

Brusel 25. února 2019
(OR. en)

6800/19
ADD 2

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

B.71 ANALÝZY SENZIBILIZACE KŮŽE *IN VITRO* ZAMĚŘENÉ NA KLÍČOVOU UDÁLOST AKTIVACE DENDRITICKÝCH BUNĚK V DRÁZE NEŽÁDOUCÍCH ÚČINKŮ (AOP) VEDOUCÍCH K SENZIBILIZACI KŮŽE

VŠEOBECNÝ ÚVOD

Zkušební metoda vycházející z klíčové události aktivace dendritických buněk

1. Jako látka senzibilizující kůži se označuje látka, která po styku s kůží vyvolává alergickou odpověď, jak ji definuje globálně harmonizovaný systém klasifikace a označování chemických látek Organizace spojených národů (GHS OSN) (1) a nařízení Evropské unie (EU) č. 1272/2008 o klasifikaci, označování a balení látek a směsí (CLP)¹. Existuje všeobecná shoda, pokud jde o klíčové biologické procesy, jež zapříčiňují senzibilizaci kůže. Současné znalosti o chemických a biologických mechanismech souvisejících se senzibilizací kůže byly v rámci programu OECD zkoumajícího dráhy nežádoucích účinků (AOP) (2) shrnuty jako AOP, počínaje molekulární iniciační událostí přes průběžné události až po nepříznivý účinek, a sice alergickou kontaktní dermatitidu. V tomto případě je molekulární iniciační událostí (tj. první klíčová událost) kovalentní vazba elektrofilních látek na nukleofilní centra v kožních proteinech. Druhá klíčová událost v této metodě AOP se odehrává v keratinocytech a zahrnuje zánětlivé odpovědi, jakož i změny v expresi genů spojené se specifickými dráhami buněčné signalizace, např. dráhami závislými na antioxidačním/elektrofilním responzivním elementu (ARE). Třetí klíčovou událostí je aktivace dendritických buněk (DC), typicky hodnocená podle exprese specifických buněčných povrchových markerů, chemokinů a cytokinů. Čtvrtou klíčovou událostí je aktivace a proliferace T buněk, která se nepřímo hodnotí ve zkoušce s vyšetřením lokálních lymfatických uzlin na myších (LLNA) (3).
2. Tato zkušební metoda je rovnocenná Pokynu OECD pro zkoušení (TG) č. 442E (2017). Popisuje analýzy *in vitro*, které se zaměřují na mechanismy popsané v klíčové události aktivace dendritických buněk AOP u senzibilizace kůže (2). Tato zkušební metoda

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.

zahrnuje zkoušky, které se podpůrně používají k rozlišování mezi látkami senzibilizujícími kůži a látkami nesenzibilizujícími kůži v souladu s GHS OSN a s nařízením CLP.

Zkoušky popsané v této zkušební metodě jsou:

- Zkouška aktivace lidské buněčné linie (h-CLAT)
 - Zkouška aktivace buněčné linie U937 (U-SENSTM)
 - Analýza reportérového genu pro interleukin-8 (analýza IL-8 Luc)
3. Zkoušky zahrnuté do této zkušební metody a odpovídající pokyn OECD se mohou lišit, pokud jde o postup použitý pro generování dat a naměřené hodnoty, ale pro zkoušení mohou být použity bez rozdílu pro účely požadavků jednotlivých zemí na výsledky zkoušek u klíčové události aktivace dendritických buněk AOP u senzibilizace kůže, přičemž může být využito vzájemné uznávání údajů podle postupu OECD.

Obecné informace a principy zkoušek zahrnutých do této zkušební metody vycházející z klíčové události

4. Hodnocení senzibilizace kůže bylo obvykle prováděno na pokusných zvířatech. Klasické metody, které používají morčata, Magnussonovu-Klingmannovu maximalizační zkoušku na morčatech (GPMT) a Bühlerovu zkoušku (zkušební metoda B.6) (4), hodnotí indukční i provokační fázi senzibilizace kůže. Zkoušky na myších, LLNA (zkušební metoda TM B.42) (3) a její dvě neradioaktivní modifikace, LLNA: DA (zkušební metoda B.50) (5) a LLNA: BrdU-ELISA (zkušební metoda B.51) (6), posuzují výlučně odpověď na indukci a také se prosadily, neboť ve srovnání se zkouškami na morčatech jsou vhodnější z hlediska dobrého zacházení se zvířaty a objektivního měření indukční fáze senzibilizace kůže.
5. V poslední době byly přijaty mechanisticky založené zkušební metody *in chemico* a *in vitro* zkoumající první klíčovou událost (zkušební metoda B.59; analýza přímé reaktivity peptidů (7)) a druhou klíčovou událost (zkušební metoda B.60; zkušební metoda se stanovením luciferázy ARE-Nrf2 (8)), neboť přispívají k hodnocení potenciální nebezpečnosti chemických látek z hlediska senzibilizace kůže.
6. Zkoušky popsané v této zkušební metodě kvantifikují změnu exprese buněčného povrchového markeru (markerů) spojenou s procesem aktivace monocytů a dendritických buněk po expozici senzibilizujícím látkám (např. CD54, CD86), nebo změny exprese IL-8, cytokinu souvisejícího s aktivací dendritických buněk. Bylo hlášeno, že látky senzibilizující kůži indukují expresi markerů na buněčné membráně, například CD40, CD54, CD80, CD83 a CD86, vedle indukce prozánětlivých cytokinů, jako jsou IL-1 β a TNF- α , a několika chemokinů včetně IL-8 (CXCL8) a CCL3 (9) (10) (11) (12), souvisejících s aktivací dendritických buněk (2).

7. Protože však aktivace dendritických buněk představuje pouze jednu klíčovou událost AOP (2) (13), informace získané zkouškami měřícími markery aktivace dendritických buněk nemusí samy o sobě stačit k vyvození závěru o existenci či neexistenci potenciálu chemických látek způsobovat senzibilizaci kůže. Proto se navrhuje, aby údaje získané pomocí zkoušek popsanych v této zkušební metodě byly použity jako podpůrné údaje při rozlišení mezi látkami senzibilizujícími kůži (tj. GHS OSN/CLP kategorie 1) a látkami, které kůži nesenzibilizují, při použití v rámci integrovaných přístupů ke zkouškám a posuzování (IATA), společně s dalšími relevantními doplňujícími informacemi, pocházejícími např. ze zkoušek *in vitro* zkoumajících jiné klíčové události v rámci metody AOP pro stanovení senzibilizace kůže, jakož i z nezkušebních metod včetně údajů odvozených z analogických chemických látek (13). Příklady použití dat získaných z těchto zkoušek v rámci definovaných přístupů, tj. přístupů standardizovaných jak v souvislosti s použitými informačními zdroji, tak i s postupem uplatněným u dat za účelem vypracování předpovědí, byly publikovány (13) a mohou být využity jako užitečné prvky v rámci IATA.
8. Zkoušky popsané v této zkušební metodě nelze používat samy o sobě, a to ani k zařazení látek senzibilizujících kůži do podkategorií 1A a 1B, jak je definuje systém GHS OSN / CLP, ze strany orgánů zavádějících tyto dvě doplňkové podkategorie, ani k predikci účinnosti těchto látek při rozhodování v rámci posuzování bezpečnosti. V závislosti na regulačním rámci však kladné výsledky získané těmito metodami mohou být použity samy o sobě ke klasifikaci chemické látky v kategorii 1 GHS OSN / CLP.
9. Termín „zkoušená chemická látka“ se v této zkušební metodě používá k označení toho, co se zkouší¹, a nesouvisí s použitelností zkoušek ke zkoušení jednosložkových látek, vícesložkových látek a/nebo směsí. V současnosti jsou k dispozici jen omezené informace o použitelnosti zkoušek ke zkoušení vícesložkových látek/směsí(14) (15). Tyto zkoušky jsou nicméně technicky použitelné i na zkoušení vícesložkových látek a směsí. Před použitím této zkušební metody ke zkoušení směsi za účelem získání údajů pro zamýšlené použití v právních předpisech by však mělo být zváženo, zda tato metoda může pro tento účel poskytnout přiměřené výsledky, a pokud ano, proč je tomu tak². Takové posouzení není nutné, pokud existuje právní požadavek na zkoušení dané směsi. Při zkoušení

¹ V červnu 2013 bylo na společné schůzi OECD dohodnuto, že by měl být v nových a aktualizovaných pokynech OECD ke zkoušení používán výraz „zkoušená chemická látka“ popisující to, co se zkouší, jednotněji.

² Tato věta byla navržena a schválena na zasedání pracovní skupiny WNT v dubnu 2014.

vícesložkových látek nebo směsí by se mimoto měly uvážit možné rušivé vlivy cytotoxických složek na pozorované odpovědi.

LITERATURA

- (1) United Nations UN (2015). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Sixth revised edition. New York & Geneva: United Nations Publications. ISBN: 978-92-1-117006-1. Dostupný na: https://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev06/06files_e.html.
- (2) OECD (2012). The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Series on Testing and Assessment No. Series on Testing and Assessment No. 168. Dostupné na: [http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO\(2012\)10/PART1&docLanguage=En](http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO(2012)10/PART1&docLanguage=En).
- (3) Kapitola B.42 této přílohy: Zkouška s vyšetřením lokálních lymfatických uzlin. Kapitola B.6 této přílohy: Senzibilizace kůže.
- (4) Kapitola B.50 této přílohy: Senzibilizace kůže: zkouška s vyšetřením lokálních lymfatických uzlin: DA.
- (5) Kapitola B.51 této přílohy: Senzibilizace kůže: zkouška s vyšetřením lokálních lymfatických uzlin: BrdU-ELISA.
- (6) Kapitola B.59 této přílohy: Senzibilizace kůže *in chemico*: zkouška přímé reaktivity peptidů (DPRA).
- (7) Kapitola B.60 této přílohy: Senzibilizace kůže *in vitro*: zkušební metoda luciferázou s ARE-Nrf2.
- (8) Steinman RM. (1991). The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol* 9:271-96.
- (9) Caux C, Vanbervliet B, Massacrier C, Azuma M, Okumura K, Lanier LL, and Banchereau J. (1994). B70/B7-2 is identical to CD86 and is the major functional ligand for CD28 expressed on human dendritic cells. *J Exp Med* 180:1841-7.
- (10) Aiba S, Terunuma A, Manome H, and Tagami H. (1997). Dendritic cells differently respond to haptens and irritants by their production of cytokines and expression of co-stimulatory molecules. *Eur J Immunol* 27:3031-8.
- (11) Aiba S, Manome H, Nakagawa S, Mollah ZU, Mizuashi M, Ohtani T, Yoshino Y, and Tagami. H. (2003). p38 mitogen-activated protein kinase and extracellular signal-regulated kinases play distinct roles in the activation of dendritic cells by two representative haptens, NiCl₂ and DNCB. *J Invest Dermatol* 120:390-8.

- (12) OECD (2016). Series on Testing & Assessment No 256: Guidance Document On The Reporting Of Defined Approaches And Individual Information Sources To Be Used Within Integrated Approaches To Testing And Assessment (IATA) For Skin Sensitisation, Annex 1 and Annex 2. ENV/JM/HA(2016)29. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Dostupné na webových stránkách: <https://community.oecd.org/community/iatass>.
- (13) Ashikaga T, Sakaguchi H, Sono S, Kosaka N, Ishikawa M, Nukada Y, Miyazawa M, Ito Y, Nishiyama N, Itagaki H. (2010). A comparative evaluation of *in vitro* skin sensitisation tests: the human cell-line activation test (h-CLAT) versus the local lymph node assay (LLNA). *Altern. Lab. Anim.* 38, 275-284.
- (14) Piroird, C., Ovigne, J.M., Rousset, F., Martinozzi-Teissier, S., Gomes, C., Cotovio, J., Alépée, N. (2015). The Myeloid U937 Skin Sensitization Test (U-SENS) addresses the activation of dendritic cell event in the adverse outcome pathway for skin sensitization. *Toxicol. Chem. In Vitro* 29, 901-916.

Dodatek 1

SENZIBILIZACE KŮŽE *IN VITRO*: ZKOUŠKA AKTIVACE BUNĚČNÉ LINIE (H-CLAT)

VÝCHOZÍ ÚVAHY A OMEZENÍ

1. Zkouška h-CLAT kvantifikuje změny exprese buněčných povrchových markerů spojené s procesem aktivace monocytů a dendritických buněk (DC) (tj. CD86 a CD54) v buněčné linii lidské monocytární leukémie THP-1 po expozici senzibilizujícím látkám (1)(2). Naměřené úrovně exprese buněčných povrchových markerů CD86 a CD54 se poté použijí jako podpůrný údaj pro rozlišení mezi látkami senzibilizujícími kůži a látkami, které kůži nesenzibilizují.
2. Zkouška h-CLAT byla hodnocena ve validační studii koordinované Referenční laboratoří Evropské unie pro alternativy ke zkouškám na zvířatech (EURL ECVAM) a následně byla podrobena nezávislé odborné revizi, kterou provedl vědecký poradní výbor (ESAC) EURL ECVAM. S ohledem na všechny dostupné důkazy a příspěvky od regulátorů a účastníků doporučil EURL ECVAM (3) zkoušku h-CLAT pro použití v rámci přístupu IATA na podporu rozlišování mezi látkami senzibilizujícími kůži a látkami nesenzibilizujícími kůži za účelem klasifikace nebezpečnosti a označování. Příklady využití údajů h-CLAT v kombinaci s jinými informacemi jsou uvedeny v odborné literatuře (4)(5)(6)(7)(8)(9)(10)(11).
3. U zkoušky h-CLAT se prokázalo, že ji lze přenést do laboratoří, které mají zkušenosti s technikami používajícími buněčné kultury a analýzou pomocí průtokové cytometrie. Míra reprodukovatelnosti předpovědí, které lze od této zkoušky očekávat, činí řádově 80 % v rámci laboratoří a 80 % mezi laboratořemi (3)(12). Výsledky validační studie (13) a dalších zveřejněných studií (14) celkově ukazují, že v porovnání s výsledky zkušební metody LLNA je přesnost při odlišení kůži senzibilizujících látek (tj. kategorie 1 GHS OSN/CLP) od nesenzibilizujících látek 85 % (N=142) při citlivosti 93 % (94/101) a specifčnosti 66 % (27/41) (na základě opakované analýzy provedené EURL ECVAM (12) při zohlednění všech stávajících dat, přičemž nebyly brány v úvahu negativní výsledky chemických látek s log K_{ow} větším než 3,5, jak je uvedeno v odstavci 4). Falešně negativní předpovědi se u zkoušky h-CLAT pravděpodobněji týkají chemických látek vykazujících nízkou až střední potenci způsobovat senzibilizaci kůže (tj. podkategorie 1B GHS OSN / CLP) než chemických látek vykazujících vysokou potenci způsobovat senzibilizaci kůže (tj. podkategorie 1A GHS OSN / CLP (4)(13)(15). Celkově vzato tyto informace naznačují, že metoda h-CLAT může být užitečná a může přispět k zjištění nebezpečí senzibilizace kůže. Zde uvedené hodnoty přesnosti h-CLAT jako samostatné zkoušky jsou však pouze orientační, neboť tato zkouška by měla být posuzována v kombinaci s jinými

zdroji informací v rámci IATA a v souladu s ustanoveními odstavců 7 a 8 ve Všeobecném úvodu. Při hodnocení metod posuzování senzibilizace kůže bez použití zvířat by se dále mělo vést v patrnosti, že ani zkouška LLNA a ani jiné zkoušky na zvířatech nemusí plně odrážet situaci u lidí.

4. Na základě nyní dostupných údajů bylo prokázáno, že metodu h-CLAT lze použít ke zkoušení chemických látek, které obsahují různé organické funkční skupiny, mají různé reakční mechanismy, různou potenci způsobovat senzibilizaci kůže (jak byla stanovena ve studiích *in vivo*) a různé fyzikálně-chemické vlastnosti (3)(14) (15). Metodu h-CLAT lze použít ke zkoušení rozpustných chemických látek nebo látek, jež tvoří stabilní disperzi (tj. koloid nebo suspenzi, ve které se zkoušená chemická látka neusazuje ani se neodděluje od rozpouštědla/vehikula do různých fází) ve vhodném rozpouštědle/ vehikulu (viz odstavec 14). Zkoušené chemické látky s log K_{ow} větším než 3,5 mají tendenci dávat falešně negativní výsledky (14). Negativní výsledky zkoušených chemických látek s log K_{ow} větším než 3,5 by proto neměly být brány v úvahu. Pozitivní výsledky získané u zkoušených chemických látek s log K_{ow} větším než 3,5 však přesto mohou být použity na podporu identifikace zkoušené chemické látky jako látky senzibilizující kůži. Z důvodu omezené metabolické schopnosti použité buněčné linie (16) a vzhledem k experimentálním podmínkám mohou prohapteny (tj. látky vyžadující enzymatickou aktivaci, například prostřednictvím enzymů P450) a prehapteny (tj. látky aktivované oxidací) zejména při nízké míře oxidace rovněž vykazovat negativní výsledky ve zkoušce h-CLAT (15). Zkouškou h-CLAT (17) mohou být hodnoceny fluorescenční zkoušené chemické látky, avšak silné fluorescenční zkoušené chemické látky vyzařující na stejné vlnové délce jako fluorescein-isothiokyanát (FITC) nebo jako propidiumiodid (PI) budou narušovat detekci pomocí průtokové cytometrie, a proto nemohou být správně hodnoceny pomocí konjugovaných protilátek FITC nebo PI. V takovém případě mohou být použity jiné protilátky značené fluorochromem, respektive jiné markery cytotoxicity, pokud lze prokázat, že poskytují podobné výsledky jako protilátky značené FITC (viz odstavec 24) nebo PI (viz odstavec 18), např. zkoušením vhodných látek uvedených v dodatku 1-2. Vzhledem k výše uvedenému by se měly negativní výsledky interpretovat v kontextu stanovených omezení a společně s jinými zdroji informací v rámci přístupu IATA. V případech, kdy existují důkazy prokazující nepoužitelnost metody h-CLAT na jiné specifické kategorie zkoušených chemických látek, neměla by se tato metoda ke zkoušení těchto specifických kategorií používat.
5. Jak bylo popsáno výše, metoda h-CLAT pomáhá rozlišovat mezi látkami senzibilizujícími kůži a látkami nesenzibilizujícími kůži. Může však také potenciálně přispět k hodnocení senzibilizační potence (4)(5)(9), je-li používána v rámci integrovaných přístupů, například IATA. Pro určení toho, jak mohou výsledky h-CLAT potenciálně přispět k posuzování

potence, nicméně bude nutný další výzkum, přednostně založený na údajích o účincích na člověka.

6. Definice jsou uvedeny v dodatku 1.1.

PODSTATA ZKOUŠKY

7. Metoda h-CLAT je analýza *in vitro*, která kvantifikuje změny exprese buněčných povrchových markerů (tj. CD86 a CD54) v buněčné linii lidské monocytární leukémie, na buňkách THP-1 po 24hodinové expozici zkoušené chemické látky. Tyto povrchové molekuly jsou typickými markery aktivace monocytických THP-1 a mohou napodobovat aktivaci DC, která hraje kritickou roli při primární aktivaci (primingu) T buněk. Změny exprese povrchových markerů se měří pomocí průtokové cytometrie po obarvení buněk protilátkami značenými fluorochromem. Rovněž se provádí paralelní měření cytotoxicity, aby bylo možné posoudit, zda při sub-cytotoxických koncentracích dochází k up-regulaci exprese povrchových markerů. Relativní intenzita fluorescence povrchových markerů v porovnání s kontrolou s rozpouštědlem/vehikulem se vypočítá a použije v predikčním modelu (viz odstavec 26) jako podpůrný údaj pro rozlišení mezi senzibilizujícími a nesenzibilizujícími látkami.

PROKÁZÁNÍ ZPŮSOBILOSTI

8. Před rutinním používáním zkoušky popsané v tomto dodatku ke zkušební metodě B.71 by měly laboratoře prokázat odbornou způsobilost použitím 10 látek pro prokazování způsobilosti, které jsou uvedeny v dodatku 1.2. Uživatelé zkoušky by si také měli vést historickou databázi údajů pocházejících ze zkoušek reaktivity (viz odstavec 11) a z pozitivních kontrol a kontrol s rozpouštědlem/vehikulem (viz odstavce 20–22) a používat tato data na potvrzení, že v jejich laboratoři je udržována reprodukovatelnost zkoušky v čase.

POSTUP

9. Tato zkouška je založena na protokolu databázové služby pro alternativní metody k pokusům na zvířatech (DB-ALM) č. 158 (18), což je protokol použitý při validační studii provedené za koordinace EURL ECVAM. Při provádění a používání metody h-CLAT v laboratoři se doporučuje použít tento protokol. Dále je uveden popis hlavních složek a postupů metody h-CLAT, která zahrnuje dva kroky: *analýza pro stanovení dávky a měření exprese CD86/CD54*.

Příprava buněk

10. Metoda h-CLAT se používá s buněčnou linií lidské monocytární leukémie THP-1. Doporučuje se, aby byly buňky (TIB-202™) pořízeny z kvalifikované buněčné banky, jako je například Americká sbírka typových kultur.
11. Buňky THP-1 se kultivují při teplotě 37°C ve zvlhčené atmosféře s 5 % CO₂ v médiu RPMI-1640 doplněném 10 % fetálního bovinního séra (FBS), 0,05 mM 2-merkaptoethanolu, 100 jednotkami/ml penicilinu a 100 µg/ml streptomycinu. Použití penicilinu a streptomycinu v kultivačním médiu může být vynecháno. V takovém případě by si však uživatelé měli ověřit, že nepřítomnost antibiotik v kultivačním médiu nemá žádný vliv na výsledky, například otestováním vhodných látek uvedených v dodatku 1.2. Aby se minimalizovalo riziko kontaminace, měly by být v každém případě dodržovány správné postupy při kultivaci buněk nezávisle na tom, zda kultivační médium obsahuje antibiotika. Buňky THP-1 se rutinně nasazují každé 2–3 dny v hustotě 0,1 až 0,2 × 10⁶ buněk/ml. Udržují se při hustotě 0,1 až 1,0 × 10⁶ buněk/ml. Než se buňky použijí pro zkoušení, je třeba zjistit, zda jsou vhodné, provedením kontroly reaktivity. Kontrola reaktivity buněk se provádí pomocí pozitivních kontrol, 2,4-dinitrochlorobenzenu (DNCB) (CAS č. 97-00-7, čistota ≥ 99 %) a síranu nikelnatého (NiSO₄) (CAS č. 10101-97-0, čistota ≥ 99 %), a negativní kontroly, kyseliny mléčné (LA) (CAS č. 50-21-5, čistota ≥ 85 %), a to dva týdny po rozmrazení. DNCB i NiSO₄ by měly dát pozitivní odpověď buněčných povrchových markerů CD86 i CD54 a LA by měla dát negativní odpověď buněčných povrchových markerů CD86 i CD54. Pro analýzu se používají pouze buňky, které prošly kontrolou reaktivity. Buňky mohou být množeny až dva měsíce po rozmrazení. Počet pasáží by neměl překročit 30. Kontrola reaktivity se provádí podle postupů popsanych v odstavcích 20–24.
12. Pro zkoušení se buňky THP-1 nasadí v hustotě 0,1 × 10⁶ buněk/ml nebo 0,2 × 10⁶ buněk/ml a předběžně se kultivují v kultivačních baňkách po dobu 72 hodin, respektive 48 hodin. Je důležité, aby byla hustota buněk v kultivační baňce bezprostředně po předběžné kultivaci pokud možno stejná při každém experimentu (použitím jedné ze dvou podmínek předběžné kultivace popsanych výše), protože hustota buněk v kultivační baňce bezprostředně po předběžné kultivaci by mohla ovlivnit expresi CD86/CD54 indukovanou alergeny (19). V den zkoušky se buňky získané z kultivační baňky resuspendují v čerstvém kultivačním médiu při hustotě 2 × 10⁶ buněk/ml. Poté se buňky rozdělí do 24jamkové destičky s plochým dnem s 500 µl (1 × 10⁶ buněk/jamku) nebo do 96jamkové destičky s plochým dnem s 80 µl (1,6 × 10⁵ buněk/jamku).

Analýza ke stanovení dávky

13. Analýza ke stanovení dávky se provádí za účelem stanovení CV75, což je koncentrace zkoušené chemické látky, která dává 75% životaschopnost buněk (CV) v porovnání s

kontrolou s rozpouštědlem/vehikulem. Hodnota CV75 se používá ke stanovení koncentrace zkoušených chemických látek pro měření exprese *CD86/CD54* (viz odstavce 20–24).

Příprava zkoušených chemických látek a kontrolních látek

14. Zkoušené chemické látky a kontrolní látky se připraví v den zkoušení. Pro metodu h-CLAT se zkoušené chemické látky rozpustí nebo stabilně dispergují (viz také odstavec 4) ve fyziologickém roztoku nebo médiu jako rozpouštědlo/vehikulu první volby nebo v dimethylsulfoxidu (DMSO, čistota $\geq 99\%$) jako v rozpouštědlo/vehikulu druhé volby, jestliže zkoušená chemická látka není rozpustná nebo netvoří stabilní disperzi v předchozích dvou rozpouštědlech/vehikulech, na finální koncentraci 100 mg/ml (ve fyziologickém roztoku nebo médiu) nebo 500 mg/ml (v DMSO). Jestliže je podáno dostatečné vědecké zdůvodnění, mohou být použita jiná rozpouštědla/vehikula než výše uvedená. Je třeba vzít v úvahu stabilitu zkoušené chemické látky ve finálním rozpouštědle/vehikulu.
15. Z počátečních 100 mg/ml (ve fyziologickém roztoku nebo médiu) nebo 500 mg/ml (v DMSO) zásobních roztoků zkoušených chemických látek se připraví tyto zředěné roztoky:
 - Pro fyziologický roztok nebo médium jako rozpouštědlo/vehikulum: Připraví se osm zásobních roztoků (osm koncentrací) dvojnásobným postupným ředěním s použitím odpovídajícího rozpouštědla/vehikula. Tyto zásobní roztoky se poté dále naředí padesátinásobně na kultivační médium (pracovní roztoky). Jestliže je nejvyšší konečná koncentrace na destičce 1000 $\mu\text{g/ml}$ netoxická, je třeba znovu stanovit maximální koncentraci provedením nové zkoušky cytotoxicity. Konečná koncentrace na destičce by neměla přesahovat 5000 $\mu\text{g/ml}$ zkoušených chemických látek rozpuštěných nebo stabilně dispergovaných ve fyziologickém roztoku nebo médiu.
 - Pro DMSO jako rozpouštědlo/vehikulum: Připraví se osm zásobních roztoků (osm koncentrací) dvojnásobným postupným ředěním s použitím odpovídajícího rozpouštědla/vehikula. Tyto zásobní roztoky se poté dále naředí 250násobně na kultivační médium (pracovní roztoky). Konečná koncentrace na destičce by neměla přesahovat 1000 $\mu\text{g/ml}$ ani v případě, že je tato koncentrace netoxická.

Nakonec se pracovní roztoky použijí pro expozici přidáním stejného objemu pracovního roztoku do objemu buněčné suspenze THP-1 na destičce (viz také odstavec 17), čímž se dosáhne dalšího dvojnásobného ředění) obvykle je konečný rozsah koncentrací na destičce 7,81–1000 $\mu\text{g/ml}$).

16. Jako kontrola s rozpouštědlem/vehikulem se u metody h-CLAT používá kultivační médium (pro zkoušené chemické látky rozpustné nebo stabilně dispergované (viz odstavec 4) v médiu nebo ve fyziologickém roztoku) nebo DMSO (pro zkoušené chemické látky rozpustné nebo stabilně dispergované v DMSO) zkoušené v jedné konečné koncentraci na

destičce 0,2 %. Proveďte se stejné ředění, jak je popsáno u pracovních roztoků v odstavci 15.

Aplikace zkoušených chemických látek a kontrolních látek

17. Kultivační médium nebo pracovní roztoky popsané v odstavcích 15 a 16 se smíchají 1:1 (obj.) s buněčnými suspenzemi připravenými ve 24jamkové nebo 96jamkové destičce s plochým dnem (viz odstavec 12). Exponované destičky se poté inkubují po dobu $24 \pm 0,5$ hodin při teplotě $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ za přítomnosti 5% CO_2 . Mělo by se dbát na to, aby nedošlo k vypařování těkavých zkoušených chemických látek a ke vzájemné kontaminaci zkoušenou chemickou látkou mezi jamkami, např. tak, že se destičky před inkubací se zkoušenými chemickými látkami zapečetí (20).

Barvení propidiumiodidem (PI)

18. Po $24 \pm 0,5$ hodinách expozice se buňky přenesou do zkumavek a odeberou se odstředěním. Supernatanty se zlikvidují a zbývající buňky se resuspendují s 200 μl (u 96jamkové destičky) nebo 600 μl (u 24jamkové destičky) fosfátového pufru obsahujícího 0,1 % bovinního sérového albuminu (barvicí pufr). 200 μl buněčné suspenze se přenesou do 96jamkové destičky s oblým dnem (u 96jamkové destičky) nebo do mikrozkušavky (u 24jamkové destičky) a dvakrát se promyje 200 μl (u 96jamkové destičky) nebo 600 μl (u 24jamkové destičky) barvicího pufru. Nakonec se buňky resuspendují v barvicím pufru (např. 400 μl) a přidá se roztok PI (např. 20 μl) (konečná koncentrace PI činí například 0,625 $\mu\text{g/ml}$). Mohou být použity jiné markery cytotoxicity, jako je 7-aminoaktinomycin D (7-AAD), trypanová modř či jiné, pokud lze prokázat, například otestováním vhodných látek uvedených v dodatku 1.2, že alternativní barviva dávají podobné výsledky jako PI.

Měření cytotoxicity pomocí průtokové cytometrie a odhad hodnoty CV75

19. Příjem PI se analyzuje pomocí průtokové cytometrie s akvizičním kanálem FL-3. Připraví se celkem 10 000 živých buněk (PI negativních). Životaschopnost buněk lze vypočítat podle následující rovnice programem cytometrické analýzy. Když je životaschopnost buněk nízká, je třeba připravit až 30 000 buněk včetně odumřelých. Alternativně lze získat údaje za jednu minutu po zahájení analýzy.

$$\text{Životaschopnost buněk} = \frac{\text{Počet živých buněk}}{\text{Celkový počet požadovaných buněk}} \times 100$$

Hodnota CV75 (viz odstavec 13), tj. koncentrace vykazující 75% přežití buněk THP-1 (25% cytotoxicita), se vypočítá log-lineární interpolací podle této rovnice:

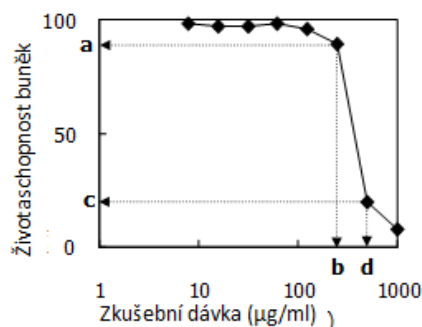
$$\text{Log CV75} = \frac{(75-c) \times \text{Log}(b) - (75-a) \times \text{Log}(d)}{a-c}$$

Kde:

a je minimální hodnota životaschopnosti buněk nad 75 %

c je maximální hodnota životaschopnosti buněk pod 75 %

b a d jsou koncentrace ukazující hodnotu životaschopnosti buněk a, respektive c



Lze použít i jiné způsoby odvození hodnoty CV75, pokud je prokázáno, že to nemá vliv na výsledky (např. otestováním vhodných látek uvedených).

Měření exprese CD86/CD54

Příprava zkoušených chemických látek a kontrolních látek

20. Použije se vhodné rozpouštědlo/vehikulum (fyziologický roztok, médium nebo DMSO; viz odstavec 14) na rozpuštění nebo stabilní dispergování zkoušených chemických látek. Zkoušené chemické látky se nejprve naředí na koncentraci odpovídající 100násobku (pro fyziologický roztok nebo médium) nebo 500násobku (pro DMSO) hodnoty $1,2 \times CV75$ stanovené v *analýze pro zjištění dávky* (viz odstavec 19). Jestliže nelze stanovit hodnotu CV75 (tj. když v *analýze pro zjištění dávky* není pozorována dostatečná cytotoxicita), použije se jako výchozí koncentrace nejvyšší rozpustná nebo stabilně dispergovaná koncentrace zkoušené chemické látky připravená s každým rozpouštědlem/vehikulem. Nezapomeňte, že konečná koncentrace na destičce by neměla přesahovat 5000 μg/ml (v případě fyziologického roztoku nebo média) nebo 1000 μg/ml (v případě DMSO). Poté se připraví 1,2násobným sériovým ředěním s použitím odpovídajícího rozpouštědla/vehikula zásobní roztoky (osm koncentrací v rozsahu od $100 \times 1,2 \times CV75$ do $100 \times 0,335 \times CV75$ (pro fyziologický roztok nebo médium) nebo od $500 \times 1,2 \times CV75$ do $500 \times 0,335 \times CV75$ (pro DMSO)), které budou testovány metodou h-CLAT (viz protokol DB-ALM č. 158, kde je uveden příklad dávkování). Zásobní roztoky se poté dále naředí 50násobně (pro fyziologický roztok nebo médium) nebo 250násobně (pro DMSO) na kultivační médium (pracovní roztoky). Tyto pracovní roztoky se nakonec použijí pro expozici s dalším konečným dvojnásobným ředicím faktorem na destičce. Jestliže výsledky nesplňují kritéria přijatelnosti popsaná v odstavcích 29 a 30, pokud jde o životaschopnost buněk, může být zopakována *analýza ke stanovení dávky*, aby se určila přesnější hodnota CV75.

Nezapomeňte, že pro měření exprese CD86/CD54 mohou být použity pouze 24jamkové destičky.

21. Připraví se kontrola s rozpouštědlem/vehikulem, jak bylo popsáno v odstavci 16. Jako pozitivní kontrola se u metody h-CLAT používá DNCB (viz odstavec 11), přičemž zásobní roztoky se připraví v DMSO a naředí podle popisu ředění zásobních roztoků uvedeného v odstavci 20. Jako pozitivní kontrola pro *měření exprese CD86/CD54* se používá DNCB v jedné konečné koncentraci na destičce (obvykle 4,0 µg/ml). Pro získání koncentrace DNCB na destičce 4,0 µg/ml se připraví 2 mg/ml zásobního roztoku DNCB v DMSO, který se dále naředí 250násobně s kultivačním médiem na 8 µg/ml pracovního roztoku. Alternativně může být použita jako koncentrace pozitivní kontroly také hodnota CV75 DNCB, která se stanoví v každém zkušebním zařízení. Lze použít i jiné vhodné pozitivní kontroly, pokud jsou k dispozici dosavadní údaje umožňující odvodit srovnatelná kritéria přijatelnosti daného provedení zkoušky. Jedna konečná koncentrace na destičce u pozitivních kontrol by neměla přesahovat 5000 µg/ml (v případě fyziologického roztoku nebo média) nebo 1000 µg/ml (v případě DMSO). Kritéria přijatelnosti provedení zkoušky jsou stejná jako kritéria přijatelnosti popsaná pro zkoušenou chemickou látku (viz odstavec 29), s výjimkou posledního kritéria přijatelnosti, neboť pozitivní kontrola se testuje v jedné koncentraci.

Aplikace zkoušených chemických látek a kontrolních látek

22. U každé zkoušené chemické látky a kontrolní látky je pro předpověď potřebný jeden experiment. Každý experiment sestává alespoň ze dvou nezávislých provedení zkoušky pro *měření exprese CD86/CD54* (viz odstavce 26-28). Každé nezávislé opakování se provádí v různý den nebo ve stejný den, pokud pro každé nezávislé provedení zkoušky: a) jsou připraveny nezávislé čerstvé zásobní roztoky zkoušené chemické látky a roztoky protilátek a b) jsou použity nezávisle sebrané buňky (tj. buňky se sbírají z různých kultivačních baněk); buňky však mohou pocházet ze stejné pasáže. Zkoušené chemické látky a kontrolní látky připravené jako pracovní roztoky (500 µl) se smíchají s 500 µl suspendovaných buněk (1×10^6 buněk) v poměru 1 : 1 a buňky se inkubují po dobu $24 \pm 0,5$ hodiny, jak je popsáno v odstavcích 20 a 21. Při každém provedení zkoušky stačí jeden replikát pro každou koncentraci zkoušené chemické látky a kontrolní látky, protože predikce se získává alespoň ze dvou nezávislých provedení zkoušky.

Barvení a analýza buněk

23. Po $24 \pm 0,5$ hodinách expozice se buňky přenesou z 24jamkové destičky do zkumavek, odeberou se odstředěním a poté se dvakrát promyjí 1 ml barvicího pufru (v případě potřeby může být provedeno další promytí). Po promytí se počet buněk upraví 600 µl tlumivého roztoku (barvicí pufr obsahující 0,01 % (m/v) globulinu (Cohnova frakce II, III, lidský; SIGMA, #G2388-10G nebo ekvivalentní)) a inkubují se při 4 °C po dobu 15 min. Po

úpravě počtu se buňky rozdělí na tři díly po 180 µl do 96jamkové destičky s oblým dnem nebo mikrozkuhavky.

24. Po odstředění se buňky barví 50 µl protilátky anti-CD86, anti-CD54 nebo myší IgG1 protilátky (izotyp) značené FITC při 4°C po dobu 30 min. Protilátky popsané v protokolu č. 158 pro metodu h-CLAT DB-ALM (18) se používají po naředění 3:25 obj. (pro CD86 (BD-PharMingen, #555657; Klon: Fun-1)) nebo 3:50 obj. (pro CD54 (DAKO, #F7143; Klon: 6.5B5) a IgG1 (DAKO, #X0927)) v barvicím pufru. Vývojáři zkoušky definovali tyto ředící faktory protilátek jako faktory, které poskytují nejlepší odstup signálu od šumu. Podle zkušeností vývojářů zkoušek je intenzita fluorescence protilátek obvykle u různých šarží konzistentní. Uživatelé však mohou zvážit titraci protilátek v podmínkách své vlastní laboratoře a definovat si tak nejlepší koncentrace pro použití. Mohou být použity jiné protilátky anti-CD86 a/nebo anti-CD54 značené fluorochromem, pokud lze prokázat, například otestováním vhodných látek uvedených v dodatku 1.2, že dávají podobné výsledky jako konjugované protilátky značené FITC. Je třeba poznamenat, že změna klonu nebo dodavatele protilátek, které jsou popsány v protokolu č. 158 pro metodu h-CLAT DB-ALM (18), může ovlivnit výsledky. Po dvojím nebo vícenásobném promytí 150 µl barvicího pufru se buňky resuspendují v barvicím pufru (např. 400 µl) a přidá se roztok PI (např. 20 µl pro dosažení konečné koncentrace 0,625 µg/ml) nebo roztok jiného markeru cytotoxicity (viz odstavec 18). Úroveň exprese CD86 a CD54 a životaschopnosti buněk se analyzují pomocí průtokové cytometrie.

ÚDAJE A PŘEDKLÁDÁNÍ ZPRÁV

Vyhodnocení údajů

25. Expres CD86 a CD54 se analyzuje pomocí průtokové cytometrie s akvizičním kanálem FL-1. Na základě geometrického průměru intenzity fluorescence (MFI) se vypočítá relativní intenzita fluorescence (RFI) CD86 a CD54 pro buňky pozitivní kontroly (ctrl) a buňky exponované chemické látce podle této rovnice:

$$RFI = \frac{MFI \text{ buněk exponovaných chem.látce} - MFI \text{ kontrolních buněk izotypu exponovaných chem.látce}}{MFI \text{ ctrl buněk exponovaných ředidlu/vehikulu} - MFI \text{ ctrl buněk izotypu exponovaných ředidlu/vehikulu}} \times 100$$

Podle rovnice uvedené v odstavci 19 se vypočítá také životaschopnost buněk z kontrolních (ctrl) buněk izotypu (které jsou obarveny myšími IgG1 (izotyp) protilátkami).

Predikční model

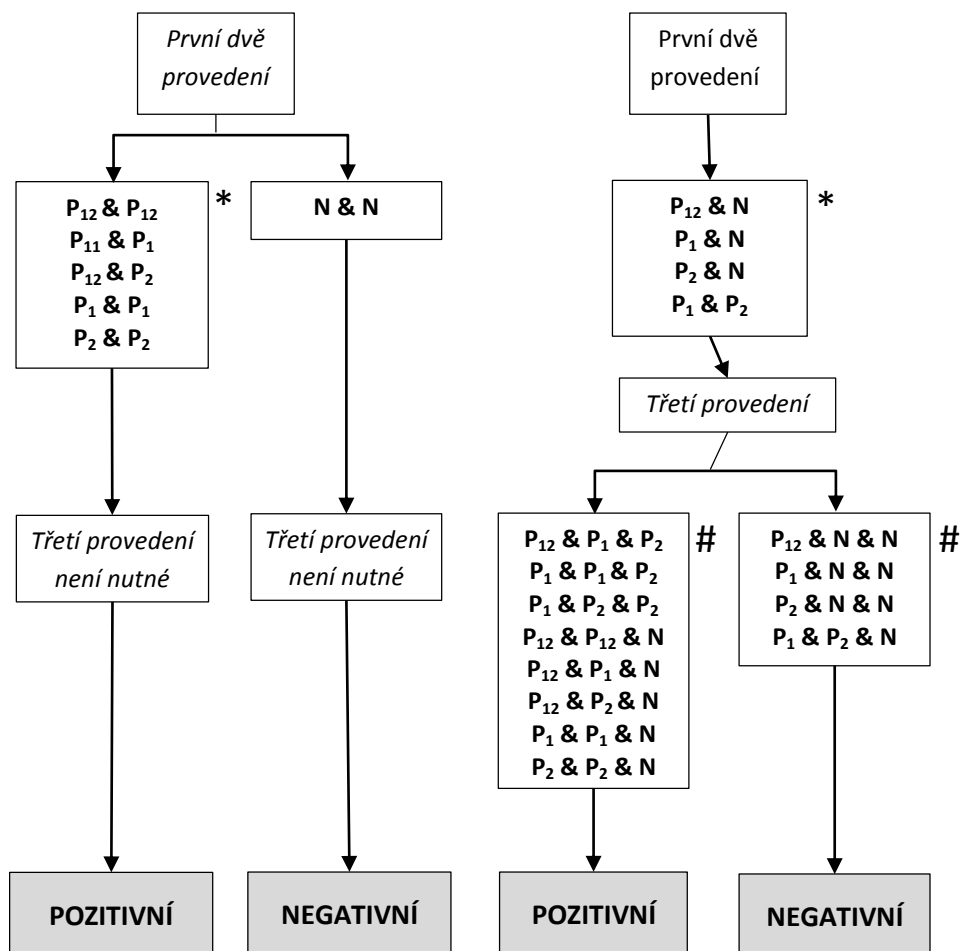
26. Pro měření exprese *CD86/CD54* se každá zkoušená chemická látka otestuje alespoň ve dvou nezávislých provedeních zkoušky, z nichž se odvodí jedna předpověď (POZITIVNÍ nebo NEGATIVNÍ). Předpověď získaná zkouškou h-CLAT se považuje za POZITIVNÍ,

je-li splněna alespoň jedna z následujících podmínek ve 2 ze 2 opakování nebo alespoň ve 2 ze 3 nezávislých provedení zkoušky, jinak se předpověď získaná zkouškou h-CLAT považuje za NEGATIVNÍ (obrázek 1):

- RFI u CD86 se rovná nebo je větší než 150 % při jakékoliv zkoušené koncentraci (při životaschopnosti buněk ≥ 50 %);
- RFI u CD54 se rovná nebo je větší než 200 % při jakékoliv zkoušené koncentraci (při životaschopnosti buněk ≥ 50 %).

27. Pokud jsou první dvě provedení zkoušky u CD86 pozitivní anebo jsou pozitivní pro CD54, považuje se předpověď získaná zkouškou h-CLAT za POZITIVNÍ a třetí provedení zkoušky není nutné. Podobně, pokud jsou první dvě provedení zkoušky negativní, považuje se předpověď h-CLAT za NEGATIVNÍ (při zohlednění ustanovení odstavce 30), aniž by bylo nutné opakovat zkoušku potřetí. Pokud však první dvě provedení zkoušky nejsou shodné alespoň u jednoho z markerů (CD54 nebo CD86), je třeba provést zkoušku potřetí, přičemž konečná předpověď bude vycházet z většinového výsledku těchto tří jednotlivých provedení zkoušky (tj. 2 ze 3). V této souvislosti je třeba poznamenat, že pokud se provedou první dvě nezávislé zkoušky a jedna je pozitivní pouze pro CD86 (dále jen P₁) a druhá je pozitivní pouze pro CD54 (dále jen P₂), je třeba provést zkoušku potřetí. Jestliže je toto třetí provedení zkoušky negativní pro oba markery (dále jen N), považuje se předpověď h-CLAT za NEGATIVNÍ. Jestliže je však toto třetí provedení zkoušky pozitivní pro jeden z markerů (P₁ nebo P₂) nebo pro oba markery (dále jen P₁₂), považuje se předpověď h-CLAT za POZITIVNÍ.

Obrázek 1: Predikční model používaný při metodě h-CLAT. Předpověď h-CLAT by měla být zvažována v rámci přístupu IATA a v souladu s ustanovením odstavců 7 a 8 Všeobecného úvodu.



P₁: provedení zkoušky pozitivní pouze u CD86; P₂: provedení zkoušky pozitivní pouze u CD54; P₁₂: provedení zkoušky pozitivní u CD86 i CD54; N: provedení zkoušky není pozitivní u CD86 ani CD54.

*Rámečky ukazují relevantní kombinace výsledků z prvních dvou provedení zkoušky, a to nezávisle na pořadí jejich získání.

#Rámečky ukazují relevantní kombinace výsledků ze tří provedení zkoušky na základě výsledků získaných v prvních dvou provedeních zkoušky znázorněných v rámečku výše, ale nevyjadřují pořadí jejich získání.

28. Pro zkoušené chemické látky, které jsou na základě metody h-CLAT považovány za POZITIVNÍ, lze doplňkově stanovit dvě hodnoty účinné koncentrace (EC), EC150 pro CD86 a EC200 pro CD54, tj. koncentrace, při níž zkoušené chemické látky indukují RFI 150 nebo 200. Tyto hodnoty EC mohou však také potenciálně přispět k hodnocení

senzibilizační potence (9), jsou-li používány v rámci integrovaných přístupů, například IATA (4) (5) (6) (7) (8). Vypočítají se pomocí této rovnice:

$$EC150 \text{ (for CD86)} = B_{conc} + [(150 - B_{RFI}) / (A_{RFI} - B_{RFI}) \times (A_{conc} - B_{conc})]$$

$$EC200 \text{ (for CD54)} = B_{conc} + [(200 - B_{RFI}) / (A_{RFI} - B_{RFI}) \times (A_{conc} - B_{conc})]$$

kde

A_{conc} je nejnižší koncentrace v $\mu\text{g/ml}$ s $\text{RFI} > 150$ (CD86) nebo 200 (CD54)

B_{conc} je nejvyšší koncentrace v $\mu\text{g/ml}$ s $\text{RFI} < 150$ (CD86) nebo 200 (CD54)

A_{RFI} je RFI při nejnižší koncentraci s $\text{RFI} > 150$ (CD86) nebo 200 (CD54)

B_{RFI} je RFI při nejvyšší koncentraci s $\text{RFI} < 150$ (CD86) nebo 200 (CD54)

Pro účely přesnějšího odvození hodnot EC150 a EC200 mohou být potřebná tři nezávislá provedení *měření exprese CD86/CD54*. Poté se stanoví konečné hodnoty EC150 a EC200 jako medián hodnot EC vypočtených ze tří nezávislých provedení zkoušky. Pokud kritéria pozitivitu splňují pouze dvě ze tří nezávislých provedení zkoušky (viz odstavce 26-27), použije se vyšší ze dvou vypočtených hodnot EC150 nebo EC200.

Kritéria přijatelnosti

29. Při používání metody h-CLAT by měla být splněna tato kritéria přijatelnosti (22) (27).

- Životaschopnost buněk u kontroly s médiem a kontroly s rozpouštědlem/vehikulem by měla být vyšší než 90 %.
- Při kontrole s rozpouštědlem/vehikulem by hodnoty RFI u CD86 i CD54 neměly překročit pozitivní kritéria (CD86 $\text{RFI} \geq 150$ % a CD54 $\text{RFI} \geq 200$ %). Hodnoty RFI kontroly s rozpouštědlem/vehikulem se vypočítají podle vzorce uvedeného v odstavci 25 („MFI chemické látky“ se nahradí „MFI rozpouštědla/vehikula“ a „MFI rozpouštědla/vehikula“ se nahradí „MFI kontroly (s médiem)“).
- U kontroly s médiem i kontroly s rozpouštědlem/vehikulem by mělo být procento MFI u CD86 i CD54 > 105 % kontroly izotypu.
- Při pozitivní kontrole (DNFB) by hodnoty RFI u CD86 i CD54 měly splňovat pozitivní kritéria (CD86 $\text{RFI} \geq 150$ a CD54 $\text{RFI} \geq 200$) a životaschopnost buněk by měla být větší než 50 %.
- U zkoušené chemické látky by životaschopnost buněk měla být větší než 50 % alespoň u čtyř testovaných koncentrací při každém provedení zkoušky.

30. Negativní výsledky jsou přijatelné pouze u zkoušených chemických látek, které vykazují životaschopnost buněk menší než 90 % při nejvyšší zkoušené koncentraci (tj. $1.2 \times \text{CV75}$

podle schématu sériového ředění popsaného v odstavci 20). Jestliže se životaschopnost buněk při $1,2 \times CV75$ rovná nebo je vyšší než 90 %, je třeba negativní výsledek vyřadit. V takovém případě se doporučuje pokusit se zpřesnit výběr dávky zopakováním stanovení hodnoty CV75. Je třeba poznamenat, že když se jako maximální experimentální koncentrace zkoušené chemické látky použije 5 000 µg/ml ve fyziologickém roztoku (nebo médiu či jiných rozpouštědlech/vehikulech), 1 000 µg/ml v DMSO nebo nejvyšší rozpustná koncentrace, je negativní výsledek přijatelný i v případě, že je životaschopnost buněk nad 90 %.

Závěrečná zpráva

31. Závěrečná zpráva by měla obsahovat tyto informace.

Zkoušená chemická látka

Jednosložková látka:

- chemická identifikace, např. název (názvy) IUPAC nebo CAS, číslo (čísla) CAS, kód SMILES nebo InChI, strukturní vzorec a/nebo jiné identifikátory,
- fyzický vzhled, log K_{ow} , rozpustnost ve vodě, rozpustnost v DMSO, molekulová hmotnost a další důležité fyzikálně-chemické vlastnosti, v rozsahu, v jakém jsou tyto informace dostupné,
- čistota, případně chemická identita nečistot, je-li to prakticky proveditelné atd.,
- případné ošetření před zkoušením (např. zahřívání, mletí),
- zkušební koncentrace,
- podmínky skladování a stabilita, v rozsahu, v jakém jsou tyto informace dostupné,
- zdůvodnění volby rozpouštědla/vehikula pro každou zkoušenou chemickou látku.

Vícesložková látka, UVCB a směs:

- charakterizovaná v co možná největší míře např. chemickou identitou (viz výše), čistotou, kvantitativním výskytem a důležitými fyzikálně-chemickými vlastnostmi (viz výše) složek, v rozsahu, v jakém jsou tyto informace dostupné,
- fyzický vzhled, rozpustnost ve vodě, rozpustnost v DMSO, a další důležité fyzikálně-chemické vlastnosti, v rozsahu, v jakém jsou tyto informace dostupné,
- molekulová hmotnost nebo zdánlivá molekulová hmotnost v případě směsí/polymerů se známým složením nebo jiné informace důležité pro provedení studie,
- případné ošetření před zkoušením (např. zahřívání, mletí),

- zkušební koncentrace,
- podmínky skladování a stabilita, v rozsahu, v jakém jsou tyto informace dostupné,
- zdůvodnění volby rozpouštědla/vehikula pro každou zkoušenou chemickou látku.

