický roztok. Jestliže zkoušená chemická látka vykazuje nízkou rozpustnost nebo ji nelze rozpustit či rovnoměrně suspendovat po dobu alespoň pěti minut ve fyziologickém roztoku, použije se jako rozpouštědlo druhé volby 5% DMSO (CAS#67-68-5) ve fyziologickém roztoku. Pro zkoušené chemické látky, které nelze rozpustit či rovnoměrně suspendovat po dobu alespoň pěti minut ve fyziologickém roztoku ani v 5% DMSO ve fyziologickém roztoku, se jako rozpouštědlo třetí volby použije minerální olej (CAS#8042-47-5).
19. Zkoušené chemické látky se rozpustí nebo rovnoměrně suspendují ve zvoleném rozpouštědle na koncentraci 5 % (hmotnostních) a poté se dále ředí postupným desetinásobným ředěním na koncentraci 0,5 % a 0,05 %. Každá zkoušená chemická látka se zkouší v koncentraci 5 % i 0,05 %. Buňky kultivované v 96jamkové mikrotitrační destičce se exponují roztoku (nebo suspenzi) zkoušené chemické látky v množství 200 µl/jamku v koncentraci 5 % nebo 0,05 %, a to po dobu pěti minut při pokojové teplotě. Zkoušené chemické látky (jednosložkové látky nebo vícesložkové látky či směsi) se považují za čisté látky a ředí se nebo suspendují podle této metody bez ohledu na čistotu.
20. Kultivační médium popsané v odstavci 16 se používá jako kontrola s médiem na každé destičce a při každém opakování. Kromě toho se na každé destičce a při každém opakování buňky exponují také vzorkům kontroly s rozpouštědlem. Bylo potvrzeno, že rozpouštědla uvedená v odstavci 18 nemají žádné nežádoucí účinky na životaschopnost buněk SIRC.
21. Ve zkušební metodě STE se na každé destičce a při každém opakování používá jako pozitivní kontrola 0,01% laurylsíran sodný (SLS) ve fyziologickém roztoku. Aby bylo možné vypočítat životaschopnost buněk u pozitivní kontroly, musí každá destička při každém opakování zahrnovat také kontrolu s rozpouštědlem ve fyziologickém roztoku.
22. Aby bylo možné stanovit kompenzaci pro optickou hustotu, je třeba provést slepou zkoušku, přičemž tato slepá zkouška se provádí na jamkách obsahujících pouze fosfátový pufr, ale žádné kalcium a magnézium (PBS-) nebo buňky.
23. Každý vzorek (zkoušená chemická látka v koncentraci 5 % a 0,05 %, kontrola s médiem, kontrola s rozpouštědlem a pozitivní kontrola) je třeba zkoušet při každém opakování třikrát exponováním buněk 200 µl příslušné zkoušené nebo kontrolní látky po dobu pěti minut při pokojové teplotě.

24. Srovnávací látky jsou účelné pro hodnocení potenciálu podráždění očí neznámými chemickými látkami nebo specifickými třídami chemických látek nebo produktů nebo pro hodnocení relativního potenciálu podráždění látkou s dráždivými účinky na oči ve specifickém rozmezí dráždivých reakcí.

Měření životaschopnosti buněk

25. Po expozici se buňky dvakrát promyjí 200 μ l PBS a přidá se 200 μ l roztoku MTT (0,5 mg MTT/ml kultivačního média). Po dvouhodinové reakční době v inkubátoru (37 °C, 5 % CO₂) se roztok MTT dekantuje, formazan MTT se extrahuje přidáním 200 μ l 0,04 N kyseliny chlorovodíkové v isopropanolu po dobu 60 minut v temnu při pokojové teplotě a pomocí čtečky destiček se změří absorbance roztoku formazanu MTT při 570 nm. K interferenci zkoušených chemických látek s analýzou MTT (barvivy nebo přímými redukčními činidly MTT) dochází pouze, když se ve zkušebním systému ponechá po oplachu po expozici významné množství zkoušené chemické látky, což platí pro 3D tkáň rekonstruované lidské rohovky nebo rekonstruované lidské epidermis, ale neplatí pro 2D buněčné kultury používané pro zkušební metodu STE.
26. Poté se použijí hodnoty optické hustoty (OD) dosažené pro každou zkoušenou chemickou látku k výpočtu relativní životaschopnosti buněk vzhledem ke kontrole s rozpouštědlem, která je stanovena na úroveň 100 %. Relativní životaschopnost buněk se vyjadřuje jako procento a zjistí se vydělením optické hustoty zkoušené chemické látky optickou hustotou kontroly s rozpouštědlem po odečtení optické hustoty slepého pokusu od obou hodnot.

Životaschopnost buněk (%)

$$= \frac{(OD_{570} \text{ zkoušené látky}) - (OD_{570} \text{ slepého pokusu})}{(OD_{570} \text{ kontroly s rozpouštědlem}) - (OD_{570} \text{ slepého pokusu})} \times 100$$

Podobně se relativní životaschopnost buněk každé kontroly s rozpouštědlem vyjadřuje jako procento a zjistí se vydělením optické hustoty každé kontroly s rozpouštědlem optickou hustotou kontroly s médiem po odečtení optické hustoty slepého pokusu od obou hodnot.

27. Měla by být provedena tři nezávislá opakování, přičemž každé zahrnuje tři replikované jamky (tj. n = 9). Aritmetický průměr tří jamek pro každou zkoušenou chemickou látku a kontrolu s rozpouštědlem při každém nezávislém opakování se použije pro výpočet aritmetického průměru relativní životaschopnosti buněk. Ze tří nezávislých opakování se vypočítá konečný aritmetický průměr životaschopnosti buněk.

28. Dále jsou uvedeny hraniční hodnoty životaschopnosti buněk pro identifikaci zkoušených chemických látek vyvolávajících vážné poškození očí (kategorie 1 GHS OSN/CLP) a zkoušených chemických látek, které není nutné klasifikovat jako látky mající dráždivé účinky na oči nebo vyvolávající vážné poškození očí (bez kategorie GHS OSN/CLP).

Tabulka 2: Prediktivní model zkušební metody STE

Životaschopnost buněk		Klasifikace GHS OSN/CLP	Použitelnost
při 5 %	při 0,05 %		
> 70 %	> 70 %	bez kategorie	látky a směsi, s výjimkou: i) vysoce těkavých látek s tlakem výparů nad 6 kPa ¹ a ii) pevných chemických látek (látek a směsí) jiných než povrchově aktivních látek a směsí složených pouze z povrchově aktivních látek
≤ 70 %	> 70%	nelze předpovědět	nepoužije se
≤ 70 %	≤ 70 %	kategorie 1	látky a směsi ²

¹ Směsi obsahující látky s tlakem výparů vyšším než 6 kPa by měly být hodnoceny opatrně, aby nedošlo k případnému podcenění, přičemž každý případ by měl být individuálně odůvodněn.

² Na základě výsledků získaných zejména ze zkoušek jednosložkových látek, ačkoli omezené údaje existují i o zkoušení směsí. Zkušební metoda je nicméně technicky použitelná i na zkoušení vícesložkových látek a směsí. Před použitím této zkušební metody ke zkoušení směsí za účelem získání údajů pro zamýšlené použití v právních předpisech by mělo být zváženo, zda tato metoda může pro tento účel poskytnout přiměřené výsledky, a pokud ano, proč je tomu tak. Takové úvahy nejsou nutné, pokud existuje právní požadavek na zkoušení dané směsi.

Kritéria přijatelnosti

29. Výsledky zkoušky se považují za přijatelné, když jsou splněna všechna následující kritéria:

- Optická hustota kontroly s médiem (exponované kultivačnímu médiu) by měla být po odečtení optické hustoty slepého pokusu 0,3 nebo vyšší.
- Životaschopnost kontroly s rozpouštědlem by měla být 80 % nebo vyšší ve vztahu ke kontrole s médiem. Pokud se při každém opakování používají kontroly s více rozpouštědly, každá z těchto kontrol by měla vykazovat životaschopnost buněk větší než 80 %, aby byly vhodné pro chemické látky zkoušené těmito rozpouštědly.
- Životaschopnost buněk zjištěná při pozitivní kontrole (0,01 % SLS) by měla být mezi dvěma směrodatnými odchylkami od historické střední hodnoty. Horní a dolní mez

přijatelnosti pro pozitivní kontrolu je třeba často aktualizovat, tj. každé tři měsíce nebo pokaždé, když se přijatelná zkouška vykonává v laboratořích, kde se zkoušky nedělají často (tj. méně než jednou měsíčně). Pokud laboratoř neprovedla dostatečný počet experimentů, aby mohla stanovit statisticky robustní distribuci pozitivních kontrol, je přijatelné, aby byla použita horní a dolní mez přijatelnosti stanovená subjektem, který metodu vyvinul, tj. mezi 21,1 % a 62,3 % podle historických dat laboratoře, přičemž v průběhu prvních rutinních zkoušek se stanoví interní distribuce.

- d) Směrodatná odchylka konečné životaschopnosti buněk odvozená ze tří nezávislých opakování by měla být menší než 15 % pro koncentraci 5 % i 0,05 % zkoušené chemické látky.

Není-li jedno nebo několik těchto kritérií splněno, měly by se výsledky zlikvidovat a provést další tři nezávislá opakování.

ÚDAJE A PŘEDKLÁDÁNÍ ZPRÁV

Údaje

30. Vykazují se údaje za každou jednotlivou jamku (např. hodnoty životaschopnosti buněk) z každého opakování, jakož i celková střední hodnota, směrodatná odchylka a klasifikace.

Závěrečná zpráva

31. Závěrečná zpráva by měla obsahovat tyto informace:

Zkoušené chemické látky a látky pro kontrolu

- Jednosložková látka: chemická identifikace, např. název (názvy) IUPAC nebo CAS, registrační číslo (čísla) CAS, kód SMILES nebo InChI, strukturní vzorec a/nebo jiné identifikátory,
- vícesložková látka, UVCB a směs: charakterizovaná v co možná největší míře např. chemickou identitou (viz výše), čistotou, kvantitativním výskytem a důležitými fyzikálně-chemickými vlastnostmi (viz výše) složek, v rozsahu, v jakém jsou tyto informace dostupné,
- skupenství, těkavost, pH, logP, molekulová hmotnost, chemická třída a další důležité fyzikálně-chemické vlastnosti podstatné pro provedení studie, a to v rozsahu, v jakém jsou tyto informace dostupné,
- čistota, případně chemická identita nečistot, je-li to prakticky proveditelné atd.,
- případné ošetření před zkoušením (např. zahřívání, mletí),

- podmínky skladování a stabilita, v rozsahu, v jakém jsou tyto informace dostupné.

Podmínky a postupy zkušební metody

- Jméno a adresa zadavatele, zkušebního zařízení a vedoucího studie,
- popis použité zkušební metody,
- použitá buněčná linie, její zdroj, počet pasáží a konfluence buněk použitých ke zkoušení,
- podrobnosti o použitém zkušebním postupu,
- počet opakování a použitých replik,
- koncentrace zkoušených chemických látek (pokud se liší od doporučených),
- zdůvodnění volby rozpouštědla pro každou zkoušenou chemickou látku,
- délka expozice zkoušené chemické látky (pokud se liší od doporučené),
- popis všech úprav zkušebního postupu,
- popis použitých hodnotících kritérií a kritérií rozhodování,
- odkaz na dosavadní střední hodnoty pozitivních kontrol a směrodatnou odchylku (SD):
- prokázání způsobilosti laboratoře k provádění této zkušební metody (např. zkoušením vhodných látek) nebo prokázání reprodukovatelného provedení této zkušební metody v průběhu doby.

Výsledky

- Pro každou zkoušenou chemickou látku a kontrolní látku a pro každou zkoušenou koncentraci je třeba v tabulkové formě uvést jednotlivé hodnoty optické hustoty každé replikované jamky, aritmetický průměr hodnot optické hustoty pro každé nezávislé opakování, % životaschopnosti buněk pro každé nezávislé opakování a konečný aritmetický průměr % životaschopnosti buněk a směrodatnou odchylku ze tří opakování,
- výsledky z kontroly s médiem, kontroly s rozpouštědlem a pozitivní kontroly prokazující vhodná kritéria přijatelnosti studie,
- popis ostatních pozorovaných účinků,
- celková odvozená klasifikace s odkazem na použitý predikční model / kritéria rozhodování.

Diskuse o výsledcích

Závěry

LITERATURA

- (1) United Nations UN (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Fifth revised edition. New York & Geneva: United Nations Publications. ISBN: 978-92-1-117006-1. Dostupné na webových stránkách: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html.
- (2) Scott L, *et al.* (2010). A proposed Eye Irritation Testing Strategy to Reduce and Replace *in vivo* Studies Using Bottom-Up and Top-Down Approaches. *Toxicol. Chem. In Vitro* 24, 1-9.
- (3) Mosmann T. (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to 7 Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J. Immunol. Methods* 65, 55-63.
- (4) Takahashi Y, *et al.* (2008). Development of the Short Time Exposure (STE) Test: an *In Vitro* Eye Irritation Test Using SIRC Cells. *Toxicol. Chem. In Vitro* 22, 760-770.
- (5) Sakaguchi H, *et al.* (2011). Validation Study of the Short Time Exposure (STE) Test to Assess the Eye Irritation Potential of Chemicals. *Toxicol. Chem. In Vitro* 25, 796-809.
- (6) Kojima H, *et al.* (2013). Second-Phase Validation of Short Time Exposure Tests for Assessment of Eye Irritation Potency of Chemicals. *Toxicol. Chem. In Vitro* 27, pp.1855-1869.
- (7) ICCVAM (2013). Short Time Exposure (STE) Test Method Summary Review Document, NIH. Dostupné na webových stránkách: [http://www.ntp.niehs.nih.gov/iccvam/docs/ocutox_docs/STE-SRD-NICEATM-508.pdf].
- (8) Kapitola B.5 této přílohy: Akutní dráždivé/leptavé účinky na oči.
- (9) Saito K, *et al.* (2015). Predictive Performance of the Short Time Exposure Test for Identifying Eye Irritation Potential of Chemical Mixtures.
- (10) Mikkelsen TJ, Chrai SS and Robinson JR. (1973). Altered Bioavailability of Drugs in the Eye Due to Drug-Protein Interaction. *J. Pharm. Sci.* 1648-1653.

- (11) ECETOC (1998). Eye Irritation Reference Chemicals Data Bank. Technical Report (No 48. (2)), Brussels, Belgium.
- (12) Gautheron P, *et al.* (1992). Bovine Corneal Opacity and Permeability Test: an *In Vitro* Assay of Ocular Irritancy. *Fundam Appl Toxicol.* 18, 442-449.
- (13) OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 34). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (14) OECD (2017). Guidance Document on an Integrated Approaches on Testing and Assessment for Serious Eye Damage and Eye irritation. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 263). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

Dodatek

DEFINICE

Přesnost: Přesnost shody mezi výsledky zkušební metody a přijatými referenčními hodnotami. Je to míra funkčnosti zkušební metody a jeden z aspektů její relevantnosti. Tento pojem se často používá místo pojmu soulad a rozumí se jím podíl správných výsledků zkušební metody (13).

Srovnávací látka: Látka použitá jako norma pro srovnání se zkoušenou látkou. Srovnávací látka by měla mít tyto vlastnosti: i) nesporný a spolehlivý zdroj (nesporné a spolehlivé zdroje); ii) strukturální a funkční podobnost s třídou zkoušených látek; iii) známé fyzikální/chemické vlastnosti; iv) podpůrné údaje o známých účincích; a v) známou sílu v rozsahu žádoucí reakce.

Přístup „zdola nahoru“: Přístup zkoušení po krocích používaný u zkoušené chemické látky, u níž se předpokládá, že ji není nutné klasifikovat jako látku mající dráždivé účinky na oči nebo vyvolávající vážné poškození očí, který začíná odlišením chemických látek, u nichž není nutná klasifikace (negativní výsledek), od ostatních chemických látek (pozitivní výsledek).

Chemická látka: Látka nebo směs.

Podráždění očí: Vyvolání změny na oku po aplikaci zkoušené chemické látky na přední plochu oka, která je plně vratná do 21 dní od aplikace. Tento pojem je zaměnitelný s výrazy „vratné účinky na oko“ a kategorie 2 GHS OSN/CLP.

Míra falešné negativity: Podíl všech pozitivních chemických látek falešně zjištěných zkušební metodou jako negativní. Je to jeden z ukazatelů výsledku zkušební metody.

Míra falešné positivity: Podíl všech negativních chemických látek falešně zjištěných zkušební metodou jako pozitivní. Je to jeden z ukazatelů výsledku zkušební metody.

Nebezpečnost: Základní charakteristika látky nebo situace, která má potenciál vyvolat nepříznivé účinky, jsou-li organismus, systém nebo (sub)populace vystaveny této látce.

Kontrola s médiem: Neošetřená replika, která obsahuje všechny složky zkušebního systému. Tento vzorek se zpracovává se vzorky zkoušené chemické látky a jinými kontrolními vzorky, aby se zjistilo, zda rozpouštědlo vzájemně reaguje se zkušebním systémem.

Směs: Směs nebo roztok složený ze dvou nebo více látek.

Jednosložková látka: Látka definovaná svým kvantitativním složením, v níž je přítomna jedna hlavní složka v míře alespoň 80 % hmot.

MTT: 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difeny-2H-tetrazolium-bromid; thiazolylová modř tetrazolium-bromid.

Vícesložková látka: Látka definovaná svým kvantitativním složením, v níž je přítomna více než jedna hlavní složka v koncentraci ≥ 10 % hmot. a < 80 % hmot. Vícesložková látka je výsledkem výrobního procesu. Rozdíl mezi směsí a vícesložkovou látkou spočívá v tom, že směs se získá smísením dvou nebo více látek bez chemické reakce. Vícesložková látka je výsledkem chemické reakce.

OD: Optická hustota.

Pozitivní kontrola: Replika obsahující všechny složky zkušebního systému a látku, o níž je známo, že způsobuje pozitivní reakci. Aby se zajistilo, že proměnlivost v reakci na pozitivní kontrolu v čase bude možné vyhodnotit, rozsah pozitivní reakce by neměl být nadměrný.

Relevantnost: Popis vztahu zkoušky k účinku, který je předmětem zájmu, a také toho, zda je zkouška smysluplná a použitelná pro konkrétní účel. Vyjadřuje, do jaké míry zkouška správně měří nebo predikuje biologický účinek, který je předmětem zájmu. Relevantnost zahrnuje také posouzení přesnosti (shody) zkušební metody (10).

Spolehlivost: Měření rozsahu, v jakém může být zkušební metoda časem reprodukovatelná v laboratořích a mezi laboratořemi, když se provádí s použitím stejného protokolu. Hodnotí se to výpočtem laboratorní a mezilaboratorní reprodukovatelnosti a laboratorní opakovatelnosti (13).

Citlivost: Podíl všech pozitivních/aktivních chemických látek, které jsou na základě zkoušky správně klasifikovány. Je měřítkem přesnosti zkušební metody, která poskytuje kategorické výsledky, a je důležitým prvkem při hodnocení relevantnosti zkušební metody (10).

Vážné poškození očí: Tvorba poškození tkání v oku nebo závažné fyzikální slábnutí vidění po aplikaci zkoušené látky na přední plochu oka, které není plně vratné do 21 dní od aplikace. Tento pojem je zaměnitelný s výrazy „nevratné účinky na oči“ a kategorie 1 GHS OSN/CLP.

Kontrola s rozpouštědlem/vehikulem: Neošetřený vzorek obsahující všechny složky zkušebního systému, včetně rozpouštědla nebo vehikula, který se zpracovává s exponovanými zkoušenými chemickými látkami a jinými kontrolními vzorky, aby se zjistila základní reakce vzorků zkoušených se zkoušenou chemickou látkou rozpuštěnou ve stejném rozpouštědle nebo vehikulu. Pokud se vzorek zkouší souběžnou kontrolou s médiem, ukazuje také, zda rozpouštědlo nebo vehikulum vzájemně reaguje se zkušebním systémem.

Specifičnost: Podíl všech negativních/neaktivních chemických látek, které jsou na základě zkušební metody správně klasifikovány. Je měřítkem přesnosti zkušební metody, která poskytuje kategorické výsledky, a je důležitým prvkem při hodnocení relevantnosti zkušební metody (13).

Látka: Chemický prvek a jeho sloučeniny v přírodním stavu nebo získané výrobním postupem, včetně jakýchkoliv aditiv potřebných pro zachování stability výrobku a všech nečistot pocházejících z použitého postupu, ale s vyloučením všech rozpouštědel, která je možno oddělit bez ovlivnění stability dané látky nebo změny jejího složení.

Smáčedlo: Nazývané též povrchově aktivní látka, je to chemická látka, jako např. detergent, která je schopna snížit povrchové napětí kapaliny a umožnit jí vytvářet pěnu nebo pronikat do pevných látek; je též známa jako surfaktant.

Zkoušená chemická látka: Jakákoli látka nebo směs zkoušená pomocí této zkušební metody.

Strategie stupňovitého zkoušení: Strategie postupného zkoušení, kde se všechny existující informace o zkoušené chemické látce přezkoumávají ve stanoveném pořadí s použitím postupu váhy důkazů na každém stupni, aby se zjistilo, zda je k dispozici dost informací pro rozhodnutí o klasifikaci nebezpečnosti, než se postoupí do dalšího stupně. Pokud potenciál dráždivých účinků zkoušené chemické látky lze určit na základě existujících informací, další zkoušení není nutné. Jestliže potenciál dráždivých účinků zkoušené látky nelze určit na základě existujících informací, použije se stupňovitý postupný postup zkoušení na zvířatech po krocích, dokud se nestanoví jednoznačná klasifikace.

Přístup „shora dolů“: Přístup zkoušení po krocích používaný u zkoušených chemických látek, u nichž se předpokládá, že způsobují vážné poškození očí, který začíná odlišením chemických látek vyvolávajících vážné poškození očí (pozitivní výsledek) od jiných chemických látek (negativní výsledek).

Globálně harmonizovaný systém klasifikace a označování chemických látek Organizace spojených národů (GHS OSN): Systém navrhuje klasifikaci látek a směsí podle standardizovaných typů a úrovní fyzikálních, zdravotních a environmentálních nebezpečí a řeší příslušné komunikační prvky, jako jsou piktogramy, signální slova, výroky o nebezpečí, výroky o bezpečnostních opatřeních a bezpečnostní datové listy, které obsahují informace o jejich nežádoucích účincích s ohledem na ochranu lidí (včetně zaměstnavatelů, pracovníků, přepraveců, spotřebitelů a osob reagujících na havárie) a životního prostředí (1).

Kategorie 1 GHS OSN/CLP: Viz „vážné poškození očí“.

Kategorie 2 GHS OSN/CLP: Viz „dráždivé účinky na oči“.

Bez kategorie GHS OSN/CLP: Chemické látky, které nesplňují požadavky na klasifikaci v kategorii 1 nebo 2 GHS OSN/CLP (nebo 2A nebo 2B GHS OSN).

UVCB: látky s neznámým nebo proměnlivým složením, komplexní reakční produkty nebo biologický materiál.

B.69 ZKUŠEBNÍ METODA S POUŽITÍM REKONSTRUOVANÉHO EPITELU PODOBNÉHO LIDSKÉ ROHOVCE (RhCE) PRO STANOVENÍ CHEMICKÝCH LÁTEK, KTERÉ NEVYŽADUJÍ KLASIFIKACI A OZNAČENÍ JAKO LÁTKY MAJÍCÍ DRÁŽDIVÉ ÚČINKY NA OČI NEBO VYVOLÁVAJÍCÍ VÁŽNÉ POŠKOZENÍ OČÍ

ÚVOD

1. Tato zkušební metoda je rovnocenná Pokynu OECD pro zkoušení (TG) č. 492 (2017). *Vážné poškození očí* znamená vznik poškození tkáně oka nebo závažné zhoršení zraku po aplikaci zkoušené chemické látky na přední plochu oka, které není plně vratné do 21 dnů po aplikaci, jak je definováno v globálně harmonizovaném systému klasifikace a označování chemických látek (GHS) OSN (1) a v nařízení Evropského unie (EU) č. 1272/2008 o klasifikaci, označování a balení látek a směsí (CLP)¹. Rovněž podle GHS OSN a CLP znamená *podráždění očí* vznik změn na oku po aplikaci zkoušené chemické látky na přední plochu oka, které jsou plně vratné do 21 dní od aplikace. Zkoušené chemické látky vyvolávající vážné poškození oka jsou klasifikovány jako látky kategorie 1 GHS OSN a CLP, zatímco zkoušené chemické látky vyvolávající podráždění oka jsou klasifikovány jako kategorie 2 GHS OSN a CLP. Zkoušené chemické látky, které nejsou klasifikovány jako látky mající dráždivé účinky na oči nebo vyvolávající vážné poškození očí, jsou definovány jako chemické látky, které nesplňují požadavky pro klasifikaci v kategorii 1 nebo 2 (2A nebo 2B) GHS OSN a CLP, tj. označují se jako chemické látky bez kategorie GHS OSN a CLP.
2. Posuzování vážného poškození oka / podráždění oka bylo obvykle prováděno na pokusných zvířatech (zkušební metoda B.5 (2)). Výběr nejvhodnější zkušební metody a její použití je třeba posuzovat v souvislosti s Pokynem OECD k integrovanému přístupu ke zkoušení a posuzování vážného poškození očí a podráždění očí (39).
3. Tato zkušební metoda popisuje postup *in vitro*, který umožňuje určení chemických látek (látek a směsí), které nevyžadují klasifikaci a označení jako látky vyvolávající

¹ Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1272/2008 ze dne 16. prosince 2008 o klasifikaci, označování a balení látek a směsí, o změně a zrušení směrnic 67/548/EHS a 1999/45/ES a o změně nařízení (ES) č. 1907/2006, Úř. věst. L 353, 31.12.2008, s. 1..

podráždění oka nebo vážné poškození oka podle systému GHS OSN a nařízení CLP. Využívá rekonstruovaného epitelu podobného lidské rohovce (RhCE), který věrně napodobuje histologické, morfologické, biochemické a fyziologické vlastnosti epitelu lidské rohovky. Byly validovány čtyři další zkušební metody *in vitro*, které jsou považovány za vědecky platné a byly přijaty jako zkušební metody B.47 (3), B.48 (4), B.61 (5) a B.68 (6) pro zkoumání účinků na lidské zdraví, a to vážného poškození oka / podráždění oka.

4. Tato zkušební metoda zahrnuje dvě validované zkoušky využívající komerčně dostupné modely RhCE. Validační studie k posouzení podráždění oka / vážného poškození oka byly provedeny (7)(8)(9)(10)(11)(12)(13) s použitím zkoušek na podráždění oka (EIT) EpiOcular™ a SkinEthic™ Human Corneal Epithelium (HCE). Každá z těchto zkoušek, které se v dalším textu nazývají validované referenční metody – VRM 1 respektive VRM2, využívá jako zkušební systém komerčně dostupné tkáňové konstrukce RhCE. Na základě těchto validačních studií a jejich nezávislého vzájemného hodnocení (9)(12) byl vyvozen závěr, že zkoušky na podráždění oka EpiOcular™ EIT a SkinEthic™ HCE dokážou správně určit chemické látky (látky i směsi), které nevyžadují klasifikaci a označení jako látky vyvolávající podráždění oka nebo vážné poškození oka podle GHS OSN, a tyto zkoušky byly doporučeny jako vědecky platné pro tento účel (13).
5. V současnosti se obecně uznává, že v dohledné budoucnosti nebude moci žádný alternativní test *in vitro* plně nahradit Draizeovu oční zkoušku *in vivo* (2)(14), pokud jde o předpověď celé škály závažného poškození očí/dráždivosti u různých tříd chemických látek. Draizeova oční zkouška (15) by však mohla být zcela nahrazena strategickými kombinacemi několika alternativních zkušebních metod v rámci strategií (odstupňovaného) zkoušení, jako je přístup zdola nahoru / shora dolů. Postup „zdola nahoru“ (15) má být použit, pokud se na základě existujících informací očekává, že chemická látka nevyvolává tak intenzivní podráždění oka, aby vyžadovala klasifikaci, zatímco postup „shora dolů“ (15) se má použít, jestliže se na základě existujících informací předpokládá, že chemická látka vyvolává závažné poškození oka. Zkoušky na podráždění oka EpiOcular™ EIT a SkinEthic™ HCE se doporučují použít k identifikaci chemických látek, které není nutné klasifikovat jako látky mající dráždivé účinky na oči nebo vyvolávající vážné poškození očí podle systému GHS OSN (bez kategorie), bez dalšího zkoušení, a to v rámci strategie zkoušení, jako je přístup zdola nahoru, jak navrhuje Scott *et al.*, například jako první krok v přístupu zdola nahoru nebo jako jeden z posledních kroků v přístupu shora dolů (15). Zkoušky na podráždění oka EpiOcular™ EIT a SkinEthic™ HCE však nejsou určeny pro rozlišení látek kategorie 1 GHS OS/CLP (vážné poškození oka) od

látek kategorie 2 GHS OS/CLP (podráždění oka). Toto rozlišení bude třeba řešit dalším stupněm strategie zkoušení (15). Zkoušená chemická látka, která je pomocí zkoušek na podráždění oka EpiOcular™ EIT nebo SkinEthic™ HCE určena jako látka vyžadující klasifikaci z důvodu podráždění oka / vážného poškození oka, tedy bude vyžadovat další zkoušení (*in vitro* anebo *in vivo*), aby bylo možné stanovit konečný závěr (bez kategorie, kategorie 2 nebo kategorie 1 GHS OSN/CLP), a to pomocí např. zkušební metody B.47, B.48, B.61 nebo B.68.

6. Účelem této zkušební metody je popsat postup používaný k hodnocení potenciálních nebezpečných účinků zkoušené chemické látky na oči podle její schopnosti vyvolávat toxicitu v tkáňové konstrukci RhCE, měřenou analýzou MTT (16) (viz odstavec 21). Životaschopnost tkáně RhCE po expozici zkoušené chemické látky se určuje porovnáním s tkáněmi ošetřenými negativní kontrolní látkou (% životaschopnosti) a poté se používá k predikci potenciální nebezpečnosti zkoušené chemické látky pro oko.
7. K dispozici jsou standardy funkčnosti (17), které usnadní validaci nových nebo pozměněných zkoušek *in vitro* využívajících RhCE, obdobných zkouškám na podráždění oka EpiOcular™ EIT a SkinEthic™ HCE, v souladu se zásadami pokynu OECD č. 34 (18), a které umožní včas provést změnu pokynu OECD pro zkoušení č. 492, aby do něj mohly být zahrnuty. Vzájemné uznávání údajů bude podle postupu dohodnutého v rámci OECD zaručeno pouze u zkušebních metod validovaných podle těchto standardů funkčnosti, pokud tyto zkoušky byly podrobeny revizi a pokud je OECD zahrnula do odpovídajícího pokynu ke zkoušení.

DEFINICE

8. Definice jsou uvedeny v dodatku 1.

VÝCHOZÍ ÚVAHY A OMEZENÍ

9. Tato zkušební metoda vychází z komerčních trojrozměrných tkáňových konstrukcí RhCE, které se vyrábějí s využitím primárních lidských epidermálních keratinocytů (tj. EpiOcular™ OCL-200), nebo imortalizovaných lidských buněk epitelu rohovky (tj. SkinEthic™ HCE/S). Tkáňové konstrukce EpiOcular™ OCL-200 a SkinEthic™ HCE/S RhCE jsou podobné trojrozměrné struktuře rohovkového epitelu *in vivo* a vyrábějí se s použitím buněk zájmových druhů (19)(20). Tyto zkoušky navíc přímo měří cytotoxicitu v důsledku průniku chemické látky přes rohovku a vznik poškození buněk a tkání; cytotoxická odpověď poté určuje celkový výsledek vážného poškození oka / podráždění oka *in vivo*. K poškození buněk může dojít několika způsoby účinku

(viz odstavec 20), ale cytotoxicita hraje důležitou, pokud ne primární, mechanistickou roli při určování celkové odpovědi na působení chemické látky ve formě poškození oka / podráždění oka, které se projevuje *in vivo* zejména zákalem rohovky, iritidou, zarudnutím spojivek anebo chemózou spojivek bez ohledu na fyzikálně chemické procesy, které jsou příčinou poškození tkáně.

10. Ve validační studii k této zkušební metodě byla zkoušena široká škála chemických látek zahrnujících nejrozličnější chemické druhy, chemické třídy, molekulové hmotnosti, logP, chemické struktury atd. Validační databáze zkoušky na podráždění oka EpiOcular™ obsahovala celkem 113 chemických látek zahrnujících 95 různých organických funkčních skupin podle analýzy OECD QSAR (8). Většina těchto chemických látek představovala jednosložkové látky, ale do studie bylo zařazeno také několik vícesložkových látek (včetně 3 homopolymerů, 5 kopolymerů a 10 kvazipolymerů). Z hlediska skupenství a kategorií GHS OSN/CLP bylo 113 zkoušených chemických látek rozděleno takto: 13 kapalin kategorie 1, 15 pevných látek kategorie 1, 6 kapalin kategorie 2A, 10 pevných látek kategorie 2A, 7 kapalin kategorie 2B, 7 pevných látek kategorie 2B, 27 kapalin bez kategorie a 28 pevných látek bez kategorie (8). Validační databáze zkoušky na podráždění oka SkinEthic™ HCE obsahovala celkem 200 chemických látek zahrnujících 165 různých organických funkčních skupin (8)(10)(11). Většina těchto chemických látek představovala jednosložkové látky, ale do studie bylo zařazeno také několik vícesložkových látek (včetně 10 polymerů). Z hlediska skupenství a kategorií GHS OSN/CLP bylo 200 zkoušených chemických látek rozděleno takto: 27 kapalin kategorie 1, 24 pevných látek kategorie 1, 19 kapalin kategorie 2A, 10 pevných látek kategorie 2A, 9 kapalin kategorie 2B, 7 pevných látek kategorie 2B, 50 kapalin bez kategorie a 53 pevných látek bez kategorie (10)(11).
11. Tato zkušební metoda je použitelná pro látky a směsi a pro pevné látky, kapaliny, polotuhé látky a vosky. Kapaliny mohou být vodné či nevodné; pevné látky mohou být ve vodě rozpustné či nerozpustné. Pevné látky by měly být pokud možno před aplikací rozemlety na jemný prášek; žádná další předběžná úprava vzorku není vyžadována. Plyny a aerosoly nebyly ve validační studii hodnoceny. Ačkoli není jejich zkoušení postupem za použití techniky RhCE teoreticky vyloučeno, současná zkušební metoda zkoušení plynů a aerosolů neumožňuje.
12. Zkoušené chemické látky absorbující světlo ve stejném pásmu jako formazan MTT (přirozeně nebo po expozici) a zkoušené chemické látky schopné přímé redukce vitálního barviva MTT (na formazan MTT) mohou interferovat s měřením životaschopnosti tkání, proto je třeba pro korekce použít upravené kontroly. Druh upravených kontrol, které mohou být potřebné, se bude lišit v závislosti na druhu

interference vyvolané zkoušenou chemickou látkou a na postupu použitým pro kvantifikaci formazanu MTT (viz odstavce 36–42).

13. Výsledky získané v předběžné validační studii (21)(22) a v plné validační studii (8)(10)(11) prokázaly, že obě zkoušky na podráždění oka EpiOcular™ EIT i SkinEthic™ HCE jsou přenosné do laboratoří, které doposud tyto analýzy neprováděly, a také že jsou reprodukovatelné v rámci laboratoře i mezi laboratořemi. Podle těchto studií je míra reprodukovatelnosti z hlediska shody předpovědí, které lze od zkoušky na podráždění oka EpiOcular™ očekávat na základě údajů o 113 chemických látkách, řádově 95 % v rámci laboratoří a 93 % mezi laboratořemi. Míra reprodukovatelnosti z hlediska shody předpovědí, které lze očekávat od zkoušky na podráždění oka SkinEthic™ HCE na základě údajů o 120 chemických látkách, je řádově 92 % v rámci laboratoří a 95 % mezi laboratořemi.
14. Zkoušku na podráždění oka EpiOcular™ lze použít k identifikaci chemických látek, které není nutné klasifikovat jako látky mající dráždivé účinky na oči nebo vyvolávající vážné poškození očí podle klasifikačního systému GHS OSN a CLP. Podle údajů získaných ve validační studii (8) má zkouška na podráždění oka EpiOcular™ celkovou přesnost 80 % (podle 112 chemických látek), citlivost 96 % (podle 57 chemických látek), míru falešné negativity 4 % (podle 57 chemických látek), specifičnost 63 % (podle 55 chemických látek) a míru falešné pozitivivity 37 % (podle 55 chemických látek) při porovnání s údaji z referenční oční zkoušky *in vivo* na králících (zkušební metoda B.5) (2)(14) klasifikovaných podle klasifikačního systému GHS OSN a CLP. Studie, v níž bylo zkoušeno 97 kapalných agrochemických přípravků ve zkoušce na podráždění oka EpiOcular™, prokázala podobnou výkonnost zkušební metody u tohoto druhu směsí, jaká byla získána ve validační studii (23). 97 přípravků bylo rozděleno takto: 21 kategorie 1, 19 kategorie 2A, 14 kategorie 2B a 43 bez kategorie, klasifikováno podle klasifikačního systému GHS OSN na základě údajů z referenční oční zkoušky *in vivo* na králících (zkušební metoda B.5) (2)(14). Byla dosažena celková přesnost 82 % (podle 97 přípravků), citlivost 91 % (podle 54 přípravků), míra falešné negativity 9 % (podle 54 přípravků), specifičnost 72 % (podle 43 přípravků) a míra falešné pozitivivity 28 % (podle 43 přípravků) (23).
15. Zkoušku na podráždění očí SkinEthic™ HCE lze použít k identifikaci chemických látek, které není nutné klasifikovat jako látky mající dráždivé účinky na oči nebo vyvolávající vážné poškození očí podle klasifikačního systému GHS OSN a CLP. Podle údajů získaných ve validační studii (10)(11) má zkouška na podráždění oka SkinEthic™ HCE celkovou přesnost 84 % (podle 200 chemických látek), citlivost 95 % (podle 97 chemických látek), míru falešné negativity 5 % (podle 97 chemických látek), specifičnost 72 % (podle 103 chemických látek) a míru falešné pozitivivity 28 %

(podle 103 chemických látek) při porovnání s údaji z referenční oční zkoušky *in vivo* na králících (zkušební metoda B.5) (2)(14) klasifikovaných podle klasifikačního systému GHS OSN a CLP.

16. Míry falešné negativy zjištěné u obou zkoušek RhCE u látek nebo směsí spadají do 12% celkové pravděpodobnosti, že chemické látky jsou při opakovaných testech v Draizově oční zkoušce *in vivo* identifikovány jako kategorie 2 podle GHS OSN a CLP nebo bez kategorie podle GHS OSN a CLP; je to způsobeno inherentní variabilitou metody v rámci zkoušky (24). Míry falešné pozitivy zjištěné u obou zkušebních metod RhCE u látek nebo směsí nejsou u této zkušební metody zásadně důležité, neboť všechny zkoušené chemické látky, které vykazují životaschopnost tkáně rovnou nebo nižší než stanovené mezní hodnoty (viz odstavec 44), budou vyžadovat další zkoušení pomocí jiných zkušebních metod *in vitro* nebo jako poslední možnost zkoušku na králících, v závislosti na požadavcích právních předpisů, s využitím strategie postupného zkoušení v rámci přístupu založeného na průkazných důkazech. Tyto zkušební metody lze použít pro všechny druhy chemických látek, přičemž negativní výsledek by měl být uznán pro neklasifikování chemické látky jako látky mající dráždivé účinky na oči a vyvolávající vážné poškození očí (bez kategorie GHS OSN a CLP). Použití zkoušek na podráždění oka EpiOcular™ a SkinEthic™ HCE podle jiných klasifikačních systémů než GHS OSN/CLP by mělo být předem konzultováno s příslušnými regulačními orgány.
17. Omezení této zkušební metody spočívá v tom, že neumožňuje rozlišit mezi podrážděním oka / vratnými účinky na oko (kategorie 2) a vážným poškozením oka / nevratnými účinky na oko (kategorie 1) podle definice GHS OSN a CLP, ani mezi látkami vyvolávajícími podráždění oka (volitelná kategorie 2A) a látkami vyvolávajícími mírné podráždění oka (volitelná kategorie 2B) podle definice GHS OSN (1). Pro tyto účely je nutné další zkoušení s použitím jiných zkušebních metod *in vitro*.
18. Termín „zkoušená chemická látka“ se v této zkušební metodě používá k označení toho, co se zkouší,¹ a netýká se použitelnosti zkušební metody RhCE ke zkoušení látek a/nebo směsí.

¹ V červnu 2013 bylo na společné schůzi OECD dohodnuto, že nyní by měl být v nových a aktualizovaných pokynech OECD ke zkoušení používán výraz „zkoušená chemická látka“ popisující to, co se zkouší, jednodušeji.