Kontroly

Pozitivní kontrola:

- chemická identifikace, např. název (názvy) IUPAC nebo CAS, číslo (čísla) CAS, kód SMILES nebo InChI, strukturní vzorec a/nebo jiné identifikátory,
- případně fyzický vzhled, log K_{ow} , rozpustnost ve vodě, rozpustnost v DMSO, molekulová hmotnost a další důležité fyzikálně-chemické vlastnosti, v rozsahu, v jakém jsou tyto informace dostupné,
- čistota, případně chemická identita nečistot, je-li to prakticky proveditelné atd.,
- případné ošetření před zkoušením (např. zahřívání, mletí),
- zkušební koncentrace,
- podmínky skladování a stabilita, v rozsahu, v jakém jsou tyto informace dostupné,
- odkaz na případné dosavadní výsledky pozitivních kontrol prokazující vhodnost kritérií přijatelnosti provedení.

Negativní kontrola a kontrola rozpouštědlem/vehikulem:

- chemická identifikace, např. název (názvy) IUPAC nebo CAS, číslo (čísla) CAS, kód SMILES nebo InChI, strukturní vzorec a/nebo jiné identifikátory,
- čistota, případně chemická identita nečistot, je-li to prakticky proveditelné atd.,
- fyzický vzhled, molekulová hmotnost a další důležité fyzikálně-chemické vlastnosti v případě použití jiného rozpouštědla/vehikula než rozpouštědel/vehikul uvedených v tomto pokynu, a to v rozsahu, v jakém jsou tyto informace dostupné,
- podmínky skladování a stabilita, v rozsahu, v jakém jsou tyto informace dostupné,
- zdůvodnění volby rozpouštědla/vehikula pro každou zkoušenou chemickou látku.

Zkušební podmínky

- jméno a adresa zadavatele, zkušebního zařízení a vedoucího studie,
- popis použité zkoušky,
- použité buněčné linie, podmínky skladování a zdroj (např. zařízení, z něhož byly získány),

- použitá průtoková cytometrie (např. model), včetně nastavení přístrojů, použitého globulinu a markeru cytotoxicity,
- postup použitý pro prokázání způsobilosti laboratoře k provádění této zkoušky zkoušením vhodných látek a postup použitý pro prokázání reprodukovatelného provedení zkoušky v čase, např. dosavadní kontrolní údaje anebo dosavadní údaje o kontrolách reaktivity.

Kritéria přijatelnosti zkoušky

- životaschopnost buněk, hodnoty MFI a RFI získané z kontroly s rozpouštědlem/vehikulem v porovnání s rozsahy přijatelnosti,
- životaschopnost buněk a hodnoty RFI získané z pozitivní kontroly v porovnání s rozsahy přijatelnosti,
- životaschopnost buněk všech testovaných koncentrací zkoušené chemické látky.

Zkušební postup

- počet provedení zkoušky,
- koncentrace zkoušených chemických látek, použité doby aplikace a expozice (pokud se liší od doporučených),
- délka expozice zkoušené chemické látky (pokud se liší od doporučené);
- popis použitých hodnotících kritérií a kritérií rozhodování,
- popis všech změn zkušebního postupu.

Výsledky

- údaje ve formě tabulky, včetně CV75 (v relevantních případech), jednotlivých geometrických hodnot MFI, RFI, hodnot životaschopnosti buněk, hodnot EC150/EC200 (v relevantních případech) získaných pro zkoušenou chemickou látku a pro pozitivní kontrolu při každém provedení zkoušky a uvedení klasifikace zkoušené chemické látky podle predikčního modelu;
- případně popis jakýchkoli jiných důležitých zjištění z pozorování.

Diskuse o výsledcích

- diskuse o výsledcích získaných pomocí metody h-CLAT;
- diskuse o výsledcích zkoušky v rámci IATA, jsou-li k dispozici jiné příslušné informace.

Závěry

LITERATURA

- (1) Ashikaga T, Yoshida Y, Hirota M, Yoneyama K, Itagaki H, Sakaguchi H, Miyazawa M, Ito Y, Suzuki H, Toyoda H. (2006). Development of an *in vitro* skin sensitization test using human cell lines: The human Cell Line Activation Test (h-CLAT) I. Optimization of the h-CLAT protocol. *Toxicol. Chem. In Vitro* 20, 767-773.
- (2) Miyazawa M, Ito Y, Yoshida Y, Sakaguchi H, Suzuki H. (2007). Phenotypic alterations and cytokine production in THP-1 cells in response to allergens. *Toxicol. Chem. In Vitro* 21, 428-437.
- (3) EC EURL-ECVAM (2013). Recommendation on the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for skin sensitisation testing. Dostupné na: <https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/eurl-ecvam-recommendations>
- (4) Takenouchi O, Fukui S, Okamoto K, Kurotani S, Imai N, Fujishiro M, Kyotani D, Kato Y, Kasahara T, Fujita M, Toyoda A, Sekiya D, Watanabe S, Seto H, Hirota M, Ashikaga T, Miyazawa M. (2015). Test battery with the human cell line activation test, direct peptide reactivity assay and DEREK based on a 139 chemical data set for predicting skin sensitizing potential and potency of chemicals. *J Appl Toxicol.* 35, 1318-1332.
- (5) Hirota M, Fukui S, Okamoto K, Kurotani S, Imai N, Fujishiro M, Kyotani D, Kato Y, Kasahara T, Fujita M, Toyoda A, Sekiya D, Watanabe S, Seto H, Takenouchi O, Ashikaga T, Miyazawa M. (2015). Evaluation of combinations of *in vitro* sensitization test descriptors for the artificial neural network-based risk assessment model of skin sensitization. *J Appl Toxicol.* 35, 1333-1347.
- (6) Bauch C, Kolle SN, Ramirez T, Fabian E, Mehling A, Teubner W, van Ravenzwaay B, Landsiedel R. (2012). Putting the parts together: combining *in vitro* methods to test for skin sensitizing potentials. *Regul Toxicol Pharmacol.* 63, 489-504.
- (7) Van der Veen JW, Rorije E, Emter R, Natch A, van Loveren H, Ezendam J. (2014). Evaluating the performance of integrated approaches for hazard identification of skin sensitizing chemicals. *Regul Toxicol Pharmacol.* 69, 371-379.
- (8) Urbisch D, Mehling A, Guth K, Ramirez T, Honarvar N, Kolle S, Landsiedel R, Jaworska J, Kern PS, Gerberick F, Natsch A, Emter R, Ashikaga T, Miyazawa M, Sakaguchi H. (2015). Assessing skin sensitization hazard in mice and men using non-animal test methods. *Regul Toxicol Pharmacol.* 71, 337-351.

- (9) Jaworska JS, Natsch A, Ryan C, Strickland J, Ashikaga T, Miyazawa M. (2015). Bayesian integrated testing strategy (ITS) for skin sensitization potency assessment: a decision support system for quantitative weight of evidence and adaptive testing strategy. *Arch Toxicol.* 89, 2355-2383.
- (10) Strickland J, Zang Q, Kleinstreuer N, Paris M, Lehmann DM, Choksi N, Matheson J, Jacobs A, Lowit A, Allen D, Casey W. (2016). Integrated decision strategies for skin sensitization hazard. *J Appl Toxicol.* DOI 10.1002/jat.3281.
- (11) Nukada Y, Ashikaga T, Miyazawa M, Hirota M, Sakaguchi H, Sasa H, Nishiyama N. (2012). Prediction of skin sensitization potency of chemicals by human Cell Line Activation Test (h-CLAT) and an attempt at classifying skin sensitization potency. *Toxicol. Chem. In Vitro* 26, 1150-60.
- (12) EC EURL-ECVAM (2015). Re-analysis of the within and between laboratory reproducibility of the human Cell Line Activation Test (h-CLAT). Dostupné na: <https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/eurl-ecvam-recommendations/eurl-ecvam-recommendation-on-the-human-cell-line-activation-test-h-clat-for-skin-sensitisation-testing>
- (13) EC EURL ECVAM (2012). human Cell Line Activation Test (h-CLAT) Validation Study Report Accessible at: <https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/eurl-ecvam-recommendations>
- (14) Takenouchi O, Miyazawa M, Saito K, Ashikaga T, Sakaguchi H. (2013). Predictive performance of the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for lipophilic with high octanol-water partition coefficients. A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. *Sci.* 38, 599-609.
- (15) Ashikaga T, Sakaguchi H, Sono S, Kosaka N, Ishikawa M, Nukada Y, Miyazawa M, Ito Y, Nishiyama N, Itagaki H. (2010). A comparative evaluation of *in vitro* skin sensitisation tests: the human cell-line activation test (h-CLAT) versus the local lymph node assay (LLNA). *Altern. Lab. Anim.* 38, 275-284.
- (16) Fabian E., Vogel D., Blatz V., Ramirez T., Kolle S., Eltze T., van Ravenzwaay B., Oesch F., Landsiedel R. (2013). Xenobiotic metabolizing enzyme activities in cells used for testing skin sensitization *in vitro*. *Arch Toxicol* 87, 1683-1699.
- (17) Okamoto K, Kato Y, Kosaka N, Mizuno M, Inaba H, Sono S, Ashikaga T, Nakamura T, Okamoto Y, Sakaguchi H, Kishi M, Kuwahara H, Ohno Y. (2010). The Japanese ring study of a human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for predicting skin sensitization potential (6th report): A study for

- evaluating oxidative hair dye sensitization potential using h-CLAT. AATEX 15, 81-88.
- (18) DB-ALM (INVITTOX) (2014). Protocol 158: human Cell Line Activation Test (h-CLAT), 23pp. Dostupné na: <http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/>
- (19) Mizuno M, Yoshida M, Kodama T, Kosaka N, Okamoto K, Sono S, Yamada T, Hasegawa S, Ashikaga T, Kuwahara H, Sakaguchi H, Sato J, Ota N, Okamoto Y, Ohno Y. (2008). Effects of pre-culture conditions on the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) results; Results of the 4th Japanese inter-laboratory study. AATEX 13, 70-82.
- (20) Sono S, Mizuno M, Kosaka N, Okamoto K, Kato Y, Inaba H, , Nakamura T, Kishi M, Kuwahara H, Sakaguchi H, Okamoto Y, Ashikaga T, Ohno Y. (2010). The Japanese ring study of a human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for predicting skin sensitization potential (7th report): Evaluation of volatile, poorly soluble fragrance materials. AATEX 15, 89-96.
- (21) OECD (2005). Guidance Document No 34 on The Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. OECD Series on Testing and Assessment. Organization for Economic Cooperation and Development, Paris, France, 2005, 96 pp.
- (22) OECD (2012). The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Series on Testing and Assessment No. Series on Testing and Assessment No. 168. Dostupné na: [http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=E NV/JM/MONO\(2012\)10/PART1&docLanguage=En](http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=E NV/JM/MONO(2012)10/PART1&docLanguage=En)
- (23) United Nations UN (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Fifth revised edition. New York & Geneva: United Nations Publications. ISBN: 978-92-1-117006-1. Dostupné na: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html
- (24) ECETOC (2003). Contact sensitization: Classification according to potency. European Centre for Ecotoxicology & Toxicology of Chemicals (Technical Report No 87).
- (25) Ashikaga T, Sakaguchi H, Okamoto K, Mizuno M, Sato J, Yamada T, Yoshida M, Ota N, Hasegawa S, Kodama T, Okamoto Y, Kuwahara H, Kosaka N, Sono S, Ohno Y. (2008). Assessment of the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for Skin Sensitization; Results of the First Japanese Inter-laboratory Study. AATEX 13, 27-35.

Dodatek 1.1

DEFINICE

Přesnost: přesnost shody mezi výsledky zkoušky a přijatými referenčními hodnotami. Je to míra funkčnosti zkoušky a jeden z aspektů její relevantnosti. Tento pojem se často používá místo pojmu soulad a rozumí se jím podíl správných výsledků zkoušky (21).

AOP (mechanismy nežádoucích účinků): sled událostí od chemické struktury cílové chemické látky nebo skupiny podobných chemických látek přes molekulární iniciační událost po účinek *in vivo*, který je předmětem zájmu (22).

Chemická látka: látka nebo směs.

CV75: odhad koncentrace ukazující 75% životaschopnost buněk.

EC150: koncentrace ukazující hodnoty RFI 150 v expresi CD86.

EC200: koncentrace ukazující hodnoty RFI 200 v expresi CD54.

Průtoková cytometrie: cytometrická technika, při níž buňky suspendované v kapalině protékají jedna po druhé přes ohnisko excitačního světla, které je rozptýleno do vzorů charakteristických pro buňky a jejich komponenty; buňky jsou často označeny fluorescenčními markery, aby bylo světlo nejprve absorbováno a poté emitováno v pozmeněných frekvencích.

Nebezpečnost: základní charakteristika látky nebo situace, která má potenciál vyvolat nepříznivé účinky, jsou-li organismus, systém nebo (sub)populace vystaveny této látce.

IATA (jednotný přístup ke zkoušení a posuzování): strukturovaný přístup používaný pro zjišťování nebezpečnosti (potenciál), charakterizaci rizik (potence) a/nebo posouzení bezpečnosti (potenciál/potence a expozice) chemické látky nebo skupiny chemických látek, jenž strategicky integruje a váží všechny důležité údaje s cílem poskytnout informace pro přijetí regulačního rozhodnutí, které se týká potenciální nebezpečnosti a/nebo rizika a/nebo potřeby dalšího cíleného, a tudíž minimálního zkoušení.

Kontrola s médiem: neošetřená replika, která obsahuje všechny složky zkušebního systému. Tento vzorek se zpracovává se vzorky zkoušené chemické látky a jinými kontrolními vzorky, aby se zjistilo, zda rozpouštědlo/vehikulum vzájemně reaguje se zkušebním systémem.

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

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

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

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

Prehapteny: chemické látky, z nichž se abiotickou transformací staly senzibilizující látky.

Prohapteny: chemické látky vyžadující enzymatickou aktivaci, aby vykazovaly potenciál senzibilizace kůže.

Relativní intenzita fluorescence (RFI): relativní hodnoty geometrického průměru intenzity fluorescence (MFI) v buňkách exponovaných chemické látce v porovnání s hodnotou MFI v buňkách exponovaných rozpouštědlem/vehikulu.

Relevantnost: popis vztahu zkoušky k účinku, který je předmětem zájmu, a také toho, zda je zkouška smysluplná a použitelná pro konkrétní účel. Vyjadřuje, do jaké míry zkouška správně měří nebo predikuje biologický účinek, který je předmětem zájmu. Relevantnost zahrnuje také posouzení přesnosti (shody) zkoušky (21).

Spolehlivost: měření rozsahu, v jakém může být zkouška časem reprodukovatelná v laboratořích a mezi laboratořemi, když se provádí s použitím stejného protokolu. Hodnotí se to výpočtem laboratorní a mezilaboratorní reprodukovatelnosti a laboratorní opakovatelnosti (21).

Provedení zkoušky: jedna či více zkoušených chemických látek se zkouší současně s kontrolou s rozpouštědlem/vehikulem a s pozitivní kontrolou.

Citlivost: podíl všech pozitivních/aktivních chemických látek, které jsou na základě zkoušky správně zatříděny. Je to měřítko přesnosti zkoušky, která dává kategorické výsledky, a je důležitým prvkem při hodnocení relevance zkoušky (21).

Barvicí pufr: fosfátový pufr obsahující 0,1 % bovinního sérového albuminu.

Kontrola s rozpouštědlem/vehikulem: neexponovaný vzorek obsahující všechny složky zkušebního systému s výjimkou zkoušené chemické látky, ale včetně rozpouštědla/vehikula, které se používá. Používá se ke stanovení účinku na pozadí u vzorků exponovaných zkoušené chemické látce, která je rozpuštěna nebo stabilně dispergována ve stejném rozpouštědle/vehikulu. Pokud se vzorek zkouší souběžnou kontrolou s médiem, ukazuje také, zda rozpouštědlo/vehikulum vzájemně reaguje se zkušebním systémem.

Specifičnost: podíl všech negativních/neaktivních chemických látek, které jsou na základě

zkušební metody správně zatříděny. Je to měřítko přesnosti zkušební metody, která dává kategorické výsledky, a je důležitým prvkem při hodnocení relevance zkušební metody (21).

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

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

Globálně harmonizovaný systém klasifikace a označování chemických látek Organizace spojených národů (GHS OSN): systém navrhuje klasifikaci chemických látek (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, dělníků, přepravníků, spotřebitelů a osob reagujících na havárie) a životního prostředí (23).

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

Validovaná zkouška: zkouška, u níž se má za to, že je dostatečně relevantní a spolehlivá pro určitý účel, a která je založena na vědecky spolehlivých zásadách. Zkouška není nikdy validovaná v absolutním smyslu, ale pouze pro určitý konkrétní účel (21).

Dodatek 1.2

LÁTKY PRO PROKÁZÁNÍ ZPŮSOBILOSTI

Dříve než začnou laboratoře běžně používat zkoušku popsanou v tomto dodatku ke zkušební metodě B.71, měly by prokázat odbornou způsobilost správným získáním předpokládané předpovědi h-CLAT u 10 vhodných látek doporučených v tabulce 1 a získáním hodnot CV75, EC150 a EC200, které spadají do příslušného referenčního rozpětí, u nejméně 8 z 10 vhodných látek. Látky pro prokázání způsobilosti byly vybrány tak, aby představovaly rozpětí účinků na nebezpečí senzibilizace kůže. Dalšími kritérii výběru bylo, aby látky byly komerčně dostupné, aby k nim byly k dispozici kvalitní referenční údaje *in vivo* a také kvalitní údaje *in vitro* získané metodou h-CLAT. Pro metodu h-CLAT jsou také k dispozici zveřejněné referenční údaje (3) (14).

Tabulka 1: Doporučené látky pro prokázání odborné způsobilosti k používání metody h-CLAT

Látky pro prokázání způsobilosti	CASRN	Skupenství	Předpověď <i>in vivo</i> ¹	CV75 Odkaz Rozsah v µg/ml ²	Výsledky h-CLAT pro CD86 (referenční rozmezí EC150 v µg/ml) ²	Výsledky h-CLAT pro CD54 (referenční rozmezí EC200 v µg/ml) ²
2,4-dinitrochlorbenzen	97-00-7	pevná látka	senzibilizující (extrémně)	2–12	pozitivní (0,5–10)	pozitivní (0,5–15)
benzen-1,4-diamin	106-50-3	pevná látka	senzibilizující (silně)	5–95	pozitivní (< 40)	negativní (> 1,5) ³
síran nikelnatý	10101-97-0	pevná látka	senzibilizující (středně silně)	30–500	pozitivní (< 100)	pozitivní (10–100)
2-mercaptbenzothiazol	149-30-4	pevná látka	senzibilizující (středně silně)	30–400	negativní (> 10) ³	pozitivní (10–140)
R(+)-limonen	5989-27-5	kapalina	senzibilizující (slabě)	> 20	negativní (> 5) ³	pozitivní (< 250)
imidazolidinyl urea	39236-46-9	pevná látka	senzibilizující (slabě)	25–100	pozitivní (20–90)	pozitivní (20–75)
propan-2-ol	67-63-0	kapalina	není senzibilizující	> 5 000	negativní (> 5 000)	negativní (> 5 000)
glycerol	56-81-5	kapalina	není senzibilizující	> 5 000	negativní (> 5 000)	negativní (> 5 000)
kyselina mléčná	50-21-5	kapalina	není senzibilizující	1 500–5 000	negativní (> 5 000)	negativní (> 5 000)
kyselina 4-aminobenzoová	150-13-0	pevná látka	není senzibilizující	> 1 000	negativní (> 1 000)	negativní (> 1 000)

Zkratky: CAS RN = registrační číslo CAS (Chemical Abstracts Service)

¹ Předpovědi nebezpečnosti (a potence) *in vivo* vycházejí z údajů ze zkoušek LLNA (3) (14). Potence *in vivo* je odvozena s použitím kritérií navržených střediskem ECETOC (24).

² Na základě dosavadních pozorovaných hodnot (13) (25).

³ Doposud byla většina negativních výsledků získána u tohoto markeru, a proto se většinou očekává negativní výsledek. Uvedené rozmezí bylo definováno na základě několika doposud pozorovaných pozitivních výsledků. V případě pozitivního výsledku by měla být hodnota EC v rámci uvedeného referenčního rozmezí.

Dodatek 2

SENZIBILIZACE KŮŽE *IN VITRO*: ZKOUŠKA AKTIVACE BUNĚČNÉ LINIE U937 (U-SENS™)

VÝCHOZÍ ÚVAHY A OMEZENÍ

1. Zkouška U-SENS™ kvantifikuje změnu exprese buněčného povrchového markeru spojenou s procesem aktivace monocytů a dendritických buněk (DC) (tj. CD86) v buněčné linii lidského histiocytického lymfomu U937 po expozici senzibilizujícími látkami (1). Naměřené úrovně exprese buněčného povrchového markeru CD86 v buněčné linii U937 se poté použijí jako podpůrný údaj pro rozlišení mezi látkami senzibilizujícími kůži a látkami, které kůži nesenzibilizují.
2. Zkouška U-SENS™ byla hodnocena ve validační studii (2) koordinované společností L'Oreal a poté podrobena odborné revizi poradního výboru (ESAC) referenční laboratoře EU pro alternativy ke zkouškám na zvířatech (EURL ECVAM) (3). S ohledem na všechny dostupné důkazy a příspěvky od regulátorů a účastníků doporučil EURL ECVAM (4) zkoušku U-SENS™ pro použití v rámci přístupu IATA na podporu rozlišování mezi látkami senzibilizujícími kůži a látkami nesenzibilizujícími kůži za účelem klasifikace nebezpečnosti a označování. OECD ve svých pokynech k předkládání zpráv o strukturovaných přístupech k integraci a individuálním zdrojům informací používaným v rámci postupu IATA pro senzibilizaci kůže v současné době rozebírá řadu případových studií popisujících různé strategie zkoušení a predikční modely. Jeden z různých definovaných přístupů vychází z analýzy U-SENS (5). Příklady využití údajů U-SENS™ v kombinaci s jinými informacemi, včetně dosavadních údajů a stávajících platných údajů o humánním použití (6), jsou uvedeny také jinde v odborné literatuře (4) (5) (7).
3. U zkoušky U-SENS™ se prokázalo, že ji lze přenést do laboratoří, které mají zkušenosti s technikami používajícími buněčné kultury a analýzou pomocí průtokové cytometrie. Míra reprodukovatelnosti předpovědí, které lze od této zkoušky očekávat, činí řádově 90 % v rámci laboratoří a 84 % mezi laboratořemi (8). Výsledky validační studie (8) a dalších zveřejněných studií (1) celkově ukazují, že přesnost při odlišení senzibilizujících látek (tj. kategorie 1 GHS OSN/CLP) od nesenzibilizujících látek činí 86 % (N=166) při citlivosti 91 % (118/129) a specifičnosti 65% (24/37) ve srovnání s výsledky zkušební metody LLNA. V porovnání s výsledky při humánním použití je přesnost při odlišení senzibilizujících látek (tj. kategorie 1 GHS OSN/CLP) od nesenzibilizujících látek 77 % (N=101) při citlivosti 100 % (58/58) a specifičnosti 47 % (20/43). V porovnání s metodou LLNA se falešně negativní předpovědi u zkoušky U-SENS™ pravděpodobněji týkají chemických látek vykazujících nízkou až střední potenci způsobovat senzibilizaci kůže

(tj. podkategorie 1B GHS OSN/CLP) než chemických látek vykazujících vysokou potenci způsobovat senzibilizaci kůže (tj. podkategorie 1A GHS OSN/CLP) (1) (8) (9). Celkově vzato tyto informace naznačují, že zkouška U-SENSTM může být užitečná a může přispět k zjištění nebezpečí senzibilizace kůže. Zde uvedené hodnoty přesnosti U-SENSTM jako samostatné zkoušky jsou však pouze orientační, neboť tato zkouška by měla být posuzována v kombinaci s jinými zdroji informací v rámci IATA a v souladu s ustanoveními odstavců 7 a 8 ve Všeobecném úvodu. Při hodnocení metod posuzování senzibilizace kůže bez použití zvířat by se dále mělo vést v patrnosti, že ani zkouška LLNA a ani jiné zkoušky na zvířatech nemusí plně odrážet situaci u lidí.

4. Na základě údajů, které jsou v současné době k dispozici, bylo prokázáno, že zkouška U-SENSTM je použitelná u zkoušených chemických látek (včetně složek kosmetických přípravků, například konzervantů, povrchově aktivních látek, účinných látek, barviv) spadajících do nejrozličnějších organických funkčních skupin, majících různé fyzikálně chemické vlastnosti, různou schopnost vyvolávat senzibilizaci kůže (podle stanovení ve studiích *in vivo*) a různé spektrum reakčních mechanismů, o nichž je známo, že souvisí se senzibilizací kůže (tj. Michaelův akceptor, vznik Schiffovy báze, agens acylového přenosu, nukleofilní bimolekulární substituce [SN₂] nebo nukleofilní aromatická substituce [S_NAr]) (1) (8) (9) (10). Metodu U-SENSTM lze použít ke zkoušení rozpustných chemických látek, které jsou rozpustné nebo které tvoří stabilní disperzi (tj. koloid nebo suspenzi, ve které se zkoušená chemická látka neusazuje ani se neodděluje od rozpouštědla/vehikula do různých fází) ve vhodném rozpouštědle/vehikulu (viz odstavec 13). Chemické látky ve skupině uvedené jako prehapteny (tj. látky aktivované oxidací) nebo prohapteny (tj. látky vyžadující enzymatickou aktivaci, například prostřednictvím enzymu P450) byly ve zkoušce U-SENSTM předpovězeny správně (1) (10). Látky narušující membránu mohou vést k falešně pozitivním výsledkům v důsledku nespecifického zvýšení exprese CD86, neboť 3 ze 7 falešně pozitivních výsledků u referenční klasifikace *in vivo* se týkaly povrchově aktivních látek (1). Proto je třeba pozitivní výsledky u povrchově aktivních látek posuzovat opatrně, zatímco negativní výsledky u povrchových látek přesto mohou být použity na podporu identifikace zkoušené chemické látky jako látky senzibilizující kůži. Zkouškou U-SENSTM (1) mohou být hodnoceny fluorescenční zkoušené chemické látky, avšak silné fluorescenční zkoušené chemické látky vyzařující na stejné vlnové délce jako fluorescein-isothiokyanát (FITC) nebo jako propidiumiodid (PI) budou narušovat detekci pomocí průtokové cytometrie, a proto nemohou být správně hodnoceny pomocí konjugovaných protilátek FITC (potenciálně falešně negativní) nebo PI (životaschopnost neměřitelná). V takovém případě mohou být použity jiné protilátky značené fluorochromem, respektive jiné markery cytotoxicity, pokud lze prokázat, že poskytují podobné výsledky jako protilátky značené FITC nebo PI (viz odstavec 18), např. zkoušením vhodných látek uvedených v dodatku 2.2. Vzhledem k výše uvedenému by se měly pozitivní výsledky u povrchově aktivních látek a negativní výsledky u silně

fluorescenčních zkoušených chemických látek interpretovat v kontextu stanovených omezení a společně s jinými zdroji informací v rámci přístupu IATA. V případech, kdy existují důkazy prokazující nepoužitelnost zkoušky U-SENS™ na jiné specifické kategorie zkoušených chemických látek, neměla by se tato metoda ke zkoušení těchto specifických kategorií používat.

5. Jak bylo popsáno výše, zkouška U-SENS™ pomáhá rozlišovat mezi látkami senzibilizujícími kůži a látkami nesenzibilizujícími kůži. Může však také potenciálně přispět k hodnocení senzibilizační potence, je-li používána v rámci integrovaných přístupů, například IATA. Pro určení toho, jak mohou výsledky U-SENS™ potenciálně přispět k posuzování potence, však bude nutný další výzkum, přednostně založený na údajích o účincích na člověka.
6. Definice jsou uvedeny v dodatku 2.1.

PODSTATA ZKOUŠKY

7. Zkouška U-SENS™ je analýza *in vitro*, která kvantifikuje změny exprese buněčného povrchového markeru CD86 na buněčné linii lidského histiocytického lymfomu, buňkách U937, po 45±3 hodinách expozice zkoušené chemické látky. Povrchový marker CD86 je jedním z typických markerů aktivace U937. O markeru CD86 je známo, že je kostimulační molekulou, která může napodobovat aktivaci monocytů, což hraje kritickou roli při primární aktivaci (primingu) T buněk. Změny exprese buněčného povrchového markeru CD86 se měří pomocí průtokové cytometrie po obarvení buněk obvykle protilátkami značenými fluorescein-isothiokyanátem (FITC). Rovněž se provádí paralelní měření cytotoxicity (např. pomocí PI), aby bylo možné posoudit, zda při sub-cytotoxických koncentracích dochází k up regulaci exprese buněčného povrchového markeru CD86. Stimulační index (S.I.) buněčného povrchového markeru CD86 v porovnání s kontrolou s rozpouštědlem/vehikulem se vypočítá a použije v predikčním modelu (viz odstavec 19) jako podpůrný údaj pro rozlišení mezi senzibilizujícími a nesenzibilizujícími látkami.

PROKÁZÁNÍ ZPŮSOBILOSTI

8. Před rutinním používáním zkoušky popsané v tomto dodatku ke zkušební metodě B.71 by měly laboratoře prokázat odbornou způsobilost použitím 10 látek pro prokazování způsobilosti, které jsou uvedeny v dodatku 2.2, a to v souladu s osvědčenými postupy pro metody *in vitro* (11). Uživatelé zkoušky by si také měli vést historickou databázi údajů pocházejících ze zkoušek reaktivity (viz odstavec 11) a z pozitivních kontrol a kontrol s rozpouštědlem/vehikulem (viz odstavce 15–16) a používat tato data k potvrzení, že v jejich laboratoři je udržována reprodukovatelnost zkoušky v čase.

POSTUP

9. Tato zkouška je založena na protokolu databázové služby pro alternativní metody k pokusům na zvířatech (DB-ALM) č. 183 (12) pro U-SENSTM. Při zavádění a používání zkoušky U-SENSTM v laboratoři by měly být využívány standardní pracovní postupy. Na provádění zkoušky U-SENSTM může být využit automatizovaný systém, pokud lze prokázat, například otestováním vhodných látek uvedených v dodatku 2.2, že poskytuje podobné výsledky. Dále je uveden popis hlavních složek a postupů zkoušky U-SENSTM.

Příprava buněk

10. Zkouška U-SENSTM se používá s buněčnou linií lidského histiocytického lymfomu U937 (13). Buňky (klon CRL1593.2) by měly být pořízeny z kvalifikované buněčné banky, jako je například Americká sbírka typových kultur.
11. Buňky U937 se kultivují při teplotě 37 °C ve zvlhčené atmosféře s 5 % CO₂ v médiu RPMI-1640 doplněném 10 % fetálního telecího séra (FCS), 2 mM L-glutaminu, 100 jednotkami/ml penicilinu a 100 µg/ml streptomycinu (kompletní médium). Buňky U937 se rutinně pasážují každé 2–3 dny v hustotě 1,5, respektive 3×10^5 buněk/ml. Hustota buněk by neměla přesahovat 2×10^6 buněk/ml a životaschopnost buněk měřená vyloučením trypanové modři by měla být ≥ 90 % (nepoužije se při první pasáži po rozmrazení). Než se použijí pro zkoušení, je třeba provedením kontroly reaktivity zjistit, zda jsou všechny šarže buněk, FCS nebo protilátek vhodné. Kontrola reaktivity buněk se provádí pomocí pozitivní kontroly, kyseliny picrylsulfonové (kyselina 2,4,6-trinitrobenzensulfonová: TNBS) (CASRN 2508-19-2, čistota ≥ 99 %) a negativní kontrola pomocí kyseliny mléčné (LA) (CASRN 50-21-5, čistota ≥ 85 %), alespoň jeden týden po rozmrazení. Při kontrole reaktivity je třeba pro každou ze dvou kontrol otestovat šest konečných koncentrací (TNBS: 1, 12,5, 25, 50, 75, 100 µg/ml a LA: 1, 10, 20, 50, 100, 200 µg/ml). TNBS rozpuštěná v kompletním médiu by měla dát pozitivní a na koncentraci závislou odpověď CD86 (např. když po pozitivní koncentraci, stimulační index CD86 ≥ 150 , následuje koncentrace s rostoucím stimulačním indexem CD86) a LA rozpuštěná v kompletním médiu by měla dát negativní odpověď CD86 (viz odstavec 21). Pro analýzu se používají pouze šarže buněk, které dvakrát prošly kontrolou reaktivity. Buňky mohou být množeny až sedm týdnů po rozmrazení. Počet pasáží by neměl překročit 21. Kontrola reaktivity se provádí podle postupů popsanych v odstavcích 18–22.
12. Pro zkoušení se buňky U937 nasadí v hustotě 3×10^5 buněk/ml nebo 6×10^5 buněk/ml a předběžně se kultivují v kultivačních baňkách po dobu 2 dnů, respektive 1 dne. Mohou být použity jiné podmínky předběžné kultivace, než je uvedeno výše, pokud je uvedeno dostatečné vědecké zdůvodnění a lze prokázat, například otestováním vhodných látek uvedených v dodatku 2.2, že poskytují podobné výsledky. V den zkoušky se buňky získané

z kultivační baňky resuspendují v čerstvém kultivačním médiu při hustotě 5×10^5 buněk/ml. Poté se buňky rozdělí do 96jamkové destičky s plochým dnem s 100 μ l (konečná hustota buněk $0,5 \times 10^5$ buněk/jamku).

Příprava zkoušených chemických látek a kontrolních látek

13. Před zkoušením se provede posouzení rozpustnosti. Za tímto účelem se zkoušené chemické látky rozpustí nebo stabilně dispergují při koncentraci 50 mg/ml v kompletním médiu jako rozpouštědlo první volby nebo v dimethylsulfoxidu (DMSO, čistota $\geq 99\%$) jako v rozpouštědlo druhé volby, jestliže zkoušená chemická látka není rozpustná v kompletním médiu jako rozpouštědlo/vehikulu. Pro zkoušení se zkoušená chemická látka rozpustí na konečnou koncentraci 0,4 mg/ml v kompletním médiu, jestliže je chemická látka rozpustná v tomto rozpouštědlo/vehikulu. Pokud je chemická látka rozpustná pouze v DMSO, rozpustí se na koncentraci 50 mg/ml. Jestliže je podáno dostatečné vědecké zdůvodnění, mohou být použita jiná rozpouštědla/vehikula než výše uvedená. Je třeba vzít v úvahu stabilitu zkoušené chemické látky ve finálním rozpouštědlo/vehikulu.
14. Zkoušené chemické látky a kontrolní látky se připraví v den zkoušení. Protože se neprovádí analýza ke stanovení dávky, při prvním provedení zkoušky se testuje 6 konečných koncentrací (1, 10, 20, 50, 100 a 200 μ g/ml) v odpovídajícím rozpouštědlo/vehikulu, a to buď v kompletním médiu, nebo v 0,4% DMSO v médiu. Pro další provedení zkoušky, od 0,4 mg/ml v kompletním médiu nebo od 50 mg/ml v DMSO, se s použitím odpovídajícího rozpouštědla/vehikula připraví alespoň 4 pracovní roztoky zkoušených chemických látek (tj. alespoň 4 koncentrace). Nakonec se pracovní roztoky použijí pro expozici přidáním stejného objemu buněčné suspenze U937 (viz odstavec 11 výše) do objemu pracovního roztoku na destičce, čímž se dosáhne dalšího dvojnásobného ředění (12). Koncentrace (alespoň 4 koncentrace) pro případné další provedení zkoušky se zvolí na základě jednotlivých výsledků všech předchozích provedení zkoušky (8). Použitelné konečné koncentrace jsou 1, 2, 3, 4, 5, 7.5, 10, 12.5, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180 a 200 μ g/ml. Maximální konečná koncentrace je 200 μ g/ml. V případě, že je pozorována pozitivní hodnota CD86 při 1 μ g/ml, hodnotí se 0,1 μ g/ml, aby byla zjištěna koncentrace zkoušené chemické látky, která nevyvolává CD86 nad pozitivní prahovou hodnotu. Pro každé provedení zkoušky se vypočítá EC150 (koncentrace, při níž chemická látka dosáhne 150 % pozitivní prahové hodnoty CD86, viz odstavec 19), jestliže je pozorována odpověď na pozitivní koncentraci CD86. Pokud zkoušená chemická látka indukuje pozitivní odpověď CD86, která nezávisí na koncentraci, nemusí být výpočet EC150 relevantní, jak je uvedeno v protokolu ke zkušební metodě U-SENS™ DB-ALM č. 183 (12). Pro každé provedení zkoušky se vypočítá CV70 (koncentrace, při níž chemická látka dosáhne 70 % prahové hodnoty cytotoxicity, viz odstavec 19) (12). Pro zkoumání účinku nárůstu koncentrace na odpověď CD86 se zvolí

jakékoli koncentrace z použitelných koncentrací rovnoměrně rozdělené mezi EC150 (neboli nejvyšší negativní necytotoxickou koncentraci CD86) a CV70 (neboli nejvyšší povolenou koncentraci tj. 200 µg/ml). Zkouší se minimálně 4 koncentrace v každém provedení zkoušky, přičemž alespoň 2 koncentrace jsou společné s předchozím provedením (provedeními) zkoušky, a to za účelem porovnání.

15. Jako kontrola s rozpouštědlem/vehikulem se u zkoušky U-SENS™ používá kompletní médium (pro zkoušené chemické látky rozpustné nebo stabilně dispergované) (viz odstavec 4) nebo 0,4% DMSO v kompletním médiu (pro zkoušené chemické látky rozpustné nebo stabilně dispergované v DMSO).
16. Pozitivní kontrolou používanou u zkoušky U-SENS™ je TNBS (viz odstavec 11) připravený v kompletním médiu. Jako pozitivní kontrola pro měření exprese CD86 se používá TNBS v jedné konečné koncentraci na destičce (50 µg/ml), což dává > 70% životaschopnost buněk. Pro získání koncentrace TNBS na destičce 50 µg/ml se připraví 1 M (tj. 293 mg/ml) zásobního roztoku TNBS v kompletním médiu, který se dále naředí 2930násobně s kompletním médiem na 100 µg/ml pracovního roztoku. Jako negativní kontrola se používá kyselina mléčná (LA, CAS 50-21-5) v koncentraci 200 µg/ml rozpuštěná v kompletním médiu (ze zásobního roztoku 0,4 mg/ml). Na každé destičce se při každém provedení zkoušky připraví tři replikáty neexponované kontroly v kompletním médiu, kontroly s rozpouštědlem/vehikulem, negativní kontroly a pozitivní kontroly (12). Lze použít i jiné vhodné pozitivní kontroly, pokud jsou k dispozici dosavadní údaje umožňující odvodit srovnatelná kritéria přijatelnosti daného provedení zkoušky. Kritéria přijatelnosti provedení zkoušky jsou stejná jako u zkoušené chemické látky (odstavec 12).

Aplikace zkoušených chemických látek a kontrolních látek

17. Kontrola s rozpouštědlem / vehikulem nebo pracovní roztoky popsané v odstavcích 14–16 se smíchají 1 : 1 (obj.) s buněčnými suspenzemi připravenými ve 96jamkové destičce s plochým dnem (viz odstavec 12). Exponované destičky se poté inkubují po dobu 45±3 hodin při teplotě 37 °C za přítomnosti 5% CO₂. Před inkubací se destičky zapečetí polopropustnou membránou, aby nedošlo k odpaření těkavých zkoušených chemických látek a křížové kontaminaci mezi buňkami exponovanými zkoušeným chemickým látkám (12).

Barvení buněk

18. Po 45 ± 3 hodinách expozice se buňky přenesou na mikrotitrační destičku s kónickým dnem a odeberou se odstředěním. Narušení rozpustnosti je definováno jako krystaly nebo kapky pozorované pod mikroskopem 45 ± 3 hodiny po expozici (před obarvením buněk). Supernatanty se zlikvidují a zbývající buňky se jednou promyjí se 100 µl ledově studeného fosfátového pufru (PBS) obsahujícího 5 % fetálního telecího séra (barvicí pufr). Po

odstředění se buňky resuspendují se 100 µl barvicího pufru a barví se 5 µl (např. 0,25 µg) protilátek anti-CD86 nebo myšího IgG1 (izotyp) značených FITC při 4 °C po dobu 30 minut chráněny před světlem. Použijí se protilátky uvedené v protokolu ke zkušební metodě U-SENS™ DB-ALM č. 183 (12) (pro CD86: BD-PharMingen #555657 klon: Fun-1, nebo Caltag/Invitrogen # MHCD8601 klon: BU63; a pro IgG1: BD-PharMingen #555748, nebo Caltag/Invitrogen # GM4992). Podle zkušeností vývojářů zkoušek je intenzita fluorescence protilátek obvykle u různých šarží konzistentní. Pro analýzu mohou být použity jiné klony nebo protilátky od jiných dodavatelů, které prošly kontrolou reaktivity (viz odstavec 11). Uživatelé však mohou zvážit titraci protilátek v podmínkách své vlastní laboratoře, a definovat si tak nejlepší koncentrace pro použití. Může být použit jiný detekční systém, např. protilátky anti-CD86 značené fluorochromem, pokud lze prokázat, například otestováním vhodných látek uvedených v dodatku 2.2, že dávají podobné výsledky jako konjugované protilátky značené FITC. Po dvojím promytí 100 µl barvicího pufru a jednom promytí 100 µl ledově studeného PBS se buňky resuspendují v ledově studeném PBS (např. 125 µl pro vzorky analyzované ručně zkumavku po zkumavce nebo 50 µl s použitím automatické vzorkovací destičky) a přidá se roztok PI (konečná koncentrace 3 µg/ml). Mohou být použity jiné markery cytotoxicity, jako je 7-aminoaktinomycin D (7-AAD) nebo trypanová modř, pokud lze prokázat, například otestováním vhodných látek uvedených v dodatku 2.2, že alternativní barviva dávají podobné výsledky jako PI.

Analýza pomocí průtokové cytometrie

19. Úroveň exprese CD86 a životaschopnost buněk se analyzuje pomocí průtokové cytometrie. Buňky jsou zobrazeny na dot plot histogramu vyjadřujícím velikost (FSC) a granularitu (SSC) nastaveném na logaritmickou stupnici, aby byla jasně identifikována populace v první oblasti R1 a eliminovány zbytky. Pro každou jamku se připraví cílový počet celkem 10 000 buněk v oblasti R1. Buňky ze stejné oblasti R1 se zobrazí na dot plot diagramu FL3 nebo FL4 / SSC. Životaschopné buňky se vykreslí umístěním druhé oblasti R2 selektující populaci propidiumiodid negativních buněk (kanál FL3 nebo FL4). Životaschopnost buněk lze vypočítat podle následující rovnice programem cytometrické analýzy. Když je životaschopnost buněk nízká, lze připravit až 20 000 buněk včetně odumřelých. Alternativně lze získat údaje za jednu minutu po zahájení analýzy.

$$\text{Životaschopnost buněk} = \frac{\text{Počet živých buněk}}{\text{Celkový počet požadovaných buněk}} \times 100$$

Poté se změří procento FL1 pozitivních buněk z těchto životaschopných buněk gateovaných na R2 (v oblasti R1). Expres CD86 na buněčném povrchu se analyzuje na dot plot histogramu FL1 / SSC gatovaném na životaschopných buňkách (R2).

U jamek s kompletním médiem / IgG1 se marker analýzy stanoví v blízkosti hlavní

populace, aby měly kontroly s kompletním médiem IgG1 v cílové zóně 0,6 až 0,9 %.

Barevná interference se definuje jako posun IgG1 značeného FITC na dot plot diagramu (geometrický průměr stimulačního indexu IgG1 FL1 ≥ 150 %).

Stimulační index (S.I.) CD86 pro kontrolní buňky (neexponované nebo v 0,4% DMSO) a buňky exponované chemické látce se vypočítá podle této rovnice:

$$S.I. = \frac{\% CD86^{+} \text{exponovaných buněk} - \% IgG1^{+} \text{exponovaných buněk}}{\% CD86^{+} \text{kontrolních buněk} - \% IgG1^{+} \text{kontrolních buněk}} \times 100$$

% IgG1⁺ neexponovaných kontrolních buněk: uvedené jako procento FL1 pozitivních buněk IgG1 definovaných pomocí markeru analýzy (přijatelné rozmezí $\geq 0,6$ % a $< 1,5$ %, viz odstavec 22) z životaschopných neexponovaných buněk.

% IgG1⁺/CD86⁺ kontrolních/exponovaných buněk: uvedené jako procento FL1 pozitivních buněk IgG1/CD86 měřeno bez pohybu markeru analýzy z životaschopných kontrolních/exponovaných buněk.

ÚDAJE A PŘEDKLÁDÁNÍ ZPRÁV

Vyhodnocení údajů

20. Ve zkoušce U-SENSTM se vypočítávají tyto parametry: hodnota CV70, tj. koncentrace vykazující 70% přežití buněk U937 (30% cytotoxicita) a hodnota EC150, tj. koncentrace, při níž zkoušené chemické látky indukovaly stimulační index (S.I.) CD86 150 %.

CV70 se vypočítá log-lineární interpolací podle této rovnice:

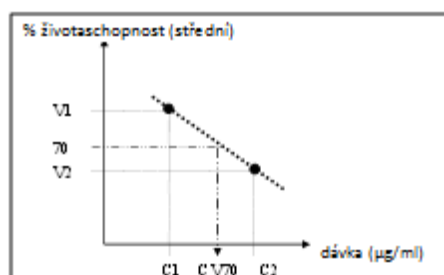
$$CV70 = C1 + [(V1 - 70) / (V1 - V2) * (C2 - C1)]$$

kde:

V1 je minimální hodnota životaschopnosti buněk nad 70 %

V2 je maximální hodnota životaschopnosti buněk pod 70 %

C1 a C2 jsou koncentrace ukazující hodnotu životaschopnosti buněk V1, respektive V2.



Lze použít i jiné způsoby odvození hodnoty CV70, pokud je prokázáno, že to nemá vliv na výsledky (např. otestováním vhodných látek uvedených).

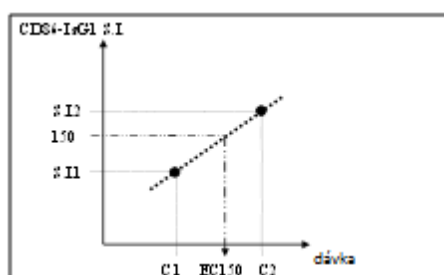
EC150 se vypočítá log-lineární interpolací podle této rovnice:

$$EC150 = C1 + [(150 - S.I.1) / (S.I.2 - S.I.1) * (C2 - C1)]$$

kde:

C1 je nejvyšší koncentrace v $\mu\text{g/ml}$ se stimulačním indexem $CD86 < 150 \%$ (S.I. 1)

C2 je nejnižší koncentrace v $\mu\text{g/ml}$ se stimulačním indexem $CD86 > 150 \%$ (S.I. 2).



Hodnoty EC150 a CV70 se vypočítají

- pro každé provedení zkoušky: jednotlivé hodnoty EC150 a CV70 se použijí jako nástroj pro zkoumání účinku nárůstu koncentrace na odpověď CD86 (viz odstavec 14),
- na základě průměrné životaschopnosti se stanoví celková hodnota CV70 (12),
- na základě průměrné dávky ($\mu\text{g/ml}$) : stimulačního indexu CD86 se stanoví celková hodnota EC150 pro zkoušenou chemickou látku predikovanou při použití metody U-SENSTM jako POZITIVNÍ (viz odstavec 21) (12).

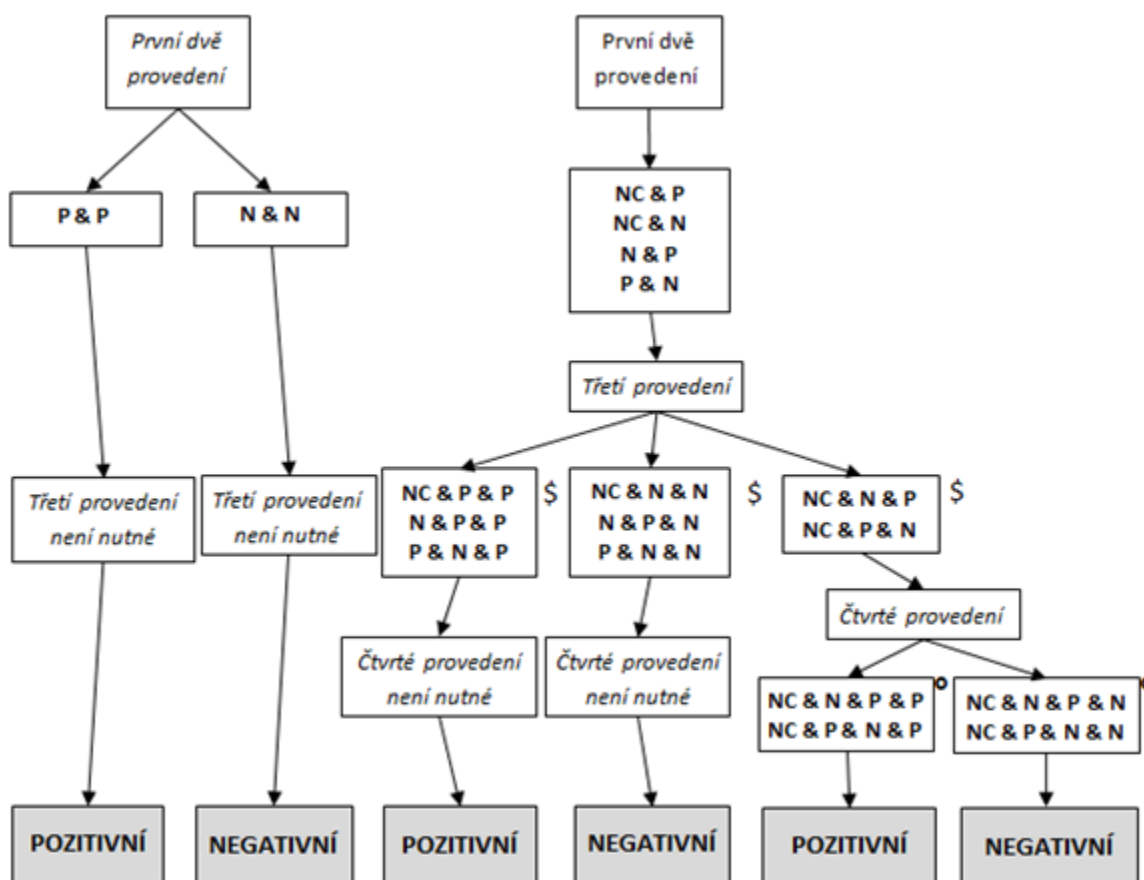
Predikční model

21. Pro měření exprese CD86 se každá zkoušená chemická látka otestuje alespoň ve čtyřech nezávislých provedeních zkoušky (v různé dny), z nichž se odvodí jedna předpověď (NEGATIVNÍ nebo POZITIVNÍ).
 - Jednotlivé provedení zkoušky U-SENSTM se považuje za negativní (dále jen N), jestliže je stimulační index CD86 menší než 150 % při všech necytotoxických koncentracích (životaschopnost buněk $\geq 70 \%$) a jestliže není pozorována žádná interference (cytotoxicita, rozpustnost: viz odstavec 18 nebo barva: viz odstavec 19 bez ohledu na necytotoxické koncentrace, při nichž byla detekována interference). Ve všech ostatních

případech: stimulační index CD86 vyšší než nebo rovný 150 % a pozorovány interference, je jednotlivé provedení zkoušky U-SENS™ považováno za pozitivní (dále jen P).

- Predikce na základě zkoušky U-SENS™ je považována za NEGATIVNÍ, jestliže jsou negativní (N) alespoň dvě nezávislá provedení zkoušky (obrázek 1). Pokud jsou první dvě provedení zkoušky negativní (N), považuje se předpověď získaná zkouškou U-SENS™ za NEGATIVNÍ a třetí provedení zkoušky není nutné.
- Predikce na základě zkoušky U-SENS™ je považována za POZITIVNÍ, jestliže jsou pozitivní (P) alespoň dvě nezávislá provedení zkoušky (obrázek 1). Pokud jsou první dvě provedení zkoušky pozitivní (P), považuje se předpověď získaná zkouškou U-SENS™ za POZITIVNÍ a třetí provedení zkoušky není nutné.
- Protože se neprovádí analýza ke stanovení dávky, je zde výjimka, pokud je při prvním provedení zkoušky stimulační index CD86 vyšší než nebo rovný 150 % pouze při nejvyšší necytotoxické koncentraci. Toto provedení zkoušky se poté považuje za NEPRŮKAZNÉ (NC) a v dalších provedeních je třeba testovat další koncentrace (mezi nejvyšší necytotoxickou koncentrací a nejnižší cytotoxickou koncentrací – viz odstavec 20). Pokud je provedení zkoušky určeno jako NC, je třeba provést alespoň 2 další zkoušky a v případě, že druhá a třetí zkouška nesouhlasí (N a/nebo P nezávisle), provádí se čtvrtá zkouška (obrázek 1). Další zkoušky budou považovány za pozitivní i v případě, že CD86 vyjde 150 % nebo vyšší pouze u jedné necytotoxické koncentrace, neboť nastavení koncentrace bylo pro tuto konkrétní zkoušenou chemickou látku upraveno. Konečná predikce bude vycházet z většinového výsledku tří nebo čtyř jednotlivých provedení zkoušky (tj. 2 ze 3 nebo 2 ze 4) (obrázek 1).

Obrázek 1: Predikční model používaný při zkoušce U-SENS™. Předpověď U-SENS™ by měla být hodnocena v rámci přístupu IATA a v souladu s ustanoveními odstavce 4 a odstavců 7, 8 a 9 Obecného úvodu.



N: Provedení zkoušky bez pozitivního výsledku CD86 a bez pozorované interference;

P: Provedení zkoušky s pozitivním výsledkem CD86 a/nebo s pozorovanou interferencí (interferencemi);

NC: Neprůkazný výsledek. První provedení s neprůkazným výsledkem, když je CD86 pozitivní pouze při nejvyšší necytotoxické koncentraci;

#: Neprůkazný (NC) jednotlivý výsledek zjištěný pouze při prvním provedení zkoušky vede automaticky k nutnosti třetího provedení zkoušky, aby byla dosažena většina pozitivních (P) nebo negativních (N) výsledků při alespoň 2 ze 3 nezávislých provedení zkoušky.

\$: Rámečky ukazují relevantní kombinace výsledků ze tří provedení zkoušky na základě výsledků získaných v prvních dvou provedeníh zkoušky znázorněných v rámečku výše.

°: Rámečky ukazují relevantní kombinace výsledků ze čtyř provedení zkoušky na základě výsledků získaných v prvních třech provedeníh zkoušky znázorněných v rámečku výše.

Kritéria přijatelnosti

22. Při používání zkoušky U-SENS™ by měla být splněna tato kritéria přijatelnosti (12).

- Na konci expozice v délce 45 ± 3 hodin musí být střední životaschopnost trojích neexponovaných buněk U937 $> 90 \%$ a nesmí být pozorován žádný posun exprese CD86. Bazální exprese CD86 neexponovaných buněk U937 musí být v rozmezí $\geq 2 \%$ a $\leq 25 \%$.

- Když je jako rozpouštědlo použit DMSO, posuzuje se platnost kontroly s vehikulem DMSO pomocí výpočtu stimulačního indexu DMSO v porovnání s neexponovanými buňkami, přičemž střední životaschopnost trojích buněk musí být $> 90 \%$. Kontrola s vehikulem je platná, když je střední hodnota trojího stimulačního indexu CD86 menší než 250% střední hodnoty trojího stimulačního indexu CD86 neexponovaných buněk U937.
- Provedení zkoušky se považují za platná, jestliže alespoň dvě ze tří hodnot IgG1 neexponovaných buněk U937 spadají do rozmezí $\geq 0,6 \%$ a $< 1,5 \%$.
- Souběžně prováděná negativní kontrola (kyselina mléčná) se považuje za platnou, jestliže alespoň dva ze tří replikátů byly negativní (CD86 S.I. $< 150 \%$) a necytotoxické (životaschopnost buněk $\geq 70 \%$).
- Pozitivní kontrola (TNBS) se považuje za platnou, jestliže alespoň dva ze tří replikátů byly pozitivní (CD86 S.I. $\geq 150 \%$) a necytotoxické (životaschopnost buněk $\geq 70 \%$).

Závěrečná zpráva

23. Závěrečná zpráva by měla obsahovat tyto informace.

Zkoušená chemická látka

Jednosložková látka:

- chemická identifikace, např. název (názvy) IUPAC nebo CAS, číslo (čísla) CAS, kód SMILES nebo InChI, strukturní vzorec a/nebo jiné identifikátory,
- fyzický vzhled, úplná rozpustnost v médiu, rozpustnost v DMSO, molekulová hmotnost a další důležité fyzikálně-chemické vlastnosti, v rozsahu, v jakém jsou tyto informace dostupné,
- čistota, případně chemická identita nečistot, je-li to prakticky proveditelné atd.,
- případné ošetření před zkoušením (např. zahřívání, mletí),
- zkušební koncentrace,
- podmínky skladování a stabilita, v rozsahu, v jakém jsou tyto informace dostupné,
- zdůvodnění volby rozpouštědla/vehikula pro každou zkoušenou chemickou látku.

Vícesložková látka, UVCB a směs:

- charakterizovaná v co možná největší míře např. chemickou identitou (viz výše), čistotou, kvantitativním výskytem a důležitými fyzikálně-chemickými vlastnostmi (viz výše) složek, v rozsahu, v jakém jsou tyto informace dostupné,

- fyzický vzhled, rozpustnost v kompletním médiu, rozpustnost v DMSO, a další důležité fyzikálně-chemické vlastnosti, v rozsahu, v jakém jsou tyto informace dostupné,
- molekulová hmotnost nebo zdánlivá molekulová hmotnost v případě směsí/polymerů se známým složením nebo jiné informace důležité pro provedení studie;
- případné ošetření před zkoušením (např. zahřívání, mletí),
- zkušební koncentrace,
- podmínky skladování a stabilita, v rozsahu, v jakém jsou tyto informace dostupné,
- zdůvodnění volby rozpouštědla/vehikula pro každou zkoušenou chemickou látku.

Kontroly

Pozitivní kontrola:

- chemická identifikace, např. název (názvy) IUPAC nebo CAS, číslo (čísla) CAS, kód SMILES nebo InChI, strukturní vzorec a/nebo jiné identifikátory,
- fyzický vzhled, rozpustnost v DMSO, molekulová hmotnost a další důležité fyzikálně-chemické vlastnosti, v rozsahu, v jakém jsou tyto informace dostupné,
- čistota, případně chemická identita nečistot, je-li to prakticky proveditelné atd.,
- případné ošetření před zkoušením (např. zahřívání, mletí),
- zkušební koncentrace,
- podmínky skladování a stabilita, v rozsahu, v jakém jsou tyto informace dostupné,
- odkaz na případné dosavadní výsledky pozitivních kontrol prokazující vhodnost kritérií přijatelnosti provedení.

Negativní kontrola a kontrola rozpouštědlem/vehikulem:

- chemická identifikace, např. název (názvy) IUPAC nebo CAS, číslo (čísla) CAS, kód SMILES nebo InChI, strukturní vzorec a/nebo jiné identifikátory,
- čistota, případně chemická identita nečistot, je-li to prakticky proveditelné atd.,
- fyzický vzhled, molekulová hmotnost a další důležité fyzikálně-chemické vlastnosti v případě použití jiného rozpouštědla/vehikula než rozpouštědel/vehikul uvedených v tomto pokynu, a to v rozsahu, v jakém jsou tyto informace dostupné,
- podmínky skladování a stabilita v rozsahu, v jakém jsou tyto informace dostupné,
- zdůvodnění volby rozpouštědla/vehikula pro každou zkoušenou chemickou látku.

Zkušební podmínky

- jméno a adresa zadavatele, zkušebního zařízení a vedoucího studie,
- popis použité zkoušky,
- použité buněčné linie, podmínky skladování a zdroj (např. zařízení, z něhož byly získány),
- použitá průtoková cytometrie (např. model), včetně nastavení přístrojů, použitého globulinu a markeru cytotoxicity,
- postup použitý pro prokázání způsobilosti laboratoře k provádění této zkoušky zkoušením vhodných látek a postup použitý pro prokázání reprodukovatelného provedení zkoušky v čase, např. dosavadní kontrolní údaje anebo dosavadní údaje o kontrolách reaktivity.

Kritéria přijatelnosti zkoušky

- životaschopnost buněk a hodnoty stimulačního indexu CD86 získané z kontroly s rozpouštědlem/vehikulem v porovnání s rozsahy přijatelnosti,
- životaschopnost buněk a hodnoty stimulačního indexu získané z pozitivní kontroly v porovnání s rozsahy přijatelnosti,
- životaschopnost buněk všech testovaných koncentrací zkoušené chemické látky.

Zkušební postup

- počet provedení zkoušky,
- koncentrace zkoušených chemických látek, použité doby aplikace a expozice (pokud se liší od doporučených),
- doba expozice,
- popis použitých hodnotících kritérií a kritérií rozhodování,
- popis jakýchkoli změn zkušebního postupu.

Výsledky

- údaje ve formě tabulky, včetně CV70 (v relevantních případech), stimulačního indexu, hodnot životaschopnosti buněk, hodnot EC150 (v relevantních případech) získaných pro zkoušenou chemickou látku a pro pozitivní kontrolu při každém provedení zkoušky a uvedení klasifikace zkoušené chemické látky podle predikčního modelu,
- případně popis jakýchkoli jiných důležitých zjištění z pozorování.

Diskuse o výsledcích

- diskuse o výsledcích získaných za pomoci zkoušky U-SENS™,
- diskuse o výsledcích zkoušky v rámci IATA, jsou-li k dispozici jiné příslušné informace.

Závěry

LITERATURA

- (1) Piroird, C., Ovigne, J.M., Rousset, F., Martinozzi-Teissier, S., Gomes, C., Cotovio, J., Alépée, N. (2015). The Myeloid U937 Skin Sensitization Test (U-SENS) addresses the activation of dendritic cell event in the adverse outcome pathway for skin sensitization. *Toxicol. Chem. In Vitro* 29, 901-916.
- (2) EURL ECVAM (2017). The U-SENS™ test method Validation Study Report. Dostupné na: http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/eurl-ecvam/eurl-ecvam-recommendations
- (3) EC EURL-ECVAM (2016). ESAC Opinion No 2016-03 on the L'Oréal-coordinated study on the transferability and reliability of the U-SENS™ test method for skin sensitisation testing. EUR 28178 EN; doi 10.2787/815737. Dostupné na: <http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC103705>].
- (4) EC EURL-ECVAM (2017). EURL ECVAM Recommendation on the use of non-animal approaches for skin sensitisation testing. EUR 28553 EN; doi 10.2760/588955. Dostupné na: <https://ec.europa.eu/jrc/en/publication/eurl-scientific-and-technical-research-reports/eurl-ecvam-recommendation-use-non-animal-approaches-skin-sensitisation-testing>.
- (5) Steiling, W. (2016). Safety Evaluation of Cosmetic Ingredients Regarding their Skin Sensitization Potential. doi:10.3390/cosmetics3020014. *Cosmetics* 3, 14.
- (6) OECD (2016). Guidance Document on The Reporting of Defined Approaches and Individual Information Sources to be Used Within Integrated Approaches to Testing and Assessment (IATA) For Skin Sensitisation, Series on Testing & Assessment No 256, ENV/JM/MONO(2016)29. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Dostupné na webových stránkách: [<http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm>.
- (7) Urbisch, D., Mehling, A., Guth, K., Ramirez, T., Honarvar, N., Kolle, S., Landsiedel, R., Jaworska, J., Kern, P.S., Gerberick, F., Natsch, A., Emter, R., Ashikaga, T., Miyazawa, M., Sakaguchi, H. (2015). Assessing skin sensitization hazard in mice and men using non-animal test methods. *Regul. Toxicol. Chem. Acute Exposure of the Neonatal Rat to Triethyltin Results in Persistent Changes in Neurotypic and Gliotypic Proteins*. 71, 337-351.

- (8) Alépée, N., Piroird, C., Aujoulat, M., Dreyfuss, S., Hoffmann, S., Hohenstein, A., Meloni, M., Nardelli, L., Gerbeix, C., Cotovio, J. (2015). Prospective multicentre study of the U-SENS test method for skin sensitization testing. *Toxicol In Vitro* 30, 373-382.
- (9) Reisinger, K., Hoffmann, S., Alépée, N., Ashikaga, T., Barroso, J., Elcombe, C., Gellatly, N., Galbiati, V., Gibbs, S., Groux, H., Hibatallah, J., Keller, D., Kern, P., Klaric, M., Kolle, S., Kuehn, J., Lambrechts, N., Lindstedt, M., Millet, M., Martinozzi-Teissier, S., Natsch, A., Petersohn, D., Pike, I., Sakaguchi, H., Schepky, A., Tailhardat, M., Templier, M., van Vliet, E., Maxwell, G. (2014). Systematic evaluation of non-animal test methods for skin sensitisation safety assessment. *Toxicol. In Vitro* 29, 259-270.
- (10) Fabian, E., Vogel, D., Blatz, V., Ramirez, T., Kolle, S., Eltze, T., van Ravenzwaay, B., Oesch, F., Landsiedel, R. (2013). Xenobiotic metabolizing enzyme activities in cells used for testing skin sensitization *in vitro*. *Arch. Toxicol.* 87, 1683-1696.
- (11) OECD. (2018). Draft Guidance document: Good *In Vitro* Method Practices (GIVIMP) for the Development and Implementation of *In Vitro* Methods for Regulatory Use in Human Safety Assessment. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Dostupné na webových stránkách: [http://www.oecd.org/env/ehs/testing/OECD Final Draft GIVIMP.pdf](http://www.oecd.org/env/ehs/testing/OECD%20Final%20Draft%20GIVIMP.pdf).
- (12) DB-ALM (2016). Protocol no 183: Myeloid U937 Skin Sensitization Test (U-SENS™), 33pp. Dostupné na: [http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/].
- (13) Sundström, C., Nilsson, K. (1976). Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937). *Int. J. Cancer* 17, 565-577.
- (14) OECD (2005). Series on Testing and Assessment No. 34: Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Dostupné na webových stránkách: <http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm>.
- (15) United Nations UN (2015). Globálně harmonizovaný systém klasifikace a označování chemických látek (GHC). ST/SG/AC.10/30/Rev.6, Sixth Revised Edition, New York & Geneva: United Nations Publications. Dostupné na: http://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev06/English/ST-SG-AC10-30-Rev6e.pdf.
- (16) OECD (2012). Series on Testing and Assessment No 168: The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to

Proteins. Part 1: Series on Testing and Assessment No. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Dostupné na webových stránkách: <http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm>.

- (17) ECETOC (2003). Technical Report No 87: Contact sensitization: Classification according to potency. European Centre for Ecotoxicology & Toxicology of Chemicals, Brussels. Dostupné na: https://ftp.cdc.gov/pub/Documents/OEL/06.%20Dotson/References/ECETOC_2003-TR87.pdf.

Dodatek 2.1**DEFINICE**

Přesnost: přesnost shody mezi výsledky zkoušky a přijatými referenčními hodnotami. Je to míra funkčnosti zkoušky a jeden z aspektů její relevantnosti. Tento výraz se často používá namísto výrazu soulad a rozumí se jím podíl správných výsledků zkoušky (14).

AOP (mechanismy nežádoucích účinků): sled událostí od chemické struktury cílové chemické látky nebo skupiny podobných chemických látek přes molekulární iniciační událost po účinek *in vivo*, který je předmětem zájmu (15).

Odpověď na koncentraci CD86: k závislosti na koncentraci (neboli odpovědi na koncentraci) dochází, když po pozitivní koncentraci ($\text{CD86 S.I.} \geq 150$) následuje koncentrace se zvyšujícím se stimulačním indexem CD86.

Chemická látka: látka nebo směs.

CV70: odhad koncentrace ukazující 70% životaschopnost buněk.

Posun: posun je definován tak, že i) korigovaná hodnota % CD86^+ neexponovaného kontrolního replikátu 3 je menší než 50 % střední hodnoty korigované hodnoty % CD86^+ neexponovaných kontrolních replikátů 1 a 2 a ii) korigovaná hodnota % CD86^+ negativního kontrolního replikátu 3 je menší než 50 % střední hodnoty korigované hodnoty % CD86^+ negativních kontrolních replikátů 1 a 2.

EC150: odhad koncentrací vykazujících 150% stimulační index exprese CD86.

Průtoková cytometrie: cytometrická technika, při níž buňky suspendované v kapalině protékají jedna po druhé přes ohnisko excitačního světla, které je rozptýleno do vzorů charakteristických pro buňky a jejich komponenty; buňky jsou často označeny fluorescenčními markery, aby bylo světlo nejprve absorbováno a poté emitováno v pozmeněných frekvencích.

Nebezpečnost: základní charakteristika látky nebo situace, která má potenciál vyvolat nepříznivé účinky, jsou-li organismus, systém nebo (sub)populace vystaveny této látce.

IATA (jednotný přístup ke zkoušení a posuzování): strukturovaný přístup používaný pro zjišťování nebezpečnosti (potenciál), charakterizaci rizik (potence) a/nebo posouzení bezpečnosti (potenciál/potence a expozice) chemické látky nebo skupiny chemických látek, jenž strategicky integruje a váží všechny důležité údaje s cílem poskytnout informace pro přijetí regulačního rozhodnutí, které se týká potenciální nebezpečnosti a/nebo rizika a/nebo potřeby dalšího cíleného, a tudíž minimálního zkoušení.

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

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

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

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

Prehapteny: chemické látky, z nichž se abiotickou transformací, např. oxidací, staly senzibilizující látky.

Prohapteny: chemické látky vyžadující enzymatickou aktivaci, aby vykazovaly potenciál senzibilizace kůže.

Relevantnost: popis vztahu zkoušky k účinku, který je předmětem zájmu, a také toho, zda je zkouška smysluplná a použitelná pro konkrétní účel. Vyjadřuje, do jaké míry zkouška správně měří nebo predikuje biologický účinek, který je předmětem zájmu. Relevantnost zahrnuje také posouzení přesnosti (shody) zkoušky (14).

Spolehlivost: měření rozsahu, v jakém může být zkouška časem reprodukovatelná v laboratořích a mezi laboratořemi, když se provádí s použitím stejného protokolu. Hodnotí se to výpočtem laboratorní a mezilaboratorní reprodukovatelnosti a laboratorní opakovatelnosti (14).

Provedení zkoušky: jedna či více zkoušených chemických látek se zkouší současně s kontrolou s rozpouštědlem/vehikulem a s pozitivní kontrolou.

Citlivost: podíl všech pozitivních/aktivních chemických látek, které jsou na základě zkoušky správně zatříděny. Je měřítkem přesnosti zkušební metody, která poskytuje kategorické výsledky, a je důležitým prvkem při hodnocení relevantnosti zkušební metody (14).

S.I.: stimulační index. Relativní hodnoty geometrického průměru intenzity fluorescence v buňkách exponovaných chemické látce v porovnání s buňkami exponovanými rozpouštědlem.

Kontrola s rozpouštědlem/vehikulem: neexponovaný vzorek obsahující všechny složky zkušebního systému s výjimkou zkoušené chemické látky, ale včetně rozpouštědla/vehikula, které se používá. Používá se ke stanovení účinku na pozadí u vzorků exponovaných zkoušené chemické látce, která je rozpuštěna nebo stabilně dispergována ve stejném rozpouštědle/vehikulu. Pokud se vzorek zkouší souběžnou kontrolou s médiem, ukazuje také, zda rozpouštědlo/vehikulum vzájemně reaguje se zkušebním systémem.

Specifičnost: podíl všech negativních/neaktivních chemických látek, které jsou na základě zkušební metody správně zaříděny. Je to měřítko přesnosti zkušební metody, která dává kategorické výsledky, a je důležitým prvkem při hodnocení relevance zkušební metody (14).

Barvicí pufr: fosfátový pufr ve fyziologickém roztoku obsahující 5 % fetálního telecího séra.

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

Zkoušená chemická látka: jakákoli látka nebo směs zkoušená touto zkouškou.

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, dělníků, přepravníků, spotřebitelů a osob reagujících na havárie) a životního prostředí (16).

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

Validovaná zkouška: zkouška, u níž se má za to, že je dostatečně relevantní a spolehlivá pro určitý účel, a která je založena na vědecky spolehlivých zásadách. Zkouška není nikdy validovaná v absolutním smyslu, ale pouze pro určitý konkrétní účel (14).

Dodatek 2.2**LÁTKY PRO PROKÁZÁNÍ ZPŮSOBILOSTI**

Dříve než začnou laboratoře běžně používat zkoušku popsanou v tomto dodatku ke zkušební metodě B.71, měly by prokázat odbornou způsobilost správným získáním předpokládané předpovědi U-SENSTM u 10 vhodných látek doporučených v tabulce 1 a získáním hodnot CV70 a EC150, které spadají do příslušného referenčního rozpětí, u nejméně 8 z 10 vhodných látek. Látky pro prokázání způsobilosti byly vybrány tak, aby představovaly rozpětí účinků na nebezpečí senzibilizace kůže. Dalšími kritérii výběru bylo, aby látky byly komerčně dostupné, aby k nim byly k dispozici kvalitní referenční údaje *in vivo* a také kvalitní údaje *in vitro* získané zkouškou U-SENSTM. Pro zkoušku U-SENSTM jsou také k dispozici zveřejněné referenční údaje (1) (8).

Tabulka 1: Doporučené látky pro prokázání odborné způsobilosti k provádění zkoušky U-SENSTM

Látky pro prokázání způsobilosti	Fyzikální forma	Skupenství	Předpověď <i>in vivo</i> ¹	U-SENS TM Rozpouštědlo/ vehikulum	U-SENS TM CV70 Odkaz Rozsah v µg/ml ²	U-SENS TM (referenční rozmezí EC150 v µg/ml) ²
benzen-1,4-diamin	106-50-3 Org.	pevná látka	senzibilizující (silně)	kompletní médium ³	< 30	pozitivní (≤ 10)
kyselina picrylsulfonová	2508-19-2	kapalina	senzibilizující (silně)	kompletní médium	> 50	pozitivní (≤ 50)
diethyl-maleinát	141-05-9	kapalina	senzibilizující (středně silně)	DMSO	10–100	pozitivní (≤ 20)
resorcin	108-46-3	pevná látka	senzibilizující (středně silně)	kompletní médium	> 100	pozitivní (≤ 50)
skořicový alkohol	104-54-1	pevná látka	senzibilizující (slabě)	DMSO	> 100	pozitivní (10–100)
estragol	140-67-0	kapalina	senzibilizující (slabě)	DMSO	> 100	pozitivní (< 200)
sacharin	81-07-2	pevná látka	není senzibilizující	DMSO	> 200	negativní (> 200)
glycerol	56-81-5	kapalina	není senzibilizující	kompletní médium	> 200	negativní (> 200)
kyselina mléčná	50-21-5	kapalina	není senzibilizující	kompletní médium	> 200	negativní (> 200)
kyselina salicylová	69-72-7	pevná látka	není senzibilizující	DMSO	> 200	negativní (> 200)

Zkratky: CAS RN = registrační číslo CAS (Chemical Abstracts Service)

¹ Předpovědi nebezpečnosti (a potence) *in vivo* vycházejí z údajů ze zkoušek LLNA (1) (8). Potence *in vivo* je odvozena s

použitím kritérií navržených střediskem ECETOC (17).

² Na základě dosavadních pozorovaných hodnot (1) (8).

³ Kompletní médium: Médium RPMI-1640 doplněném 10 % fetálního telecího séra, 2 mM L-glutaminu, 100 jednotkami/ml penicilinu a 100 µg/ml streptomycinu (8).

Dodatek 3

SENZIBILIZACE KŮŽE *IN VITRO*: ANALÝZA IL-8 LUC

VÝCHOZÍ ÚVAHY A OMEZENÍ

1. Na rozdíl od zkoušek analyzujících expresi buněčných povrchových markerů kvantifikuje analýza IL-8-Luc změny v expresi IL-8, cytokinu spojeného s aktivací dendritických buněk (DC). V reportérové buněčné linii IL-8 odvozené od THP (THP-G8, vytvořené z buněčné linie lidské akutní monocytární leukémie THP-1) se měří exprese IL-8 po expozici senzibilizujícím látkám (1). Poté se použije exprese luciferázy jako pomůcka pro rozlišení mezi látkami senzibilizujícími kůži a látkami nesenzibilizujícími kůži.
2. Analýza IL-8 Luc byla hodnocena ve validační studii (2) provedené Japonským střediskem pro validaci alternativních metod (JaCVAM), **ministerstvem hospodářství, obchodu a průmyslu** (METI) a Japonskou společností **pro alternativy experimentů na zvířatech (JSAAE)** a poté byla podrobena nezávislému hodnocení (3) pod záštitou střediska JaCVAM a ministerstva zdravotnictví, práce a sociálních věcí (MHLW) s podporou útvaru pro **Mezinárodní spolupráci při alternativních zkušebních metodách** (ICATM). S ohledem na všechny dostupné důkazy a příspěvky od regulátorů a účastníků je analýza IL-8 Luc považována za užitečnou v rámci přístupu IATA na rozlišení mezi látkami senzibilizujícími kůži a látkami nesenzibilizujícími kůži za účelem klasifikace nebezpečnosti a označování. Příklady využití údajů z analýzy IL-8 Luc v kombinaci s jinými informacemi jsou uvedeny v odborné literatuře (4) (5) (6).
3. U analýzy IL-8 Luc se prokázalo, že ji lze přenést do laboratoří, které mají zkušenosti s používáním buněčných kultur a měřením luciferázy. Reprodukovatelnost v rámci laboratoře a mezilaboratorní reprodukovatelnost činily 87,7 %, respektive 87,5 % (2). Údaje získané z validační studie (2) a dalších zveřejněných prací (1) (6) ukazují, že analýza IL-8 Luc určila 118 ze 143 chemických látek jako pozitivních nebo negativních a 25 jako neprůkazných a že přesnost analýzy IL-8 Luc při odlišení senzibilizujících látek (tj. kategorie 1 GHS OSN/CLP) od nesenzibilizujících látek (tj. bez kategorie GHS OSN/CLP) činí 86 % (101/118) při citlivosti 96 % (92/96) a specifičnosti 41 % (9/22). S vyloučením látek mimo oblast použitelnosti, jak je popsáno níže (odstavec 5), analýza IL-8 Luc určila 113 ze 136 chemických látek jako pozitivních nebo negativních a 23 jako neprůkazných, přičemž přesnost analýzy IL-8 Luc činí 89 % (101/113) při citlivosti 96 % (92/96) a specifičnosti 53 % (9/17). Podle údajů o použití u lidí citovaných v Urbisch et al. (7) analýza IL-8 Luc určila 76 z 90 chemických látek jako pozitivních nebo negativních a 14 jako neprůkazných, přičemž přesnost činí 80 % (61/76), citlivosti 93 % (54/58) a specifičnost 39 % (7/18). S vyloučením látek mimo oblast použitelnosti analýza IL-8 Luc

určila 71 z 84 chemických látek jako pozitivních nebo negativních a 13 chemických látek jako neprůkazných, přičemž přesnost činí 86 % (61/71) při citlivosti 93 % (54/58) a specifčnosti 54 % (7/13). Falešně negativní předpovědi se u analýzy IL-8 Luc pravděpodobněji týkají chemických látek vykazujících nízkou/střední potenci způsobovat senzibilizaci kůže (podkategorie 1B GHS OSN/CLP) než chemických látek vykazujících vysokou potenci (podkategorie 1A GHS OSN/CLP) (6). Celkově vzato tyto informace podporují roli, kterou může analýza IL-8 Luc sehrát při identifikaci nebezpečí senzibilizace kůže. Uvedená přesnost analýzy IL-8 Luc jako samostatné zkoušky je však pouze orientační, neboť tato zkouška by měla být posuzována v kombinaci s jinými zdroji informací v rámci IATA a v souladu s ustanoveními odstavců 7 a 8 ve Všeobecném úvodu. Při hodnocení zkoušek na senzibilizaci kůže bez použití zvířat by se dále mělo vést v patrnosti, že zkouška LLNA a ani jiné zkoušky na zvířatech nemusí plně odrážet situaci u lidí.

4. Na základě nyní dostupných údajů bylo prokázáno, že analýzu IL-8 Luc lze použít ke zkoušení chemických látek, které obsahují různé organické funkční skupiny, mají různé reakční mechanismy, různou potenci způsobovat senzibilizaci kůže (jak byla stanovena ve studiích *in vivo*) a různé fyzikálně-chemické vlastnosti (2) (6).
5. Ačkoli analýza IL-8 Luc používá jako rozpouštědlo X-VIVO™ 15, správně vyhodnotila chemické látky s $\log K_{ow} > 3,5$ a chemické látky s rozpustností ve vodě 100 µg/ml podle výpočtu pomocí EPI Suite™ a její schopnost detekovat senzibilizující látky špatně rozpustné ve vodě je lepší než v případě analýzy IL-8 Luc používající jako rozpouštědlo dimethylsulfoxid (DMSO) (2). Negativní výsledky u zkoušených chemických látek, které se nerozpouštějí při 20 mg/ml, však mohou dávat falešně negativní výsledky vzhledem k jejich nerozpustnosti v X-VIVO™ 15. Negativní výsledky u těchto zkoušených chemických látek by proto neměly být brány v úvahu. Ve validační studii byla pozorována vysoká míra falešně negativních výsledků u anhydridů. Dále z důvodu omezené metabolické schopnosti buněčné linie (8) a vzhledem k experimentálním podmínkám mohou prohapteny (látky vyžadující metabolickou aktivaci) a prehapteny (látky aktivované oxidací) při analýze vykazovat negativní výsledky. Ačkoliv by však měly být negativní výsledky u pravděpodobných pre/prohaptenu interpretovány opatrně, analýza IL-8 Luc správně posoudila 11 z 11 prehaptenu, 6/6 prohaptenu a 6/8 pre/prohaptenu v souboru dat analýzy IL-8 Luc (2). Na základě nedávno provedené komplexní revize tří zkoušek neprováděných na zvířatech (DPRA, KeratinoSens™ a h-CLAT) na detekci pre- a prohaptenu (9) a na základě skutečnosti, že buňky THP-G8 používané při analýze IL-8 Luc jsou buněčná linie derivovaná z buněk THP-1, které se používají při zkoušce h-CLAT, může analýza IL-8 Luc také přispět ke zvýšení citlivosti zkoušek prováděných na zvířatech, které jsou určeny na detekci pre- a prohaptenu, v kombinaci s jinými zkouškami. Zkoušené povrchově aktivní látky zatím dávaly (falešně) pozitivní výsledky bez ohledu na

jejich druh (např. kationtové, aniontové nebo neiontové). Konečně, zkoušené chemické látky, jež ovlivňují luciferázu, mohou zkreslit její aktivitu/měření, neboť způsobují zjevnou inhibici nebo zvýšenou luminiscenci (10). Uvádí se například, že koncentrace fytoestrogenů vyšší než 1 μM ovlivnila luminiscenční signály v jiných zkouškách reportérových genů založených na luciferáze v důsledku nadměrné aktivace reporterového genu luciferázy. V důsledku toho je nutné pečlivě zkoumat exprese luciferázy získané při vysoké koncentraci fytoestrogenů nebo sloučenin, u nichž existuje podezření, že vyvolávají aktivaci reporterového genu luciferázy podobně jako fytoestrogeny (11). Na základě výše uvedeného jsou povrchově aktivní látky, anhydridy a chemické látky interferující s luciferázou mimo oblast použitelnosti této analýzy. V případech, kdy existují důkazy prokazující nepoužitelnost analýzy IL-8 Luc na jiné specifické kategorie zkoušených chemických látek, neměla by se tato zkouška u těchto specifických kategorií používat.

6. Jak bylo popsáno výše, pomáhá analýza IL-8 Luc rozlišovat mezi látkami senzibilizujícími kůži a látkami nesenzibilizujícími kůži. Ke stanovení toho, zda mohou výsledky analýzy IL-8 Luc přispět k hodnocení potence při posuzování v kombinaci s jinými zdroji informací, však bude zapotřebí další výzkum, nejlépe založený na údajích o účincích na člověka.
7. Definice jsou uvedeny v dodatku 3.1.

PODSTATA ZKOUŠKY

8. Analýza IL-8 Luc využívá buněčnou linii THP-1 lidské monocytární leukemie, která byla získána z Americké sbírky typových kultur (Manassas, VA, USA). S využitím této buněčné linie vytvořila Katedra dermatologie Lékařské fakulty Univerzity v Tohoku reportérovou buněčnou linii IL-8 derivovanou z buněk THP-1, THP-G8, která obsahuje geny stabilní luciferázové oranže (SLO) a stabilní luciferázové červeně (SLR) pod kontrolou promotérů IL-8, respektive glycerinaldehyd-3-fosfátdehydrogenázy (GAPDH) (1). To umožňuje kvantitativní měření indukce genu luciferázy pomocí luminiscenční detekce za použití známých substrátů pro luciferázu produkujících světlo jako ukazatele aktivity transkripčního faktoru IL-8 a GAPDH v buňkách po expozici senzibilizujícím látkám.
9. Duální barevný zkušební systém sestává z luciferázy emitující oranžovou (SLO; $\lambda_{\text{max}} = 580 \text{ nm}$) (12) pro genovou expresi promotéru IL-8 a z luciferázy emitující červenou (SLR; $\lambda_{\text{max}} = 630 \text{ nm}$) (13) pro genovou expresi interního kontrolního promotéru, GAPDH. Tyto dvě luciferázy emitují po reakci s d-luciferinem světlušek různé barvy, přičemž jejich luminiscence se měří současně v jednostupňové reakci rozdělením emise z analyzované směsi pomocí optického filtru (14) (dodatek 3.2).
10. Buňky THP-G8 se po dobu 16 hodin exponují zkoušené chemické látce a poté se změří aktivita luciferázy SLO (SLO-LA), která vyjadřuje aktivitu promotéru IL-8 a aktivitu

luciferázy SLR (SLR-LA), vyjadřující aktivitu promotéru GAPDH. Aby byly zkratky snadno pochopitelné, označují se SLO-LA a SLR-LA jako IL8LA, respektive GAPLA. V tabulce 1 je uveden popis výrazů souvisejících s aktivitou luciferázy při analýze IL-8 Luc. Naměřené hodnoty se používají pro výpočet normalizované hodnoty IL8LA (nIL8LA), což je poměr IL8LA ke GAPLA; indukce nIL8LA (Ind-IL8LA), což je poměr aritmetických průměrů čtyřnásobně změřených hodnot nIL8LA buněk THP-G8 exponovaných zkoušené chemické látky a hodnot nIL8LA neexponovaných buněk THP-G8; a inhibice GAPLA (Inh-GAPLA), což je poměr aritmetických průměrů čtyřnásobně změřených hodnot GAPLA buněk THP-G8 exponovaných zkoušené chemické látky a hodnot GAPLA neexponovaných buněk THP-G8, a použijí se jako ukazatel cytotoxicity.

Tabulka 1: Popis výrazů souvisejících s aktivitou luciferázy při analýze IL-8 Luc

Zkratky	Definice
GAPLA	Aktivita luciferázy SLR vyjadřující aktivitu promotéru GAPDH
IL8LA	Aktivita luciferázy SLO vyjadřující aktivitu promotéru IL-8
nIL8LA	IL8LA / GAPLA
Ind-IL8LA	nIL8LA buněk THP-G8 exponovaných chemickým látkám / nIL8LA neexponovaných buněk
Inh-GAPLA	GAPLA buněk THP-G8 exponovaných chemickým látkám / GAPLA neexponovaných buněk
CV05	Nejnižší koncentrace chemické látky, při níž je Inh-GAPLA < 0,05.

11. Jsou k dispozici technické parametry (PS) (15), které usnadní validaci pozměněných zkoušek luciferázy IL-8 *in vitro* obdobných analýze IL-8 Luc a umožní včas provést změnu pokynu OECD 442E, aby do ní mohly být zahrnuty. Vzájemné uznávání údajů podle postupu OECD (MAD) bude zaručeno pouze u zkoušek validovaných podle těchto technických parametrů, pokud tyto zkoušky byly podrobeny revizi a pokud je OECD zahrnula do pokynu ke zkoušení 442E (16).

PROKÁZÁNÍ ZPŮSOBILOSTI

12. Před rutinním používáním zkoušky popsané v tomto dodatku ke zkušební metodě B.71 by měly laboratoře prokázat odbornou způsobilost použitím 10 látek pro prokazování způsobilosti, které jsou uvedeny v dodatku 3.3, a to v souladu s osvědčenými postupy pro metody *in vitro* (17). Uživatelé zkoušky by si také měli vést historickou databázi údajů pocházejících ze zkoušek reaktivity (viz odstavec 15) a z pozitivních kontrol a kontrol s rozpouštědlem/vehikulem (viz odstavce 21–24) a používat tato data na potvrzení, že v jejich laboratoři je udržována reprodukovatelnost zkoušky v čase.

POSTUP

13. Jsou k dispozici standardní pracovní postupy pro analýzu IL-8 Luc a měly by být používány pro provádění této zkoušky (18). Laboratoře, jež chtějí tuto zkoušku provádět, mohou získat rekombinantní buněčnou linii výkonnostních standardů od společnosti GPC Lab. Co. Ltd., Tottori, Japonsko po uzavření smlouvy o prodeji materiálu (MTA) v souladu s podmínkami uvedenými ve vzoru OECD. Dále je uveden popis hlavních složek a postupů analýzy.

Příprava buněk

14. Při provádění analýzy IL-8 Luc by se měla používat buněčná linie THP-G8 od společnosti GPC Lab. Co. Ltd., Tottori, Japonsko (viz odstavce 8 a 13). Buňky se po obdržení pomnoží (2–4 pasáže) a skladují se zmrazené jako homogenní kmen. Buňky z této zásoby mohou být pasážovány maximálně 12krát nebo maximálně 6 týdnů. K množení se používá kultivační médium RPMI-1640 obsahující 10 % fetálního bovinního séra (FBS), antibiotický/antimykotický roztok (100 jednotek/ml penicilinu G, 100 µg/ml streptomycinu a 0,25 µg/ml amfotericinu B v 0,85% fyziologickém roztoku) (např. GIBCO kat. č. 15240-062), 0,15 µg/ml Puromycinu (např. CAS:58-58-2) a 300 µg/ml G418 (např. CAS:108321-42-2).
15. Než se buňky použijí pro zkoušení, je třeba zjistit, zda jsou vhodné, provedením kontroly reaktivity. Tato kontrola se provádí 1–2 týdny nebo 2–4 pasáže po rozmrazení za použití pozitivní kontroly, 4-nitrobenzyl-bromidu (4-NBB) (CAS:100-11-8, čistota ≥ 99 %) a negativní kontroly, kyseliny mléčné (LA) (CAS:50-21-5, čistota ≥ 85 %). 4-NBB by měl dát pozitivní odpověď na Ind-IL8LA ($\geq 1,4$), zatímco kyselina mléčná by měla dát negativní odpověď na Ind-IL8LA ($< 1,4$). Pro analýzu se používají pouze buňky, které prošly kontrolou reaktivity. Kontrola se provádí podle postupů popsanych v odstavcích 22–24.
16. Pro zkoušení se buňky THP-G8 nasadí v hustotě 2 až 5×10^5 buněk/ml a předběžně se kultivují v kultivačních baňkách po dobu 48 až 96 hodin. V den zkoušky se buňky získané z kultivační baňky promyjí RPMI-1640 s obsahem 10 % FBS bez jakýchkoli antibiotik a poté resuspendují s RPMI-1640 s obsahem 10 % FBS bez jakýchkoli antibiotik při 1×10^6 buněk/ml. Poté se buňky rozdělí do 96jamkové destičky s plochým dnem (např. Costar kat. č. 3603) s 50 µl (5×10^4 buněk/jamka).

Příprava zkoušené chemické látky a kontrolních látek

17. Zkoušená chemická látka a kontrolní látky se připraví v den zkoušení. Pro analýzu IL-8 Luc se zkoušené chemické látky rozpustí v X-VIVO™ 15, komerčně dostupném médiu bez séra (Lonza, 04-418Q), na konečnou koncentraci 20 mg/ml. X-VIVO™ 15 se přidá do 20 mg zkoušené chemické látky (bez ohledu na rozpustnost chemické látky) ve zkumavce do mikroadstředivky a doplní se na objem 1 ml a poté se silně odstředí a promíchává na

rotoru při maximální rychlosti 8 ot/min. po dobu 30 minut při okolní teplotě přibližně 20 °C. Pokud jsou pevné chemické látky stále nerozpustné, zkumavka se poté vloží do ultrazvukové lázně, dokud se chemická látka zcela nerozpustí nebo dokud není stabilně dispergována. U zkoušených chemických látek, které jsou rozpustné v X-VIVO™ 15, se roztok naředí přípravkem X-VIVO™ 15 faktorem 5 a použije jako zásobní roztok X-VIVO™ 15 zkoušené chemické látky (4 mg/ml). U zkoušených chemických látek, které nejsou rozpustné v X-VIVO™ 15, se směs opět promíchává po dobu alespoň 30 minut, poté se odstředí při 15 000 ot/min ($\approx$ 20 000 g) po dobu 5 minut; výsledný supernatant se použije jako zásobní roztok X-VIVO™ 15 zkoušené chemické látky. Pro použití jiných rozpouštědel, jako je DMSO, voda nebo kultivační médium, je třeba uvést vědecké zdůvodnění. Podrobný postup rozpuštění chemických látek je uveden v dodatku 3.5. Roztoky X-VIVO™ 15 popsané v odstavcích 18–23 se smíchají 1 : 1 (obj.) s buněčnými suspenzemi připravenými ve 96jamkové destičce s plochým dnem (viz odstavec 16).

18. Cílem prvního provedení zkoušky je stanovit cytotoxickou koncentraci a zkoumat potenciál chemických látek senzibilizovat kůži. Pomocí X-VIVO™ 15 se připraví sériově naředěné zásobní roztoky X-VIVO™ 15 zkoušených chemických látek při faktoru ředění dva (viz dodatek 3.5) s použitím 96jamkového zkušební bloku (např. Costar kat. č. EW-01729-03). Poté se 50 μ l/jamku naředěného roztoku přidá do 50 μ l buněčné suspenze v 96jamkové černé destičce s plochým dnem. Pro zkoušené chemické látky, které jsou rozpustné v X-VIVO™ 15, bude tedy konečná koncentrace zkoušených chemických látek v rozsahu od 0,002 do 2 mg/ml (dodatek 3.5). Pro zkoušené chemické látky, které nejsou rozpustné v X-VIVO™ 15 při 20 mg/ml, se stanoví pouze faktory ředění v rozsahu od 2 do 2^{10} , přestože jsou skutečné konečné koncentrace zkoušených chemických látek nejisté a závisí na saturované koncentraci zkoušených chemických látek v zásobním roztoku X-VIVO™ 15.
19. Při dalších provedeních zkoušky (tj. druhý, třetí a čtvrtý replikát) se zásobní roztoky X-VIVO™ 15 připraví při koncentraci čtyřikrát vyšší, než je koncentrace životaschopnosti buněk 05 (CV05; nejnižší koncentrace, při níž je $\text{Inh-GAPLA} < 0,05$) v prvním experimentu. Jestliže Inh-GAPLA neklesne při prvním provedení zkoušky pod 0,05 při nejvyšší koncentraci, zásobní roztok X-VIVO™ 15 se připraví v nejvyšší koncentraci při prvním provedení zkoušky. Koncentrace CV05 se vypočítá vydělením koncentrace zásobního roztoku v prvním provedení zkoušky faktorem ředění pro CV05 (X) (faktor ředění CV05 (X); faktor ředění potřebný pro naředění zásobního roztoku na CV05) (viz dodatek 3.5). Pro zkoušené látky, které nejsou rozpustné v X-VIVO při 20 mg/ml, se CV05 určí podle koncentrace zásobního roztoku $\times 1/X$. Pro provedení zkoušky 2 až 4 se připraví druhý zásobní roztok jako 4 x CV50 (dodatek 3.5).

20. Připraví se sériově naředěné druhé zásobní roztoky X-VIVO™ 15 při faktoru ředění 1,5 s použitím 96jamkového zkušební bloku. Poté se 50 µl/jamku naředěného roztoku přidá do 50 µl buněčné suspenze v jamkách 96jamkové černé destičky s plochým dnem. Každá koncentrace každé zkoušené chemické látky by měla být testována ve 4 jamkách. Vzorky se poté míchají na třepačce a inkubují po dobu 16 hodin při 37°C a 5 % CO₂ a poté se změří aktivita luciferázy, jak je popsáno níže.
21. Kontrola s rozpouštědlem je směs 50 µl/jamku X-VIVO™ 15 a 50 µl/jamku buněčné suspenze v RPMI-1640 s obsahem 10 % FBS.
22. Doporučená pozitivní kontrola je 4-NBB. 20 mg 4-NBB se připraví ve zkumavce do mikroadstředivky o objemu 1,5 ml a doplní se přípravkem X-VIVO™ 15 na objem 1 ml. Zkumavka se silně odstředí a promíchává na rotoru při maximální rychlosti 8 ot/min. po dobu alespoň 30 minut. Po odstředění při 20 000 g po dobu 5 minut se supernatant naředí faktorem 4 přípravkem X-VIVO™ 15 a 500 µl naředěného supernatantu se přenesse do jamky 96jamkového zkušební bloku. Naředěný supernatant se dále naředí přípravkem X-VIVO™ 15 při faktoru 2 a 4 a 50 µl roztoku se přidá do 50 µl buněčné suspenze THP-G8 v jamkách 96jamkové černé destičky s plochým dnem (dodatek 3.6). Každá koncentrace pozitivní kontroly by měla být testována ve 4 jamkách. Destička se míchá na třepačce a inkubuje v CO₂ po dobu 16 hodin (37 °C, 5 % CO₂) a poté se změří aktivita luciferázy, jak je popsáno odstavci 29.
23. Doporučená negativní kontrola je kyselina mléčná. 20 mg kyseliny mléčné se připraví ve zkumavce do mikroadstředivky o objemu 1,5 ml a doplní se přípravkem X-VIVO™ 15 na objem 1 ml (20 mg/ml). 20 mg/ml roztoku kyseliny mléčné se naředí faktorem 5 přípravkem X-VIVO™ 15 (4 mg/ml); 500 µl tohoto roztoku kyseliny mléčné 4 mg/ml se přenesse do jamky 96jamkového zkušební bloku. Tento roztok se naředí faktorem 2 přípravkem X-VIVO™ 15 a poté se opět naředí faktorem 2, aby vznikly roztoky 2 mg/ml a 1 mg/ml. 50 µl těchto 3 roztoků a kontroly s vehikulem (X-VIVO™ 15) se přidá do 50 µl buněčné suspenze THP-G8 v jamkách 96jamkové černé destičky s plochým dnem. Každá koncentrace negativní kontroly by měla být testována ve 4 jamkách. Destička se míchá na třepačce a inkubuje v CO₂ po dobu 16 hodin (37 °C, 5 % CO₂) a poté se změří aktivita luciferázy, jak je popsáno odstavci 29.
24. Lze použít i jiné vhodné pozitivní nebo negativní kontroly, pokud jsou k dispozici dosavadní údaje umožňující odvodit srovnatelná kritéria přijatelnosti daného provedení zkoušky.
25. Mělo by se dbát na to, aby nedošlo k vypařování těkavých zkoušených chemických látek a ke vzájemné kontaminaci zkoušenou chemickou látkou mezi jamkami, např. tak, že se destičky před inkubací se zkoušenými chemickými látkami zapečetí.

26. Zkoušené chemické látky a kontrola s rozpouštědlem vyžadují 2 až 4 provedení zkoušky, aby mohla být stanovena pozitivní nebo negativní predikce (viz tabulka 2). Každé opakování se provádí v různý den s čerstvým zásobním roztokem X-VIVO™ 15 zkoušených chemických látek a s nezávisle sklizenými buňkami. Buňky mohou pocházet ze stejné pasáže.

Měření aktivity luciferázy

27. Luminiscence se měří pomocí luminometru na 96jamkové destičky vybaveného optickými filtry, např. Phelios (ATTO, Tokyo, Japonsko), Tristan 941 (Berthold, Bad Wildbad, Německo) a ARVO series (PerkinElmer, Waltham, MA, USA). Luminometr musí být kalibrován pro každou zkoušku, aby byla zajištěna reprodukovatelnost (19). Pro tuto kalibraci se dodávají rekombinantní luciferázy emitující oranžovou a červenou.
28. Do každé jamky destičky obsahující buněčnou suspenzi exponovanou nebo neexponovanou chemické látce se přenese 100 μ l ohřáté reagentie Tripluc® Luciferase (Tripluc). Destička se protřepává po dobu 10 minut při okolní teplotě přibližně 20°C. Destička se umístí do luminometru a změří se aktivita luciferázy. Bioluminiscence se měří po dobu 3 sekund, a to bez optického filtru (F0) a s optickým filtrem (F1). Při použití alternativního uspořádání, např. v závislosti na modelu použitého luminometru, je třeba uvést zdůvodnění.
29. Z naměřených hodnot se vypočítají parametry pro každou koncentraci, např. IL8LA, GAPLA, nIL8LA, Ind-IL8LA, Inh-GAPLA, střední hodnota $\pm$ SD IL8LA, střední hodnota $\pm$ SD GAPLA, střední hodnota $\pm$ SD nIL8LA, střední hodnota $\pm$ SD Ind-IL8LA, střední hodnota $\pm$ SD Inh-GAPLA a 95% konfidenční interval Ind-IL8LA. Definice parametrů použitých v tomto odstavci jsou uvedeny v dodatku I, respektive v dodatku IV.
30. Před měřením se zajistí barevné rozlišení u vícebarevných reportérových analýz obvykle pomocí detektorů (luminometr a čtečka destiček) vybavených optickými filtry, jako jsou např. sharp-cut (dlouhovlnné nebo krátkovlnné průchodové) filtry nebo pásmové průchodové filtry. Před zkouškou je třeba kalibrovat prostupové koeficienty filtru pro každou barvu bioluminiscenčního signálu podle dodatku 3.2.

ÚDAJE A PŘEDKLÁDÁNÍ ZPRÁV

Vyhodnocení údajů

31. Kritéria pro pozitivní/negativní rozhodnutí vyžadují, aby při každém provedení zkoušky:
- byla predikce při analýze IL-8 Luc určena jako pozitivní, jestliže má zkoušená chemická látka Ind-IL8LA $\geq 1,4$ a dolní limit 95% konfidenčního intervalu Ind-IL8LA $\geq 1,0$,

- byla predikce při analýze IL-8 Luc určena jako negativní, jestliže má zkoušená chemická látka $\text{Ind-IL8LA} < 1,4$ a/nebo dolní limit 95% konfidenčního intervalu $\text{Ind-IL8LA} < 1,0$.

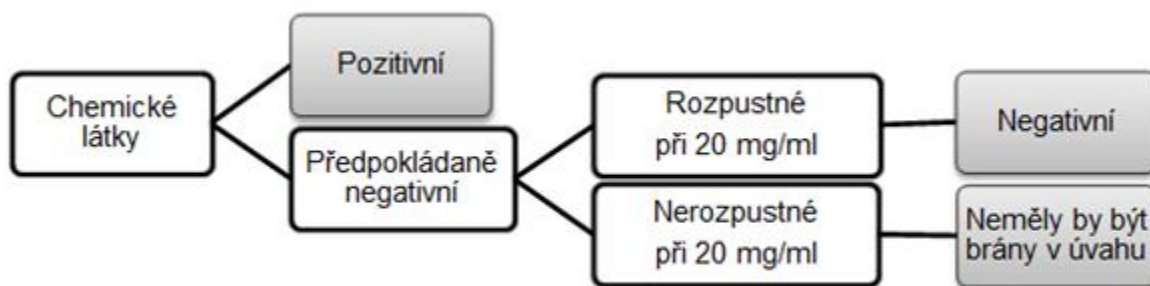
Predikční model

32. Zkoušené chemické látky, které dávají dva pozitivní výsledky z 1., 2., 3. nebo 4. provedení zkoušky, jsou určeny jako pozitivní, zatímco zkoušené chemické látky, které dávají tři negativní výsledky z 1., 2., 3. nebo 4. provedení zkoušky, jsou určeny jako pravděpodobně negativní (tabulka 2). Z pravděpodobně negativních chemických látek jsou chemické látky, které se rozpouštějí při 20 mg/ml X-VOVO™ 15, určeny jako negativní, zatímco chemické látky, které se nerozpouštějí při 20 mg/ml X-VOVO™ 15, by neměly být brány v úvahu (obrázek 1).