PRINCIP ZKOUŠKY

19. Zkoušená chemická látka se aplikuje lokálně na minimálně dvě trojrozměrné konstrukce tkáně RhCE a po expozici a inkubační době po ošetření se změří životaschopnost tkáně. Tkáně RhCE jsou rekonstruovány z primárních lidských epidermálních keratinocytů nebo lidských immortalizovaných buněk epitelu rohovky, které byly kultivovány po několik dnů, aby vytvořily stratifikovaný, vysoce diferencovaný dlaždicový epitel morfologicky podobný epitelu, který se nachází v lidské rohovce. Tkáňová konstrukce EpiOcular™ RhCE sestává alespoň ze 3 životaschopných vrstev buněk a nekeratinizovaného povrchu vykazujícího strukturu podobnou rohovce, která je analogická struktuře *in vivo*. Tkáňová konstrukce SkinEthic™ HCE RhCE sestává alespoň ze 4 životaschopných vrstev buněk, včetně cylindrických bazálních buněk, přechodových křídlových buněk a povrchových dlaždicových buněk, podobných buňkám normálního lidského epitelu rohovky (20) (26).
20. Chemicky vyvolané vážné poškození očí / podráždění očí, které se projevuje *in vivo* zejména zákalem rohovky, iritidou, zarudnutím spojivek anebo chemózou spojivek, je výsledkem kaskády událostí, která začíná proniknutím chemické látky přes rohovku anebo spojivku a vznikem poškození buněk. K poškození buněk může dojít několika způsoby účinku, včetně: lýzy buněčné membrány (např. působením povrchově aktivních látek, organických rozpouštědel); koagulace makromolekul (zejména bílkovin) (např. působením povrchově aktivních látek, organických rozpouštědel, alkalických látek a kyselin); saponifikace lipidů (např. působením alkalických látek); a alkylace nebo jiných kovalentních interakcí s makromolekulami (např. působením bělidel, peroxidů a alkylačních látek) (15)(27)(28). Bylo však prokázáno, že cytotoxicita hraje důležitou, pokud ne hlavní, mechanistickou roli při určování celkové odpovědi na působení chemické látky ve formě poškození oka / podráždění oka bez ohledu na fyzikálně chemické procesy, které jsou příčinou poškození tkáně (29)(30). Kromě toho potenciál chemické látky vyvolat vážné poškození oka / podráždění oka je v zásadě určen rozsahem počátečního poranění (31), které koreluje s rozsahem odumření buněk (29) a s rozsahem následných odpovědí a konečných výsledků (32). Slabě dráždivé látky tak obvykle zasáhnou pouze povrchový epitel rohovky, mírně a středně dráždivé látky poškozují zásadně epitel a povrchové vrstvy stromatu a silně dráždivé látky poškozují epitel, hluboké vrstvy stromatu a někdy i endotel rohovky (30)(33). Měření životaschopnosti tkáňové konstrukce RhCE po lokální expozici zkoušené chemické látky za účelem určení chemických látek, které nevyžadují klasifikaci jako látky vyvolávající vážné poškození oka / podráždění oka (bez kategorie podle GHS OSN a CLP), vychází z předpokladu, že všechny chemické

látky vyvolávající vážné poškození oka nebo podráždění oka vyvolají cytotoxicitu v epitelu rohovky anebo ve spojivce.

21. Životaschopnost tkáně RhCE se klasicky měří enzymatickou přeměnou vitálního barviva MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyl-2H-tetrazolium-bromid; thiazolylová modř tetrazolium-bromid; číslo CAS 298–93-1] vitálními buňkami tkáně na sůl modrého formazanu MTT, jehož množství se změří po extrakci z tkání (16). Chemické látky, které nevyžadují klasifikaci a označení podle GHS OSN / CLP (bez kategorie), se určují jako látky, které nesnižují životaschopnost tkáně pod stanovenou mez (tj. životaschopnost tkáně > 60 % ve zkouškách EpiOcular™ EIT a SkinEthic™ HCE EITL¹, nebo > 50 % ve zkouškách na dráždění oka SkinEthic™ HCE EITS²) (viz odstavec 44).

PROKÁZÁNÍ ZPŮSOBILOSTI

22. Dříve než začnou laboratoře rutinně používat zkoušky RhCE pro regulační účely, měly by prokázat svou odbornou způsobilost správnou predikcí patnácti vhodných chemických látek uvedených v tabulce 1. Tyto chemické látky byly vybrány z chemických látek použitých ve validačních studiích validovaných referenčních metod (8)(10)(11). Výběr zahrnuje pokud možno chemické látky, které: i) zahrnují různá skupenství; ii) celý rozsah odpovědí *in vivo* na vážné poškození očí / podráždění očí na základě kvalitních výsledků získaných v referenční oční zkoušce *in vivo* na králících (zkušební metoda B.5) (2)(14) a klasifikačního systému GHS OSN (tj. kategorie 1, 2A, 2B nebo bez kategorie) (1) a klasifikačního systému CLP (tj. kategorie 1, 2 nebo bez kategorie); iii) zahrnují různé faktory *in vivo* důležité pro klasifikaci (24)(25); iv) jsou charakteristické pro chemické třídy použité ve validační studii (8)(10)(11); v) zahrnují správné a široké zastoupení organických funkčních skupin (8)(10)(11); vi) mají chemické struktury, které jsou dobře definovány (8)(10)(11); vii) jsou zabarvené anebo přímo redukují MTT; viii) mají reprodukovatelné výsledky ve zkušebních metodách RhCE v průběhu validace; ix) byly správně predikovány zkušebními metodami RhCE v průběhu validace; x) zahrnují celý rozsah odpovědí *in vitro* na základě kvalitních údajů ze zkušebních

¹ EITL: zkouška na podráždění oka pro kapaliny v případě SkinEthic™ HCE.

² EITS: zkouška na podráždění oka pro pevné látky v případě SkinEthic™ HCE.

metod RhCE (0 až 100% životaschopnost); xi) jsou komerčně dostupné; a xii) nejsou spojeny s příliš vysokými pořizovacími náklady a/nebo náklady na likvidaci odpadu. V situacích, kdy uvedená chemická látka není k dispozici nebo ji nelze použít z jiných oprávněných důvodů, může být použita jiná chemická látka splňující výše popsaná kritéria, např. některá z chemických látek použitých při validaci validované referenční metody. Tyto změny by však měly být odůvodněny.

Tabulka 1: Seznam vhodných chemických látek

Chemický název	CASRN	Organická funkční skupina ¹	Skupenství	Životaschopnost VRM1 (%) ²	Životaschopnost VRM2 (%) ³	Předpověď VRM	Redukční činidlo MTT	Barevná interf.
Kategorie <i>in vivo</i> 1⁴								
Methylthioglykolát	2365-48-2	ester kyseliny karboxylové; thioalkohol	K	10,9 ± 6,4	5,5 ± 7,4	nelze předpovědět	A (silně)	N
Hydroxyethyl-akrylát	818-61-1	akrylát; alkohol	K	7,5 ± 4,7 ⁵	1,6 ± 1,0	nelze předpovědět	N	N
2,5-dimethyl-2,5-hexandiol	110-03-2	alkohol	PL	2,3 ± 0,2	0,2 ± 0,1	nelze předpovědět	N	N
Šťavelan sodný	62-76-0	kyselina oxokarboxylová	S	29,0 ± 1,2	5,3 ± 4,1	nelze předpovědět	N	N
Kategorie <i>in vivo</i> 2A⁴								
2,4,11,13-tetraazatetradekan-diimidamid, N,N"-bis(4-chlorofenyl)-3,12-diimino-, di-D-glukonát (20%, vodný) ⁶	18472-51-0	aromatický heterocyklický halogenid; arylhalogenid; dihydroxylová skupina; guanidin	K	4,0 ± 1,1	1,3 ± 0,6	nelze předpovědět	N	A (slabě)
Benzoan sodný	532-32-1	aryl; karboxylová kyselina	PL	3,5 ± 2,6	0,6 ± 0,1	nelze předpovědět	N	N
Kategorie <i>in vivo</i> 2B⁴								
Diethyl-toluamid	134-62-3	benzamid	K	15,6 ± 6,3	2,8 ± 0,9	nelze předpovědět	N	N
2,2-dimethyl-3-methylenbicyklo [2.2.1] heptan	79-92-5	alkan, rozvětvený s terciárním uhlíkem; alken; bicykloheptan; můstky propojené cyklické uhlovodíky; cykloalkan	PL	4,7 ± 1,5	15,8 ± 1,1	nelze předpovědět	N	N
Bez kategorie <i>in vivo</i> ⁴								
1-ethyl-3-methylimidazol ethylsulfát	342573-75-5	alkoxy; amonná sůl; aryl; imidazol; síran	K	79,9 ± 6,4	79,4 ± 6,2	bez kat.	N	N

Chemický název	CASRN	Organická funkční skupina ¹	Skupenství	Životaschopnost VRM1 (%) ²	Životaschopnost VRM2 (%) ³	Předpověď VRM	Redukční činidlo MTT	Barevná interf.
Dikaprylylether	629-82-3	alkoxy; ether	K	97,8 ± 4,3	95,2 ± 3,0	bez kat.	N	N
Piperonylbutoxid	51-03-6	alkoxy; benzodioxol; benzyl; ether	K	104,2 ± 4,2	96,5 ± 3,5	bez kat.	N	N
Polyethylenglykol (PEG-40) hydrogenovaný ricinový olej	61788-85-0	acylal; alkohol; allyl; ether	viskózní	77,6 ± 5,4	89,1 ± 2,9	bez kat.	N	N
1-(4-chlorfenyl)-3-(3,4-dichlorfenyl) močovina	101-20-2	aromatický heterocyklický halogenid; arylhalogenid; deriváty močoviny	PL	106,7 ± 5,3	101,9 ± 6,6	bez kat.	N	N
2,2'-metylen-bis-[6-(2H-benzotriazol-2-yl)-4-(1,1,3,3-tetramethylbutyl)fenol]	103597-45-1	alkan, rozvětvený s kvartérním uhlíkem; kondenzovaná karbocyklická aromatická látka; kondenzované nasycené heterocykly; prekurzorové chinoidní sloučeniny; terc- butanol	PL	102,7 ± 13,4	97,7 ± 5,6	bez kat.	N	N
Tetrafluorboritan draselný	14075-53-7	anorganická sůl	S	88,6 ± 3,3	92,9 ± 5,1	bez kat.	N	N

Zkratky: CASRN = Chemical Abstracts Service Registry Number (registrační číslo CAS); GHS OSN = Globálně harmonizovaný systém klasifikace a označování chemických látek Organizace spojených národů (1); VRM1 = validovaná referenční metoda, EpiOcular™ EIT; VRM2 = validovaná referenční metoda, SkinEthic™ HCE EIT; Barevná interf. = měření barevné interference se standardní absorbancí (optická hustota (OD)) formazanu MTT.

¹ Organická funkční skupina stanovena podle vnořené analýzy pomocí souboru nástrojů OECD Toolbox 3.1 (8).

² Podle výsledků zjištěných ve zkoušce na podráždění oka EpiOcular™ při validační studii podráždění oka EURL ECVAM/Cosmetics Europe (EIVS) (8).

³ Podle výsledků zjištěných ve zkoušce na podráždění oka SkinEthic™ HCE EIT při validační studii (10)(11).

⁴ Založena na oční zkoušce *in vivo* na králících (zkušební metoda B.5/pokyn OECD č. 405) (2)(14) a s použitím GHS OSN.

⁵ Podle výsledků zjištěných ve studii zkušební strategie *in vitro* na podráždění oka CEFIC CONsortium (CON4EI).

⁶ Klasifikace 2A nebo 2B závisí na interpretaci kritéria GHS OSN pro rozlišování mezi těmito dvěma kategoriemi, tj. pro stanovení klasifikace v kategorii 2A jsou nutné 1 ze 3

oproti 2 ze 3 zvířat s účinky v den 7. Studie *in vivo* byla provedena na 3 zvířatech. Všechny sledované vlastnosti kromě zákalu rohovky u jednoho zvířete se ke dni 7 nebo dříve vrátily zpět na nulovou hodnotu. Toto jedno zvíře, které se ke dni 7 zcela neuzdravilo, mělo skóre zákalu rohovky 1 (v den 7) a plně se uzdravilo v den 9.

23. V rámci zkoušení způsobilosti se doporučuje, aby uživatelé po obdržení modelu rekonstruované lidské epidermis ověřili bariérové vlastnosti tkání uvedené výrobcem tkáňové konstrukce RhCE (viz odstavce 25, 27 a 30). To je zvláště důležité v případě, že se tkáň zasílají na dlouhé vzdálenosti nebo že jejich přeprava trvá dlouhou dobu. Pokud je zkouška úspěšně zavedena a je získána a prokázána způsobilost správně ji používat, není nutno běžně provádět takové ověřování. Při běžném používání zkoušky se však doporučuje i nadále v pravidelných intervalech bariérové vlastnosti posuzovat.

POSTUP

24. Zkoušky, které v současné době zahrnuje tato zkušební metoda, jsou vědecky platné zkoušky na podráždění oka EpiOcular™ EIT a SkinEthic™ HCET (9)(12)(13), nazývané validovaná referenční metoda (VRM1, respektive VRM2). K dispozici jsou standardní pracovní postupy pro zkušební metody RhCE, které by měly být používány pro provádění a využívání těchto zkušebních metod v laboratoři (34)(35). V následujících odstavcích a v dodatku 2 je uveden popis hlavních složek a postupů zkoušek RhCE.

SLOŽKY ZKUŠEBNÍ METODY RHCE

Obecné podmínky

25. Na rekonstrukci trojrozměrné epitelové tkáně podobné rohovce, která by se měla skládat z postupně stratifikovaných, nikoli však kornifikovaných buněk, se používají příslušné lidské derivované buňky. Tkáňová konstrukce RhCE se připravuje ve vložkách s porézní syntetickou membránou, přes kterou mohou do buněk procházet živiny. V rekonstruovaném epitelu podobném rohovce by mělo být přítomno několik vrstev životaschopných, nekeratinizovaných epitelových buněk. Tkáňová konstrukce RhCE by měla mít epitelový povrch v přímém kontaktu se vzduchem, aby byla možná přímá lokální expozice zkoušených chemických látek způsobem podobným tomu, jak by byl epitel rohovky exponován *in vivo*. Tkáňová konstrukce RhCE by měla tvořit funkční bariéru s dostatečnou robustností, aby odolala rychlému průniku cytotoxických referenčních látek, např. přípravku Triton X-100 nebo dodecylsulfátu sodného (SDS). Bariérová funkce by měla být prokázána a může být hodnocena stanovením doby expozice potřebné ke snížení životaschopnosti tkáně o 50 % (ET₅₀) po aplikaci referenční látky v pevně stanovené koncentraci (např. 100 µl 0,3% (obj.) přípravku Triton X-100) nebo v koncentraci, při níž referenční látka snižuje životaschopnost tkání o 50 % (IC₅₀) po pevně stanovené době expozice (např. 30minutová expozice 50 µl SDS) (viz odstavec 30). Zadržovací vlastnosti tkáňové konstrukce RhCE by měly zabránit průchodu zkoušené chemické látky kolem okraje

životaschopné tkáně, což by mohlo vést k nesprávnému modelování expozice rohovky. Lidské derivované buňky použité k vytvoření tkáňové konstrukce RhCE by neměly být kontaminovány bakteriemi, viry, mykoplazmaty ani houbovými mikroorganismy. Dodavatel by měl kontrolovat sterilitu tkáně rekonstrukce, zda není kontaminována houbami a bakteriemi.

Funkční podmínky

Životaschopnost

26. K určení míry životaschopnosti se používá zkouška MTT (16). Vitální buňky tkáňové konstrukce RhCE redukují vitální barvivo MTT na modrou sraženinu formazanu, která je poté z tkáně extrahována pomocí isopropylalkoholu (nebo podobného rozpouštědla). Extrahovaný formazan MTT může být kvantifikován pomocí standardního měření absorpance (optické hustoty (OD)) nebo spektrofotometrickým postupem HPLC/UPLC (36). Optická hustota samotného extrakčního rozpouštědla by měla být dostatečně malá, tzn. $OD < 0,1$. Uživatelé tkáňové konstrukce RhCE by měli zajistit, aby každá použitá šarže tkáňové konstrukce RhCE splňovala stanovená kritéria pro negativní kontrolu. Rozsahy přijatelnosti pro hodnoty OD negativní kontroly pro validované referenční metody jsou uvedeny v tabulce 2. Uživatel spektrofotometrie HPLC/UPLC by měl jako kritérium přijatelnosti pro negativní kontrolu používat rozsahy OD negativní kontroly uvedené v tabulce 2. V závěrečné zprávě je třeba doložit, že tkáně ošetřené negativní kontrolní látkou jsou stabilně kultivovány (poskytují podobné naměřené hodnoty životaschopnosti tkáně) po dobu trvání zkušební doby expozice. Podobný postup by měl používat výrobce tkání v rámci řízení kvality při propouštění šarží tkání, ale v tomto případě mohou platit jiná kritéria přijatelnosti než kritéria uvedená v tabulce 2. Rozsah přijatelnosti (horní a dolní mez) hodnot OD negativní kontroly (za podmínek zkušební metody QC) stanoví subjekt, který model RhCE vyvinul nebo dodává.

Tabulka 2: Rozsahy přijatelnosti pro hodnoty OD negativní kontroly (pro uživatele testu)

Zkouška	Dolní mez přijatelnosti	Horní mez přijatelnosti
EpiOcular™ EIT (OCL-200) – VRM1 (protokoly pro kapaliny i pevné látky)	$> 0,8^1$	$< 2,5$
SkinEthic™ HCE EIT (HCE/S) – VRM2 (protokoly pro kapaliny i pevné látky)	$> 1,0$	$\leq 2,5$

¹ V této mezi přijatelnosti je uvažována možnost delší doby přepravy/skladování (např. > 4 dny), která prokazatelně nemá vliv na účinnost zkušební metody (37).

Bariérová funkce

27. Tkáňová konstrukce RhCE by měla být dostatečně silná a robustní, aby odolávala rychlému průniku cytotoxických referenčních látek, podle odhadu na základě hodnoty ET_{50} (např. Triton X-100) nebo IC_{50} (SDS) (tabulka 3). Bariérovou funkci každé šarže použité tkáňové konstrukce RhCE by měl prokázat vývojář/prodejce modelu RhCE při dodávce tkání koncovému uživateli (viz odstavec 30).

Morfologie

28. Histologické vyšetření tkáňové konstrukce RhCE by mělo prokázat strukturu podobnou epitelu lidské rohovky (včetně alespoň 3 vrstev životaschopných epitelových buněk a nekeratinizovaného povrchu). Pro validované referenční metody stanovil vhodnou morfologii vývojář/dodavatel, a proto ji uživatel zkušební metody nemusí znovu prokazovat při každé použité šarži tkáně.

Reprodukovatelnost

29. Výsledky zkušební metody za použití pozitivních a negativních kontrol by měly prokázat reprodukovatelnost v průběhu času.

Kontrola kvality

30. Tkáňová konstrukce RhCE by měla být použita pouze v případě, že subjekt, který ji vyvinul nebo dodává, prokáže, že každá použitá šarže tkáňové konstrukce RhCE splňuje stanovená produkční kritéria pro uvolnění do oběhu, přičemž mezi nejvýznamnější z nich patří kritéria životaschopnosti (odstavec 26) a bariérové funkce (odstavec 27). Rozsah přijatelnosti (horní a dolní mez) pro bariérové funkce měřené podle hodnoty ET_{50} nebo IC_{50} (viz odstavce 25 a 26) stanoví vývojář/dodavatel tkáňové konstrukce RhCE. Rozsah přijatelnosti hodnot ET_{50} a IC_{50} použitý jako kritérium řízení kvality pro propouštění šarží u vývojáře/dodavatele tkáňových konstrukcí RhCE (použitých ve validovaných referenčních metodách) je uveden v tabulce 3. Údaje prokazující shodu se všemi výrobními kritérii pro propuštění by měl vývojář/dodavatel tkáňové konstrukce RhCE poskytnout uživatelům zkušební metody, aby je mohli uvést v závěrečné zprávě. Pro spolehlivou predikci chemických látek, které nevyžadují klasifikaci a označení jako látky vyvolávající podráždění oka nebo vážné poškození oka podle systému GHS OSN/CLP, lze akceptovat pouze výsledky získané u tkání splňujících všechna tato výrobní kritéria pro propuštění.

Tabulka 3: Kritérium kontroly kvality pro uvolnění šarže do oběhu

Zkouška	Dolní mez přijatelnosti	Horní mez přijatelnosti
EpíOcular™ EIT (OCL-200) – VRM1 (100 µl 0,3% (obj.) Tritonu X-100)	$ET_{50} = 12,2 \text{ min}$	$ET_{50} = 37,5 \text{ min}$
SkinEthic™ HCE EIT (HCE/S) – VRM2	$IC_{50} = 1 \text{ mg/ml}$	$IC_{50} = 3,2 \text{ mg/ml}$

Aplikace zkoušené chemické látky a kontrolních látek

31. Pro každou zkoušenou látku a každou kontrolní látku by se při každém provedení zkoušky měly použít alespoň dva tkáňové replikáty. Používají se dva různé zkušební protokoly, jeden pro kapalně zkoušené chemické látky a jeden pro pevně zkoušené chemické látky (34)(35). Před aplikací zkoušených chemických látek u obou metod a protokolů by měl být povrch tkáňové konstrukce zvlhčen Dulbeccovým fosfátovým pufrům bez vápníku a hořčíku (DPBS bez $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$), aby se napodobily vlhké podmínky lidského oka. Ošetření tkání se zahajuje expozicí zkoušené chemické látky (látkám) a kontrolní látkám. U obou zkušebních protokolů v obou validovaných referenčních metodách je zapotřebí nanést dostatečné množství zkoušené chemické látky nebo kontrolní látky, aby rovnoměrně pokryla povrch epitelu, a současně se vyhnout nekonečné dávce (viz odstavce 32 a 33) (dodatek 2).
32. Se zkoušenými chemickými látkami, které lze pipetovat při teplotě 37 °C nebo při nižších teplotách (v případě potřeby pomocí objemové pipety), se ve validovaných referenčních metodách nakládá jako s kapalinami, jinak by se s nimi mělo nakládat jako s pevnými látkami (viz odstavec 33). Ve validovaných referenčních metodách se kapalná zkoušená chemická látka rovnoměrně rozprostře na povrch tkáně (tj. aplikace minimálně 60 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$) (viz dodatek 2, (33)(34)). V maximální možné míře by měly být vyloučeny kapilární jevy (účinky povrchového napětí), k nimž může dojít v důsledku malých objemů aplikovaných na vložku (na povrch tkáně), aby bylo zaručeno správné dávkování na tkáň. Tkáně ošetřené kapalnými zkoušenými chemickými látkami se inkubují po dobu 30 minut při standardních kultivačních podmínkách (37 $\pm$ 2 °C, 5 $\pm$ 1% CO_2 , $\geq$ 95% relativní vlhkost). Na konci expoziční doby je nutno kapalnou zkoušenou chemickou látku a kontrolní látku pečlivě odstranit z povrchu tkáně důkladným opláchnutím pomocí DPBS bez $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ při pokojové teplotě. Po opláchnutí následuje poexpoziční ponoření do čerstvého média při pokojové teplotě (aby se odstranila veškerá zkoušená chemická látka absorbovaná do tkáně) po stanovenou dobu, která se liší v závislosti na použité validované referenční metodě. Pouze u VMR1 platí poexpoziční inkubační doba v čerstvém médiu při standardních kultivačních podmínkách před provedením analýzy MTT (viz dodatek 2, (34)(35)).
33. Se zkoušenými chemickými látkami, které nelze pipetovat při teplotách do 37 °C, se ve validovaných referenčních metodách zachází jako s pevnými látkami. Množství aplikované zkoušené chemické látky by mělo být dostatečné, aby pokrylo celý povrch tkáně, tj. mělo by být aplikováno minimálně 60 mg/cm^2 (dodatek 2). Pevné látky by

se měly pokud možno zkoušet ve formě jemného prášku. Tkáně ošetřené pevnými zkoušenými chemickými látkami se inkubují po stanovenou dobu (v závislosti na použité validované referenční metodě) při standardních kultivačních podmínkách (viz dodatek 2, (34)(35)). Na konci expoziční doby je nutno pevnou zkoušenou chemickou látku a kontrolní látky pečlivě odstranit z povrchu tkáně důkladným opláchnutím pomocí DPBS bez $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ při pokojové teplotě. Po opláchnutí následuje poexpoziční ponoření do čerstvého média při pokojové teplotě (aby se odstranila veškerá zkoušená chemická látka absorbovaná do tkáně) po stanovenou dobu, která se liší v závislosti na použité validované referenční metodě, a poexpoziční inkubace v čerstvém médiu při standardních kultivačních podmínkách před provedením analýzy MTT (viz dodatek 2, (34)(35)).

34. Do každého provedení zkoušky by se měly zařadit souběžné negativní a pozitivní kontroly, aby se prokázalo, že životaschopnost (stanovená při negativní kontrole) a citlivost (stanovená při pozitivní kontrole) tkání jsou v rámci rozpětí přijatelnosti definovaného podle dosavadních hodnot. Souběžná negativní kontrola poskytuje také výchozí hodnotu (100% životaschopnost tkáně) pro výpočet relativní percentuální životaschopnosti tkání ošetřených zkoušenou chemickou látkou (%Viability_{test}). Doporučenou látkou pro pozitivní kontrolu, která se má používat u těchto validovaných referenčních metod, je čistý methyl-acetát (CAS č. 79-20-9, komerčně dostupný např. od společnosti Sigma-Aldrich, kat. č. 45997; kapalný). Doporučenými látkami pro negativní kontrolu, které se mají používat u VRM1 a VRM2, je ultračistá H_2O , respektive DPBS bez $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$. Tyto kontrolní látky byly použity ve validačních studiích validovaných referenčních metod a většina dosavadních údajů se týká právě těchto látek. Použití vhodných alternativních látek pro pozitivní nebo negativní kontrolu by mělo být adekvátně vědecky odůvodněno. Negativní a pozitivní kontroly by měly být zkoušeny podle stejného protokolu (protokolů), jako byly protokoly použité pro zkoušené chemické látky zařazené do provedení zkoušky (tj. pro kapaliny anebo pevné látky). Po jejich aplikaci by měla následovat experimentální expozice, oplach, poexpoziční ponoření, případně poexpoziční inkubace, jak je popsáno pro kontroly prováděné souběžně u kapalných zkoušených chemických látek (viz odstavec 32) nebo pro kontroly prováděné souběžně u pevných zkoušených chemických látek (viz odstavec 33) před provedením analýzy MTT (viz odstavec 35) (34)(35). Postačí jedna sada negativních a pozitivních kontrol pro všechny zkoušené chemické látky stejného skupenství (kapaliny nebo pevné látky) zařazené do stejného provedení zkoušky.

Měření životaschopnosti tkání

35. Zkouška MTT je standardizovaná kvantitativní metoda (16), která by se měla používat k měření životaschopnosti tkání podle této zkušební metody. Je slučitelná s použitím trojrozměrné tkáňové konstrukce. Analýza MTT se provádí okamžitě po poexpoziční inkubační době. Ve validovaných referenčních metodách se vzorek tkáňové konstrukce RhCE vloží do 0,3 ml roztoku MTT v koncentraci 1 mg/ml na dobu 180 ± 15 min při standardních kultivačních podmínkách. Životaschopné buňky tkáňové konstrukce RhCE redukují vitální barvivo MTT na modrou sraženinu formazanu MTT. Vysrážený modrý formazan MTT se poté z tkáně extrahuje pomocí příslušného množství isopropylalkoholu (nebo podobného rozpouštědla) (34)(35). Tkáně testované kapalnými zkoušenými chemickými látkami by měly být extrahovány z horní i dolní části tkání, zatímco tkáně testované pevnými zkoušenými chemickými látkami a barvenými kapalinami by měly být extrahovány pouze z dolní části tkáně (aby se minimalizovala potenciální kontaminace extrakčního roztoku isopropylalkoholu některou zkoušenou chemickou látkou, jež mohla zůstat v tkáni). Tkáně testované kapalnými zkoušenými chemickými látkami, které nelze snadno vymýt, mohou být také extrahovány pouze z dolní části tkáně. Se souběžně testovanými negativními a pozitivními kontrolními látkami se zachází podobně jako se zkoušenou chemickou látkou. Extrahovaný formazan MTT může být kvantifikován pomocí standardního měření absorbance (OD) při vlnové délce 570 nm za použití filtru o pásmové propustnosti nejvýše ± 30 nm nebo spektrofotometrickým postupem HPLC/UPLC (viz odstavce 42) (11)(36).
36. Optické vlastnosti zkoušené látky nebo její chemické působení na MTT mohou měření formazanu MTT ovlivnit, což vede k nepravdivému odhadu životaschopnosti tkáně. Zkoušené chemické látky mohou interferovat s měřením formazanu MTT, a to přímou redukcí MTT na modrý formazan MTT, anebo barevnou interferencí, jestliže zkoušená chemická látka absorbuje, přirozeně nebo v důsledku experimentálních postupů, ve stejném rozsahu OD jako formazan MTT (tj. cca 570 nm). Před testováním by měly být provedeny předběžné zkoušky, aby bylo možné identifikovat potenciální přímá redukční činidla MTT anebo barevně interferující chemické látky, a k detekci a korekci potenciální interference těchto zkoušených chemických látek by měly být provedeny dodatečné kontroly (viz odstavce 37–41). To je zvláště důležité v případech, že se určitá zkoušená chemická látka opláchnutím z tkáňové konstrukce RhCE zcela neodstraní nebo že pronikne do epitelu podobného rohovce, takže je přítomna v tkáňových konstrukcích, když se provádí analýza MTT. U zkoušených chemických látek absorbujících světlo ve stejném pásmu jako formazan MTT (přirozeně nebo po expozici), které nejsou kompatibilní se standardním měřením absorbance (OD) formazanu MTT vzhledem k příliš velké interferenci, tj. silná absorbance při vlnové délce 570 ± 30 nm, může být na měření formazanu MTT použit

HPLC/UPLC spektrofotometrický postup (viz odstavce 41 a 42) (11)(36). Podrobný popis, jak detekovat a korigovat přímou redukci MTT a interference způsobené barvivý, je k dispozici ve standardních prováděcích postupech validovaných referenčních metod (34)(35). V dodatku III, respektive IV jsou také uvedeny grafy ilustrující identifikaci a nakládání s přímými redukčními činidly MTT anebo barevně interferujícími chemickými látkami pro VRM1 a VRM2.

37. Aby bylo možné identifikovat potenciální interferenci zkoušených chemických látek absorbujících světlo ve stejném pásmu jako formazan MTT (přirozeně nebo po expozici) a rozhodnout, zda jsou nutné další kontroly, zkoušená chemická látka se přidá do vody anebo isopropylalkoholu a inkubuje se po vhodnou dobu při pokojové teplotě (viz dodatek 2, (34)(35)). Jestliže zkoušená chemická látka ve vodě anebo isopropylalkoholu absorbuje dostatečně světlo v pásmu 570 ± 20 nm u VRM1 (viz dodatek 3) nebo jestliže po smíchání zkoušené chemické látky s vodou vznikne zbarvený roztok u VRM2 (viz dodatek 4), považuje se zkoušená chemická látka za interferující se standardním měřením absorbance (OD) formazanu MTT a je třeba provést další kontroly s barvivý, případně použít spektrofotometrický postup HPLC/UPLC, přičemž v tomto případě nejsou tyto kontroly nutné (viz odstavce 41 a 42 a dodatky III a IV) (34)(35). Při provádění standardního měření absorbance (OD) by měla být každá interferující zkoušená chemická látka aplikována na alespoň dva životaschopné tkáňové replikáty, které se podrobí celému zkušebnímu postupu, ale v průběhu inkubačního kroku MTT se inkubují v médiu místo roztoku MTT za účelem vytvoření kontroly nespecifického zbarvení v živých tkáních (NSC_{living}) (34)(35). Vzhledem k inherentní biologické variabilitě živých tkání je třeba kontrolu NSC_{living} provádět současně se zkoušením zbarvené chemické látky a v případě většího počtu zkoušek je třeba u každé zkoušky (při každém provedení zkoušky) provést nezávislou kontrolu NSC_{living}. Skutečná životaschopnost tkáně se vypočte jako: $\text{percentuální životaschopnost tkáně získaná z živých tkání vystavených působení interferující zkoušené chemické látky a inkubovaných v roztoku MTT (\% Viability_{test})} \text{ minus percentuální nespecifické zbarvení získané z živých tkání vystavených působení interferující zkoušené chemické látky a inkubovaných v roztoku bez MTT, prováděno současně s korigovanou zkouškou (\% NSC_{living}), tj. skutečná životaschopnost tkáně} = [\% Viability_{test}] - [\% NSC_{living}]$.
38. Aby bylo možné identifikovat přímá redukční činidla MTT, je třeba každou zkoušenou chemickou látku přidávat do čerstvě připraveného roztoku MTT. Do roztoku MTT se přidá vhodné množství zkoušené chemické látky a směs se inkubuje přibližně po dobu přibližně 3 hodin při standardních kultivačních podmínkách (viz dodatky III a IV) (34)(35). Jestliže směs MTT obsahující zkoušenou chemickou látku

(nebo suspenzi u nerozpustných zkoušených chemických látek) zmodrá/zfialoví, je zkoušená chemická látka považována za přímé redukční činidlo MTT, přičemž je třeba provést další funkční kontrolu na neživotaschopných tkáňových konstrukcích RhCE nezávisle na použití standardního měření absorbance (OD) nebo spektrofotometrického postupu HPLC/UPLC. Tato další funkční kontrola využívá neživé tkáně, které mají pouze zbytkovou metabolickou aktivitu, ale absorbují a udržují v sobě zkoušenou chemickou látku podobně jako životaschopné tkáně. Neživé tkáně u VRM1 se připravují expozicí nízké teplotě („usmrčené zmrazením“). Neživé tkáně u VRM2 se připravují dlouhodobou inkubací (např. minimálně 24 ± 1 hodina) ve vodě s následným uložením při nízké teplotě („usmrčené vodou“). Každá zkoušená chemická látka redukující MTT se aplikuje na alespoň dva neživé tkáňové replikáty, které se podrobí celému zkušebnímu postupu, aby došlo ke kontrole na nespecifickou redukci MTT (NSMTT (34)(35)). Postačí jedna kontrola NSMTT na zkoušenou chemickou látku bez ohledu na počet provedených nezávislých zkoušek/experimentů. Skutečná životaschopnost tkáně se vypočte jako: procentuální životaschopnost tkáně získaná z živých tkání vystavených působení redukčního činidla MTT ($\%Viability_{test}$) minus procentuální nespecifická redukce MTT získaná z neživých tkání vystavených stejnému redukčnímu činidlu MTT, počítáno ve vztahu k negativní kontrole prováděné současně s korigovanou zkouškou ($\% NSMTT$), tj. skutečná životaschopnost tkáně = $[\%Viability_{test}] - [\%NSMTT]$.

39. Zkoušené chemické látky, u nichž se zjistí, že působí barevné interference (viz odstavec 37) i že přímo redukují MTT (viz odstavec 38), budou při provádění standardního měření absorbance (OD) také vyžadovat třetí skupinu kontrol vedle kontrol NSMTT a NSC_{living} popsanych v předchozích odstavcích. Obvykle je tomu tak u tmavě zbarvených zkoušených chemických látek absorbujících světlo v rozsahu 570 ± 30 nm (např. modré, fialové, černé), protože jejich vlastní barva narušuje posouzení jejich schopnosti přímo redukovat MTT, jak je popsáno v odstavci 38. Je tedy nutné použít standardně kontroly NSMTT společně s kontrolami NSC_{living} . Zkoušené chemické látky, u nichž je provedena kontrola NSMTT i NSC_{living} , mohou být absorbovány a zachyceny v živých i neživých tkáních. Proto v tomto případě kontrola NSMTT musí nejen korigovat potenciální přímou redukci MTT způsobenou zkoušenou chemickou látkou, ale také barevnou interferenci vznikající z absorpce a retence zkoušené chemické látky v neživých tkáních. Mohlo by to vést k dvojí korekci barevné interference, protože kontrola NSC_{living} již koriguje barevnou interferenci vznikající z absorpce a retence zkoušené chemické látky v živých tkáních. Aby byla vyloučena možná dvojí korekce barevné interference, je třeba provést třetí kontrolu na nespecifické zbarvení u neživých tkání (NSC_{killed}) (viz dodatky III a IV) (34)(35). Při této další kontrole se zkoušená chemická látka aplikuje na alespoň dva neživé tkáňové

replikáty, které se podrobí celé zkoušce, ale v průběhu inkubačního kroku MTT se inkubují v médiu místo roztoku MTT. Postačí jedna kontrola NSC_{killed} na zkoušenou chemickou látku bez ohledu na počet provedených nezávislých zkoušek/experimentů, ale tuto kontrolu je třeba provést současně s kontrolou NSMTT a se stejnou šarží tkáně. Skutečná životaschopnost tkáně se vypočte jako: procentuální životaschopnost tkáně získaná z živých tkání vystavených působení zkoušené chemické látky (%Viability_{test}) minus % NSMTT minus % NSC_{living} plus procentuální nespecifické zbarvení získané z neživých tkání vystavených působení interferující zkoušené chemické látky a inkubovaných v roztoku bez MTT, počítáno ve vztahu k negativní kontrole provedené současně s korigovanou zkouškou (% NSC_{killed}), tj. skutečná životaschopnost tkáně = [%Viability_{test}] – [%NSMTT] – [%NSC_{living}] + [%NSC_{killed}].

40. Je důležité uvést, že nespecifická redukce MTT a nespecifické barevné interference mohou zvyšovat OD (při provádění standardních měření absorbance) tkáňového extraktu nad rozsah linearitu spektrofotometru a že nespecifická redukce MTT může také zvyšovat plochu píku formazanu MTT (při provádění HPLC/UPLC-spektrofotometrických měření) tkáňového extraktu nad rozsah linearitu spektrofotometru. Proto je důležité, aby každá laboratoř stanovila OD / rozsah linearitu plochy píku svého spektrofotometru s použitím např. formazanu MTT (CAS č. 57360-69-7), který je komerčně dostupný např. od společnosti Sigma-Aldrich (kat. č. M2003), než zahájí testování zkoušených chemických látek pro regulační účely.
41. Standardní měření absorbance (OD) pomocí spektrofotometru je vhodné pro posouzení zkoušených chemických látek, které přímo redukují MTT a působí barevné interference, když interference pozorované při měření formazanu MTT nejsou příliš silné (tzn. optická hustota tkáňových extraktů zjištěná za použití zkoušené chemické látky bez korekce přímé redukce MTT anebo barevné interference je v lineárním rozsahu spektrofotometru). Avšak výsledky u zkoušených chemických látek, které dávají % NSMTT anebo % NSC_{living} ≥ 60 % (protokol VRM1 a VRM2 pro kapaliny) nebo ≥ 50 % (protokol VRM2 pro pevné látky) negativní kontroly, je třeba posuzovat opatrně, neboť je to stanovená hraniční hodnota používaná ve validovaných referenčních metodách na odlišení klasifikovaných chemických látek od neklasifikovaných (viz odstavec 44). Standardní absorbanci (OD) však nelze měřit, když je interference s měřením formazanu MTT příliš silná (tj. vede k nesprávným hodnotám OD u zkoušených tkáňových extraktů spadajících mimo lineární rozsah spektrofotometru). Zabarvené zkoušené chemické látky nebo zkoušené chemické látky, které se zabarví při kontaktu s vodou nebo isopropylalkoholem a které interferují příliš silně se standardním měřením absorbance (OD) formazanu MTT, mohou být přesto hodnoceny pomocí HPLC/UPLC spektrofotometrie (viz dodatky III

a IV). Je tomu tak proto, že systém HPLC/UPLC umožňuje oddělit formazan MTT od chemické látky před její kvantifikací (36). Z tohoto důvodu se při použití HPLC/UPLC spektrofotometrie nepožadují kontroly NSC_{living} ani NSC_{killed}, a to nezávisle na zkoušené chemické látce. Kontroly NSMTT by se však měly použít, pokud existuje podezření, že zkoušená chemická látka přímo redukuje MTT (podle postupu popsaného v odstavci 38). Kontroly NSMTT by se také měly použít u zkoušených chemických látek majících barvu (vlastní barvu nebo zbarvení ve vodě), která znesnadňuje posouzení jejich schopnosti přímé redukce MTT, jak je popsáno v odstavci 38. Při použití HPLC/UPLC spektrofotometrie na měření formazanu MTT se procentuální životaschopnost tkáně vypočítá jako procentuální plocha píku formazanu MTT získaná z živých tkání vystavených působení zkoušené chemické látky ve vztahu k píku formazanu MTT získanému při souběžné negativní kontrole. U zkoušených chemických látek, které dokážou přímo redukovat MTT, se skutečná životaschopnost tkáně vypočítá jako: % Viability_{test} minus % NSMTT, jak je popsáno v poslední větě odstavce 38. Konečně je třeba uvést, že přímá redukční činidla MTT nebo přímá redukční činidla MTT, jež jsou také barevně interferující, která zůstanou v tkáních po expozici a redukují MTT tak silně, že to vede k takovým hodnotám optické hustoty (při využití standardního měření OD) nebo plochám píků (při použití UPLC/HPLC spektrofotometrie) zkoušených tkáňových extraktů, které spadají mimo rozsah linearitu spektrofotometrie, nelze posuzovat zkušebními metodami RhCE, i když lze očekávat, že k tomu dochází velmi vzácně.

42. HPLC/UPLC spektrofotometrie může být použita u všech druhů zkoušených chemických látek (barevných, nebarevných, látek redukujících MTT i látek, které MTT neredukují) pro měření formazanu MTT (11)(36). Vzhledem k různým spektrofotometrickým systémům HPLC/UPLC není možné, aby každý uživatel vytvořil přesně stejné systémové podmínky. Proto je třeba prokázat způsobilost spektrofotometrického systému HPLC/UPLC před jeho použitím pro kvantifikaci formazanu MTT z tkáňových extraktů splněním kritérií přijatelnosti pro skupinu standardních parametrů způsobilosti vycházejících z parametrů popsaných v pokynu amerického Úřadu pro potraviny a léčiva pro průmysl k validaci bioanalytických metod (36)(38). Tyto klíčové parametry a jejich kritéria přijatelnosti jsou uvedeny v dodatku 5. Po splnění kritérií přijatelnosti definovaných v dodatku 5 je spektrofotometrický systém HPLC/UPLC považován za způsobilý a připravený na měření formazanu MTT za experimentálních podmínek popsaných v této zkušební metodě.

Kritéria přijatelnosti

43. U každého provedení zkoušky s použitím šarží tkáně RhCE, které splňují požadavky na kvalitu (viz odstavec 30), by tkáně ošetřené látkou pro negativní kontrolu měly vykazovat hodnoty OD odrážející kvalitu tkání, která vznikla po všech přepravních a přejímacích krocích a po všech procesech podle protokolu zkoušky, a neměly by být mimo doposud stanové meze popsané v tabulce 2 (viz odstavec 26). Podobně tkáně ošetřené látkou pro pozitivní kontrolu, tj. methylacetátem, by měly vykazovat střední životaschopnost tkáně $< 50 \%$ ve vztahu k negativní kontrole ve VRM1 u protokolu pro kapaliny i protokolu pro pevné látky a $\leq 30 \%$ (protokol pro kapaliny) nebo $\leq 20 \%$ (protokol pro pevné látky) ve vztahu k negativní kontrole ve VRM2, a odrážet tak schopnost tkání reagovat na dráždivou zkoušenou chemickou látku za podmínek zkušební metody (34)(35). Variabilita mezi tkáňovými replikáty u zkoušených chemických látek anebo kontrolních látek by měla spadat do přijatelných limitů (tj. rozdíl životaschopnosti mezi dvěma tkáňovými replikáty by měl být menší než 20% a směrodatná odchylka (SD) mezi třemi tkáňovými replikáty by neměla přesahovat 18%). Jestliže je negativní kontrola nebo pozitivní kontrola zařazená do zkoušky mimo přijatelné rozsahy, je toto provedení zkoušky považováno za „nezpůsobilé“ a zkoušku je třeba opakovat. Jestliže je variabilita mezi tkáňovými replikáty zkoušené chemické látky mimo přijatelný rozsah, je třeba zkoušku považovat za „nezpůsobilou“ a zkoušenou chemickou látku je třeba testovat znovu.