Tabulka 2: Kritéria pro identifikaci pozitivních a pravděpodobně negativních látek

1. provedení	2. provedení	3. provedení	4. provedení	Konečná predikce
pozitivní	pozitivní	–	–	pozitivní
		pozitivní	–	pozitivní
	negativní	negativní	pozitivní	pozitivní
			negativní	pravděpodobně negativní
negativní	pozitivní	pozitivní	–	pozitivní
		negativní	pozitivní	pozitivní
	negativní		negativní	pravděpodobně negativní
		pozitivní	pozitivní	pozitivní
			negativní	pravděpodobně negativní
		negativní	–	pravděpodobně negativní

Obrázek 1: Predikční model pro konečné posouzení



Kritéria přijatelnosti

33. Při použití zkoušky IL-8 Luc by měla být splněna tato kritéria přijatelnosti:

- Ind-IL8LA by mělo být větší než 5,0 alespoň v jedné koncentraci pozitivní kontroly, 4-NBB, při každém provedení zkoušky.
- Ind-IL8LA by mělo být menší než 1,4 při jakékoli koncentraci negativní kontroly, kyselina mléčná, při každém provedení zkoušky.
- Údaje z destiček, kde je GAPLA kontrolních jamek s buňkami a přípravkem Tripluc, ale bez chemických látek menší než pětinašobek této hodnoty jamek obsahujících pouze zkoušené médium (50 μ l/jamku RPMI-1640 s obsahem 10 % FBS a 50 μ l/jamku X-VIVOTM 15), se vyřadí.
- Údaje z destiček, kde je Inh-GAPLA všech koncentrací zkoušené chemické látky nebo kontrolních chemických látek menší než 0,05, se vyřadí. V takovém případě by měla být první zkouška zopakována, tak aby byla nejvyšší konečná koncentrace opakované zkoušky stejná jako nejnižší konečná koncentrace předchozí zkoušky.

Závěrečná zpráva

34. Závěrečná zpráva by měla obsahovat tyto informace:

Zkoušené chemické látky

Jednosložková látka:

- chemická identifikace, např. název (názvy) IUPAC nebo CAS, číslo (čísla) CAS, kód SMILES nebo InChI, strukturní vzorec a/nebo jiné identifikátory,
- fyzický vzhled, rozpustnost ve vodě, molekulová hmotnost a další důležité fyzikálně-chemické vlastnosti, v rozsahu, v jakém jsou tyto informace dostupné,
- čistota, případně chemická identita nečistot, je-li to prakticky proveditelné atd.,

- případné ošetření před zkoušením (např. zahřívání, mletí),
- rozpustnost v X-VIVO™ 15. U chemických látek, které jsou nerozpustné v X-VIVO™ 15, zda je po odstředění pozorována sraženina nebo flotace,
- zkušební koncentrace,
- podmínky skladování a stabilita, v rozsahu, v jakém jsou tyto informace dostupné,
- zdůvodnění volby rozpouštědla/vehikula pro každou zkoušenou chemickou látku, jestliže nebyl použit X-VIVO™ 15.

Vícesložková látka, UVCB a směs:

- charakterizovaná v co možná největší míře např. chemickou identitou (viz výše), čistotou, kvantitativním výskytem a důležitými fyzikálně-chemickými vlastnostmi (viz výše) složek, v rozsahu, v jakém jsou tyto informace dostupné,
- fyzický vzhled, rozpustnost ve vodě a další důležité fyzikálně-chemické vlastnosti, v rozsahu, v jakém jsou tyto informace dostupné,
- molekulová hmotnost nebo zdánlivá molekulová hmotnost v případě směsí/polymerů se známým složením nebo jiné informace důležité pro provedení studie,
- případné ošetření před zkoušením (např. zahřívání, mletí),
- rozpustnost v X-VIVO™ 15. U chemických látek, které jsou nerozpustné v X-VIVO™ 15, zda je po odstředění pozorována sraženina nebo flotace,
- zkušební koncentrace,
- podmínky skladování a stabilita, v rozsahu, v jakém jsou tyto informace dostupné,
- zdůvodnění volby rozpouštědla/vehikula pro každou zkoušenou chemickou látku, jestliže nebyl použit X-VIVO™ 15.

Kontroly

Pozitivní kontrola:

- chemická identifikace, např. název (názvy) IUPAC nebo CAS, číslo (čísla) CAS, kód SMILES nebo InChI, strukturní vzorec a/nebo jiné identifikátory,
- případně fyzický vzhled, rozpustnost ve vodě, molekulová hmotnost a další důležité fyzikálně-chemické vlastnosti, v rozsahu, v jakém jsou tyto informace dostupné,
- čistota, případně chemická identita nečistot, je-li to prakticky proveditelné atd.,
- případné ošetření před zkoušením (např. zahřívání, mletí),

- zkušební koncentrace,
- podmínky skladování a stabilita, v rozsahu, v jakém jsou tyto informace dostupné,
- odkaz na případné dosavadní výsledky pozitivních kontrol prokazující vhodnost kritérií přijatelnosti.

Negativní kontrola:

- chemická identifikace, např. název (názvy) IUPAC nebo CAS, číslo (čísla) CAS a/nebo jiné identifikátory,
- čistota, případně chemická identita nečistot, je-li to prakticky proveditelné atd.,
- fyzický vzhled, molekulová hmotnost a další důležité fyzikálně-chemické vlastnosti v případě použití jiných negativních kontrol, než které jsou uvedeny v tomto pokynu, a to v rozsahu, v jakém jsou tyto informace dostupné,
- podmínky skladování a stabilita, v rozsahu, v jakém jsou tyto informace dostupné,
- zdůvodnění volby rozpouštědla pro každou zkoušenou chemickou látku.

Zkušební podmínky

- jméno a adresa zadavatele, zkušebního zařízení a vedoucího studie,
- popis použité zkoušky,
- použitá buněčná linie, podmínky skladování a zdroj (např. zařízení, z něhož byla získána),
- číslo šarže a původ FBC, jméno dodavatele, číslo šarže 96jamkové černé destičky s plochým dnem a číslo šarže reagentie Tripluc,
- číslo pasáže a hustota buněk použitých ke zkoušení,
- metoda počítání buněk použitá při jejich nasazování před zkoušením a opatření přijatá k zajištění homogenní distribuce počtu buněk,
- použitý luminometr (např. model), včetně nastavení přístroje, použitý substrát pro luciferázu a prokázání přiměřeného měření luminiscence na základě kontrolního testu, který je popsán v dodatku 3.2,
- postup použitý pro prokázání způsobilosti laboratoře k provádění této zkoušky (např. zkoušením vhodných látek) nebo pro prokázání reprodukovatelného provedení této zkoušky v průběhu doby.

Zkušební postup

- počet replikátů a počet provedení zkoušky,

- koncentrace zkoušených chemických látek, postup aplikace a doba expozice (pokud se liší od doporučených),
- popis použitých hodnotících kritérií a kritérií rozhodování,
- popis použitých kritérií přijatelnosti studie,
- popis jakýchkoli změn zkušebního postupu.

Výsledky

- měření IL8LA a GAPLA,
- výpočty pro nIL8LA, Ind-IL8LA a Inh-GAPLA,
- 95% konfidenční interval Ind-IL8LA,
- graf zobrazující křivky dávka-odpověď pro indukci aktivity luciferázy a životaschopnost,
- případně popis jakýchkoli jiných důležitých zjištění z pozorování.

Diskuse o výsledcích

- diskuse o výsledcích získaných za pomoci analýzy IL-8 Luc,
- diskuse o výsledcích analýzy v rámci IATA, jsou-li k dispozici jiné příslušné informace.

Závěr

LITERATURA

- (1) Takahashi T, Kimura Y, Saito R, Nakajima Y, Ohmiya Y, Yamasaki K, and Aiba S. (2011). An *in vitro* test to screen skin sensitizers using a stable THP-1-derived IL-8 reporter cell line, THP-G8. *Toxicol Sci* 124:359-69.
- (2) OECD (2017). Validation report for the international validation study on the IL-8 Luc assay as a test evaluating the skin sensitizing potential of chemicals conducted by the IL-8 Luc Assay. Series on Testing and Assessment No 267, ENV/JM/MONO(2017)19. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Dostupné na webových stránkách: <http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm>.
- (3) OECD (2017). Report of the Peer Review Panel for the IL-8 Luciferase (IL-8 Luc) Assay for *in vitro* skin sensitisation. Series on Testing and Assessment No 258, ENV/JM/MONO(2017)20. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Dostupné na webových stránkách: <http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm>.
- (4) OECD (2016) Guidance Document On The Reporting Of Defined Approaches And Individual Information Sources To Be Used Within Integrated Approaches To Testing And Assessment (IATA) For Skin Sensitisation, Series on Testing & Assessment No 256, ENV/JM/MONO(2016)29. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Dostupné na webových stránkách: <http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm>.
- (5) van der Veen JW, Rorije E, Emter R, Natsch A, van Loveren H, and Ezendam J. (2014). Evaluating the performance of integrated approaches for hazard identification of skin sensitizing chemicals. *Regul Toxicol Pharmacol* 69:371-9.
- (6) Kimura Y, Fujimura C, Ito Y, Takahashi T, Nakajima Y, Ohmiya Y, and Aiba S. (2015). Optimization of the IL-8 Luc assay as an *in vitro* test for skin sensitization. *Toxicol In Vitro* 29:1816-30.
- (7) Urbisch D, Mehling A, Guth K, Ramirez T, Honarvar N, Kolle S, Landsiedel R, Jaworska J, Kern PS, Gerberick F, et al. (2015). Assessing skin sensitization hazard in mice and men using non-animal test methods. *Regul Toxicol Pharmacol* 71:337-51.
- (8) Ashikaga T, Sakaguchi H, Sono S, Kosaka N, Ishikawa M, Nukada Y, Miyazawa M, Ito Y, Nishiyama N, and Itagaki H. (2010). A comparative

evaluation of *in vitro* skin sensitisation tests: the human cell-line activation test (h-CLAT) versus the local lymph node assay (LLNA). Alternatives to laboratory animals: ATLA 38:275-84.

- (9) Patlewicz G, Casati S, Basketter DA, Asturiol D, Roberts DW, Lepoittevin J-P, Worth A and Aschberger K (2016) Can currently available non-animal methods detect pre and pro haptens relevant for skin sensitisation? Regul Toxicol Pharmacol, 82:147-155.
- (10) Thorne N, Inglese J, and Auld DS. (2010). Illuminating insights into firefly luciferase and other bioluminescent reporters used in chemical biology. Chem Biol 17:646-57.
- (11) OECD (2016). Test No 455: Performance-Based Test Guideline for Stably Transfected Transactivation *In Vitro* Assays to Detect Estrogen Receptor Agonists and Antagonists, OECD Publishing, Paris. <http://dx.doi.org/10.1787/9789264265295-en>.
- (12) Viviani V, Uchida A, Suenaga N, Ryufuku M, and Ohmiya Y. (2001). Thr226 is a key residue for bioluminescence spectra determination in beetle luciferases. Biochem Biophys Res Commun 280:1286-91.
- (13) Viviani VR, Bechara EJ, and Ohmiya Y. (1999). Cloning, sequence analysis, and expression of active *Phrixothrix* railroad-worms luciferases: relationship between bioluminescence spectra and primary structures. Biochemistry 38:8271-9.
- (14) Nakajima Y, Kimura T, Sugata K, Enomoto T, Asakawa A, Kubota H, Ikeda M, and Ohmiya Y. (2005). Multicolor luciferase assay system: one-step monitoring of multiple gene expressions with a single substrate. Biotechniques 38:891-4.
- (15) OECD (2017). Bude vydáno - Performance Standards for the assessment of proposed similar or modified *in vitro* skin sensitisation IL-8 luc test methods. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment. OECD, Paris, France
- (16) OECD (2005). Guidance Document the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. OECD Environment, Health and Safety publications, OECD Series on Testing and Assessment No 34. OECD, Paris, France.
- (17) OECD (2018). Draft Guidance document: Good *In Vitro* Method Practices (GIVIMP) for the Development and Implementation of *In Vitro* Methods for Regulatory Use in Human Safety Assessment. Organisation for Economic

Cooperation and Development, Paris. Dostupné na webových stránkách:
http://www.oecd.org/env/ehs/testing/OECD_Final_Draft_GIVIMP.pdf.

- (18) JaCVAM (2016). IL-8 Luc assay protocol, Available at.
http://www.jacvam.jp/en_effort/effort02.html.
- (19) Niwa K, Ichino Y, Kumata S, Nakajima Y, Hiraishi Y, Kato D, Viviani VR, and Ohmiya Y. (2010). Quantum yields and kinetics of the firefly bioluminescence reaction of beetle luciferases. *Photochem Photobiol* 86:1046-9.
- (20) OECD (2012). The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins, Part 1: Series on Testing and Assessment No. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 168. OECD, Paris, France.
- (21) United Nations (2015). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Sixth revised edition. New York & Geneva: United Nations Publications. ISBN: 978-92-1-117006-1. Dostupné: na webových stránkách:
http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html.

Dodatek 3.1**DEFINICE**

Přesnost: přesnost shody mezi výsledky zkoušky a přijatými referenčními hodnotami. Je to míra funkčnosti zkoušky a jeden z aspektů její relevantnosti. Tento výraz se často používá namísto výrazu soulad a rozumí se jím podíl správných výsledků zkoušky (16).

AOP (mechanismy nežádoucích účinků): sled událostí od chemické struktury cílové chemické látky nebo skupiny podobných chemických látek přes molekulární iniciační událost po účinek *in vivo*, který je předmětem zájmu (20).

Chemická látka: látka nebo směs.

CV05: životaschopnost buněk 05, tj. minimální koncentrace, při níž vykazují chemické látky méně než 0,05 Inh-GAPLA.

FInSLO-LA: zkratka, která se používá ve validační zprávě a v předchozích publikacích týkajících se analýzy IL-8 Luc na označení Ind-IL8LA. Viz Ind-IL8LA, kde je uvedena definice.

GAPLA: luciferázová aktivita stabilní luciferázové červeně (SLR) ($\lambda_{\max} = 630 \text{ nm}$), regulované promotérem GAPDH, která prokazuje životaschopnost buněk a počet životaschopných buněk.

Nebezpečnost: základní charakteristika látky nebo situace, která má potenciál vyvolat nepříznivé účinky, jsou-li organismus, systém nebo (sub)populace vystaveny této látce.

IATA (jednotný přístup ke zkoušení a posuzování): strukturovaný přístup používaný pro zjišťování nebezpečnosti (potenciál), charakterizaci rizik (potence) a/nebo posouzení bezpečnosti (potenciál/potence a expozice) chemické látky nebo skupiny chemických látek, jenž strategicky integruje a váží všechny důležité údaje s cílem poskytnout informace pro přijetí regulačního rozhodnutí, které se týká potenciální nebezpečnosti a/nebo rizika a/nebo potřeby dalšího cíleného, a tudíž minimálního zkoušení.

II-SLR-LA: zkratka, která se používá ve validační zprávě a v předchozích publikacích týkajících se analýzy IL-8 Luc na označení Inh-GAPLA. Viz Inh-GAPLA, kde je uvedena definice.

IL-8 (Interleukin-8): cytokin derivovaný z endotelových buněk, fibroblastů, keratinocytů, makrofágů a monocytů, který vyvolává chemotaxi neutrofilů a T-lymfocytů.

IL8LA: luciferázová aktivita stabilní luciferázové oranžové (SLO) ($\lambda_{\max} = 580 \text{ nm}$), regulované promotérem IL-8.

Ind-IL8LA: násobná indukce IL8LA. Stanoví se vydělením nIL8LA buněk THP-G8

exponovaných chemickým látkám touto hodnotou nestimulovaných buněk THP-G8 a představuje indukci aktivity promotéru IL-8 chemickými látkami.

Inh-GAPLA: inhibice GAPLA. Stanoví se vydělením GAPLA buněk THP-G8 exponovaných chemickým látkám touto hodnotou neexponovaných buněk THP-G8 a představuje cytotoxicitu chemických látek.

Minimální prahová hodnota indukce (MIT): nejnižší koncentrace, při níž chemická látka splňuje pozitivní kritéria.

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

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

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

nIL8LA: aktivita luciferázy SLO vyjadřující aktivitu promotéru IL-8 (IL8LA) normalizovaná aktivitou luciferázy SLR vyjadřující aktivitu promotéru GAPDH (GAPLA). Představuje aktivitu promotéru IL-8 po zohlednění životaschopnosti buněk nebo počtu buněk.

nSLO-LA: zkratka, která se používá ve validační zprávě a v předchozích publikacích týkajících se analýzy IL-8 Luc na označení nIL8LA. Viz nIL8LA, kde je uvedena definice.

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

Prehapteny: chemické látky, z nichž se abiotickou transformací staly senzibilizující látky.

Prohapteny: chemické látky vyžadující enzymatickou aktivaci, aby vykazovaly potenciál senzibilizace kůže.

Relevantnost: popis vztahu zkoušky k účinku, který je předmětem zájmu, a také toho, zda je zkouška smysluplná a použitelná pro konkrétní účel. Vyjadřuje, do jaké míry zkouška správně měří nebo predikuje biologický účinek, který je předmětem zájmu. Relevantnost zahrnuje také posouzení přesnosti (shody) zkoušky (16).

Spolehlivost: měření rozsahu, v jakém může být zkouška časem reprodukovatelná v laboratořích a mezi laboratořemi, když se provádí s použitím stejného protokolu. Hodnotí se to výpočtem laboratorní a mezilaboratorní reprodukovatelnosti a laboratorní opakovatelnosti (16).

Provedení zkoušky: jedna či více zkoušených chemických látek se zkouší současně s kontrolou s rozpouštědlem/vehikulem a s pozitivní kontrolou.

Citlivost: podíl všech pozitivních/aktivních chemických látek, které jsou na základě zkoušky správně zaříděny. Je to měřítko přesnosti zkušební metody, která dává kategorické výsledky, a je důležitým prvkem při hodnocení relevance zkušební metody (16).

SLO-LA: zkratka, která se používá ve validační zprávě a v předchozích publikacích týkajících se analýzy IL-8 Luc na označení IL8LA. Viz IL8LA, kde je uvedena definice.

SLR-LA: zkratka, která se používá ve validační zprávě a v předchozích publikacích týkajících se analýzy IL-8 Luc na označení GAPLA. Viz GAPLA, kde je uvedena definice.

Kontrola s rozpouštědlem/vehikulem: neexponovaný vzorek obsahující všechny složky zkušebního systému s výjimkou zkoušené chemické látky, ale včetně rozpouštědla/vehikula, které se používá. Používá se ke stanovení účinku na pozadí u vzorků exponovaných zkoušené chemické látky, která je rozpuštěna nebo stabilně dispergována ve stejném rozpouštědle/vehikulu. Pokud se vzorek zkouší souběžnou kontrolou s médiem, ukazuje také, zda rozpouštědlo/vehikulum vzájemně reaguje se zkušebním systémem.

Specifičnost: podíl všech negativních/neaktivních chemických látek, které jsou na základě zkušební metody správně zaříděny. Je to měřítko přesnosti zkušební metody, která dává kategorické výsledky, a je důležitým prvkem při hodnocení relevance zkušební metody (16).

Látka: chemický prvek a jeho sloučeniny v přírodním stavu nebo získané výrobním procesem včetně všech přídatných látek nutných k uchování stability výrobku a všech nečistot vznikajících v použitém procesu, ale s vyloučením všech rozpouštědel, která je možno oddělit bez ovlivnění stability látky nebo změny jejího složení.

Smáčedlo: nazývané též povrchově aktivní látka je látka jako např. detergent, která je schopna snížit povrchové napětí kapaliny a umožnit jí vytvářet pěnu nebo pronikat do pevných látek; je též známa jako sufraktant. (TG437)

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

THP-G8: reportérova buněčná linie IL-8, která se používá při analýze IL-8 Luc. Lidská buněčná linie THP-1 podobná makrofágům byla transfekována geny luciferázy SLO a SLR pod kontrolou promotéru IL-8, respektive GAPDH.

Globálně harmonizovaný systém klasifikace a označování chemických látek Organizace spojených národů (GHS OSN): systém navrhuje klasifikaci chemických látek (látek a směsí) podle standardizovaných typů a úrovní fyzikálních, zdravotních a environmentálních nebezpečí a řešící příslušné komunikační prvky, jako jsou piktogramy, signální slova, výroky o nebezpečí, výroky o bezpečnostních opatřeních a bezpečnostní datové listy, které obsahují informace o jejich nežádoucích účincích s ohledem na ochranu lidí (včetně zaměstnavatelů, dělníků, přepraveců, spotřebitelů a osob reagujících na havárie)

a životního prostředí (21).

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

Validovaná zkušební metoda: zkouška, u níž se má za to, že je dostatečně relevantní a spolehlivá pro určitý účel, a která je založena na vědecky spolehlivých zásadách. Zkouška není nikdy validovaná v absolutním smyslu, ale pouze pro určitý konkrétní účel.

Dodatek 3.2**PRINCIP MĚŘENÍ AKTIVITY LUCIFERÁZY A STANOVENÍ PROSTUPOVÝCH KOEFICIENTŮ OPTICKÉHO FILTRU PRO SLO A SLR**

Multireportérový analytický systém Tripluc se může používat s luminometrem na mikrodestičky s vícebarevným detekčním systémem, který může zahrnovat optický filtr (např. Phelios AB-2350 (ATTO), ARVO (PerkinElmer), Tristar LB941 (Berthold)). Optický filtr použitý při měření je dlouhovlnný nebo krátkovlnný průchodový filtr 600–620 nm nebo pásmový průchodový filtr 600–700 nm.

Měření dvoubarevných luciferáz s optickým filtrem.

V tomto příkladu se používá přístroj Phelios AB-2350 (ATTO). Tento luminometr je vybaven dlouhovlnným průchodovým filtrem 600 nm (R60 HOYA Co.), 600 nm LP, filtr 1) pro rozdělení luminiscence SLO ($\lambda_{\max} = 580$ nm) a SLR ($\lambda_{\max} = 630$ nm).

Pro stanovení prostupových koeficientů filtru 600 nm LP se nejprve pomocí purifikovaných enzymů luciferázy SLO a SLR změří i) intenzita SLO a intenzita bioluminiscence SLR bez filtru (F0), ii) intenzita bioluminiscence SLO a SLR, která prošla přes filtr 600 nm LP (filtr 1), a iii) vypočítají se prostupové koeficienty filtru 600 nm LP pro SLO a SLR uvedené níže.

Prostupové koeficienty		Zkratka	Definice
SLO	filtr 1 prostupové koeficienty	κO_{R60}	prostupový koeficient filtru u SLO
SLR	filtr 1 prostupové koeficienty	κR_{R60}	prostupový koeficient filtru u SLR

Když je ve zkušební vzorku definována intenzita SLO a SLR jako O, respektive R, i) je intenzita světla bez filtru (celooptický) F0 a ii) intenzita světla, které prochází přes filtr 600 nm LP (filtr 1) F1 popsána, jak je uvedeno níže.

$$F0 = O + R$$

$$F1 = \kappa O_{R60} \times O + \kappa R_{R60} \times R$$

Tyto vzorce lze vyjádřit takto:

$$\begin{pmatrix} F0 \\ F1 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1 & 1 \\ \kappa O_{R60} & \kappa R_{R60} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} O \\ R \end{pmatrix}$$

Poté můžete pomocí vypočtených činitelů prostupnosti (κO_{R60} a κR_{R60}) a změřených hodnot F0 a F1 vypočítat hodnoty O a R takto:

$$\begin{pmatrix} O \\ R \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1 & 1 \\ \kappa O_{R60} & \kappa R_{R60} \end{pmatrix}^{-1} \begin{pmatrix} F0 \\ F1 \end{pmatrix}$$

Materiál a metody pro stanovení činitele prostupnosti

1) Reagencie

Jednotlivé purifikované luciferázové enzymy:

lyofilizovaný purifikovaný enzym SLO

lyofilizovaný purifikovaný enzym SLR

(které byly pro validaci získány od společnosti GPC Lab. Co. Ltd., Tottori, Japonsko s buněčnou linií THP-G8)

Zkušební reagencie:

zkušební reagencie Tripluc® Luciferase (např. od společnosti TOYOBO kat. č. MRA-301)

Médium: pro analýzu luciferázy (30 ml, uchováváno při 2–8°C)

reagencie	konc.	konečná konc. v médiu	potřebné množství
RPMI-1640	–	–	27 ml
FBS	–	10 %	3 ml

2) Příprava enzymatického roztoku

Lyofilizovaný purifikovaný enzym luciferázy rozpustíte ve zkumavce s 200 µl 10 ~ 100 mM Tris/HCl nebo Hepes/HCl (pH 7,5 ~ 8,0) a doplňte 10 % (objemové hmotnosti) glycerolu, enzymatický roztok rozdělíte po 10 µl do jednorázových zkumavek o objemu 1,5 ml a uložte je do mrazničky při –80°C. Zmrazený enzymatický roztok můžete používat po dobu 6 měsíců. Při použití přidejte do každé zkumavky obsahující enzymatický roztok (naředěný enzymatický roztok) 1 ml média pro analýzu luciferázy (RPMI-1640 s 10 % FBS) a uložte je na led, abyste zabránili deaktivaci.

3) Měření bioluminiscence

Rozmrazte zkušební reagencii Tripluc® Luciferase (Tripluc) a nechte ji při pokojové teplotě ve vodní lázni nebo při teplotě okolního vzduchu. Luminometr zapněte 30 minut před zahájením měření, aby se stabilizoval fotonásobič. Přeneste 100 µl naředěného enzymatického roztoku do černé 96jamkové destičky (s plochým dnem) (referenční vzorek SLO do jamek B1, B2, B3, referenční vzorek SLR do jamek D1, D2, D3). Poté napipetujte 100 µl předem ohřátého přípravku Tripluc do každé jamky

destičky obsahující naředěný enzymatický vzorek. Pomocí třepačky protřepávejte destičku po dobu 10 minut při pokojové teplotě (přibližně 25°C). Pokud se v roztoku v jamkách objeví bublinky, odstraňte je. Destičku vložte do luminometru a změřte aktivitu luciferázy. Bioluminiscence se měří po dobu 3 sekund, a to bez optického filtru (F0) a s optickým filtrem (F1).

Prostupové koeficienty optického filtru byly vypočteny takto:

Prostupový koeficient (SLO ($\kappa_{O_{R60}}$)) = (#B1 z F1+ #B2 z F1+ #B3 z F1) / (#B1 z F0+ #B2 z F0+ #B3 z F0)

Prostupový koeficient (SLR ($\kappa_{R_{R60}}$)) = (#D1 z F1+ #D2 z F1+ #D3 z F1) / (#D1 z F0+ #D2 z F0+ #D3 z F0)

Vypočítané prostupové faktory se použijí pro všechna měření prováděná pomocí stejného luminometru.

Kontrola kvality vybavení

Použijí se postupy uvedené v protokolu k analýze IL-8 Luc (18).

Dodatek 3.3

LÁTKY PRO PROKÁZÁNÍ ZPŮSOBILOSTI

Dříve než začnou laboratoře běžně používat zkoušku popsanou v tomto dodatku ke zkušební metodě B.71, měly by prokázat odbornou způsobilost získáním předpokládané předpovědi analýzy IL-8 Luc u 10 vhodných látek doporučených v tabulce 1 a získáním hodnot, které spadají do příslušného referenčního rozpětí, u nejméně 8 z 10 vhodných látek (zvolených tak, aby zastupovaly celý rozsah odpovědí pro rizika senzibilizace kůže). Dalšími kritérii výběru bylo, aby látky byly komerčně dostupné, aby k nim byly k dispozici kvalitní referenční údaje *in vivo* a také kvalitní údaje *in vitro* získané analýzou IL-8 Luc. Pro analýzu IL-8 Luc jsou také k dispozici zveřejněné referenční údaje (6) (1).

Tabulka 1: Doporučené látky pro prokázání odborné způsobilosti k provádění analýzy IL-8 Luc

Látky pro prokázání způsobilosti	č. CAS	Skupenství	Rozpustnost v X-VIVO15 při 20 mg/ml	Předpověď <i>in vivo</i> ¹	Predikce podle IL- 8 Luc ²	Referenční rozpětí (µg/ml) ³	
						CV05 ⁴	IL-8 Luc MIT ⁵
2,4-dinitrochlorbenzen	97-00-7	pevná látka	nerozpustná	senzibilizující (extrémně)	pozitivní	2,3–3,9	0,5–2,3
formaldehyd	50-00-0	kapalina	rozpustná	senzibilizující (silně)	pozitivní	9–30	4–9
2-sulfanylbzothiazol	149-30-4	pevná látka	nerozpustná	senzibilizující (středně silně)	pozitivní	250–290	60–250
ethylendiamin	107-15-3	kapalina	rozpustná	senzibilizující (středně silně)	pozitivní	500–700	0,1–0,4
ethylenglykol-dimethakrylát	97-90-5	kapalina	nerozpustná	senzibilizující (slabě)	pozitivní	> 2000	0,04–0,1
4-allylanizol (estragol)	140-67-0	kapalina	nerozpustná	senzibilizující (slabě)	pozitivní	> 2000	0,01–0,07
streptomycin sulfát	3810-74-0	pevná látka	rozpustná	není senzibilizující	negativní	> 2000	> 2000
glycerol	56-81-5	kapalina	rozpustná	není senzibilizující	negativní	> 2000	> 2000
Propan-2-ol	67-63-0	kapalina	rozpustná	není senzibilizující	negativní	> 2000	> 2000

Zkratky: Číslo CAS = registrační číslo Chemical Abstracts Service

¹ Potence *in vivo* je odvozena s použitím kritérií navržených střediskem ECETOC (19).

² Na základě dosavadních pozorovaných hodnot (1) (6).

³ CV05 a IL-8 Luc MIT byly vypočteny pomocí rozpustnosti ve vodě uvedené v EPI Suite™.

⁴ CV05: minimální koncentrace, při níž vykazují chemické látky méně než 0,05 Inh-GAPLA.

⁵ MIT: nejnížší koncentrace, při níž chemická látka splňuje pozitivní kritéria.

Dodatek 3.4**INDEXY A KRITÉRIA POSUZOVÁNÍ****nIL8LA (nSLO-LA)**

Pro IL8LA (SLO-LA), respektive GAPLA (SLR-LA) se měří j-té opakování ($j = 1-4$) i-té koncentrace ($i = 0-11$). Normalizovaná IL8LA, označovaná nIL8LA (nSLO-LA), je definována jako:

$$nIL8LA_{ij} = IL8LA_{ij} / GAPLA_{ij}$$

Je to základní jednotka měření v této analýze.

Ind-IL8LA (FInSLO-LA)

Násobné zvýšení zprůměrované nIL8LA (nSLO-LA) pro opakování i-té koncentrace v porovnání s touto hodnotou při koncentraci 0, Ind-IL8LA je primárním měřítkem této analýzy. Tento poměr se zapisuje pomocí následující rovnice:

$$\text{Ind-IL8LA}_i = \{(1/4) \times \sum_j nIL8LA_{ij}\} / \{(1/4) \times \sum_j nIL8LA_{0j}\}$$

Vedoucí laboratoř navrhla, aby pozitivnímu výsledku pro zkoušenou chemickou látku odpovídala hodnota 1,4. Tato hodnota vychází ze studia dosavadních údajů vedoucí laboratoře. Tým pro správu dat poté používal tuto hodnotu ve všech fázích validační studie. Primární výsledek, Ind-IL8LA, je podíl dvou aritmetických průměrů, jak ukazuje rovnice.

95% konfidenční interval (95% CI)

Může být odhadnut 95% konfidenční interval (95% CI) na základě podílu, který ukazuje přesnost tohoto primárního výsledného měřítka. Dolní limit 95% CI ≥ 1 ukazuje, že nIL8LA v i-té koncentraci je významně větší než tato hodnota při kontrole s rozpouštědlem. 95% CI lze sestavit několika způsoby. V této studii jsme použili metodu známou jako Fiellerův teorém. Tento teorém 95% konfidenčního intervalu se získá z následujícího vzorce:

$$\left[\frac{-B - \sqrt{B^2 - 4AC}}{2A}, \frac{-B + \sqrt{B^2 - 4AC}}{2A} \right],$$

kde

$$A = \bar{x}_0^2 - t_{0,975(v)}^2 \times \frac{sd_0^2}{n_0}, \quad B = -2 \times \bar{x} \times \bar{y}, \quad C = \bar{y}_i^2 - t_{0,975(v)}^2 \times \frac{sd_{yi}^2}{n_{yi}} \text{ a } n_0 = 4,$$

$$\bar{x}_0 = (1/n_0) \times \sum_j nIL8LA_{0j}, \quad sd_0^2 = \{1/(n_0 - 1)\} \times \sum_j (nIL8LA_{0j} - \bar{x}_0)^2,$$

$$n_{yi} = 4, \bar{y}_i = (1/n_{yi}) \times \sum_j (nIL8LA_{ij}), sd_{yi}^2 = \{1/(n_{yi} - 1)\} \times \sum_j (nIL8LA_{ij} - \bar{y}_i)^2.$$

$t_{0.975(v)}$ je 97,5 percentil centrálního t rozdělení s v stupněmi volnosti, kde

$$v = \left(\frac{sd_0^2}{n_0} + \frac{sd_{yi}^2}{n_{yi}} \right) / \left\{ \left(\frac{sd_0^2}{n_0} \right)^2 / (n_0 - 1) + \left(\frac{sd_{yi}^2}{n_{yi}} \right) / (n_{yi} - 1) \right\}.$$

Inh-GAPLA (II-SLR-LA)

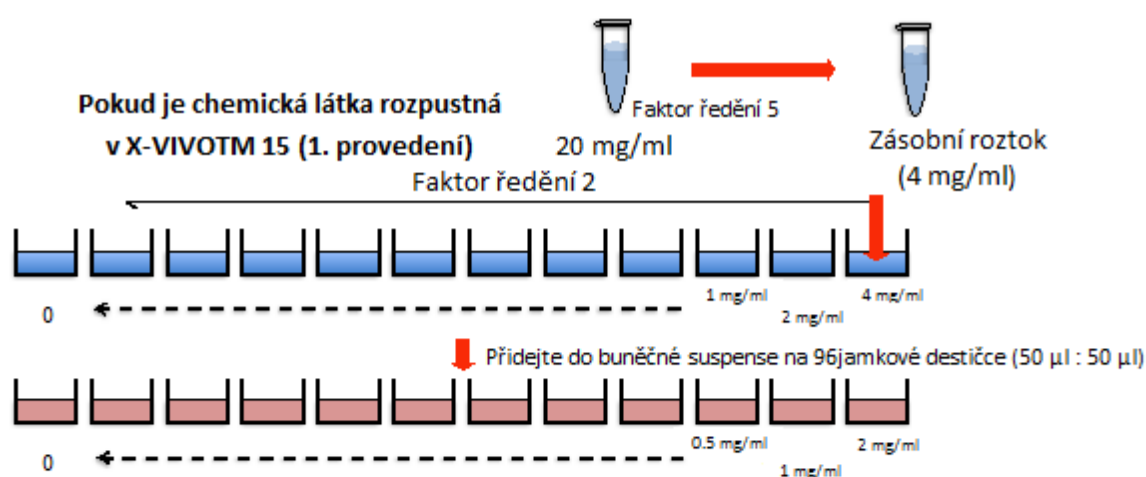
Inh-GAPLA je poměr zprůměrované GAPLA (SLR-LA) pro opakování i-té koncentrace v porovnání s koncentrací u kontroly s rozpouštědlem a zapisuje se jako

$$Inh - GAPLA_i = \{(1/4) \times \sum_j GAPLA_{ij}\} / \{(1/4) \times \sum_j GAPLA_{0j}\}.$$

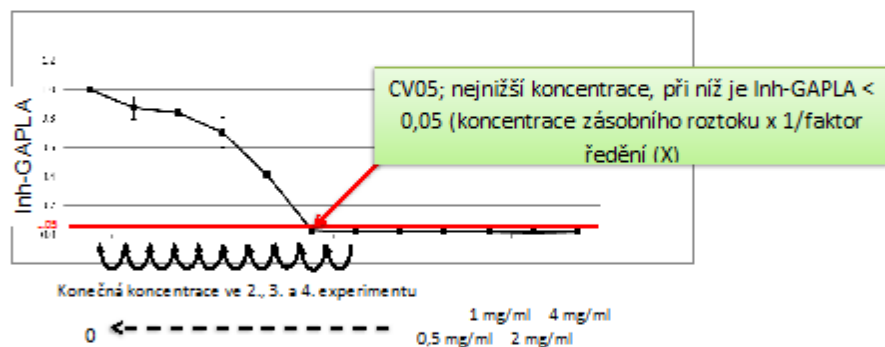
Protože GAPLA je jmenovatelem nIL8LA, působí extrémně malá hodnota velkou odchylku v nIL8LA. Hodnoty Ind-IL8LA s extrémně malou hodnotou Inh-GAPLA (méně než 0,05) mohou být tedy považovány za špatnou přesnost.

Dodatek 3.5**SCHÉMA METOD ROZPOUŠTĚNÍ CHEMICKÝCH LÁTEK PRO ANALÝZU IL-8 LUC.**

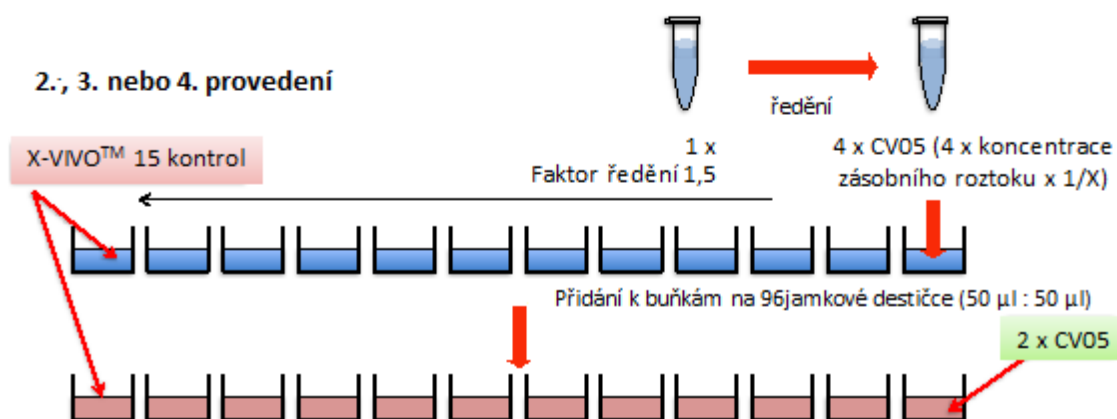
a) Pro chemické látky rozpustné v X-VIVO™ 15 při 20 mg/ml



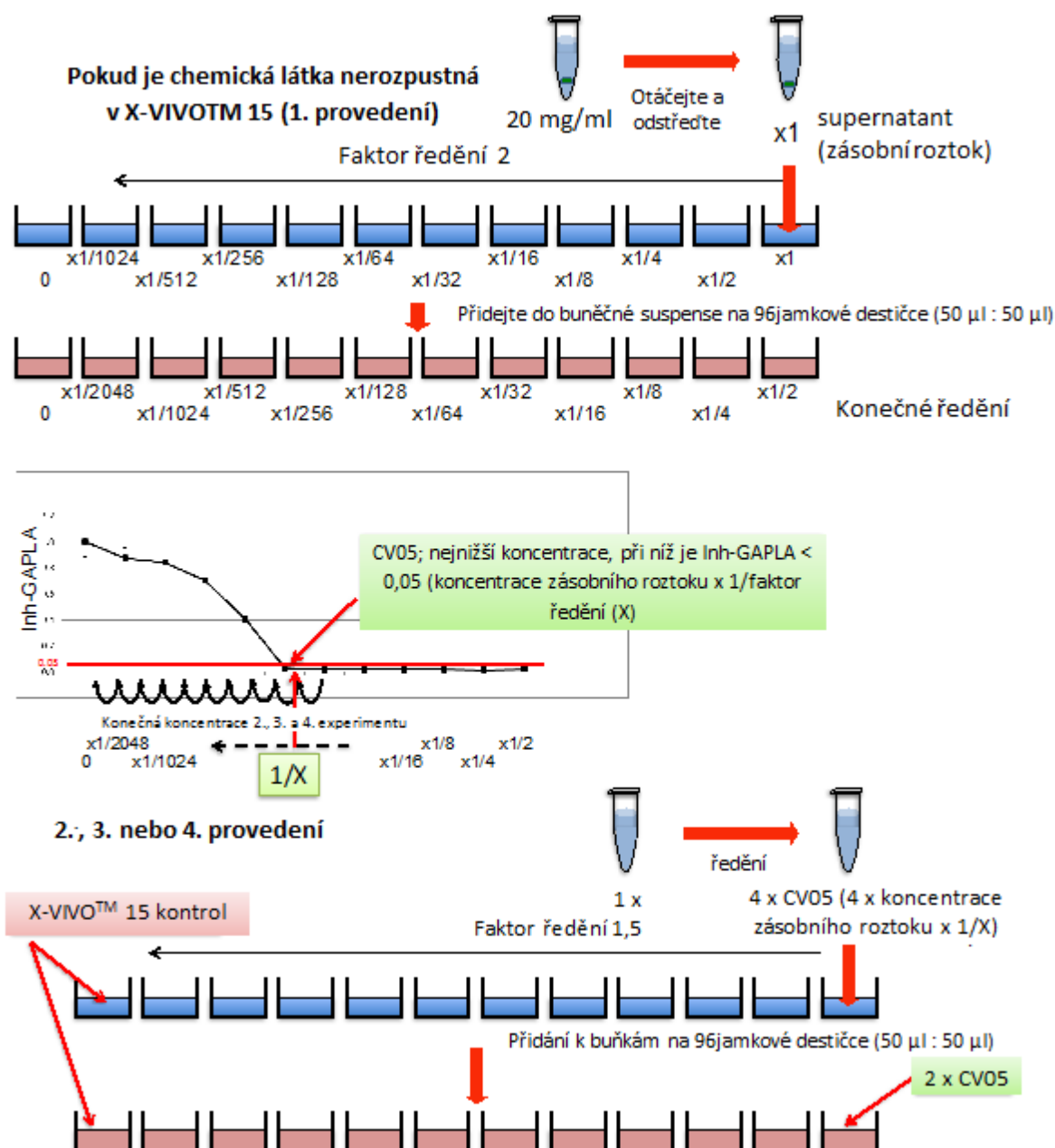
Určete nejvyšší koncentraci v následujících experimentech



2., 3. nebo 4. provedení

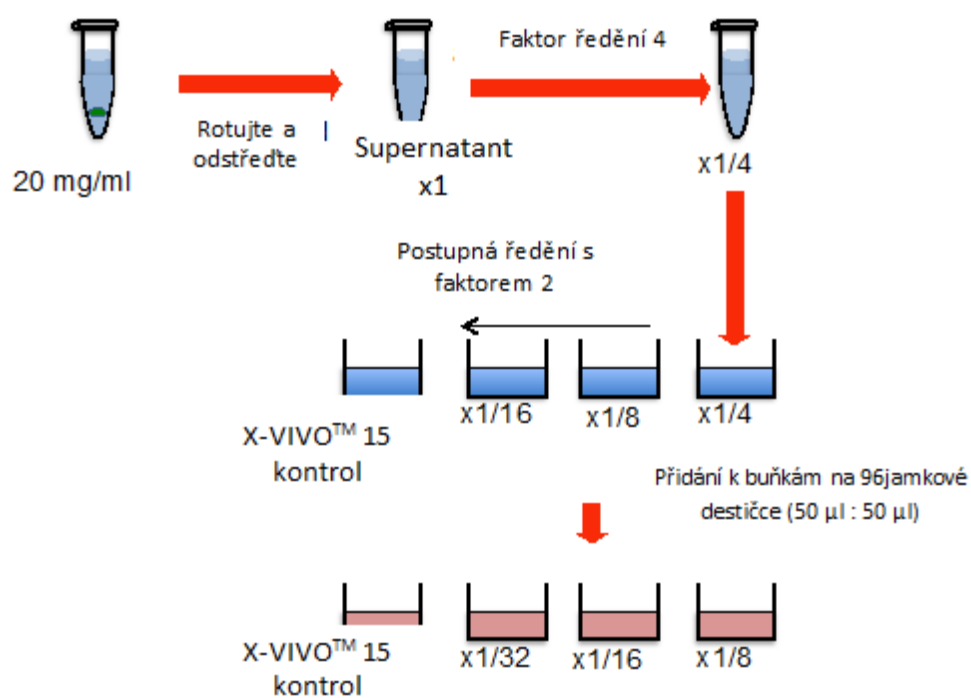


b) Pro chemické látky nerozpustné v X-VIVO™ 15 při 20 mg/ml



Dodatek 3.6**SCHÉMA METOD ROZPOUŠTĚNÍ 4-NBB PRO POZITIVNÍ KONTROLU ANALÝZY IL-8 LUC.**

Pozitivní kontrola: 4-NBB (nerozpustná v X-VIVO™ 15)



9) V části C se doplňují tyto kapitoly:

„C.52 ROZŠÍŘENÁ JEDNOGENERAČNÍ ZKOUŠKA REPRODUKCE HALANČÍKA JAPONSKÉHO (MEOGRT)

ÚVOD

1. Tato zkušební metoda odpovídá pokynu OECD pro zkoušení (TG) 240 (2015). Rozšířená jednogenerační zkouška reprodukce halančíka japonského (MEOGRT) popisuje souhrnnou zkušební metodu založenou na rybách exponovaných v několika generacích, aby byly získány údaje relevantní pro ekologickou nebezpečnost a posouzení rizik chemických látek, včetně pravděpodobných endokrinních disruptorů (EDC). Expozice v MEOGRT pokračuje až do vylíhnutí (do dvou týdnů po fertilizaci) v druhé (F2) generaci. Pro odůvodnění užitečnosti rozšíření generace F2 do doby po vylíhnutí by byly nutné další studie; v současnosti nejsou k dispozici dostatečné informace, aby bylo možné stanovit relevantní podmínky nebo kritéria pro rozšíření generace F2. Tato zkušební metoda se však může aktualizovat, tak jak budou zohledňovány nové informace a údaje. Například pokyn k rozšíření generace F2 prostřednictvím reprodukce může být za určitých podmínek potenciálně užitečný (např. chemické látky s vysokým potenciálem biokoncentrace nebo indikacemi mezigeneračních účinků u jiných taxonů). Tato zkušební metoda se může používat na posouzení potenciálních chronických účinků chemických látek, včetně potenciálních endokrinních disruptorů, na ryby. Metoda klade primární důraz na potenciální účinky relevantní pro populaci (a to negativní dopady na přežití, vývoj, růst a reprodukci) pro výpočet koncentrace bez pozorovaných účinků (NOEC) nebo účinné koncentrace (EC_x), ačkoliv je třeba poznamenat, že metody EC_x jsou jen zřídka vhodné pro velké studie tohoto typu, kde může být nepraktické zvyšovat počet zkušebních koncentrací, aby bylo možné stanovit požadovanou EC_x , což může také způsobit významné problémy v oblasti dobrých životních podmínek zvířat vzhledem k velkému počtu použitých zvířat. Pro chemické látky, které nevyžadují hodnocení „několika generací“, nebo chemické látky, které nejsou potenciálními endokrinními disruptory mohou být vhodnější jiné zkušební metody (1). Vhodným druhem pro použití u této zkušební metody je halančík japonský vzhledem k jeho krátkému životnímu cyklu a možnosti stanovit jeho genetické pohlaví (2), což je považováno za kritickou součást této zkušební metody. Konkrétní metody a sledované cílové parametry popsané v této metodě jsou použitelné u halančíka japonského samotného. Jiné druhy malých ryb (např. danio pruhované) mohou být adaptovány na podobný zkušební protokol.
2. Tato zkušební metoda měří několik biologických cílových parametrů. Primární důraz je kladen na relevantní parametry, a to potenciální nežádoucí účinky na populaci, včetně přežití, celkového vývoje, růstu a reprodukce. Sekundárně za účelem zajištění

mechanistických informací a spojení mezi výsledky z jiných druhů terénních a laboratorních studií, pokud budou dodatečně zjištěny důkazy, že chemická látka působí jako potenciální endokrinní disruptor (např. androgenní nebo estrogenní aktivita v jiných zkouškách a analýzách), se další užitečné informace získávají měřením mRNA *vitelogeninu* (*vltg*) (nebo bílkoviny vitelogeninu, VTG), fenotypových sekundárních pohlavních charakteristik (SSC) souvisejících s genetickým pohlavím a vyhodnocením histopatologie. Je třeba poznamenat, že pokud neexistuje podezření, že zkoušená chemická látka nebo její metabolity jsou endokrinní disruptory, nemusí být nutné měřit tyto sekundární cílové parametry a může být vhodnější použít studie, které jsou méně náročné na zdroje a zvířata (1). Definice použité v této zkušební metodě jsou uvedeny v dodatku 1.

VÝCHOZÍ ÚVAHY A OMEZENÍ

3. Vzhledem k omezenému počtu zkoušených chemických látek a laboratoří zapojených do validace této dosti složité analýzy lze předpokládat, že až bude k dispozici dostatečný počet studií k posouzení účinnosti experimentálního uspořádání této nové metody, bude zkušební metoda přezkoumána a v případě potřeby bude revidována z hlediska nabytých zkušeností. Údaje mohou být použity na úrovni 5 koncepčního rámce OECD pro zkoušení a posuzování endokrinních disruptorů (3). Zkušební metoda začíná expozicí dospělých ryb (generace F0) zkoušené chemické látky v průběhu reprodukční fáze. Expozice pokračuje po dobu vývoje a reprodukce v generaci F1 a líhnutí v generaci F2; analýza tak umožňuje hodnocení strukturálních a aktivačních endokrinních drah. Při interpretaci cílových parametrů souvisejících s endokrinním systémem může být provedena analýza průkaznosti výsledků.
4. Zkouška by měla zahrnovat adekvátní počet jednotlivců, aby byla zajištěna dostatečná síla na hodnocení cílových parametrů relevantních pro reprodukci (viz dodatek 3) a aby bylo zároveň zajištěno, že počet použitých zvířat je minimální potřebný počet s ohledem na dobré životní podmínky zvířat. Vzhledem k velkému počtu použitých pokusných zvířat je důležité pečlivě zvažovat, zda je nutné zkoušku provést s ohledem na existující údaje, které již mohou obsahovat podstatné informace o mnoha cílových parametrech ve zkoušce MEOGRT. V tomto směru může určitou pomoc poskytnout rámec OECD pro zkoušení toxicity na rybách (1).
5. Tato zkušební metoda je primárně určena na rozlišení účinků jedné látky. Pokud je však potřebná zkouška směsi, je třeba zvážit, zda poskytne přijatelné výsledky pro zamýšlený právní účel.
6. Před zahájením zkoušky je důležité mít informace o fyzikálně chemických vlastnostech zkoušené chemické látky, zejména proto, aby bylo možné připravit stabilní chemické

roztoky. Rovněž je nutné mít adekvátně citlivou analytickou metodu pro ověření koncentrací zkoušené chemické látky.

PODSTATA ZKOUŠKY

7. Zkouška se zahajuje exponováním pohlavně zralých samců a samic (alespoň 12 týdnů po fertilizaci) v chovných párech po dobu 3 týdnů, během nichž se zkoušená chemická látka distribuuje v organismu rodičovské generace (F0) podle svého toxikokinetického chování. Pokud možno co nejbližší prvnímu dni čtvrtého týdne se sesbírají vajíčka a zahájí se generace F1. V průběhu chovu generace F1 (celkem 15 týdnů) se posuzuje líhnivost a přežití. Kromě toho se 9–10 týdnů po fertilizaci odeberou vzorky ryb pro stanovení vývojových cílových parametrů a od 12. do 14. týdne po fertilizaci se posuzuje tření. Po třetím týdnu posuzování reprodukce a chovu až do ukončení líhnutí se zahajuje generace F2.

KRITÉRIA PLATNOSTI ZKOUŠKY

8. Použijí se tato kritéria platnosti zkoušky:
 - koncentrace rozpuštěného kyslíku by po celou dobu zkoušky měla být $\geq 60\%$ nasycení vzduchem,
 - střední teplota vody by se měla po celou dobu trvání studie pohybovat mezi 24 a 26 °C. Krátké odchylky od střední teploty v jednotlivých akváriích by neměly být větší než 2 °C,
 - střední plodivost kontrol v každé generaci (F0 a F1) by měla být větší než 20 vajíček na pár denně. Fertilita všech vajíček vyprodukovaných v průběhu posuzování by měla být větší než 80 %. Kromě toho 16 z doporučených 24 kontrolních chovných párů ($> 65\%$) by mělo vyprodukovat více než 20 vajíček na pár denně,
 - líhnivost vajíček by u kontrol měla být $\geq 80\%$ (průměr) (v každé generaci F1 a F2),
 - přežití po vylíhnutí do 3. týdne po fertilizaci a od 3. týdne po fertilizaci až do ukončení zkoušky pro generaci F1 (tj. 15 týdnů po fertilizaci) by u kontrol (F1) mělo být $\geq 80\%$ (průměr), respektive $\geq 90\%$ (průměr),
 - měly by být k dispozici důkazy pro prokázání toho, že koncentrace zkoušené chemické látky v roztoku byly uspokojivě udržovány v rozmezí $\pm 20\%$ od středních naměřených hodnot.