Interpretace výsledků a predikční model

44. Hodnoty OD / plochy píku zjištěné u replikovaných tkáňových extraktů pro každou zkoušenou chemickou látku se použijí k výpočtu střední percentuální životaschopnosti tkání (průměru z tkáňových replikátů) normalizované podle negativní kontroly, která je stanovena na 100% . Percentuální hraniční hodnoty životaschopnosti tkání pro určení zkoušených chemických látek, které není nutné klasifikovat jako látky mající dráždivé účinky na oči nebo vyvolávající vážné poškození očí (bez kategorie GHS OSN/CLP), jsou uvedeny v tabulce 4. Výsledky by tedy měly být interpretovány takto:

- Zkoušená chemická látka je určena jako látka nevyžadující klasifikaci a označení podle systému GHS OSN a CLP (bez kategorie), jestliže je střední percentuální životaschopnost tkáně po expozici a poexpoziciční inkubaci větší než ($>$) stanovená mezní hodnota percentuální životaschopnosti tkáně, jak je uvedeno v tabulce 4. V tomto případě není vyžadováno žádné další zkoušení jinými zkušebními metodami.
- Jestliže je střední percentuální životaschopnost tkáně po expozici a poexpoziciční inkubaci menší než nebo rovna ($\leq$) stanovené mezní hodnotě percentuální životaschopnosti tkáně, nelze provést žádnou predikci, jak je uvedeno v tabulce 4. V tomto případě bude nutné další zkoušení jinými zkušebními metodami, protože

zkušební metody RhCE vykazují určitý počet falešně pozitivních výsledků (viz odstavce 14–15) a nedokážou rozlišit mezi kategoriemi 1 a 2 podle GHS OSN a CLP (viz odstavec 17).

Tabulka 4: Predikční modely podle klasifikace GHS OSN a CLP

Validovaná referenční metoda	Bez kategorie	Nelze předpovědět
VRM 1 – EpiOcular™ EIT (pro oba protokoly)	střední životaschopnost tkáně > 60 %	střední životaschopnost tkáně ≤ 60 %
VRM 2 – SkinEthic™ HCE EIT (pro protokoly pro kapaliny)	střední životaschopnost tkáně > 60 %	střední životaschopnost tkáně ≤ 60 %
VRM2 – SkinEthic™ HCE EIT (pro protokol pro pevné látky)	střední životaschopnost tkáně > 50 %	střední životaschopnost tkáně ≤ 50 %

45. U zkoušené chemické látky s jednoznačným výsledkem by měla stačit jedna zkouška za použití alespoň dvou tkáňových replikátů. Avšak v případě hraničních výsledků, jako jsou například nesouhlasné výsledky opakovaných měření a/nebo průměrná hodnota životaschopnosti ve výši 60 ± 5 % (VRM1 a VRM2 pro protokol pro kapaliny) nebo 50 ± 5 % (VRM2 pro protokol pro pevné látky), by se měla zvážit druhá zkouška, jakož i třetí zkouška v případě nesouhlasných výsledků mezi prvními dvěma zkouškami.
46. Pokud je to vhodné a zdůvodněné, lze pro konkrétní druhy směsí uvažovat různé mezní hodnoty procentuální životaschopnosti tkání rozlišující klasifikované zkoušené chemické látky od neklasifikovaných, aby se zvýšila celková účinnost zkušební metody pro tyto druhy směsí (viz odstavec 14). Srovnávací chemické látky mohou být užitečné pro hodnocení potenciálu vážného poškození očí / podráždění očí neznámými zkoušenými chemickými látkami nebo třídami produktů nebo pro hodnocení potenciálu relativní toxicity klasifikované chemické látky pro oči ve specifickém rozmezí pozitivních odpovědí.

ÚDAJE A PŘEDKLÁDÁNÍ ZPRÁV

Údaje

47. Údaje získané ve zkoušce za použití jednotlivých tkáňových replikátů (např. hodnoty OD / plochy píku formazanu MTT a vypočítané údaje procentuální životaschopnosti tkání za zkoušenou chemickou látku a kontrolní látku a konečná predikce zkušební metody RhCE) by se měly vykazovat ve formě tabulky za každou zkoušenou chemickou látku, popřípadě včetně údajů z opakovaných zkoušek. Kromě toho by se za každou jednotlivou zkoušenou chemickou látku a kontrolní látku měla uvést

střední percentuální životaschopnost tkáně a rozdíl životaschopnosti mezi dvěma tkáňovými replikáty (jestliže $n = 2$ replikované tkáně) nebo SD (jestliže $n \geq 3$ replikované tkáně). Za každou zkoušenou chemickou látku je třeba uvést všechny pozorované interference zkoušené chemické látky s měřením formazanu MTT ve formě přímé redukce MTT anebo barevné interference.

Závěrečná zpráva

48. Závěrečná zpráva by měla obsahovat tyto informace:

Zkoušená chemická látka

Jednosložková látka:

- Chemická identifikace, např. název (názvy) IUPAC nebo CAS, číslo (čísla) CAS, kód SMILES nebo InChI, strukturní vzorec a/nebo jiné identifikátory,
- skupenství, těkavost, pH, logP, molekulová hmotnost, chemická třída a další důležité fyzikálně-chemické vlastnosti podstatné pro provedení studie, a to v rozsahu, v jakém jsou tyto informace dostupné,
- čistota, případně chemická identita nečistot, je-li to prakticky proveditelné atd.,
- případné ošetření před zkoušením (např. zahřívání, mletí),
- podmínky skladování a stabilita, v rozsahu, v jakém jsou tyto informace dostupné.

Vícesložková látka, UVCB a směs:

- Charakterizovaná v co možná největší míře např. chemickou identitou (viz výše), čistotou, kvantitativním výskytem a důležitými fyzikálně-chemickými vlastnostmi (viz výše) složek, v rozsahu, v jakém jsou tyto informace dostupné,
- skupenství a další důležité fyzikálně-chemické vlastnosti podstatné pro provedení studie, a to v rozsahu, v jakém jsou tyto informace dostupné,
- čistota, případně chemická identita nečistot, je-li to prakticky proveditelné atd.,
- případné ošetření před zkoušením (např. zahřívání, mletí),
- podmínky skladování a stabilita, v rozsahu, v jakém jsou tyto informace dostupné.

Látky pozitivní a negativní kontroly

- Chemická identifikace, např. název (názvy) IUPAC nebo CAS, číslo (čísla) CAS, kód SMILES nebo InChI, strukturní vzorec a/nebo jiné identifikátory,

- skupenství, těkavost, molekulová hmotnost, chemická třída a další důležité fyzikálně-chemické vlastnosti podstatné pro provedení studie, a to v rozsahu, v jakém jsou tyto informace dostupné,
- čistota, případně chemická identita nečistot, je-li to prakticky proveditelné atd.,
- případné ošetření před zkoušením (např. zahřívání, mletí),
- podmínky skladování a stabilita, v rozsahu, v jakém jsou tyto informace dostupné,
- zdůvodnění použití jiné negativní kontroly než ultračisté H₂O, případně DPBS bez Ca²⁺/Mg²⁺,
- zdůvodnění případného použití jiné pozitivní kontroly než čistého methyl-acetátu,
- odkaz na dosavadní výsledky pozitivních a negativních kontrol prokazující vhodnost kritérií přijatelnosti provedení.

Informace týkající se zadavatele a zkušebního zařízení

- Jméno a adresa zadavatele, zkušebního zařízení a vedoucího studie.

Použitý model tkáňové konstrukce RhCE a protokol (případně s uvedením zdůvodnění jejich volby)

Podmínky zkušební metody

- Použitá tkáňová konstrukce RhCE, včetně čísla šarže,
- (případně) vlnová délka a pásmová propustnost použitá pro kvantifikaci formazanu MTT a rozsah linearitu měřicího zařízení (např. spektrofotometru),
- popis metody použité pro kvantifikaci formazanu MTT,
- případně popis použitého HPLC/UPLC spektrofotometrického systému,
- úplné podklady ke konkrétní použité tkáňové konstrukci RhCE včetně jejího chování při zkoušce. Ty by měly zejména zahrnovat:
 - i) řízení kvality životaschopnosti (dodavatel);
 - ii) životnost za podmínek zkušební metody (dodavatel);
 - iii) řízení kvality bariérové funkce;
 - iv) morfologii, je-li k dispozici;
 - v) reprodukovatelnost a prediktivní schopnost;
 - vi) jiné údaje o řízení kvality tkáňové konstrukce RhCE, jsou-li k dispozici,
- odkaz na dosavadní údaje tkáňové konstrukce RhCE. Měl by zejména zahrnovat: přijatelnost údajů z kontrol kvality s odkazem na dosavadní údaje o šaržích,

- prohlášení, že zkoušející zařízení prokázalo způsobilost při používání zkušební metody před rutinním použitím otestováním vhodných chemických látek.

Kritéria přijatelnosti provedení zkoušky

- Střední hodnoty pozitivních a negativních kontrol a rozpětí přijatelnosti založené na porovnání s historickými údaji,
- přijatelná variabilita mezi tkáňovými replikáty pro pozitivní a negativní kontroly,
- přijatelná variabilita mezi tkáňovými replikáty pro zkoušenou chemickou látku.

Postup zkoušky

- Podrobnosti použitého zkušebního postupu,
- dávky zkoušené chemické látky a použitých kontrolních látek,
- doba a teplota expozice, doba poexpozičního ponoření a (případně) doba poexpoziční inkubace,
- popis všech úprav zkušebního postupu,
- přehled kontrol použitých pro látky, které přímo redukují MTT, případně pro zbarvující zkoušené chemické látky,
- počet tkáňových replikátů použitých na jednu zkoušenou chemickou látku a kontroly (pozitivní kontrola, negativní kontrola a NSMTT, případně NSC_{living} a NSC_{killed}).

Výsledky

- Tabulka s údaji o jednotlivých zkoušených chemických látkách a kontrolách pro každé provedení zkoušky (případně včetně opakovaných experimentů) a každé měření replikátů včetně hodnoty OD nebo plochy píku formazanu MTT, procentuální životaschopnosti tkáně, střední procentuální životaschopnosti tkáně, rozdílu mezi replikáty nebo směrodatnými odchylkami a konečné predikce,
- případně výsledky kontrol použitých pro přímá redukční činidla MTT anebo zbarvené zkoušené chemické látky včetně hodnot OD nebo plochy píku formazanu MTT, %NSMTT, %NSC_{living}, %NSC_{killed}, rozdílu mezi tkáňovými replikáty nebo směrodatnými odchylkami, konečné korigované procentuální životaschopnosti tkáně a konečné predikce,
- výsledky získané u zkoušených chemických látek a kontrolních látek ve vztahu k definovaným kritériím přijatelnosti provedení zkoušky,
- popis ostatních pozorovaných účinků, např. zbarvení tkání zbarvenou zkoušenou chemickou látkou.

Diskuse o výsledcích

Závěr

LITERATURA

- (1) UN (2015). United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). ST/SG/AC.10/30/Rev.6, Sixth Revised Edition, New York and Geneva: United Nations. Dostupné na webových stránkách:
http://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev06/English/ST-SG-AC10-30-Rev6e.pdf.
- (2) Kapitola B.5 této přílohy, Akutní dráždivé/leptavé účinky na oči.
- (3) Kapitola B.47 této přílohy, Zkušební metoda pro zákal a propustnost rohovky u skotu pro zjišťování i) chemických látek vyvolávajících vážné poškození očí a ii) chemických látek, které není nutné klasifikovat jako látky mající dráždivé účinky na oči nebo vyvolávající vážné poškození očí.
- (4) Kapitola B.48 této přílohy, Zkušební metoda odděleného kuřecího oka pro zjišťování i) chemických látek vyvolávajících vážné poškození očí a ii) chemických látek, které není nutné klasifikovat.
- (5) Kapitola B.61 této přílohy, Zkušební metoda průniku fluoresceinu ke zjišťování látek s leptavými a silně dráždivými účinky na oči.
- (6) Kapitola B.68 této přílohy, Zkušební metoda využívající krátkodobou expozici *in vitro* pro zjišťování i) chemických látek vyvolávajících vážné poškození očí a ii) chemických látek, které není nutné klasifikovat jako látky mající dráždivé účinky na oči nebo vyvolávající vážné poškození očí.
- (7) Freeman, S.J., Alépée N., Barroso, J., Cole, T., Compagnoni, A., Rubingh, C., Eskes, C., Lammers, J., McNamee, P., Pfannenbecker, U., Zuang, V. (2010). Prospective Validation Study of Reconstructed Human Tissue Models for Eye Irritation Testing. *ALTEX* 27, Special Issue 2010, 261-266.
- (8) EC EURL-ECVAM (2014). The EURL ECVAM - Cosmetics Europe prospective validation study of Reconstructed human Cornea-like Epithelium (RhCE)-based test methods for identifying chemicals not requiring classification and labelling for serious eye damage/eye irritation: Validation Study Report. EUR 28125 EN; doi:10.2787/41680. Dostupné na webových stránkách:
<http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC100280>.
- (9) EURL ECVAM Science Advisory Committee (2014). ESAC Opinion on the EURL ECVAM Eye Irritation Validation Study (EIVS) on EpiOcularTM EIT and SkinEthicTM HCE and a related Cosmetics Europe study on HPLC/UPLC-spectrophotometry as an alternative endpoint detection system for MTT-formazan. ESAC Opinion No 2014-03 of 17 November 2014; EUR

28173 EN; doi: LX 46 10,2787/043697. Dostupné na webových stránkách: <http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC103702>.

- (10) Alépée, N., Leblanc, V., Adriaens, E., Grandidier, M.H., Lelièvre, D., Meloni, M., Nardelli, L., Roper, C.S, Santirocco, E., Toner, F., Van Rompay, A., Vinall, J., Cotovio, J. (2016). Multi-laboratory validation of SkinEthic HCE test method for testing serious eye damage/eye irritation using liquid chemicals. *Toxicol. In Vitro* 31, 43-53.
- (11) Alépée, N., Adriaens, E., Grandidier, M.H., Meloni, M., Nardelli, L., Vinall, C.J., Toner, F., Roper, C.S, Van Rompay, A.R., Leblanc, V., Cotovio, J. (2016). Multi-laboratory evaluation of SkinEthic HCE test method for testing serious eye damage/eye irritation using solid chemicals and overall performance of the test method with regard to solid and liquid chemicals testing. *Toxicol. Chem. In Vitro* 34, 55-70.
- (12) EURL ECVAM Science Advisory Committee (2016). ESAC Opinion on the SkinEthic™ Human Corneal Epithelium (HCE) Eye Irritation Test (EIT). ESAC Opinion No 2016-02 of 24 June 2016; EUR 28175 EN; doi : LX 46 10,2787/390390. Dostupné na webových stránkách: <http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC103704>.
- (13) EC EURL-ECVAM (2016). Recommendation on the Use of the Reconstructed human Cornea-like Epithelium (RhCE) Test Methods for Identifying Chemicals not Requiring Classification and Labelling for Serious Eye Damage/Eye Irritation According to UN GHS. (Návrh).
- (14) Draize, J.H., Woodard, G., Calvery, H.O. (1944). Methods for the Study of Irritation and Toxicity of Substances Applied Topically to the Skin and Mucous Membranes. *Journal of Pharmacol. and Exp. Therapeutics* 82, 377-390.
- (15) Scott, L., Eskes, C., Hoffmann, S., Adriaens, E., Alépée, N., Bufo, M., Clothier, R., Facchini, D., Faller, C., Guest, R., Harbell, J., Hartung, T., Kamp, H., Le Varlet, B., Meloni, M., McNamee, P., Osborne, R., Pape, W., Pfannenbecker, U., Prinsen, M., Seaman, C., Spielman, H., Stokes, W., Trouba, K., Van den Berghe, C., Van Goethem, F., Vassallo, M., Vinardell, P., Zuang, V. (2010). A Proposed Eye Irritation Testing Strategy to Reduce and Replace *In Vivo* Studies Using Bottom-Up and Top-Down Approaches. *Toxicol. In Vitro* 24, 1-9.
- (16) Mosmann, T. (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J. Immunol. Methods* 65, 55-63.
- (17) OECD (2016). Series on Testing and Assessment No 216: Performance Standards for the Assessment of Proposed Similar or Modified *In Vitro* Reconstructed Human Cornea-Like Epithelium (RhCE) Test Methods for

Identifying Chemicals not Requiring Classification and Labelling for Eye Irritation or Serious Eye Damage, Based on the Validated Reference Methods EpiOcular™ EIT and SkinEthic™ HCE EIT described in TG 492. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

- (18) OECD (2005). Series on Testing and Assessment No 34: Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (19) Kaluzhny, Y., Kandárová, H., Hayden, P., Kubilus, J., d'Argembeau-Thornton, L., Klausner, M. (2011). Development of the EpiOcular™ Eye Irritation Test for Hazard Identification and Labelling of Eye Irritating Chemicals in Response to the Requirements of the EU Cosmetics Directive and REACH Legislation. *Altern. Lab. Anim.* 39, 339-364.
- (20) Nguyen, D.H., Beuerman, R.W., De Wever, B., Rosdy, M. (2003). Three-dimensional construct of the human corneal epithelium for in vitro toxicology. In: Salem, H., Katz, S.A. (Eds), *Alternative Toxicological Methods*, CRC Press, pp. 147-159.
- (21) Pfannenbecker, U., Bessou-Touya, S., Faller, C., Harbell, J., Jacob, T., Raabe, H., Tailhardat, M., Alépée, N., De Smedt, A., De Wever, B., Jones, P., Kaluzhny, Y., Le Varlet, B., McNamee, P., Marrec-Fairley, M., Van Goethem, F. (2013). Cosmetics Europe multi-laboratory pre-validation of the EpiOcular™ reconstituted Human Tissue Test Method for the Prediction of Eye Irritation. *Toxicol. Chem. In Vitro* 27, 619-626.
- (22) Alépée, N., Bessou-Touya, S., Cotovio, J., de Smedt, A., de Wever, B., Faller, C., Jones, P., Le Varlet, B., Marrec-Fairley, M., Pfannenbecker, U., Tailhardat, M., van Goethem, F., McNamee, P. (2013). Cosmetics Europe Multi-Laboratory Pre-Validation of the SkinEthic™ Reconstituted Human Corneal Epithelium Test Method for the Prediction of Eye Irritation. *Toxicol. Chem. In Vitro* 27, 1476-1488.
- (23) Kolle, S.N., Moreno, M.C.R., Mayer, W., van Cott, A., van Ravenzwaay, B., Landsiedel, R. (2015). The EpiOcular™ Eye Irritation Test is the Method of Choice for *In Vitro* Eye Irritation Testing of Agrochemical Formulations: Correlation Analysis of EpiOcular™ Eye Irritation Test and BCOP Test Data to UN GHS, US EPA and Brazil ANIVSA Classifications. *Altern. Lab. Anim.* 43, 1-18.
- (24) Adriaens, E., Barroso, J., Eskes, C., Hoffmann, S., McNamee, P., Alépée, N., Bessou-Touya, S., De Smedt, A., De Wever, B., Pfannenbecker, U., Tailhardat, M., Zuang, V. (2014). Retrospective Analysis of the Draize Test for Serious Eye Damage/Eye Irritation: Importance of Understanding the *In Vivo* Endpoints Under UN GHS/EU CLP for the Development and Evaluation of *In Vitro* Test Methods. *Arch. Toxicol.* 88, 701-723.

- (25) Barroso, J., Pfannenbecker, U., Adriaens, E., Alépée, N., Cluzel, M., De Smedt, A., Hibatallah, J., Klaric, M., Mewes, K.R., Millet, M., Templier, M., McNamee, P. (2017). Cosmetics Europe compilation of historical serious eye damage/eye irritation *in vivo* data analysed by drivers of classification to support the selection of chemicals for development and evaluation of alternative methods/strategies: the Draize eye test Reference Database (DRD). *Arch. Toxicol.* 91, 521-547.
- (26) Meloni, M., De Servi, B., Marasco, D., Del Prete, S. (2011). Molecular mechanism of ocular surface damage: Application to an *in vitro* dry eye model on human corneal epithelium. *Molecular Vision* 17, 113-126.
- (27) Hackett, R.B., McDonald, T.O. (1991). Eye Irritation. In *Advances in Modern Toxicology: Dermatoxicology* Marzulli F.N. and Maibach H.I. (Eds.), 4th Edition, pp. 749–815. Washington, DC, USA: Hemisphere Publishing Corporation.
- (28) Fox, D.A., Boyes, W.K. (2008). Toxic Responses of the Ocular and Visual System. In Cassaret and Doull's *Toxicology: The Basic Science of Poisons* Klaassen C.D.(Ed.), 7th Edition, pp. 665–697. Withby, ON, Canada: McGraw-Hill Ryerson.
- (29) Jester, J.V., Li, H.F., Petroll, W.M., Parker, R.D., Cavanagh, H.D., Carr, G.J., Smith, B., Maurer, J.K. (1998). Area and Depth of Surfactant Induced Corneal Injury Correlates with Cell Death. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 39, 922-936.
- (30) Maurer, J.K., Parker, R.D., Jester, J.V. (2002). Extent of Corneal Injury as the Mechanistic Basis for Ocular Irritation: Key Findings and Recommendations for the Development of Alternative Assays. *Reg. Tox. Pharmacol.* 36, 106-117.
- (31) Jester, J.V., Li, L., Molai, A., Maurer, J.K. (2001). Extent of Corneal Injury as a Mechanistic Basis for Alternative Eye Irritation Tests. *Toxicol. Chem. In Vitro* 15, 115–130.
- (32) Jester, J.V., Petroll, W.M., Bean, J., Parker, R.D., Carr, G.J., Cavanagh, H.D., Maurer, J.K. (1998). Area and Depth of Surfactant-Induced Corneal Injury Predicts Extent of Subsequent Ocular Responses. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 39, 2610-2625.
- (33) Jester, J.V. (2006). Extent of Corneal Injury as a Biomarker for Hazard Assessment and the Development of Alternative Models to the Draize Rabbit Eye Test. *Cutan. Ocul. Toxicol.* 25, 41-54.
- (34) EpiOcular™ EIT SOP, Version 8 (March 05, 2013). EpiOcular™ EIT for the Prediction of Acute Ocular Irritation of Chemicals. Dostupné na

webových stránkách: [https://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/beta/index.cfm/methodsAndProtocols/index].

- (35) SkinEthic™ HCE EIT SOP, Version 1. (July 20, 2015). SkinEthic™ HCE Eye Irritation Test (EITL for Liquids, EITS for Solids) for the Prediction of Acute Ocular Irritation of Chemicals. Dostupné na webových stránkách: <https://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/beta/index.cfm/methodsAndProtocols/index>.
- (36) Alépée, N., Barroso, J., De Smedt, A., De Wever, B., Hibatallah, J., Klaric, M., Mewes, K.R., Millet, M., Pfannenbecker, U., Tailhardat, M., Templier, M., McNamee, P. (2015). Use of HPLC/UPLC-Spectrophotometry for Detection of Formazan in *In Vitro* Reconstructed Human Tissue (RhT)-Based Test Methods Employing the MTT-Reduction Assay to Expand their Applicability to Strongly Coloured Test Chemicals. *Toxicol. In Vitro* 29, 741-761.
- (37) Kaluzhny, Y., Kandárová, H., Handa, Y., DeLuca, J., Truong, T., Hunter, A., Kearney, P., d'Argembeau-Thornton, L., Klausner, M. (2015). EpiOcular™ Eye Irritation Test (EIT) for Hazard Identification and Labeling of Eye Irritating Chemicals: Protocol Optimization for Solid Materials and Extended Shipment Times. *Altern. Lab Anim.* 43, 101-127.
- (38) US FDA (2001). Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration. May 2001. Dostupné na webových stránkách: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070107.pdf>.
- (39) OECD (2017). Guidance Document on an Integrated Approaches on Testing and Assessment for Serious Eye Damage and Eye irritation. Series on Testing and Assessment No. 263. ENV Publications, Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

Dodatek 1

DEFINICE

Přesnost: Přesnost shody mezi výsledky zkušební metody a přijatými referenčními hodnotami. Je to míra funkčnosti zkušební metody a jeden z aspektů její „relevantnosti“. Tento pojem se často používá místo pojmu „soulad“ a rozumí se jím podíl správných výsledků zkušební metody (18).

Srovnávací chemická látka: Látka použitá jako norma pro srovnání se zkoušenou látkou. Srovnávací látka by měla mít tyto vlastnosti: i) neměnný a spolehlivý zdroj (zdroje) pro její určení a charakterizaci; ii) podobnost se strukturou, funkcí anebo chemickou či produktovou třídou se zkoušenou chemickou látkou (látkami); iii) známé fyzikálněchemické vlastnosti; iv) podklady ke známým účinkům; a v) známé účinky v rozsahu žádoucí reakce.

Přístup „zdola nahoru“: Postupný přístup používaný u zkoušených chemických látek, u nichž se předpokládá, že je není nutné klasifikovat a označovat jako látky mající dráždivé účinky na oči nebo vyvolávající vážné poškození očí, který začíná odlišením chemických látek, u nichž není nutná klasifikace a označení (negativní výsledek), od ostatních chemických látek (pozitivní výsledek).

Chemická látka: Látka nebo směs.

Soulad: Viz „přesnost“.

Rohovka: Průhledná přední část oční bulvy, která zahrnuje duhovku a zornici a propouští světlo dovnitř oka.

CV: Variační koeficient.

Dev: Odchylka.

EIT: Zkouška dráždivosti pro oči.

EURL-ECVAM: Referenční laboratoř EU pro alternativy ke zkouškám na zvířatech.

Podráždění očí: Vyvolání změn na oku po aplikaci zkoušené chemické látky na přední plochu oka, které jsou plně vratné do 21 dní od aplikace. Tento pojem je zaměnitelný s výrazy „vratné účinky na oko“ a „kategorie 2 GHS OSN/CLP“.

ET₅₀: Doba expozice potřebné k tomu, aby se životaschopnost tkáně snížila o 50 % po aplikaci referenční chemické látky v pevně stanovené koncentraci.

Míra falešné negativity: Podíl všech pozitivních látek falešně zjištěných zkušební metodou jako negativní. Je to jeden z ukazatelů výsledku zkušební metody.

Míra falešné positivity: Podíl všech negativních látek falešně zjištěných zkušební metodou jako pozitivní. Je to jeden z ukazatelů výsledku zkušební metody.

Nebezpečnost: Základní charakteristika látky nebo situace, která má potenciál vyvolat nepříznivé účinky, jsou-li organismus, systém nebo (sub)populace vystaveny této látce.

HCE: SkinEthic™ Human Corneal Epithelium (lidský rohovkový epitel).

HPLC: Vysokoučinná kapalinová chromatografie

IC₅₀: Koncentrace, při níž referenční chemická látka snižuje životaschopnost tkání o 50 % po pevně stanovené době expozice (např. 30minutová expozice SDS).

Nekonečná dávka: Množství zkušební látky nanesené na tkáňovou konstrukci RhCE, které přesahuje množství potřebné k úplnému a rovnoměrnému pokrytí epitelového povrchu.

Nevratné účinky na oči: Viz „vážené poškození očí“.

LLOQ: Dolní mez kvantifikace.

logP: Logaritmus rozdělovacího koeficientu oktanol/voda

Směs: Směs nebo roztok složený ze dvou nebo více látek.

Jednosložková látka: Látka definovaná svým kvantitativním složením, v níž je přítomna jedna hlavní složka v míře alespoň 80 % hmot.

Vícesložková látka: Látka definovaná svým kvantitativním složením, v níž je přítomna více než jedna hlavní složka v koncentraci ≥ 10 % hmot. a < 80 % hmot. Vícesložková látka je výsledkem výrobního procesu. Rozdíl mezi směsí a vícesložkovou látkou spočívá v tom, že směs se získá smísením dvou nebo více látek bez chemické reakce. Vícesložková látka je výsledkem chemické reakce.

MTT: 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyl-2H-tetrazolium-bromid; thiazolylová modř tetrazolium-bromid.

Negativní kontrola: Vzorek obsahující všechny složky zkušebního systému a látku, o níž je známo, že nezpůsobuje pozitivní odpověď ve zkušebním systému. Tento vzorek se zpracovává se vzorky zkoušené chemické látky a jinými kontrolními vzorky a používá se na stanovení 100% životaschopnosti.

Neklasifikované: Chemické látky, které nejsou klasifikované jako látky mající dráždivé účinky na oči (kategorie 2 GHS OSN/CLP, kategorie 2A nebo 2B GHS OSN) nebo jako látky vyvolávající vážné poškození očí (kategorie 1 GHS OSN/CLP). Tento pojem je zaměnitelný s pojmem „bez kategorie GHS OSN/CLP“.

NSC_{killed}: Nespecifická barva u neživých tkání.

NSC_{living}: Nespecifická barva u živých tkání.

NSMTT: Nespecifická redukce MTT.

OD: Optická hustota.

Standardy funkčnosti: Standardy založené na validované referenční metodě, která je považována za vědecky platnou, jež slouží jako základ pro hodnocení srovnatelnosti navrhované zkušební metody, která je mechanicky a funkčně podobná. Zahrnují se: i) zásadní složky zkušební metody; ii) minimální seznam srovnávacích látek vybraných z chemických látek používaných k prokázání přijatelné funkčnosti validované referenční metody a iii) srovnatelné hladiny přesnosti a spolehlivosti založené na hodnotách získaných u validované referenční metody, jež by navrhovaná zkušební metoda měla prokázat při vyhodnocení za použití minimálního seznamu srovnávacích látek (18).

Pozitivní kontrola: Vzorek obsahující všechny složky zkušebního systému a látku, o níž je známo, že způsobuje pozitivní odpověď ve zkušebním systému. Tento vzorek se zpracovává se vzorky zkoušené chemické látky a jinými kontrolními vzorky. Aby se zajistilo, že proměnlivost v reakci na pozitivní kontrolu v čase bude možné vyhodnotit, rozsah pozitivní reakce by neměl být nadměrný.

Relevantnost: Popis vztahu zkoušky k účinku, který je předmětem zájmu, a také toho, zda je zkouška smysluplná a použitelná pro konkrétní účel. Vyjadřuje, do jaké míry zkouška správně měří nebo predikuje biologický účinek, který je předmětem zájmu. Relevantnost zahrnuje také posouzení přesnosti (shody) zkušební metody (18).

Spolehlivost: Měření rozsahu, v jakém může být zkušební metoda časem reprodukovatelná v laboratořích a mezi laboratořemi, když se provádí s použitím stejného protokolu. Hodnotí se to výpočtem laboratorní a mezilaboratorní reprodukovatelnosti a laboratorní opakovatelnosti (18).

Náhradní zkouška: Zkouška, která je koncipována tak, aby nahradila běžně používanou a uznávanou zkoušku, která slouží k určení nebezpečnosti a/nebo posouzení rizika a u níž je zjištěno, že poskytuje stejnou nebo lepší úroveň ochrany zdraví lidí nebo zvířat či případně ochrany životního prostředí ve srovnání s uznávanou zkouškou ve všech možných zkušebních situacích a pro všechny zkoušené chemické látky (18).

Reprodukovatelnost: Shoda mezi výsledky získanými při opakovaném zkoušení téže zkoušené chemické látky za použití stejného zkušebního protokolu (viz „spolehlivost“) (18).

Vratné účinky na oči: Viz „dráždivé účinky na oči“.

RhCE: Rekonstruovaný epitel podobný lidské rohovce.

Provedení zkoušky: Jedna či více zkoušených chemických látek se zkouší současně s negativní kontrolou a s pozitivní kontrolou.

SD: Směrodatná odchylka.

Citlivost: Podíl všech pozitivních/aktivních zkoušených látek, které jsou na základě

zkoušky správně klasifikovány. Je měřítkem přesnosti zkušební metody, která poskytuje kategorické výsledky, a je důležitým prvkem při hodnocení relevantnosti zkušební metody (18).

Vážné poškození očí: Tvorba poškození tkání v oku nebo závažné fyzikální slábnutí vidění po aplikaci zkoušené látky na přední plochu oka, které není plně vratné do 21 dní od aplikace. Tento pojem je zaměnitelný s výrazy „nevratné účinky na oči“ a „kategorie 1 GHS OSN a CLP“.

Standardní pracovní postupy (SOP): Formální písemné postupy, které podrobně popisují, jak se mají vykonávat konkrétní rutinní laboratorní operace a operace při konkrétních zkouškách. Jsou vyžadovány podle správné laboratorní praxe.

Specifičnost: Podíl všech negativních/neaktivních zkoušených látek, které jsou na základě zkoušky správně klasifikovány. Je měřítkem přesnosti zkušební metody, která poskytuje kategorické výsledky, a je důležitým prvkem při hodnocení relevantnosti zkušební metody (18).

Látka: Chemický prvek a jeho sloučeniny v přírodním stavu nebo získané výrobním postupem, včetně jakýchkoliv aditiv potřebných pro zachování stability výrobku a všech nečistot pocházejících z použitého postupu, ale s vyloučením všech rozpouštědel, která je možno oddělit bez ovlivnění stability dané látky nebo změny jejího složení.

Zkouška: Jedna zkoušená chemická látka, která byla souběžně zkoušena na minimálně dvou tkáňových replikátech příslušným standardním pracovním postupem.

Životaschopnost tkáně: Parametr, kterým se měří celková aktivita buněčné populace v rekonstruované tkáni jako její schopnost redukovat vitální barvivo MMT a který v závislosti na měřeném jevu a na použitém uspořádání zkoušky koreluje s celkovým počtem a/nebo vitalitou živých buněk.

Přístup „shora dolů“: Postupný přístup používaný u chemických látek, u nichž se předpokládá, že způsobují vážné poškození očí, který začíná odlišením chemických látek vyvolávajících vážné poškození očí (pozitivní výsledek) od jiných chemických látek (negativní výsledek).

Zkoušená chemická látka: Jakákoli látka nebo směs zkoušená touto zkušební metodou.

Strategie postupného zkoušení: Strategie zkoušení po krocích, při které se zkušební metody využívají postupně. Všechny existující informace o zkoušené chemické látce se přezkoumávají na každém stupni s použitím hodnocení závažnosti důkazů, aby se zjistilo, zda jsou k dispozici dostačující informace pro rozhodnutí o klasifikaci nebezpečnosti, než se postoupí do dalšího stupně strategie. Pokud potenciál/intenzita nebezpečnosti zkoušené chemické látky lze určit na základě existujících informací na daném stupni, další zkoušení není nutné (18).

ULOQ: Horní mez kvantifikace.

Globálně harmonizovaný systém klasifikace a označování chemických látek Organizace spojených národů (GHS OSN): Systém navrhující klasifikaci chemických látek (látek a směsí) podle standardizovaných typů a úrovní fyzikálních, zdravotních a environmentálních nebezpečí a řešící příslušné komunikační prvky, jako jsou piktogramy, signální slova, výroky o nebezpečí, výroky o bezpečnostních opatřeních a bezpečnostní datové listy, které obsahují informace o jejich nežádoucích účincích s ohledem na ochranu lidí (včetně zaměstnavatelů, zaměstnanců, přepraveců, spotřebitelů a osob reagujících na havárie) a životního prostředí (1).

Kategorie 1 podle GHS OSN/CLP: Viz „vážené poškození očí“.

Kategorie 2 podle GHS OSN/CLP: Viz „dráždivé účinky na oči“.

Bez kategorie GHS OSN/CLP: Chemické látky, které nesplňují požadavky na klasifikaci v kategorii 1 nebo 2 GHS OSN/CLP (2A nebo 2B GHS OSN). Tento pojem je zaměnitelný s výrazem „neklasifikované“.

UPLC: Vysokoúčinná kapalinová chromatografie.

UVCB: Látky s neznámým nebo proměnlivým složením, komplexní reakční produkty nebo biologický materiál.

Validovaná zkušební metoda: Zkušební metoda, u níž se má za to, že je dostatečně relevantní a spolehlivá pro určitý účel, a která je založena na vědecky spolehlivých zásadách. Zkušební metoda není nikdy validovaná v absolutním smyslu, ale pouze pro určitý konkrétní účel (18).

Validovaná zkušební metoda: Zkušební metoda, u níž byly provedeny validační studie k určení její relevantnosti (včetně přesnosti) a spolehlivosti pro konkrétní účel. Je důležité si uvědomit, že validovaná zkušební metoda nemusí mít dostatečnou funkčnost, pokud jde o přesnost a spolehlivost, aby mohla být shledána přijatelnou pro navrhovaný účel (18).

VRM: Validovaná referenční metoda.

VRM1: EpiOcular™ EIT se nazývá validovaná referenční metoda 1.

VRM2: SkinEthic™ HCE EIT se nazývá validovaná referenční metoda 2.

Váha důkazů: Postup zvažování silných a slabých stránek různých informací v dosahování a podpoře závěru týkajícího se potenciálu nebezpečnosti zkoušené látky.