Co se týká teploty vody, i když nejde o kritérium platnosti, replikáty v rámci expozice by se neměly vzájemně statisticky odlišovat a ani expoziční skupiny v rámci zkoušky by se neměly statisticky odlišovat (na základě denního měření teploty, s vyloučením krátkých odchylek).

9. I když může být ve skupinách s vyšší expozicí pozorována snížená reprodukce, mělo by docházet k dostatečné reprodukci alespoň v třetí nejvyšší skupině a ve všech nižších skupinách generace F0, aby se naplnily inkubátory. Kromě toho by mělo být adekvátní přežití embryí v třetí nejvyšší a v nižších expozičních skupinách generace F1, aby bylo možné hodnotit cílový parametr při odebrání vzorků nedospělých zvířat (viz odstavce 36 a 38 a dodatek 9). Dále by mělo být alespoň minimální přežití po vylíhnutí (~20 %) v druhé nejvyšší expoziční skupině generace F1. Nejde o kritéria platnosti jako taková, ale o doporučení, aby bylo možné vypočítat robustní koncentrace bez pozorovaných účinků (NOEC).
10. Je-li zjištěna odchylka od kritérií platnosti zkoušky, měly by být zváženy důsledky z hlediska spolehlivosti výsledků zkoušek a tyto odchylky a úvahy by měly být zahrnuty do závěrečné zprávy.

POPIS METODY

Přístroje a pomůcky

11. Normální laboratorní vybavení, a zejména:

- a) oximetr a pH-metr;
- b) vybavení pro stanovení tvrdosti a alkality vody;
- c) vhodné zařízení pro regulaci teploty a pro její pokud možno nepřetržité sledování;
- d) nádrže z chemicky inertního materiálu o vhodném objemu vzhledem k doporučené velikosti násady a hustotě obsádky (viz dodatek 3);
- e) dostatečně přesné váhy (tj. vážící s přesností na $\pm 0,5$ mg).

Voda

12. Jako zkušební voda může být použita jakákoli voda, v níž zkušební druh dlouhodobě přežívá a roste. Po celou dobu zkoušky by měla mít stejnou kvalitu. Pro ujištění, že ředící voda nebude mít přílišný vliv na výsledky zkoušky (například tvorbou komplexů se zkoušenou látkou) nebo nepříznivý vliv na stav matečných ryb, by měly být odebírány v pravidelných intervalech její vzorky pro analýzu. Je-li kvalita ředící vody relativně konstantní, mělo by být stanovení těžkých kovů (např. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni), hlavních aniontů a kationtů (např. Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , K^+ , Cl^- , SO_4^{2-}), pesticidů, celkového obsahu organického uhlíku a suspendovaných látek provedeno např. každých šest měsíců. Některé chemické charakteristiky doporučené ředící vody jsou uvedeny v dodatku 2. Hodnota pH by měla být v rozmezí 6,5 až 8,5, avšak během zkoušky by se pH nemělo lišit o více než $\pm 0,5$.

Systém expozice

13. Návrh a materiály použité pro systém expozice nejsou stanoveny. Pro výstavbu zkušebnímu systému by mělo být použito sklo, nerezavějící ocel nebo jiný chemicky inertní materiál, který nebyl kontaminován v průběhu předchozích zkoušek. Pro účely této zkoušky může vhodný systém expozice sestávat z kontinuálního průtokového systému (4)(5)(6)(7)(8)(9)(10)(11)(12)(13).

Zkušební roztoky

14. Zásobní roztok zkoušené chemické látky se do systému expozice přivádí vhodným čerpadlem. Průtok zásobního roztoku by měl být kalibrován v souladu s analytickým potvrzením zkušebních roztoků před zahájením expozice a v průběhu zkoušky by měl být pravidelně kontrolován jeho objem. Zkušební roztok v každé komoře se adekvátně vyměňuje (např. minimálně 5krát/den až 16krát/den nebo max. průtok 20 ml/min) v závislosti na stabilitě zkoušené chemické látky a kvalitě vody.
15. Zkušební roztoky o zvolených koncentracích se připraví ředěním zásobního roztoku. Zásobní roztok by měl být připraven přednostně jednoduchým mechanickým mícháním nebo protřepáváním zkoušené chemické látky v ředící vodě (např. mechanickým mícháním nebo pomocí ultrazvuku). Pro dosažení vhodné koncentrace zásobního roztoku mohou být použity syticí kolony/systémy nebo metody pasivního dávkování (14). Měla by být vynaložena maximální snaha nepoužívat rozpouštědla nebo nosiče, protože: 1) některá rozpouštědla sama o sobě mohou vyvolávat toxicitu anebo nežádoucí či neočekávané odpovědi, 2) zkoušené chemické látky v koncentraci vyšší, než je jejich rozpustnost ve vodě (což se může často stát při použití rozpouštědel), mohou způsobit nepřesné stanovení účinných koncentrací, 3) použití rozpouštědel u dlouhodobějších zkoušek může mít za následek značný vznik „biofilmu“ souvisejícího s mikrobiální aktivitou, což může mít vliv na okolní podmínky i na schopnost udržet expoziční koncentrace a 4) v případě, že nejsou k dispozici dřívější údaje, které prokazují, že rozpouštědlo neovlivňuje výsledek studie, vyžaduje použití rozpouštědel kontrolu s rozpouštědlem, což má dopady na dobré životní podmínky zvířat, neboť k provedení zkoušky jsou potřebná další zvířata. V případě chemických látek, jejichž zkoušení je obtížné, lze použít rozpouštědlo jako poslední řešení, a určení, jaká metoda je nejvhodnější, by mělo vycházet z metodického dokumentu OECD č. 23 ke zkouškám toxicity složitých látek a směsí pro vodní organismy (15). Volba rozpouštědla se bude řídit chemickými vlastnostmi dané chemické látky a dostupností dosavadních údajů o používání rozpouštědla. Jsou-li použita jako nosiče rozpouštědla, je nutné vyhodnotit kontrolní měření nejen při použití vhodného rozpouštědla, ale i při kontrolách (negativních), kdy se rozpouštědlo nepoužije (pouze ředící voda). V případě, že se použití rozpouštědla nelze vyhnout a dojde k mikrobiální aktivitě (vznik biofilmu), doporučuje se zaznamenávat/vykázat vznik biofilmu v každé nádrži (alespoň týdně) po

celou dobu zkoušky. Ideálně by se měla udržovat konstantní koncentrace rozpouštědla při kontrole s rozpouštědlem a při všech zkušebních expozicích. Jestliže koncentrace rozpouštědla není udržována v konstantní výši, je třeba při kontrole s rozpouštědlem použít nejvyšší koncentraci rozpouštědla při zkušební expozici. V případech, kdy je použito nosné rozpouštědlo, neměla by maximální koncentrace rozpouštědla překročit 100 µl/l nebo 100 mg/l (15) a doporučuje se udržovat koncentraci rozpouštědla co možná nejnižší (např. < 20 µl/l) aby se zamezilo potenciálnímu účinku rozpouštědla na měřené ukazatele (16).

Zkušební organismy

Výběr a chov ryb

16. Zkušebním druhem je halančík japonský *Oryzias latipes* vzhledem k jeho krátkému životnímu cyklu a možnosti určit genetické pohlaví. I když mohou být na podobný zkušební protokol adaptovány jiné druhy malých ryb, konkrétní metody a sledované cílové parametry popsané v této zkušební metodě jsou použitelné pouze u halančíka japonského (viz odstavec 1). Halančíka japonského lze snadno přimět, aby se rozmnožoval v zajetí; pro jeho chov existují publikované metody (17) (18) (19) a k dispozici jsou údaje z krátkodobých zkoušek letality, raného vývojového stádia i celého životního cyklu (5) (6) (8) (9) (20). Všechny ryby se chovají v režimu 16 h světlo, 8 h tma. Ryby se krmí živými larvami (nauplie) žábřonožky (druh *Artemia*), které mohou být v případě potřeby doplněny komerčně dostupným vločkovým krmivem. Komerčně dostupné vločkové krmivo by se mělo pravidelně analyzovat, aby se zjistila přítomnost kontaminantů.
17. Pokud jsou dodržovány vhodné metody chovu, není nutný žádný konkrétní kultivační protokol. Halančík japonský může být chován například ve dvoulitrových nádržích s 240 rybími larvami v každé nádrži do 4. týdne po fertilizaci, poté mohou být ryby chovány ve dvoulitrových nádržích s 10 rybami v každé nádrži do 8. týdne po fertilizaci, kdy se přemísť v chovných párech do dvoulitrových nádrží.

Aklimatizace a výběr ryb

18. Zkušební ryby by měly pocházet z laboratorní populace, která byla alespoň dva týdny před zkouškou udržována v podmínkách kvality vody a osvětlení podobných podmínkám použitým ve zkoušce (poznámka: toto aklimatizační období není předexpoziční období *in situ*). Doporučuje se, aby testovací ryby byly pořizovány z vlastní kultivace, neboť přeprava dospělých ryb je stresující a může narušit spolehlivé tréní. Ryby se krmí larvami (nauplia) žábřonožky dvakrát denně po celou dobu chovného období i v průběhu expoziční fáze a v případě potřeby mohou být dokrmovány komerčně dostupným vločkovým krmivem. Aby byla zajištěna adekvátní replikace, považuje se za potřebné zahájit tuto zkoušku minimálně se 42 chovnými páry (54 chovnými páry, jestliže je vyžadována kontrola s rozpouštědlem částečně v důsledku nedostatku dřívějších údajů na podporu

použití pouze kontroly s rozpouštědlem). Dále je třeba ověřit, že každý chovný pár generace F0 je XX-XY (tj. normální komplement pohlavních chromozomů u každého pohlaví), aby nedošlo k možnému zahrnutí spontánních samců XX (viz odstavec 39).

19. V průběhu aklimatizační fáze se zaznamenává mortalita chovaných ryb, přičemž po 48hodinovém stabilizačním období se použijí tato kritéria:

- mortalita větší než 10 % chované populace za sedm dnů před přemístěním do zkušebního systému: vyměnit celou obsádku,
- mortalita mezi 5 % a 10 % populace za sedm dnů před přemístěním do zkušebního systému: aklimatizace po dobu sedmi dalších dnů až dvoutýdenní aklimatizační období; je-li mortalita během následujících sedmi dnů větší než 5 %, vymění se celá obsádka,
- mortalita menší než 5 % populace za sedm dnů před přemístěním do zkušebního systému: násada se přijímá.

20. Během dvoutýdenního aklimatizačního období před zkouškou a během expozice nesmí být u ryb léčeny žádné nemoci a léčba nemocí by měla být pokud možno zcela vyloučena. Ryby s klinickými známkami onemocnění by neměly být ve studii používány. Měl by být veden záznam pozorování a všech profylaktických a terapeutických ošetření nemocí v průběhu chovného období předcházejícího zkoušce.

21. Fáze expozice začíná s pohlavně dimorfními dospělými rybami s geneticky stanoveným pohlavím z laboratorní dodávky reprodukčně zralých zvířat chovaných při 25 ± 2 °C. Ryby by měly být prokazatelně chovné (tj. ryby, které měly životaschopné potomstvo) v průběhu týdne před expozicí. Rozpětí individuálních hmotností podle pohlaví na začátku zkoušky by pro celou skupinu ryb použitých ve zkoušce mělo být pokud možno ± 20 % aritmetického průměru hmotností stejného pohlaví. Před zkouškou by se měl zvážit menší vzorek ryb s cílem odhadnout střední hodnotu hmotnosti. Vybrané ryby by měly být alespoň 12 týdnů po fertilizaci a měly by vyvážit ≥ 300 mg u samic a ≥ 250 mg u samečků.

USPOŘÁDÁNÍ ZKOUŠKY

Zkušební koncentrace

22. Doporučuje se použít pět koncentrací chemické látky plus kontrolu (kontroly). Při výběru rozmezí zkušebních koncentrací by měly být zvažovány všechny zdroje informací, včetně kvantitativních vztahů mezi strukturou a aktivitou (QSAR), údajů odvozených z analogických látek, výsledků zkoušek na rybách, jako jsou analýzy akutní mortality (kapitola C.1 této přílohy), krátkodobá analýza reprodukce ryb (kapitola C.48 této přílohy) a další zkušební metody např. kapitoly C.15, C.37, C.41, C.47 nebo C.49 této přílohy (21)

(22) (23) (24) (25) (26), jestliže jsou k dispozici, nebo v případě potřeby ze zkoušky ke stanovení rozsahu, případně včetně reprodukční fáze. V případě potřeby může být provedena zkouška ke stanovení rozsahu za podmínek (kvalita vody zkušební systém, násada) podobných podmínkám použitým v hlavní zkoušce. Jestliže je nezbytné použít rozpouštědlo a nejsou k dispozici žádné předchozí údaje, může být k určení vhodnosti rozpouštědla použita zkouška ke stanovení rozsahu. Nejvyšší zkušební koncentrace by neměla překročit rozpustnost látky ve vodě, 10 mg/l nebo 1/10 z 96h-LC50 (27). Nejnižší koncentrace by měla být 10krát až 100krát nižší než nejvyšší koncentrace. Použití pěti koncentrací v této zkoušce umožňuje nejen změřit vztah mezi dávkou a odpovědí, ale poskytuje také nejnižší koncentraci s pozorovaným účinkem (LOEC) a koncentraci bez pozorovaných účinků (NOEC), které jsou v některých regulačních programech nebo jurisdikcích nezbytné pro posouzení rizik. Obecně je rozdíl mezi nominálními koncentracemi zkoušené chemické látky mezi jednotlivými úrovněmi expozice $\leq 3,2$.

Replikáty ve zkušebních skupinách a kontrolách

23. Mělo by být použito minimálně šest replikátů zkušebních komor na každou zkoušenou koncentraci (viz dodatek 7). V průběhu reprodukční fáze (s výjimkou generace F0) se struktura replikací u hodnocení plodivosti zdvojnásobí, přičemž každý replikát má pouze jeden chovný pár (viz odstavec 42).
24. Kromě zkušebních koncentrací by měla být nasazena kontrolní skupina v ředící vodě a podle potřeby kontrolní skupina s rozpouštědlem. Pro kontroly se použije dvojitý počet replikátů komor, aby byla zajištěna adekvátní statistická síla (tj. pro kontroly by mělo být použito alespoň dvanáct replikátů). V průběhu reprodukční fáze se počet replikátů v kontrolách zdvojnásobí (tj. minimálně 24 replikátů a každý replikát má jen jeden chovný pár). Po reprodukci by měly kontrolní replikáty obsahovat maximálně 20 (rybích) embryí.

POSTUP

Zahájení zkoušky

25. Reprodukčně aktivní dospělé ryby použité pro zahájení generace F0 zkoušky se vybírají podle dvou kritérií: věku (obvykle více než 12 týdnů po fertilizaci, ale doporučuje se nepřekračovat 16 týdnů po fertilizaci) a hmotnosti (měla by být ≥ 300 mg u samic a ≥ 250 mg u samečků).
26. Páry samička-sameček, které splňují výše uvedené specifikace, se při zahájení zkoušky přemístí jako jednotlivé páry do každého replikátu nádrže, tj. dvanáct replikátů v kontrolních skupinách a šest replikátů ve skupinách exponovaných chemické látce. Tyto nádrže se náhodně rozdělí na expozice (např. T1–T5 a kontrola) a replikát (např. A–L u

kontrol a A–F u expozice) a poté se umístí do expozičního systému s příslušným průtokem do každé nádrže.

Podmínky expozice

27. Úplný souhrn zkušebních parametrů a podmínek lze najít v dodatku 3. Při dodržení těchto specifikací by kontrolní ryby měly mít hodnoty sledovaných parametrů podobné hodnotám uvedeným v dodatku 4.
28. V průběhu zkoušky se měří alespoň v jedné zkušební nádrži každé expoziční skupiny a kontroly množství rozpuštěného kyslíku, pH a teplota. S výjimkou teploty by se měla tato měření provádět minimálně jednou týdně po celou dobu expozice. Střední teplota vody by se měla po celou dobu zkoušky pohybovat mezi 24 a 26 °C. Teplota by se měla měřit každý den po celou dobu expozice. Hodnota pH by měla být v rozmezí 6,5 až 8,5, avšak během zkoušky by se pH nemělo lišit o více než $\pm 0,5$. Replikáty v rámci expozice by se neměly vzájemně statisticky odlišovat a ani expoziční skupiny v rámci zkoušky by se neměly statisticky odlišovat (na základě denního měření teploty, s vyloučením krátkých odchylek).

Doba trvání expozice

29. Ve zkoušce jsou pohlavně reprodukční ryby exponovány od generace F0 po dobu tří týdnů. V týdnu 4 přibližně v den zkoušky 24 se založí generace F1 a chovné páry z generace F0 se humánně usmrtí a zaznamená se jejich hmotnost a délka (viz odstavec 34). Poté následuje expozice generace F1 po dobu dalších 14 týdnů (celkem 15 týdnů u generace F1) a generace F2 po dobu dvou týdnů až do vylíhnutí. Celková doba trvání zkoušky je primárně 19 týdnů (tj. až do vylíhnutí generace F2). Časové plány zkoušky jsou uvedeny v tabulce 2 a dále podrobně vysvětleny v dodatku 9.

Krmný režim

30. Ryby mohou být krmeny libovolně dlouho žábřonožkou, rod *Artemia*, (24 hodin staré larvy) a v případě potřeby doplňkově komerčně dostupným vločkovým krmivem. Komerčně dostupné vločkové krmivo by mělo být pravidelně analyzováno, zda neobsahuje kontaminanty, např. organochlorové pesticidy, polycyklické aromatické uhlovodíky (PAH) a polychlorované bifenylly (PCB). Měla by být vyloučena potrava se zvýšenou hladinou endokrinně aktivních látek (tj. fytoestrogenů), která by mohla narušit odpověď zkoušky. Nespotřebovaná potrava a výkaly se ze zkušebních nádrží odstraňují podle potřeby, např. opatrným odsátím ze dna jednotlivých nádrží pomocí odsávačky. Jednou nebo dvakrát týdně je třeba vyčistit také stěny a dno každé nádrže (např. oškrábáním špachtlí). Příklad harmonogramu krmení lze najít v dodatku 5. Množství krmiva závisí na počtu ryb v každém replikátu. Proto se množství krmiva sníží, pokud v replikátu došlo k úhynu.

Analytické stanovení a měření

31. Před započítáním předexpoziční doby je třeba zajistit řádné fungování systému dávkování chemických látek. Měly by se stanovit všechny analytické metody, které budou zapotřebí, včetně dostatečných znalostí o stabilitě chemické látky ve zkušebním systému. Během zkoušky se koncentrace zkoušené látky určují ve vhodných intervalech, nejlépe alespoň každý týden v jednom replikátu u každé expoziční skupiny, přičemž replikáty ve stejné expoziční skupině se každý týden střídají.
32. V průběhu zkoušky se průtoky ředicího a zásobního roztoku v určitých intervalech kontrolují (např. minimálně třikrát týdně). Doporučuje se zakládat výsledky na naměřených koncentracích. Udržela-li se však koncentrace zkoušené chemické látky v roztoku během celé zkoušky uspokojivě v rozmezí $\pm 20\%$ středních naměřených hodnot, lze výsledky zakládat na jmenovitých nebo změřených hodnotách. V případě chemických látek, které se v rybách výrazně akumulují, se mohou zkušební koncentrace snižovat s tím, jak ryba roste. V těchto případech se doporučuje upravit rychlost výměny zkušebního roztoku v každé komoře tak, aby byly zkušební koncentrace udrženy v maximální možné míře konstantní.

Pozorování a měřené parametry

33. Měřené parametry zahrnují plodivost, fertilitu, líhnutí, růst a přežití za účelem zhodnocení možných účinků na úrovni populace. Také pozorování chování by se mělo provádět denně a každé neobvyklé chování by se mělo zaznamenat. Další mechanistické parametry zahrnují hladiny hepatické *vgt* mRNA nebo bílkoviny VTG určené na základě imunotestu (28), pohlavní fenotypové markery, jako jsou charakteristické samčí papily na řitní ploutvi, histologické vyšetření pohlaví podle gonád a histopatologické vyšetření ledvin, jater a gonád (viz seznam parametrů v tabulce 1). Všechny tyto specifické parametry se hodnotí v souvislosti s určením genetického pohlaví jednotlivce podle přítomnosti nebo nepřítomnosti genu *dmy* určujícího samčí pohlaví halančíka japonského (viz odstavec 41). Dále se hodnotí také doba do tření. Kromě toho lze jednoduché podíly fenotypového pohlaví odvodit podle informací o počtu papil na řitní ploutvi, které definují jednotlivé halančíky japonské jako samičky nebo samečky. Od této zkušební metody nelze očekávat, že bude detekovat menší odchylky od očekávaného podílu pohlaví, protože relativně malé počty ryb v každém replikátu nezajišťují dostatečnou statistickou sílu. V průběhu histopatologického vyšetření se také hodnotí gonády a provádí se mnohem silnější analýzy pro stanovení fenotypu gonád v souvislosti s genetickým pohlavím.
34. Hlavním účelem této zkušební metody je posoudit potenciální účinky zkoušené chemické látky relevantní pro populaci. Mechanistické parametry (VTG, SSC a některé účinky na histopatologii gonád) mohou rovněž pomoci při určování, zda je některý účinek zprostředkován endokrinní aktivitou. Tyto mechanistické parametry však mohou být

rovněž ovlivněny systémovými a jinými toxicitami. Proto může být také detailně posuzována histopatologie jater a ledvin, což pomůže lépe pochopit odpovědi u mechanistických cílových parametrů. I když se však neprovedou tato podrobná hodnocení, je třeba přesto zaznamenávat a vykázat hrubé abnormality zpozorované náhodně při histopatologickém vyšetření.

Humánní usmrcení ryb

35. Při ukončení expozice generace F0 a F1, když se odebírá dílčí vzorek nedospělých ryb, by se ryby měly usmrtit přiměřeným množstvím roztoku anestetika (např. trikain methan sulfonát, MS-222 (CAS.886-86-2), 100–500 mg/l), pufrovaného roztokem NaHCO₃ (hydrogenuhličitan sodný, číslo CAS 144-55-8) 300 mg/l, aby se snížilo podráždění sliznice. Jestliže ryby vykazují známky značného utrpení (velmi silné utrpení a spolehlivě lze předvídat úhyn) a jsou považovány za hynoucí, je třeba jim podat anestetikum, usmrtit je a při analýze dat je zahrnout do mortality. Pokud je ryba usmrcena v důsledku morbidit, je třeba to zaznamenat a vykázat. V závislosti na tom, kdy v průběhu studie jsou ryby usmrceny, je lze uchovat pro histopatologickou analýzu (fixovat ryby pro případnou histopatologii).

Nakládání s vajíčky a rybími larvami

Sběr vajíček od chovných párů pro namnožení další generace

36. Sběr vajíček se provádí první den (nebo v případě potřeby první dva dny) zkušebního týdne 4, aby se přešlo z generace F0 na generaci F1, a zkušebního týdne 18, aby se přešlo z generace F1 na generaci F2. Zkušební týden 18 odpovídá generaci F1, 15 týdnů pro fertilizaci dospělých ryb. Je důležité, aby byla z každé nádrže odebrána všechna vajíčka v den před započítáním sběru vajíček, aby bylo zajištěno, že všechna vajíčka získaná od chovného páru jsou z jednoho tření. Po vytření někdy samičky halančika japonského nosí svá vajíčka v blízkosti kloaky, dokud je nemohou uložit na substrát. Protože v nádrži žádný substrát není, mohou být vajíčka nalezena přichycená k samičce nebo na dně nádrže. Podle toho, kde se vajíčka nacházejí, ve zkušebním týdnu 4 generace F0 a ve zkušebním týdnu 18 generace F1 se opatrně oddělí od samičky nebo vysají ze dna. Všechna vajíčka shromážděná v rámci expozice se před distribucí do inkubačních komor sloučí.
37. Vlákna, která drží vytřená vajíčka dohromady, je třeba odstranit. Od každého chovného páru (1 pár na každý replikát) se sesbírají oplodněná vajíčka (maximálně 20), sloučí se podle expozice a systematicky rozdělí do vhodných inkubačních komor (dodatek 6, 7). Pomocí kvalitního stereoskopického mikroskopu lze vidět známky rané fertilizace/vývoje, jako je vznik fertilizační membrány (chorionu), probíhající dělení buněk nebo vznik blastuly. Inkubační komory mohou být vloženy do samostatného „inkubačního akvária“ sestaveného pro každou expozici (v takovém případě je třeba v nich měřit kvalitu vody a

koncentrace zkoušené chemické látky) nebo do replikátu akvária, v němž budou chovány vylíhlé larvy (například eleutheroembryo). Pokud je potřebný druhý den sběru (zkušební den 23), všechna vajíčka z obou dnů se sloučí a poté se systematicky rozdělí do všech zkušebních replikátů.

Pěstování vajíček do vylíhnutí

38. Oplodněná vajíčka se průběžně promíchávají, *např.* v inkubátoru vzduchovými bublinkami nebo vertikálním kroužením inkubátoru. Mortalita oplodněných vajíček (embryí) se každý den kontroluje a zaznamenává. Odumřelá vajíčka se z inkubátorů odstraňují (dodatek 9). V den 7 po fertilizaci se promíchávání zastaví nebo sníží, aby se oplodněná vajíčka mohla usadit na dně inkubátoru. Podporuje to líhnutí, zpravidla následující den či po dvou dnech. U každé expozice a kontroly se spočítá (ze spojených replik) plůdek (mladé larvy; eleutheroembryo). Oplodněná vajíčka, z nichž se nevylíhl plůdek ani po dvojnásobku střední doby líhnutí v kontrole (obvykle 16. nebo 17. den po fertilizaci), se považují za neživotoschopná a zlikvidují se.
39. Do každé repliky nádrže se přenese dvanáct plůdků. Plůdek z inkubačních komor se sloučí a systematicky rozdělí do replik nádrží (dodatek 7). Lze to provést náhodným výběrem plůdku z expoziční skupiny a postupným přidáváním plůdku bez rozdílu do replikovaných akvárií. Každá z nádrží by měla obsahovat stejný počet ($n = 12$) vylíhlých larev (maximálně 20 larev v nádrži). Pokud není dostatek plůdku k zaplnění všech expozičních replikátů, doporučuje se zajistit, aby co možná nejvíce replikátů mělo 12 plůdků. S plůdkem lze bezpečně manipulovat pomocí skleněných pipet s velkým vnitřním průměrem. Zbývající plůdek se humánně usmrtí anestetikem. V týdnech před sestavením chovných párů je třeba zaznamenat den, kdy bylo v každém replikátu pozorováno první tření.

Příprava chovných párů

Označení ploutví a určení genotypového pohlaví

40. Určení genotypového pohlaví označením ploutví se provádí v 9.–10. týdnu po fertilizaci (tj. zkušební týden 12–13 u generace F1). Všechny ryby v nádrži se anestetizují (s použitím schválených metod, *např.* IACUC) a z dorzální nebo ventrální špičky ocasní ploutve každé ryby se odebere malý vzorek tkáně za účelem stanovení genotypového pohlaví jednotlivce (29). Ryby z replikátu mohou být v replikátové nádrži umístěny do klíček, pokud možno jedna ryba na klíčku. Alternativně lze do každé klíčky umístit dvě ryby, pokud je lze od sebe odlišit. Jednou z metod je zastříhnout při odebírání vzorku tkáně ocasní ploutev různě (*např.* dorzální nebo ventrální špičku).
41. Genotypové pohlaví halančíka japonského se určí identifikovaným a sekvenovaným genem (*dmy*), který je umístěn na chromozomu Y. Přítomnost *dmy* indikuje jedince XY, a to bez ohledu na fenotyp, zatímco nepřítomnost *dmy* indikuje jedince XX, a to bez ohledu na

fenotyp (30); (31). Z každé odstřižené ploutve se extrahuje kyselina deoxyribonukleová (DNA) a přítomnost nebo nepřítomnost genu *dmy* se určí metodami polymerázové řetězové reakce (PCR) (viz dodatek 9 v kapitole C.41 této přílohy nebo dodatek 3 a 4 v (29).

Sestavení chovných párů

42. Informace o fenotypovém pohlaví se použijí k sestavení chovných párů XX-XY bez ohledu na externí fenotyp, který může být pozměněn expozicí zkoušené chemické látky. V den po stanovení genotypového pohlaví každé ryby se náhodně vyberou z každého replikátu dvě ryby XX a dvě ryby XY a sestaví se dva chovné páry XX-XY. Pokud v replikátu nejsou dvě ryby XX, případně dvě ryby XY, použije se vhodná ryba z jiných replikátů v rámci skupiny. Prioritou je mít doporučený počet replikovaných chovných párů (12) v každé expozici i v kontrolách (24). Při sestavování chovných párů se vyloučí ryby se zjevnými abnormalitami (problémy s plynovým měchýřem, páteřní deformity, extrémní odchylky velikosti atd.). V průběhu reprodukční fáze generace F1 by měla každá replikovaná nádrž obsahovat pouze jeden chovný pár.

Výběr vzorku nedospělých jedinců a hodnocení cílových parametrů

Výběr vzorku ryb netvořících chovný pár

43. Po přípravě chovných párů se ryby, které nebyly vybrány k dalšímu chovu, humánně usmrtí za účelem měření cílových parametrů nedospělých jedinců ve zkušebním týdnu 12–13 (F1). Je velice důležité, aby bylo s rybami zacházeno tak, aby bylo stále možné vysledovat genotypové pohlaví stanovené pro výběr chovných párů k jednotlivým rybám. Všechny shromážděné údaje se analyzují v rámci genotypového pohlaví konkrétní ryby. Každá ryba se použije pro měření nejrůznějších cílových parametrů, včetně: stanovení míry přežití juvenilních/nedospělých ryb (zkušební týdny 7–12/13 (F1)), nárůstu délky (standardní délka se může měřit, jestliže byla ocasní ploutev zkrácená v rámci výběru vzorku pro analýzu genetického pohlaví. Celková délka se může měřit, jestliže byl odebrán vzorek pouze části ocasní ploutve, dorzální nebo ventrální, pro stanovení genu *dmy*) a tělesné hmotnosti (tj. hmotnost ve vlhkém stavu, po osušení do sucha), jaterní *vtg* mRNA (nebo VTG) a papil řitní ploutve (viz tabulky 1 a 2). Nezapomeňte, že hmotnost a délka chovných párů je potřebná také pro výpočet středního růstu v expoziční skupině.

Odběr tkáňových vzorků a měření vitelogeninu

44. Játra se vypreparují a uloží při teplotě ≤ -70 °C až do doby měření *vtg* mRNA (nebo VTG). Ocas ryby, včetně řitní ploutve, se konzervuje ve vhodné fixační látce (např. Davidsonův roztok) nebo se vyfotografuje, aby bylo možné později spočítat papily na řitní ploutvi. V tomto okamžiku mohou být odebrány i vzorky jiných tkání (tj. gonád) a uchovány. Koncentrace jaterní VTG se kvantifikuje metodou homologní ELISA (viz doporučené postupy pro halančíka japonského v dodatku 6 v kapitole C.48 této přílohy). Alternativně

byly americkou agenturou EPA stanoveny metody pro kvantifikaci mRNA vtg, tj. extrakce mRNA genu *vtg I* ze vzorku jater a kvantifikace počtu kopií genu *vtg I* (na ng celkové mRNA) kvantitativní PCR (29). Místo stanovování počtu kopií genu *vtg* v kontrolní skupině a v expoziční skupině je metodou méně náročnou na zdroje i méně technicky obtížnou stanovit relativní (násobnou) změnu exprese *vtg I* z kontrolní skupiny a expoziční skupiny.

Druhotné pohlavní znaky

45. Za normálních okolností má papily, které se vyvinou na člancích některých paprsků řitní ploutve jako druhotná pohlavní charakteristika, pouze pohlavně dospělý sameček halančíka japonského, což představuje potenciální biomarker endokrinních disruptivních účinků. Metoda počítání papil na řitní ploutvi (počet článků s papilami) je uvedena v dodatku 8. Počet papil na řitní ploutvi u jednotlivce se také používá pro účely výpočtu jednoduchého podílu pohlaví v replikátu jako ukazatel, že daný jednatlivec je externě fenotypový sameček nebo samička. Halančík japonský s libovolným počtem větším než 0 je definován jako sameček; halančík japonský bez papil (0 papil) na řitní ploutvi je definován jako samička.

Posouzení plodivosti a fertility

46. Plodivost a fertilita se posuzují ve zkušebních týdnech 1 až 3 v generaci F0 a ve zkušebních týdnech 15 až 17 v generaci F1. Vajíčka od každého chovného páru se sbírají denně během 21 po sobě jdoucích dnů. Vajíčka se každé ráno jemně uvolní z vylovených samic anebo se vysají ze dna akvária. Plodivost i fertilita se zaznamenávají denně pro každý replikovaný chovný pár. Plodivost je definována jako počet vytřených vajíček a fertilita je funkčně definována jako počet oplodněných a životaschopných vajíček v době počítání. Počítání by se mělo provést co nejdříve po sběru vajíček.
47. Plodivost replikátu se zaznamenává denně jako počet vajíček na chovný pár a analyzuje se podle doporučených statistických postupů s použitím středních hodnot replikátů. Fertilita replikátu je součet počtu fertálních vajíček vyprodukovaných chovným párem děleno součtem počtu vajíček vyprodukovaných tímto párem. Statistická fertilita se analyzuje jako podíl na replikát. Líhivost replikátu je počet plůdků děleno počtem nasazených embryí (obvykle 20). Statistická líhivost se analyzuje jako podíl na replikát.

Výběr vzorku dospělých jedinců a hodnocení cílových parametrů

Odběr vzorků chovných párů

48. Po zkušebním týdnu 17 (tj. po úspěšném zahájení generace F2) se dospělí jedinci z generace F1 humánně usmrtí a hodnotí se různé sledované parametry (viz tabulky 1 a 2). Pořídí se obrazový záznam řitní ploutve pro posouzení papil na řitní ploutvi (viz dodatek

8) a/nebo se odebere ocas bezprostředně za kloakou a fixuje se pro pozdější spočítání papil. V tomto okamžiku může být případně odebrán vzorek části ocasní ploutve a archivován pro ověření genetického pohlaví (*dmy*). V případě potřeby může být odebrán vzorek tkáně pro zopakování analýzy *dmy* za účelem ověření genetického pohlaví konkrétní ryby. Před ponořením celého těla do fixační látky se otevře tělní dutina, aby byla umožněna perfúze příslušnými fixačními látkami (např. Davidsonův roztok). Pokud je však před fixací proveden vhodný permeabilizační krok, není třeba tělní dutinu otevírat.

Histopatologie

49. Každá ryba se histologicky vyšetří, zda gonadální tkáň není patologická (30), (29). Jak je zmíněno v odstavci 33, mohou být další mechanistické parametry hodnocené v této analýze (tj. VTG, SSC a některé gonadální histopatologické účinky) ovlivněny systémovou či jinou toxicitou. Proto může být také detailně posuzována histopatologie jater a ledvin, což pomůže lépe pochopit odpovědi u mechanistických cílových parametrů. I když se však neprovedou tato podrobná hodnocení, je třeba přesto zaznamenávat a vykázat hrubé abnormality upozorované náhodně při histopatologickém vyšetření. Lze zvážit „odečet“ od skupiny s nejvyšší expozicí (v porovnání s kontrolou) do expozice bez účinku, doporučuje se však histopatologický postup konzultovat (29). Obvykle se zpracují/preparují všechny vzorky a poté je posoudí patolog. Při použití „odečtové“ metody nezapomeňte, že postup podle Rao-Scotta a Cochrane-Armitage využívající dílčí testy (RSCABS) používá předpoklad, že se zvyšováním úrovně dávky se zvyšuje také biologický dopad (patologie). Síla analýzy se tedy ztratí, pokud bude posuzována pouze jedna vysoká dávka bez středně velkých dávek. Pokud není nezbytné provádět statistickou analýzu, aby mohlo být rozhodnuto, že vysoká dávka nemá žádný účinek, je tento postup přijatelný. Z tohoto hodnocení se odvodí také gonádový fenotyp.

Další pozorování

50. Zkouška MEOGRT poskytuje údaje, které mohou být použity (např. při analýze průkaznosti výsledků) pro současné hodnocení alespoň dvou obecných typů drah nežádoucích účinků (AOP), které končí narušením reprodukční funkce: a) endokrinně mediované dráhy zahrnující narušení endokrinní osy hypotalamus-hypofýza-gonády (HPG) a b) dráhy, které působí snížení přežití, růstu (délky a hmotnosti) a rozmnožování prostřednictvím neendokrinně mediované toxicity. V této zkoušce jsou zahrnuty také parametry obvykle měřené ve zkouškách chronické toxicity, jako je zkouška celého vývojového cyklu a zkouška raných vývojových stádií, a tyto parametry mohou být použity na vyhodnocení nebezpečnosti, kterou představují neendokrinně mediované toxické způsoby účinku i endokrinně mediované dráhy toxicity. V průběhu zkoušky by se mělo provádět denně pozorování chování a každé neobvyklé chování by se mělo zaznamenat. Dále by se měla zaznamenat veškerá mortalita a přežití do redukce ryb (zkušební týden

6/7), přežití po redukci do odběru vzorku nedospělých jedinců (v týdnu 9–10 po fertilizaci) a vypočítat přežití od spárování do odběru vzorku dospělých ryb.

Tabulka 1: Přehled sledovaných parametrů u zkoušky MEOGRT*

Vývojové stádium	Ukazatel	Generace
Embryo (2 týdny po fertilizaci)	Vylíhnutí (% a doba do vylíhnutí)	F1, F2
Mladé ryby (4 týdny po fertilizaci)	Přežití	F1
Nedospělé ryby (9 nebo 10 týdnů po fertilizaci)	Přežití	F1
	Růst (délka a hmotnost)	
	Vitelogenin (mRNA nebo bílkovina)	
	Druhotné pohlavní znaky (papily na řitní ploutvi)	
	Poměr pohlaví podle vnějších znaků	
	Doba do 1. vytření	
Dospělý jedinec (12–14 týdnů po fertilizaci)	Reprodukce (plodivost a fertilita)	F0, F1
Dospělý jedinec (15 týdnů po fertilizaci)	Přežití	F1
	Růst (délka a hmotnost)	
	Druhotné pohlavní znaky (papily na řitní ploutvi)	
	Histopatologie (gonády, játra, ledviny)	

*Tyto parametry se statisticky analyzují.

HARMONOGRAM

51. Harmonogram zkoušky MEOGRT znázorněný v tabulce 2 ukazuje průběh zkoušky. Zkouška MEOGRT zahrnuje 4 týdny expozice do vývoje dospělých jedinců generace F0,

15 týdnů expozice do generace F1 a dobu expozice pro druhou generaci (F2) až do vylíhnutí (2 týdny pro fertilizaci). Průběh zkoušky MEOGRT je shrnut v dodatku 9.

Tabulka 2: Harmonogram expozice a měření sledovaných parametrů u zkoušky MEOGRT.

Harmonogram expozice a sledované parametry u zkoušky MEOGRT																		
F0	1	2	3	4														
F1				1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
F2																	1	2
Týden zkoušky	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Vývojové stádium				Embryo				Larva				Mladá ryba				Nedospělá ryba		Dospělá ryba
Sledované vlastnosti																		
Plodnost	F ₀														F ₁			
Fertilita	F ₀														F ₁			
Vylíhnutí					F ₁													F ₂
Přežití						F ₁						F ₁					F ₁	
Růst				F ₀								F ₁					F ₁	
Vitelogenin												F ₁						
Druhotné pohlavní znaky												F ₁					F ₁	
Histopatologie																	F ₁	
Zkušební týden	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18

- Uspořádání experimentu má 7 skupin replikátů
 - 5 pro expozici zkoušené chemické látky
 - 2 pro kontrolní expozici (4, pokud je použito rozpouštědlo)
- Uspořádání v rámci skupiny
 - 12 replikátů pro reprodukci, patologii a SSC dospělých jedinců (týdny 10 až 18)
 - 6 replikátů pro vylíhnutí, přežití, Vtg a - SSC a růst nedospělých jedinců (týdny 1 až 9)

SSC: druhotné pohlavní znaky; Wks: týdny;
Vtg: vitelogenin

OZNAMOVÁNÍ ÚDAJŮ

Statistická analýza

52. Protože se pro všechny pokusné ryby stanoví genotypové pohlaví, je třeba údaje analyzovat pro každé genotypové pohlaví samostatně (tj. samečci XY a samičky XX). V opačném případě by se výrazně snížila statistická síla jakékoli analýzy. Statistická analýza údajů by se pokud možno měla řídit postupy, které jsou popsány v dokumentu OECD *Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application* (32) (Současné přístupy ke statistické analýze dat týkajících se údajů o ekotoxicitě: Pokyny k použití). Další pokyny ke statistické analýze jsou uvedeny v dodatku 10.

53. Uspořádání experimentu a výběr statistických testů by měl umožňovat dostatečnou průkaznost zkoušky, aby se zjistily změny biologického významu v ukazatelích, u nichž má být uvedena hodnota NOEC (32). Vykazování příslušných koncentrací vyvolávajících účinky a příslušných parametrů může záviset na regulačním rámci. Je třeba určit procentuální změnu u každého ukazatele, který má být zjištěn nebo odhadnut. Aby to bylo

možné, mělo by být uspořádání experimentu přesně přizpůsobeno. Není pravděpodobné, že stejná procentuální změna platí pro všechny ukazatele, a není ani pravděpodobné, že je možné naplánovat proveditelný experiment, který splní tato kritéria u všech ukazatelů. Za účelem naplánování experimentu vhodným způsobem je proto důležité zaměřit se na ty ukazatele, které jsou důležité pro daný experiment. V dodatku 10 je uvedeno statistické schéma a pokyny, které jsou vodítkem při zpracování údajů a při výběru nejvhodnějšího statistického testu nebo modelu, který má být použit. Mohou být použity i jiné statistické metody za předpokladu, že jsou vědecky odůvodněné.

54. Bude nezbytné analyzovat rozdíly v rámci každé sady opakování pomocí analýzy rozptylu nebo pomocí kontingenční tabulky a na základě této analýzy použít dostatečné, vhodné metody statistické analýzy. K vícenásobnému porovnání výsledků pro jednotlivé koncentrace a pro kontrolní skupiny se doporučuje test sestupného trendu (např. Jonckheerův-Terpstrův test) pro kontinuální odpovědi. Nejsou-li údaje v souladu s monotónní odpovědí na koncentraci, je třeba použít Dunnettův test nebo Dunnův test (v případě potřeby po adekvátní transformaci dat).
55. U plodivosti se vajíčka počítají denně, ale analýza může být provedena jako celkový počet vajíček nebo jako opakované měření. Podrobnosti o analyzování tohoto parametru jsou uvedeny v dodatku 10. Pro histopatologické údaje, které jsou ve formě stupně závažnosti, byl vypracován nový statistický test, Rao-Scottův, Cochranův-Armitageův test využívající dílčí testy (RSCABS) (33).
56. Všechny sledované parametry pozorované při expozicích chemické látky, které jsou významně odlišné od příslušných kontrol, je třeba vykázat.

Poznámky k analýze dat

Použití zpochybněných úrovní expozice

57. Při určování toho, zda opakování nebo celá expozice vykazují zjevnou toxicitu a měly by být z analýzy vyřazeny, se zvažuje několik faktorů. Zjevná toxicita je definována jako > 4 úhyny v každém opakování mezi týdnem 3 a 9 po fertilizaci, které nelze vysvětlit technickou chybou. Jiné příznaky zjevné toxicity zahrnují krvácení, nestandardní chování, nestandardní plavání, anorexii a jakékoli jiné klinické příznaky choroby. Při subletálních příznacích toxicity mohou být nezbytná kvalitativní hodnocení, která by měla být vždy prováděna ve srovnání s kontrolní skupinou v ředici vodě (pouze čistá voda). Jestliže nejvyšší expozice vykazuje (vykazují) zjevnou toxicitu, doporučuje se, aby byly tyto expozice z analýzy cenzurovány.

Kontroly s rozpouštědlem

58. Použití rozpouštědla by mělo být zvažováno pouze jako poslední možnost, když byly uváženy všechny ostatní možnosti dávkování chemické látky. Je-li použito rozpouštědlo, měla by být souběžně provedena u kontrolní skupiny zkouška s ředící vodou. Při ukončení zkoušky je třeba provést hodnocení případných účinků rozpouštědla. To se provede pomocí statistického srovnání kontrolní skupiny s rozpouštědlem a kontrolní skupiny s ředící vodou. Nejdůležitějšími ukazateli, které je třeba při této analýze posoudit, jsou determinanty růstu (hmotnost), jelikož tyto ukazatele mohou být ovlivněny generalizovanými toxicitami. Jsou-li zaznamenány statisticky významné rozdíly v těchto ukazatelích mezi kontrolní skupinou s ředící vodou a kontrolní skupinou s rozpouštědlem, je třeba odborně posoudit, zda je platnost zkoušky zpochybněna. Jestliže se tyto dvě kontroly liší, je třeba skupiny exponované chemické látce porovnávat s kontrolou s rozpouštědlem, pokud není známo, že je vhodnější porovnání s kontrolou s ředící vodou. Není-li zaznamenán žádný statisticky významný rozdíl mezi oběma kontrolními skupinami, doporučuje se porovnávat skupiny exponované zkoušené chemické látce se sloučenými skupinami (kontrola s rozpouštědlem a kontrola s ředící vodou), pokud není známo, že je vhodnější buď porovnání pouze s kontrolou s ředící vodou, nebo pouze s kontrolní skupinou s rozpouštědlem.

Závěrečná zpráva

59. Závěrečná zpráva by měla obsahovat:

Zkoušená chemická látka: fyzikální povaha a (je-li to podstatné) fyzikálně-chemické vlastnosti,

- údaje o chemické identifikaci.

Jednosložková látka:

- fyzický vzhled, rozpustnost ve vodě a další relevantní fyzikálně-chemické vlastnosti.
- chemická identifikace, např. název podle IUPAC nebo CAS, číslo CAS, kód SMILES nebo InChI, strukturní vzorec, čistota, popřípadě chemická identita nečistot, je-li to prakticky proveditelné atd. (včetně obsahu organického uhlíku, je-li měřen).

Vícesložková látka, UVCB a směsi:

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

Zkušební druh:

- vědecký název, kmen, je-li k dispozici, zdroj a metoda sběru oplodněných jiker a následné zpracování.

Zkušební podmínky:

- fotoperioda (fotoperiody),
- uspořádání zkoušky (např. velikost nádrže, materiál a objem vody, počet zkušebních nádrží a jejich replikátů, počet plůdků v každém replikátu),
- metoda přípravy zásobních roztoků a četnost obnovování (je-li použito, mělo by se uvést solubilizační činidlo a jeho koncentrace),
- metoda dávkování zkoušené chemické látky (např. čerpadla, ředicí systémy),
- výtěžnost metody a nominální zkušební koncentrace, mez stanovitelnosti, střední hodnoty naměřených hodnot ve zkušebních nádržích a jejich směrodatné odchylky a metody jejich stanovení a doklad toho, že naměřené koncentrace odpovídají koncentracím zkoušené chemické látky ve skutečném roztoku,
- charakteristiky ředicí vody: hodnota pH, tvrdost, teplota, koncentrace rozpuštěného kyslíku, koncentrace zbytkového chloru (je-li měřena), obsah celkového organického uhlíku (je-li měřen), obsah suspendovaných látek (je-li měřen), salinita zkušební média (je-li měřena) a výsledky jakýchkoli jiných provedených měření,
- nominální zkušební koncentrace, střední hodnoty naměřených koncentrací ve zkušebních nádobách a jejich směrodatné odchylky,
- kvalita vody ve zkušebních nádržích, pH, teplota (denně) a koncentrace rozpuštěného kyslíku,
- podrobné informace o krmení (např. druh krmiva (krmiv), původ, podávané množství a frekvence krmení).

Výsledky:

- doklady o tom, že kontrolní skupiny splnily celková kritéria validity,
- následující údaje o kontrolních (plus kontrole s rozpouštědlem, když je použita) a expozičních skupinách: líhnutí (líhnivost a doba do vylíhnutí) pro generace F1 a F2, přežití po vylíhnutí u generace F1, růst (délka a tělesná hmotnost) u generace F1, genotypové pohlaví a rozlišení pohlaví (např. druhotné pohlavní znaky podle papil na řitní ploutvi a histologie gonád) u generace F1, fenotypové pohlaví u generace F1, druhotné pohlavní znaky (papily na řitní ploutvi) u generace F1, mRNA *vtg* (nebo bílkovina VTG) u generace F1, histopatologické vyšetření (gonády, játra a ledviny) u generace F1 a reprodukce (plodivost a fertilita) u generace F0, F1, (viz tabulky 1 a 2),
- metoda statistické analýzy (regresní analýza nebo analýza rozptylu) a zpracování údajů (použité statistické testy a modely),
- koncentrace bez pozorovaných účinků (NOEC) pro každou posuzovanou odpověď,

- nejnižší koncentrace s pozorovaným účinkem (LOEC) pro každou posuzovanou odpověď (při $p = 0,05$), případně hodnoty EC_x pro každou posuzovanou odezvu a intervaly spolehlivosti (např. 90 % nebo 95 %) a graf proloženého modelu použitý pro jejich výpočet, směrnice křivky koncentrace-odezva, vzorec regresního modelu, odhadované parametry modelu a jejich směrodatné odchylky,
 - všechny odchylky od této zkušební metody a odchylky od kritérií přijatelnosti a dále poznámky k potenciálním důsledkům na výsledek zkoušky.
60. U výsledků měření sledovaných ukazatelů by měly být uvedeny střední hodnoty a jejich směrodatné odchylky (pokud možno pro jednotlivé replikáty i koncentrace).

LITERATURA

- (1) OECD (2012a). Fish Toxicity Testing Framework, Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 171), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (1) Padilla S, Cowden J, Hinton DE, Yuen B, Law S, Kullman SW, Johnson R, Hardman RC, Flynn K and Au DWT. (2009). Use of Medaka in Toxicity Testing. *Current Protocols in Toxicology* 39: 1-36.
- (2) OECD (2012b). Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Endocrine Disrupters. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 150), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (3) Benoit DA, Mattson VR, Olson DL. (1982). A Continuous-Flow Mini-Diluter System for Toxicity Testing. *Water Research* 16: 457–464.
- (4) Yokota H, Tsuruda Y, Maeda M, Oshima Y, Tadokoro H, Nakazono A, Honjo T and Kobayashi K. (2000). Effect of Bisphenol A on the Early Life Stage in Japanese Medaka (*Oryzias Latipes*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 19: 1925-1930.
- (5) Yokota H, Seki M, Maeda M, Oshima Y, Tadokoro H, Honjo T and Kobayashi K. (2001). Life-Cycle Toxicity of 4-Nonylphenol to Medaka (*Oryzias Latipes*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 20: 2552-2560.
- (6) Kang IJ, Yokota H, Oshima Y, Tsuruda Y, Yamaguchi T, Maeda M, Imada N, Tadokoro H and Honjo T. (2002). Effects of 17 β -Estradiol on the Reproduction of Japanese Medaka (*Oryzias Latipes*). *Chemosphere* 47: 71–80.
- (7) Seki M, Yokota H, Matsubara H, Tsuruda Y, Maeda M, Tadokoro H and Kobayashi K. (2002). Effect of Ethinylestradiol on the Reproduction and Induction of Vitellogenin and Testis-Ova in Medaka (*Oryzias Latipes*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 21: 1692-1698.
- (8) Seki M, Yokota H, Matsubara H, Maeda M, Tadokoro H and Kobayashi K. (2003). Fish Full Life-Cycle Testing for the Weak Estrogen 4-Tert-Pentylphenol on Medaka (*Oryzias Latipes*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 22: 1487-1496.
- (9) Hirai N, Nanba A, Koshio M, Kondo T, Morita M and Tatarazako N. (2006a). Feminization of Japanese Medaka (*Oryzias latipes*) Exposed to 17 β -Estradiol: Effect of Exposure Period on Spawning Performance in Sex-Transformed Females. *Aquatic Toxicology* 79: 288-295.

- (10) Hirai N, Nanba A, Koshio M, Kondo T, Morita M and Tatarazako N. (2006b). Feminization of Japanese Medaka (*Oryzias latipes*) Exposed to 17 β -Estradiol: Formation of Testis-Ova and Sex-Transformation During Early-Ontogeny. *Aquatic Toxicology* 77: 78-86.
- (11) Nakamura A, Tamura I, Takanobu H, Yamamuro M, Iguchi T and Tatarazako N. (2015). Fish Multigeneration Test with Preliminary Short-Term Reproduction Assay for Estrone Using Japanese Medaka (*Oryzias Latipes*). *Journal of Applied Toxicology* 35:11-23.
- (12) U.S. Environmental Protection Agency (2013). Validation of the Medaka Multigeneration Test: Integrated Summary Report. Dostupné na: <http://www.epa.gov/scipoly/sap/meetings/2013/062513meeting.html>.
- (13) Adolfsson-Erici M, Åkerman G, Jahnke A, Mayer P and McLachlan M. (2012). A Flow-Through Passive Dosing System for Continuously Supplying Aqueous Solutions of Hydrophobic Chemicals to Bioconcentration and Aquatic Toxicity Tests. *Chemosphere* 86: s. 593-599.
- (14) OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 23.), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (15) Hutchinson TH., Shillabeer N., Winter MJ and Pickford DB. (2006). Acute and Chronic Effects of Carrier Solvents in Aquatic Organisms: A Critical Review. *Aquatic Toxicology* 76: 69–92.
- (16) Denny JS, Spehar RL, Mead KE and Yousuff SC. (1991). Guidelines for Culturing the Japanese Medaka, *Oryzias latipes*. US EPA/600/3-91/064.
- (17) Koger CS, Teh SJ and Hinton DE. (1999). Variations of Light and Temperature Regimes and Resulting Effects on Reproductive Parameters in Medaka (*Oryzias Latipes*). *Biology of Reproduction* 61: 1287-1293.
- (18) Kinoshita M, Murata K, Naruse K and Tanaka M. (2009). Medaka: Biology, Management, and Experimental Protocols, Wiley- Blackwell.
- (19) Gormley K and Teather K. (2003). Developmental, Behavioral, and Reproductive Effects Experienced by Japanese Medaka in Response to Short-Term Exposure to Endosulfan. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 54: s. 330-338.
- (20) Kapitola C.15 této přílohy, Zkouška krátkodobé toxicity na rybím embryu a váčkovém plůdku.

- (21) Kapitola C.37 této přílohy, 21denní zkouška na rybách: krátkodobý screening estrogenní a androgenní aktivity a inhibice aromatázy.
- (22) Kapitola C.41 této přílohy, Zkouška pohlavního vývoje ryb.
- (23) Kapitola C.48 této přílohy: Krátkodobá zkouška působení na reprodukci ryb.
- (24) Kapitola C.47 této přílohy, Zkouška toxicity v raných fázích života ryb.
- (25) Kapitola C.49 této přílohy, Zkouška akutní toxicity na rybích embryích (FET).
- (26) Wheeler JR, Panter GH, Weltje L and Thorpe KL. (2013). Test Concentration Setting for Fish *In Vivo* Endocrine Screening Assays. *Chemosphere* 92: 1067-1076.
- (27) Tatarazako N, Koshio M, Hori H, Morita M and Iguchi T. (2004). Validation of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Method for Vitellogenin in the Medaka. *Journal of Health Science* 50: 301-308.
- (28) OECD (2015). Guidance Document on Medaka Histopathology Techniques and Evaluation. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 227). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (29) Nanda I, Hornung U, Kondo M, Schmid M and Scharrtl M. (2003). Common Spontaneous Sex-Reversed XX Males of the Medaka *Oryzias Latipes*. *Genetics* 163: 245–251.
- (30) Shinomiya, A, Otake H, Togashi K, Hamaguchi S and Sakaizumi M. (2004). Field Survey of Sex-Reversals in the Medaka, *Oryzias Latipes*: Genotypic Sexing of Wild Populations, *Zoological Science* 21: s. 613-619.
- (31) OECD (2014). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A guidance to application (annexes to this publication exist as a separate document), OECD Publishing, Paris.
- (32) Green JW, Springer TA, Saulnier AN and Swintek J. (2014). Statistical Analysis of Histopathology Endpoints. *Environmental Toxicology and Chemistry* 33: 1108-1116.

Dodatek 1

DEFINICE

Chemická látka: látka nebo směs

ELISA: enzymová imunosorpční analýza

Plodivost = počet vajíček

Fertilita = počet životaschopných vajíček/plodivost

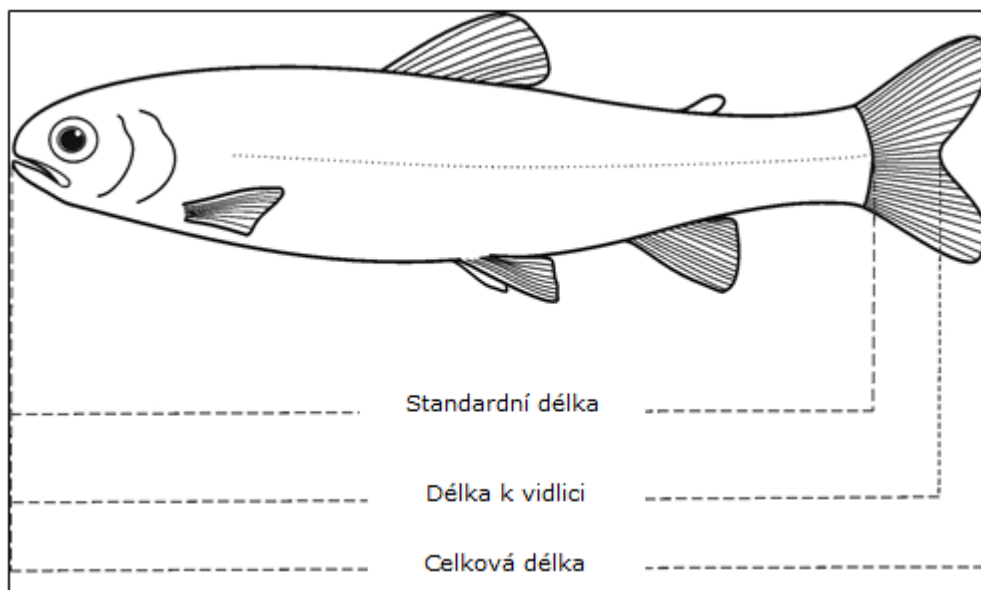
Délka k vidlici (FL) označuje délku od špičky tlamy po průsečík paprsků ocasní ploutve a používá se u ryb, u kterých je obtížné určit, kde končí páteř (www.fishbase.org)

Líhnivost = plůdky/počet embryí nasazených do inkubátoru

IACUC: Institutional Animal Care and Use Committee (Instituciální výbor pro péči o zvířata a jejich používání)

Standardní délka (SL) označuje délku ryby měřenou od špičky tlamy po konec posledního obratle nebo po konec ocasního násadce ve střední části. Jednoduše řečeno, tato míra nezahrnuje délku ocasní ploutve (www.fishbase.org).

Celková délka (TL) označuje délku od špičky tlamy po konec delšího laloku ocasní ploutve, obvykle měřenou s laloky sevřenými podél střední linie. Je to míra po přímce, neměří se přes zaoblení těla (www.fishbase.org).



Obrázek 1:

Popis různých používaných délek

EC_x: (účinná koncentrace s x% účinkem) je koncentrace, která vyvolá x% účinek u zkušebních organismů během dané expoziční doby ve srovnání s kontrolou. Například EC₅₀ je koncentrace odhadnutá pro vyvolání účinku na zkoušený ukazatel u 50 % exponované populace za stanovenou expoziční dobu.

Průtoková metoda je zkouška, při níž zkušební roztoky plynule protékají zkušebním systémem po celou dobu trvání expozice.

Osa HPG: hypothalamo-hypofýzo-gonadální osa.

IUPAC: International Union of Pure and Applied Chemistry (Mezinárodní unie pro čistou a užitou chemii).

Velikost násady: živá hmotnost ryb na jednotku objemu vody.

Nejnižší koncentrace s pozorovaným účinkem (LOEC) je nejnižší zkušební koncentrace zkoušené chemické látky, při níž je pozorován statisticky významný účinek zkoušené látky ve srovnání s kontrolou (při $p < 0,05$). Všechny zkušební koncentrace vyšší než LOEC musí však mít stejné nebo závažnější škodlivé účinky, než jsou účinky pozorované při koncentraci LOEC. Nelze-li tyto dvě podmínky splnit, mělo by být podrobně vysvětleno, jak byla LOEC (a tedy i NOEC) zvolena. Pokyny jsou uvedeny v dodatku 5 a 6.

Medián letální koncentrace (LC₅₀): je koncentrace zkoušené chemické látky, která usmrtí přibližně 50 % zkušebních organismů během celé zkoušky.

Koncentrace bez pozorovaných účinků (NOEC) je zkušební koncentrace bezprostředně nižší než LOEC, která při srovnání s kontrolou nemá pro danou expoziční dobu statisticky významný účinek (při $p < 0,05$).

SMILES: Simplified Molecular Input Line Entry Specification (Zjednodušená molekulární specifikace pro vstupní řádky).

Hustota obsádky: počet ryb na jednotku objemu vody.

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

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

VTG: vitelogenin je fosfolipoglykoprotein, prekurzor proteinů vaječného žloutku, který se obvykle vyskytuje u sexuálně aktivních samic všech vejcorodých druhů.

WPF: týdny po fertilizaci.

Dodatek 2**NĚKTERÉ CHEMICKÉ CHARAKTERISTIKY DOPORUČENÉ ŘEDICÍ VODY**

Látka	Koncentrační limit
Pevné částice	5 mg/l
Celkový obsah organického uhlíku	2 mg/l
Neionizovaný amoniak	1 µg/l
Zbytkový chlor	10 µg/l
Celkové organofosforové pesticidy	50 ng/l
Celkový obsah organochlorových pesticidů a polychlorovaných bifenyľů	50 ng/l
Celkový obsah organického chloru	25 ng/l
Hliník	1 µg/l
Arsen	1 µg/l
Chrom	1 µg/l
Kobalt	1 µg/l
Měď	1 µg/l
Železo	1 µg/l
Olovo	1 µg/l
Nikl	1 µg/l
Zinek	1 µg/l
Kadmium	100 ng/l
Rtuť	100 ng/l
Stříbro	100 ng/l

Dodatek 3**ZKUŠEBNÍ PODMÍNKY PRO ZKOUŠKU MEOGRT**

1. Doporučený druh	Halančík japonský (<i>Oryzias latipes</i>)
2. Typ zkoušky	Kontinuální průtok
3. Teplota vody	Nominální teplota při zkoušce je 25 °C. Střední teplota po celou dobu zkoušky v každé nádrži je 24–26 °C.
4. Kvalita osvětlení	Fluorescenční zářivky (šírokospektrální a ~ 150 lumen/m ²) (~ 150 lux). 16 h světlo: 8 h tma
6. Velikost násady	F0: 2 dospělé ryby/replikát; F1: zahajuje se maximálně s 20 vajíčky (embryi)/replikát, redukuje se na 12 embryi/replikát při vylíhnutí a poté 2 dospělé ryby (chovný pár XX-XY) v týdnu 9–10 pro reprodukční fázi
7. Minimální využitelný objem zkušební komory	1,8 l (např. velikost zkušební komory: 18 x 9 x 15 cm)
8. Výměna objemu zkušebních roztoků	Minimálně 5násobek objemu/den a maximálně 16násobek objemu/den (nebo průtok 20 ml/min)
9. Stáří zkušebních organismů při zahájení	F0: > 12 týdnů po fertilizaci, ale doporučuje se nepřekračovat 16 týdnů po fertilizaci
10. Počet organismů na replikát	F0: 2 ryby (pár samička a sameček); F1: maximálně 20 ryb (vajíček)/replikát (vyprodukovaných chovnými páry z generace F0 a F1).
11. Počet expozií	5 expozií zkoušené chemické látky plus příslušná kontrola (kontroly)
12. Počet replikátů pro každou expozií	Minimálně 6 replikátů na expozií u zkoušené chemické látky a minimálně 12 replikátů u kontrol a u kontroly s rozpouštědlem, pokud je použita (počet replikátů se v reprodukční fázi u generace F1 zdvojnásobí)
13. Počet organismů na zkoušku	Minimálně 84 ryb v generaci F0 a 504 v generaci F1. (Je-li použita kontrola s rozpouštědlem, pak 108 ryb v generaci F0 a 648 ryb v generaci F1.) Počítanou jednotkou je post-eleutheroembryo.
14. Krmný režim	Ryby se krmí libovolně dlouho žabronožkou, rod <i>Artemia</i> , (24 hodin staré larvy) a v případě potřeby doplňkově komerčně dostupným vločkovým krmivem. (Příklad krmného plánu pro zajištění adekvátního růstu a vývoje na podporu silné reprodukce lze nalézt v dodatku 6.)

15. Provzdušňování	Žádné, pokud rozpuštěný kyslík neklesne pod 60 % hodnoty saturace vzduchu.
16. Ředící voda	Čistá povrchová, studniční nebo rekonstituovaná voda nebo odchlorovaná vodovodní voda.
17. Doba expozice	Primárně 19 týdnů (od generace F0 do vylíhnutí generace F2)
18. Biologické ukazatele (primární)	Líhivost (F1 a F2); přežití (F1, od vylíhnutí do týdne 4 po fertilizaci (konec larválního stádia / začátek stádia mladých ryb), od týdne 4 do týdne 9 (nebo 10) po fertilizaci (začátek stádia mladých ryb do stádia nedospělých ryb) a od týdne 9 do týdne 15 po fertilizaci (nedospělé ryby až do ukončení zkoušky u dospělých ryb)); růst (F1, délka a hmotnost v týdnu 9 a 15 po fertilizaci); druhotné pohlavní znaky (F1, papily na řitní ploutvi v týdnu 9 a 15 po fertilizaci); vitelogenin (F1, mRNA <i>vtg</i> nebo bílkovina VTG v týdnu 15 po fertilizaci); fenotypové pohlaví (F1, prostřednictvím histologického vyšetření gonád v týdnu 15 po fertilizaci); rozmnožování (F0 a F1, plodivost a fertilita po dobu 21 dnů); doba do vytření (F1) a histopatologie (F1, gonády, játra a ledviny v týdnu 15 po fertilizaci)
19. Kritéria platnosti zkoušky	Rozpuštěný kyslík ≥ 60 % hodnoty nasycení vzduchem; střední teplota vody 24–26 °C po celou dobu zkoušky; úspěšná reprodukce ≥ 65 % samic v kontrolní skupině (skupinách); střední denní plodivost ≥ 20 vajíček v kontrolní skupině (skupinách); líhivost vajíček ≥ 80 % (průměr) v kontrolních skupinách (v každé generaci F1 a F2); přežití po vylíhnutí do týdne 3 po fertilizaci ≥ 80 % (průměr) a od týdne 3 po fertilizaci až do ukončení pro tuto generaci ≥ 90 % (průměr) v kontrolních skupinách (F1), koncentrace zkoušené chemické látky v roztoku by měly být uspokojivě udržovány v rozmezí ± 20 % středních naměřených hodnot.

Dodatek 4

POKYNY K TYPICKÝM KONTROLNÍM HODNOTÁM

Je třeba uvést, že tyto kontrolní hodnoty vycházejí z omezeného počtu validačních studií a s ohledem na další zkušenosti mohou být revidovány.

Růst

Hmotnost a délka se měří u všech vzorků ryb v týdnu 9 (nebo 10) a 15 po fertilizaci. Při dodržování tohoto protokolu bude očekávaná hmotnost za vlhka v týdnu 9 po fertilizaci 85–145 mg u sameček a 95–150 mg u samiček. Očekávaná hmotnost v týdnu 15 po fertilizaci je 250–330 mg u sameček a 280–350 mg u samiček. I když se u jednotlivých ryb mohou objevit značné odchylky od těchto rozmezí, střední kontrolní hmotnosti výrazně mimo uvedené rozmezí, zejména nižší, naznačují problémy s krmením, řízením teploty, kvalitou vody, nemocemi nebo kombinaci těchto faktorů.

Líhnutí

Úspěšnost líhnutí v kontrolních skupinách je obvykle kolem 90 %, ale ani tak nízké hodnoty, jako je 80 %, nejsou neobvyklé. Úspěšnost líhnutí menší než 75 % může ukazovat na nedostatečné míchání vyvíjejících se vajíček nebo neadekvátní péči o vajíčka, například odumřelá vajíčka nebyla včas odstraňována, což vedlo k napadení houbami.

Přežití

Míra přežití od vylíhnutí do týdne 3 po fertilizaci a po týdnu 3 po fertilizaci je u kontrolních skupin obvykle 90 % nebo více, ale ani tak nízká míra přežití v raných vývojových stádiích, jako je 80 %, není alarmující. Míra přežití v kontrolních skupinách menší než 80 % by měla vzbuzovat obavy a může naznačovat nedostatečné čištění akvária vedoucí k úhynu rybích larev z důvodu nemoci nebo udušení v důsledku nízkých hladin rozpuštěného kyslíku. Mortalita může být rovněž důsledkem poranění při čištění nádrže a ztráty rybích larev vypuštěním do odtoku z nádrže.

Gen vitelogenin

I když se absolutní hladiny genu *vitelogenin* (*vgt*), vyjádřené jako kopie celkové mRNA, mezi jednotlivými laboratoři mohou značně lišit v důsledku používaných postupů nebo nástrojů, měl by být poměr *vgt* přibližně 200krát větší u kontrolních samiček než u kontrolních sameček. Není neobvyklé, aby byl tento poměr vysoký i 1 000 až 2 000, avšak poměry menší než 200 jsou podezřelé a mohou naznačovat problémy s kontaminací vzorku nebo problémy s použitým postupem anebo reagensy.

Druhotné pohlavní znaky

U sameček je normální rozsah druhotných pohlavních znaků, definovaný jako celkový

počet segmentů ploutevních paprsků papil na řitní ploutvi, 40–80 segmentů v týdnu 9–10 po fertilizaci. Do týdne 15 po fertilizaci by měl být rozsah u kontrolních samečků přibližně 80–120 a 0 u kontrolních samic. Ve vzácných případech nemají někteří samečci z nevysvětlitelných důvodů do týdne 9 po fertilizaci žádné papily, ale protože do týdne 15 po fertilizaci se papily vyvinou u všech kontrolních samečků, je to s největší pravděpodobností způsobeno opožděným vývojem. Přítomnost papil u kontrolních samic ukazuje přítomnost samečků XX v populaci.

Samečci XX

Zdá se, že normální výskyt samečků XX v chovu je přibližně 4 % nebo méně při 25 °C, přičemž výskyt se zvyšuje se zvyšující se teplotou. Je třeba učinit opatření na minimalizaci podílu samečků XX v populaci. Protože se zdá, že výskyt samečků XX má genetickou složku a je tedy dědičný, je efektivním způsobem jak snížit výskyt samečků XX v populaci monitorování chovné zásoby a zajištění, aby samečci XX nebyli používáni na rozmnožování chovné zásoby.

Tření

Před posouzením plodivosti by mělo být u kontrolních replikátů denně monitorováno tření. Kontrolní páry mohou být kvalitativně posuzovány vizuálně, zda jeví známky tření. Do týdne 12–14 po fertilizaci by se měla většina kontrolních párů vytřít. Nízké počty párů, které se do této doby vytřely, ukazují na potenciální problémy se zdravotním stavem, vyspělostí nebo dobrými podmínkami ryb.

Plodivost

Zdravý, dobře živěný halančík japonský se do týdne 12–14 po fertilizaci obvykle tře denně, přičemž každý den vyprodukuje 15 až 50 vajíček. 16 z doporučených 24 kontrolních chovných párů (> 65 %) by mělo vyprodukovat více než 20 vajíček na pár denně, ale může to být i 40 vajíček denně. Méně vajíček, než je uvedené množství, může ukazovat, že páry jsou nezralé, podvyživené nebo nezdravé.

Fertilita

Procento fertilních vajíček pro kontrolní páry je obvykle v rozsahu 90 %, přičemž hodnoty pohybující se kolem 95 % nebo více nejsou neobvyklé. Míry fertility menší než 80 % u kontrolních vajíček jsou podezřelé a mohou ukazovat na nezdravé jedince nebo horší než ideální podmínky chovu.

Dodatek 5

PŘÍKLAD KRMNÉHO PLÁNU

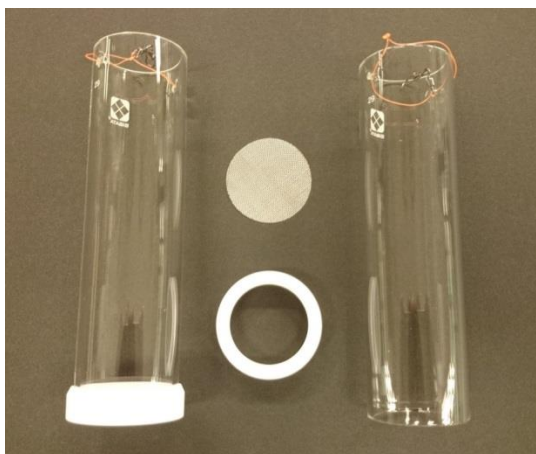
Příklad krmného plánu, který zajišťuje adekvátní růst a vývoj na podporu robustní reprodukce, je uveden v tabulce 1. Lze připustit odchylky od tohoto krmného plánu, ale doporučuje se, aby byly otestovány za účelem ověření, že bude pozorován přijatelný růst a reprodukce. Aby byl dodržen navrhovaný krmný plán, je třeba před zahájením zkoušky stanovit hmotnost sušiny žábronožky v objemu žábronožky ve formě kaše. Lze to provést zvážení definovaného objemu kaše žábronožky, která byla vysušována po dobu 24 hodin při 60 °C na předem zvážených miskách. Za účelem zohlednění hmotnosti solí v kaši je třeba vysušit stejný objem stejného solného roztoku použitého v kaši, zvážít jej a odečíst od hmotnosti vysušené kaše žábronožky. Alternativně je možné žábronožku před vysušením přefiltrovat a propláchnout destilovanou vodou, čímž se eliminuje nutnost stanovit hmotnost „solného slepého roztoku“. Tyto informace slouží k přepočtu údajů z tabulky o hmotnosti sušiny žábronožky na objem žábronožky ve formě kaše, který má být zkrmen na jednu rybu. Kromě toho se doporučuje každý týden zvážít poměrný podíl kaše žábronožky, a ověřit tak správnou hmotnost zkrmované sušiny.

Tabulka 1: Příklad krmného plánu

Čas (po vylíhnutí)	Žábronožka (hmotnost sušiny v mg/ryba/den)
Den 1	0,5
Den 2	0,5
Den 3	0,6
Den 4	0,7
Den 5	0,8
Den 6	1,0
Den 7	1,3
Den 8	1,7
Den 9	2,2
Den 10	2,8
Den 11	3,5
Den 12	4,2
Den 13	4,5
Den 14	4,8
Den 15	5,2
Dny 16–21	5,6
Týden 4	7,7
Týden 5	9,0
Týden 6	11,0
Týden 7	13,5
Týden 8–utracení	22,5

Dodatek 6**PŘÍKLADY INKUBAČNÍ KOMORY NA VAJÍČKA****Příklad A**

Tento inkubátor se skládá z příčně dělené skleněné odstředivky, která je připojena objímkou z korozi-vzdorné oceli a uchycena šroubovací zátkou. Skrz zátku prochází úzká skleněná trubička nebo trubička z korozi-vzdorné oceli a vede až k zaoblenému dnu, kam přivádí vzduch, který lehce probublává a víří vajíčka, čímž se snižuje přenos saprofytických plísňových infekcí mezi vajíčky a zároveň usnadňuje výměna chemické látky mezi inkubátorem a chovnou nádrží.

Příklad B

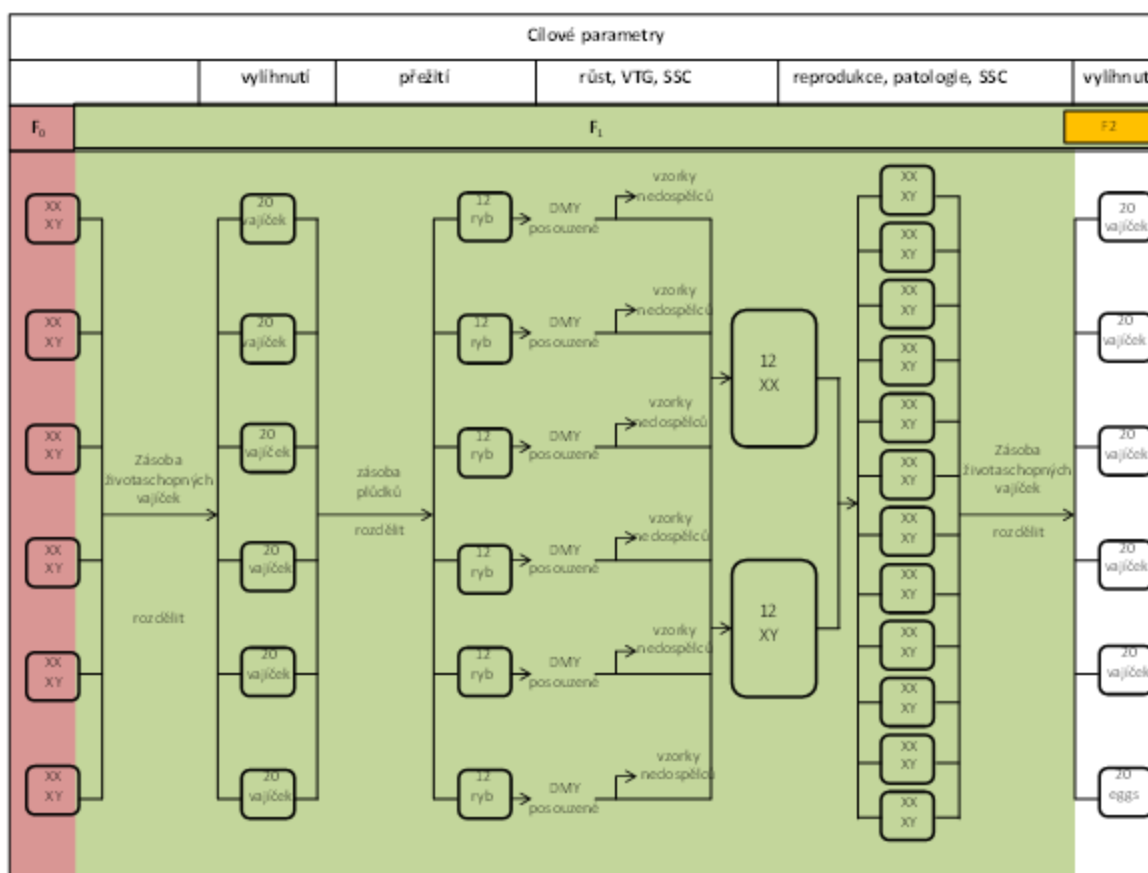


Tento inkubátor se skládá ze skleněného válcovitého tělesa (průměr 5 cm a výška 10 cm) a sítě z koroziivzdorného ocelového drátu (oko 0,25 ϕ a 32), které je připevněno ke dnu tělesa kroužkem z PTFE. Inkubátory jsou zavěšeny v nádržích na tyči a vertikálně protřepávány (v amplitudě přibližně 5 cm) v cyklu (přibližně jednou za 4 sekundy) vhodném pro vajíčka halančíka japonského.

Dodatek 7

SCHEMATICKÝ DIAGRAM PRO SLUČOVÁNÍ A OSAZOVÁNÍ REPLIKÁTŮ V PRŮBĚHU ZKUŠEBNÍ METODY MEOGRT

Obrázek 1: Slučování a osazování replikátů v průběhu zkušební metody MEOGRT. Obrázek představuje jednu expozici nebo polovinu kontroly. Vzhledem ke slučování není v průběhu zkoušky identita replikátu kontinuální. Upozorňujeme, že výraz „vajíčka“ se týká životaschopných, oplodněných vajíček (ekvivalent embryí).



Expozice a replikace

Zkušební metoda doporučuje pět expozic zkoušené chemické látky s použitím technického materiálu a negativní kontroly. Počet replikátů v jedné expozici není v průběhu zkoušky MEOGRT konstantní, počet replikátů v kontrolní expozici je dvojnásobek expozice každé jednotlivé zkoušené chemické látky. V generaci F₀ má každá expozice zkoušené chemické látky šest replikátů, zatímco expozice negativní kontrole má 12 replikátů. Důrazně se nedoporučuje používat rozpouštědla, a pokud jsou přesto použita, je třeba do zprávy o zkoušce MEOGRT uvést vybrané rozpouštědlo a odůvodnění pro jeho použití. Je-li použito rozpouštědlo, je také třeba provést dva druhy kontroly: a) kontrolu s rozpouštědlem a b) negativní kontrolu. Každá z těchto dvou kontrolních skupin by měla zahrnovat celou škálu

replikátů ve všech bodech časového průběhu zkoušky MEOGRT. Tato struktura replikátů zůstává stejná po celou dobu vývoje zkušebních organismů v generaci F1 (a v generaci F2, do vylíhnutí). Ve stádiu dospělosti, když jsou sestavovány chovné páry generace F1, se však počet replikátů reprodukčních párů na jednu expozici optimálně zdvojnásobí; proto je v každé expozici zkoušené chemické látky až 12 replikovaných párů a v kontrolní skupině 24 replikovaných párů (a dalších 24 replikovaných párů v kontrole s rozpouštědlem, je-li potřebná). Určení líhnutí z embryí vyprodukovaných páry generace F1 se provádí na stejné struktuře replikátů jako u embryí vyprodukovaných páry z generace F0, což znamená zpočátku šest replikátů na jednu expozici zkoušené chemické látky a 12 replikátů v kontrolní skupině (skupinách).

Dodatek 8

POČÍTÁNÍ PAPIL NA ŘITNÍ PLOUTVI

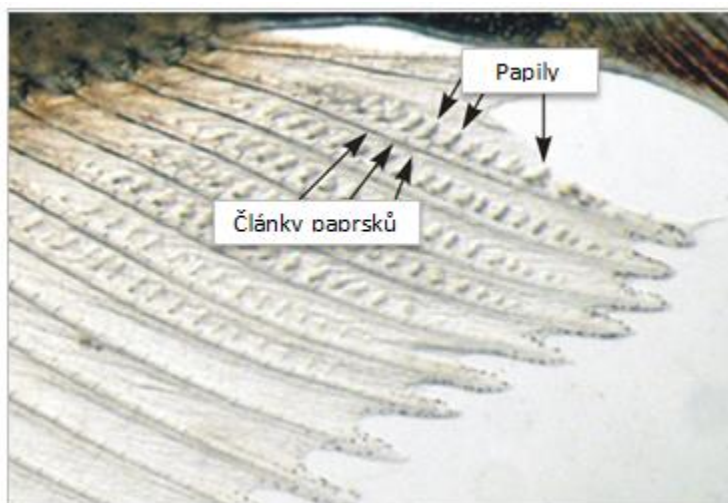
Hlavní materiál a reakční činidla

- Stereoskopický mikroskop (volitelně s připojenou kamerou)
- Fixační roztok (např. Davidsonův (Bouinův se nedoporučuje)), pokud se nepočítá přímo ze zobrazení

Postupy

Po pitvě se řitní ploutev zobrazí, aby bylo možné pohodlně spočítat papily na řitní ploutvi. I když je zobrazení doporučenou metodou, lze řitní ploutev zafixovat pomocí Davidsonova fixačního roztoku nebo jiné vhodné fixační látky aplikované přibližně na 1 minutu. Je důležité udržet při fixaci řitní ploutev plochou, aby bylo možné snáze spočítat papily na řitní ploutvi. Mrtvé tělo s řitní ploutví lze do analýzy uchovat v Davidsonově fixačním roztoku nebo v jiné vhodné fixační látce. Spočítejte počet článků paprsků (viz **obrázek 1**) s papilami, které vystupují ze zadního okraje článku paprsků.

Obrázek 1: Papily na řitní ploutvi



Dodatek 9

PODROBNÝ ČASOVÝ PLÁN ZKOUŠKY MEOGRT

Zkušební týdny 1–3 (F0)

Ryby ve třetí z generace F0, které splnily kritéria výběru (viz odstavce 16–20), se exponují na tři týdny, aby se umožnil vývoj gamet a gonadálních tkání, jež mají být exponovány zkoušené chemické látky. V každé replikované nádrži se chová jeden chovný rybí pár (chovný pár samička XX – sameček XY). Počínaje prvním dnem zkoušky se po dobu 21 po sobě jdoucích dnů sbírají vytřená vajíčka, spočítají se a vyhodnotí se jejich fertilita.

Zkušební týden 4 (F0 a F1)

Vhodnější je sesbírat oplodněná a životaschopná vajíčka (embrya) v jeden den; pokud však není embryí dostatek, mohou být sbírána po dva dny. Jestliže se embrya sbírají dva dny, všechna embrya v expozičních skupinách, která byla sesbírána první den, se sloučí s embryi sesbíranými druhý den. Poté se všechna sloučená embrya za každou expozici náhodně rozdělí do jednotlivých replikovaných inkubátorů v počtu 20 embryí na inkubátor. Každý den se kontroluje a zaznamenává mortalita oplodněných vajíček (embryí). Odumřelá vajíčka se z inkubátorů odstraňují (odumřelá vajíčka se vyznačují zejména v raných stádiích zřetelnou ztrátou průsvitnosti a změnou ve zbarvení vyvolanou koagulací a/nebo sražením bílkovin, což vede k bílému zakalení; OECD (210).

Poznámka: jestliže jednorázové podání vyžaduje sběr druhý den, musí být tomuto postupu podrobeny všechny expoziční skupiny (včetně kontrol). Jestliže ani po druhém dni sběru není v rámci expoziční skupiny k dispozici dostatečný počet embryí, aby bylo možné nasadit 20 embryí na inkubátor, snižte počet nasazených embryí v rámci této konkrétní expoziční skupiny na 15 embryí na inkubátor. Jestliže není k dispozici dostatečný počet embryí, aby bylo možné nasadit 15 embryí na inkubátor, snižte počet replikovaných inkubátorů, dokud nebude k dispozici dostatečné množství pro 15 embryí na inkubátor. Dále lze v generaci F0 přidat více chovných párů na každou expoziční a kontrolní skupinu, aby vyprodukovaly více vajíček, a mohl tak být dosažen doporučený počet 20 vajíček na replikát.

V den zkoušky 24 se chovné páry z generace F0 humánně usmrtí a zaznamená se jejich hmotnost a délka. V případě potřeby mohou být chovné páry z generace F0 chovány další 1–2 dny, aby se zahájila generace F1.

Zkušební týdny 5–6 (F1)

Jeden až dva dny před očekávaným začátkem líhnutí ukončete nebo omezte míchání inkubovaných vajíček, aby se líhnutí urychlilo. Embrya vylíhlá v jednotlivé dny se sloučí podle expoziční skupiny a systematicky rozdělí do každé nádrže pro rybí larvy v rámci dané expoziční skupiny, přičemž do jedné nádrže se umístí maximálně 12 plůdků. Provádí se to náhodným výběrem plůdků a jejich umístěním po jednom postupně do replikátů bez

rozlišení, přičemž se postupuje v pořadí konkrétních expozičních replikátů, dokud všechny replikáty v rámci expoziční skupiny nemají 12 plůdků. Pokud není dostatek plůdků k zaplnění všech replikátů, zajistěte, aby co možná nejvíce replikátů mělo 12 plůdků a mohla být zahájena fáze F1.

Vajíčka, z nichž se nevylíhl plůdek ani po dvojnásobku střední doby líhnutí v kontrole, se považují za neživotaschopná a zlikvidují se. Počet plůdků se zaznamená a v každém replikátu se vypočítá úspěšnost líhnutí (líhnivost).

Zkušební týden 7–11 (F1)

Ve všech replikátech se každý den kontroluje a zaznamenává přežití rybích larev. V den zkoušky 43 se zaznamená počet přeživších ryb v každém replikátu, jakož i počáteční počet plůdků umístěných do daného replikátu (nominálně 12). Umožňuje to vypočítat procento přežití od vylíhnutí do stádia nedospělosti.

Zkušební týdny (F1)

Ve dnech zkoušky 78–85 se z ocasní ploutve každé ryby odebere malý vzorek tkáně za účelem stanovení genotypového pohlaví jednotlivce (tj. vystřížení ploutve). Tyto informace se použijí k sestavení chovných párů.

Do tří dnů po stanovení genotypového pohlaví každé ryby se náhodně sestaví 12 chovných párů na každou expoziční skupinu a 24 párů na každou kontrolu. Z každého replikátu se náhodně vyberou dvě ryby XX a XY, poté se sloučí podle pohlaví a pak náhodně vyberou za účelem sestavení chovného páru (tj. pár XX-XY). Sestaví se minimálně 12 replikátů na každou expozici chemické látky a minimálně 24 replikátů na každou kontrolu s jedním chovným párem v každém replikátu. Pokud v replikátu nejsou k dispozici dvě ryby XX, případně dvě ryby XY ke sloučení, použije se ryba s příslušným genotypem pohlaví z jiných replikátů v rámci expoziční skupiny.

Zbývající ryby (maximálně 8 ryb na replikát) se humánně usmrtí a odeberou se vzorky pro různé sledované parametry nedospělého stádia. Údaje o *dmy* (XX nebo XY) ze všech vzorků nedospělého stádia se uchovávají, aby bylo zajištěno, že všechna data sledovaných parametrů mohou být vztažena ke genetickému pohlaví každé jednotlivé ryby.

Zkušební týdny 13–14 (F1)

Expozice pokračuje po dobu, kdy se nedospělé chovné páry vyvíjejí na dospělé jedince. V den zkoušky 98 (tj. den před zahájením sběru vajíček) se z akvárií i od samiček odstraní vajíčka.

Zkušební týdny 15–17 (F1)

Vyprodukovaná vajíčka se v každém replikátu denně sbírají po dobu 21 po sobě jdoucích dnů a vyhodnotí se jejich plodivost a fertilita.

Zkušební týden 184 (opakování zkušebního týdne 4) (F1 a F2)

Ráno v den zkoušky 120 se v každé replikované nádrži provede sběr vajíček. Sesbíraná vajíčka se vyhodnotí a oplodněná vajíčka (s odstraněnými vlákny) od každého z chovných párů se sloučí podle expozice a systematicky rozdělí do inkubačních komor po 20 oplodněných vajíčkách na inkubátor. Inkubátory mohou být umístěny do samostatných „inkubačních nádrží“ vytvořených pro každou expozici nebo do replikované nádrže, která bude po vylíhnutí obsahovat larvy. Vhodnější je sesbírat embrya v jeden den; pokud však není embryí dostatek, mohou být sbírána po dva dny. Jestliže se embrya sbírají dva dny, všechna embrya v expozičních skupinách, která byla sesbírána první den, se sloučí s embryi sesbíranými druhý den. Poté se všechna sloučená embrya za každou expozici náhodně rozdělí do jednotlivých replikovaných inkubátorů v počtu 20 embryí na inkubátor. Poznámka: jestliže jednorázové podání vyžaduje sběr druhý den, musí být tomuto postupu podrobeny všechny expoziční skupiny (včetně kontrol). Jestliže ani po druhém dni sběru není v rámci expoziční skupiny k dispozici dostatečný počet embryí, aby bylo možné nasadit 20 embryí na inkubátor, snižte počet nasazených embryí v rámci této konkrétní expoziční skupiny na 15 embryí na inkubátor. Jestliže není k dispozici dostatečný počet embryí, aby bylo možné nasadit 15 embryí na inkubátor, snižte počet replikovaných inkubátorů, dokud nebude k dispozici dostatečné množství pro 15 embryí na inkubátor.

V den zkoušky 121 (nebo v den zkoušky 122, aby bylo zajištěno dobré zahájení generace F2) se chovné páry z generace F1 humánně usmrtí a analyzují se sledované parametry dospělých jedinců. V případě potřeby mohou být chovné páry z generace F1 chovány další 1–2 dny, aby se zahájila generace F2.

Zkušební týden 19–20 (F2)

Jeden až dva dny před očekávaným začátkem líhnutí ukončete nebo omezte míchání inkubovaných vajíček, aby se líhnutí urychlilo. Jestliže je zkouška ukončena do dokončení líhnutí generace F2, jsou plůdky každý den spočítány a zlikvidovány. (Embrya, z nichž se nevylíhl plůdek ani po prodloužené inkubační době definované jako dvojnásobek střední doby líhnutí v kontrole, se považují za neživotaschopná.)

Dodatek 10

STATISTICKÁ ANALÝZA

Typy biologických údajů vznikajících ve zkoušce MEOGRT nejsou jedinečné jen pro tuto zkoušku a bylo vyvinuto mnoho vhodných statistických metodik pro správnou analýzu podobných dat, s výjimkou patologických údajů, v závislosti na jejich charakteristikách, včetně normality, homogenity rozptylu, na tom, zda plán studie sám o sobě vede k testování hypotézy, nebo k regresní analýze, zda jde o parametrické nebo neparametrické testy atd. V zásadě platí, že navržené statistické analýzy dodržují doporučení OECD pro údaje o ekotoxicitě (OECD 2006), schéma rozhodování pro analýzu údajů ze zkoušky MEOGRT je uvedeno na obrázku 2.

Lze předpokládat, že soubory dat budou nejčastěji zobrazovat monotónní odpovědi. Dále je třeba vzít v úvahu problém použití jednostranného statistického testu proti oboustrannému statistickému testu. Pokud neexistuje biologické zdůvodnění, že jednostranný test je nevhodný, doporučuje se používat jednostranné testy. I když jsou v následující části doporučeny určité statistické testy, pokud jsou vyvinuty vhodnější anebo silnější statistické metody pro použití u specifických údajů vzniklých při zkoušce MEOGRT, použijí se tyto statistické testy, aby byly maximálně využity uvedené výhody.

Údaje ze zkoušky MEOGRT se analyzují zvlášť pro každé genotypové pohlaví. Existují dvě strategie analyzování údajů od ryb s opačným pohlavím (samečků XX nebo samic XY). 1) Cenzurovat všechny údaje od ryb s opačným pohlavím v celé zkoušce s výjimkou prevalence změny pohlaví v každém replikátu. 2) Ponechat údaje od všech ryb s opačným pohlavím v souboru dat a analyzovat je podle genotypu.

Histopatologické údaje

Histopatologické údaje se uvádějí jako stupně závažnosti, které se hodnotí pomocí nově vyvinutého statistického postupu, Rao-Scottova, Cochran-Armitagova testu využívajícího dílčí testy (RSCABS), (Green *et al.*, 2014). Úprava podle *Rao-Scotta* ponechává informace z replikací zkoušky; postup *využívající dílčí testy* zahrnuje biologické očekávání, že stupně závažnosti budou mít tendenci se zvyšovat s rostoucími koncentracemi expozice. U každé diagnózy specifikuje výstup RSCABS, u kterých expozičních skupin byla prevalence patologie vyšší než u kontrol, a s tím související úroveň závažnosti.

Údaje o plodivosti

Analýzy pro údaje o plodivosti zahrnují sestupný Jonckheerův-Terpstrův nebo Williamsův test na stanovení účinků expozice za předpokladu, že data jsou konzistentní a mají monotónní odpověď na koncentraci. U sestupného testu se všechna porovnání provádějí na hladině významnosti 0,05 a bez korekce počtu provedených porovnání. Očekává se, že údaje budou odpovídat monotónní odpovědi na koncentraci, ale lze to ověřit buď vizuální prohlídkou dat, nebo sestavením lineárních a kvadratických kontrastů středních hodnot expozice po transformaci dat seřazených do pořadí. S výjimkou případů, kdy je kvadratický

kontrast signifikantní a lineární kontrast není signifikantní, provádí se trend-test. Jinak se používá Dunnettův test na stanovení účinku expozice, pokud jsou data normálně distribuovaná s homogenními rozptyly. Jestliže tyto požadavky nejsou splněny, pak se použije Dunnův test s úpravou podle Bonferroniho-Holma. Všechny uvedené testy se provádějí nezávisle na případném celkovém F-testu nebo Kruskalově-Wallisově testu. Další podrobnosti jsou uvedeny v dokumentu OECD 2006.

Pro počítání vajíček (bez transformace) lze použít alternativní metody, jako je generalizovaný lineární model s Poissonovým rozdělením chyb, jestliže je to statisticky odůvodněno (Cameron and Trividi, 2013). Při použití alternativního přístupu se doporučuje vyžádat si radu od statistiků.

Denní počítání vajíček u jedné generace

Model ANOVA je dán vztahem $Y = \text{čas} \cdot \text{čas} + \text{expozice} + * \text{expozice} + \text{čas} \cdot \text{expozice} + * \text{čas} \cdot \text{expozice}$, s náhodnými účinky replikátu (generace*expozice), a čas*replikát (expozice), což umožňuje nerovné složky rozptylu obou typů napříč generacemi. Čas zde znamená frekvenci počítání vajíček (např. denně nebo týdně). Jde o analýzu opakovaného měření s korelacemi mezi pozorováními stejného replikátu při zohlednění skutečnosti, že data jsou měřena opakovaně.

Hlavní účinky expozice se testují pomocí Dunnettova (nebo Dunnettova-Hsuova) testu, který zahrnuje korekci podle počtu srovnání. Korekce hlavního účinku u generace nebo času jsou nutné, neboť u těchto dvou faktorů není žádná „kontrolní“ úroveň a každý pár úrovní může představovat srovnání, které je předmětem zájmu. Jestliže je u těchto dvou hlavních účinků F-test hlavního účinku signifikantní na úrovni 0,05, pak mohou být párová porovnání tohoto faktoru mezi úrovněmi testována na úrovni 0,05 bez další úpravy.

Model zahrnuje interakce dvou a tří faktorů, takže hlavní účinek například u času nemusí být signifikantní, i když má čas signifikantní dopad na výsledky. Jestliže je tedy interakce dvou nebo tří faktorů zahrnujících čas signifikantní na úrovni 0,05, lze akceptovat srovnání úrovní času na úrovni signifikance 0,05 bez další úpravy.

Další jsou F-testy signifikance expozice v čase, tzv. dílčí testy v tabulce ANOVA. Jestliže je například dílčí test expozice v generaci F1 a čase 12 signifikantní na úrovni 0,05, pak mohou být párová porovnání expozice v generaci F1 a čase 12 akceptována na úrovni 0,05 bez další úpravy. Podobná tvrzení platí i pro testy času v generaci F1 a expozice a pro generaci v rámci určitého času a expozice.

Konečně, u srovnání nespádajících do žádné z výše uvedených kategorií je třeba srovnání upravit pomocí Bonferroniho-Holmovy korekce na p-hodnoty. Další informace o analýzách těchto modelů lze nalézt v publikaci Hockinga (1985) a Hochberga a Tamhana (1987).

Alternativně se nezpracovaná data zaznamenají a uvedou v závěrečné zprávě jako plodivost (počet vajíček) na replikát za každý den. Vypočítá se střední hodnota nezpracovaných dat replikátu a poté se použije transformace druhou odmocninou. Vypočítá se jednocestná

analýza ANOVA z transformovaných středních hodnot replikátu a poté Dunnettovy kontrasty. Rovněž může být užitečné vizuálně zkontrolovat data o plodivosti u každé expozice anebo replikátu na bodovém grafu, který zobrazuje data v čase. Umožní to neformální posouzení potenciálních účinků v průběhu času.

Všechny ostatní biologické údaje

Statistické analýzy vycházejí ze základního předpokladu, že při správné volbě dávky budou data monotónní. Data se tedy považují za monotónní a formálně se vyhodnotí jejich monotónnost pomocí lineárních a kvadratických kontrastů. Jsou-li data monotónní, doporučuje se Jonckheerův-Terpstrův trend-test mediánů replikátů (jak je doporučeno v dokumentu OECD 2006). Je-li kvadratický kontrast signifikantní a lineární kontrast není signifikantní, data se považují za nemonotónní.

Jestliže jsou data nemonotónní, zejména vzhledem k redukované odpovědi nejvyšší expozice nebo nejvyšších dvou expozic, je třeba zvážit cenzurování datového souboru, aby byla analýza provedena bez těchto expozic. Toto rozhodnutí je třeba učinit na základě odborného posouzení a všech dostupných dat, zejména dat, která naznačují zjevnou toxicitu na těchto úrovních expozice.

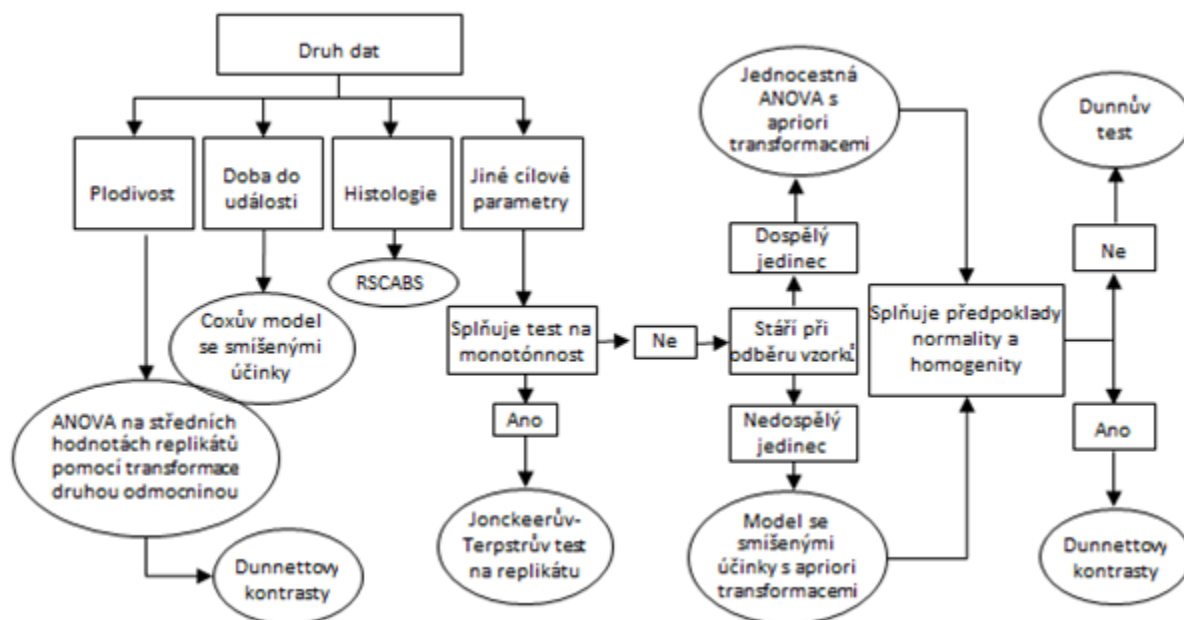
U hmotnosti a délky se nedoporučuje provádět žádné transformace, i když občas mohou být nutné. U údajů o vitelogeninu se však doporučuje logaritmická transformace; u údajů o SSC (papily na řitní ploutvi) se doporučuje transformace druhou odmocninou; u údajů o líhivosti, procentu přežití, podílu pohlaví a procentu fertilních vajíček se doporučuje transformace druhou odmocninou funkce arcsin. Doba do vylíhnutí a doba do prvního vytržení se považuje za údaj o vztahu mezi časem a událostí, přičemž jednotlivá embrya, která se nevylíhnou v definovaném časovém období, nebo replikáty, které se nevytrou, se považují za vpravo cenzurovaná data. Doba do vylíhnutí se počítá od mediánového dne vylíhnutí každého replikátu. Tyto cílové parametry se analyzují pomocí Coxova modelu proporcionálních rizik u smíšených účinků.

Biologická data ze vzorků dospělých ryb mají jedno měření na replikát, to znamená, že v každém replikovaném akváriu je jedna ryba XX a jedna ryba XY. Proto se doporučuje provést jednocestnou analýzu ANOVA středních hodnot replikátu. Jsou-li splněny předpoklady analýzy ANOVA (normalita a homogenita rozptylu posuzovaná podle reziduálních hodnot z analýzy ANOVA pomocí Shapirova-Wilksova testu, respektive Levenova testu), použijí se Dunnettovy kontrasty na stanovení expozic, které se lišily od kontroly. Naopak, jestliže předpoklady analýzy ANOVA nejsou splněny, je třeba provést Dunnův test a stanovit tak, které expozice se lišily od kontroly. Podobný postup se doporučuje i pro data, která jsou ve formě procent (fertilita, líhnutí a přežití).