Dodatek 2

HLAVNÍ SLOŽKY ZKOUŠEK RHCE VALIDOVANÝCH PRO STANOVENÍ CHEMICKÝCH LÁTEK, KTERÉ NEVYŽADUJÍ KLASIFIKACI A OZNAČENÍ JAKO LÁTKY MAJÍCÍ DRÁŽDIVÉ ÚČINKY NA OČI NEBO VYVOLÁVAJÍCÍ VÁŽNÉ POŠKOZENÍ OČÍ

Složky zkoušky	EpiOcular™ EIT (VRM 1)		SkinEthic™ HCE EIT (VRM 2)	
	Kapaliny (pipetovatelné při $37 \pm 1^\circ\text{C}$ nebo nižších teplotách po dobu 15 min)	Pevné látky (nepipetovatelné)	Kapaliny a viskózní látky (pipetovatelné)	Pevné látky (nepipetovatelné)
Protokoly				
Povrch modelu	0,6 cm ²	0,6 cm ²	0,5 cm ²	0,5 cm ²
Počet tkáňových replikátů	nejméně 2	nejméně 2	nejméně 2	nejméně 2
Předběžná kontrola na barevnou interferenci	50 µl + 1 ml H₂O po dobu 60 min. při $37 \pm 2^\circ\text{C}$, $5 \pm 1\%$ CO₂, $\geq 95\%$ RH (nezbarvené zkoušené chemické látky) nebo 50 µl + 2 ml isopropylalkoholu míchaného po dobu 2–3 hod. při pokojové teplotě (zbarvené zkoušené chemické látky) → jestliže je OD zkoušené chemické látky při vlnové délce 570 ± 20 nm po odečtení OD isopropylalkoholu nebo vody $> 0,08$ (což odpovídá přibližně 5 % střední OD negativní kontroly), je třeba provést upravené kontroly na živé tkáni.	50 mg + 1 ml H₂O po dobu 60 min. při $37 \pm 2^\circ\text{C}$, $5 \pm 1\%$ CO₂, $\geq 95\%$ RH (nezbarvené zkoušené chemické látky) a/nebo 50 mg + 2 ml isopropylalkoholu míchaného po dobu 2–3 hod. při pokojové teplotě (zbarvené i nezbarvené zkoušené chemické látky) → jestliže je OD zkoušené chemické látky při vlnové délce 570 ± 20 nm po odečtení OD isopropylalkoholu nebo vody $> 0,08$ (což odpovídá přibližně 5 % střední OD negativní kontroly), je třeba provést upravené kontroly na živé tkáni.	10 µl + 90 µl H₂O mícháno po dobu 30 ± 2 min. při pokojové teplotě (RT, 18–28°C) → jestliže se zkoušená chemická látka zbarví, je třeba provést upravené kontroly na živé tkáni	10 mg + 90 µl H₂O mícháno po dobu 30 ± 2 min. při pokojové teplotě → jestliže se zkoušená chemická látka zbarví, je třeba provést upravené kontroly na živé tkáni

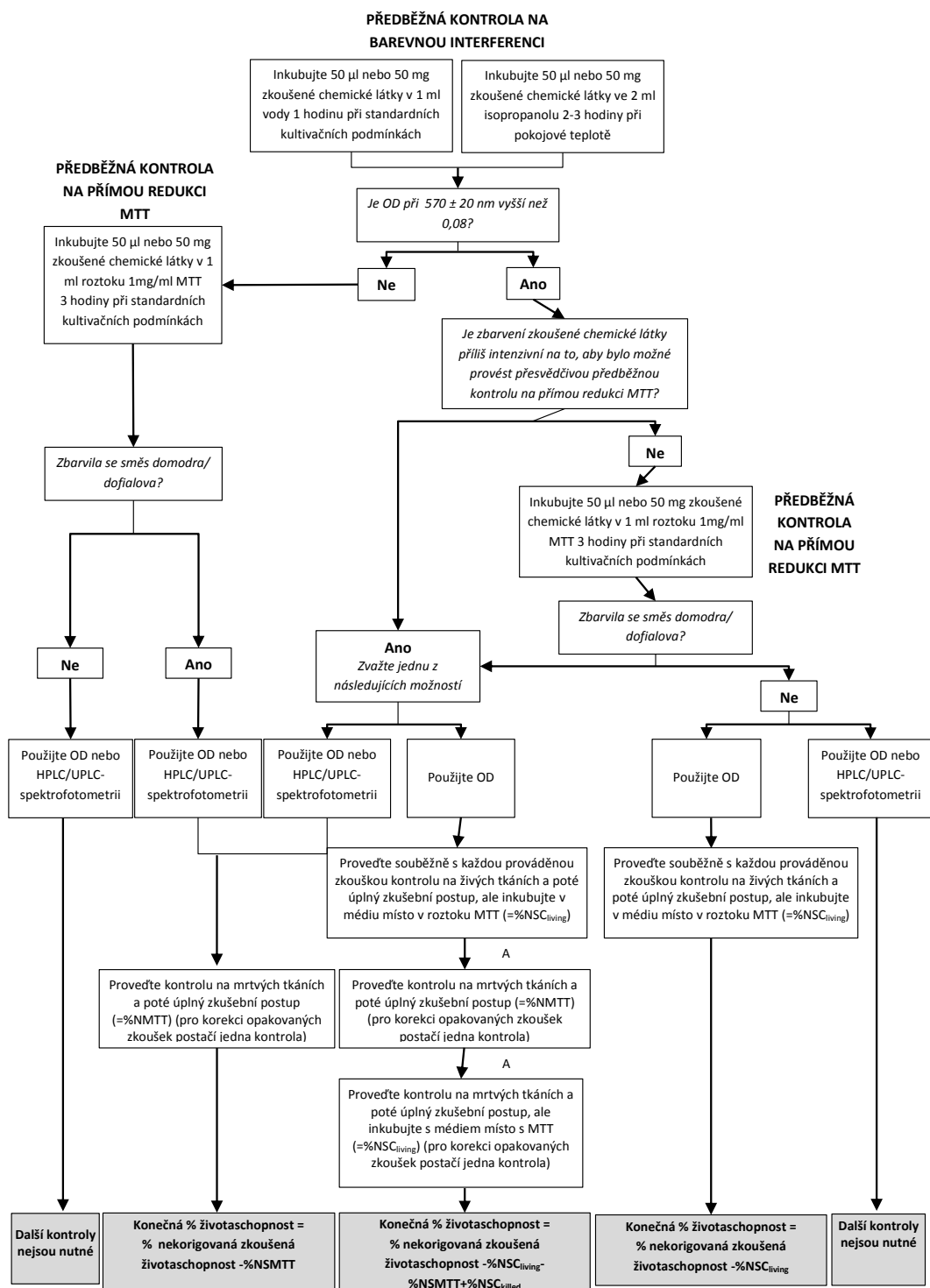
Složky zkoušky	EpiOcular™ EIT (VRM 1)		SkinEthic™ HCE EIT (VRM 2)	
Předběžná kontrola na přímou redukci MTT	50 µl + 1 ml MTT 1 mg/ml roztoku po dobu 180 ± 15 min při 37 ± 2°C, 5 ± 1% CO ₂ , ≥ 95% RH → jestliže roztok zmodrá/zfialoví, je třeba provést upravené kontroly na tkáni usmrcené zmrazením (jako negativní kontrola se používá 50 µl sterilní deionizované vody v roztoku MTT)	50 mg + 1 ml MTT 1 mg/ml roztoku po dobu 180 ± 15 min při 37 ± 2°C, 5 ± 1% CO ₂ , ≥ 95% RH → jestliže roztok zmodrá/zfialoví, je třeba provést upravené kontroly na tkáni usmrcené zmrazením (jako negativní kontrola se používá 50 µl sterilní deionizované vody v roztoku MTT)	30 µl + 300 µl MTT 1 mg/ml roztoku po dobu 180 ± 15 min při 37 ± 2°C, 5 ± 1% CO ₂ , ≥ 95% RH → jestliže roztok zmodrá/zfialoví, je třeba provést upravené kontroly na tkáni usmrcené vodou (jako negativní kontrola se používá 30 µl sterilní deionizované vody v roztoku MTT)	30 mg + 300 µl MTT 1 mg/ml roztoku po dobu 180 ± 15 min při 37 ± 2°C, 5 ± 1% CO ₂ , ≥ 95% RH → jestliže roztok zmodrá/zfialoví, je třeba provést upravené kontroly na tkáni usmrcené vodou (jako negativní kontrola se používá 30 µl sterilní deionizované vody v roztoku MTT)
Předběžné ošetření	20 µl Ca ²⁺ /Mg ²⁺ bez DPBS po dobu 30 ± 2 min při 37 ± 2°C, 5 ± 1% CO ₂ , ≥ 95% RH, chráněno před světlem.	20 µl Ca ²⁺ /Mg ²⁺ bez DPBS po dobu 30 ± 2 min při 37 ± 2°C, 5 ± 1% CO ₂ , ≥ 95% RH, chráněno před světlem.	-	-
Experimentální dávky a aplikace	50 µl (83,3 µl/cm ²)	50 mg (83,3 mg/cm ²) pomocí kalibrovaného nástroje (např. zarovnaná kalibrovaná odměrka s obsahem 50 mg chloridu sodného).	10 µl Ca ²⁺ /Mg ²⁺ bez DPBS + 30 ± 2 µl (60 µl/cm ²) U viskózních látek použijte nylonovou síťku	30 µl Ca ²⁺ /Mg ²⁺ bez DPBS + 30 ± 2 mg (60 mg/cm ²)
Doba a teplota expozice	30 min (± 2 min) v kultivačním médiu při 37 ± 2°C, 5 ± 1% CO ₂ , ≥ 95% RH	6 hodin (± 0,25 hod.) v kultivačním médiu při 37 ± 2°C, 5 ± 1% CO ₂ , ≥ 95% RH	30 min (± 2 min) v kultivačním médiu při 37 ± 2°C, 5 ± 1% CO ₂ , ≥ 95% RH	4 hodiny (± 0,1 hod.) v kultivačním médiu při 37 ± 2°C, 5 ± 1% CO ₂ , ≥ 95% RH
Propláchnutí při pokojové teplotě	3krát ve 100 ml DPBS bez Ca ²⁺ /Mg ²⁺	3krát ve 100 ml DPBS bez Ca ²⁺ /Mg ²⁺	20 ml DPBS bez Ca ²⁺ /Mg ²⁺	25 ml DPBS bez Ca ²⁺ /Mg ²⁺
Ponoření po expozici	12 min (± 2 min) při pokojové teplotě v kultivačním médiu	25 min (± 2 min) při pokojové teplotě v kultivačním médiu	30 min (± 2 min) při 37 °C, 5% CO ₂ , 95% RH v kultivačním médiu	30 min (± 2 min) při pokojové teplotě v kultivačním médiu

Složky zkoušky	EpiOcular™ EIT (VRM 1)		SkinEthic™ HCE EIT (VRM 2)	
Inkubace po expozici	120 min (± 15 min) v kultivačním médiu při $37 \pm 2^\circ\text{C}$, $5 \pm 1\%$ CO_2 , $\geq 95\%$ RH	18 hod. ($\pm 0,25$ hod.) v kultivačním médiu při $37 \pm 2^\circ\text{C}$, $5 \pm 1\%$ CO_2 , $\geq 95\%$ RH	žádná	18 hod. ($\pm 0,5$ hod.) v kultivačním médiu při $37 \pm 2^\circ\text{C}$, $5 \pm 1\%$ CO_2 , $\geq 95\%$ RH
Negativní kontrola	50 μl H_2O Zkoušeno současně	50 μl H_2O Zkoušeno současně	DPBS bez $30 \pm 2\mu\text{l}$ $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ Zkoušeno současně	DPBS bez $30 \pm 2\mu\text{l}$ $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ Zkoušeno současně
Pozitivní kontrola	50 μl methylacetátu Zkoušeno současně	50 μl methylacetátu Zkoušeno současně	$30 \pm 2\mu\text{l}$ methylacetátu Zkoušeno současně	$30 \pm 2\mu\text{l}$ methylacetátu Zkoušeno současně
Roztok MTT	300 μl 1 mg/ml	300 μl 1 mg/ml	300 μl 1 mg/ml	300 μl 1 mg/ml
Doba inkubace MTT a teplota	180 min (± 15 min) při $37 \pm 2^\circ\text{C}$, $5 \pm 1\%$ CO_2 , $\geq 95\%$ RH	180 min (± 15 min) při $37 \pm 2^\circ\text{C}$, $5 \pm 1\%$ CO_2 , $\geq 95\%$ RH	180 min (± 15 min) při $37 \pm 2^\circ\text{C}$, $5 \pm 1\%$ CO_2 , $\geq 95\%$ RH	180 min (± 15 min) při $37 \pm 2^\circ\text{C}$, $5 \pm 1\%$ CO_2 , $\geq 95\%$ RH
Extrakční rozpouštědlo	2 ml isopropylalkoholu (extrakce z horní a dolní části vložky propíchnutím tkáně)	2 ml isopropylalkoholu (extrakce z horní a dolní části vložky propíchnutím tkáně)	1,5 ml isopropylalkoholu (extrakce z horní a dolní části vložky)	1,5 ml isopropylalkoholu (extrakce z dolní části vložky)
Doba a teplota extrakce	2–3 hod. s protřepáváním (~ 120 ot./min.) při pokojové teplotě nebo přes noc při $4\text{--}10^\circ\text{C}$	2–3 hod. s protřepáváním (~ 120 ot./min.) při pokojové teplotě nebo přes noc při $4\text{--}10^\circ\text{C}$	4 hod. s protřepáváním (~ 120 ot./min.) při pokojové teplotě nebo alespoň přes noc bez protřepávání při $4\text{--}10^\circ\text{C}$	Alespoň 2 hod. s protřepáváním (~ 120 rpm) při pokojové teplotě
Odečet OD	570 nm (550–590 nm) bez referenčního filtru	570 nm (550–590 nm) bez referenčního filtru	570 nm (540–600 nm) bez referenčního filtru	570 nm (540–600 nm) bez referenčního filtru
Kontrola tkání kvality	Expozice za použití 100 μl 0,3% (obj.) přípravku Triton X-100 $12,2 \text{ min} \leq \text{ET}_{50} \leq 37,5 \text{ min}$	Expozice za použití 100 μl 0,3% (obj.) přípravku Triton X-100 $12,2 \text{ min} \leq \text{ET}_{50} \leq 37,5 \text{ min}$	30 min. expozice za použití SDS (50 μl) $1,0 \text{ mg/ml} \leq \text{IC}_{50} \leq 3,5 \text{ mg/ml}$	30 min. expozice za použití SDS (50 μl) $1,0 \text{ mg/ml} \leq \text{IC}_{50} \leq 3,2 \text{ mg/ml}$

Složky zkoušky	EpiOcular™ EIT (VRM 1)		SkinEthic™ HCE EIT (VRM 2)	
Kritéria přijatelnosti	1. Střední hodnota OD tkáňových replikátů vystavených působení negativní kontroly by měla být $> 0,8$ a $< 2,5$. 2. Střední životaschopnost tkáňových replikátů vystavených působení pozitivní kontroly po dobu 30 minut, vyjádřeno jako % negativní kontroly, by měla být < 50 %. 3. Rozdíl životaschopnosti mezi dvěma tkáňovými replikáty by měl být menší než 20 %.	1. Střední hodnota OD tkáňových replikátů vystavených působení negativní kontroly by měla být $> 0,8$ a $< 2,5$. 2. Střední životaschopnost tkáňových replikátů vystavených působení pozitivní kontroly po dobu 6 hodin, vyjádřeno jako % negativní kontroly, by měla být < 50 %. 3. Rozdíl životaschopnosti mezi dvěma tkáňovými replikáty by měl být menší než 20 %.	1. Střední hodnota OD tkáňových replikátů vystavených působení negativní kontroly by měla být $> 1,0$ a $\leq 2,5$. 2. Střední životaschopnost tkáňových replikátů vystavených působení pozitivní kontroly po dobu 30 minut, vyjádřeno jako % negativní kontroly, by měla být ≤ 30 %. 3. Rozdíl životaschopnosti mezi dvěma tkáňovými replikáty by měl být menší než 20 %.	1. Střední hodnota OD tkáňových replikátů vystavených působení negativní kontroly by měla být $> 1,0$ a $\leq 2,5$. 2. Střední životaschopnost tkáňových replikátů vystavených působení pozitivní kontroly po dobu 4 hodin, vyjádřeno jako % negativní kontroly, by měla být ≤ 20 %. 3. Rozdíl životaschopnosti mezi dvěma tkáňovými replikáty by měl být menší než 20 %.

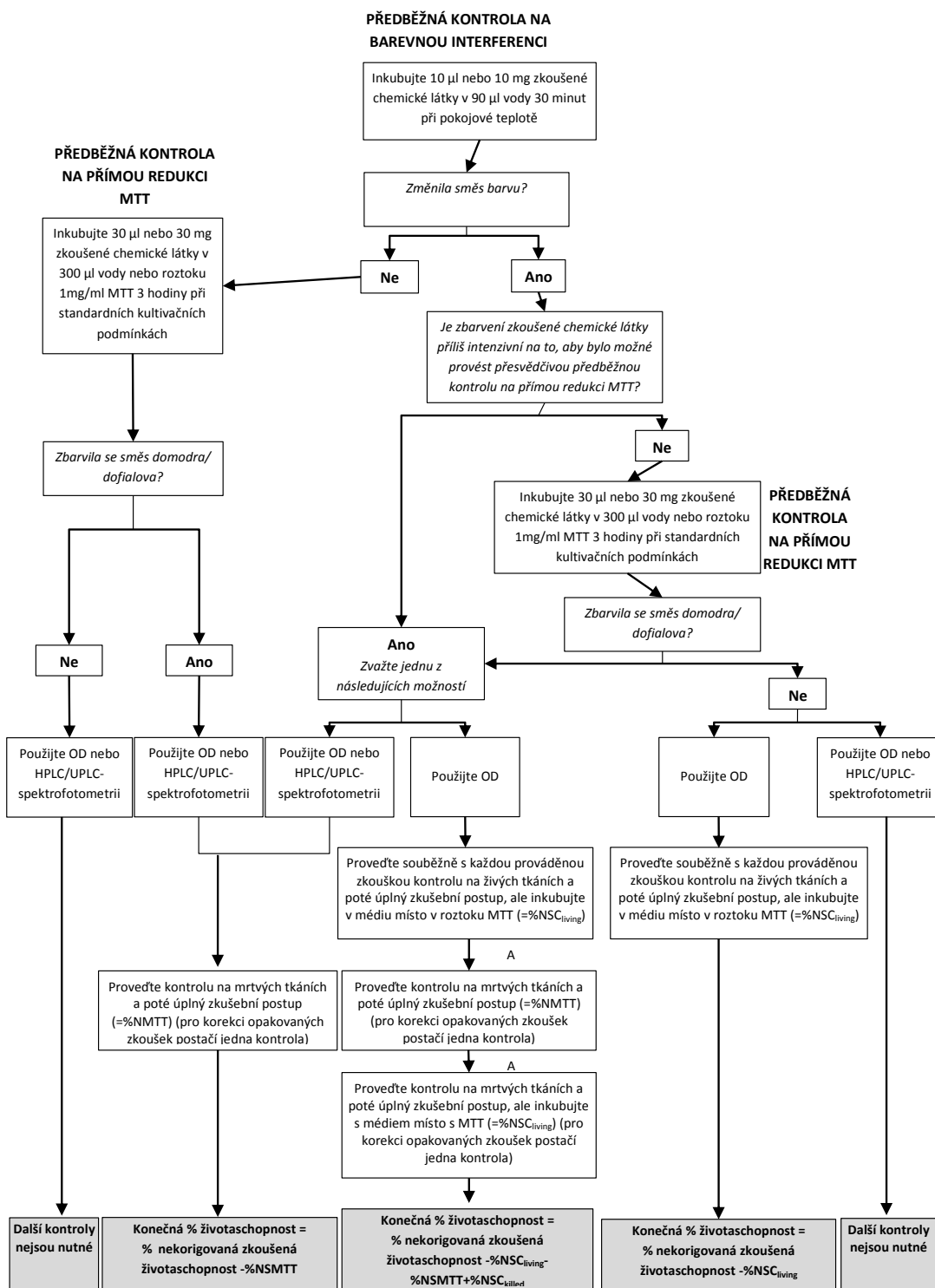
Dodatek 3

GRAF ILUSTRUJÍCÍ IDENTIFIKACI A NAKLÁDÁNÍ S PŘÍMÝMI REDUKČNÍMI ČINIDLY MTT ANEBE BAREVNĚ INTERFERUJÍCÍMI CHEMICKÝMI LÁTKAMI NA ZÁKLADĚ STANDARDNÍHO PRACOVNÍHO POSTUPU PRO VRM1



Dodatek 4

**GRAF ILUSTRUJÍCÍ IDENTIFIKACI A NAKLÁDÁNÍ S PŘÍMÝMI REDUKČNÍMI
ČINIDLY MTT ANEBO BAREVNĚ INTERFERUJÍCÍMI CHEMICKÝMI LÁTKAMI NA
ZÁKLADĚ STANDARDNÍHO PRACOVNÍHO POSTUPU PRO VRM2**



Dodatek 5

KLÍČOVÉ PARAMETRY A KRITÉRIA PŘIJATELNOSTI PRO ZPŮSOBILOST SPEKTROFOTOMETRICKÉHO SYSTÉMU HPLC/UPLC PRO MĚŘENÍ FORMAZANU MTT EXTRAHOVANÉHO Z TKÁŇOVÝCH KONSTRUKCÍ RHCE

Parametr	Protokol vycházející z pokynu FDA (36)(38)	Kritéria přijatelnosti
Selektivita	Analýza isopropylalkoholu, slepý pokus s živou tkání (isopropylalkoholový extrakt z tkáňových konstrukcí RhCE bez jakékoli expozice), slepý pokus s neživou tkání (isopropylalkoholový extrakt z tkáňových konstrukcí RhCE bez jakékoli expozice), a analýza barviva (např. methylenová modř)	$\text{plocha}_{\text{interference}} \leq 20 \% \text{ plochy}_{\text{LLOQ}}^1$
Přesnost	Kontroly kvality (tj. formazan MTT při 1,6 µg/ml, 16 µg/ml a 160 µg/ml) v isopropylalkoholu (n = 5)	CV ≤ 15 % nebo ≤ 20 % pro LLOQ
Přesnost	Kontroly kvality v isopropylalkoholu (n = 5)	%Dev ≤ 15 % nebo ≤ 20 % pro LLOQ
Vlivy matrice	Kontroly kvality ve slepém pokusu s živou tkání (n = 5)	85 % ≤ % matricového jevu ≤ 115 %
Únik	Analýza isopropylalkoholu po standardu ULOQ ²	$\text{plocha}_{\text{interference}} \leq 20 \% \text{ plochy}_{\text{LLOQ}}$
Reprodukovatelnost (v rámci dne)	3 nezávislé kalibrační křivky (vycházející z 6 postupných třetinových ředění formazanu MTT v isopropylalkoholu s počátkem při ULOQ, tj. 200 µg/ml); Kontroly kvality v isopropylalkoholu (n = 5)	Kalibrační křivky: %Dev ≤ 15 % nebo ≤ 20 % pro LLOQ Kontroly kvality: %Dev ≤ 15 % a CV ≤ 15 %
Reprodukovatelnost (v rámci dne)	Den 1: 1 kalibrační křivka a kontroly kvality v isopropylalkoholu (n = 3) Den 2: 1 kalibrační křivka a kontroly kvality v isopropylalkoholu (n = 3) Den 3: 1 kalibrační křivka a kontroly kvality v isopropylalkoholu (n = 3)	
Krátkodobá stabilita formazanu MTT v tkáňovém extraktu RhCE	Kontroly kvality ve slepém pokusu s živou tkání (n = 3) analyzované v den přípravy a po 24 hodinách uložení při pokojové teplotě	
Dlouhodobá stabilita formazanu MTT v tkáňovém extraktu RhCE, v případě potřeby	Kontroly kvality ve slepém pokusu s živou tkání (n = 3) analyzované v den přípravy a po Několika dnech uložení při –20°C	%Dev ≤ 15 %

¹ LLOQ: Dolní mez kvantifikace, definovaná, aby postihla 1–2% tkáňovou životaschopnost, tj. 0,8 µg/ml.

² ULOQ: Horní mez kvantifikace, definovaná tak, aby byla alespoň dvakrát vyšší než nejvyšší očekávaná koncentrace formazanu MTT v isopropylalkoholových extraktech z negativních kontrol (~70 µg/ml ve VRM), tj. 200 µg/ml.

B.70 ZKOUŠKA *IN VITRO* S VYUŽITÍM REKOMBINANTNÍCH ESTROGENOVÝCH RECEPTORŮ NA DETEKCI CHEMICKÝCH LÁTEK S VAZEBNOU AFINITOU NA ER

VŠEOBECNÝ ÚVOD

Pokyn OECD vycházející z funkční způsobilosti

1. Tato zkušební metoda odpovídá pokynu OECD pro zkoušení (TG) 493 (2015). Pokyn č. 493 je pokyn vycházející z funkční způsobilosti (PBTG), který popisuje metodiku lidských rekombinantních analýz *in vitro* na detekci látek s vazebnou afinitou na estrogenové receptory (analýzy vazby hrER). Skládá se ze dvou mechanisticky a funkčně podobných analýz pro zjištění látek, které se vážou na estrogenový receptor (tj. ER α), a měl by usnadnit vypracování nových podobných nebo modifikovaných analýz podle zásad pro validaci stanovených v dokumentu OECD o validaci a mezinárodním uznání nových nebo aktualizovaných zkušebních metod pro posuzování nebezpečnosti (1). Plně validovanými referenčními zkušebními metodami (dodatek 2 a dodatek 3), které představují základ pro tuto metodiku vycházející z funkční způsobilosti, jsou:
 - Freyberger-Wilsonova (FW) *in vitro* analýza vazby na estrogenové receptory (ER) s využitím celého lidského rekombinantního ER α (2) a
 - *in vitro* analýza vazby na estrogenové receptory s využitím lidského rekombinantního proteinu s ligand vázající doménou Ústavu pro hodnocení a výzkum chemických látek (CERI) (2).

K dispozici jsou standardy funkčnosti (PS) (3), které usnadňují vývoj a validaci podobných zkušebních metod pro stejné riziko a umožňují včasnou změnu pokynu PBTG 493, aby mohly být do aktualizovaného pokynu přidány nové podobné analýzy. Podobné analýzy však budou přidány až po kontrole a dohodě s OECD, že splňují standardy funkčnosti. Analýzy zařazené do pokynu 493 mohou být použity libovolně pro řešení požadavků členských zemí OECD na výsledky zkoušek na vazbu na estrogenové receptory při využití vzájemného uznávání údajů podle postupu dohodnutého v rámci OECD.

Obecné informace a principy analýz zahrnutých do této zkušební metody

2. V roce 1998 zahájila OECD činnost vysoké priority, jejíž podstatou je revize stávajících a vytvoření nových pokynů pro screening a zkoušení potenciálních endokrinních disruptorů. V roce 2012 byl revidován koncepční rámec OECD pro zkoušky a hodnocení potenciálních endokrinních disruptorů. Původní i revidovaný koncepční rámec je uveden v přílohách standardizovaných pokynů pro zkoušení a posuzování endokrinních disruptorů (*Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption*) (4). Koncepční rámec je tvořen pěti úrovněmi, které odpovídají různým

úrovním biologické komplexnosti. Analýzy vazby na ER popsané v této zkušební metodě představují úroveň 2, která zahrnuje „analýzy *in vivo* poskytující údaje o vybraných endokrinních mechanizmech/drahách“. Tato zkušební metoda je v testech vazby ligandu na receptor *in vitro* určena na zjištění ligandů na lidský estrogenový receptor alfa (ER α).

3. Relevance testu vazby ER *in vitro* pro biologické funkce byla jasně prokázána. Testy vazby ER jsou určeny k identifikaci chemických látek, které mají potenciál narušit dráhu estrogenových hormonů a v posledních dvou desetiletích se široce používají pro charakterizaci distribuce ER v tkáních, jakož i pro identifikaci agonistů/antagonistů ER. Tyto testy odrážejí interakci mezi ligandem a receptorem, což je první krok estrogenové signální dráhy, který je zásadně důležitý pro reprodukční funkci všech obratlovců.
4. Interakce estrogenů s estrogenovými receptory může ovlivnit transkripci estrogenem kontrolovaných genů a indukovat negenomové účinky, což může vést k indukci nebo inhibici buněčných procesů, včetně procesů nezbytných pro buněčnou proliferaci, normální vývoj plodu a reprodukční funkci (5)(6)(7). Narušení normálních estrogenních systémů může spustit nežádoucí účinky v oblasti normálního vývoje (ontogeneze), reprodukčního zdraví a správné funkce reprodukčního systému. Nesprávná signalizace ER může vést k takovým účinkům, jako je zvýšené riziko hormonálně dependentního karcinomu, narušení plodnosti a změny růstu a vývoje plodu (8).
5. Analýzy vazby *in vitro* vycházejí z přímé interakce látky s vazebným místem ligandu na specifický receptor, který reguluje transkripci genu. Hlavní složka testu vazby lidského rekombinantního estrogenového receptoru alfa (hrER α) měří schopnost radioizotopově značeného ligandu ([³H]17 β -estradiol) vázat se na ER v přítomnosti zvyšujících se koncentrací zkoušené chemické látky (tj. kompetitor). Zkoušené chemické látky, které mají vysokou afinitu na ER, konkurují radioizotopově značenému ligandu při nižší koncentraci v porovnání s chemickými látkami s nižší afinitou na tento receptor. Tato analýza sestává ze dvou hlavních složek: saturačního vazebného experimentu za účelem charakterizace parametrů interakce mezi receptorem a ligandem a dokumentace specifčnosti ER, po němž následuje kompetitivní vazebný experiment, který charakterizuje kompetici mezi zkoušenou chemickou látkou a radioizotopově značeným ligandem ve vazbě na ER.
6. Validační studie vazebných analýz CERI a FW prokázaly jejich relevanci a spolehlivost pro zamýšlený účel (2).
7. Definice a zkratky používané v této zkušební metodě jsou popsány v dodatku 1.

Platnost a omezení testů vazby ligandu na receptor

8. Tyto analýzy jsou navrženy pro účely screeningu a stanovení priorit, ale mohou také poskytovat informace o molekulární iniciační události (MIE), které lze použít při analýze průkaznosti výsledků. Týkají se chemické vazby na doménu ER α vázající ligand v systému

in vitro. Výsledky proto nelze přímo extrapolovat na komplexní signalizaci a regulaci intaktního endokrinního systému *in vivo*.

9. Vazba přirozeného ligandu, 17 β -estradiolu, je prvním krokem v sérii molekulárních událostí, který aktivuje transkripci cílových genů a nakonec vrcholí fyziologickou změnou (9). Vazba na doménu ER α vázající ligand se tedy považuje za jeden z klíčových mechanismů narušení endokrinního systému (ED) mediovaneho ER, i když existují i jiné mechanismy, jejichž prostřednictvím může k tomuto narušení dojít, včetně i) interakcí s místy ER α jinými, než je kapsa vázající ligand, ii) interakcí s jinými receptory relevantními pro estrogenovou signalizaci, ER β a estrogenovým receptorem spřaženým s G-proteinem, jinými receptory a enzymatickými systémy v endokrinním systému, iii) syntézy hormonů, iv) metabolické aktivace anebo inaktivace hormonů, v) distribuce hormonů do cílových tkání a vi) clearance hormonů z těla. Žádná z analýz podle této zkušební metody se nezabývá těmito způsoby účinku.
10. Tato zkušební metoda se zabývá schopností látek vázat se na lidský ER α , ale nerozlišuje mezi agonisty a antagonisty ER α . Tyto analýzy neřeší další události v řetězci, jako je genová transkripce nebo fyziologické změny. Vzhledem k tomu, že při validaci byly použity pouze jednotlivé jednosložkové látky, nebyla řešena použitelnost na zkoušené směsi. Analýzy jsou však teoreticky použitelné i na zkoušení vícesložkových látek a směsí. Před použitím této zkušební metody ke zkoušení směsi s cílem získat údaje pro zamýšlené regulační účely by mělo být zváženo, zda tato metoda může pro tento účel poskytnout přiměřené výsledky, a pokud ano, proč je tomu tak. Takové úvahy nejsou nutné, pokud existuje právní požadavek na zkoušení dané směsi.
11. Receptorové systémy bez buněk nemají žádnou vnitřní metabolickou kapacitu a nebyly validovány v kombinaci s metabolickými enzymatickými systémy. Mohlo by však být možné začlenit metabolickou aktivitu do plánu studie, ale vyžadovalo by to další práci v oblasti validace.
12. Chemické látky, které by mohly protein (tj. receptorový protein) denaturovat, jako jsou povrchově aktivní látky nebo chemické látky, které mohou změnit pH zkušebního pufru, nesmí být testovány nebo mohou být testovány pouze při koncentracích, které tyto interakce vylučují. Jinak je rozsah koncentrací, které mohou být zkoušeny v testech zkoušené chemické látky, omezen na její rozpustnost ve zkušebním pufru.
13. V tabulce 1 jsou pro informaci uvedeny výsledky testu 24 látek, které byly zkoušeny oběma plně validovanými analýzami popsány v této zkušební metodě. Z těchto látek je na základě publikovaných zpráv, včetně analýz *in vitro* na transkripční aktivaci ER anebo uterotrofní analýzy, 17 klasifikováno jako ER vázající látky a 6 jako ER nevážající látky (9)(10)(11)(12)(13)(14)(15). Pokud jde o údaje uvedené v tabulce 1, byla mezi oběma analýzami u klasifikace všech látek do 10⁻⁴ M téměř 100% shoda, přičemž každá látka byla správně klasifikována jako ER vázající nebo nevážající. Doplňkové informace o této

skupině látek i o dalších látkách zkoušených v analýzách vazby ER v průběhu validačních studií jsou uvedeny ve standardech funkčnosti pro analýzu vazby hrER (3), dodatek 2 (tabulky 1, 2 a 3).

Tabulka 1: Klasifikace látek vázajících a nevazajících se na ER při zkoušení pomocí analýz vazby na hrER FW a CERI v porovnání s očekávanou odpovědí

	Název látky	CASR N	Předpokládaná odpověď	Analýza FW		Analýza CERI		MESH Chemická třída	Třída produktu
				Koncentrace Rozsah (M)	Klasifikace	Koncentrace Rozsah (M)	Klasifikace		
1	17β-estradiol	50-28-2	váže se	$1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-6}$	váže se	$1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-6}$	váže se	Steroid	Léčivý přípravek, veterinární látka
2	Norethynodrel	68-23-5 Org.	váže se	$3 \times 10^{-9} - 30 \times 10^{-4}$	váže se	$3 \times 10^{-9} - 30 \times 10^{-4}$	váže se	Steroid	Léčivý přípravek, veterinární látka
3	Norethindron	68-22-4	váže se	$3 \times 10^{-9} - 30 \times 10^{-4}$	váže se	$3 \times 10^{-9} - 30 \times 10^{-4}$	váže se	Steroid	Léčivý přípravek, veterinární látka
4	Di-n-butylftalát	84-74-2	neváže se*	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-4}$	neváže se**	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-4}$	neváže se**	Uhlovodík (cyklický), ester	Plastifikátor, chemický meziprodukt
5	DES	56-53-1	váže se	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	váže se	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	váže se	Uhlovodík (cyklický), fenol	Léčivý přípravek, veterinární látka
6	17α-ethynylestradiol	57-63-6	váže se	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	váže se	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	váže se	Steroid	Léčivý přípravek, veterinární látka
7	Meso-Hexestrol	84-16-2	váže se	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	váže se	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	váže se	Uhlovodík (cyklický), fenol	Léčivý přípravek, veterinární látka
8	Genistein	446-72-0	váže se	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	váže se	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	váže se	Uhlovodík (heterocyklický), flavonoid	Přírodní produkt
9	Equol	531-95-3	váže se	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	váže se	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	váže se	Fytoestrogenový metabolit	Přírodní produkt
10	Butylparaben (n butyl-4-hydroxybenzoan)	94-26-8	váže se	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	váže se	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	váže se	Paraben	Konzervant
11	Nonylfenol (směs)	84852-15-3	váže se	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	váže se	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	váže se	Alkylfenol	Meziprodukt
12	o,p'-DDT	789-02-6	váže se	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	váže se	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	váže se	Organochlor	Insekticid
13	Kortikosteron	50-22-6	neváže se*	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-4}$	neváže se	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-4}$	neváže se	Steroid	Přírodní produkt
14	Zearalenon	17924-92-4 Org.	váže se	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	váže se	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	váže se	Uhlovodík (heterocyklický), lakton	Přírodní produkt
15	Tamoxifen	10540-29-1	váže se	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	váže se	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	váže se	Uhlovodík (cyklický)	Léčivý přípravek, veterinární látka
16	5α-dihydrotestosteron	521-18-6	váže se	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	váže se	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	váže se	Steroid, nefenolový	Přírodní produkt
17	Bisfenol A	80-05-7	váže se	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	váže se	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	váže se	Fenol	Chemický meziprodukt
18	4-n-heptylphenol	1987-50-4	váže se	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	neurčitě ^a	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	váže se	Alkylfenol	Meziprodukt
19	Kepon (Chlordecon)	143-50-0	váže se	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	váže se	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	váže se	Uhlovodík (halogenovaný)	Pesticid

20	Benzo(a)anthracen	56-55-3	neváže se	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	neváže se ^b	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	neváže se ^b	Aromatický uhloводík	Meziprodukt
21	Enterolakton	78473-71-9	váže se	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	váže se	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	váže se	Fytoestrogen	Přírodní produkt
22	Progesteron	57-83-0	neváže se*	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-4}$	neváže se	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-4}$	neváže se	Steroid	Přírodní produkt
23	Oktyltriethoxysilan	2943-75-1	neváže se	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	neváže se	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	neváže se	Silan	Povrchový modifikátor
24	Atrazin	1912-24-9	neváže se*	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-4}$	neváže se	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-4}$	neváže se	Heterocyklická sloučenina	Herbicid

*Mez rozpustnosti $< 1 \times 10^{-4}$ M.

*Použití klasifikace di-n-butylftalátu (DBP) jako látky, která se neváže, vycházelo ze zkoušení do 10^{-4} M, protože v některých laboratořích bylo v průběhu předvalidačních studií pozorováno, že látka je nerozpustná při 10^{-3} M (např. zákal).

† V průběhu validační studie byl di-n-butylftalát (DBP) testován jako zakódovaná zkoušená látka při koncentracích do 10^{-3} M. Za těchto podmínek bylo v některých laboratořích pozorováno snížení vazby radioligandu při nejvyšší koncentraci (10^{-3} M) anebo nejednoznačné vynesení křivky. V těchto provedeních zkoušky byl DBP klasifikován v 3/5 laboratořích, které použily analýzu CERL, a v 5/6 laboratořích, které použily analýzu FW, jako „neurčitý“ nebo „váže se“ (viz odkaz (2), části IV.B.3a,b a VI.A).

^a Klasifikace neodpovídala očekávané klasifikaci. Vzhledem ke klasifikaci 4-n-heptylfenolu jako „neurčitý“ nebo „váže se“ v 3/5 laboratořích byla průměrná klasifikace neurčitá. Bližší kontrola odhalila, že to bylo způsobeno omezením chemické rozpustnosti, což zabránilo vzniku celé vazebné křivky.

^b Při předvalidační studii byl benz(a)antracen přefazován mezi látky, které se nevážou (tj. negativní), a to na základě zveřejněné literatury prokazující, že estrogení aktivita *in vitro* uváděná u této látky (16) závisí primárně na její metabolické aktivaci (17)(18). Enzymatická metabolická aktivace látky by se v nebuněčných analýzách vazby na hrER použitých v této mezivalidační studii nepředpokládala. Správná klasifikace této látky tedy je „neváže se“ při použití za experimentálních podmínek pro analýzy FW a CERL.

SLOŽKY VAZEBNÉ ANALÝZY hrER

Zásadní složky zkoušky

14. Tato zkušební metoda platí pro analýzy používající receptor ER a vhodný silný ligand na receptor, který může být použit jako marker/stopovací látka pro analýzu a se zvyšujícími se koncentracemi zkoušené chemické látky může být vytěsňen. Vazebné analýzy sestávají z těchto dvou hlavních složek: 1) saturační vazby a 2) kompetitivní vazby. Saturační vazebná analýza se používá na potvrzení specifčnosti a aktivity receptorových přípravků, zatímco kompetitivní vazebný experiment se používá na vyhodnocení schopnosti zkoušené chemické látky vázat se na hrER.

Kontroly

15. Je třeba popsat východisko pro navrhované souběžné referenční zkoušky s estrogenem a kontroly. Souběžné kontroly (rozpuštědlo (vehikulum), pozitivní (vazba na ER; silná a slabá afinita), negativní (neváže se)) slouží podle potřeby jako indikace, že analýza je za zkušebních podmínek funkční a poskytuje základ pro porovnání jednotlivých experimentů; obvykle jsou součástí kritérií přijatelnosti pro daný experiment (1). Při každém provedení zkoušky by měly být na jedné destičce použity celé křivky koncentrace pro referenční estrogen a kontroly (tj. slabá vazba a neváže se). Všechny ostatní destičky by měly

obsahovat: 1) vysokou (přibližně úplné vytěsnění radioizotopově značeného ligandu) a střední (přibližně IC_{50}) koncentraci každého E2 a látky se slabou vazbou, a to třikrát; 2) kontrolu s rozpouštědlem a látkou s nespecifickou vazbou, a to vždy třikrát.

Standardní postupy kontroly kvality

16. Standardní postupy řízení kvality by měly být prováděny tak, jak je popsáno pro každou analýzu, aby byly zajištěny aktivní receptory a správné koncentrace chemické látky a aby bylo zajištěno, že toleranční meze zůstanou u vícečetných replikátů stabilní a bude zachována schopnost podávat očekávané odpovědi vazby na ER v průběhu času.

Prokázání odborné způsobilosti laboratoře

17. Před zkoušením neznámých chemických látek pomocí některé z analýz v rámci této zkušební metody by měla každá laboratoř prokázat odbornou způsobilost v používání analýzy provedením saturačních zkoušek na potvrzení specifčnosti a aktivity přípravku ER a kompetitivních vazebných zkoušek s referenčním estrogenem a kontrolami (s látkou se slabou vazbou a látkou, která se neváže). Laboratoř by si měla vytvořit historickou databázi s výsledky za referenční estrogen a kontroly získanými z 3–5 nezávislých experimentů provedených v různé dny. Tyto experimenty budou základem pro referenční estrogen a historické kontroly pro tuto laboratoř a budou použity jako částečné hodnocení přijatelnosti analýzy pro budoucí zkoušky.
18. Odpovědi zkušebního systému budou potvrzeny také zkoušením vhodných látek uvedených v tabulce 2. Seznam vhodných látek představuje podmnožinu referenčních látek uvedených ve standardech funkčnosti pro analýzy vazby na ER (3). Tyto látky jsou komerčně dostupné, představují třídy chemických látek běžně souvisejících s vazebnou aktivitou na ER a vykazují vhodný rozsah síly očekávané od látek, které se vážou na ER (tj. silné až slabé), a látek, které se na ER nevážou (tj. negativní). U každé látky pro prokázání způsobilosti by měly zkoušené koncentrace zahrnovat rozmezí uvedené v tabulce 2. Pro každou látku by se měly provést alespoň tři experimenty a výsledky by měly být v souladu s očekávanou chemickou aktivitou. Každý experiment by se měl provádět nezávisle (tj. s čerstvými roztoky zředěného receptoru, chemickými látkami a reagensy), a to se třemi opakováními u každé koncentrace. Odborná způsobilost je prokázána správnou klasifikací (pozitivní/negativní) každé vhodné látky. Zkoušení odborné způsobilosti by měl provést každý technik, který se analýzy učí.

Tabulka 2: Seznam kontrolních látek a látek pro prokázání způsobilosti pro kompetitivní vazebné analýzy hrER¹

Č.	Název látky	CASRN ²	Předpokládaná odpověď ^{3,4}	Rozpětí zkušebních koncentrací (M)	Třída chemických látek MeSH ⁵	Třída produktu ⁶
Kontroly (referenční estrogen, slabá vazba, neváže se)						
1	17-εστραδιολ	50-28-2	váže se	$1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-6}$	Steroid	Léčivý přípravek, veterinární látka
2	Norethynodrel (nebo) Norethindron	68-23-5 (or) 68-22-4	váže se	$3 \times 10^{-9} - 30 \times 10^{-6}$	Steroid	Léčivý přípravek, veterinární látka
3	Oktyltriethoxysilan	2943-75-1	neváže se	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Silan	Povrchový modifikátor
Vhodné látky⁶						
4	Diethylstilbestrol	56-53-1	váže se	$1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-6}$	Uhlovodík (cyklický), fenol	Léčivý přípravek, veterinární látka
5	17α-ethynylestradiol	57-63-6	váže se	$1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-6}$	Steroid	Léčivý přípravek, veterinární látka
6	meso-Hexestrol	84-16-2	váže se	$1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-6}$	Uhlovodík (cyklický), fenol	Léčivý přípravek, veterinární látka
7	Tamoxifen	10540-29-1	váže se	$1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-6}$	Uhlovodík (cyklický)	Léčivý přípravek, veterinární látka
8	Genistein	446-72-0	váže se	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Heterocyklická sloučenina, flavonoid	Přírodní produkt
9	Bisfenol A	80-05-7	váže se	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Fenol	Chemický meziprodukt
10	Zearalonone	17924-92-4	váže se	$1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-3}$	Heterocyklická sloučenina, lakton	Přírodní produkt

11	Butylparaben	94-26-8	váže se	$1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-3}$	Kyselina karboxylová, fenol	Konzervant
12	Atrazin	1912-24-9	neváže se	$1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-6}$	Heterocyklická sloučenina	Herbicide
13	Di-n-butylftalát (DBP) ⁷	84-74-2	neváže se ⁸	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-4}$	Uhlovodík (cyklický), ester	Plastifikátor, chemický meziprodukt
14	Kortikosteron	50-22-6	neváže se	$1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-4}$	Steroid	Přírodní produkt

¹ Jestliže vhodná látka již není komerčně dostupná, může být použita látka se stejnou klasifikací vazby na ER, srovnatelnou silou a ze stejné chemické třídy.

² Zkratky: CASRN = registrační číslo CAS (Chemical Abstracts Service Registry Number)

³ Klasifikace jako látka, která se váže na ER α , nebo látka, která se neváže, v průběhu validační studie pro analýzy vazby na hrER CERI a FW (2).

⁴ Vazebná aktivita na ER vycházela z dokumentů výboru ICCVAM (BRD) pro analýzy vazby ER a TA (9) a z empirických údajů a dalších informací získaných ze zveřejněných a kontrolovaných citovaných studií (10)(11)(12)(13)(14)(15).

⁵ Látky byly zařazeny do jedné nebo několika chemických tříd s použitím klasifikačního systému Národní knihovny názvů léků a léčivých látek (MeSH), mezinárodně uznávané standardizované klasifikace (k dispozici na: <http://www.nlm.nih.gov/mesh>).

⁶ Látky byly zařazeny do jedné nebo několika produktových tříd podle databáze nebezpečných látek americké Národní knihovny léčiv (k dispozici na: <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB>).

⁷ DPB může být použit jako alternativní kontrola, která se neváže, zkoušená při maximální koncentraci 10^{-4} M.

⁸ Mez rozpustnosti pro tuto látku je 10^{-4} M. Použití klasifikace di-n-butylftalátu (DBP) jako látky, která se neváže, vycházelo ze zkoušení do 10^{-4} M, protože v některých laboratořích bylo v průběhu předvalidačních studií pozorováno, že látka je nerozpustná při 10^{-3} M (např. zákal).

Zkoušení rozpustnosti a stanovení rozsahu koncentrace pro zkoušené chemické látky

19. Měla by být provedena předběžná zkouška, aby bylo možné stanovit mez rozpustnosti pro každou zkoušenou chemickou látku a zjistit vhodný rozsah koncentrace, jenž má být použit při provádění zkoušky. Mez rozpustnosti každé zkoušené chemické látky se nejprve stanoví v rozpouštědle a dále potvrdí za zkušebních podmínek. Konečná koncentrace zkoušená při analýze by neměla překročit 1 nM. Zkoušení za účelem zjištění rozsahu sestává z kontroly s rozpouštědlem společně s osmi log-sériovými ředěními, počínaje maximální přijatelnou koncentrací (např. 1 mM nebo menší, na základě meze rozpustnosti), přičemž je třeba zaznamenat přítomnost zákalu nebo sraženiny. Při druhém a třetím experimentu by se měla podle potřeby upravit koncentrace, aby lépe charakterizovala křivku závislosti odpovědi na koncentraci.

Kritéria přijatelnosti provedení zkoušky

20. Přijetí nebo odmítnutí provedené zkoušky vychází z hodnocení výsledků získaných pro referenční estrogen a kontrolu použitou pro každý experiment. Za prvé, na destičce 1 by měly celé křivky koncentrace pro referenční kontroly z každého experimentu odpovídat mírám funkčnosti u parametrů vynesené křivky (např. IC_{50} a Hillův koeficient) podle výsledků uvedených pro příslušné protokoly pro analýzy CER1 a FW (dodatek 2 a 3) a dosavadních kontrolních dat z laboratoře provádějící zkoušku. Všechny kontroly (referenční estrogen, slabá vazba a neváže se) by měly být u každého experimentu správně klasifikovány. Za druhé, u kontrol na všech dalších destičkách je třeba posuzovat, zda odpovídají destičce 1. Mělo by být použito dostatečné rozmezí koncentrací, aby byl jednoznačně definován vrchol kompetitivní vazebné křivky. Variabilita mezi replikáty při každé koncentraci zkoušené chemické látky i mezi třemi nezávislými provedeními zkoušky by měla být přiměřená a vědecky obhajitelná. Schopnost konzistentního provedení analýzy by měla být prokázána vytvořením a údržbou historické databáze referenčního estrogenu a kontrol. Jako měřítko vnitrolaboratorní reprodukovatelnosti mohou být použity směrodatné odchylky (SD) nebo variační koeficienty (CV) pro střední hodnoty parametrů stanovené křivky referenčního estrogenu a slabé vazby z vícečetných experimentů. Při posuzování výsledků kontrol z každého provedení zkoušky i výsledků za každou zkoušenou chemickou látku je třeba postupovat s odborným úsudkem.

Kromě toho by měly být splněny tyto zásady, pokud jde o kritéria přijatelnosti:

- Údaje by měly postačovat na kvantitativní posouzení vazby na ER.
- Zkoušené koncentrace by měly zůstat v rozmezí rozpustnosti zkoušené chemické látky.

Analýza údajů

21. Stanovený postup analýzy údajů o nasycené a kompetitivní vazbě by měl odpovídat hlavním zásadám pro charakterizaci interakcí mezi receptorem a ligandem. Údaje o nasycené vazbě se obvykle analyzují pomocí nelineárního regresního modelu, který zohledňuje celkovou a

nespecifickou vazbu. Při určování $B_{\max}$ a K_d může být nutná korekce úbytku ligandu (např. Swillens, 1995 (19)). Data z kompetitivních vazebných analýz se obvykle transformují (např. procentuální specifická vazba a koncentrace zkoušené chemické látky ($\log M$)). Odhady $\log (IC_{50})$ za každou zkoušenou chemickou látku se stanoví pomocí vhodného softwaru pro nelineární vynesení křivky, aby byly vhodné pro čtyřparametrickou Hillovu rovnici. Po první analýze je třeba stanovit parametry vynesené křivky a vizuálně zkontrolovat, jak dobře vazebná data odpovídají generované kompetitivní vazebné křivce. V některých případech může být nutná další analýza, aby byl dosažen nejlepší tvar křivky (např. omezení horní anebo dolní části křivky, použití pravidla 10 %, viz dodatek 4 a odkaz 2 (oddíl III.A.2)).

22. Splnění kritérií přijatelnosti (odstavec 20) ukazuje, že systém funguje správně, ale nezaručuje to, že konkrétní provedení zkoušky podá přesné údaje. Opakování správných výsledků první zkoušky je nejlepším důkazem, že údaje byly přesné.

Obecná kritéria interpretace údajů

23. V současné době neexistuje žádná univerzálně akceptovaná metoda pro interpretaci údajů o vazbě na ER. Kvalitativní (např. váže se / neváže se) anebo kvantitativní (např. $\log IC_{50}$, relativní vazebná afinita (RBA) atd.) posouzení aktivity zprostředkované hrER by však mělo vycházet z empirických údajů a řádného vědeckého úsudku.

Závěrečná zpráva

24. Závěrečná zpráva by měla obsahovat tyto informace:

Analýza:

- použitá analýza

Kontrola / referenční látka / zkoušená chemická látka

- zdroj, číslo šarže a je-li k dispozici, datum použitelnosti,
- stabilita zkoušené chemické látky samotné, je-li známa,
- rozpustnost a stabilita zkoušené chemické látky v rozpouštědle, jsou-li známy,
- měření pH, osmolality a sraženiny v kultivačním médiu, do něhož byla podle potřeby přidána zkoušená chemická látka.

Jednosložková látka:

- fyzický vzhled, rozpustnost ve vodě a další relevantní fyzikálně-chemické vlastnosti,
- chemická identifikace, např. název IUPAC nebo CAS, číslo CAS, SMILES nebo kód InChI, strukturní vzorec, čistota, případně chemická identita nečistot, je-li to prakticky proveditelné atd.

Vícesložková látka, látka s neznámým nebo proměnlivým složením, komplexní reakční produkt nebo biologický materiál a směsi:

- charakterizované pokud možno chemickou identitou (viz výše), kvantitativním výskytem a relevantními fyzikálně-chemickými vlastnostmi složek.

Rozpouštědlo/vehikulum:

- charakterizace (povaha, dodavatel a šarže),
- zdůvodnění volby rozpouštědla/vehikula,
- rozpustnost a stabilita zkoušené chemické látky v rozpouštědle/vehikulu, jsou-li známy,

Receptory:

- zdroj receptoru (dodavatel, katalogové číslo, šarže, druh receptoru, koncentrace aktivního receptoru uvedená dodavatelem, certifikace dodavatele),
- charakterizace receptorů (včetně výsledků nasycené vazby): K_d , B_{max} ,
- uchovávání receptorů,
- radioizotopově značený ligand:
- dodavatel, katalogové číslo, šarže, měrná aktivita.

Zkušební podmínky:

- meze rozpustnosti za podmínek zkoušky,
- složení vazebného pufru,
- koncentrace receptoru,
- koncentrace stopovací látky (tj. radioizotopově značený ligand),
- koncentrace zkoušené chemické látky,
- procento vehikula v konečné analýze,
- teplota a doba inkubace,
- způsob separace vázané/volné látky,
- pozitivní a negativní kontroly / referenční látky,
- kritéria klasifikace zkoušky na pozitivní, negativní nebo dvojznačnou.

Kontrola přijatelnosti:

- skutečné hodnoty IC_{50} a hodnoty Hillova koeficientu pro souběžné pozitivní kontroly / referenční látky.

Výsledky:

- naměřená data a data o vázaných/volných látkách,
- případně kontrola potvrzení denaturace,

- pokud existuje, nejnižší účinná koncentrace (LEC),
- hodnoty RBA a IC_{50} podle potřeby,
- závislost účinku na koncentraci, pokud je to možné,
- případné statistické analýzy společně s měřítkem chyby a spolehlivosti (např. SEM, SD, CV nebo 95% CI) a popis, jak byly tyto hodnoty získány.

Diskuse o výsledcích:

- uplatnění pravidla 10 %.

Závěr

LITERATURA

- (1) OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (No 34), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (2) OECD (2015). Integrated Summary Report: Validation of Two Binding Assays Using Human Recombinant Estrogen Receptor Alpha (hrER α), Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 226), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (3) OECD (2015). Performance Standards for Binding Assays Using Human Recombinant Estrogen Receptor Alpha (hrER α), Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 222), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (4) OECD (2012). Guidance Document on Standardized Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (No 150), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (5) Cavailles V. (2002). Estrogens and Receptors: an Evolving Concept, Climacteric, 5 Suppl 2: p. 20-6.
- (6) Welboren W.J., *et al.* (2009). Genomic Actions of Estrogen Receptor Alpha: What are the Targets and how are they Regulated? *Endocr. Relat. Cancer.*, 16(4): p. 1073-89.
- (7) Younes M. and Honma N. (2011). Estrogen Receptor Beta, *Arch. Pathol. Lab. Med.*, 135(1): 63-6.
- (8) Diamanti-Kandarakis *et al.* (2009). Endocrine-Disrupting Chemicals: an Endocrine Society Sci. Statement, *Endo Rev* 30(4):293-342.
- (9) ICCVAM (2002). Background Review Document. Current Status of Test Methods for Detecting Endocrine Disruptors: *In Vitro* Estrogen Receptor Binding Assays. (NIH Publication No 03-4504). National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC.
- (10) ICCVAM (2003). ICCVAM Evaluation of *In Vitro* Test Methods for Detecting Potential Endocrine Disruptors: Estrogen Receptor and Androgen Receptor Binding and Transcriptional Activation Assays.

- (11) ICCVAM (2006). ICCVAM Evaluation of *In Vitro* Test Methods for Detecting Potential Endocrine Disruptors: Estrogen Receptor and Androgen Receptor Binding and Transcriptional Activation Assays.
- (12) Akahori Y. *et al.* (2008). Relationship Between the Results of *In Vitro* Receptor Binding Assay to Human Estrogen Receptor Alpha and *In Vivo* Uterotrophic Assay: Comparative Study with 65 Selected Chemicals, *Toxicol. In Vitro*, 22(1): 225-231.
- (13) OECD (2007). Additional Data Supporting the Test Guideline on the Uterotrophic Bioassay in Rodents, Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 67), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (14) Takeyoshi, M. (2006). Draft Report of Pre-validation and Inter-laboratory Validation For Stably Transfected Transcriptional Activation (TA) Assay to Detect Estrogenic Activity - The Human Estrogen Receptor Alpha Mediated Reporter Gene Assay Using hER-HeLa-9903 Cell Line, Chemicals Evaluation and Research Institute (CERI): Japan. p. 1-188.
- (15) Yamasaki, K; Noda, S; Imatanaka, N; Yakabe, Y. (2004). Comparative Study of the Uterotrophic Potency of 14 Chemicals in a Uterotrophic Assay and their Receptor-Binding Affinity, *Toxicol. Letters*, 146: 111-120.
- (16) Kummer V; Maskova, J; Zraly, Z; Neca, J; Simeckova, P; Vondracek, J; Machala, M. (2008). Estrogenic Activity of Environmental Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Uterus of Immature Wistar Rats. *Toxicol. Letters*, 180: 213-221.
- (17) Gozgit, JM; Nestor, KM; Fasco, MJ; Pentecost, BT; Arcaro, KF. (2004). Differential Action of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons on Endogenous Estrogen-Responsive Genes and on a Transfected Estrogen-Responsive Reporter in MCF-7 Cells. *Toxicol. and Applied Pharmacol.*, 196: 58-67.
- (18) Santodonato, J. (1997). Review of the Estrogenic and Antiestrogenic Activity of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Relationship to Carcinogenicity. *Chemosphere*, 34: 835-848.
- (19) Swillens S (1995). Interpretation of Binding Curves Obtained with High Receptor Concentrations: Practical Aid for Computer Analysis, *Mol Pharmacol* 47(6):1197-1203.

Dodatek 1

DEFINICE A ZKRATKY

Pravidlo 10 %: Možnost vyloučit z analýz datové body, pokud je průměr replikátů pro procento specifické vazby [^3H]17 β -estradiolu o 10 % nebo více nad hodnotu pozorovanou u střední hodnoty při nižší koncentraci (viz dodatek 4).

Kritéria přijatelnosti: Minimální pravidla pro výkonnost experimentálních kontrol a referenčních standardů. Aby se experiment mohl považovat za platný, měla by být splněna všechna kritéria přijatelnosti.

Přesnost (soulad): Přesnost shody mezi výsledky analýzy a přijatými referenčními hodnotami. Je to měřítko funkčnosti analýzy a jeden z aspektů relevance. Tento pojem se často používá místo pojmu „soulad“ a rozumí se jím podíl správných výsledků analýzy (1).

CF: Koncepční rámec OECD pro zkoušky a hodnocení endokrinních disruptorů.

Chemická látka: Látka nebo směs.

CV: Variační koeficient.

E2: 17 β -estradiol.

ED: Narušení endokrinní činnosti.

hER α : Lidský estrogenový receptor alfa.

ER: Estrogenový receptor.

Estrogenní aktivita: Schopnost chemické látky napodobit schopnost 17 β -estradiolu vázat se na estrogenové receptory. Touto zkušební metodou lze detekovat vazbu na hER α .

IC₅₀: Poloviční maximální účinná koncentrace inhibiční zkoušené chemické látky.

ICCVAM: Meziagenturní koordinační výbor pro validaci alternativních metod.

Mezilaboratorní reprodukovatelnost: Míra, v jaké mohou různé kvalifikované laboratoře za použití stejného protokolu a při testování stejných látek získat kvalitativně a kvantitativně podobné výsledky. Mezilaboratorní reprodukovatelnost se určuje během předvalidačních a validačních postupů a ukazuje, do jaké míry lze analýzu úspěšně přenášet mezi různými laboratořemi (1).

Vnitrolaboratorní reprodukovatelnost: Určení míry, v jaké může kvalifikovaný personál ve stejné laboratoři jindy úspěšně dosáhnout stejných výsledků za použití určitého protokolu. Označuje se také jako „reprodukovatelnost v rámci laboratoře“ (1).

LEC: Nejnižší účinná koncentrace je nejnižší koncentrace zkoušené chemické látky, která dává odpověď (tj. nejnižší koncentrace zkoušené chemické látky, při níž je násobná indukce statisticky

odlišná od souběžné kontroly vehikulem).

Zkouška typu „me-too“: Hovorový výraz pro analýzu, která je strukturálně a funkčně podobná validované a uznávané referenční zkušební metodě. Používá se namísto podobné zkušební metody.

PBTG: Pokyn vycházející z funkční způsobilosti.

Standardy funkčnosti: Standardy založené na validované zkušební metodě, které slouží jako základ pro hodnocení srovnatelnosti navrhované analýzy, která je mechanicky a funkčně podobná. Zahrnují 1) zásadní složky analýzy; 2) minimální seznam srovnávacích látek vybraných z chemických látek používaných k prokázání přijatelné funkčnosti validované referenční metody; a 3) srovnatelné hladiny přesnosti a spolehlivosti založené na hodnotách získaných u validované zkušební metody, jež by navrhovaná analýza měla prokázat při vyhodnocení za použití minimálního seznamu srovnávacích látek (1).

Vhodné látky: Podsoubor referenčních látek zařazených do standardů funkčnosti, které mohou laboratoře použít k prokázání způsobilosti k provádění standardizované analýzy. Kritéria výběru u těchto látek obvykle zahrnují to, že reprezentují celou škálu odpovědí, jsou komerčně dostupné a jsou k nim dostupné kvalitní referenční údaje.

Způsobilost: Prokázaná schopnost řádně provést analýzu před zkoušením neznámých látek.

Referenční estrogen: 17 β -estradiol (E2, CAS 50-28-2).

Referenční zkušební metody: Analýzy, z nichž vychází pokyn PBTG č. 493.

RBA: Relativní vazebná afinita. RBA látky se vypočítá jako procento log (IC₅₀) pro látku vzhledem k log (IC₅₀) pro 17 β -estradiol.

Relevantnost: Popis vztahu analýzy k účinku, který je předmětem zájmu, a také toho, zda je analýza smysluplná a použitelná pro konkrétní účel. Vyjadřuje, do jaké míry analýza správně měří nebo predikuje biologický účinek, který je předmětem zájmu. Relevantnost zahrnuje také posouzení přesnosti (shody) analýzy (1).

Spolehlivost: Míra rozsahu, v jakém může být analýza časem reprodukovatelná v laboratořích a mezi laboratořemi, když se provádí s použitím stejného protokolu. Vyhodnocuje se na základě výpočtu vnitrolaboratorní a mezilaboratorní reprodukovatelnosti.

SD: Směrodatná odchylka.

Zkoušená chemická látka: Jakákoli látka nebo směs zkoušená touto zkušební metodou.

Validovaná zkušební metoda: Analýza, u níž byly provedeny validační studie k určení její relevantnosti (včetně přesnosti) a spolehlivosti pro konkrétní účel. Je důležité si uvědomit, že validovaná zkušební metoda nemusí mít dostatečnou funkčnost, pokud jde o přesnost a spolehlivost, aby mohla být shledána přijatelnou pro navrhovaný účel (1).

Validace: Proces, při němž je stanovena spolehlivost a relevance konkrétního přístupu, metody, analýzy, procesu nebo hodnocení pro definovaný účel (1).

Dodatek 2

FREYBERGER-WILSONOVA (FW) *IN VITRO* SATURAČNÍ ANALÝZA A ANALÝZA KOMPETITIVNÍ VAZBY NA ESTROGENOVÝ RECEPTOR (ER α) S VYUŽITÍM CELÉ DÉLKY LIDSKÉHO REKOMBINANTNÍHO ER α

VÝCHOZÍ ÚVAHY A OMEZENÍ (VIZ TAKÉ VŠEOBECNÝ ÚVOD)

1. Tato *in vitro* analýza saturace a kompetitivní vazby na estrogenový receptor (ER α) používají celou délku lidského receptoru ER α (hrER α), který je vytvořen a izolován z buněk hmyzu infikovaných bakulovírem. Protokol, který vypracovali Freyberger a Wilson, prošel mezinárodní validační studií v několika laboratořích (2), která prokázala jeho relevanci a spolehlivost pro zamýšlený účel analýzy.
2. Tato analýza je screeningovým postupem pro určení látek, které se mohou vázat na hrER α v celé délce. Používá se na určení schopnosti zkoušené chemické látky konkurovat 17 β -estradiolu ve vazbě na hrER α . Výsledky kvantitativní analýzy mohou zahrnovat IC₅₀ (míra koncentrace zkoušené chemické látky potřebná na vytěsnění poloviny [³H]-17 β -estradiolu z hrER α) a relativní vazebné afinity zkoušených chemických látek pro hrER α v porovnání s 17 β -estradiol. Pro účely chemického screeningu mohou přijatelné výsledky kvalitativní analýzy zahrnovat klasifikace zkoušených chemických látek jako látek, které se vážou na hrER α , látek, které se na něj nevážou, nebo látek neurčitých, a to na základě kritérií popsanych u vazebných křivek.
3. Analýza používá radioaktivní ligand, což vyžaduje, aby laboratoř měla povolení nakládat s radioaktivními materiály. Při používání radioizotopů a nebezpečných chemických látek musí být dodržovány předpisy a postupy stanovené vnitrostátními právními předpisy.
4. Před použitím této analýzy pro regulační účely je třeba přečíst si části „**VŠEOBECNÝ ÚVOD**“ a „**SLOŽKY VAZEBNÉ ANALÝZY hrER**“. Definice a zkratky používané v této zkušební metodě jsou popsány v dodatku 1.

PRINCIPY ANALÝZY (VIZ TAKÉ VŠEOBECNÝ ÚVOD)

5. Test vazby na hrER α měří schopnost radioizotopově značeného ligandu ([³H]17 β -estradiol) vázat se na ER v přítomnosti zvyšujících se koncentrací zkoušené chemické látky (tj. kompetitor). Zkoušené chemické látky, které mají vysokou afinitu na ER, konkurují radioizotopově značenému ligandu při nižší koncentraci v porovnání s chemickými látkami s nižší afinitou na tento receptor.
6. Tato analýza sestává ze dvou hlavních složek: saturačního vazebného experimentu za účelem charakterizace parametrů interakce mezi receptorem a ligandem a dokumentace specifčnosti ER, po němž následuje kompetitivní vazebný experiment, který charakterizuje

kompetici mezi zkoušenou chemickou látkou a radioizotopově značeným ligandem ve vazbě na ER.

7. Účelem saturačního vazebného experimentu je charakterizovat konkrétní šarži receptorů z hlediska vazebné afinity a počtu při přípravě na kompetitivní vazebný experiment. Saturační vazebný experiment měří za rovnovážných podmínek afinitu pevně stanovené koncentrace estrogenového receptoru na jeho přirozený ligand (představovaný disociační konstantou K_d) a koncentraci míst aktivního receptoru (B_{max}).
8. Kompetitivní vazebný experiment měří afinitu látky konkurovat $[3H]17\beta$ -estradiolu ve vazbě na ER. Afinita je kvantifikována koncentrací zkoušené chemické látky, která za rovnovážného stavu inhibuje 50 % specifické vazby $[3H]17\beta$ -estradiolu (nazývá se „50% inhibiční koncentrace“ nebo IC_{50}). Může se hodnotit také pomocí relativní vazebné afinity (RBA, vzhledem k IC_{50} estradiolu měřené samostatně při stejném provedení zkoušky). Kompetitivní vazebný experiment měří vazbu $[3H]17\beta$ -estradiolu při pevně stanovené koncentraci v přítomnosti širokého rozmezí (osm řádů) koncentrací zkoušené chemické látky. Data se poté vynesou pokud možno do určité formy Hillovovy rovnice (Hill, 1910), která popisuje vytěsnění radioligandu kompetiční látkou s jedním vazebným místem. Rozsah vytěsnění radioizotopově značeného estradiolu v rovnovážném stavu se používá na charakterizaci zkoušené chemické látky jako látky, která se váže, která se neváže nebo která generuje neurčitou odpověď.

POSTUP

Prokázání funkční způsobilosti proteinu hrER α

9. Před rutinním prováděním saturačních a kompetitivních vazebných analýz by mělo být u každé nové šarže hrER α prokázáno, že v laboratoři, v níž bude používán, funguje správně. K prokázání způsobilosti by se měl použít proces zahrnující dva kroky. Jsou to tyto kroky:
 - Proved'te saturační vazebnou analýzu $[^3H]$ - 17β -estradiolu na prokázání specifičnosti a saturace hrER α . V nelineární regresní analýze těchto dat (např. BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995) a na následném Scatchardově grafu by měla být dokumentována vazebná afinita hrER α vůči $[^3H]$ - 17β -estradiolu (K_d) a počet receptorů (B_{max}) pro každou šarži hrER α .
 - Proved'te kompetitivní vazebnou analýzu pomocí kontrolních látek (referenčního estrogenu (17β -estradiol), látky se slabou vazbou (např. norethynodrel nebo norethindron) a látky, která se neváže (oktyltriethoxysilan, OTES). Každá laboratoř by si měla vytvořit historickou databázi dokumentující konzistentnost hodnot IC_{50} a dalších relevantních hodnot pro referenční estrogen a látku se slabou vazbou u experimentů a různých šarží hrER α . Parametry kompetitivních vazebných křivek pro kontrolní látky by měly být v rozmezí 95% konfidenčního intervalu (viz tabulka 1), který byl stanoven pomocí dat z laboratoří, jež se účastnily validační studie pro tuto analýzu (2).

Tabulka 1: Kritéria výkonnosti vypracovaná pro referenční estrogen a látku se slabou vazbou, vazebná analýza FW hrER

Látka	Parametr	Střední hodnota ^a	Směrodatná odchylka (n)	95% konfidenční intervaly ^b	
				Dolní mez	Horní mez
17β-estradiol	Horní (%)	100,44	10,84 (67)	97,8	103,1
	Dolní (%)	0,29	1,25 (67)	-0,01	0,60
	Hillův koeficient	-1,06	0,20 (67)	-1,11	-1,02
	logIC ₅₀ (M)	-8,92 ^c	0,18 (67)	-8,97	-8,88
Norethynodrel	Horní (%)	99,42	8,90 (68)	97,27	101,60
	Dolní (%)	2,02	3,42 (68)	1,19	2,84
	Hillův koeficient	-1,01	0,38 (68)	-1,10	-0,92
	log IC ₅₀ (M)	-6,39	0,27 (68)	-6,46	-6,33
Norethindrone ^c	Horní (%)	96,14	8,44 (27)	92,80	99,48
	Dolní (%)	2,38	5,02 (27)	0,40	4,37
	Hillův koeficient	-1,41	0,32 (27)	-1,53	-1,28
	logIC ₅₀ (M)	-5,73	0,27 (27)	-5,84	-5,62

^aStřední hodnota (n) ± směrodatná odchylka (SD) byly vypočítány pomocí odhadu parametrů vynesené křivky (4parametrická Hillova rovnice) pro kontrolní zkoušky provedené ve čtyřech laboratořích při validační studii (viz příloha N k odkazu 2).

^b 95% konfidenční intervaly jsou uvedeny jako vodítko pro kritéria přijatelnosti.

^c Testování norethindronu bylo ve validační studii v dílčím úkolu 4 volitelné (viz odkaz 2, viz dílčí úkol 4). Střední hodnota ± (SD) (n) byla tedy vypočítána pomocí odhadu vynesené křivky (4parametrická Hillova rovnice) pro kontrolní zkoušky provedené ve dvou laboratořích.

Rozsah IC₅₀ bude záviset na Kd receptorového přípravku a koncentraci radioizotopově značeného ligandu použitého v každé laboratoři. Vhodná úprava rozsahu IC₅₀ podle podmínek použitých při provádění analýzy bude přijatelná.

Prokázání odborné způsobilosti laboratoře

- Viz odstavce 17 a 18 a tabulka 2 v části „SLOŽKY VAZEBNÉ ANALÝZY hrER“ této zkušební metody. Každá analýza (saturační a kompetitivní vazby) by měla zahrnovat tři nezávislé zkoušky (tzn. s čerstvě naředěným receptorem, chemickými látkami a reagensiemi) provedené v různé dny, přičemž každé provedení by mělo obsahovat tři opakování.

Určení koncentrace receptoru (hrERα)

- Koncentrace aktivního receptoru se poněkud liší podle šarže a podmínek uchovávání. Z tohoto důvodu je třeba stanovit koncentraci aktivního receptoru přijatého od dodavatele. Získá se tím vhodná koncentrace aktivního receptoru v době provedení zkoušky.
- Za podmínek odpovídajících kompetitivní vazbě (tj. 1 nM [³H]-estradiol) by se měly nominální koncentrace receptoru 0,25, 0,5, 0,75 a 1 nM inkubovat v nepřítomnosti (celková

vazba) a v přítomnosti (nespecifická vazba) 1 μM neznačeného estradiolu. Specifická vazba vypočítaná jako rozdíl celkové a nespecifické vazby se nanese proti nominální koncentraci receptoru. Koncentrace receptoru, která dává hodnoty specifické vazby odpovídající 20 % přidaného radioizotopového značení, souvisí s odpovídající nominální koncentrací receptoru a tato koncentrace receptoru se používá pro saturační a kompetitivní vazebné experimenty. Často bude tuto podmínku splňovat konečná koncentrace hrER 0,5 nM.

13. Jestliže nelze opakovaně splnit 20% kritérium, je třeba zkontrolovat, zda uspořádání experimentu neobsahuje možné chyby. Nedosažení 20% kritéria může ukazovat, že v rekombinantní šarži je příliš málo aktivního receptoru, a potom je třeba zvážit použití jiné šarže receptoru.

Saturační analýza

14. Hodnotí se osm zvyšujících se koncentrací [^3H]-17 β -estradiolu v trojím provedení, a to za těchto tří podmínek (viz tabulka 2):

- Za nepřítomnosti neznačeného 17 β -estradiolu a v přítomnosti ER. Je to stanovení celkové vazby měřením radioaktivity v jamkách, v nichž je pouze [^3H]-17 β -estradiol.
- V přítomnosti tisícinásobně zvýšené koncentrace neznačeného 17 β -estradiolu nad značený 17 β -estradiol a v přítomnosti ER. Záměrem této podmínky je saturovat aktivní vazebná místa neznačeným 17 β -estradiolem a změřením radioaktivity v jamkách stanovit nespecifickou vazbu. Případný zbývající radioaktivní estradiol, který se může vázat na receptor, se považuje za navázaný na nespecifické místo, neboť neradioaktivní estradiol by měl být v tak vysoké koncentraci, aby se navázal na všechna dostupná specifická místa na receptoru.
- Za nepřítomnosti neznačeného 17 β -estradiolu a nepřítomnosti ER (stanovení celkové radioaktivity)

Příprava roztoků [^3H]-17 β -estradiolu a neznačeného 17 β -estradiolu

15. Zředěné roztoky [^3H]-17 β -estradiolu se připravují přidáním zkušební pufru do 12 nM zásobního roztoku [^3H]-17 β -estradiolu, aby se získaly koncentrace v počátečním rozsahu od 0,12 nM do 12 nM. Přidáním 40 μl těchto roztoků do příslušných jamek 96jamkové mikrotitrační destičky (v konečném objemu 160 μl) se získají konečné zkušební koncentrace v rozsahu od 0,03 do 3,0 nM. Příprava zkušební pufru, zásobního roztoku [^3H]-17 β -estradiolu a zředěných roztoků a stanovení koncentrací je podrobně popsáno v protokolu FW (2).
16. Zředěné etanolové roztoky 17 β -estradiolu se připravují přidáním zkušební pufru, aby bylo dosaženo osmi zvyšujících se koncentrací v počátečním rozsahu od 0,06 μM do 6 μM . Přidáním 80 μl těchto roztoků do příslušných jamek 96jamkové mikrotitrační destičky (v konečném objemu 160 μl) se získají konečné zkušební koncentrace v rozsahu od 0,03 μM do 3,0 μM . Konečná koncentrace neznačeného 17 β -estradiolu v jednotlivých jamkách

nespecifické vazebné analýzy by měla být tisícinásobkem koncentrace značeného [³H]-17β-estradiolu. Příprava roztoků neznačeného 17β-estradiolu je podrobně popsána v protokolu FW (2).

17. Měla by se použít taková nominální koncentrace receptoru, která dává specifickou vazbu $20 \pm 5 \%$ (viz odstavce 12–13). Roztok hrERα je třeba připravovat bezprostředně před použitím.

18. 96jamkové mikrotitrační destičky se připraví tak, jak je zobrazeno v tabulce 2, a to s třemi replikáty na každou koncentraci. Příklad uspořádání koncentrací a objemů [³H]-17β-estradiolu, neznačeného 17β-estradiolu, pufru a receptoru je uveden v dodatku 2.2.

Tabulka 2: Uspořádání mikrotitrační destičky při saturační vazebné analýze

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	0,03 nM [³ H] E ₂ + ER			0,06 nM [³ H] E ₂ + ER			0,08 nM [³ H] E ₂ + ER			0,10 nM [³ H] E ₂ + ER			Celková vazba (rozpuště dlo)
B	0,30 nM [³ H] E ₂ + ER			0,60 nM [³ H] E ₂ + ER			1,0 nM [³ H] E ₂ + ER			3,0 nM [³ H] E ₂ + ER			
C													
D	0,03 nM [³ H] E ₂ + ER + 0,03 μM E ₂			0,06 nM [³ H] E ₂ + ER + 0,06 μM E ₂			0,08 nM [³ H] E ₂ + ER + 0,08 μM E ₂			0,10 nM [³ H] E ₂ + ER + 0,10 μM E ₂			Nespecifická vazba
E	0,30 nM [³ H] E ₂ + ER + 0,30 μM E ₂			0,60 nM [³ H] E ₂ + ER + 0,60 μM E ₂			1,0 nM [³ H] E ₂ + ER + 1,0 μM E ₂			3,0 nM [³ H] E ₂ + ER + 3,0 μM E ₂			
F													
G													
H													

[³H] E₂: [³H]-17β-estradiol

ER: Estrogenový receptor

E₂: neznačený 17β-estradiol

19. Experimentální mikrotitrační destičky se inkubují při 2–8 °C po dobu 16 až 20 hodin a v průběhu inkubace se umístí na otáčecí podložku.

Měření [³H]-17β-estradiolu navázaného na hrERα

20. [³H]-17β-estradiol navázaný na hrERα se separuje z volného [³H]-17β-estradiolu přidáním 80 μl studené suspenze DCC do každé jamky, mikrotitrační destičky se protřepávají po dobu 10 minut a odstřeďují po dobu 10 minut při 2500 ot./min. Aby se v průběhu tohoto procesu minimalizovala disociace vázaného [³H]-17β-estradiolu z hrERα, je velmi důležité, aby byly pufrы i experimentální jamky udržovány při teplotě mezi 2 a 8 °C a aby byl každý krok proveden rychle. Pro efektivní a rychlé zpracování destiček je nezbytná třepačka na mikrotitrační destičky.

21. Poté se velmi opatrně odebere 50 μ l supernatantu obsahujícího $[^3\text{H}]$ -17 β -estradiol navázaný na hrER α , aby nedošlo ke kontaminaci jamek dotykem DCC, a umístí se na druhou mikrotitrační destičku.

22. Pak se do každé jamky přidá 200 μ l scintilační kapaliny, schopné přeměnit kinetickou energii jaderných emisí na světelnou energii (A1–B12 a D1 až E12). Jamky G1–H12 (označené jako celkové dpm) představují sériové naředěné roztoky $[^3\text{H}]$ -17 β -estradiolu (40 μ l), které je třeba přemístit přímo do scintilační kapaliny v jamkách měřicí destičky, jak je vyznačeno v tabulce 3, tj. tyto jamky obsahují pouze 200 μ l scintilační kapaliny a příslušně naředěný roztok $[^3\text{H}]$ -17 β -estradiolu. Tato měření ukazují, kolik $[^3\text{H}]$ -17 β -estradiolu v dpm bylo přidáno do každé sady jamek pro celkovou vazbu a nespecifickou vazbu.

Tabulka 3: Uspořádání mikrotitrační destičky při saturační vazebné analýze, měření radioaktivity

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	0,03 nM [³ H] E ₂ + ER			0,06 nM [³ H] E ₂ + ER			0,08 nM [³ H] E ₂ + ER			0,10 nM [³ H] E ₂ + ER			Celková vazba (rozpuštědlo)
B	0,30 nM [³ H] E ₂ + ER			0,60 nM [³ H] E ₂ + ER			1,0 nM [³ H] E ₂ + ER			3,0 nM [³ H] E ₂ + ER			
C													
D	0,03 nM [³ H] E ₂ + ER + 0,03 μM E ₂			0,06 nM [³ H] E ₂ + ER + 0,06 μM E ₂			0,08 nM [³ H] E ₂ + ER + 0,08 μM E ₂			0,10 nM [³ H] E ₂ + ER + 0,10 μM E ₂			Nespecifická vazba
E	0,30 nM [³ H] E ₂ + ER + 0,30 μM E ₂			0,60 nM [³ H] E ₂ + ER + 0,60 μM E ₂			1,0 nM [³ H] E ₂ + ER + 1,0 μM E ₂			3,0 nM [³ H] E ₂ + ER + 3,0 μM E ₂			
F													
G	0,03 nM [³ H] E ₂ (dpm celkem)			0,06 nM [³ H] E ₂			0,08 nM [³ H] E ₂			0,10 nM [³ H] E ₂			Celkem dpm*
H	0,30 nM [³ H] E ₂			0,60 nM [³ H] E ₂			1,0 nM [³ H] E ₂			3,0 nM [³ H] E ₂			

$[^3\text{H}]$ E₂: $[^3\text{H}]$ -17 β -estradiol

ER: estrogenový receptor

E₂: neznačený 17 β -estradiol

dpm: rozpady za minutu

*Radioaktivní sériová ředění $[^3\text{H}]$ -značeného estradiolu se zde přidávají přímo do 200 μ l scintilační kapaliny v jamkách G1–H12.

23. Měření by mělo být zahájeno se zpožděním alespoň 2 hodiny a doba počítání by měla být 40 minut na jamku. Ke stanovení dpm/jamku s korekcí na zhášení se používá scintilační spektrometr mikrotitračních destiček. Není-li k dispozici scintilační spektrometr pro mikrotitrační destičky, mohou se vzorky alternativně měřit klasickým spektrometrem. Za těchto podmínek může být zvaženo zkrácení doby počítání.

Kompetitivní vazebná analýza

24. Kompetitivní vazebná analýza měří vazbu jedné koncentrace [^3H]17 β -estradiolu v přítomnosti zvyšujících se koncentrací zkoušené chemické látky. Při každé koncentraci by se měly v jednom provedení zkoušky použít tři souběžné replikáty. Kromě toho by se měla pro každou zkoušenou chemickou látku provést tři nesouběžná provedení zkoušky. Analýza se provádí v jedné nebo několika 96jamkových mikrotitračních destičkách.

Kontroly

25. Při provádění analýzy by měly být do každého experimentu zařazeny souběžné testy s rozpouštědlem a kontroly (tj. referenční estrogen, slabá vazba a neváže se). Při každém provedení zkoušky by měly být na jedné destičce použity celé křivky koncentrace pro referenční estrogen a kontroly (tj. slabá vazba a neváže se). Všechny ostatní destičky by měly obsahovat i) vysokou (maximální vytěsnění) a střední (přibližně IC_{50}) koncentraci každého E2 a látky se slabou vazbou, a to třikrát; ii) kontrolu s rozpouštědlem a látkou s nespecifickou vazbou, a to vždy alespoň třikrát. Postupy pro přípravu experimentálního pufu, kontrol, [^3H]-17 β -estradiolu, hrER α a roztoků zkoušených chemických látek jsou popsány v odkazu 2 (příloha K, viz protokol pro analýzu FW).

Kontrola s rozpouštědlem:

26. Kontrola s rozpouštědlem ukazuje, že rozpouštědlo nereaguje se zkušebním systémem, a měří také celkovou vazbu (TB). Nejvhodnějším rozpouštědlem je ethanol. Jestliže nejvyšší koncentrace zkoušené chemické látky není rozpustná v ethanolu, může být alternativně použit DMSO. Koncentrace ethanolu nebo DMSO, je-li použit, v jamkách pro konečnou analýzu je 1,5 % a nesmí překročit 2 %.

Kontrola s pufrem:

27. Kontrola s pufrem (BC) by neměla obsahovat rozpouštědlo ani zkoušenou chemickou látku, ale všechny ostatní složky analýzy. Výsledky kontroly s pufrem se porovnají s kontrolou s rozpouštědlem za účelem ověření, že použité rozpouštědlo neovlivňuje zkušební systém.

Látka se silnou vazbou (referenční estrogen)

28. 17 β -estradiol (CAS 50-28-2) je endogenní ligand a váže se s vysokou afinitou na ER, podtyp alfa. Pro každou kompetitivní vazebnou analýzu hrER α by měla být vypracována standardní křivka s použitím neznačeného 17 β -estradiolu, aby bylo možné posoudit variabilitu při provádění analýzy v čase ve stejné laboratoři. Připraví se osm roztoků neznačeného 17 β -estradiolu v ethanolu, přičemž koncentrace v jamkách jsou v rozmezí 100 nM–10 pM (od $-7[\log\text{M}]$ do $-11[\log\text{M}]$), a to v těchto rozestupech: $-7[\log\text{M}]$, $-8[\log\text{M}]$, $-8,5[\log\text{M}]$, $-9[\log\text{M}]$, $-9,5[\log\text{M}]$, $-10[\log\text{M}]$, $-11[\log\text{M}]$. Nejvyšší koncentrace neznačeného 17 β -estradiolu (1 μM) slouží také jako indikátor nespecifické vazby. Tato koncentrace je v tabulce 4 odlišena označením „NSB“, ačkoliv je také součástí standardní křivky.

Látka se slabou vazbou

29. Měla by být zařazena látka se slabou vazbou (norethynodrel (CAS 68-23-5) nebo norethindron (CAS 68-22-4)), aby se prokázala citlivost každého experimentu a aby se umožnilo posouzení variability při provádění analýzy v čase. Připraví se osm roztoků látky se slabou vazbou v ethanolu, přičemž koncentrace v jamkách jsou v rozmezí od 3 nM do 30 μ M (od $-8,5[\log M]$ do $-4,5[\log M]$), a to v těchto rozestupech: $-4,5[\log M]$, $-5[\log M]$, $-5,5[\log M]$, $-6[\log M]$, $-6,5[\log M]$, $-7[\log M]$, $-7,5[\log M]$, $-8,5[\log M]$.

Látka, která se neváže

30. Jako negativní kontrola (látka, která se neváže) se používá oktyltriethoxysilan (OTES, CAS 2943-75-1). Poskytuje jistotu, že analýza, tak jak je prováděna, dokáže detekovat, když se zkoušené chemické látky nenavážou na hrER α . Připraví se osm roztoků látky, která se neváže, v ethanolu, přičemž koncentrace v jamkách jsou v rozmezí od 0,1 nM do 1 000 μ M (od $-10[\log M]$ do $-3[\log M]$), a to v logaritmických přírůstcích. Jako alternativní kontrolní látka, která se neváže, může být použit di-*n*-butylftalát (DBP). Bylo prokázáno, že jeho maximální rozpustnost je $-4[\log M]$.

Koncentrace hrER α

31. Mělo by se použít takové množství receptoru, které dává specifickou vazbu $20 \pm 5 \%$ 1 nM radioligandu (viz odstavce 12–13 v dodatku 2). Roztok hrER α je třeba připravovat bezprostředně před použitím.

[^3H]-17 β -estradiol

32. Koncentrace [^3H]-17 β -estradiolu v jamkách by měla být 1,0 nM.

Zkoušené chemické látky

33. V první řadě je třeba provést zkoušku rozpustnosti, aby bylo možné stanovit mez rozpustnosti pro každou zkoušenou chemickou látku a zjistit vhodný rozsah koncentrace, jenž má být použit při provádění zkušebního protokolu. Mez rozpustnosti každé zkoušené chemické látky se nejprve stanoví v rozpouštědle a dále potvrdí za zkušebních podmínek. Konečná koncentrace zkoušená při analýze by neměla překročit 1 mM. Zkoušení za účelem zjištění rozsahu sestává z kontroly s rozpouštědlem společně s 8 log-sériovými ředěními, počínaje maximální přijatelnou koncentrací (např. 1 mM nebo menší, na základě meze rozpustnosti), přičemž je třeba zaznamenat přítomnost zákalu nebo sraženiny (viz také odstavec 35). Zkoušená chemická látka by měla být testována s použitím 8 logaritmických křivek koncentrací v rozestupech definovaných předchozí zkouškou ke stanovení rozsahu. Při druhém a třetím experimentu by se měla podle potřeby upravit koncentrace, aby lépe charakterizovala křivku závislosti odpovědi na koncentraci.
34. Zkoušená chemická látka se naředí ve vhodném rozpouštědle (viz odstavec 26 v dodatku 2). Jestliže nejvyšší koncentrace zkoušené chemické látky není rozpustná v ethanolu ani v DMSO a přidání většího množství rozpouštědla by způsobilo, že koncentrace rozpouštědla v poslední zkumavce bude větší než přijatelná mez, může se nejvyšší koncentrace snížit na

nejbližší nižší koncentraci. V tomto případě může být na dolní konec série koncentrací přidána další koncentrace. Ostatní koncentrace v sérii by měly zůstat beze změny.