Biologická data ze vzorků nedospělých ryb mají od 1 do 8 měření na replikát, to znamená, že počty jednotlivců, kteří přispívají ke střední hodnotě replikátu u každého genotypového pohlaví, mohou být různé. Proto se doporučuje použít model ANOVA se smíšenými účinky a poté Dunnettovy kontrasty, pokud byly splněny předpoklady normality a homogenity rozptylu (na reziduální hodnoty smíšených účinků analýzy ANOVA). Jestliže splněny

nebyly, je třeba provést Dunnův test a stanovit tak, které expozice se lišily od kontroly.

Obrázek 2: Vývojový diagram pro doporučené statistické postupy pro analýzu dat MEOGRT.



Literatura

- (1) OECD (2014). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A guidance to application (přílohy k této publikaci jsou ve formě samostatného dokumentu), OECD Publishing, Paris.
- (2) Cameron AC and Trivedi PK (2013). Regression Analysis of Count Data, 2nd edition, Econometric Society Monograph No 53, Cambridge University Press.
- (3) Hocking RR (1985). The Analysis of Linear Models, Monterey, CA: Brooks/Cole.
- (4) Hochberg Y and Tamhane AC (1987). Multiple Comparison Procedures. John Wiley and Sons, New York.

C.53 ANALÝZA RŮSTU A VÝVOJE LAREV OBOJŽIVELNÍKŮ (LAGDA)

ÚVOD

1. Tato zkušební metoda je rovnocenná pokynu OECD pro zkoušení č. 241 (2015). Potřeba vyvinout a ověřit zkoušku schopnou zjistit a charakterizovat nežádoucí důsledky expozice toxickým chemickým látkám u obojživelníků vyplývá z obavy, že úroveň chemických látek v životním prostředí mohou mít nepříznivé účinky na lidi i volně žijící živočichy. Pokyn OECD týkající se analýzy růstu a vývoje larev obojživelníku (LAGDA) popisuje zkoušku toxicity na obojživelnících, při níž je posuzován růst a vývoj od fertilizace po dobu raného juvenilního období. Jde o analýzu (obvykle 16 týdnů), která hodnotí raný vývoj, metamorfózu, přežití, růst a částečné reprodukční dospívání. Umožňuje také měřit sadu dalších cílových parametrů za účelem diagnostického hodnocení pravděpodobných endokrinních disruptorů (EDC) nebo jiných druhů vývojových a reprodukčních toxických látek. Metoda popsaná v této zkušební metodě je odvozena od validační práce na drápatce vodní (*Xenopus laevis*) provedené americkou Agenturou pro ochranu životního prostředí (U.S. EPA) s podporou z Japonska (1). I když mohou být na růstový a vývojový zkušební protokol adaptovány jiné druhy obojživelníků, přičemž důležitou složkou je schopnost určit genetické pohlaví, konkrétní metody a sledované cílové parametry popsané v této zkušební metodě jsou použitelné pouze u halančíka *Xenopus laevis*.
2. Analýza LAGDA slouží jako zkouška vyššího stupně u obojživelníků pro sběr složitějších informací o nežádoucích účincích na základě vztahu mezi koncentrací a odpovědí a je vhodná pro použití při identifikaci a charakterizaci nebezpečnosti a posuzování ekologických rizik. Analýza je na úrovni 4 koncepčního rámce OECD pro zkoušení a posuzování endokrinních disruptorů, kde analýzy *in vivo* poskytují také údaje o nežádoucích účincích na sledované parametry související s endokrinním systémem (2). Obecné uspořádání experimentu zahrnuje exponování embryí *X. laevis* ve stádiu 8–10 (3) podle Nieuwkoopa a Fabera (NF) minimálně čtyřem různým koncentracím zkoušené chemické látky (obvykle minimálně v polovičních logaritmických intervalech) a kontrole (kontrolám) po 10 týdnů po střední době do stádia NF 62 v kontrole, s jedním průběžným dílčím vzorkem ve stádiu NF 62 (≤ 45 po fertilizaci; obvykle přibližně 45 dnů (dpf)). V každé zkušební koncentraci jsou čtyři replikáty s osmi replikáty pro kontrolu. Cílové parametry hodnocené v průběhu expozice (při odebrání průběžného dílčího vzorku a konečného vzorku po dokončení zkoušky) zahrnují parametry indikující generalizovanou toxicitu: mortalitu, abnormální chování a stanovení růstu (délka a hmotnost), jakož i cílové parametry určené pro charakterizaci specifických způsobů působení endokrinní toxicity ovlivňující estrogenní a androgenní fyziologické procesy nebo fyziologické procesy zprostředkované štítnou žlázou. Tato metoda klade primární důraz na potenciální účinky

relevantní pro populaci (a to nežádoucí dopady na přežití, vývoj, růst a reprodukční vývoj) pro výpočet koncentrace bez pozorovaných účinků (NOEC) nebo účinné koncentrace působící x% změnu (EC_x) měřeného cílového parametru. Je však třeba poznamenat, že přístupy EC_x jsou jen zřídka vhodné pro velké studie tohoto druhu, kde může být nepraktické zvyšovat počet zkoušených koncentrací, aby bylo možné stanovit požadovanou EC_x . Rovněž je třeba poznamenat, že tato metoda nezahrnuje reprodukční fázi samotnou. Definice použité v této zkušební metodě jsou uvedeny v dodatku 1.

VÝCHOZÍ ÚVAHY A OMEZENÍ

3. Vzhledem k omezenému počtu zkoušených chemických látek a laboratoří zapojených do validace této dosti složité analýzy, a zejména proto, že mezilaboratorní reprodukovatelnost není doposud zadokumentována s experimentálními daty, lze předpokládat, že až bude k dispozici dostatečný počet studií k posouzení účinnosti experimentálního uspořádání této nové metody, bude pokyn OECD 241 přezkoumán a v případě potřeby revidován z hlediska nabytých zkušeností. Analýza LAGDA je důležitá analýza řešící potenciální faktory přispívající k poklesu populace obojživelníků hodnocením účinků expozice chemickým látkám v průběhu citlivého larválního stádia, kdy mohou účinky na přežití a vývoj, včetně normálního vývoje reprodukčních orgánů, negativně ovlivnit populaci.
4. Zkouška je navržena tak, aby detekovala hlavní účinek (účinky) vyplývající z endokrinních i neendokrinních mechanismů, a zahrnuje diagnostické cílové parametry, které jsou z části specifické pro klíčové endokrinní dráhy. Je třeba uvést, že dokud nebyla vyvinuta analýza LAGDA, neexistovala žádná validovaná analýza, která by sloužila pro tuto funkci u obojživelníků.
5. Před zahájením analýzy je důležité mít informace o fyzikálně chemických vlastnostech zkoušené chemické látky, zejména proto, aby bylo možné připravit stabilní chemické roztoky. Rovněž je nutné mít adekvátně citlivou analytickou metodu pro ověření koncentrací zkoušené chemické látky. Po dobu přibližně 16 týdnů vyžaduje tato analýza celkový počet 480 zvířat, tj. embryí *X. laevis* (nebo 640 embryí, jestliže je použita kontrola s rozpouštědlem), aby byla zajištěna dostatečná síla zkoušky pro hodnocení cílových parametrů relevantních pro populaci, jako je růst, vývoj a reprodukční dospělost.
6. Před použitím zkušební metody ke zkoušení směsi pro účely právních předpisů je třeba zvážit, zda poskytne přijatelné výsledky pro zamýšlený právní účel. Kromě toho tato analýza nehodnotí plodivost přímo, takže nemusí být použitelná v pokročilejším stádiu, než je úroveň 4 Koncepčního rámce OECD pro zkoušky a posuzování chemických látek narušujících činnost endokrinních žláz.

VĚDECKÝ ZÁKLAD ZKUŠEBNÍ METODY

7. Většina našich současných znalostí o biologii obojživelníků byla získána pomocí modelového laboratorního druhu *X. laevis*. Tento druh může být rutinně chován v laboratoři, ovulaci lze indukovat pomocí lidského choriového gonadotropinu (hCG), přičemž zásoba zvířaty je běžně dostupná u komerčních chovatelů.
8. Stejně jako u všech obratlovců je reprodukce obojživelníků řízená hypothalamo-hypofýzo-gonadální (HPG) osou (4). Mediátory tohoto endokrinního systému jsou estrogeny a androgeny, které řídí vývoj a fyziologii pohlavně dimorfních tkání. Ve vývojovém cyklu obojživelníků jsou tři odlišné fáze, kdy je tato osa zvláště aktivní: 1) diferenciaci gonád v průběhu larválního vývoje, 2) vývoj druhotných pohlavních znaků a vyzrálost gonád v průběhu juvenilní fáze a 3) funkční reprodukce dospělých jedinců. Každé z těchto tří vývojových oken může být náchylné na narušení endokrinního systému určitými chemickými látkami, jako jsou estrogeny a androgeny, což nakonec vede ke ztrátě reprodukční způsobilosti organismů.
9. Gonády se začínají vyvíjet ve stádiu NF 43, kdy se nejdříve vyvine bipotenciální genitální rýha. Diferenciace gonád začíná ve stádiu NF 52, kdy primordiální zárodečné buňky buď migrují do medulární tkáně (samečci), nebo zůstávají v kortikální oblasti (samičky) vyvíjejících se gonád (3). Poprvé bylo zjištěno, že je tento proces pohlavní diferenciaci gonád náchylný na chemickou alteraci, u druhu *Xenopus* v 50. letech minulého století (5) (6). Při expozici pulců estradiolu v průběhu tohoto období diferenciaci gonád dochází ke změně pohlaví samečků, kteří jsou pak po dosažení dospělosti plně funkčními samičkami (7) (8). Funkční změna pohlaví samiček na samečky je také možná a byla hlášena po implantaci tkáně varlat pulcům (9). Přestože však expozice inhibitoru aromatázy také působí funkční změnu pohlaví u *X. tropicalis* (10), nebylo prokázáno, že by k tomu docházelo u *X. laevis*. V minulosti byly účinky toxických látek na diferenciaci gonád hodnoceny podle histologického vyšetření gonád při metamorfóze a změna pohlaví mohla být stanovena pouze analýzou podílů pohlaví. Donedávna neexistovaly žádné prostředky jak přímo určit genetické pohlaví druhu *Xenopus*. Nedávné stanovení markerů souvisejících s pohlavím u druhu *X. laevis* však umožňuje určit genetické pohlaví a přímo identifikovat zvířata se změněným pohlavím (11).
10. U samečků postupuje juvenilní vývoj se zvyšováním hladin testosteronu v krvi odpovídajícím vývoji druhotných pohlavních znaků, jakož i vývoji varlat. U samiček produkují vaječníky estradiol, což vyvolává vznik vitelogeninu (VTG) v plazmě, vitelogeninových oocytů ve vaječníku a vývoj vejcovodů (12). Vejcovody jsou samičí druhotné pohlavní znaky, které fungují při dozrávání oocytů v průběhu reprodukce. Na vnější stranu oocytů procházejících přes vejcovod se nabalí sliz, oocyty se poté shromažďují ve vřetku a jsou připraveny k fertilizaci. Zdá se že vývoj vejcovodů je

regulován estrogény, neboť u *X. laevis* (13) a *X. tropicalis* vývoj koreluje s hladinami estradiolu (12). Byl hlášen vývoj vejcovodů u samečků po expozici sloučeninám polychlorovaných bifenyli (14) a 4-*terc*-oktylfenolu (15).

PODSTATA ZKOUŠKY

11. Uspořádání experimentu zahrnuje exponování embryí *X. laevis* ve stádiu NF 8–10 vodní cestou čtyřem různým koncentracím zkoušené chemické látky (látek) po 10 týdnů po střední době do stádia NF 62 v kontrole, s jedním průběžným dílčím vzorkem ve stádiu NF 62. I když je možné podávat vysoce hydrofobní chemické látky potravou, s použitím této cesty expozice při této analýze je doposud málo zkušeností. V každé zkušební koncentraci jsou čtyři replikáty s osmi replikáty pro každou použitou kontrolu. Cílové parametry hodnocené v průběhu expozice zahrnují parametry indukující generalizovanou toxicitu (tj. mortalitu, abnormální chování a stanovení růstu (délka a hmotnost)), jakož i cílové parametry určené pro charakterizaci specifických způsobů působení endokrinní toxicity ovlivňující estrogenní a androgenní fyziologické procesy nebo fyziologické procesy zprostředkované štítnou žlázou (tj. histopatologie štítné žlázy, histopatologie gonád a gonadálního traktu, abnormální vývoj, plazmatický vitelogenin (doplňkově) a podíly genotypového/fenotypového pohlaví).

KRITÉRIA PLATNOSTI ZKOUŠKY

12. Použijí se tato kritéria platnosti zkoušky:

- koncentrace rozpuštěného kyslíku by po celou dobu zkoušky měla být $\geq 40\%$ nasycení vzduchem,
- teplota vody by měla být v rozsahu $21 \pm 1^\circ\text{C}$ a rozdíly mezi replikáty a mezi expozicemi by neměly přesahovat $1,0^\circ\text{C}$,
- hodnota pH zkušebního roztoku by měla být udržována mezi 6,5 a 8,5 a rozdíly mezi replikáty a mezi expozicemi by neměly přesahovat 0,5,
- měly by být k dispozici důkazy pro prokázání toho, že koncentrace zkoušené chemické látky v roztoku byly uspokojivě udržovány v rozmezí $\pm 20\%$ od středních naměřených hodnot,
- mortalita po dobu expozice by měla být $\leq 20\%$ v každém replikátu v kontrolách,
- životaschopnost potěru vybraného k zahájení studie $\geq 70\%$,
- střední doba do stádia NF 62 kontrol by měla být ≤ 45 dnů,

- střední hmotnost zkušebních organismů ve stádiu NF 62 a při ukončení analýzy v kontrolách a v kontrolách s rozpouštědlem (jsou-li použity) by měla dosahovat $1,0 \pm 0,2$, respektive $11,5 \pm 3$ g.
13. I když nejde o kritérium platnosti, doporučuje se, aby byly pro analýzu k dispozici alespoň tři expoziční úrovně se třemi nezpochybněnými replikáty. Příliš vysoká mortalita, která zpochybňuje platnost expozice, je definována jako > 4 úhyny ($> 20 \%$) ve 2 nebo více replikátech, které nelze vysvětlit technickou chybou. Pro analýzu musí být dostupné alespoň tři úrovně expozice bez zjevné toxicity. Znamky zjevné toxicity mohou zahrnovat zejména plavání na hladině, ležení na dně nádrže, obrácené nebo nepravidelné plavání, nepravidelné vyplouvání k hladině a nereagování na podnět, morfologické abnormality (např. deformity končetin), hemoragické léze a abdominální edém.
14. V případě, že zjištěno nedodržení kritérií přijatelnosti zkoušky, měly by být zváženy důsledky z hlediska spolehlivosti zkušebních údajů a tyto úvahy by měly být zahrnuty do zpráv.

POPIS METOD

Přístroje a pomůcky

15. Normální laboratorní vybavení, a zejména:
- a) zařízení řídící teplotu (např. ohřívače nebo chladiče nastavitelné na $21^\circ \pm 1^\circ \text{C}$);
 - b) teploměr;
 - c) binokulární stereoskopický mikroskop a preparační nástroje;
 - d) digitální fotoaparát s rozlišením minimálně 4 megapixelů a s mikrofunkcí (v případě potřeby);
 - e) analytické váhy s přesností měření na 0,001 mg nebo 1 μg ;
 - f) oximetr (měřič rozpuštěného kyslíku) a pH-metr;
 - g) luxmetr (měřič intenzity osvětlení) s přesností měření na jednotky luxů.

Voda

Zdroje a kvalita

16. Použit lze jakoukoli ředící vodu, která je místně dostupná (např. pramenitou vodu nebo vodu z kohoutku filtrovanou přes aktivní uhlí) a umožňuje normální růst a vývoj *X. laevis*, přičemž by měly být k dispozici důkazy o normálním růstu v této vodě. Jelikož kvalita místní vody se může v různých oblastech podstatně lišit, je třeba provést analýzu kvality vody, zejména pokud nejsou dostupné historické údaje o používání této vody pro chov larev obojživelníků. Je-li kvalita ředící vody relativně konstantní, mělo by být stanovení

těžkých kovů (např. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni), hlavních aniontů a kationtů (např. Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , K^+ , Cl^- , SO_4^{2-}), pesticidů, celkového obsahu organického uhlíku a suspendovaných látek provedeno před začátkem zkoušení a/nebo například každých šest měsíců. Některé chemické charakteristiky doporučené ředicí vody jsou uvedeny v dodatku 2.

Koncentrace jódu ve zkušební vodě

17. K tomu, aby mohla štítná žláza syntetizovat thyroidální hormony na podporu normální metamorfózy, musí mít larvy k dispozici dostatek jodidu podávaného současně vodou i potravou. V současnosti neexistují žádné empiricky podložené pokyny ohledně minimální koncentrace jodidu v potravě nebo vodě pro zajištění správného vývoje. Dostupnost jodidu však může ovlivnit schopnost tyreoidálního systému reagovat na činitele ovlivňující činnost štítné žlázy, a jak známo, moduluje bazální aktivitu štítné žlázy, což si zasluhuje pozornost při interpretaci výsledků provedené histopatologie štítné žlázy. Na základě předchozích prací byla prokázána funkční způsobilost analýzy při koncentraci jodidu (I^-), která se v ředicí vodě pohybovala mezi 0,5 a 10 $\mu\text{g/l}$. Optimální hodnota minimální koncentrace jodidu (přidávaného jako sodná nebo draselná sůl) v ředicí vodě by měla po celou dobu zkoušky činit 0,5 $\mu\text{g/l}$. Pokud je zkušební voda rekonstituována z deionizované vody, měl by se přidat jód v minimální koncentraci 0,5 $\mu\text{g/l}$. Změřené koncentrace jodidu ze zkušební vody (tj. ředicí vody) a doplnění jódu či jiných solí (jsou-li použity) do zkušební vody je třeba uvést. Kromě zkušební vody může být měřen také obsah jódu v potravě.

Systém expozice

18. Zkouška byla vypracována pomocí průtokového systému ředění. Složky systému, které přicházejí do styku s vodou, by měly být vyrobeny ze skla, nerezové oceli a/nebo jiných chemicky inertních materiálů. Jako expoziční nádrže by měla sloužit akvária ze skla nebo nerezové oceli a využitelný objem nádržky by měl být mezi 4,0 a 10,0 l (minimální hloubka vody 10 až 15 cm). Systém by měl být schopen podporovat všechny zkušební koncentrace, kontrolu a v případě potřeby kontrolu s rozpouštědlem, se čtyřmi replikáty na expozici a osmi v kontrolách. Průtoková rychlost by měla být u všech nádob stejná a neměnná, jednak kvůli zachování biologických podmínek, jednak kvůli expozici chemické látky. Doporučuje se, aby byly průtoky přiměřené (např. výměna objemu nádrže alespoň pětkrát denně), aby nedošlo k poklesu koncentrace chemické látky v důsledku metabolismu zkušebních organismů a vodních organismů přítomných v akváriu nebo abiotickými cestami degradace (hydrolýzou, fotolýzou) nebo zánikem odpařením, sorpcí). Expoziční nádrže by k určité pozici v systému expozice měly být přiřazeny náhodně, aby se snížily potenciální poziční vlivy, včetně mírných rozdílů v teplotě, intenzitě osvětlení apod. Další informace o nastavení průtokových systémů expozice jsou uvedeny v publikaci *Standard*

Guide for Conducting Acute Toxicity Tests on Test Materials with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians (16).

Dávkování chemické látky: příprava zkušebních roztoků

19. Zkušební roztoky v expozičním systému se připravují tak, že se zásobní roztok zkoušené chemické látky přivádí do systému vhodným čerpadlem. Průtok zásobního roztoku by měl být kalibrován v souladu s analytickým potvrzením zkušebních roztoků před zahájením expozice a v průběhu zkoušky by měl být pravidelně kontrolován jeho objem. Objem zkušebního roztoku v každé komoře by měl být vyměněn minimálně pětkrát denně.

20. Zkoušenou chemickou látku je možné zavést do systému různým způsobem, v závislosti na jejích fyzikálně-chemických vlastnostech. Před zkouškou je proto třeba získat výchozí informace o chemické látce, které jsou podstatné pro stanovení její testovatelnosti. K užitečným informacím o vlastnostech jednotlivých zkoušených chemických látek patří strukturní vzorec, molekulová hmotnost, čistota, stabilita ve vodě a na světle, pK_a a K_{ow} , rozpustnost ve vodě (nejlépe ve zkušebním médiu) a tlak par, jakož i výsledky zkoušky snadné biologické rozložitelnosti (zkušební metoda C.4 (17) nebo C.29 (18)). Rozpustnost ve vodě a tlak par lze použít pro výpočet Henryho konstanty, která určí, zda může dojít ke ztrátám v důsledku odpařování zkoušené chemické látky. Provedení této zkoušky bez výše uvedených informací by mělo být pečlivě zváženo, neboť plán studie bude záviset na fyzikálně-chemických vlastnostech zkoušené chemické látky a bez těchto dat může být obtížné interpretovat výsledky, případně výsledky nemusí dávat smysl. Měla by být k dispozici spolehlivá analytická metoda pro stanovení množství zkoušené chemické látky ve zkušebních roztocích, a to se známou a doloženou přesností a mezí stanovitelnosti. Zkoušené chemické látky rozpustné ve vodě mohou být rozpuštěny v přiměřeném množství ředící vody v koncentraci, která umožňuje dávkování v cílové zkušební koncentraci v průtokovém systému. Chemické látky, které jsou kapalné nebo pevné při pokojové teplotě a jsou středně rozpustné ve vodě, mohou vyžadovat syticí kolony kapalina : kapalina nebo pevná látka : pevná látka (např. válec ze skelné vaty) (19). I když je možné podávat velmi hydrofobní zkoušené chemické látky potravou, s použitím této cesty expozice při této analýze je málo zkušeností.

21. Zkušební roztoky o zvolených koncentracích se připraví ředěním zásobního roztoku. Zásobní roztok by měl být připraven přednostně jednoduchým mechanickým mícháním nebo protřepáváním zkoušené chemické látky v ředící vodě (např. mícháním a/nebo pomocí ultrazvuku). Pro dosažení vhodné koncentrace zásobního roztoku mohou být použity syticí kolony/systémy nebo metody pasivního dávkování (20). Upřednostňuje se použití zkušebního systému bez rozpouštědel; avšak různé zkoušené chemické látky budou mít rozličné fyzikálně-chemické vlastnosti, které mohou vyžadovat různé přístupy při přípravě vody pro expozici chemické látky. Měla by být vynaložena maximální snaha

nepoužívat rozpouštědla nebo nosiče, protože: 1) některá rozpouštědla sama o sobě mohou vyvolávat toxicitu anebo nežádoucí či neočekávané odpovědi, 2) zkoušené chemické látky v koncentraci vyšší, než je jejich rozpustnost ve vodě (což se může často stát při použití rozpouštědel), mohou způsobit nepřesné stanovení účinných koncentrací, 3) použití rozpouštědel u dlouhodobějších zkoušek může mít za následek značný vznik „biofilmu“ souvisejícího s mikrobiální aktivitou, což může mít vliv na okolní podmínky i na schopnost udržet expoziční koncentrace a 4) neexistence dřívějších údajů, které prokazují, že rozpouštědlo neovlivňuje výsledek studie, vyžaduje použití rozpouštědel kontrolu s rozpouštědlem, což má významné dopady na dobré životní podmínky zvířat, neboť k provedení zkoušky jsou potřebná další zvířata. V případě chemických látek, jejichž zkoušení je obtížné, lze použít rozpouštědlo jako poslední řešení, a určení, jaká metoda je nejvhodnější, by mělo vycházet z metodického dokumentu OECD ke zkouškám toxicity složitých látek a směsí pro vodní organismy (21). Volba rozpouštědla se bude řídit chemickými vlastnostmi dané chemické látky a dostupností dosavadních kontrolních údajů o rozpouštědle. Nejsou-li k dispozici dřívější údaje, je třeba před provedením konečné studie stanovit vhodnost rozpouštědla. V případě, že se použití rozpouštědla nelze vyhnout a dojde k mikrobiální aktivitě (vznik biofilmu), doporučuje se zaznamenávat/vykázat vznik biofilmu v každé nádrži (alespoň týdně) po celou dobu zkoušky. Ideálně by se měla udržovat konstantní koncentrace rozpouštědla při kontrole s rozpouštědlem a při všech zkušebních expozicích. Jestliže koncentrace rozpouštědla není udržována v konstantní výši, je třeba při kontrole s rozpouštědlem použít nejvyšší koncentraci rozpouštědla při zkušební expozici. V případech, kdy je použito nosné rozpouštědlo, neměla by maximální koncentrace rozpouštědla překročit 100 µl/l nebo 100 mg/l (21) a doporučuje se udržovat koncentraci rozpouštědla co možná nejnížší (např. ≤ 20 µl/l), aby se zamezilo potenciálnímu účinku rozpouštědla na měřené ukazatele (22).

Zkušební organismy

Zkušební druh

22. Zkušebním druhem je *X. laevis*, protože: 1) se běžně chová v laboratořích na celém světě, 2) je snadno dostupný od komerčních dodavatelů a 3) lze stanovit jeho genetické pohlaví.

Péče o dospělé jedince a množení

23. Správná péče a chov *X. laevis* jsou popsány ve standardizovaném pokynu (23). Chov a péči o *X. laevis* popisuje také Read (24). Množení se provádí tak, že se třem až pěti párům dospělých samic a samečků vstříkne intraperitoneálně lidský choriogonadotropin (hCG). Samičkám ve vzorku se vstříkne např. přibližně 800–1 000 IU a samečkům 500–800 IU hCG rozpuštěného v 0,6–0,9% solném roztoku (nebo Ringerově žabím roztoku, izotonickém roztoku pro použití u obojživelníků; www.hermes.mbl.edu/biologicalbulletin/compendium/comp-RGR.html). Injekční objemy

by měly být přibližně 10 µl/g tělesné hmotnosti (~ 1000 µl). Poté jsou indukované chovné páry drženy ve velkých nádržích, v klidu a ve statických podmínkách, aby se podpořil amplexus. Na dně každé množicí nádrže by mělo být nepravé dno z nerezového ocelového pletiva (např. otvory 1,25 cm), které umožní propadnutí vajíček na dno nádrže. Žáby, kterým se vstříkne hCG pozdě odpoledne, obvykle nakladou většinu vajíček do druhého dne dopoledne. Po uvolnění a oplodnění dostatečného množství vajíček by dospělí jedinci měli být z množicích nádrží odstraněni. Vajíčka se poté sesbírají a slizový obal se odstraní ošetřením v L-cysteinu (23). Připraví se 2% roztok L-cysteinu a jeho hodnota pH se upraví na 8,1 pomocí 1 M NaOH. Tento roztok o teplotě 21 °C se přidá do Erlenmeyerovy baňky o objemu 500 ml obsahující vajíčka z jednoho kladení, lehce se promíchává po dobu jedné až dvou minut a poté se důkladně propláchne 6–8krát kultivační vodou o teplotě 21 °C. Vajíčka se poté přenesou do krystalizační misky a stanoví se, zda jsou životaschopné z > 70 % a vykazují jen minimální abnormality buněčného dělení embryí.

USPOŘÁDÁNÍ ZKOUŠKY

Zkušební koncentrace

24. Doporučuje se použít minimálně čtyři koncentrace chemické látky a příslušné kontroly (v případě potřeby včetně kontrol s rozpouštědlem). Obvykle se doporučuje rozdíl koncentrací (faktor odstupňování) nepřesahující 3,2.
25. Pro účely této zkoušky by se měly v maximální možné míře používat výsledky z již existujících studií obojživelníků pro stanovení nejvyšší zkoušené koncentrace, aby se nepoužívaly koncentrace, které jsou zjevně toxické. Ke stanovení této koncentrace mohou přispět například informace o kvantitativním vztahu mezi strukturou a aktivitou, analogické údaje a data z již existujících studií obojživelníků, jako je analýza metamorfózy obojživelníků, zkušební metoda C.38 (25) a analýza teratogeneze žabích embryí – *Xenopus* (23), anebo zkoušek na rybách, jako jsou zkušební metody C.48, C.41 a C.49 (26) (27) (28). Před provedením analýzy LAGDA může být provedena zkouška ke zjištění rozsahu. Doporučuje se, aby expozice ke zjištění rozsahu byla zahájena do 24 hodin po fertilizaci a pokračovala po dobu 7–14 dnů (v případě potřeby i déle) a aby byly zkoušené koncentrace nastaveny tak, aby intervaly mezi jednotlivými zkoušenými koncentracemi nebyly větší než faktor 10. Výsledky zkoušky ke zjištění rozsahu by měly sloužit pro stanovení nejvyšší zkoušené koncentrace při analýze LAGDA. Nezapomeňte, že pokud musí být použito rozpouštědlo, pak může být vhodnost tohoto rozpouštědla (tj. zda může mít dopad na výsledek studie) stanovena v rámci studie ke zjištění rozsahu.

Replikáty ve zkušebních skupinách a kontrolách

26. Měly by se použít minimálně čtyři replikované nádrže na každou zkoušenou koncentraci a minimálně osm replikátů pro kontroly (a v případě potřeby pro kontrolu s rozpouštědlem)

(tj. počet replikátů v kontrolách a v každé kontrole s rozpouštědlem by měl být dvakrát tak velký jako počet replikátů každé expoziční skupiny, aby byla zajištěna správná statistická síla). Každý replikát by měl obsahovat maximálně 20 jedinců. Minimální počet zpracovaných jedinců bude 15 (5 pro dílčí vzorek stádia NF 62 a 10 juvenilních jedinců). Do každého replikátu se však přidají další jedinci, aby se tak kompenzovala možná mortalita a zachoval se kritický počet 15.

POSTUP

Přehled analýzy

27. Analýza se zahajuje s nově nakladenými embryi (stádium NF 8–10) a pokračuje do vývoje juvenilních jedinců. Každý den se kontroluje mortalita a případné známky abnormálního chování. Ve stádiu NF 62 se odebere dílčí vzorek larev (maximálně 5 jedinců na replikát) a vyšetří se jednotlivé sledované parametry (tabulka 1). Poté, co všichni jedinci dosáhnou stádia NF 66, tj. dokončení metamorfózy (nebo po 70 dnech od zahájení studie, pokud toto datum nastane dříve), se provede náhodná redukce (avšak bez odebrání dílčích vzorků), aby se počet jedinců snížil (10 na nádrž) (viz odstavec 43), a zbývající jedinci jsou i nadále exponováni až do 10 týdnů po střední době do stádia NF 62 v kontrole. Při ukončení zkoušky (odebírání vzorků juvenilních jedinců) se provedou další měření (tabulka 1).

Podmínky expozice

28. Úplný souhrn zkušebních parametrů lze najít v dodatku 3. V průběhu doby expozice se denně měří množství rozpuštěného kyslíku, teplota a pH zkušebních roztoků. Jednou měsíčně se měří konduktivita, zásaditost a tvrdost. Pokud jde o teplotu vody zkušebních roztoků, rozdíly mezi jednotlivými replikáty a mezi jednotlivými expozicemi (v rámci jednoho dne) by neměly překročit 1,0 °C. Také u hodnoty pH zkušebních roztoků by rozdíly mezi jednotlivými replikáty a mezi jednotlivými expozicemi neměly překročit 0,5.
29. Expoziční nádrže mohou být každý den čištěny odsáváním, aby se z nich odstranila nezkonzumovaná potrava a odpadní produkty, přičemž je třeba dávat pozor, aby nedošlo ke křížové kontaminaci nádrží. Je nutné dbát na minimalizaci stresu a traumat zvířat, zejména během přemísťování, čištění akvárií a manipulace. Je třeba se vyvarovat stresových podmínek/činností, jakými jsou hlasitý a/nebo nepřetržitý hluk, klepání na akvária, vibrace v nádržích.

Délka expozice zkoušené chemické látky

30. Expozice se zahajuje s nově nakladenými embryi (stádium NF 8–10) a pokračuje po 10 týdnů po střední době do stádia NF 62 (≤ 45 dnů od zahájení studie) v kontrolní skupině. Analýza LAGDA trvá obvykle 16 týdnů (maximálně 17 týdnů).

Zahájení analýzy

31. Rodičovská zvířata použitá pro zahájení analýzy by měla v minulosti prokazatelně vyprodukovat potomstvo, u něž lze geneticky určit pohlaví (dodatek 5). Po vytření dospělých jedinců se sesbírají embrya, ošetří se cysteinem, aby se z nich odstranil slizový povlak, a zkontroluje se jejich životaschopnost (23). Ošetření cysteinem umožňuje, aby se embrya při manipulaci v průběhu screeningu nenalepila na povrchy. Screening probíhá pod stereomikroskopem pomocí očního kapátka vhodné velikosti, kterým se odstraňují neživotaschopná embrya. Preferuje se, aby byl pro zkoušku použit jeden potěr s větší než 70% životaschopností. Embrya ve stádiu NF 8–10 se náhodně rozdělí do expozičních nádrží obsahujících příslušný objem ředící vody tak, aby každá nádrž obsahovala 20 embryí. S embryi je třeba při tomto přemístění zacházet opatrně, aby se minimalizoval manipulační stres a předešlo jakémukoli poranění. 96 hodin po fertilizaci by měli pulci vyplavat ve vodním sloupci nahoru a začít se přichytávat na stěny nádrže.

Krmný režim

32. Krmivo a změna krmného režimu v průběhu jednotlivých vývojových stádií *X. laevis* představují velmi důležitý aspekt protokolu LAGDA. Při nadměrném krmení v průběhu larvální fáze obvykle dochází ke zvýšenému výskytu a závažnosti skoliózy (dodatek 8) a tomu by se mělo zabránit. Naopak při nedostatečném krmení v průběhu larvální fáze dochází k vysoce variabilním vývojovým výsledkům mezi kontrolami, což by potenciálně mohlo narušit statistickou sílu nebo způsobit zavádějící výsledky zkoušky. V dodatku 4 je uvedeno doporučené krmivo a krmné režimy pro larvy a juvenilní jedince *X. laevis* v průtokových podmínkách, ale jsou přípustné i alternativy, pokud zkoušené organismy rostou a vyvíjejí se uspokojivě. Je důležité poznamenat, že pokud se měří endokrinní specifické cílové parametry, nesmí krmivo obsahovat endokrinní účinné látky, jako je sója.

Krmení larev

33. Doporučená potrava pro larvy zahrnuje krmivo pro mladé lososovité ryby, řasy *Spirulina* a vločky pro okrasné rybičky (např. vločky TetraFin[®], Tetra, Německo) promíchané v kultivační (nebo ředící) vodě. Tato směs se podává třikrát denně v pracovní dny a jednou denně o víkendech. Pulci se také krmí živou žábřonou, rod *Artemia*, 24 hodin starými larvami (nauplie), a to dvakrát denně v pracovní dny a jednou denně o víkendech, počínaje dnem 8 po fertilizaci. Krmení, které by mělo být stejné v každé zkušební nádrži, by mělo umožňovat správný růst a vývoj pokusných zvířat, aby byla zajištěna reprodukovatelnost a přenositelnost výsledků analýzy: 1) střední doba do stádia NF 62 v kontrolách by měla být ≤ 45 dnů a 2) doporučuje se, aby střední hmotnost byla v kontrolách ve stádiu NF 62 v rozmezí $1,0 \pm 0,2$ g.

Krmení juvenilních jedinců

34. Po dokončení metamorfózy zahrnuje krmný režim prvotřídní krmivo pro žáby, které klesá pod hladinu, např. Sinking Frog Food -3/32 (Xenopus Express, FL, USA) (dodatek 4). Pro malé žabky (rané juvenilní stádium) se peletky krátce pomelou v mlýnku na kávu, mixéru nebo se podrtí tloučkem v třecí misce, aby se zmenšila jejich velikost. Jakmile jsou juvenilní žabky dostatečně velké, aby mohly konzumovat celé peletky, není mletí nebo drcení dále nutné. Zvířata by měla být krmena jednou denně. Krmení juvenilních jedinců by mělo umožňovat správný růst a vývoj organismů: doporučuje se střední hmotnost kontrolních juvenilních jedinců v rozmezí $11,5 \pm 3$ g při ukončení analýzy.

Analytická chemie

35. Před zahájením analýzy je třeba stanovit stabilitu zkoušené chemické látky (např. rozpustnost, odbouratelnost a těkavost) a všech potřebných analytických metod například pomocí stávajících informací nebo znalostí. Při dávkování přes ředící vodu se doporučuje, aby byly zkoušené roztoky z každé koncentrace replikované nádrže před zahájením zkoušky analyzovány, aby se ověřila účinnost systému. Během doby expozice se koncentrace zkoušené látky určují ve vhodných intervalech, nejlépe každý týden alespoň v jednom replikátu u každé expoziční skupiny, přičemž replikáty ve stejné expoziční skupině se každý týden střídají. Doporučuje se zakládat výsledky na naměřených koncentracích. Udržela-li se však koncentrace zkoušené chemické látky v roztoku během celé zkoušky uspokojivě v rozmezí $\pm 20\%$ jmenovité koncentrace, lze výsledky zakládat na jmenovitých nebo změřených hodnotách. Také variační koeficient (CV) měřených zkoušených koncentrací by měl být po celou dobu zkoušky v rámci expozice v každé koncentraci udržován na 20 % nebo méně. Když změřené koncentrace nezůstávají v rámci 80–120 % nominální koncentrace (například při testování vysoce biologicky rozložitelných nebo adsorpčních chemických látek), je třeba stanovit účinné koncentrace a vyjádřit je ve vztahu k průměrné koncentraci pro průtokové zkoušky.
36. Rychlosti průtoku ředící vody a zásobního roztoku by měly být ve vhodných intervalech kontrolovány (např. třikrát týdně) po celou dobu expozice. U chemických látek, které nelze detekovat při některých nebo při všech nominálních koncentracích (např. v důsledku rychlého rozkladu nebo adsorpce ve zkušebních komorách nebo při výrazné akumulaci chemické látky v organismu exponovaných zvířat), se doporučuje přizpůsobit rychlost obměny zkušebního roztoku v každé komoře tak, aby byly zkoušené koncentrace udržovány pokud možno konstantní.

Pozorování a měření sledovaných parametrů

37. Sledovanými parametry hodnocenými v průběhu expozice jsou parametry naznačující toxicitu včetně mortality a abnormálního chování, jako jsou klinické známky onemocnění anebo generalizované toxicity, a stanovení růstu (délka a hmotnost), jakož i patologické parametry, které mohou být odpovědí na generalizovanou toxicitu i na endokrinní způsoby

účinku působící na dráhy zprostředkované estrogény, androgeny nebo hormony štítné žlázy. Doplnkově může být při ukončení analýzy změřena koncentrace VTG v plazmě. Měření VTG může být užitečné pro pochopení výsledků studie v souvislosti s endokrinními mechanismy pravděpodobných endokrinních disruptorů. Sledované parametry a harmonogramy měření jsou uvedeny v tabulce 1.

Tabulka1: Přehled sledovaných parametrů u zkoušky LAGDA

Sledované parametry*	Denně	Průběžný odběr vzorků (odběr vzorků larev)	Ukončení zkoušky (odběr vzorků juvenilních jedinců)
Mortalita a abnormality	X		
Doba do stádia NF 62		X	
Histo(pato)logie (štítná žláza)		X	
Morfometrické údaje (růst jako hmotnost a délka)		X	X
Jaterní somatický index (LSI)			X
Podíly genetického/fenotypového pohlaví			X
Histopatologie (gonády, reprodukční cesty, ledviny a játra)			X
Vitelogenin (VTG) (doplňkově)			X

* Všechny sledované parametry se analyzují statisticky.

Mortalita a denní pozorování

38. Všechny zkušební nádrže je třeba denně kontrolovat, zda neobsahují mrtvé jedince, a zaznamenávat mortalitu v každé nádrži. Mrtvé jedince ihned po jejich zpozorování je třeba ze zkušební nádrže odstranit. Vývojová stádia mrtvých zvířat se kategorizují jako stádium před NF 58 (před vytvořením předních končetin), stádium NF 58 až stádium NF 62, stádium NF 63 až stádium NF 66 (mezi stádiem 62 a úplnou absorpcí ocasu) nebo stádium po NF 66 (po larválním stádiu). Míra mortality vyšší než 20 % může ukazovat na nevhodné zkušební podmínky nebo na zjevně toxické účinky zkoušené chemické látky. Zvířata bývají nejcitlivější na mortalitu indukovanou jinými událostmi než chemickou látkou v prvních několika dnech vývoje po nakladení vajíček a v průběhu vrcholu metamorfózy. Tato mortalita může být zjevná z kontrolních dat.
39. Dále by mělo být zaznamenáno každé pozorované abnormální chování, makroskopicky viditelné malformace (např. skolióza) nebo léze. Pozorované případy skoliózy je třeba spočítat (incidence) a stanovit její stupeň závažnosti (např. nenápadná – NR, minimální – 1, střední – 2, těžká – 3; dodatek 8). Je třeba usilovat o minimalizaci prevalence střední až

těžké skoliózy (např. pod 10 % v kontrolách) po celou dobu studie, přestože větší prevalence abnormalit v kontrolách nemusí být nutně důvodem pro zastavení zkoušky. Pro standardní chování je typické, že larvy jsou ponořeny ve vodním sloupci, ocas mají zvednutý výše, než je hlava, pravidelně rytmicky mrskají ocasní ploutví, pravidelně vyplouvají k hladině, zavírají žábry a reagují na podněty. Nestandardní chování by zahrnovalo například plavání na hladině, ležení na dně nádrže, obrácené nebo nepravidelné plavání, nepravidelné vyplouvání k hladině a nereagování na podnět. U jedinců po metamorfóze by kromě výše uvedeného normálního chování měly být zaznamenány velké rozdíly ve spotřebě potravy mezi expozicemi. Závažné malformace a léze mohou zahrnovat například morfologické abnormality (např. deformace končetin), krvácivé léze, bakteriální nebo plísňové infekce. Výskyt lézí na hlavě juvenilních jedinců bezprostředně za nosními dírkami může být indikací nedostatečné vlhkosti. Tato stanovení jsou kvalitativní, měla by být považována za rovnocenná klinickým příznakům onemocnění/stresu a porovnána s kontrolními zvířaty. Pokud je míra výskytu v exponovaných nádržích větší než v kontrolních, pak tento výskyt nebo míru výskytu je třeba považovat za důkaz zjevné toxicity.

Dílčí odběr vzorků larev

Popis dílčího odběru vzorků larev:

40. Pulci, kteří dosáhli stádia NF 62, se z nádrží odstraní a použijí se jako vzorky, nebo se přemístí do další části expozice v nové nádrži, případně se fyzicky oddělí od zbývajících pulců ve stejné nádrži dělicí přepážkou. Pulci se každý den kontrolují a zaznamená se den studie, kdy jednotliví pulci dosáhnou stádia NF 62. Rozhodující charakteristikou při tomto hodnocení je tvar hlavy. Jakmile se hlava zmenší natolik, že je vizuálně zhruba stejně široká jako trup pulce a přední končetiny na úrovni střední části srdce, počítá se tento jedinec jako pulec, který dosáhl stádia NF 62.
41. Cílem je odebrat celkem pět vzorků pulců ve stádiu NF 62 z každé replikované nádrže. Provádí se to zcela náhodně, ale je třeba rozhodnout předem. Hypotetický příklad replikované nádrže je uveden na **obrázku 1**. Pokud je v konkrétní nádrži 20 přeživších pulců, když první jednotlivec dosáhne stadia NF 62, vybere se z čísel 1–20 pět náhodných čísel. Pulec číslo 1 je první jednotlivec, který dosáhl stadia NF 62, a pulec číslo 20 je poslední jedinec v nádrži, který dosáhl stadia NF 62. Podobně, pokud je v konkrétní nádrži 18 přeživších pulců, vybere se z čísel 1–18 pět náhodných čísel. Toto se udělá u každé replikované nádrže, když první jednotlivec ve zkoušce dosáhne stadia NF 62. Jestliže jsou při odběru vzorků ve stádiu NF 62 mortality, je třeba zbývajících vzorky opět randomizovat podle toho, kolik larev zbylo do stadia NF 62 a kolik dalších vzorků je zapotřebí pro dosažení celkem pěti vzorků z tohoto replikátu. V den, kdy pulec dosáhne stadia NF 62, se udělá poznámka v připraveném schématu pro odběr vzorků, aby bylo možné určit, zda je

daný jednatlivec použit jako vzorek, nebo fyzicky oddělen od zbývajících pulců pro další expozici. V uvedeném příkladu (obrázek 1) je první jednatlivec, který dosáhne stádia NF 62 (tj. políčko číslo jedna), fyzicky oddělen od ostatních larev, pokračuje v expozici a den studie, kdy tento jednatlivec dosáhl stádia NF 62, se zaznamená. Poté se stejným způsobem pokračuje u jednatlivců číslo 2 a číslo 3 jako u čísla 1 a poté je jednatlivec číslo 4 použit jako vzorek pro stanovení růstu a histologické vyšetření štítné žlázy (podle tohoto příkladu). Tento postup pokračuje až do doby, kdy se 20. jednatlivec buď připojí ke zbývajícím jednatlivcům ve stádiu po NF 62, nebo je použit jako vzorek. Použitý postup náhodného výběru musí každému organismu ve zkoušce poskytnout stejnou pravděpodobnost, že bude vybrán. Toho lze dosáhnout použitím jakékoli metody náhodného výběru, avšak vyžaduje se také, aby každý pulec byl v určité době v průběhu odběru dílčích vzorků ve stádiu NF 62 odloven.

Obrázek 1: Hypotetický příklad režimu odběru vzorků ve stádiu NF 62 u jedné replikované nádrže.



42. Sledovanými parametry při odběru vzorků v larválním stádiu jsou: 1) doba do stádia NF 62 (tj. počet dnů mezi fertilizací a stádiem NF 62), 2) externí abnormality, 3) morfometrické údaje (např. hmotnost a délka) a 4) histologie štítné žlázy.

Humánní usmrcení pulců

43. Pulci odebrání jako vzorek ve stádiu NF 62 (5 jednatlivců na replikát) se usmrtí ponořením do vhodného množství (např. 500 ml) roztoku anestetika (např. 0,3% roztok MS-222, trikain methan sulfonát, CAS.886-86-2) na dobu 30 minut. Roztok MS-222 by měl být pufrován bikarbonátem sodným na hodnotu pH přibližně 7,0, protože nepufrovaný roztok MS-222 je kyselý a dráždivý pro žabí kůže, což působí špatnou absorpci a zbytečný další stres pro organismy.
44. Pulec se pomocí podběráku vyjme z experimentální nádrže a přenesení (umístí) do eutanazačního roztoku. Zvíře se správně usmrtí a je připraveno na pitvu, když nereaguje na externí podněty, jako je zaštípnutí zadní končetiny kleštičkami.

Morfometrické údaje (hmotnost a délka)

45. Stanovení hmotnosti ve vlhkém stavu (na nejbližší mg) a délky těla od tlamy po kloaku (SVL) (na nejbližší 0,1 mm) u každého púlce se provede okamžitě poté, co přestane reagovat v důsledku anestetika (obrázek 2a). Na změření SVL z fotografie může být použit software pro analýzu obrazu. Pulci se před vážením osuší, aby se z nich odstranila nadbytečná ulpělá voda. Po změření velikosti těla (hmotnost a SVL) se zaznamenají nebo zapíší všechny velké morfologické abnormality anebo klinické známky toxicity, jako je skolióza (viz dodatek 8), petechie a krvácení, přičemž se doporučuje elektronická dokumentace. Nezapomeňte, že petechie jsou drobná tečkovitá krvácení červené nebo fialové barvy v kožních vlasečnicích.

Odběr a zpracování tkání

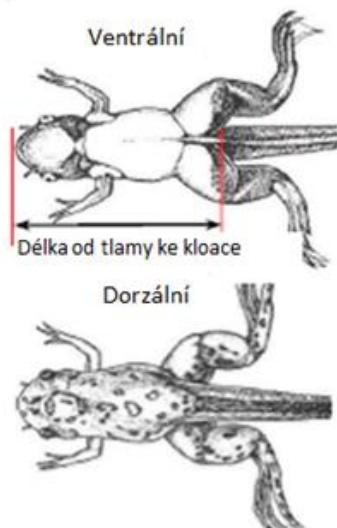
46. U dílčích vzorků odebraných v larválním stádiu se histologicky vyšetří štítná žláza. Dolní část těla za předními končetinami se odstraní a zlikviduje. Zastřižené mrtvé tělo se zafixuje v Davidsonově fixačním médiu. Objem fixačního roztoku v nádobě by měl být alespoň desetinásobkem přibližného objemu tkání. Aby se zájmové tkáně adekvátně zafixovaly, je třeba zajistit správné promíchání nebo cirkulaci fixačního roztoku. Všechny tkáně zůstanou v Davidsonově fixačním médiu minimálně 48 hodin, avšak ne déle než 96 hodin, a poté se opláchnou v deionizované vodě a uchovávají v 10% neutrálním pufrovaném formalínu (1) (29).

Histologie štítné žlázy

47. U každého dílčího vzorku larvy (zafixované tkáně) se histologicky vyšetří štítná žláza, tj. stanoví se diagnóza a stupeň závažnosti (29) (30).

Obrázek 2: Značky pro měření délky těla od tlamy po kloaku při analýze LAGDA ve stádiu NF 62 a) a u juvenilních žab b). Rozhodující charakteristiky stádia NF 62 a): hlava má stejnou šířku jako trup, délka čichového nervu je kratší než průměr čichového bulbu (pohled zezadu) a přední končetiny jsou na úrovni srdce (pohled zepředu). Obrázky převzaty z publikace Nieuwkoop a Faber (1994).

a. Dílčí odběr vzorků larev (stádium NF 62)



b. Odběr vzorků juvenilních jedinců



Konec expozice larev

48. Vzhledem k počátečnímu počtu pulců lze předpokládat, že jedinců, kteří se nebudou vyvíjet normálně a nedokončí metamorfózu (stádium NF 66) v průměrném čase, bude pravděpodobně malé procento. Larvální část expozice by neměla překročit 70 dní. Všechny pulce zbývající na konci tohoto období je třeba usmrtit (viz odstavec 43), stanovit jejich hmotnost ve vlhkém stavu a SVL, stanovit stádium podle Nieuwkoop a Faber, 1994 a zaznamenat případné vývojové abnormality.

Redukce po stádiu NF 66

49. Od stadia NF 66 (úplná resorpce ocasu) až do ukončení expozice by mělo pokračovat deset jedinců na nádrž. Jakmile tedy všechna zvířata dosáhla stadia NF 66 nebo po 70 dnech (pokud toto datum nastane dříve) je třeba provést redukci. Zvířata po stádiu NF 66, která nebudou nadále exponována, se vybírají náhodně.
50. Zvířata, která nejsou vybrána pro další expozici, se utratí (viz odstavec 43). U každého zvířete se provede měření vývojového stadia, stanoví se jeho hmotnost za vlhka a SVL (obrázek 2b) a provede se podrobná pitva. Fenotypové pohlaví (podle morfologie gonád) se označí jako samičí, samčí nebo neurčité.

Odběr vzorků juvenilních jedinců

Popis odběru vzorků juvenilních jedinců

51. Zbývající zvířata jsou nadále exponována až do 10 týdnů po střední době do stadia NF 62 v kontrole s ředící vodou (anebo v kontrole s rozpouštědlem v příslušných případech). Na konci doby expozice se zbývající zvířata (maximálně 10 žab na replikát) usmrtí a změří se

nebo vyhodnotí jednotlivé sledované parametry a zaznamenají se: 1) morfometrické údaje (hmotnost a délka), 2) podíl fenotypového/genotypového pohlaví, 3) hmotnost jater (jaterní somatický index), 4) histopatologie (gonády, reprodukční trakt, játra a ledviny) a doplňkově 5) plazmatický VTG.