35. Roztoky zkoušené chemické látky je třeba po přidání do jamky pečlivě sledovat, neboť zkoušená chemická látka se může po přidání do jamky srážet. Data za všechny jamky, které obsahují sraženinu, by měla být vyloučena z vynesené křivky a měl by být uveden důvod pro vyloučení těchto dat.
36. Jestliže již existují informace z jiných zdrojů, které uvádějí $\log(\text{IC}_{50})$ zkoušené chemické látky, může být vhodné stanovit geometrické rozestupy ředění (tj. 0,5 log jednotky kolem předpokládané hodnoty $\log(\text{IC}_{50})$). Konečný výsledek by měl odrážet dostatečný rozsah koncentrací na každé straně $\log(\text{IC}_{50})$, včetně „horní“ a „dolní“, aby vazebná křivka mohla být adekvátně charakterizována.

Uspořádání zkušebních destiček

37. Připraví se označené mikrotitrační destičky pro šestinásobné inkubace s kódy pro kontrolu s rozpouštědlem, nejvyšší koncentraci referenčního estrogenu, který slouží také jako indikátor nespecifické vazby (NSB), a kontrolu s pufrem a pro trojnásobné inkubace s kódy pro každou z osmi koncentrací kontrolní látky, která se neváže (oktyltriethoxysilan), sedm nižších koncentrací pro referenční estrogen, osm úrovní koncentrace látky se slabou vazbou a osm koncentrací každé zkoušené chemické látky (TC). Příklad diagramu destičky pro celé koncentrační křivky pro referenční estrogen a kontrolu je uveden níže v tabulce 4. Pro zkoušené chemické látky se použijí další mikrotitrační destičky, které by měly obsahovat kontroly (tj. 1) vysokou (maximální vytěsnění) a střední (přibližně IC_{50}) koncentraci každého E2 a látky se slabou vazbou, a to třikrát; 2) kontrolu s rozpouštědlem a látkou s nespecifickou vazbou, a to vždy šestkrát (tabulka 5). Příklad postupu uspořádání mikrotitrační destičky pro kompetitivní analýzu s použitím tří neznámých zkoušených chemických látek je uveden v dodatku 2.3. Koncentrace uvedené v tabulkách 4 a 5 jsou konečné koncentrace analýzy. Maximální koncentrace pro E2 by měla být 1×10^{-7} M a pro látku se slabou vazbou by měla být použita nejvyšší koncentrace pro látku se slabou vazbou použitá na destičce 1. Koncentraci IC_{50} musí stanovit laboratoř na základě své dosavadní kontrolní databáze. Lze očekávat, že tato hodnota bude podobná hodnotě pozorované ve validačních studiích (viz tabulka 1).

Tabulka 4: Uspořádání mikrotitrační destičky při kompetitivní vazebné analýze, celé křivky koncentrace pro referenční estrogen a kontroly (destička 1)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TB (pouze rozpouštědlo)			TB (pouze rozpouštědlo)			NSB			NSB		
B	E2 (1×10^{-7})			E2 (1×10^{-8})			E2 ($1 \times 10^{-8,5}$)			E2 (1×10^{-9})		
C	E2 ($1 \times 10^{-9,5}$)			E2 (1×10^{-10})			E2 (1×10^{-11})			Slepý pokus*		
D	NE ($1 \times 10^{-4,5}$)			NE (1×10^{-5})			NE ($1 \times 10^{-5,5}$)			NE (1×10^{-6})		

E	NE ($1 \times 10^{-6,5}$)	NE (1×10^{-7})	NE ($1 \times 10^{-7,5}$)	NE ($1 \times 10^{-8,5}$)
F	OTES (1×10^{-3})	OTES (1×10^{-4})	OTES (1×10^{-5})	OTES (1×10^{-6})
G	OTES (1×10^{-7})	OTES (1×10^{-8})	OTES (1×10^{-9})	OTES (1×10^{-10})
H	Slepý pokus (pro radioaktivní)**	Slepý pokus (pro radioaktivní)**	Kontrola s pufrem	Kontrola s pufrem

V tomto příkladu je látkou se slabou vazbou norethinodrel (NE)

* skutečně slepý pokus, jamka nepoužita

** slepý pokus nepoužitý při inkubaci, ale použitý na potvrzení celkové přidané radioaktivity.

Tabulka 5: Uspořádání mikrotitrační destičky při analýze kompetitivní vazby, celé křivky koncentrace pro zkoušené chemické látky a kontroly.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TB (pouze rozpouštědlo)			TB (pouze rozpouštědlo)			NSB			NSB		
B	TC1 (1×10^{-3})			TC1 (1×10^{-4})			TC1 (1×10^{-5})			TC1 (1×10^{-6})		
C	TC1 (1×10^{-7})			TC1 (1×10^{-8})			TC1 (1×10^{-9})			TC1 (1×10^{-10})		
D	TC2 (1×10^{-3})			TC2 (1×10^{-4})			TC2 (1×10^{-5})			TC2 (1×10^{-6})		
E	TC2 (1×10^{-7})			TC2 (1×10^{-8})			TC2 (1×10^{-9})			TC2 (1×10^{-10})		
F	TC3 (1×10^{-3})			TC3 (1×10^{-4})			TC3 (1×10^{-5})			TC3 (1×10^{-6})		
G	TC3 (1×10^{-7})			TC3 (1×10^{-8})			TC3 (1×10^{-9})			TC3 (1×10^{-10})		
H	NE (IC ₅₀)			NE ($1 \times 10^{-4,5}$)			E2 (IC ₅₀)			E2 (1×10^{-7})		

V tomto příkladu je látkou se slabou vazbou norethinodrel (NE)

Dokončení analýzy kompetitivní vazby

38. Jak je uvedeno v tabulce 6, přidá se do jamek 80 μ l kontroly s rozpouštědlem, kontroly s pufrem, referenční estrogen, látka se slabou vazbou, látka, která se neváže, a zkušební chemické látky připravené ve zkušebním pufru. Poté se do každé jamky přidá 40 μ l roztoku 4 nM [^{3} H]-17 β -estradiolu. Po mírném otáčení po dobu 10 až 15 minut při teplotě od 2 °C do 8 °C se přidá 40 μ l roztoku hrER α . Experimentální mikrotitrační destičky se inkubují při 2 °C až 8 °C po dobu 16 až 20 hodin a v průběhu inkubace se umístí na otáčecí podložku.

Tabulka 6: Objem zkušebních složek pro kompetitivní vazebnou analýzu hrER, mikrotitrační destičky

Objem (μ l)	Složka
80	Neznačený 17 β -estradiol, norethinodrel, OTES, zkoušené chemické látky, rozpouštědlo nebo pufr
40	roztok 4 nM [^{3} H]-17 β -estradiolu

40	roztok hrER α , určená koncentrace
160	<i>Celkový objem v každé jamce</i>

39. Poté se provede kvantifikace [^3H]-17 β -estradiolu navázaného na hrER α po separaci [^3H]-17 β -estradiolu navázaného na hrER α z volného [^3H]-17 β -estradiolu přidáním 80 μl studené suspenze DCC do každé jamky, jak je popsáno v odstavcích 20–23 týkajících se saturační vazebné analýzy.
40. Jamky H1–6 (označené v tabulce 4 jako slepý pokus (pro radioaktivní látku)) představují dpm [^3H]-značeného-estradiolu v 40 μl . Alikvotní množství z 40 μl se přidá přímo do scintilační kapaliny v jamkách H1–H6.

Kritéria přijatelnosti

Saturační vazebná analýza

41. Křivka specifické vazby by měla dosáhnout plató s použitím zvyšujících se koncentrací [^3H]-17 β -estradiolu, což ukazuje saturaci hrER α ligandem.
42. Specifická vazba při 1 nM [^3H]-17 β -estradiolu by měla být v přijatelném rozmezí 15 % až 25 % průměrné naměřené celkové radioaktivity přidané v průběhu jednotlivých provedení zkoušek. Občasná mírná vybočení mimo toto rozmezí jsou přijatelná, ale pokud jsou všechna provedení zkoušky mimo toto rozmezí nebo pokud je konkrétní provedení zkoušky výrazně mimo toto rozmezí, je třeba upravit koncentraci proteinu a saturační analýzu zopakovat.
43. Data by měla vytvořit lineární Scatchardův graf.
44. Nespecifická vazba by neměla být nadměrná. Hodnota nespecifické vazby by měla být typicky < 35 % celkové vazby. Tento poměr však může při měření velmi nízkých dpm u nejnižší koncentrace radioizotopově značeného zkoušeného 17 β -estradiolu občas uvedený limit překročit.

Analýza kompetitivní vazby

45. Zvyšující se koncentrace neznačeného 17 β -estradiolu by měly vytěsnit [^3H]-17 β - estradiol z receptoru způsobem odpovídajícím jednomístné kompetitivní vazbě.
46. Hodnota IC₅₀ pro referenční estrogen (tj. 17 β -estradiol) by se měla přibližně rovnat molární koncentraci [^3H]-17 β -estradiolu plus K_d určený ze saturační vazebné analýzy.
47. Celková specifická vazba by měla být soustavně v přijatelném rozmezí 20 $\pm$ 5 %, když je průměrná naměřená koncentrace celkové radioaktivity přidaná do každé jamky 1 nM ve všech provedeních zkoušky. Občasná mírná vybočení mimo toto rozmezí jsou přijatelná,

ale pokud jsou všechna provedení zkoušky mimo toto rozmezí nebo pokud je konkrétní provedení zkoušky výrazně mimo toto rozmezí, je třeba upravit koncentraci proteinu.

48. Rozpouštědlo by nemělo měnit citlivost ani reprodukovatelnost analýzy. Výsledky kontroly s rozpouštědlem (jamky TB) se porovnají s kontrolou s pufrem za účelem ověření, že použité rozpouštědlo neovlivňuje zkušební systém. Jestliže rozpouštědlo nemá na analýzu žádný vliv, měly by být výsledky TB a kontroly s rozpouštědlem srovnatelné.
49. Látka, která se neváže, by neměla vytěsnit více než 25 % [^3H]-17 β -estradiolu z hrER α při zkoušení do 10^{-3} M (OTES) nebo 10^{-4} M (DBP).
50. Pro referenční estrogen a dvě látky se slabou vazbou (např. norethynodrel, norethindron) byla vypracována kritéria funkčnosti s použitím údajů z validační studie vazebné analýzy FW hrER (příloha N v odkazu 2). Jsou uvedeny 95% konfidenční intervaly pro střední hodnotu (n) $\pm$ SD za všechna kontrolní provedení zkoušky ve všech laboratořích účastnících se ve validační studii. Pro referenční estrogen a látky se slabou vazbou a pro log₁₀RBA látek se slabou vazbou vzhledem k referenčnímu estrogenu byly vypočteny 95% konfidenční intervaly pro parametry křivky (tj. horní, dolní, Hillův koeficient, logIC₅₀), které jsou uvedeny jako kritéria funkčnosti pro pozitivní kontroly. V tabulce 1 jsou uvedeny očekávané rozsahy parametrů křivky, které mohou být použity jako kritéria funkčnosti. V praxi se může rozsah IC₅₀ poněkud odlišovat v závislosti na K_d receptorového přípravku a koncentraci ligandu.
51. Pro parametry křivky pro zkoušené chemické látky nebyla vypracována žádná kritéria funkčnosti, protože stávajících potenciálních zkoušených chemických látek existuje velké množství a značně se liší jejich potenciální afinity a výsledky (např. celá křivka, částečná křivka, mimo křivku). Při posuzování výsledků z každého provedení zkoušky za zkoušenou chemickou látku je třeba postupovat s odborným úsudkem. Mělo by být použito dostatečné rozmezí koncentrací, aby byl jednoznačně definován vrchol (např. 90–100 % vazby) kompetitivní křivky. Variabilita mezi replikáty při každé koncentraci zkoušené chemické látky i mezi 3 zkouškami neprováděnými souběžně by měla být přiměřená a vědecky obhajitelná. Kontroly z každého provedení zkoušky by se u zkoušené chemické látky měly blížit mírám funkčnosti uvedeným pro tuto analýzu FW a měly by odpovídat dosavadním kontrolním údajům z každé příslušné laboratoře.

ANALÝZA ÚDAJŮ

Saturační vazebná analýza

52. Měří se celková i nespecifická vazba. Z těchto hodnot se specifická vazba zvyšujících se koncentrací [^3H]-17 β -estradiolu za rovnovážného stavu vypočítá odečtením nespecifické vazby od celkové. Graf specifické vazby proti koncentraci [^3H]-17 β -estradiolu by měl dosáhnout plató u maximální specifické vazby indikující saturaci hrER α [^3H]-17 β -estradiolem. Kromě toho by analýza dat měla dokumentovat vazbu [^3H]-17 β -estradiolu na

jedno vazebné místo s vysokou afinitou. Na křivce saturační vazby by měla být zobrazena nespecifická, celková a specifická vazba. Další rozbor těchto údajů by měl být proveden pomocí nelineární regresní analýzy (např. BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995) s konečným zobrazením dat ve formě Scatchardova grafu.

53. Při analýze dat se určuje $B_{\max}$ a K_d z údajů o celkové vazbě samotné, a to za použití předpokladu, že nespecifická vazba je lineární, není-li zdůvodněno použití jiné metody. Kromě toho by při určování nejlepších hodnot měla být použita robustní regrese, pokud není uvedeno zdůvodnění. Metoda zvolená pro robustní regresi by měla být uvedena. Při určování $B_{\max}$ a K_d z údajů o saturační vazbě by měla být vždy použita korekce úbytku ligandu (např. pomocí metody podle Swillense 1995).

Analýza kompetitivní vazby

54. Křivka kompetitivní vazby se vynáší jako specifická vazba [^3H]-17 β -estradiolu proti koncentraci (log₁₀ jednotky) kompetitora. Koncentrace zkoušené chemické látky, která inhibuje 50 % maximální specifické vazby [^3H]-17 β -estradiolu, je hodnota IC_{50} .
55. Odhady log (IC_{50}) pro pozitivní kontroly (např. referenční estrogen a látku se slabou vazbou) se stanoví pomocí vhodného softwaru pro nelineární vynesení křivky, aby byly vhodné pro čtyřparametrickou Hillovu rovnici (např. BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995). Při vynášení těchto křivek se horní bod, dolní bod, sklon a log(IC_{50}) obvykle ponechávají bez omezení. Při určování nejlepších hodnot by měla být použita robustní regrese, pokud není uvedeno zdůvodnění. Korekce úbytku ligandu se nepoužívá. Po úvodní analýze je třeba každou vazebnou křivku zkontrolovat, aby bylo zajištěno, že je vhodně aplikována na model. Relativní vazebná afinita (RBA) pro látku se slabou vazbou se vypočítá jako procento log (IC_{50}) pro látku se slabou vazbou vzhledem k log (IC_{50}) pro 17 β -estradiol. Výsledky z pozitivních kontrol a z kontroly s látkou, která se neváže, se posuzují pomocí měřítek účinnosti analýzy uvedených v odstavci 45–50 v tomto dodatku 2.
56. Data za všechny zkoušené chemické látky se analyzují postupně, aby bylo zajištěno, že data budou analyzována správně, a aby byla správně klasifikována každá kompetitivní vazebná křivka. Doporučuje se, aby každé provedení zkoušky u zkoušené chemické látky nejdříve prošlo standardizovanou analýzou dat, která je stejná jako analýza použitá pro kontroly s referenčním estrogenem a s látkou se slabou vazbou (viz odstavec 55 výše). Po dokončení je třeba provést technickou kontrolu parametrů vynesené křivky a vizuálně zkontrolovat, jak dobře data odpovídají generované kompetitivní vazebné křivce u každého provedení zkoušky. V průběhu této technické kontroly je pozorovaný pokles procenta specificky navázaného [^3H]-17 β -estradiolu v závislosti na koncentraci, nízká variabilita mezi technickými replikáty při jednotlivých koncentracích chemické látky a konzistentní parametry u tří provedení zkoušky dobrým ukazatelem, že zkouška a analýzy dat byly provedeny správně.

Interpretace údajů

57. Za předpokladu, že jsou splněna všechna kritéria přijatelnosti, lze zkoušenou chemickou látku považovat za látku, která se váže na hrER α , jestliže lze vynést vazebnou křivku a nejnižší bod na křivce odpovědi v rozsahu dat je menší než 50 % (obrázek 1).

58. Za předpokladu, že jsou splněna všechna kritéria přijatelnosti, lze zkoušenou chemickou látku považovat za látku, která se neváže na hrER α , jestliže:

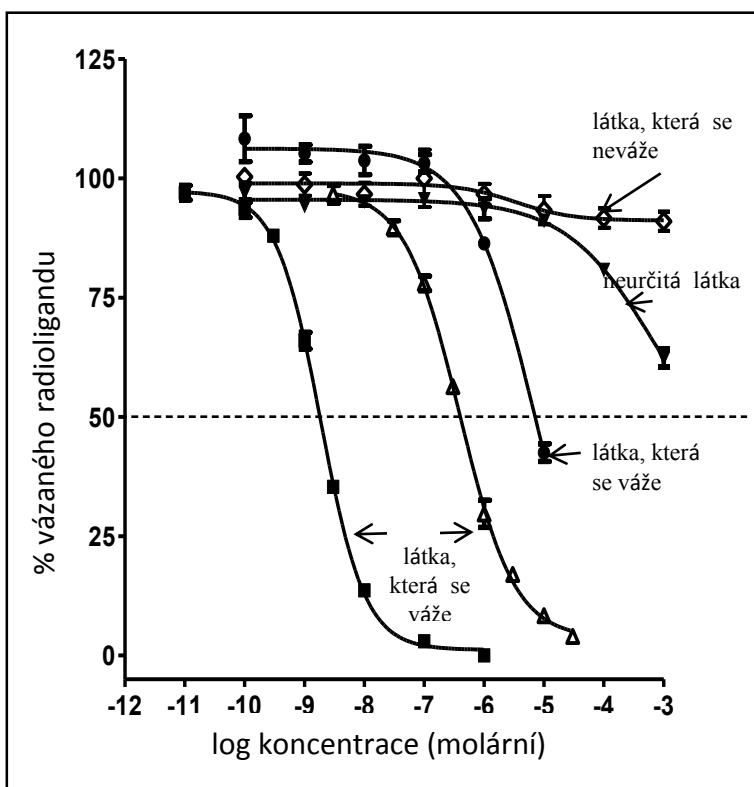
- lze vynést vazebnou křivku a nejnižší bod na křivce odpovědi v rozsahu dat je nad 75 % nebo
- nelze vynést vazebnou křivku a nejnižší nevyhlazené průměrné procento vazby ze skupiny koncentrací v datech je nad 75 %.

59. Zkoušené chemické látky se považují za neurčité, jestliže není splněna žádná z výše uvedených podmínek (např. nejnižší bod na vynesené křivce odpovědi je mezi 76 a 51 %).

Tabulka 7: Kritéria pro stanovení klasifikace zkoušené chemické látky podle kompetitivní vazebné křivky

Klasifikace	Kritéria
Látka, která se váže ^a	Lze vynést vazebnou křivku. Nejnižší bod na křivce odpovědi v rozsahu dat je menší než 50 %.
Látka, která se neváže ^b	Jestliže lze vynést vazebnou křivku, je nejnižší bod na křivce odpovědi v rozsahu dat nad 75 %. Jestliže nelze vynést vazebnou křivku, je nejnižší nevyhlazené průměrné procento vazby ze skupiny koncentrací v datech nad 75 %.
Neurčitá ^c	Každé testovatelné provedení zkoušky, kdy se látka nechová ani jako látka, která se váže, ani jako látka, která se neváže (např. nejnižší bod na vynesené křivce odpovědi je mezi 76 a 51 %).

Obrázek 1: Příklady klasifikace zkoušené chemické látky s použitím kompetitivní vazebné křivky



60. Sloučí se několik testů zkoušené chemické látky provedených v laboratoři, každému testu se přiřadí numerická hodnota a jednotlivé testy se zprůměrují, jak je znázorněno v tabulce 8. Výsledky sloučených testů v rámci každé laboratoře se porovnají s předpokládanou klasifikací jednotlivých zkoušených chemických látek.

Tabulka 8: Metoda pro klasifikaci zkoušené chemické látky s použitím několika testů v rámci laboratoře

Přiřazení hodnoty každému testu:	
Klasifikace	Číselná hodnota
váže se	2
neurčitá	1
neváže se	0
Klasifikace průměru číselných hodnot ze všech testů:	
Klasifikace	Číselná hodnota
váže se	průměr $\geq 1,5$
neurčitá	$0,5 \leq \text{průměr} < 1,5$
neváže se	průměr $< 0,5$

ZÁVĚREČNÁ ZPRÁVA

61. Viz odstavec 24 „**SLOŽKY VAZEBNÉ ANALÝZY hrER**“ této zkušební metody.

Dodatek 2.1

SEZNAM VÝRAZŮ

[³H]E₂: 17β-estradiol značený radioizotopem tritia

DCC: aktivní uhlí potažené dextranem

E₂: neznačený 17β-estradiol (inertní)

Zkušební pufr: 10 mM Tris, 10 mg bovinního sérového albuminu /ml, 2 mM DTT, 10% glycerol, 0,2 mM leupeptinu, pH 7,5

hrERα: lidský rekombinantní estrogenní receptor alfa (ligand vázající doména)

Replikát: Jedna z několika jamek, které obsahují stejný obsah ve stejné koncentraci a analyzují se souběžně v rámci jednoho provedení zkoušky. V tomto protokolu se každá koncentrace zkoušené chemické látky testuje třikrát; to znamená, že existují tři replikáty, které se analyzují současně při každé koncentraci zkoušené chemické látky.

Provedení zkoušky: Úplná sada jamek na mikrotitrační destičce analyzovaných souběžně, která poskytuje všechny informace potřebné pro charakterizaci vazby zkoušené chemické látky na hrERα (tzn. celkový [³H]-17β-estradiol přidaný do zkušební jamky, maximální vazba [³H]-17β-estradiolu na hrERα, nespecifická vazba a celková vazba při různých koncentracích zkoušené chemické látky). Provedení zkoušky může sestávat pouze z jedné jamky (tj. replikátu) na každou koncentraci, ale protože tento protokol vyžaduje trojí analyzování, sestává jedno provedení ze tří jamek na každou koncentraci. Dále tento protokol vyžaduje tři nezávislá (tj. nesouběžná) provedení na každou chemickou látku.

Dodatek 2.2

TYPICKÁ SATURAČNÍ ANALÝZA [³H]-17B-ESTRADIOLU SE TŘEMI REPLIKOVANÝMI JAMKAMI

Typická saturační analýza [³ H]-17β-estradiolu se třemi replikovanými jamkami												
Poloha	Replikát	Kód typu jamky	Výchozí koncentrace radioaktivního E2 (nM)	Objem radioaktivního E2 (μl)	Konečná koncentrace radioaktivního E2 (nM)	Výchozí koncentrace neradioaktivního E2 (μM)	Objem neradioaktivního E2 (μl)	Konečná koncentrace neradioaktivního E2 (μM)	Objem pufru (μl)	Objem receptoru (μl)	Celkový objem v jamkách	
A1	1	H	0,12	40	0,03	—	—	—	80	40	160	
A2	2	H	0,12	40	0,03	—	—	—	80	40	160	
A3	3	H	0,12	40	0,03	—	—	—	80	40	160	
A4	1	H	0,24	40	0,06	—	—	—	80	40	160	
A5	2	H	0,24	40	0,06	—	—	—	80	40	160	
A6	3	H	0,24	40	0,06	—	—	—	80	40	160	
A7	1	H	0,32	40	0,08	—	—	—	80	40	160	
A8	2	H	0,32	40	0,08	—	—	—	80	40	160	
A9	3	H	0,32	40	0,08	—	—	—	80	40	160	
A10	1	H	0,40	40	0,10	—	—	—	80	40	160	
A11	2	H	0,40	40	0,10	—	—	—	80	40	160	
A12	3	H	0,40	40	0,10	—	—	—	80	40	160	
B1	1	H	1,20	40	0,30	—	—	—	80	40	160	
B2	2	H	1,20	40	0,30	—	—	—	80	40	160	
B3	3	H	1,20	40	0,30	—	—	—	80	40	160	
B4	1	H	2,40	40	0,60	—	—	—	80	40	160	
B5	2	H	2,40	40	0,60	—	—	—	80	40	160	
B6	3	H	2,40	40	0,60	—	—	—	80	40	160	
B7	1	H	4,00	40	1,00	—	—	—	80	40	160	
B8	2	H	4,00	40	1,00	—	—	—	80	40	160	
B9	3	H	4,00	40	1,00	—	—	—	80	40	160	
B10	1	H	12,00	40	3,00	—	—	—	80	40	160	
B11	2	H	12,00	40	3,00	—	—	—	80	40	160	
B12	3	H	12,00	40	3,00	—	—	—	80	40	160	
D1	1	HC	0,12	40	0,03	0,06	80	0,03	—	40	160	
D2	2	HC	0,12	40	0,03	0,06	80	0,03	—	40	160	
D3	3	HC	0,12	40	0,03	0,06	80	0,03	—	40	160	
D4	1	HC	0,24	40	0,06	0,12	80	0,06	—	40	160	
D5	2	HC	0,24	40	0,06	0,12	80	0,06	—	40	160	
D6	3	HC	0,24	40	0,06	0,12	80	0,06	—	40	160	
D7	1	HC	0,32	40	0,08	0,16	80	0,08	—	40	160	
D8	2	HC	0,32	40	0,08	0,16	80	0,08	—	40	160	
D9	3	HC	0,32	40	0,08	0,16	80	0,08	—	40	160	
D10	1	HC	0,40	40	0,10	0,2	80	0,1	—	40	160	
D11	2	HC	0,40	40	0,10	0,2	80	0,1	—	40	160	
D12	3	HC	0,40	40	0,10	0,2	80	0,1	—	40	160	

Typická saturační analýza [3H]-17β-estradiolu se třemi replikovanými jamkami

Poloha	REP	Kód typu jamky	Výchozí koncentrace radioaktivního E2 (nM)	Objem radioaktivního E2 (μl)	Konečná koncentrace radioaktivního E2 (nM)	Výchozí koncentrace neradioaktivního E2 (μM)	Objem neradioaktivního E2 (μl)	Konečná koncentrace neradioaktivního E2 (μM)	Objem pufru (μl)	Objem receptoru (μl)	Celkový objem v jamkách
E1	1	HC	1,20	40	0,30	0,6	80	0,3	—	40	160
E2	2	HC	1,20	40	0,30	0,6	80	0,3	—	40	160
E3	3	HC	1,20	40	0,30	0,6	80	0,3	—	40	160
E4	1	HC	2,40	40	0,60	1,2	80	0,6	—	40	160
E5	2	HC	2,40	40	0,60	1,2	80	0,6	—	40	160
E6	3	HC	2,40	40	0,60	1,2	80	0,6	—	40	160
E7	1	HC	4,00	40	1,00	2	80	1	—	40	160
E8	2	HC	4,00	40	1,00	2	80	1	—	40	160
E9	3	HC	4,00	40	1,00	2	80	1	—	40	160
E10	1	HC	12,00	40	3,00	6	80	3	—	40	160
E11	2	HC	12,00	40	3,00	6	80	3	—	40	160
E12	3	HC	12,00	40	3,00	6	80	3	—	40	160
G1	1	radioaktivní	0,12	40	0,03	—	—	—	—	—	40
G2	2	radioaktivní	0,12	40	0,03	—	—	—	—	—	40
G3	3	radioaktivní	0,12	40	0,03	—	—	—	—	—	40
G4	1	radioaktivní	0,24	40	0,06	—	—	—	—	—	40
G5	2	radioaktivní	0,24	40	0,06	—	—	—	—	—	40
G6	3	radioaktivní	0,24	40	0,06	—	—	—	—	—	40
G7	1	radioaktivní	0,32	40	0,08	—	—	—	—	—	40
G8	2	radioaktivní	0,32	40	0,08	—	—	—	—	—	40
G9	3	radioaktivní	0,32	40	0,08	—	—	—	—	—	40
G10	1	radioaktivní	0,40	40	0,10	—	—	—	—	—	40
G11	2	radioaktivní	0,40	40	0,10	—	—	—	—	—	40
G12	3	radioaktivní	0,40	40	0,10	—	—	—	—	—	40
H1	1	radioaktivní	1,20	40	0,30	—	—	—	—	—	40
H2	2	radioaktivní	1,20	40	0,30	—	—	—	—	—	40
H3	3	radioaktivní	1,20	40	0,30	—	—	—	—	—	40
H4	1	radioaktivní	2,40	40	0,60	—	—	—	—	—	40
H5	2	radioaktivní	2,40	40	0,60	—	—	—	—	—	40
H6	3	radioaktivní	2,40	40	0,60	—	—	—	—	—	40
H7	1	radioaktivní	4,00	40	1,00	—	—	—	—	—	40
H8	2	radioaktivní	4,00	40	1,00	—	—	—	—	—	40
H9	3	radioaktivní	4,00	40	1,00	—	—	—	—	—	40
H10	1	radioaktivní	12,00	40	3,00	—	—	—	—	—	40
H11	2	radioaktivní	12,00	40	3,00	—	—	—	—	—	40
H12	3	radioaktivní	12,00	40	3,00	—	—	—	—	—	40

Upozorňujeme, že „radioaktivní“ jamky jsou v průběhu inkubace prázdné. 40 μl se přidává až pro počítání scintilací.

Dodatek 2.3: Uspořádání jamek při kompetitivní vazebné analýze

Mikrodestička	Poloha	Replikát	Typ jamky	Kód jamky	Kód koncentrace	Výchozí koncentrace kompetitora (M)	Zásobní hrER (μl)	Objem pufru (μl)	Objem stopovací látky (radioaktivní E2) (μl)	Objem z destičky s ředěním (μl)	Konečný objem (μl)	Konečná koncentrace kompetitora (M)
S	A1	1	celková vazba	TB	TB1	–	40		40	80	160	–
P	A2	2	celková vazba	TB	TB2	–	40		40	80	160	–
P	A3	3	celková vazba	TB	TB3	–	40		40	80	160	–
P	A4	1	celková vazba	TB	TB4	–	40		40	80	160	–
P	A5	2	celková vazba	TB	TB5	–	40		40	80	160	–
P	A6	3	celková vazba	TB	TB6	–	40		40	80	160	–
P	A7	1	neradioaktivní E2 (vysoká)	NSB	S0	2.00E-06	40	–	40	80	160	1.0E-06
S	A8	2	neradioaktivní E2 (vysoká)	NSB	S0	2.00E-06	40	–	40	80	160	1.0E-06
S	A9	3	neradioaktivní E2 (vysoká)	NSB	S0	2.00E-06	40	–	40	80	160	1.0E-06
S	A10	1	neradioaktivní E2 (vysoká)	NSB	S0	2.00E-06	40	–	40	80	160	1.0E-06
S	A11	2	neradioaktivní E2 (vysoká)	NSB	S0	2.00E-06	40	–	40	80	160	1.0E-06
S	A12	3	neradioaktivní E2 (vysoká)	NSB	S0	2.00E-06	40	–	40	80	160	1.0E-06
S	B1	1	neradioaktivní E2	S	S1	2.00E-07	40	–	40	80	160	1.0E-07
S	B2	2	neradioaktivní E2	S	S1	2.00E-07	40	–	40	80	160	1.0E-07
S	B3	3	neradioaktivní E2	S	S1	2.00E-07	40	–	40	80	160	1.0E-07
S	B4	1	neradioaktivní E2	S	S2	2.00E-08	40	–	40	80	160	1.0E-08
S	B5	2	neradioaktivní E2	S	S2	2.00E-08	40	–	40	80	160	1.0E-08
S	B6	3	neradioaktivní E2	S	S2	2.00E-08	40	–	40	80	160	1.0E-08
S	B7	1	neradioaktivní E2	S	S3	6.00E-09	40	–	40	80	160	3.0E-09
S	B8	2	neradioaktivní E2	S	S3	6.00E-09	40	–	40	80	160	3.0E-09
S	B9	3	neradioaktivní E2	S	S3	6.00E-09	40	–	40	80	160	3.0E-09
S	B10	1	neradioaktivní E2	S	S4	2.00E-09	40	–	40	80	160	1.0E-09
S	B11	2	neradioaktivní E2	S	S4	2.00E-09	40	–	40	80	160	1.0E-09
S	B12	3	neradioaktivní E2	S	S4	2.00E-09	40	–	40	80	160	1.0E-09
S	C1	1	neradioaktivní E2	S	S5	6.00E-10	40	–	40	80	160	3.0E-10
S	C2	2	neradioaktivní E2	S	S5	6.00E-10	40	–	40	80	160	3.0E-10
S	C3	3	neradioaktivní E2	S	S5	6.00E-10	40	–	40	80	160	3.0E-10
S	C4	1	neradioaktivní E2	S	S6	2.00E-10	40	–	40	80	160	1.0E-10
S	C5	2	neradioaktivní E2	S	S6	2.00E-10	40	–	40	80	160	1.0E-10
S	C6	3	neradioaktivní E2	S	S6	2.00E-10	40	–	40	80	160	1.0E-10
S	C7	1	neradioaktivní E2	S	S7	2.00E-11	40	–	40	80	160	1.0E-11
S	C8	2	neradioaktivní E2	S	S7	2.00E-11	40	–	40	80	160	1.0E-11
S	C9	3	neradioaktivní E2	S	S7	2.00E-11	40	–	40	80	160	1.0E-11
S	C10	1	slepá zkouška	slepá	B1	–	–	160	–	–	160	–
S	C11	2	slepá zkouška	slepá	B2	–	–	160	–	–	160	–
P	C12	3	slepá zkouška	slepá	B3	–	–	160	–	–	160	–
P	D1	1	norethynodrel	NE	WP1	6.00E-05	40	–	40	80	160	3.0E-05
S	D2	1	norethynodrel	NE	WP1	6.00E-05	40	–	40	80	160	3.0E-05
S	D3	1	norethynodrel	NE	WP1	6.00E-05	40	–	40	80	160	3.0E-05
S	D4	1	norethynodrel	NE	WP2	2.00E-05	40	–	40	80	160	1.0E-05
S	D5	1	norethynodrel	NE	WP2	2.00E-05	40	–	40	80	160	1.0E-05
S	D6	1	norethynodrel	NE	WP2	2.00E-05	40	–	40	80	160	1.0E-05
S	D7	1	norethynodrel	NE	WP3	6.00E-06	40	–	40	80	160	3.0E-06
S	D8	1	norethynodrel	NE	WP3	6.00E-06	40	–	40	80	160	3.0E-06
S	D9	1	norethynodrel	NE	WP3	6.00E-06	40	–	40	80	160	3.0E-06
S	D10	1	norethynodrel	NE	WP4	2.00E-06	40	–	40	80	160	1.0E-06
S	D11	1	norethynodrel	NE	WP4	2.00E-06	40	–	40	80	160	1.0E-06

S	D12	1	norethynodrel	NE	WP4	2.00E-06	40	–	40	80	160	1.0E-06

Uspořádání jamek při kompetitivní vazebné analýze												
Mikrodestička	Poloha	Replikát	Typ jamky	Kód jamky	Kód koncentrace	Výchozí koncentrace kompetitora (M)	Zásobní hrER (μl)	Objem pufru (μl)	látky (radioaktivní E2)	Objem z destičky s ředěním (μl)	Končný objem (μl)	Konečná koncentrace kompetitora (M)
S	E1	1	norethynodrel	NE	WP	6.00E-07-	40		40	80	160	3.0E-07
S	E2	2	norethynodrel	NE	WP	6.00E-07-	40		40	80	160	3.0E-07
S	E3	3	norethynodrel	NE	WP	6.00E-07-	40		40	80	160	3.0E-07
S	E4	1	norethynodrel	NE	WP	2.00E-07-	40		40	80	160	1.0E-07
S	E5	2	norethynodrel	NE	WP	2.00E-07-	40		40	80	160	1.0E-07
S	E6	3	norethynodrel	NE	WP	2.00E-07-	40		40	80	160	1.0E-07
S	E7	1	norethynodrel	NE	WP	6.00E-08-	40	-	40	80	160	3.0E-08
S	E8	2	norethynodrel	NE	WP	6.00E-08-	40	-	40	80	160	3.0E-08
S	E9	3	norethynodrel	NE	WP	6.00E-08-	40	-	40	80	160	3.0E-08
S	E10	1	norethynodrel	NE	WP	6.00E-09-	40	-	40	80	160	3.0E-09
S	E11	2	norethynodrel	NE	WP	6.00E-09-	40	-	40	80	160	3.0E-09
S	E12	3	norethynodrel	NE	WP	6.00E-09-	40	-	40	80	160	3.0E-09
S	F1	1	OTES	N	OTES	2.00E-03	40	-	40	80	160	1.0E-03
S	F2	2	OTES	N	OTES	2.00E-03	40	-	40	80	160	1.0E-03
S	F3	3	OTES	N	OTES	2.00E-03	40	-	40	80	160	1.0E-03
S	F4	1	OTES	N	OTES	2.00E-04	40	-	40	80	160	1.0E-04
S	F5	2	OTES	N	OTES	2.00E-04	40	-	40	80	160	1.0E-04
S	F6	3	OTES	N	OTES	2.00E-04	40	-	40	80	160	1.0E-04
S	F7	1	OTES	N	OTES	2.00E-05	40	-	40	80	160	3.0E-05
S	F8	2	OTES	N	OTES	2.00E-05	40	-	40	80	160	3.0E-05
S	F9	3	OTES	N	OTES	2.00E-05	40	-	40	80	160	3.0E-05
S	F10	1	OTES	N	OTES	2.00E-06	40	-	40	80	160	1.0E-06
S	F11	2	OTES	N	OTES	2.00E-06	40	-	40	80	160	1.0E-06
S	F12	3	OTES	N	OTES	2.00E-06	40	-	40	80	160	1.0E-06
S	G1	1	OTES	N	OTES	2.00E-07	40	-	40	80	160	3.0E-07
S	G2	2	OTES	N	OTES	2.00E-07	40	-	40	80	160	3.0E-07
S	G3	3	OTES	N	OTES	2.00E-07	40	-	40	80	160	3.0E-07
S	G4	1	OTES	N	OTES	2.00E-08	40	-	40	80	160	1.0E-08
S	G5	2	OTES	N	OTES	2.00E-08	40	-	40	80	160	1.0E-08
S	G6	3	OTES	N	OTES	2.00E-08	40	-	40	80	160	1.0E-08
S	G7	1	OTES	N	OTES	2.00E-09	40	-	40	80	160	1.0E-09
S	G8	2	OTES	N	OTES	2.00E-09	40	-	40	80	160	1.0E-09
S	G9	3	OTES	N	OTES	2.00E-09	40	-	40	80	160	1.0E-09
S	G10	1	OTES	N	OTES	2.00E-10	40	-	40	-	160	1.0E-10
S	G11	2	OTES	N	OTES	2.00E-10	40	-	40	-	160	1.0E-10
S	G12	3	OTES	N	OTES	2.00E-10	40	-	40	-	160	1.0E-10
S	H1	1	radioaktivní	H	H	-	-	-	40	-	40	-
P	H2	1	radioaktivní	H	H	-	-	-	40	-	40	-
S	H3	1	radioaktivní	H	H	-	-	-	40	-	40	-
S	H4	1	radioaktivní	H	H	-	-	-	40	-	40	-
S	H5	1	radioaktivní	H	H	-	-	-	40	-	40	-
S	H6	1	radioaktivní	H	H	-	-	-	40	-	40	-
S	H7	1	kontrola s pufrem	BC	BC	-	40	80	40	-	160	-
S	H8	1	kontrola s pufrem	BC	BC	-	40	80	40	-	160	-
S	H9	1	kontrola s pufrem	BC	BC	-	40	80	40	-	160	-
S	H10	1	kontrola s pufrem	BC	BC	-	40	80	40	-	160	-
S	H11	1	kontrola s pufrem	BC	BC	-	40	80	40	-	160	-
S	H12	1	kontrola s pufrem	BC	BC	-	40	80	40	-	160	-

Upozorňujeme, že „radioaktivní“ jamky jsou v průběhu inkubace prázdné. 40 μl se přidává až pro počítání scintilací.

Uspořádání jamek při kompetitivní vazebné analýze												
Mikrodestička	Poloha	Replikát	Druh jamky	Kód jamky	Kód koncentrace	Výchozí koncentrace kompetitora (M)	Zásobní hrER (μl)	Objem pufru (μl)	Látky (radioaktivní objem z destičky s ředěním ...)	Konečný objem (μl)	Konečná koncentrace kompetitora (M)	
P1	A1	1	celková vazba	TB	TBB1B1	-	40	-	40	80	160	-
P1	A2	2	celková vazba	TB	TB2	-	40	-	40	80	160	-
P1	A3	3	celková vazba	TB	TB3	-	40	-	40	80	160	-
P1	A4	1	celková vazba	TB	TB4	-	40	-	40	80	160	-
P1	A5	2	celková vazba	TB	TB5	-	40	-	40	80	160	-
P1	A6	3	celková vazba	TB	TB6	-	40	-	40	80	160	-
P1	A7	1	neradioaktivní E2 (vysoká)	NSB	S0	2.00E-06	40	-	40	80	160	1.0E-06
P1	A8	2	neradioaktivní E2 (vysoká)	NSB	S0	2.00E-06	40	-	40	80	160	1.0E-06
P1	A9	3	neradioaktivní E2 (vysoká)	NSB	S0	2.00E-06	40	-	40	80	160	1.0E-06
P1	A10	1	neradioaktivní E2 (vysoká)	NSB	S0	2.00E-06	40	-	40	80	160	1.0E-06
P1	A11	2	neradioaktivní E2 (vysoká)	NSB	S0	2.00E-06	40	-	40	80	160	1.0E-06
P1	A12	3	neradioaktivní E2 (vysoká)	NSB	S0	2.00E-06	40	-	40	80	160	1.0E-06
P1	B1	1	Zkoušená chemická látka 1	TC1	1	2.00E-03	40	0	40	80	160	1.0E-03
P1	B2	2	Zkoušená chemická látka 1	TC1	1	2.00E-03	40	0	40	80	160	1.0E-03
P1	B3	3	Zkoušená chemická látka 1	TC1	1	2.00E-03	40	0	40	80	160	1.0E-03
P1	B4	1	Zkoušená chemická látka 1	TC1	2	2.00E-04	40	0	40	80	160	1.0E-04
P1	B5	2	Zkoušená chemická látka 1	TC1	2	2.00E-04	40	0	40	80	160	1.0E-04
P1	B6	3	Zkoušená chemická látka 1	TC1	2	2.00E-04	40	0	40	80	160	1.0E-04
P1	B7	1	Zkoušená chemická látka 1	TC1	3	2.00E-05	40	0	40	80	160	1.0E-05
P1	B8	2	Zkoušená chemická látka 1	TC1	3	2.00E-05	40	0	40	80	160	1.0E-05
P1	B9	3	Zkoušená chemická látka 1	TC1	3	2.00E-05	40	0	40	80	160	1.0E-05
P1	B10	1	Zkoušená chemická látka 1	TC1	4	2.00E-06	40	0	40	80	160	1.0E-06
P1	B11	2	Zkoušená chemická látka 1	TC1	4	2.00E-06	40	0	40	80	160	1.0E-06
P1	B12	3	Zkoušená chemická látka 1	TC1	4	2.00E-06	40	0	40	80	160	1.0E-06
P1	C1	1	Zkoušená chemická látka 1	TC1	5	2.00E-07	40	0	40	80	160	1.0E-07
P1	C2	2	Zkoušená chemická látka 1	TC1	5	2.00E-07	40	0	40	80	160	1.0E-07
P1	C3	3	Zkoušená chemická látka 1	TC1	5	2.00E-07	40	0	40	80	160	1.0E-07
P1	C4	1	Zkoušená chemická látka 1	TC1	6	2.00E-08	40	0	40	80	160	1.0E-08
P1	C5	2	Zkoušená chemická látka 1	TC1	6	2.00E-08	40	0	40	80	160	1.0E-08
P1	C6	3	Zkoušená chemická látka 1	TC1	6	2.00E-08	40	0	40	80	160	1.0E-08
P1	C7	1	Zkoušená chemická látka 1	TC1	7	2.00E-09	40	0	40	80	160	1.0E-09
P1	C8	2	Zkoušená chemická látka 1	TC1	7	2.00E-09	40	0	40	80	160	1.0E-09
P1	C9	3	Zkoušená chemická látka 1	TC1	7	2.00E-09	40	0	40	80	160	1.0E-09
P1	C10	1	Zkoušená chemická látka 1	TC1	8	2.00E-10	40	0	40	80	160	1.0E-10
P1	C11	2	Zkoušená chemická látka 1	TC1	8	2.00E-10	40	0	40	80	160	1.0E-10
P1	C12	3	Zkoušená chemická látka 1	TC1	8	2.00E-10	40	0	40	80	160	1.0E-10

P1	D1	1	Zkoušená chemická látka 2	TC2	1	2.00E-03	40	0	40	80	160	1.0E-03
P1	D2	2	Zkoušená chemická látka 2	TC2	1	2.00E-03	40	0	40	80	160	1.0E-03
P1	D3	3	Zkoušená chemická látka 2	TC2	1	2.00E-03	40	0	40	80	160	1.0E-03
P1	D4	1	Zkoušená chemická látka 2	TC2	2	2.00E-04	40	0	40	80	160	1.0E-04
P1	D5	2	Zkoušená chemická látka 2	TC2	2	2.00E-04	40	0	40	80	160	1.0E-04
P1	D6	3	Zkoušená chemická látka 2	TC2	2	2.00E-04	40	0	40	80	160	1.0E-04
P1	D7	1	Zkoušená chemická látka 2	TC2	3	2.00E-05	40	0	40	80	160	1.0E-05
P1	D8	2	Zkoušená chemická látka 2	TC2	3	2.00E-05	40	0	40	80	160	1.0E-05
P1	D9	3	Zkoušená chemická látka 2	TC2	3	2.00E-05	40	0	40	80	160	1.0E-05
P1	D10	1	Zkoušená chemická látka 2	TC2	4	2.00E-06	40	0	40	80	160	1.0E-06
P1	D11	2	Zkoušená chemická látka 2	TC2	4	2.00E-06	40	0	40	80	160	1.0E-06
P1	D12	3	Zkoušená chemická látka 2	TC2	4	2.00E-06	40	0	40	80	160	1.0E-06
P1	E1	1	Zkoušená chemická látka 2	TC2	5	2.00E-07	40	0	40	80	160	1.0E-07
P1	E2	2	Zkoušená chemická látka 2	TC2	5	2.00E-07	40	0	40	80	160	1.0E-07
P1	E3	3	Zkoušená chemická látka 2	TC2	5	2.00E-07	40	0	40	80	160	1.0E-07

Uspořádání jamek při kompetitivní vazebné analýze												
Mikrodestička	Poloha	Replikát	Druh jamky	Kód jamky	Kód koncentrace	Výchozí koncentrace kompetitora (M)	Zásobní hrER (μl)	Objem pufru (μl)	látky (radioaktivní E2)	Objem z destičky s ředěním (μl)	Konečný objem (μl)	Konečná koncentrace kompetitora (M)
P1	E4	1	Zkoušená chemická látka 2	TC2	6	-	40	0	40	80	160	1.0E-08
P1	E5	2	Zkoušená chemická látka 2	TC2	6	-	40	0	40	80	160	1.0E-08
P1	E6	3	Zkoušená chemická látka 2	TC2	6	-	40	0	40	80	160	1.0E-08
P1	E7	1	Zkoušená chemická látka 2	TC2	7	2.00E-06	40	0	40	80	160	1.0E-09
P1	E8	2	Zkoušená chemická látka 2	TC2	7	2.00E-06	40	0	40	80	160	1.0E-09
P1	E9	3	Zkoušená chemická látka 2	TC2	7	2.00E-06	40	0	40	80	160	1.0E-09
P1	E10	1	Zkoušená chemická látka 2	TC2	8	2.00E-06	40	0	40	80	160	1.0E-10
P1	E11	2	Zkoušená chemická látka 2	TC2	8	2.00E-06	40	0	40	80	160	1.0E-10
P1	E12	3	Zkoušená chemická látka 2	TC2	8	2.00E-06	40	0	40	80	160	1.0E-10
P1	F1	1	Zkoušená chemická látka 3	TC3	1	2.00E-03	40	0	40	80	160	1.0E-03
P1	F2	2	Zkoušená chemická látka 3	TC3	1	2.00E-03	40	0	40	80	160	1.0E-03
P1	F3	3	Zkoušená chemická látka 3	TC3	1	2.00E-03	40	0	40	80	160	1.0E-03
P1	F4	1	Zkoušená chemická látka 3	TC3	2	2.00E-04	40	0	40	80	160	1.0E-04
P1	F5	2	Zkoušená chemická látka 3	TC3	2	2.00E-04	40	0	40	80	160	1.0E-04
P1	F6	3	Zkoušená chemická látka 3	TC3	2	2.00E-04	40	0	40	80	160	1.0E-04
P1	F7	1	Zkoušená chemická látka 3	TC3	3	2.00E-05	40	0	40	80	160	1.0E-05
P1	F8	2	Zkoušená chemická látka 3	TC3	3	2.00E-05	40	0	40	80	160	1.0E-05
P1	F9	3	Zkoušená chemická látka 3	TC3	3	2.00E-05	40	0	40	80	160	1.0E-05
P1	F10	1	Zkoušená chemická látka 3	TC3	4	2.00E-06	40	0	40	80	160	1.0E-06
P1	F11	2	Zkoušená chemická látka 3	TC3	4	2.00E-06	40	0	40	80	160	1.0E-06
P1	F12	3	Zkoušená chemická látka 3	TC3	4	2.00E-06	40	0	40	80	160	1.0E-06
P1	G1	1	Zkoušená chemická látka 3	TC3	5	2.00E-07	40	0	40	80	160	1.0E-07
P1	G2	2	Zkoušená chemická látka 3	TC3	5	2.00E-07	40	0	40	80	160	1.0E-07
P1	G3	3	Zkoušená chemická látka 3	TC3	5	2.00E-07	40	0	40	80	160	1.0E-07
P1	G4	1	Zkoušená chemická látka 3	TC3	6	2.00E-08	40	0	40	80	160	1.0E-08
P1	G5	2	Zkoušená chemická látka 3	TC3	6	2.00E-08	40	0	40	80	160	1.0E-08
P1	G6	3	Zkoušená chemická látka 3	TC3	6	2.00E-08	40	0	40	80	160	1.0E-08
P1	G7	1	Zkoušená chemická látka 3	TC3	7	2.00E-09	40	0	40	80	160	1.0E-09
P1	G8	2	Zkoušená chemická látka 3	TC3	7	2.00E-09	40	0	40	80	160	1.0E-09
P1	G9	3	Zkoušená chemická látka 3	TC3	7	2.00E-09	40	0	40	80	160	1.0E-09
P1	G10	1	Zkoušená chemická látka 3	TC3	8	2.00E-10	40	0	40	80	160	1.0E-10

P1	G11	2	Zkoušená chemická látka 3	TC3	8	2.00E-10	40	0	40	80	160	1.0E-10
P1	G12	3	Zkoušená chemická látka 3	TC3	8	2.00E-10	40	0	40	80	160	1.0E-10
P1	H1	1	norethynodrel	NE		IC50	40	0	40	80	160	
P1	H2	2	norethynodrel	NE		IC50	40	0	40	80	160	
P1	H3	3	norethynodrel	NE		IC50	40	0	40	80	160	
P1	H4	1	norethynodrel	NE		1.00E-4,5	40	0	40	80	160	
P1	H5	2	norethynodrel	NE		1.00E-4,5	40	0	40	80	160	
P1	H6	3	norethynodrel	NE		1.00E-4,5	40	0	40	80	160	
P1	H7	1	neradioaktivní E2 S			IC50	40	0	40	80	160	
P1	H8	2	neradioaktivní E2 S			IC50	40	0	40	80	160	
P1	H9	3	neradioaktivní E2 S			IC50	40	0	40	80	160	
P1	H10	1	neradioaktivní E2 S			1.00E-7	40	0	40	80	160	
P1	H11	2	neradioaktivní E2 S			1.00E-7	40	0	40	80	160	
P1	H12	3	neradioaktivní E2 S			1.00E-7	40	0	40	80	160	

Dodatek 3

ANALÝZA VAZBY NA ESTROGENOVÉ RECEPTORY *IN VITRO* S VYUŽITÍM LIDSKÉHO REKOMBINANTNÍHO PROTEINU S LIGAND VÁZAJÍCÍ DOMÉNOU PODLE ÚSTAVU PRO HODNOCENÍ A VÝZKUM CHEMICKÝCH LÁTEK (CERI)

VÝCHOZÍ ÚVAHY A OMEZENÍ (VIZ TAKÉ VŠEOBECNÝ ÚVOD)

1. Tato *in vitro* analýza saturační a kompetitivní vazby na estrogenový receptor (ER α) používá ligand vázající doménu lidského ER α (hrER α). Tato proteinová konstrukce, kterou vytvořil japonský Ústav pro hodnocení a výzkum chemických látek (CERI), existuje jako fúzní protein glutathion-S-transferáza (GST) a je exprimována v *E. coli*. Protokol CERI prošel mezinárodní validační studií v několika laboratořích (2), která prokázala jeho relevanci a spolehlivost pro zamýšlený účel analýzy.
2. Tato analýza je screeningovým postupem pro určení látek, které se mohou vázat na hrER α . Používá se na určení schopnosti zkoušené chemické látky konkurovat 17 β -estradiolu ve vazbě na hrER α -LBD. Výsledky kvantitativní analýzy mohou zahrnovat IC₅₀ (míra koncentrace zkoušené chemické látky potřebná na vytěsnění poloviny [³H]-17 β -estradiolu z hrER α) a relativní vazebné afinity zkoušených chemických látek pro hrER α v porovnání s 17 β -estradiol. Pro účely chemického screeningu mohou přijatelné výsledky kvalitativní analýzy zahrnovat klasifikace zkoušených chemických látek jako látek, které se vážou na hrER α , látek, které se na něj nevážou, nebo látek neurčitých, a to na základě kritérií popsaných u vazebných křivek.
3. Analýza používá radioaktivní ligand, což vyžaduje, aby laboratoř měla povolení nakládat s radioaktivními materiály. Při používání radioizotopů a nebezpečných chemických látek musí být dodržovány předpisy a postupy stanovené vnitrostátními právními předpisy.
4. Před použitím této analýzy pro regulační účely je třeba přečíst si části „**VŠEOBECNÝ ÚVOD**“ a „**SLOŽKY VAZEBNÉ ANALÝZY hrER**“. Definice a zkratky používané v této zkušební metodě jsou popsány v dodatku 1.

PRINCIPY ANALÝZY (VIZ TAKÉ VŠEOBECNÝ ÚVOD)

5. Test vazby na hrER α měří schopnost radioizotopově značeného ligandu ([³H]17 β -estradiol) vázat se na ER v přítomnosti zvyšujících se koncentrací zkoušené chemické látky (tj. kompetitor). Zkoušené chemické látky, které mají vysokou afinitu na ER, konkurují radioizotopově značenému ligandu při nižší koncentraci v porovnání s chemickými látkami s nižší afinitou na tento receptor.
6. Tato analýza sestává ze dvou hlavních složek: saturačního vazebného experimentu za účelem charakterizace parametrů interakce mezi receptorem a ligandem, po němž následuje

kompetitivní vazebný experiment, který charakterizuje kompetici mezi zkoušenou chemickou látkou a radioizotopově značeným ligandem ve vazbě na ER.

7. Účelem saturačního vazebného experimentu je charakterizovat konkrétní šarži receptorů z hlediska vazebné afinity a počtu při přípravě na kompetitivní vazebný experiment. Saturační vazebný experiment měří za rovnovážných podmínek afinitu pevně stanovené koncentrace estrogenového receptoru na jeho přirozený ligand (představovaný disociační konstantou K_d) a koncentraci míst aktivního receptoru (B_{max}).
8. Kompetitivní vazebný experiment měří afinitu látky konkurovat [^3H]17 β -estradiolu ve vazbě na ER. Afinita je kvantifikována koncentrací zkoušené chemické látky, která za rovnovážného stavu inhibuje 50 % specifické vazby [^3H]17 β -estradiolu (nazývá se „50% inhibiční koncentrace“ nebo IC_{50}). Může se hodnotit také pomocí relativní vazebné afinity (RBA, vzhledem k IC_{50} estradiolu měřené samostatně při stejném provedení zkoušky). Kompetitivní vazebný experiment měří vazbu [^3H]17 β -estradiolu při pevně stanovené koncentraci v přítomnosti širokého rozmezí (osm řádů) koncentrací zkoušené chemické látky. Data se poté vloží pokud možno do určité formy Hillový rovnice (Hill, 1910), která popisuje vytěsnění radioligandu kompetiční látkou s jedním vazebným místem. Rozsah vytěsnění radioizotopově značeného estradiolu v rovnovážném stavu se používá na charakterizaci zkoušené chemické látky jako látky, která se váže, která se neváže nebo která generuje neurčitou odpověď.

POSTUP

Prokázání funkční způsobilosti proteinu hrER α

9. Před rutinním prováděním saturačních a kompetitivních vazebných analýz by mělo být u každé nové šarže hrER α prokázáno, že v laboratoři, v níž bude používán, funguje správně. K prokázání způsobilosti by se měl použít proces zahrnující dva kroky. Jsou to tyto kroky:
 - Proved'te saturační vazebnou analýzu [^3H]-17 β -estradiolu na prokázání specifičnosti a saturace hrER α . V nelineární regresní analýze těchto dat (např. BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995) a na následném Scatchardově grafu by měla být dokumentována vazebná afinita hrER α vůči [^3H]-17 β -estradiolu (K_d) a počet receptorů (B_{max}) pro konkrétní šarži hrER α .
 - Proved'te kompetitivní vazebnou analýzu pomocí kontrolních látek (referenčního estrogenu (17 β -estradiol), látky se slabou vazbou (např. norethynodrel nebo norethindron) a látky, která se neváže (oktyltriethoxysilan, OTES). Každá laboratoř by si měla vytvořit historickou databázi dokumentující konzistentnost hodnot IC_{50} a relevantních hodnot pro referenční estrogen a látku se slabou vazbou u experimentů a různých šarží hrER α . Dále by parametry kompetitivních vazebných křivek pro kontrolní látky měly být v rozmezí 95% konfidenčního intervalu (viz tabulka 1), který byl stanoven pomocí dat z laboratoří, jež se účastnily validační studie pro tuto analýzu (2).

Tabulka 1: Kritéria výkonnosti vypracovaná pro referenční estrogen a látku se slabou vazbou, vazebná analýza CERi hrER

Látka	Parametr	Střední hodnota ^a	Směrodatná odchylka (n)	95% konfidenční intervaly ^b	
				Dolní mez	Horní mez
17β-estradiol	Horní	104,74	13,12 (70)	101,6	107,9
	Spodní strana	0,85	2,41 (70)	0,28	1,43
	Hillův koeficient	-1,22	0,20 (70)	-1,27	-1,17
	logIC ₅₀	-8,93	0,23 (70)	-8,98	-8,87
Norethynodrel	Horní	101,31	10,55 (68)	98,76	103,90
	Spodní strana	2,39	5,01 (68)	1,18	3,60
	Hillův koeficient	-1,04	0,21 (68)	-1,09	-0,99
	LogIC ₅₀	-6,19	0,40 (68)	-6,29	-6,10
Norethindrone^c	Nahoru	92,27	7,79 (23)	88,90	95,63
	Spodní strana	16,52	10,59 (23)	11,94	21,10
	Hillův koeficient	-1,18	0,32 (23)	-1,31	-1,04
	logIC ₅₀	-6,01	0,54 (23)	-6,25	-5,78

^aStřední hodnota (n) ± směrodatná odchylka (SD) byla vypočítána pomocí odhadu parametrů vynesené křivky (4parametrická Hillova rovnice) pro kontrolní zkoušky provedené ve čtyřech laboratořích při validační studii (viz příloha N k odkazu 2).

^b 95% konfidence je uvedena jako vodítko pro kritéria přijatelnosti.

^c Testování norethindronu bylo ve validační studii v dílčím úkolu 4 volitelné (viz odkaz 2, viz dílčí úkol 4). Střední hodnota ± (SD) (n) byla tedy vypočítána pomocí odhadu vynesené křivky (4parametrická Hillova rovnice) pro kontrolní zkoušky provedené ve dvou laboratořích.

Rozsah IC₅₀ bude záviset na K_d receptorového přípravku a koncentraci radioizotopově značeného ligandu použitého v každé laboratoři. Vhodná úprava rozsahu IC₅₀ podle podmínek použitých při provádění analýzy bude přijatelná.

Prokázání odborné způsobilosti laboratoře

- Viz odstavce 17 a 18 a tabulka 2 v části „**SLOŽKY VAZEBNÉ ANALÝZY hrER**“ této zkušební metody. Každá analýza (saturační a kompetitivní vazby) by měla zahrnovat tři nezávislé zkoušky (tzn. s čerstvě naředěným receptorem, chemickými látkami a reagenciemi) provedené v různé dny, přičemž každé provedení by mělo obsahovat tři opakování.

Určení koncentrace receptoru (hrERα)

- Koncentrace aktivního receptoru se poněkud liší podle šarže a podmínek uchovávání. Z tohoto důvodu je třeba stanovit koncentraci aktivního receptoru přijatého od dodavatele. Získá se tím vhodná koncentrace aktivního receptoru v době provedení zkoušky.
- Za podmínek odpovídajících kompetitivní vazbě (tj. 0,5 nM [³H]-estradiol) by se měly nominální koncentrace receptoru 0,1, 0,2, 0,4 a 0,6 nM inkubovat v nepřítomnosti (úplná

vazba) a v přítomnosti (nespecifická vazba) 1 μM neznačeného estradiolu. Specifická vazba, vypočítaná jako rozdíl úplné a nespecifické vazby, se nanese proti nominální koncentraci receptoru. Koncentrace receptoru, která dává hodnoty specifické vazby odpovídající 40 % přidaného radioizotopového značení, souvisí s odpovídající koncentrací receptoru a tato koncentrace receptoru se používá pro saturační a kompetitivní vazebné experimenty. Často bude tuto podmínku splňovat konečná koncentrace hrER 0,2 nM.

13. Jestliže nelze opakovaně splnit 40% kritérium, je třeba zkontrolovat, zda uspořádání experimentu neobsahuje možné chyby. Nedosažení 40% kritéria může ukazovat, že v rekombinantní šarži je příliš málo aktivního receptoru, a potom je třeba zvážit použití jiné šarže receptoru.

Saturační analýza

14. Hodnotí se osm zvyšujících se koncentrací [^3H]17 β -estradiolu v trojím provedení, a to za těchto tří podmínek (viz tabulka 2):

- Za nepřítomnosti neznačeného 17 β -estradiolu a v přítomnosti ER. Je to stanovení úplné vazby měřením radioaktivity v jamkách, v nichž je pouze [^3H]17 β -estradiol.
- V přítomnosti 2000násobně zvýšené koncentrace neznačeného 17 β -estradiolu přes značený 17 β -estradiol a v přítomnosti ER. Záměrem této podmínky je saturovat aktivní vazebná místa neznačeným 17 β -estradiolem a změřením radioaktivity v jamkách stanovit nespecifickou vazbu. Případný zbývající radioaktivní estradiol, který se může vázat na receptor, se považuje za navázaný na nespecifické místo, neboť neradioaktivní estradiol by měl být v tak vysoké koncentraci, aby se navázal na všechna dostupná specifická místa na receptoru.
- Za nepřítomnosti neznačeného 17 β -estradiolu a nepřítomnosti ER (stanovení celkové radioaktivity)

Příprava roztoků [^3H]-17 β -estradiolu a neznačeného 17 β -estradiolu a hrERa

15. 40 nM roztok [^3H]-17 β -estradiolu se připraví z 1 μM zásobního roztoku [^3H]-17 β -estradiolu v DMSO přidáním DMSO (pro přípravu 200 nM) a zkušební pufru při pokojové teplotě (pro přípravu 40 nM). Pomocí tohoto 40 nM roztoku se připraví série naředěného [^3H]-17 β -estradiolu v rozmezí od 0,313 nM do 40 nM se zkušebním pufrem při pokojové teplotě (jak je znázorněno ve sloupci 12 tabulky 2). Konečné zkušební koncentrace v rozmezí od 0,0313 do 4,0 nM se získají přidáním 10 μl těchto roztoků do příslušných jamek 96jamkové mikrotitrační destičky (viz tabulky 2 a 3). Příprava zkušební pufru, výpočet původního zásobního roztoku [^3H]-17 β -estradiolu podle jeho měrné aktivity, příprava zředěných roztoků a stanovení koncentrací je podrobně popsáno v protokolu CERI (2).
16. Zředěné roztoky neznačeného 17 β -estradiolu se připraví z 1 nM zásobního roztoku 17 β -estradiolu přidáním zkušební pufru, aby bylo dosaženo osmi zvyšujících se koncentrací v

počátečním rozsahu od 0,625 μM do 80 μM . Konečné zkušební koncentrace v rozmezí od 0,0625 do 8 μM se získají přidáním 10 μl těchto roztoků do příslušných jamek 96jamkové mikrotitrační destičky určené pro měření nespecifické vazby (viz tabulky 2 a 3). Příprava roztoků neznačeného 17 β -estradiolu je podrobně popsána v protokolu CERI (2).

17. Měla by se použít taková koncentrace receptoru, která dává specifickou vazbu $40 \pm 10\%$ (viz odstavce 12–13). Roztok hrER α se připraví s ledovým zkušebním pufrem bezprostředně před použitím, tj. až po přípravě všech jamek pro celkovou vazbu, nespecifickou vazbu a radioaktivní ligand samotný.
18. 96jamkové mikrotitrační destičky se připraví tak, jak je zobrazeno v tabulce 2, a to s třemi replikáty na každou koncentraci [^3H]-17 β -estradiolu. Přiřazení objemů [^3H]-17 β -estradiolu, neznačeného 17 β -estradiolu, pufru a receptoru je uvedeno v tabulce 3.

Tabulka 2: Uspořádání mikrotitrační destičky při saturační vazebné analýze

	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10	11.	12.
	Pro měření TB			Pro měření NSB			Pro určení radioaktivního ligandu samotného				Neznačená ředění E2 pro sloupec 4–6	Ředění [^3H]E2 pro sloupec 1–9
A	0,0313 nM [^3H] E ₂ + ER			0,0313 nM [^3H] E ₂ + 0,0625 μM E ₂ + ER			0,0313 nM				0,625 μM	0,313 nM
B	0,0625 nM [^3H] E ₂ + ER			0,0625 nM [^3H] E ₂ + 0,125 μM E ₂ + ER			0,0625 nM				1,25 μM	0,625 nM
C	30,125 nM [^3H] E ₂ + ER			0,125 nM [^3H] E ₂ + 0,25 μM E ₂ + ER			0,125 nM				2,5 μM	1,25 nM
D	0,250 nM [^3H] E ₂ + ER			0,250 nM [^3H] E ₂ + 0,5 μM E ₂ + ER			0,250 nM				5 μM	2,5 nM
E	0,50 nM [^3H] E ₂ + ER			0,50 nM [^3H] E ₂ + 1 μM E ₂ + ER			0,50 nM				10 μM	5 nM
F	1,00 nM [^3H] E ₂ + ER			1,00 nM [^3H] E ₂ + 2 μM E ₂ + ER			1,00 nM				20 μM	10 nM
G	2,00 nM [^3H] E ₂ + ER			2,00 nM [^3H] E ₂ + 4 μM E ₂ + ER			2,00 nM				40 μM	20 nM
H	4,00 nM [^3H] E ₂ + ER			4,00 nM [^3H] E ₂ + 8 μM E ₂ + ER			4,00 nM				80 μM	40 nM

TB: celková vazba

NSB: nespecifická vazba

[³H] E₂: [³H]17β-estradiol

E₂: neznačený 17β-estradiol

*Koncentrace zde uvedené jsou konečné koncentrace v každé jamce.

**Naředěné roztoky neznačeného E₂ a [³H]E₂ mohou být připraveny na jiné destičce.

Tabulka 3: Objemy reagensií pro saturační mikrotitrační destičku

Číslo sloupce		1	2	3	4	5	6	7*	8*	9*
Postup přípravy		Jamky TB			Jamky NSB			Radioaktivní ligand		
Objem komponentů pro výše uvedené reakční jamky a pořadí přidávání	pufr	60 µl			50 µl			90 µl		
	neznačený E2 ze sloupce 11 v tabulce 2	-			10 µl			-		
	[3H]E2 z řádku 12 v tabulce 2	10 µl			10 µl			10 µl		
	hrERα	30 µl			30 µl			-		
Celkový reakční objem		100 µl			100 µl			100 µl		
Inkubace		REAKCE PO 2 HODINÁCH INKUBACE						Kvantifikace radioaktivity ihned po přípravě. Bez inkubace		
Expozice 0,4% DCC		Ano			Ano			Ne		
Objem 0,4% DCC		100 µl			100 µl			-		
Filtrace		Ano			Ano			Ne		
MĚŘENÍ DPM										
Do scintilačního koktejlu přidán kvantifikační objem		100 µl**			100 µl**			50 µl		

* Jestliže se pro měření dpm používá LSC pro mikrotitrační destičky, není příprava radioaktivního ligandu samotného na stejné experimentální destičce s TB a NSB vhodná. Radioaktivní ligand samotný by měl být připravován na jiné destičce.

** Jestliže je k separaci DCC použito odstředování, je třeba 50 μl supernatantu změřit pomocí LSC, aby nedošlo ke kontaminaci DCC.

19. Mikrotitrační destičky pro stanovení celkové vazby a nespecifické vazby by se měly inkubovat při pokojové teplotě (22°C až 28°C) po dobu dvou hodin.

Měření [³H]-17β-estradiolu navázaného na hrERα

20. Po dvouhodinové inkubaci by měl být [³H]-17β-estradiol navázaný na hrERα separován od volného [³H]-17β-estradiolu přidáním 100 μl ledové suspenze 0,4% DCC do jamek. Destičky se poté umístí na led na 10 minut a reakční směs a suspenze DCC se přefiltruje přenesením na filtr mikrotitračních destiček, aby se odstranil DCC. Poté se 100 μl filtrátu přidá do scintilační kapaliny ve scintilačních lahvíčkách pro stanovení rozpadů za minutu (dpm) na lahvičku pomocí kapalinového scintilačního spektrometru.

21. Jestliže není k dispozici filtr na mikrotitrační destičky, lze DCC alternativně odstranit odstředěním. Poté se velmi opatrně odebere 50 μ l supernatantu obsahujícího [^{3} H]-17 β -estradiol navázaný na hrER α , aby nedošlo ke kontaminaci jamek dotykem DCC, a použije se pro počítání scintilací.
22. Pro stanovení rozpadu za minutu (dpm) [^{3} H]-17 β -estradiolu přidaného do jamek se použije podmínka radioaktivního ligandu samotného. Radioaktivita se kvantifikuje ihned po přípravě. Tyto jamky se neinkubují a neexponují se suspenzi DCC, ale jejich obsah je třeba přemístit přímo do scintilační kapaliny. Tato měření ukazují, kolik [^{3} H]-17 β -estradiolu v dpm bylo přidáno do každé sady jamek pro celkovou vazbu a nespecifickou vazbu.

Kompetitivní vazebná analýza

23. Kompetitivní vazebná analýza měří vazbu jedné koncentrace [^{3} H]17 β -estradiolu v přítomnosti zvyšujících se koncentrací zkoušené chemické látky. Při každé koncentraci by se měly v jednom provedení zkoušky použít tři souběžné replikáty. Kromě toho by se měla pro každou zkoušenou chemickou látku provést tři nesouběžná provedení zkoušky. Analýza se provádí v jedné nebo několika 96jamkových mikrotitračních destičkách.

Kontroly

24. Při provádění analýzy by měly být do každého experimentu zařazeny souběžné testy s rozpouštědlem a kontroly (tj. referenční estrogen, slabá vazba a látka, která se neváže). Při každém provedení zkoušky by měly být na jedné destičce použity celé křivky koncentrace pro referenční estrogen a kontroly (tj. slabá vazba a neváže se). Všechny ostatní destičky by měly obsahovat i) vysokou (maximální vytěsnění, tj. přibližně úplné vytěsnění radioizotopově značeného ligandu) a střední (přibližně IC₅₀) koncentraci E2 a látky se slabou vazbou, a to třikrát; ii) kontrolu s rozpouštědlem a látkou s nespecifickou vazbou, a to vždy třikrát. Postupy pro přípravu experimentálního pufru, [^{3} H]-17 β -estradiolu, hrER α a roztoků zkoušených chemických látek jsou podrobně popsány v protokolu CERI (2).

Kontrola s rozpouštědlem:

25. Kontrola s rozpouštědlem ukazuje, že rozpouštědlo nereaguje se zkušebním systémem, a měří také úplnou vazbu (TB). Nejvhodnějším rozpouštědlem je DMSO. Jestliže nejvyšší koncentrace zkoušené chemické látky není rozpustná v DMSO, může být alternativně použit ethanol. Koncentrace DMSO v jamkách při konečné analýze by měla být 2,05 % a může se zvyšovat do 2,5 % v případě nerozpustnosti zkoušené chemické látky. Koncentrace DMSO nad 2,5 % by se neměly prožívat vzhledem k interferenci vyšších koncentrací rozpouštědla s analýzou. U zkoušených chemických látek, které nejsou rozpustné v DMSO, ale jsou rozpustné v ethanolu, může být při analýze použit bez interference maximálně 2% ethanol.

Kontrola s pufrem:

26. Kontrola s pufrem (BC) by neměla obsahovat rozpouštědlo ani zkoušenou chemickou látku, ale všechny ostatní složky analýzy. Výsledky kontroly s pufrem se porovnají s kontrolou s rozpouštědlem za účelem ověření, že použité rozpouštědlo neovlivňuje zkušební systém.

Látka se silnou vazbou (referenční estrogen)

27. 17 β -estradiol (CAS 50-28-2) je endogenní ligand a váže se s vysokou afinitou na ER, podtyp alfa. Pro každou kompetitivní vazebnou analýzu hrER α by měla být vypracována standardní křivka s použitím neznačeného 17 β -estradiolu, aby bylo možné posoudit variabilitu při provádění analýzy v čase ve stejné laboratoři. Připraví se osm roztoků neznačeného 17 β -estradiolu v DMSO a zkušebním pufru, přičemž konečné koncentrace v jamkách, které budou použity pro standardní křivku, budou v těchto rozestupech: 10⁻⁶, 10⁻⁷, 10⁻⁸, 10^{-8,5}, 10⁻⁹, 10^{-9,5}, 10⁻¹⁰, 10⁻¹¹ M. Nejvyšší koncentrace neznačeného 17 β -estradiolu (1 μ M) by měla sloužit také jako indikátor nespecifické vazby. Tato koncentrace je v tabulce 4 odlišena označením „NSB“, ačkoliv je také součástí standardní křivky.

Látka se slabou vazbou

28. Měla by být zařazena látka se slabou vazbou (norethynodrel (CAS 68-23-5) nebo alternativně norethindron (CAS 68-22-4)), aby se prokázala citlivost každého experimentu a aby se umožnilo posouzení variability při provádění analýzy v čase. Připraví se osm roztoků látky se slabou vazbou v DMSO a zkušebním pufru, přičemž konečné koncentrace v jamkách budou: 10^{-4,5}, 10^{-5,5}, 10⁻⁶, 10^{-6,5}, 10⁻⁷, 10^{-7,5}, 10⁻⁸ a 10⁻⁹ M.

Látka, která se neváže

29. Jako negativní kontrola (látka, která se neváže) se používá oktyltriethoxysilan (OTES, CAS 2943-75-1). Poskytuje jistotu, že analýza, tak jak je prováděna, dokáže detekovat zkoušené chemické látky, které se nevážou na hrER α . Připraví se osm roztoků látky, která se neváže, v DMSO a zkušebním pufru, přičemž konečné koncentrace v jamkách budou: 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵, 10⁻⁶, 10⁻⁷, 10⁻⁸, 10⁻⁹, 10⁻¹⁰ M. Jako látka, která se neváže, může být alternativně použit di-n-butylftalát (DBP, CAS 84-72-2), ale může být zkoušen pouze do 10⁻⁴ M. Bylo prokázáno, že maximální rozpustnost DBP v analýze je 10⁻⁴ M.

Koncentrace hrER α

30. Mělo by se použít takové množství receptoru, které dává specifickou vazbu 40 $\pm$ 10 % (viz odstavce 12–13 v dodatku 3). Roztok hrER α je třeba připravovat naředěním funkčního hrER α v ledovém zkušebním pufru bezprostředně před použitím.

[³H]-17 β -estradiol

31. Konečná koncentrace [³H]-17 β -estradiolu v jamkách by měla být 0,5 nM.

Zkoušené chemické látky

32. V první řadě je třeba provést zkoušku rozpustnosti, aby bylo možné stanovit mez rozpustnosti pro každou zkoušenou chemickou látku a zjistit vhodný rozsah koncentrace, jenž má být použit při provádění zkušebního protokolu. Mez rozpustnosti každé zkoušené chemické látky se nejprve stanoví v rozpouštědle a poté dále potvrdí za zkušebních

podmínek. Konečná koncentrace zkoušená při analýze by neměla překročit 1 mM. Zkoušení za účelem zjištění rozsahu zahrnuje kontrolu s rozpouštědlem s alespoň 8 log-sériovými ředěními, počínaje maximální přijatelnou koncentrací (např. 1 mM nebo nižší, na základě meze rozpustnosti), přičemž je třeba zaznamenat přítomnost zákalu nebo sraženiny (viz také odstavec 35 v dodatku 3). Po stanovení rozsahu koncentrace pro zkoušení by zkoušená chemická látka měla být testována s použitím 8 logaritmických koncentrací v rozestupech vhodně definovaných předchozí zkouškou ke stanovení rozsahu. Při druhém a třetím experimentu by se měly podle potřeby dále upravit zkoušené koncentrace, aby lépe charakterizovaly křivku závislosti odpovědi na koncentraci, je-li to nezbytné.

33. Zkoušená chemická látka se naředí ve vhodném rozpouštědle (viz odstavec 25 v dodatku 3). Jestliže nejvyšší koncentrace zkoušené chemické látky není rozpustná v DMSO ani v ethanolu a přidání většího množství rozpouštědla by způsobilo, že koncentrace rozpouštědla v poslední zkoušce bude větší než přijatelná mez, může se nejvyšší koncentrace snížit na nejbližší nižší koncentraci. V tomto případě může být na dolní konec série koncentrací přidána další koncentrace. Ostatní koncentrace v sérii by měly zůstat beze změny.
34. Roztoky zkoušené chemické látky je třeba po přidání do jamky pečlivě sledovat, neboť zkoušená chemická látka se může po přidání do jamky srážet. Data za všechny jamky, které obsahují sraženinu, by měla být vyloučena z vynesené křivky a měl by být uveden důvod pro vyloučení těchto dat.
35. Jestliže již existují informace z jiných zdrojů, které uvádějí $\log(\text{IC}_{50})$ zkoušené chemické látky, může být vhodné stanovit geometrické rozestupy ředění blíže kolem předpokládané hodnoty $\log(\text{IC}_{50})$ (tj. 0,5 log jednotky). Konečné výsledky by měly ukazovat dostatečný rozsah koncentrací na každé straně $\log(\text{IC}_{50})$, včetně „horní“ a „dolní“, aby vazebná křivka mohla být adekvátně charakterizována.

Uspořádání zkušebních destiček

36. Připraví se označené mikrotitrační destičky s použitím šestinásobné inkubace pro kontrolu s rozpouštědlem, nejvyšší koncentrací referenčního estrogenu (E2), který slouží také jako indikátor nespecifické vazby (NSB), kontrolu s pufrem, osm koncentrací kontrolní látky, která se neváže (oktyltriethoxysilan), sedm nižších koncentrací pro referenční estrogen (E2), osm koncentrací látky se slabou vazbou (norethynodrel nebo norethindron) a osm koncentrací každé zkoušené chemické látky (TC). Příklad diagramu uspořádání destičky pro celé koncentrační křivky pro referenční estrogen a kontroly je uveden níže v tabulce 4. Pro zkoušenou chemickou látku se použijí další mikrotitrační destičky, které by měly obsahovat kontroly (tj. i) vysokou (maximální vytěsnění) a střední (přibližně IC_{50}) koncentraci každého E2 a látky se slabou vazbou, a to třikrát; ii) kontrolu s rozpouštědlem (jako celkovou vazbu) a látkou s nespecifickou vazbou, a to vždy šestkrát (tabulka 5). Příklad postupu uspořádání mikrotitrační destičky pro kompetitivní analýzu s použitím tří neznámých zkoušených chemických látek je uveden v dodatku 3.3. Koncentrace uvedené v technologickém postupu a v tabulkách 4 a 5 jsou konečné koncentrace použité v každé jamce. Maximální koncentrace pro E2 by měla být 1×10^{-7} M a pro látku se slabou vazbou

by měla být použita nejvyšší koncentrace pro látku se slabou vazbou použitá na destičce 1. Koncentraci IC₅₀ musí stanovit laboratoř na základě své dosavadní kontrolní databáze. Lze očekávat, že tato hodnota bude podobná hodnotě pozorované ve validačních studiích (viz tabulka 1).

Tabulka 4: Uspořádání mikrotitrační destičky při kompetitivní vazebné analýze^{1,2}, celé křivky koncentrace pro referenční estrogen a kontroly (destička 1)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	Kontrola s pufrem a pozitivní kontrola (E2)			Slabá pozitivní (norethynodrel)			Negativní kontrola (OTES)			TB a NSB		
A	Slepý pokus*			1×10 ⁻⁹ M			1×10 ⁻¹⁰ M			TB (kontrola s rozpouštědlem) (2,05 % DMSO)		
B	E2 (1×10 ⁻¹¹ M)			1×10 ⁻⁸ M			1×10 ⁻⁹ M					
C	E2 (1×10 ⁻¹⁰ M)			1×10 ^{-7,5} M			1×10 ⁻⁸ M			NSB (10 ⁻⁶ M E2)		
D	E2 (1×10 ^{-9,5} M)			1×10 ⁻⁷ M			1×10 ⁻⁷ M					
E	E2 (1×10 ⁻⁹ M)			1×10 ^{-6,5} M			1×10 ⁻⁶ M			Kontrola s pufrem		
F	E2 (1×10 ^{-8,5} M)			1×10 ⁻⁶ M			1×10 ⁻⁵ M					
G	E2 (1×10 ⁻⁸ M)			1×10 ^{-5,5} M			1×10 ⁻⁴ M			Slepý pokus (pro radioaktivní)**		
H	E2 (1×10 ⁻⁷ M)			1×10 ^{-4,5} M			1×10 ⁻³ M					

¹ Vzorové uspořádání standardní mikrotitrační destičky, které se použije při každém experimentu.

² Nezapomeňte, že tato mikrotitrační destička je připravena s použitím naředěných roztoků z destičky s ředěním uvedeným pro standardy v předchozích částech.

V tomto příkladu je látkou se slabou vazbou norethinodrel (NE).

* skutečný slepý pokus, jamka nepoužita

** slepý pokus, nepoužito při inkubaci, ale použito na potvrzení celkové dodané radioaktivity.

Tabulka 5: Uspořádání mikrotitrační destičky při kompetitivní vazebné analýze, další destičky pro zkoušené chemické látky (TC) a kontroly

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	Zkoušená chemická látka 1 (TC-1)			Zkoušená chemická látka 2 (TC-2)			Zkoušená chemická látka 3 (TC-3)			Kontroly		
A	TC-1 (1×10 ⁻¹⁰ M)			TC-2 (1×10 ⁻¹⁰ M)			TC-3 (1×10 ⁻¹⁰ M)			E2 (1×10 ⁻⁷ M)		
B	TC-1 (1×10 ⁻⁹ M)			TC-2 (1×10 ⁻⁹ M)			TC-3 (1×10 ⁻⁹ M)			E ₂ (IC ₅₀)		
C	TC-1 (1×10 ⁻⁸ M)			TC-2 (1×10 ⁻⁸ M)			TC-3 (1×10 ⁻⁸ M)			NE (1×10 ^{-4,5} M)		

D	TC-1 (1×10^{-7} M)	TC-2 (1×10^{-7} M)	TC-3 (1×10^{-7} M)	NE (IC_{50})
E	TC-1 (1×10^{-6} M)	TC-2 (1×10^{-6} M)	TC-3 (1×10^{-6} M)	NSB (10^{-6} M E2)
F	TC-1 (1×10^{-5} M)	TC-2 (1×10^{-5} M)	TC-3 (1×10^{-5} M)	
G	TC-1 (1×10^{-4} M)	TC-2 (1×10^{-4} M)	TC-3 (1×10^{-4} M)	TB (kontrola s rozpouštědlem)
H	TC-1 (1×10^{-3} M)	TC-2 (1×10^{-3} M)	TC-3 (1×10^{-3} M)	

V tomto příkladu je látkou se slabou vazbou norethinodrel (NE).

Dokončení kompetitivní vazebné analýzy

37. S výjimkou jamek pro celkovou vazbu a slepé pokusy (pro radioaktivní látku), jak je uvedeno v tabulce 6, se do každé jamky dá 50 μ l zkušební pufru a smíchá se s 10 μ l kontroly s rozpouštědlem, referenčního estrogenu (E2), látky se slabou vazbou, látky, která se neváže, a zkoušenými chemickými látkami, respektive s 10 μ l roztoku 5 nM [^{3} H]-17 β -estradiolu. Poté se do každé destičky přidá 30 μ l ledového roztoku receptoru a lehce promíchá. Roztok hrER α by měl být poslední přidávanou reagentií. Zkušební mikrotitrační destičky se inkubují při pokojové teplotě (22° až 28°C) po dobu 2 hodin.

Tabulka 6: Objem zkušebních složek pro kompetitivní vazebnou analýzu hrER, mikrotitrační destičky

Číslo sloupce Postup přípravy		Jiné než jamky TB	Jamky TB	Slepý pokus (pro radioaktivní látku)
Objem komponentů pro výše uvedené reakční jamky a pořadí přidávání	Zkušební pufr při pokojové teplotě	50 μ l	60 μ l	90 μ l
	Neznačený E2, látka se slabou vazbou, látka, která se neváže, rozpouštědlo a zkoušené chemické látky*	10 μ l	-	-
	[^{3} H]-17 β -estradiol pro konečnou koncentraci 0,5 nM (tj. 5 nM)	10 μ l	10 μ l	10 μ l
	určená koncentrace rER α (viz odstavce 12–13)	30 μ l	30 μ l	-
Celkový objem v každé jamce		100 μ l	100 μ l	100 μ l

*správně připravené, aby byla dosažena konečná koncentrace v rámci přijatelné koncentrace rozpouštědla

38. Poté se provede kvantifikace [^{3} H]-17 β -estradiolu navázaného na hrER α po separaci [^{3} H]-17 β -estradiolu navázaného na hrER α z volného [^{3} H]-17 β -estradiolu přidáním 100 μ l ledové suspenze DCC do každé jamky, jak je popsáno v odstavcích 21–23 dodatku 3 o saturační vazebné analýze.

39. Jamky G10–12 a H10–12 (označené v tabulce 4 jako slepý pokus (pro radioaktivní látku)) představují dpm [^{3} H]-značeného-estradiolu v 10 μ l. Alikvotní množství z 10 μ l se přidá přímo do scintilační kapaliny.

Kritéria přijatelnosti

Saturační vazebná analýza

40. Křivka specifické vazby by měla dosáhnout plató s použitím zvyšujících se koncentrací [³H]-17β-estradiolu, což ukazuje saturaci hrERα ligandem.
41. Specifická vazba při 0,5 nM [³H]-17β-estradiolu by měla být v přijatelném rozmezí 30 % až 50 % průměrné naměřené celkové radioaktivity přidané v průběhu jednotlivých provedení zkoušek. Občasná mírná vybočení mimo toto rozmezí jsou přijatelná, ale pokud jsou všechna provedení zkoušky mimo toto rozmezí nebo pokud je konkrétní provedení zkoušky výrazně mimo toto rozmezí, je třeba upravit koncentraci proteinu a saturační analýzu zopakovat.
42. Data by měla vytvořit lineární Scatchardův graf.
43. Nespecifická vazba by neměla být nadměrná. Hodnota nespecifické vazby by měla být typicky <35 % celkové vazby. Tento poměr však může při měření velmi nízkých dpm u nejnižší koncentrace radioizotopově značeného zkoušeného 17β-estradiolu občas uvedený limit překročit.

Kompetitivní vazebná analýza

44. Zvyšující se koncentrace neznačeného 17β-estradiolu by měly vytěsnit [³H]-17β-estradiol z receptoru způsobem odpovídajícím jednomístné kompetitivní vazbě.
45. Hodnota IC₅₀ pro referenční estrogen (tj. 17β-estradiol) by se měla přibližně rovnat molární koncentraci [³H]-17β-estradiolu plus K_d určený ze saturační vazebné analýzy.
46. Celková specifická vazba by měla být soustavně v přijatelném rozmezí 40 ± 10 %, když je průměrná naměřená koncentrace celkové radioaktivity přidaná do každé jamky 0,5 nM ve všech provedeních zkoušky. Občasná mírná vybočení mimo toto rozmezí jsou přijatelná, ale pokud jsou všechna provedení zkoušky mimo toto rozmezí nebo pokud je konkrétní provedení zkoušky výrazně mimo toto rozmezí, je třeba upravit koncentraci proteinu.
47. Rozpouštědlo by nemělo měnit citlivost ani reprodukovatelnost analýzy. Výsledky kontroly s rozpouštědlem (jamky TB) se porovnají s kontrolou s pufrem za účelem ověření, že použité rozpouštědlo neovlivňuje zkušební systém. Jestliže rozpouštědlo nemá na analýzu žádný vliv, měly by být výsledky TB a kontroly s rozpouštědlem srovnatelné.
48. Látka, která se neváže, by neměla vytěsnit více než 25 % [³H]-17β-estradiolu z hrERα při zkoušení do 10⁻³ M (OTES) nebo 10⁻⁴ M (DBP).
49. Pro referenční estrogen a dvě látky se slabou vazbou (např. norethynodrel, norethindron) byla vypracována kritéria funkčnosti s použitím údajů z validační studie pro vazebnou analýzu CERi hrER (příloha N v odkazu 2). Jsou uvedeny 95% konfidenční intervaly pro střední hodnotu ± SD (n) za všechna kontrolní provedení zkoušky ve čtyřech laboratořích účastnících se ve validační studii. Pro referenční estrogen a látky se slabou vazbou a pro log₁₀RBA látek se slabou vazbou vzhledem k referenčnímu estrogenu byly vypočteny 95% konfidenční intervaly pro parametry křivky (tj. horní, dolní, Hillův koeficient, log IC₅₀). V tabulce 1 jsou uvedeny očekávané rozsahy parametrů křivky, které mohou být použity jako

kritéria funkčnosti. V praxi se může rozsah IC_{50} poněkud odlišovat v závislosti na experimentálně zjištěné K_d receptorového přípravku a koncentraci ligandu použitého pro analýzu.

50. Pro parametry křivky pro zkoušené chemické látky nebyla vypracována žádná kritéria funkčnosti, protože stávajících potenciálních zkoušených chemických látek existuje velké množství a značně se liší jejich potenciální afinity a výsledky (např. celá křivka, částečná křivka, chybějící křivka). Při posuzování výsledků z každého provedení zkoušky za zkoušenou chemickou látku je třeba postupovat s odborným úsudkem. Mělo by být použito dostatečné rozmezí koncentrací, aby byl jednoznačně definován vrchol (např. 90–100 % vazby) kompetitivní křivky. Variabilita mezi replikáty při každé koncentraci zkoušené chemické látky i mezi 3 zkouškami neprováděnými souběžně by měla být přiměřená a vědecky obhajitelná. Kontroly z každého provedení zkoušky by se u zkoušené chemické látky měly blížit mírám funkčnosti uvedeným pro tuto analýzu CERI a měly by odpovídat dosavadním kontrolním údajům z každé příslušné laboratoře.

ANALÝZA ÚDAJŮ

Saturační vazebná analýza

51. Měří se celková i nespecifická vazba. Z těchto hodnot se specifická vazba zvyšujících se koncentrací $[^3H]$ -17 β -estradiolu za rovnovážného stavu vypočítá odečtením nespecifické vazby od celkové. Graf specifické vazby proti koncentraci $[^3H]$ -17 β -estradiolu by měl dosáhnout plató u maximální specifické vazby indikující saturaci hrER α $[^3H]$ -17 β -estradiolem. Kromě toho by analýza dat měla dokumentovat vazbu $[^3H]$ -17 β -estradiolu na jedno vazebné místo s vysokou afinitou. Na křivce saturační vazby by měla být zobrazena nespecifická, celková a specifická vazba. Další rozbor těchto údajů by měl být proveden pomocí nelineární regresní analýzy (např. BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995) s konečným zobrazením dat ve formě Scatchardova grafu.
52. Při analýze dat se určuje B_{max} a K_d z údajů o celkové vazbě samotné, a to za použití předpokladu, že nespecifická vazba je lineární, není-li zdůvodněno použití jiné metody. Kromě toho by při určování nejlepších hodnot měla být použita robustní regrese, pokud není uvedeno zdůvodnění. Metoda zvolená pro robustní regresi by měla být uvedena. Při určování B_{max} a K_d z údajů o saturační vazbě by měla být vždy použita korekce úbytku ligandu (např. pomocí metody podle Swillense 1995).

Kompetitivní vazebná analýza

53. Křivka kompetitivní vazby se vynáší jako specifická vazba $[^3H]$ -17 β -estradiolu proti koncentraci ($\log_{10}$ jednotky) kompetitora. Koncentrace zkoušené chemické látky, která inhibuje 50 % maximální specifické vazby $[^3H]$ -17 β -estradiolu, je hodnota IC_{50} .
54. Odhady $\log (IC_{50})$ pro pozitivní kontroly (např. referenční estrogen a látku se slabou vazbou) se stanoví pomocí vhodného softwaru pro nelineární vynesení křivky, aby byly vhodné pro čtyřparametrickou Hillovu rovnici (např. BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky,

1995). Při vynášení těchto křivek se horní bod, dolní bod, sklon a $\log(\text{IC}_{50})$ obvykle ponechávají bez omezení. Při určování nejlepších hodnot by měla být použita robustní regrese, pokud není uvedeno zdůvodnění. Korekce úbytku ligandu se nepoužívá. Po úvodní analýze je třeba každou vazebnou křivku zkontrolovat, aby bylo zajištěno, že je vhodně aplikována na model. Relativní vazebná afinita (RBA) pro látku se slabou vazbou se vypočítá jako procento $\log(\text{IC}_{50})$ pro látku se slabou vazbou vzhledem k $\log(\text{IC}_{50})$ pro 17 β -estradiol. Výsledky z pozitivních kontrol a z kontroly s látkou, která se neváže, se posuzují pomocí měřitek účinnosti analýzy uvedených v odstavci 44–49 tohoto dodatku 3.

55. Data za všechny zkoušené chemické látky se analyzují postupně, aby bylo zajištěno, že data budou analyzována správně, a aby byla správně klasifikována každá kompetitivní vazebná křivka. Doporučuje se, aby každé provedení zkoušky u zkoušené chemické látky nejdříve prošlo standardizovanou analýzou dat, která je stejná jako analýza použitá pro kontroly s referenčním estrogenem a s látkou se slabou vazbou (viz odstavec 54 tohoto dodatku 3). Po dokončení je třeba provést technickou kontrolu parametrů vynesené křivky a vizuálně zkontrolovat, jak dobře data odpovídají generované kompetitivní vazebné křivce u každého provedení zkoušky. V průběhu této technické kontroly je pozorovaný pokles procenta specificky navázaného [^3H]-17 β -estradiolu v závislosti na koncentraci, nízká variabilita mezi technickými replikáty při jednotlivých koncentracích zkoušené chemické látky a konzistentní parametry u tří provedení zkoušky dobrým ukazatelem, že zkouška a analýzy dat byly provedeny správně.

Interpretace údajů

56. Za předpokladu, že jsou splněna všechna kritéria přijatelnosti, lze zkoušenou chemickou látku považovat za látku, která se váže na hrER α , jestliže lze vynést vazebnou křivku a nejnižší bod na křivce odpovědi v rozsahu dat je menší než 50 % (obrázek 1).

57. Za předpokladu, že jsou splněna všechna kritéria přijatelnosti, lze zkoušenou chemickou látku považovat za látku, která se neváže na hrER α , jestliže:

- lze vynést vazebnou křivku a nejnižší bod na křivce odpovědi v rozsahu dat je nad 75 % nebo
- nelze vynést vazebnou křivku a nejnižší nevyhlazené průměrné procento vazby ze skupiny koncentrací v datech je nad 75 %.

58. Zkoušené chemické látky se považují za neurčité, jestliže není splněna žádná z výše uvedených podmínek (např. nejnižší bod na vynesené křivce odpovědi je mezi 76–51 %).

Tabulka 7: Kritéria pro stanovení klasifikace zkoušené chemické látky podle kompetitivní vazebné křivky

Klasifikace	Kritéria
Látka, která se váže ^a	Lze vynést vazebnou křivku. • Nejnižší bod na křivce odpovědi v rozsahu dat je menší než 50 %.
Látka, která se neváže ^b	Jestliže lze vynést vazebnou křivku,

	• je nejnižší bod na křivce odpovědi v rozsahu dat nad 75 %. Jestliže nelze vynést vazebnou křivku, • je nejnižší nevyhlazené průměrné procento vazby ze skupiny koncentrací v datech nad 75 %.
Neurčitá ^c	Každé testovatelné provedení zkoušky, kdy se látka nechová ani jako látka, která se váže, ani jako látka, která se neváže (např. nejnižší bod na vynesené křivce odpovědi je mezi 76–51 %).

Obrázek 1: Příklady klasifikace zkoušené chemické látky s použitím kompetitivní vazebné křivky

59. Sloučí se několik testů zkoušené chemické látky provedených v laboratoři, každému testu se přiřadí numerická hodnota a jednotlivé testy se zprůměrují, jak je znázorněno v tabulce 8. Výsledky sloučených testů v rámci každé laboratoře se porovnají s předpokládanou klasifikací jednotlivých zkoušených chemických látek.

Tabulka 8: Metoda pro klasifikaci zkoušené chemické látky s použitím několika testů v rámci laboratoře

Přiřazení hodnoty každému testu:	
Klasifikace	Číselná hodnota
váže se	2
neurčitá	1
neváže se	0
Klasifikace průměru číselných hodnot ze všech testů:	
Klasifikace	Číselná hodnota
váže se	průměr $\geq 1,5$
neurčitá	$0,5 \leq \text{průměr} < 1,5$
neváže se	průměr $< 0,5$

ZÁVĚREČNÁ ZPRÁVA

60. Viz odstavce 24 „SLOŽKY VAZEBNÉ ANALÝZY hrER“ této zkušební metody.

Dodatek 3.1

SEZNAM VÝRAZŮ

[³H]E2: 17β-estradiol značený radioizotopem tritia.

DCC: Aktivní uhlí potažené dextranem.

E2: Neznačený 17β-estradiol (inertní).

Zkušební pufr: 10 mM Tris-HCl, pH 7,4, s obsahem 1 mM EDTA, 1mM EGTA, 1 mM NaVO₃, 10 % glycerolu, 0,2 mM leupeptinu, 1 mM dithiothreitolu a 10 mg/ml bovinního sérového albuminu.

hrERα: Lidský rekombinantní estrogenní receptor alfa (ligand vázající doména).

Replikát: Jedna z několika jamek, které obsahují stejný obsah ve stejné koncentraci a analyzují se souběžně v rámci jednoho provedení zkoušky. V tomto protokolu se každá koncentrace zkoušené chemické látky testuje třikrát; to znamená, že existují tři replikáty, které se analyzují současně při každé koncentraci zkoušené chemické látky.

Provedení zkoušky: Úplná sada jamek na mikrotitrační destičce analyzovaných souběžně, která poskytuje všechny informace potřebné pro charakterizaci vazby zkoušené chemické látky na hrERα (tzn. celkový [³H]-17β-estradiol přidaný do zkušební jamky, maximální vazba [³H]-17β-estradiolu na hrERα, nespecifická vazba a celková vazba při různých koncentracích zkoušené chemické látky). Provedení zkoušky může sestávat pouze z jedné jamky (tj. replikátu) na každou koncentraci, ale protože tento protokol vyžaduje trojí analyzování, sestává jedno provedení ze tří jamek na každou koncentraci. Dále tento protokol vyžaduje tři nezávislá (tj. nesouběžná) provedení na každou chemickou látku.

Dodatek 3.2

USPOŘÁDÁNÍ JAMEK PŘI KOMPETITIVNÍ VAZEBNÉ ANALÝZE

Mikrodestička	Poloha	Replikát	Druh jamky	Kód jamky	Kód koncentrace	Výchozí koncentrace kompetitora (M)	Zásobní hrER (μl)	Objem pufru (μl)	Objem stopovací látky (radioaktivní E2) (μl)	Objem z destičky s ředěním (μl)	Konečný objem (μl)	Konečná koncentrace kompetitora (M)
S	A1	1	Slepý pokus	BK	BK1	—	—	—	—	—	—	—
S	A2	2	Slepý pokus	BK	BK2	—	—	—	—	—	—	—
S	A3	3	Slepý pokus	BK	BK3	—	—	—	—	—	—	—
S	B1	1	neradioaktivní E2	S	S1	1.00E-10	30	50	10	10	100	1.0E-11
S	B2	2	neradioaktivní E2	S	S1	1.00E-10	30	50	10	10	100	1.0E-11
S	B3	3	neradioaktivní E2	S	S1	1.00E-10	30	50	10	10	100	1.0E-11
S	C1	1	neradioaktivní E2	S	S2	1.00E-09	30	50	10	10	100	1.0E-10
S	C2	2	neradioaktivní E2	S	S2	1.00E-09	30	50	10	10	100	1.0E-10
S	C3	3	neradioaktivní E2	S	S2	1.00E-09	30	50	10	10	100	1.0E-10
S	D1	1	neradioaktivní E2	S	S3	3.16E-09	30	50	10	10	100	3.2E-10
S	D2	2	neradioaktivní E2	S	S3	3.16E-09	30	50	10	10	100	3.2E-10
S	D3	3	neradioaktivní E2	S	S3	3.16E-09	30	50	10	10	100	3.2E-10
S	E1	1	neradioaktivní E2	S	S4	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
S	E2	2	neradioaktivní E2	S	S4	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
S	E3	3	neradioaktivní E2	S	S4	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
S	F1	1	neradioaktivní E2	S	S5	3.16E-08	30	50	10	10	100	3.2E-09
S	F2	2	neradioaktivní E2	S	S5	3.16E-08	30	50	10	10	100	3.2E-09
S	F3	3	neradioaktivní E2	S	S5	3.16E-08	30	50	10	10	100	3.2E-09
S	G1	1	neradioaktivní E2	S	S6	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08
S	G2	2	neradioaktivní E2	S	S6	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08
S	G3	3	neradioaktivní E2	S	S6	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08
S	H1	1	neradioaktivní E2	S	S7	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
S	H2	2	neradioaktivní E2	S	S7	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
S	H3	3	neradioaktivní E2	S	S7	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
S	A4	1	norethynodrel	NE	WP1	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
S	A5	2	norethynodrel	NE	WP1	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
S	A6	3	norethynodrel	NE	WP1	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
S	B4	1	norethynodrel	NE	WP2	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08
S	B5	2	norethynodrel	NE	WP2	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08
S	B6	3	norethynodrel	NE	WP2	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08
S	C4	1	norethynodrel	NE	WP3	3.16E-07	30	50	10	10	100	3.2E-08
S	C5	2	norethynodrel	NE	WP3	3.16E-07	30	50	10	10	100	3.2E-08
S	C6	3	norethynodrel	NE	WP3	3.16E-07	30	50	10	10	100	3.2E-08
S	D4	1	norethynodrel	NE	WP4	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
S	D5	2	norethynodrel	NE	WP4	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
S	D6	3	norethynodrel	NE	WP4	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
S	E4	1	norethynodrel	NE	WP5	3.16E-06	30	50	10	10	100	3.2E-07
S	E5	2	norethynodrel	NE	WP5	3.16E-06	30	50	10	10	100	3.2E-07
S	E6	3	norethynodrel	NE	WP5	3.16E-06	30	50	10	10	100	3.2E-07
S	F4	1	norethynodrel	NE	WP6	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
S	F5	2	norethynodrel	NE	WP6	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
S	F6	3	norethynodrel	NE	WP6	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
S	G4	1	norethynodrel	NE	WP7	3.16E-05	30	50	10	10	100	3.2E-06
S	G5	2	norethynodrel	NE	WP7	3.16E-05	30	50	10	10	100	3.2E-06
S	G6	3	norethynodrel	NE	WP7	3.16E-05	30	50	10	10	100	3.2E-06

Uspořádání jamek při kompetitivní vazebné analýze												
Mikrodestička	Poloha	REP	Druh jamky	Kód jamky	Kód koncentrace	Výchozí koncentrace kompetitora (M)	Zásobní hrER (μl)	Objem pufru (μl)	Objem destičky s ředěním (μl)	Objem z destičky s ředěním (μl)	Konečný objem (μl)	Konečná koncentrace kompetitora (M)
S	H4	1	norethynodrel	NE	WP8	3.16E-04	30	50	10	10	100	3.2E-05
S	H5	2	norethynodrel	NE	WP8	3.16E-04	30	50	10	10	100	3.2E-05
S	H6	3	norethynodrel	NE	WP8	3.16E-04	30	50	10	10	100	3.2E-05
S	A7	1	OTES	N	OTES1	1.00E-09	30	50	10	10	100	1.0E-10
S	A8	2	OTES	N	OTES1	1.00E-09	30	50	10	10	100	1.0E-10
S	A9	3	OTES	N	OTES1	1.00E-09	30	50	10	10	100	1.0E-10
S	B7	1	OTES	N	OTES2	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
S	B8	2	OTES	N	OTES2	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
S	B9	3	OTES	N	OTES2	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
S	C7	1	OTES	N	OTES3	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08
S	C8	2	OTES	N	OTES3	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08
S	C9	3	OTES	N	OTES3	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08
S	D7	1	OTES	N	OTES4	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
S	D8	2	OTES	N	OTES4	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
S	D9	3	OTES	N	OTES4	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
S	E7	1	OTES	N	OTES5	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
S	E8	2	OTES	N	OTES5	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
S	E9	3	OTES	N	OTES5	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
S	F7	1	OTES	N	OTES6	1.00E-04	30	50	10	10	100	1.0E-05
S	F8	2	OTES	N	OTES6	1.00E-04	30	50	10	10	100	1.0E-05
S	F9	3	OTES	N	OTES6	1.00E-04	30	50	10	10	100	1.0E-05
S	G7	1	OTES	N	OTES7	1.00E-03	30	50	10	10	100	1.0E-04
S	G8	2	OTES	N	OTES7	1.00E-03	30	50	10	10	100	1.0E-04
S	G9	3	OTES	N	OTES7	1.00E-03	30	50	10	10	100	1.0E-04
S	H7	1	OTES	N	OTES8DBP7	1.00E-02	30	50	10	10	100	1.0E-03
S	H8	2	OTES	N	OTES88	1.00E-02	30	50	10	10	100	1.0E-03
S	H9	3	OTES	N	OTES8	1.00E-02	30	50	10	10	100	1.0E-03
S	A10	1	celková vazba	TB	TB1	-	30	60	10	-	100	-
P	A11	2	celková vazba	TB	TB2	-	30	60	10	-	100	-
P	A12	3	celková vazba	TB	TB3	-	30	60	10	-	100	-
P	B10	4	celková vazba	TB	TB4	-	30	60	10	-	100	-
S	B11	5	celková vazba	TB	TB5	-	30	60	10	-	100	-
S	B12	6	celková vazba	TB	TB6	-	30	60	10	-	100	-
S	C10	1	neradioaktivní E2 (vysoká)	NSB	S1	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
S	C11	2	neradioaktivní E2 (vysoká)	NSB	S2	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
S	C12	3	neradioaktivní E2 (vysoká)	NSB	S3	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
S	D10	4	neradioaktivní E2 (vysoká)	NSB	S4	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
S	D11	5	neradioaktivní E2 (vysoká)	NSB	S5	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
S	D12	6	neradioaktivní E2 (vysoká)	NSB	S6	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
S	E10	1	Kontrola s pufrem	BC	BC1	-	-	100	-	-	100	-
S	E11	2	Kontrola s pufrem	BC	BC2	-	-	100	-	-	100	-

S	E12	3	Kontrola s pufrem	BC	BC3	-	-	100	-	-	100	-
S	F10	4	Kontrola s pufrem	BC	BC4	-	-	100	-	-	100	-
S	F11	5	Kontrola s pufrem	BC	BC5	-	-	100	-	-	100	-
S	F12	6	Kontrola s pufrem	BC	BC6	-	-	100	-	-	100	-
S	G10*	1	Slepý pokus (pro radioaktivní látku)	radioaktivní	H1	-	90	-	10	-	100	-
S	G11*	2	Slepý pokus (pro radioaktivní látku)	radioaktivní	H2	-	90	-	10	-	100	-
P	G12*	3	Slepý pokus (pro radioaktivní látku)	radioaktivní	H3	-	90	-	10	-	100	-
S	H10*	4	Slepý pokus (pro radioaktivní látku)	radioaktivní	H4	-	90	-	10	-	100	-
S	H11*	5	Slepý pokus (pro radioaktivní látku)	radioaktivní	H5	-	90	-	10	-	100	-
S	H12	6	Slepý pokus (pro radioaktivní látku)	radioaktivní	H6	-	90	-	10	-	100	-

*: Upozorňujeme, že „radioaktivní“ jamky jsou v průběhu inkubace prázdné. 10 µl se přidává až pro počítání scintilací.

Uspořádání jamek při kompetitivní vazebné analýze												
Mikrodestička	Poloha	REP	Druh jamky	Kód jamky	Kód koncentrace	Výchozí koncentrace kompetitora (M)	Zásobní hrER (μl)	Objem pufru (μl)	Objem stopovací látky (radioaktivní E2) (μl)	Objem z destičky s ředěním (μl)	Konečný objem (μl)	Konečná koncentrace kompetitora (M)
P1	A1	1	Neznámá 1	U1	1	1.00E-09	30	50	10	10	100	1.0E-10
P1	A2	2	Neznámá 1	U1	1	1.00E-09	30	50	10	10	100	1.0E-10
P1	A3	3	Neznámá 1	U1	1	1.00E-09	30	50	10	10	100	1.0E-10
P1	B1	1	Neznámá 1	U1	2	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
P1	B2	2	Neznámá 1	U1	2	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
P1	B3	3	Neznámá 1	U1	2	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
P1	C1	1	Neznámá 1	U1	3	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08
P1	C2	2	Neznámá 1	U1	3	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08
P1	C3	3	Neznámá 1	U1	3	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08
P1	D1	1	Neznámá 1	U1	4	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
P1	D2	2	Neznámá 1	U1	4	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
P1	D3	3	Neznámá 1	U1	4	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
P1	E1	1	Neznámá 1	U1	5	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
P1	E2	2	Neznámá 1	U1	5	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
P1	E3	3	Neznámá 1	U1	5	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
P1	F1	1	Neznámá 1	U1	6	1.00E-04	30	50	10	10	100	1.0E-05
P1	F2	2	Neznámá 1	U1	6	1.00E-04	30	50	10	10	100	1.0E-05
P1	F3	3	Neznámá 1	U1	6	1.00E-04	30	50	10	10	100	1.0E-05
P1	G1	1	Neznámá 1	U1	7	1.00E-03	30	50	10	10	100	1.0E-04
P1	G2	2	Neznámá 1	U1	7	1.00E-03	30	50	10	10	100	1.0E-04
P1	G3	3	Neznámá 1	U1	7	1.00E-03	30	50	10	10	100	1.0E-04
P1	H1	1	Neznámá 1	U1	8	1.00E-02	30	50	10	10	100	1.0E-03
P1	H2	2	Neznámá 1	U1	8	1.00E-02	30	50	10	10	100	1.0E-03
P1	H3	3	Neznámá 1	U1	8	1.00E-02	30	50	10	10	100	1.0E-03
P1	A4	1	Neznámá 2	U2	1	1.00E-09	30	50	10	10	100	1.0E-10
P1	A5	2	Neznámá 2	U2	1	1.00E-09	30	50	10	10	100	1.0E-10
P1	A6	3	Neznámá 2	U2	1	1.00E-09	30	50	10	10	100	1.0E-10
P1	B4	1	Neznámá 2	U2	2	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
P1	B5	2	Neznámá 2	U2	2	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
P1	B6	3	Neznámá 2	U2	2	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
P1	C4	1	Neznámá 2	U2	3	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08
P1	C5	2	Neznámá 2	U2	3	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08
P1	C6	3	Neznámá 2	U2	3	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08
P1	D4	1	Neznámá 2	U2	4	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
P1	D5	2	Neznámá 2	U2	4	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
P1	D6	3	Neznámá 2	U2	4	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
P1	E4	1	Neznámá 2	U2	5	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
P1	E5	2	Neznámá 2	U2	5	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
P1	E6	3	Neznámá 2	U2	5	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
P1	F4	1	Neznámá 2	U2	6	1.00E-04	30	50	10	10	100	1.0E-05
P1	F5	2	Neznámá 2	U2	6	1.00E-04	30	50	10	10	100	1.0E-05
P1	F6	3	Neznámá 2	U2	6	1.00E-04	30	50	10	10	100	1.0E-05
P1	G4	1	Neznámá 2	U2	7	1.00E-03	30	50	10	10	100	1.0E-04
P1	G5	2	Neznámá 2	U2	7	1.00E-03	30	50	10	10	100	1.0E-04
P1	G6	3	Neznámá 2	U2	7	1.00E-03	30	50	10	10	100	1.0E-04
P1	H4	1	Neznámá 2	U2	8	1.00E-02	30	50	10	10	100	1.0E-03
P1	H5	2	Neznámá 2	U2	8	1.00E-02	30	50	10	10	100	1.0E-03
P1	H6	3	Neznámá 2	U2	8	1.00E-02	30	50	10	10	100	1.0E-03

Uspořádání jamek při kompetitivní vazebné analýze												
Mikrodestička	Poloha	REP	Druh jamky	Kód jamky	Kód koncentrace	Výchozí koncentrace kompetitora (M)	Zásobní hrER (μl)	Objem pufru (μl)	Objem doprovodné látky (radioaktivní E2) (μl)	Objem z destičky s ředěním (μl)	Konečný objem (μl)	Konečná koncentrace kompetitora (M)
P1	A7	1	Neznámá 3	U3	1	1.00E-09	30	50	10	10	100	1.0E-10
P1	A8	2	Neznámá 3	U3	1	1.00E-09	30	50	10	10	100	1.0E-10
P1	A9	3	Neznámá 3	U3	1	1.00E-09	30	50	10	10	100	1.0E-10
P1	B7	1	Neznámá 3	U3	2	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
P1	B8	2	Neznámá 3	U3	2	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
P1	B9	3	Neznámá 3	U3	2	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
P1	C7	1	Neznámá 3	U3	3	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08
P1	C8	2	Neznámá 3	U3	3	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08
P1	C9	3	Neznámá 3	U3	3	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08
P1	D7	1	Neznámá 3	U3	4	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
P1	D8	2	Neznámá 3	U3	4	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
P1	D9	3	Neznámá 3	U3	4	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
P1	E7	1	Neznámá 3	U3	5	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
P1	E8	2	Neznámá 3	U3	5	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
P1	E9	3	Neznámá 3	U3	5	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
P1	F7	1	Neznámá 3	U3	6	1.00E-04	30	50	10	10	100	1.0E-05
P1	F8	2	Neznámá 3	U3	6	1.00E-04	30	50	10	10	100	1.0E-05
P1	F9	3	Neznámá 3	U3	6	1.00E-04	30	50	10	10	100	1.0E-05
P1	G7	1	Neznámá 3	U3	7	1.00E-03	30	50	10	10	100	1.0E-04
P1	G8	2	Neznámá 3	U3	7	1.00E-03	30	50	10	10	100	1.0E-04
P1	G9	3	Neznámá 3	U3	7	1.00E-03	30	50	10	10	100	1.0E-04
P1	H7	1	Neznámá 3	U3	8	1.00E-02	30	50	10	10	100	1.0E-03
P1	H8	2	Neznámá 3	U3	8	1.00E-02	30	50	10	10	100	1.0E-03
P1	H9	3	Neznámá 3	U3	8	1.00E-02	30	50	10	10	100	1.0E-03
P1	A10	1	Kontrolní E2 (max)	S	E2max1	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.00E-07
P1	A11	2	Kontrolní E2 (max)	S	E2max2	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.00E-07
P1	A12	3	Kontrolní E2 (max)	S	E2max3	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.00E-07
P1	B10	1	Kontrolní E2 (IC50)	S	E2IC501	E2IC50x10	30	50	10	10	100	E2IC50
P1	B11	2	Kontrolní E2 (IC50)	S	E2IC502	E2IC50x10	30	50	10	10	100	E2IC50
P1	B12	3	Kontrolní E2 (IC50)	S	E2IC503	E2IC50x10	30	50	10	10	100	E2IC50
P1	C10	1	Kontrolní NE (max)	S	Nemax1	1.00E-3,5	30	50	10	10	100	1.00E-4,5
P1	C11	2	Kontrolní NE (max)	S	Nemax2	1.00E-3,5	30	50	10	10	100	1.00E-4,5
P1	C12	3	Kontrolní NE (max)	S	Nemax3	1.00E-3,5	30	50	10	10	100	1.00E-4,5
P1	D10	1	Kontrolní NE	S	NEIC501	NEIC50 x10	30	50	10	10	100	NEIC50
P1	D11	2	Kontrolní NE	S	NEIC502	NEIC50 x10	30	50	10	10	100	NEIC50
P1	D12	3	Kontrolní NE	S	NEIC503	NEIC50 x10	30	50	10	10	100	NEIC50
P1	E10	1	neradioaktivní E2 (vysoká)	NSB	S1	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
P1	E11	2	neradioaktivní E2 (vysoká)	NSB	S2	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
P1	E12	3	neradioaktivní E2 (vysoká)	NSB	S3	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06

P1	F10	4	neradioaktivní E2 (vysoká)	NSB	S4	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
P1	F11	5	neradioaktivní E2 (vysoká)	NSB	S5	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
P1	F12	6	neradioaktivní E2 (vysoká)	NSB	S6	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
P1	G10	1	celková vazba	TB	TB1	-	30	60	10	-	100	-
P1	G11	2	celková vazba	TB	TB2	-	30	60	10	-	100	-
P1	G12	3	celková vazba	TB	TB3	-	30	60	10	-	100	-
P1	H10	4	celková vazba	TB	TB4	-	30	60	10	-	100	-
P1	H11	5	celková vazba	TB	TB5	-	30	60	10	-	100	-
P1	H12	6	celková vazba	TB	TB6	-	30	60	10	-	100	-

Dodatek 4

POZNÁMKY PRO ANALÝZU DAT Z KOMPETITIVNÍ VAZEBNÉ ANALÝZY HRER

1. Kompetitivní vazebná analýza hrER α měří vazbu jedné koncentrace [^3H]17 β -estradiolu v přítomnosti zvyšujících se koncentrací zkoušené chemické látky. Křivka kompetitivní vazby se vynáší jako specifická vazba [^3H]-17 β -estradiolu proti koncentraci (log10 jednotky) kompetitora. Koncentrace zkoušené chemické látky, která inhibuje 50 % maximální specifické vazby [^3H]-17 β -estradiolu, je hodnota IC₅₀.

Analýza dat pro referenční estrogen a látku se slabou vazbou (1)

2. Data z kontrolních provedení zkoušek se transformují (tj. procentuální specifická vazba [^3H]-17 β -estradiolu a log koncentrace kontrolní chemické látky) pro další analýzu. Odhady log (IC₅₀) pro pozitivní kontroly (např. referenční estrogen a látku se slabou vazbou) se stanoví pomocí vhodného softwaru pro nelineární vynesení křivky, aby byly vhodné pro čtyřparametrickou Hillovu rovnici, tj. (např. BioSoft; GraphPad Prism) (2). Při vynášení těchto křivek může být horní bod, dolní bod, sklon a log(IC₅₀) obvykle ponechán bez omezení. Při určování nejlepších hodnot by měla být použita robustní regrese, pokud není uvedeno zdůvodnění. Metoda zvolená pro robustní regresi by měla být uvedena. U analýz FW nebo CERI hrER nebylo nutné provádět v korekci úbytku ligandu, ale v případě potřeby je možné její provedení zvážit. Po úvodní analýze je třeba každou vazebnou křivku zkontrolovat, aby bylo zajištěno, že je vhodně aplikována na model. Relativní vazebnou afinitu (RBA) pro látku se slabou vazbou lze vypočítat jako procento log (IC₅₀) pro látku se slabou vazbou vzhledem k log (IC₅₀) pro 17 β -estradiol. Výsledky z pozitivních kontrol a z kontroly s látkou, která se neváže, se posuzují pomocí měřítek účinnosti analýzy a kritérií přijatelnosti uvedených v této zkušební metodě (odstavec 20), v dodatku 2 (analýza FW, odstavce 41–51) a v dodatku 3 (analýza CERI, odstavce 41–51). Na obrázku 1 jsou uvedeny příklady ze 3 provedení zkoušek na referenční estrogen a látku se slabou vazbou.

Obrázek 1. Příklady křivek kompetitivní vazby pro referenční estrogen a kontrolní látku se slabou vazbou.

Analýza dat u zkoušených chemických látek

3. Data za všechny zkoušené chemické látky se analyzují postupně, aby bylo zajištěno, že data budou analyzována správně, a aby byla správně klasifikována každá kompetitivní vazebná křivka. Každé provedení zkoušky u zkoušené chemické látky by mělo nejdříve projít standardizovanou analýzou dat, která je stejná jako analýza použitá pro kontroly s referenčním estrogenem a s látkou se slabou vazbou. Po dokončení je třeba provést

technickou kontrolu parametrů vynesené křivky a vizuálně zkontrolovat, jak dobře data odpovídají generované kompetitivní vazebné křivce u každého provedení zkoušky. V průběhu této technické kontroly je pozorovaný pokles procenta specificky navázaného [³H]-17β-estradiolu v závislosti na koncentraci, nízká variabilita mezi technickými replikáty při jednotlivých koncentracích chemické látky a konzistentní parametry u tří provedení zkoušky dobrým ukazatelem, že zkouška a analýzy dat byly provedeny správně. Při posuzování výsledků z každého provedení zkoušky za zkoušenou chemickou látku je třeba používat odborný úsudek a data použitá ke klasifikaci jednotlivých zkoušených chemických látek jako látek, které se vážou, nebo látek, které se nevážou, by měla být vědecky obhajitelná.

4. Občas se mohou vyskytnout příklady dat, která vyžadují větší pozornost, aby byla data o vazbě hrER správně analyzována a interpretována. Předchozí studie ukázaly případy, kdy může být analýza a interpretace dat o kompetitivní vazbě na receptor komplikovaná v důsledku zvýšení procentuální specifické vazby při testování chemických látek při nejvyšších koncentracích (obrázek 2). Je to známý problém, který se vyskytuje při použití protokolů u řady analýz kompetitivní vazby na receptor (3). V těchto případech je pozorována odpověď závislá na koncentraci při nižších koncentracích, ale s tím, jak se koncentrace zkoušené chemické látky blíží mezi rozpustnosti, vytěšňování [³H]17β-estradiolu již neklesá. V těchto případech data u vyšších koncentrací ukazují, že byla dosažena biologická mez analýzy. Tento jev je například často spojován s nerozpustností a srážením chemické látky při vysokých koncentracích, případně může také odrážet překročení kapacity aktivního uhlí potaženého dextranem zachytávat radioizotopově značený ligand v průběhu separace při nejvyšších koncentracích chemické látky. Ponechání těchto datových bodů při nanášení kompetitivních vazebných dat na sigmoidní křivku může někdy vést k chybné klasifikaci vazebného potenciálu zkoušené chemické látky na ER (obrázek 2). Aby k tomu nedocházelo, zahrnuje protokol pro vazebné analýzy FW a CERI hrER možnost vyloučit z analýz datové body, pokud je průměr replikátů pro procento specifické vazby [³H]17β-estradiolu o 10 % nebo více nad hodnotu pozorovanou u střední hodnoty při nižší koncentraci (tj. obvykle se to nazývá pravidlo 10 %). Toto pravidlo lze použít u dané křivky pouze jednou a musí zůstat data pro alespoň 6 koncentrací, aby mohla být křivka správně klasifikována.

Obrázek 2: Příklady, kompetitivní vazebné křivky s použitím pravidla 10 % a bez použití tohoto pravidla

5. Správné použití pravidla 10 % pro korekci těchto křivek by mělo být pečlivě zváženo a vyhrazeno pouze pro ty případy, kde existuje silná indikace, že jde o látku, která se váže na hrER. Při provádění experimentů pro validační studii analýzy vazby FW hrER bylo pozorováno, že pravidlo 10 % má někdy nezamýšlený a nepředpokládaný důsledek.

Chemické látky, které nereagovaly s receptorem (tj. skutečné látky, které se nevážou), často vykazovaly variabilitu kolem 100 % vazby radioligandu, což bylo více než 10 % v celém rozmezí zkoušených koncentrací. Pokud se stalo, že nejnížší hodnota byla při nízké koncentraci, mohla být data při použití pravidla 10 % ze všech vyšších koncentrací z analýzy potenciálně vymazána, ačkoliv tyto koncentrace mohly být užitečné při určení, že tato chemická látka se neváže. Na obrázku 3 jsou uvedeny příklady, kdy použití pravidla 10 % není vhodné.

Obrázek 3: Příklady, data o kompetitivní vazbě, kdy použití pravidla 10 % není vhodné

Odkazy

- (1) OECD (2015). *Integrated Summary Report: Validation of Two Binding Assays Using Human Recombinant Estrogen Receptor Alpha (hrER α)*, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 226), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (2) Motulsky H. and Christopoulos A. (2003). *The law of mass action, In Fitting Models to Biological Data Using Linear and Non-linear Regression*. GraphPad Software Inc., San Diego, CA, pp 187-191. www.graphpad.com/manuals/Prism4/RegressionBook.pdf
- (3) Laws SC, Yavanhxay S, Cooper RL, Eldridge JC. (2006). *Nature of the Binding Interaction for 50 Structurally Diverse Chemicals with Rat Estrogen Receptors*. Toxicological Sci. 94(1):46-56.