Humánní usmrcení žab

52. Juvenilní vzorky, žáby po metamorfóze se usmrtí intraperitoneální injekcí anestetika, např. 10% MS-222 ve vhodném fosfátovém pufru. Jakmile žáby přestanou reagovat (obvykle zhruba 2 minuty po injekci, pokud je použit 10% MS-222 v dávce 0,01 ml na 1 g žáby), mohou se z nich odebrat vzorky. I když juvenilní žáby mohou být ponořeny do vyšší koncentrace anestetika (MS-222), zkušenosti ukazují, že při použití této metody trvá déle, než na ně anestetikum začne působit, přičemž doba působení nemusí být adekvátní, aby umožnila odběr vzorků. Injekce představuje efektivní a rychlé usmrcení před odběrem vzorků. Odběr vzorků by neměl být zahájen, dokud není potvrzeno, že žáby nereagují, aby bylo zajištěno, že jsou zvířata mrtvá. Jestliže žáby vykazují známky značného utrpení (velmi silné utrpení a spolehlivě lze předvídat úhyn) a jsou považovány za hynoucí, je třeba jim podat anestetikum, usmrtit je a při analýze dat je zahrnout do mortality. Pokud je žába usmrcena v důsledku morbidoty, je třeba to zaznamenat a vykázat. V závislosti na tom, kdy v průběhu studie jsou žáby usmrceny, je lze uchovat pro histopatologickou analýzu (fixovat žáby pro případnou histopatologii).

Morfometrické údaje (hmotnost a délka)

53. Měření hmotnosti ve vlhkém stavu a SVL je stejné jako měření popsané u odběru dílčích vzorků larev.

Plazmatický vitelogenin (VTG) (doplňkově)

54. VTG je široce akceptovaný biologický marker vyplývající z expozice estrogenovým chemickým látkám. Ve zkoušce LAGDA může být doplňkově měřen plazmatický VTG u juvenilních vzorků (může to být zvláště podstatné v případě podezření, že zkoušená chemická látka je estrogen).
55. Odříznou se zadní končetiny usmrcených juvenilních jedinců a z heparinizované vlásečnice se odebere krev (i když mohou být vhodné i alternativní metody odběru krve, jako je srdeční punkce). Krev se vystříkne do mikrozkuhavky do odstředivky (např. o objemu 1,5 ml) a odstředěním se získá plazma. Vzorky plazmy se skladují při teplotě – 70 °C nebo nižší až do stanovení VTG. Koncentraci VTG v plazmě lze změřit metodou enzymové imunoanalýzy s enzymem vázaným na imunosorbent (ELISA) (dodatek 6) nebo alternativní metodou, jako je například hmotnostní spektrometrie (31). Vzhledem k větší senzitivitě jsou vhodnější protilátky specifické pro daný druh.

Určení genetického pohlaví

56. Genetické pohlaví každé juvenilní žaby se posuzuje podle markerů, které vypracoval Yoshimoto *et al.* (11). Aby mohlo být stanoveno genetické pohlaví, odebere se část (nebo celá) jedné zadní končetiny (nebo jakékoli jiné tkáně) odpreparované při pitvě a uloží se do mikrozkmavky (vzorky žabí tkáně mohou být získány z jakékoli tkáně). Tkáň lze uchovávat při teplotě -20°C nebo nižší až do izolace kyseliny deoxyribonukleové (DNA). Izolace DNA z tkání může být provedena pomocí komerčně dostupných sad a analýza přítomnosti nebo nepřítomnosti markeru se provádí metodou polymerázové řetězové reakce (PCR) (dodatek 5). Obecně je shoda mezi histologickým pohlavím a genotypem u všech kontrolních zvířat v okamžiku odběru vzorků v juvenilním stádiu v kontrolních skupinách větší než 95 %.

Odběr tkání a jejich fixace pro histopatologii

57. Při posledním odběru vzorků se odeberou gonády, reprodukční trakt, ledviny a játra pro histologickou analýzu. Otevře se břišní dutina, vypreparují se játra a zváží se. Poté se opatrně vyjmou z podbřišku trávicí orgány (například žaludek, střeva), aby se odhalily gonády, ledviny a reprodukční trakt. Všechny závažné morfologické abnormality gonád se zaznamenají. Nakonec se odeberou zadní končetiny, pokud již nebyly odebrány za účelem odběru krve. Odebraná játra a mrtvé tělo s gonádami ponechanými na místě je třeba okamžitě uložit do Davidsonova fixačního roztoku. Objem fixačního roztoku v nádobě by měl být alespoň desetinásobkem přibližného objemu tkání. Všechny tkáně zůstanou v Davidsonově fixačním médiu minimálně 48 hodin, avšak ne déle než 96 hodin, a poté se opláchnou v deionizované vodě a uchovávají v 10% neutrálním pufovaném formalínu (1) (29).

Histopatologie

58. Každý juvenilní vzorek se histologicky vyšetří, zda nevykazuje patologii gonád, reprodukčního traktu, ledvin a jaterní tkáně, tj. stanoví se diagnóza a určí stupeň závažnosti (32). Z tohoto hodnocení se odvodí také gonádový fenotyp (např. vaječník, varle, obojetný pohlavní vývoj) a společně s jednotlivými měřeními genetického pohlaví mohou být tato pozorování použita pro výpočet podílů fenotypových/genotypových pohlaví.

OZNAMOVÁNÍ ÚDAJŮ

Statistická analýza

59. Při analýze LAGDA jsou generovány tři druhy dat, které je třeba statisticky analyzovat: 1) kvantitativní kontinuální data (hmotnost, SVL, LSI, VTG), 2) data o době do události u vývojových podílů (tj. dny do stádia NF 62 od zahájení analýzy) a 3) ordinální data ve formě stupňů závažnosti nebo vývojových stádií z histopatologického vyšetření.

60. Doporučuje se, aby uspořádání zkoušky a výběr statistického testu umožnily dostatečnou průkaznost zkoušky, aby se zjistily změny biologického významu v ukazatelích, u nichž má být uvedena hodnota NOEC nebo EC_x . Statistická analýza údajů (obvykle střední hodnoty replikátů) by se pokud možno měla řídit postupy, které jsou popsány v dokumentu *Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application* (33). V dodatku 7 této zkušební metody je uvedeno doporučené schéma rozhodování při statistické analýze a pokyny pro zpracování údajů a výběr nejvhodnějšího statistického testu nebo modelu, který má být při zkoušce LAGDA použit.
61. Údaje z juvenilních vzorků (např. růst, LSI) by měly být analyzovány samostatně pro každé genotypové pohlaví, protože genotypové pohlaví se určuje u všech žab.

Poznámky k analýze dat

Použití zpochybněných replikátů a expozic

62. Replikáty a expozice mohou být zpochybněny v důsledku nadúmrtnosti při zjevné toxicitě, onemocnění nebo technické chybě. Jestliže je expozice zpochybněná v důsledku onemocnění nebo technické chyby, měly by být pro analýzu k dispozici alespoň tři nezpochybněné expozice se třemi nezpochybněnými replikáty. Jestliže se u vysoké expozice (expozic) objeví zjevná toxicita, je lepší, aby byly pro analýzu k dispozici alespoň tři expoziční úrovně se třemi nezpochybněnými replikáty (odpovídající metodě maximální tolerované koncentrace podle pokynu OECD (34)). Vedle mortality mohou známky zjevné toxicity zahrnovat ovlivnění chování (např. plavání na hladině, ležení na dně nádrže, obrácené nebo nepravidelné plavání, nepravidelné vyplouvání k hladině), morfologické léze (např. hemoragické léze, abdominální edém) nebo inhibici normálních odpovědí na krmení při kvalitativním srovnání s kontrolními zvířaty.

Kontrola s rozpouštědlem

63. Při ukončení zkoušky je třeba provést hodnocení případných účinků rozpouštědla (pokud bylo použito). To se provede pomocí statistického srovnání kontrolní skupiny s rozpouštědlem a kontrolní skupiny s ředící vodou. Nejdůležitějšími ukazateli, které je třeba při této analýze posoudit, jsou determinanty růstu (hmotnost a délka), jelikož tyto ukazatele mohou být ovlivněny generalizovanými toxicitami. Jsou-li zaznamenány statisticky významné rozdíly v těchto ukazatelích mezi kontrolní skupinou s ředící vodou a kontrolní skupinou s rozpouštědlem, je třeba odborně posoudit, zda je platnost zkoušky zpochybněna. Jestliže se tyto dvě kontroly liší, je třeba skupiny exponované chemické látce porovnávat s kontrolou s rozpouštědlem, pokud není známo, že je vhodnější porovnání s kontrolou s ředící vodou. Není-li zaznamenán žádný statisticky významný rozdíl mezi oběma kontrolními skupinami, doporučuje se, porovnávat skupiny exponované zkoušené chemické látce se sloučenými skupinami (kontrola s rozpouštědlem a kontrola s

ředicí vodou), pokud není známo, že je vhodnější buď porovnání pouze s kontrolou s ředicí vodou, nebo pouze s kontrolní skupinou s rozpouštědlem.

Závěrečná zpráva

64. Závěrečná zpráva by měla obsahovat:

Zkoušená chemická látka:

- fyzikální povaha a (je-li to podstatné) fyzikálně-chemické vlastnosti,
- jednosložková látka:

fyzický vzhled, rozpustnost ve vodě a další relevantní fyzikálně-chemické vlastnosti, chemická identifikace, např. název podle IUPAC nebo CAS, číslo CAS, kód SMILES nebo InChI, strukturní vzorec, čistota, popřípadě chemická identita nečistot, je-li to prakticky proveditelné atd. (včetně obsahu organického uhlíku, je-li měřen),
- vícesložková látka, UVCB a směsi:

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

Zkušební druh:

- vědecký název, kmen, je-li k dispozici, zdroj a metoda sběru oplodněných jiker a následné zpracování.
- incidence skoliózy u dosavadních kontrol pro použitou chovanou populaci.

Zkušební podmínky:

- fotoperioda (fotoperiody),
- uspořádání zkoušky (např. velikost nádrže, materiál a objem vody, počet zkušebních nádrží a jejich replikátů, počet pokusných organismů v každém replikátu),
- metoda přípravy zásobních roztoků a četnost obnovování (je-li použito, mělo by se uvést solubilizační činidlo a jeho koncentrace),
- metoda dávkování zkoušené chemické látky (např. čerpadla, ředicí systémy),
- výtěžnost metody a nominální zkušební koncentrace, mez stanovitelnosti, střední hodnoty naměřených hodnot ve zkušebních nádržích a jejich směrodatné odchylky a metody jejich stanovení a doklad o toho, že naměřené koncentrace odpovídají koncentracím zkoušené chemické látky ve skutečném roztoku,
- charakteristiky ředicí vody: hodnota pH, tvrdost, teplota, koncentrace rozpuštěného kyslíku, koncentrace zbytkového chloru (je-li měřena), celkový obsah jódu, obsah

celkového organického uhlíku (je-li měřen), obsah suspendovaných látek (je-li měřen), salinita zkušební média (je-li měřena) a výsledky jakýchkoli jiných provedených měření,

- nominální zkušební koncentrace, střední hodnoty naměřených koncentrací ve zkušebních nádobách a jejich směrodatné odchylky,
- kvalita vody ve zkušebních nádržích, pH, teplota (denně) a koncentrace rozpuštěného kyslíku,
- podrobné informace o krmení (např. druh krmiva (krmiv), původ, podávané množství a frekvence krmení).

Výsledky:

- doklady o tom, že kontrolní skupiny splnily kritéria validity,
- následující údaje o kontrolní skupině (plus o kontrole s rozpouštědlem, je-li použita) a o expozičních skupinách: pozorovaná mortalita a abnormalita, doba do stádia NF 62, histologické vyšetření štítné žlázy (pouze vzorek larev), růst (hmotnost a délka), LSI (pouze juvenilní vzorek), podíly genotypového/fenotypového pohlaví (pouze juvenilní vzorek), výsledky histopatologického vyšetření gonád, reprodukčního traktu, ledvin a jater (pouze juvenilní vzorek) a plazmatický VTG (pouze juvenilní vzorek, je-li stanoven),
- metoda statistické analýzy a zpracování údajů (použitý statistický test nebo model),
- koncentrace bez pozorovaných účinků (NOEC) pro každou posuzovanou odpověď,
- nejnižší koncentrace s pozorovaným účinkem (LOEC) pro každou posuzovanou odpověď (při $\alpha = 0,05$), případně hodnoty EC_x pro každou posuzovanou odezvu a intervaly spolehlivosti (např. 95 %) a graf proloženého modelu použitý pro jejich výpočet, směrnice křivky koncentrace-odezva, vzorec regresního modelu, odhadované parametry modelu a jejich směrodatné odchylky,
- všechny odchylky od zkušební metody a odchylky od kritérií přijatelnosti a dále poznámky k potenciálním důsledkům na výsledek zkoušky.

65. U výsledků měření sledovaných ukazatelů by měly být uvedeny střední hodnoty a jejich směrodatné odchylky (pokud možno pro jednotlivé replikáty i koncentrace).

66. Měla by být vypočtena střední doba do stádia NF 62 v kontrolách a uvedena jako průměr mediánů replikátů a jejich směrodatná odchylka. Podobně by u expozicí měl být vypočten expoziční medián a uveden jako průměr mediánů replikátů a jejich směrodatná odchylka.

LITERATURA

- (1) U.S. Environmental Protection Agency (2013). Validation of the Larval Amphibian Growth and Development Assay: Integrated Summary Report.
- (2) OECD (2012a). Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Endocrine Disruptors. Environment, Health and Safety Publications, Series on testing and assessment (No 150) Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (3) Nieuwkoop PD and Faber J. (1994). Normal Table of *Xenopus laevis* (Daudin). Garland Publishing, Inc, New York, NY, USA.
- (4) Kloas W and Lutz I. (2006). Amphibians as Model to Study Endocrine Disruptors. Journal of Chromatography A 1130: 16-27.
- (5) Chang C, Witschi E. (1956). Genic Control and Hormonal Reversal of Sex Differentiation in *Xenopus*. Journal of the Royal Society of Medicine 93: 140-144.
- (6) Gallien L. (1953). Total Inversion of Sex in *Xenopus laevis* Daud, Following Treatment with Estradiol Benzoate Administered During Larval Stage. Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences 237: 1565.
- (7) Villalpando I and Merchant-Larios H. (1990). Determination of the Sensitive Stages for Gonadal Sex-Reversal in *Xenopus Laevis* Tadpoles. International Journal of Developmental Biology 34: 281-285.
- (8) Miyata S, Koike S and Kubo T. (1999). Hormonal Reversal and the Genetic Control of Sex Differentiation in *Xenopus*. Zoological Science 16: 335-340.
- (9) Mikamo K and Witschi E. (1963). Functional Sex-Reversal in Genetic Females of *Xenopus laevis*, Induced by Implanted Testes. Genetics 48: 1411.
- (10) Olmstead AW, Kosian PA, Korte JJ, Holcombe GW, Woodis K and Degitz SJ. (2009)a. Sex reversal of the Amphibian, *Xenopus tropicalis*, Following Larval Exposure to an Aromatase Inhibitor. Aquatic Toxicology 91: 143-150.
- (11) Yoshimoto S, Okada E, Umemoto H, Tamura K, Uno Y, Nishida-Umehara C, Matsuda Y, Takamatsu N, Shiba T and Ito M. (2008). A W-linked DM-Domain Gene, DM-W, Participates in Primary Ovary Development in *Xenopus Laevis*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 105: 2469-2474.

- (12) Olmstead AW, Korte JJ, Woodis KK, Bennett BA, Ostazeski S and Degitz SJ. (2009)b. Reproductive Maturation of the Tropical Clawed Frog: *Xenopus tropicalis*. General and Comparative Endocrinology 160: 117-123.
- (13) Tobias ML, Tomasson J and Kelley DB. (1998). Attaining and Maintaining Strong Vocal Synapses in Female *Xenopus laevis*. Journal of Neurobiology 37: s. 441-448.
- (14) Qin ZF, Qin XF, Yang L, Li HT, Zhao XR and Xu XB. (2007). Feminizing/Demasculinizing Effects of Polychlorinated Biphenyls on the Secondary Sexual Development of *Xenopus Laevis*. Aquatic Toxicology 84: 321-327.
- (15) Porter KL, Olmstead AW, Kumsher DM, Dennis WE, Sprando RL, Holcombe GW, Korte JJ, Lindberg-Livingston A and Degitz SJ. (2011). Effects of 4-*Tert*-Octylphenol on *Xenopus Tropicalis* in a Long Term Exposure. Aquatic Toxicology 103: 159-169.
- (16) ASTM. (2002). Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests on Test Materials with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians. ASTM E729-96, Philadelphia, PA, USA.
- (17) Kapitola C.4 této přílohy, Zkouška snadné biologické rozložitelnosti.
- (18) Kapitola C.29 této přílohy, Hodnocení snadné biologické rozložitelnosti – uvolňování CO₂ v těsně uzavřených lahvičkách (Headspace Test).
- (19) Kahl MD, Russom CL, DeFoe DL and Hammermeister DE (1999). Saturation Units for Use in Aquatic Bioassays. Chemosphere 39: 539-551.
- (20) Adolfsson-Erici M, Åkerman G, Jahnke A, Mayer P, McLachlan MS (2012). A flow-through passive dosing system for continuously supplying aqueous solutions of hydrophobic chemicals to bioconcentration and aquatic toxicity tests. Chemosphere, 86(6): 593-9.
- (21) OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. Environment, Health and Safety Publications, Series on testing and assessment (No 23), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (22) Hutchinson TH, Shillabeer N, Winter MJ and Pickford DB. (2006). Acute and Chronic Effects of Carrier Solvents in Aquatic Organisms: A Critical Review. Review. Aquatic Toxicology 76: 69–92.

- (23) ASTM (2004). Standard Guide for Conducting the Frog Embryo Teratogenesis Assay - *Xenopus* (FETAX). ASTM E1439 - 98, Philadelphia, PA, USA.
- (24) Read BT (2005). Guidance on the Housing and Care of the African Clawed Frog *Xenopus Laevis*. Royal Society for the Prevention of Cruelty to Animals (RSPCA), Horsham, Sussex, U.K., 84 pp.
- (25) Kapitola C.38 této přílohy, Analýza metamorfózy obojživelníků.
- (26) Kapitola C.48 této přílohy, Krátkodobá zkouška působení na reprodukci ryb.
- (27) Kapitola C.41 této přílohy, Zkouška pohlavního vývoje ryb.
- (28) Kapitola C.49 této přílohy, Zkouška akutní toxicity na rybích embryích (FET).
- (29) OECD (2007). Guidance Document on Amphibian Thyroid Histology. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment. (No 82) Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (30) Grim KC, Wolfe M, Braunbeck T, Iguchi T, Ohta Y, Tooi O, Touart L, Wolf DC and Tietge J. (2009). Thyroid Histopathology Assessments for the Amphibian Metamorphosis Assay to Detect Thyroid-Active Substances, Toxicological Pathology 37: 415-424.
- (31) Luna LG and Coady K.(2014). Identification of *X. laevis* Vitellogenin Peptide Biomarkers for Quantification by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. Analytical and Bioanalytical Techniques 5(3): 194.
- (32) OECD (2015). Guidance on histopathology techniques and evaluation. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 228), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (33) OECD (2006). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. Environment, Health and Safety Publications, Series on testing and assessment (No 54), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (34) Hutchinson TH, Bögi C, Winter MJ, Owens JW, 2009. Benefits of the Maximum Tolerated Dose (MTD) and Maximum Tolerated concentration (MTC) Concept in Aquatic Toxicology. Aquatic Toxicology 91(3): 197-202.

Dodatek 1

DEFINICE

Hlavní ukazatel: způsobuje účinek na úrovni populace.

Chemická látka: látka nebo směs.

ELISA: enzymová imunosorpční analýza.

EC_x: (účinná koncentrace s x% účinkem) je koncentrace, která vyvolá x% účinek u zkušebních organismů během dané expoziční doby ve srovnání s kontrolou. Například EC₅₀ je koncentrace odhadnutá pro vyvolání účinku na zkoušený ukazatel u 50 % exponované populace za stanovenou expoziční dobu.

dpf: dny po fertilizaci.

Průtoková metoda: zkouška, při níž zkušební roztoky plynule protékají zkušebním systémem po celou dobu trvání expozice.

Osa HPG: hypothalamo-hypofýzo-gonadální osa.

IUPAC: International Union of Pure and Applied Chemistry (Mezinárodní unie pro čistou a užitou chemii).

Nejnižší koncentrace s pozorovaným účinkem (LOEC) je nejnižší zkušební koncentrace zkoušené chemické látky, při níž je pozorován statisticky významný účinek zkoušené látky ve srovnání s kontrolou (při $p < 0,05$). Všechny zkušební koncentrace vyšší než LOEC musí však mít stejné nebo závažnější škodlivé účinky, než jsou účinky pozorované při koncentraci LOEC. Nelze-li tyto dvě podmínky splnit, mělo by být podrobně vysvětleno, jak byla LOEC (a tedy i NOEC) zvolena. Pokyny jsou uvedeny v dodatku 7.

Medián letální koncentrace (LC₅₀) je koncentrace zkoušené chemické látky, která usmrtí přibližně 50 % zkušebních organismů během celé zkoušky.

Koncentrace bez pozorovaných účinků (NOEC) je zkušební koncentrace bezprostředně nižší než LOEC, která při srovnání s kontrolou nemá pro danou expoziční dobu statisticky významný účinek (při $p < 0,05$).

SMILES: Simplified Molecular Input Line Entry Specification (Zjednodušená molekulární specifikace pro vstupní řádky).

Zkoušená chemická látka: jakákoli látka nebo směs zkoušená pomocí této zkušební metody.

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

biologický materiál.

VTG: vitelogenin je fosfolipoglykoprotein, prekurzor proteinů vaječného žloutku, který se obvykle vyskytuje u sexuálně aktivních samic všech vejcorodých druhů.

Dodatek 2**NĚKTERÉ CHEMICKÉ CHARAKTERISTIKY DOPORUČENÉ ŘEDICÍ VODY**

Látka	Koncentrační limit
Pevné částice	5 mg/l
Celkový obsah organického uhlíku	2 mg/l
Neionizovaný amoniak	1 µg/l
Zbytkový chlor	10 µg/l
Celkové organofosforové pesticidy	50 ng/l
Celkový obsah organochlorových pesticidů a polychlorovaných bifenyľů	50 ng/l
Celkový obsah organického chloru	25 ng/l
Hliník	1 µg/l
Arsen	1 µg/l
Chrom	1 µg/l
Kobalt	1 µg/l
Měď	1 µg/l
Železo	1 µg/l
Olovo	1 µg/l
Nikl	1 µg/l
Zinek	1 µg/l
Kadmium	100 ng/l
Rtuť	100 ng/l
Stříbro	100 ng/l

Dodatek 3**ZKUŠEBNÍ PODMÍNKY PRO ZKOUŠKU LAGDA**

1. Zkušební druh	<i>Xenopus laevis</i>
2. Typ zkoušky	Kontinuální průtok
3. Teplota vody	Nominální teplota je 21 °C. Střední teplota po dobu trvání zkoušky je 21 ± 1 °C (rozdíly mezi replikáty a mezi expozicemi by neměly přesahovat 1,0 °C).
4. Kvalita osvětlení	Fluorescenční zářivky (širokospektrální) 600–2 000 lux (lumen/m ²) na povrchu vody
5. Fotoperioda	12 h světlo: 12 h tma
6. Objem zkušebního roztoku a zkušební nádoby (nádrže)	4–10 l (minimální hloubka vody 10–15 cm) Akvária skleněná nebo z nerezové oceli
7. Výměny objemu zkušebních roztoků	Konstantní, s ohledem na zachování biologických podmínek a expozici chemické látky (např. objem nádrže se vymění 5x denně)
8. Stáří zkušebních organismů při zahájení	Stádium 8–10 podle Nieuwkoopa a Fabera (NF)
9. Počet organismů na replikát	20 zvířat (embryí)/nádrž (replikát) při zahájení expozice a 10 zvířat (juvenilních jedinců)/nádrž (replikát) po stádium NF 66 až do ukončení expozice
10. Počet expozic	Minimálně 4 expozice zkoušené chemické látky plus příslušná kontrola (kontroly)
11. Počet replikátů pro každou expozici	4 replikáty na expozici pro zkoušenou chemickou látku a 8 replikátů pro kontrolu (kontroly)
12. Počet organismů na zkoušenou koncentraci	Minimálně 80 zvířat na expozici pro zkoušenou chemickou látku a 160 replikátů pro kontrolu (kontroly)
13. Ředící voda	Jakákoli voda, která umožňuje normální růst a vývoj <i>X. laevis</i> (např. pramenitá voda nebo voda z vodovodní sítě přefiltrovaná přes aktivní uhlí)
14. Provzdušňování	Není vyžadováno, ale provzdušňování nádrží může být nutné, jestliže hladina rozpuštěného kyslíku poklesne pod doporučené limity a jestliže je maximalizován nárůst průtoku zkušební roztoku.
15. Rozpuštěný kyslík ve	Rozpuštěný kyslík: ≥ 40 % hodnoty nasycení vzdušným kyslíkem nebo

zkušební roztoku	$\geq 3,5$ mg/l
16. pH zkušební roztoku	6,5–8,5 (rozdíly mezi replikáty a expozicemi by neměly být větší než 0,5)
17. Tvrdost a zásaditost zkušební roztoku	10–250 mg CaCO ₃ /l
18. Krmný režim	(viz dodatek 4)
19. Doba expozice	Od stádia NF 8–10 do deseti týdnů po střední době do stádia NF 62 ve vodě a/nebo kontrolní skupině s rozpouštědlem (maximálně 17 týdnů)
20. Biologické ukazatele	Mortalita (a abnormální jevy), doba do stádia NF 62 (vzorek larev), histologické vyšetření štítné žlázy (vzorek larev), růst (hmotnost a délka), jaterní somatický index (juvenilní vzorek), podíly genotypového/fenotypového pohlaví (juvenilní vzorek), histopatologie gonád, reprodukčního traktu, ledvin a jater (juvenilní vzorek) a plazmatický vitelogenin (juvenilní vzorek, doplňkově)
21. Kritéria platnosti zkoušky	Rozpuštěný kyslík by měl být > 40 % hodnoty nasycení vzduchem; střední teplota vody by měla být v rozsahu 21 ± 1 °C a rozdíly mezi replikáty a mezi expozicemi by měly být $< 1,0$ °C; pH zkušební roztoku by mělo být v rozsahu 6,5 až 8,5; mortalita v kontrole by měla být ≤ 20 % a střední doba do stádia NF 62 v kontrole by měla být ≤ 45 dnů; střední hmotnost zkušebních organismů ve stádiu NF 62 a při ukončení analýzy v kontrolách a v kontrolách s rozpouštědlem (jsou-li použity) by měla dosahovat $1,0 \pm 0,2$, respektive $11,5 \pm 3$ g; měly by být k dispozici důkazy pro prokázání toho, že koncentrace zkoušené chemické látky v roztoku byly uspokojivě udržovány v rozmezí $\pm 20\%$ od středních naměřených hodnot.

Dodatek 4**KRMNÝ REŽIM**

Je třeba uvést, že ačkoli je tento krmný režim doporučován, jsou přípustné i alternativy, pokud budou zkušební organismy růst a vyvíjet se správnou rychlostí.

Krmení larev*Příprava krmiva pro larvy*

- A. 1 : 1 (obj.) krmivo pro mladé lososovité ryby: řasy/TetraFin® (nebo ekvivalent)
1. Krmivo pro mladé lososovité ryby: míchejte 50 g krmiva pro mladé lososovité ryby (drobné granule nebo prášek) a 300 ml vhodné filtrované vody v mixéru nastaveném na vysokou rychlost po dobu 20 sekund
 2. Směs řasy/TetraFin® (nebo ekvivalent): míchejte 12 g řas spirulina v tabletách a 500 ml filtrované vody v mixéru nastaveném na vysokou rychlost po dobu 40 sekund, smíchejte 12 g přípravku Tetrafin® (nebo ekvivalentu) s 500 ml filtrované vody a poté tyto dvě směsi slijte, čímž vznikne 1 litr krmiva s obsahem 12 g/l řas spirulina a 12 g/l přípravku Tetrafin® (nebo ekvivalentu)
 3. Smíchejte stejné objemy krmiva pro mladé lososovité ryby a směsi řasy/TetraFin® (nebo ekvivalent)
- B. Žábronožka:

15 ml vajíček žábronožky se nechá vylíhnout v 1 l slané vody (připravené přidáním 20 ml NaCl do 1 l deionizované vody). Po provzdušňování po dobu 24 hodin při pokojové teplotě za konstantního osvětlení se žábronožka odloví. Žábronožka se nechá na dobu 30 minut usadit zastavením provzdušňování. Skořápky, které vyplavou v nádobě nahoru, se slijí a zlikvidují a žábronožka se přecedí přes vhodný filtr a přemístí do 30 ml filtrované vody.

Krmný protokol

V tabulce 1 je uveden popis druhu a množství krmiva používaného v průběhu larválních stádií expozice. Zvířata se krmí třikrát denně od pondělí do pátku a jednou denně o víkendu.

Tabulka 1: Krmný režim pro larvy *X. laevis* v průtokových podmínkách

Doba* (po fertilizaci)	Krmivo pro mladé lososovité ryby: řasy/TetraFin® (nebo ekvivalent)		Žábronožka	
	Pracovní dny (třikrát denně)	Víkend (jednou denně)	Pracovní dny (dvakrát denně)	Víkend (jednou denně)
Dny 4–14 (v týdnech 0–1)	0,33 ml	1,2 ml	0,5 ml (ode dne 8 do 15)	0,5 ml (ode dne 8 do 15)

Týden 2	0,67 ml	2,4 ml	1 ml (ode dne 16)	1 ml (ode dne 16)
Týden 3	1,3 ml	4,0 ml	1 ml	1 ml
Týden 4	1,5 ml	4,0 ml	1 ml	1 ml
Týden 5	1,6 ml	4,4 ml	1 ml	1 ml
Týden 6	1,6 ml	4,6 ml	1 ml	1 ml
Týden 7	1,7 ml	4,6 ml	1 ml	1 ml
Týdny 8–10	1,7 ml	4,6 ml	1 ml	1 ml

* Den 0 je definován jako den podání injekce hCG.

Přechod z larválního krmiva na krmivo pro juvenilní jedince

Po dokončení metamorfózy larev se přechází na krmivo pro juvenilní jedince, které je popsáno níže. Při tomto přechodu se postupně snižuje množství krmiva pro larvy a zvyšuje množství krmiva pro juvenilní jedince. Lze to provést poměrným snižováním krmiva pro larvy a poměrným zvyšováním krmiva pro juvenilní jedince podle toho, jak každá skupina pěti pulců projde stádiem NF 62 a přiblíží se k dokončení metamorfózy ve stádiu NF 66.

Krmení juvenilních jedinců

Krmivo pro juvenilní jedince

Po dokončení metamorfózy (stádium 66) se krmný režim změní pouze na prvotřídní krmivo pro žáby, které klesá pod hladinu, o velikosti 3/32 palce (Xenopus Express™, FL, USA) nebo ekvivalentní.

Příprava drcených pelet pro larvy při přechodu na krmivo pro juvenilní jedince

Peletky krmiva pro žáby, které klesá pod hladinu, se krátce pomelou v mlýnku na kávu, mixéru nebo se rozdrtí v misce s tloučkem, aby se jejich velikost zmenšila přibližně o 1/3. Při příliš dlouhém zpracování vznikne prášek, což se nedoporučuje.

Krmný protokol

V tabulce 2 je uveden popis druhu a množství krmiva používaného v průběhu juvenilních a dospělých vývojových stádií. Zvířata by měla být krmena jednou denně. Je třeba poznamenat, že s postupem metamorfózy zvířata i nadále dostávají část krmiva ve formě žábřonožky, dokud > 95 % zvířat nedokončí metamorfózu.

V den ukončení zkoušky by zvířata neměla být krmena, aby krmivo nezkreslilo stanovení hmotnosti.

Tabulka 2: Krmný režim pro juvenilní jedince *X. laevis* v průtokových podmínkách. Je třeba poznamenat, že zvířata, u nichž ještě neproběhla metamorfóza, včetně zvířat, u nichž je metamorfóza opožděna v důsledku expozice chemické látky, nemohou konzumovat nerozdrcené peletky.

Doba (týdny po mediánu data metamorfózy)	Objem drcených peletek (mg na 1 žabku)	Objem celých peletek (mg na 1 žabku)
Když zvířata dokončí metamorfózu	25	0
Týdny 0–1	25	28
Týdny 2–3	0	110
Týdny 4–5	0	165
Týdny 6–9	0	220

* První den týdne 0 je mediánem data metamorfózy u kontrolních zvířat.

Dodatek 5

URČOVÁNÍ GENETICKÉHO POHLAVÍ (GENETICKÉ SEXOVÁNÍ)

Metoda určování genetického pohlaví pro *Xenopus laevis* vychází z publikace Yoshimoto *et al.*, 2008. Podrobné postupy určování genotypu lze v případě potřeby zjistit v této publikaci. Pokud je to považováno za vhodné, mohou být použity alternativní metody (např. qPCR vhodná pro vysoké propustnosti).

Primery *X. laevis*

Marker DM-W

Přímý: 5'-CCACACCCAGCTCATGTAAAG-3'

Reverzní: 5'-GGGCAGAGTCACATATACTG-3'

Pozitivní kontrola

Přímý: 5'-AACAGGAGCCCAATTCTGAG-3'

Reverzní: 5'-AACTGCTTGACCTCTAATGC-3'

Purifikace DNA

DNA purifikujte ze svalové nebo kožní tkáně např. pomocí sady Qiagen DNeasy pro krev a tkáně (kat. č. 69506) nebo podobného výrobku podle přiložených pokynů. DNA lze vyluhovat z páteře s použitím menšího množství pufru, aby byly získány koncentrovanější vzorky, je-li to považováno za nezbytné pro analýzu PCR. Upozorňujeme, že DNA je celkem stabilní, je proto třeba dbát na to, aby nedošlo ke křížové kontaminaci, což by mohlo vést k chybnému určení samečků jako samic nebo naopak.

Polymerázová řetězová reakce

Vzor protokolu s použitím sady JumpStart™ *Taq* od společnosti Sigma je uveden v **tabulce 1**.

Tabulka 1: Vzor protokolu s použitím sady JumpStart™ *Taq* od společnosti Sigma

Roztok master mix	1x (μl)	[Konečné množství]
NFW	11	–

10X pufr	2,0	–
MgCl ₂ (25 mM)	2,0	2,5 mM
dNTP (po 10 mM)	0,4	200 µM
Marker pro primer (8 µM)	0,8	0,3 µM
Marker rev primer (8 µM)	0,8	0,3 µM
Kontrola pro primer (8 µM)	0,8	0,3 µM
Kontrola rev primer (8 µM)	0,8	0,3 µM
JumpStart™ Taq	0,4	0,05 jednotky/µl
Templát DNA	1,0	~ 200 pg/µl

Poznámka: Připravte si větší množství roztoků master mix pro případné ztráty, k nimž může dojít při pipetování (příklad: 25x by se měly použít pouze pro 24 reakcí).

Reakce:

Roztok master mix 19,0 µl

Templát 1,0 µl

Celkem 20,0 µl

Profil termocyklieru:

Krok 1. 94 °C 1 min

Krok 2. 94 °C 30 s

Krok 3. 60 °C 30 s

Krok 4. 72 °C 1 min

Krok 5. Pokračovat podle kroku 2. 35 cyklů

Krok 6. 72 °C 1 min

Krok 7. 4 °C udržovat

Výrobky PCR lze použít okamžitě v gelu nebo uchovávat při 4 °C.

Gelová elektroforéza v agaróze (vzor protokolu)

50X TAE

Tris 24,2 g

Bezvodá (ledová) kyselina octová 5,71 ml

Na₂ (EDTA)·2H₂O 3,72 g

Přidejte vodu do objemu 100 ml

1X TAE

H₂O 392 ml

50X TAE 8 ml

Agaróza 3:1

3 díly agarózy NuSieve™ GTG™

1 díl agarózy Fisher s nízkou elektroendosmózou (EEO)

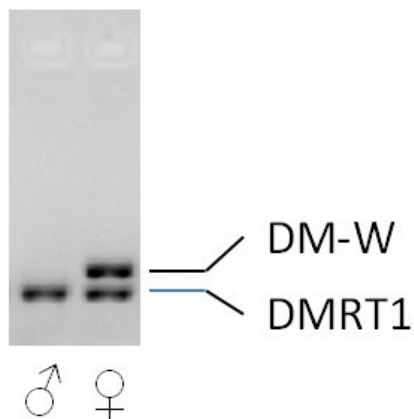
Metoda

1. Připravte 3% gel přidáním 1,2 g směsi agarózy do 43 ml 1X TAE. Protřepete, aby se rozptýlily velké shluky.
2. Směs agarózy ohřívejte v mikrovlnce, dokud se zcela nerozpustí (nesmí se převařit). Nechte trochu vychladit.
3. Přidejte 1,0 µl ethidiumbromidu (10 mg/ml). Láhev protřepete. Nezapomeňte, že ethidiumbromid je mutagenní, proto by měly být pro tento krok použity alternativní chemické látky, pokud je to technicky možné, aby se minimalizovala zdravotní rizika pro pracovníky¹.
4. Nalijte gel do formy s hřebenem. Nechte ho zcela vychladnout.
5. Přidejte gel do přístroje. Gel pokryjte 1X TAE.
6. Přidejte 1 µl 6x zaváděcího barviva do každého produktu PCR o objemu 10 µl.
7. Vzorky napipetujte do jamek.
8. Zpracujte při konstantním napětí 160 V po dobu ~ 20 minut.

Na **obrázku 1** je zobrazení agarózového gelu znázorňující vzory pruhů, které ukazují samčí a samičí jedince.

¹ V souladu s čl. 4 odst. 1 směrnice Evropského parlamentu a Rady 2004/37/ES ze dne 29. dubna 2004 o ochraně zaměstnanců před riziky spojenými s expozicí karcinogenům nebo mutagenům při práci (šestá samostatná směrnice ve smyslu čl. 16 odst. 1 směrnice 89/391/EHS) (Úř. věst. L 158, 30.4.2004, s. 50).

Obrázek 1: Zobrazení agarózového gelu znázorňující vzor pruhů, které ukazují samčí (♂) jedince (jeden pruh ~ 203 bp: DMRT1) a samičí (♀) jedince (dva pruhy při ~ 259 bp: DM-W a 203 bp:DMRT1).



LITERATURA

Yoshimoto S, Okada E, Umemoto H, Tamura K, Uno Y, Nishida-Umehara C, Matsuda Y, Takamatsu N, Shiba T, Ito M. 2008. A W-linked DM-domain gene, DM-W, participates in primary ovary development in *Xenopus laevis*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 105: 2469-2474.

Dodatek 6

MĚŘENÍ VITELOGENINU

Měření vitelogeninu (VTG) se provádí pomocí metody enzymové imunoanalýzy s enzymem vázaným na imunosorbent (ELISA), která byla původně vyvinuta pro VTG jelečka velkohlavého (Parks *et al.*, 1999). V současnosti neexistují žádné komerčně dostupné protilátky pro *X. laevis*. Vzhledem k velkému množství informací o této bílkovině a dostupnosti nákladově efektivních služeb komerční produkce protilátek lze předpokládat, že laboratoře si mohou snadno vyvinout test ELISA pro toto měření (Olmstead *et al.*, 2009). V publikaci Olmstead *et al.* (2009) je také uveden popis analýzy upravený pro VTG u *X. tropicalis*, jak je ukázáno níže. Metoda používá protilátku připravenou proti VTG *X. tropicalis*, ale je známo, že funguje také na VTG *X. laevis*. Je třeba poznamenat, že mohou být použity i nekompetitivní testy ELISA a že tyto testy mohou mít nižší detekční limity než metoda popsána níže.

Materiál a reakční činidla

- Předadsorbované sérum s 1. protilátkou (Ab)

Smíchejte jeden díl séra 1. Ab anti-*X. tropicalis* VTG s 2 díly kontrolní samčí plazmy a nechte při pokojové teplotě po dobu ~ 75 minut, položte na led na dobu 30 minut, odstřed'ujte > 20K x G po dobu 1 hodiny při 4 °C, odstraňte supernatant, alikvotní množství, uchovávejte při -20 °C.

- 2. protilátka

Konjugát kozí proti-králičí IgG-HRP (např. Bio-Rad 172-1019)

- VTG Standard

purifikovaný VTG *X. laevis* v koncentraci 3,3 mg/ml.

- TMB (3,3',5,5' tetramethyl-benzidín) (např. KPL 50-76-00; nebo Sigma T0440)
- Normální kozí sérum (NGS) (např. Chemicon® S26-100ml)
- 96jamkové polystyrenové mikrotitrační destičky EIA (např. ICN: 76-381-04, Costar:53590, Fisher:07-200-35)
- Hybridizační komora 37 °C (nebo vzduchový inkubátor s rychlým dosažením rovnovážného stavu) na destičky, vodní lázeň na zkumavky
- Další běžné laboratorní vybavení, chemikálie a spotřební materiál.

Předpisy

Nanášecí pufr (50 mM karbonátového pufru, pH 9,6):

NaHCO₃ 1,26 g

Na ₂ CO ₃	0,68 g
voda	428 ml

10X PBS (0,1 M fosfát, 1,5 M NaCl):

NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	0,83 g
Na ₂ HPO ₄ ·7 H ₂ O	20,1 g
NaCl	71 g
voda	810 ml

Promývací pufr (PBST):

10X PBS	100 ml
voda	900 ml

Upravte pH na 7,3 přidáním 1 M HCl, poté přidejte 0,5 ml Tween-20.

Zkušební pufr:

Normální kozí sérum (NGS)	3,75 ml
Promývací pufr	146,25 ml

Odběr vzorků

Krev se odebírá heparinizovanou mikrohematokritovou kapilárou a umístí na led. Po odstředování po dobu 3 minut se kapilára nařízne, rozlomí a plazma se vystříkne do mikrozkušavek o objemu 0,6 ml, které obsahují 0,13 jednotek lyofilizovaného aprotininu. (Tyto zkumavky se připraví předem přidáním příslušného množství aprotininu, zmrazením a lyofilizováním v odparce při nízké teplotě až do vysušení.) Plasma uchovávejte při teplotě – 80 °C až do analýzy.

Postup pro jednu destičku

Nanášení na destičku

Smíchejte 20 µl purifikovaného VTG s 22 ml karbonátového pufru (konečná koncentrace 3 µg/ml). Přidejte 200 µl do každé jamky 96- jamkové destičky pomocí pipety. Destičku zakryjte lepicí fólií a nechte inkubovat při teplotě 37 °C po dobu 2 hodin (nebo při teplotě 4 °C přes noc).

Zastavení reakce na destičce

Tlumivý roztok se připraví přidáním 2 ml normálního koziho séra (NGS) do 38 ml karbonátového pufru. Odstraňte nanášecí roztok a otřepete dosucha. Do každé jamky přidejte 350 µl tlumivého roztoku. Zakryjte lepicí fólií a nechte inkubovat při teplotě 37 °C po dobu 2 hodin (nebo při teplotě 4°C přes noc).

Příprava standardů

5,8 µl purifikovaného VTG se smíchá s 1,5 ml zkušební pufru v jednorázové zkumavce z borokřemičitého skla 12 x 75 mm. Vznikne tak 12 760 ng/ml. Poté se provede postupné ředění přidáním 750 µl předchozího naředěného roztoku do 750 µl zkušební pufru, čímž vzniknou konečné koncentrace 12 760, 6380, 3190, 1595, 798, 399, 199, 100 a 50 ng/ml.

Příprava vzorků

Začněte roztokem plazmy ve zkušebním pufru 1 : 300 (např. smíchejte 1 µl plazmy s 299 µl zkušební pufru) nebo 1 : 30. Jestliže očekáváte velké množství VTG, mohou být potřebná další ředění nebo větší ředění. Snažte se udržovat B/B₀ v rozmezí standardů. U vzorků bez hodnotitelného VTG, např. kontrolní samečci a samičky (všechny nezralé), použijte ředění 1 : 30. Vzorky naředěné méně, než je uvedeno, mohou vykazovat nechtěné matricové jevy.

Dále se doporučuje provést na každé destičce pozitivní kontrolní vzorek. Tento vzorek pochází ze zásoby plazmy obsahující vysoce indukované hladiny VTG. Zásoba se nejprve naředí v NGS, rozdělí se na poměrné díly a uchovává se při –80 °C. Pro každou destičku se rozmrazí poměrný díl, dále se naředí ve zkušebním pufru a použije se podobně jako zkušební vzorek.

Inkubace s 1. protilátkou

1. protilátka se připraví zhotovením zředěného roztoku 1 : 2 000 předadsorbovaného séra s 1. protilátkou ve zkušebním pufru (např. 8 µl v 16 ml zkušební pufru). Smíchejte 300 µl roztoku 1. protilátky s 300 µl vzorku/standardu ve skleněné zkumavce. Zkumavka B₀ se připraví podobně s 300 µl zkušební pufru a 300 µl protilátky. Rovněž se připraví zkumavka NSB pouze s 600 µl zkušební pufru, tj. bez protilátky. Zkumavky zakryjte fólií Parafilm a lehce promíchejte. Inkubujte ve vodní lázni o teplotě 37 °C po dobu 1 hodiny.

Promytí destičky

Bezprostředně před dokončením inkubace 1. protilátky destičku promyjte. Provádí se to vytřepáním obsahu a oklepáním dosucha na savém papíru. Poté jamky naplňte 350 µl promývacího roztoku, vylijte jej a oklepte dosucha. Zde je užitečná více-kanálová pipeta nebo promývačka destiček. Promývání se zopakuje ještě dvakrát, aby se destička promyla celkem třikrát.

Nanášení vzorku na destičku

Po promytí destičky vyjměte zkumavky z vodní lázně a lehce je promíchejte. Přidejte 200 µl

z každého vzorku, standardu, B_0 a zkumavky NSB, aby byly jamky na destičce duplikovány. Destičku zakryjte lepicí fólií a nechte inkubovat při teplotě 37 °C po dobu 1 hodiny.

Inkubace s 2. protilátkou

Na konci inkubace z předchozího kroku se destička opět třikrát promyje, jak je uvedeno výše. Naředěná 2. protilátka se připraví smícháním 2,5 μ l 2. protilátky s 50 ml zkušebního pufru. Do každé jamky se přidá 200 μ l naředěné 2. protilátky, destička se zakryje, jak je uvedeno výše a inkubuje se po dobu 1 hodiny při teplotě 37 °C.

Přidání substrátu

Po dokončení inkubace s 2. protilátkou destičku třikrát promyje, jak je popsáno výše. Poté do každé jamky přidejte 100 μ l substrátu TMB. Nechte reakci probíhat 10 minut, nejlépe mimo jasné světlo. Reakci zastavte přidáním 100 μ l kyseliny fosforečné 1 M. Změní to barvu z modré na intenzivně žlutou. Pomocí čtečky změřte absorbanci při 450 nm.

Výpočet B/B_0

Odečtete průměrnou hodnotu NSB od všech měření. B/B_0 pro každý vzorek a standard se vypočítá vydělením hodnoty absorbance (B) průměrnou absorbancí vzorku B_0 .

Zjištění standardní křivky a stanovení neznámých množství

Pomocí některého grafického softwaru (např. SlidewriteTM nebo Sigma Plot[®]) vygenerujte standardní křivku, která bude extrapolovat množství ze vzorku B/B_0 podle standardů B/B_0 . Obvykle je množství vyneseno na logaritmické stupnici a křivka má sigmoidní tvar. Při použití úzkého rozmezí standardů však může vypadat lineárně. Korigujte množství vzorku podle faktoru ředění a uveďte je v mg VTG/ml plazmy.

Určení minimálních mezí stanovitelnosti (MDL)

Zejména u normálních samečků je často nejasné, jak se mají vykazovat výsledky z nízkých hodnot. V takových případech je třeba použít 95% „konfidenční interval“ pro stanovení, zda má být hodnota vykázána jako nula, nebo jako nějaké jiné číslo. Jestliže je výsledek vzorku v rámci intervalu spolehlivosti nulového standardu (B_0), výsledek se vykazuje jako nula. Minimální úroveň detekce bude nejnižší standard, který je konzistentně odlišný od nulového standardu; to znamená, že se dva konfidenční intervaly nepřekrývají. Pro každý výsledek vzorku, který je v rámci konfidenčního intervalu minimální úrovně detekce nebo nad ní, se vykáže vypočtená hodnota. Jestliže vzorek spadá mezi intervaly nulového standardu a minimální úrovně detekce, vykáže se polovina minimální úrovně detekce pro hodnotu tohoto vzorku.

LITERATURA

Olmstead AW, Korte JJ, Woodis KK, Bennett BA, Ostazeski S, Degitz SJ. 2009. Reproductive maturation of the tropical clawed frog: *Xenopus tropicalis*. General and Comparative Endocrinology 160: 117-123.

Parks LG, Cheek AO, Denslow ND, Heppell SA, McLachlan JA, LeBlanc GA, Sullivan CV. 1999. Fathead minnow (*Pimephales promelas*) vitellogenin: purification, characterisation and quantitative immunoassay for the detection of estrogenic compounds. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology 123: 113-125.

Dodatek 7

STATISTICKÁ ANALÝZA

Při analýze LAGDA jsou generovány tři druhy dat, které je třeba statisticky analyzovat: 1) kvantitativní kontinuální data, 2) data o době do události u vývojových podílů (doba do stádia NF 62) a 3) ordinální data ve formě stupňů závažnosti nebo vývojových stádií z histopatologického vyšetření. Doporučené rozhodovací schéma statistické analýzy pro zkoušku LAGDA je uvedeno na obrázku 1. Níže jsou uvedeny také některé anotace, jež mohou být potřebné k provedení statistické analýzy pro měření ze zkoušky LAGDA. Pro rozhodovací schéma analýzy je třeba analyzovat výsledky měření mortality, růstu (hmotnost a délka) a jaterního somatického indexu (LSI) podle větve „jiné sledované parametry“.

Kontinuální data

Nejprve je třeba transformovat pořadí dat a zkontrolovat tak, zda jsou data u kontinuálních sledovaných parametrů monotónní, nanést je do modelu ANOVA a porovnat lineární a kvadratické kontrasty. Jestliže data jsou monotónní, je třeba provést Jonckheerův-Terpstrův trend test na mediánech replikátů, přičemž se neprovádějí žádné další analýzy. Alternativou pro data, která jsou normálně distribuována s homogenními rozptyly, je sestupný Williamsův test. Jestliže data nejsou monotónní (kvadratický kontrast je významný a lineární není významný), je třeba je analyzovat pomocí modelu ANOVA se smíšenými účinky. Údaje by poté měly být posouzeny z hlediska normality rozdělení (pokud možno Shapiro-Wilkovým nebo Anderson-Darlingovým testem) a homogenity rozptylu (pokud možno Levenovým testem). Oba testy se provádějí na základě reziduálních hodnot získaných z modelu ANOVA se smíšenými účinky. Místo těchto formálních testů na normalitu rozdělení a homogenitu rozptylu lze použít odborný posudek, ovšem formální testy se upřednostňují. Jestliže jsou data normálně distribuována s homogenním rozptylem, jsou splněny předpoklady modelu ANOVA se smíšenými účinky a významný účinek expozice se stanoví Dunnettovým testem. Pokud je zjištěno nenormální rozdělení nebo heterogenní rozptyl, pak jsou porušeny předpoklady Dunnettova testu a je třeba hledat normalizační transformaci ke stabilizaci rozptylu. Jestliže žádná taková transformace není nalezena, stanoví se významný účinek expozice Dunnettovým testem. Pokud je to možné, provádí se jednostranný test místo oboustranného, ale stanovení, který test je pro daný sledovaný parametr vhodný, vyžaduje odborné posouzení.

Mortalita

U dat o mortalitě se analyzuje časové období zahrnující celou zkoušku a mortalita se vyjadřuje jako podíl uhynulých jedinců v každé konkrétní nádrži. Pulci, kteří nedokončí metamorfózu v daném časovém rámci, pulci, kteří jsou v kohortě larválního dílčího vzorku, juvenilní žáby, které jsou redukovány, a všechna zvířata uhynulá v důsledku chyby experimentátora se považují za cenzurovaná data a nezařazují se do jmenovatele při výpočtu procenta. Před jakoukoli statistickou analýzou je třeba podíly mortality transformovat druhou odmocninou funkce arcsin. Alternativně lze použít sestupný Cochranův-Armitageův

test, případně s Raovou-Scottovou korekcí při nadměrném rozptylu.

Hmotnost a délka (údaje o růstu)

Samečci a samičky nejsou v průběhu metamorfózy pohlavně dimorfní, proto se údaje o růstu z dílčího vzorku z larválního stádia analyzují nezávisle na pohlaví. Údaje o růstu z juvenilního stádia se však analyzují zvlášť pro každé genotypové pohlaví. Pro tyto sledované parametry může být nutné provést logaritmickou transformaci, protože logaritmická normalita dat o velikosti není neobvyklá.

Jaterní somatický index (LSI)

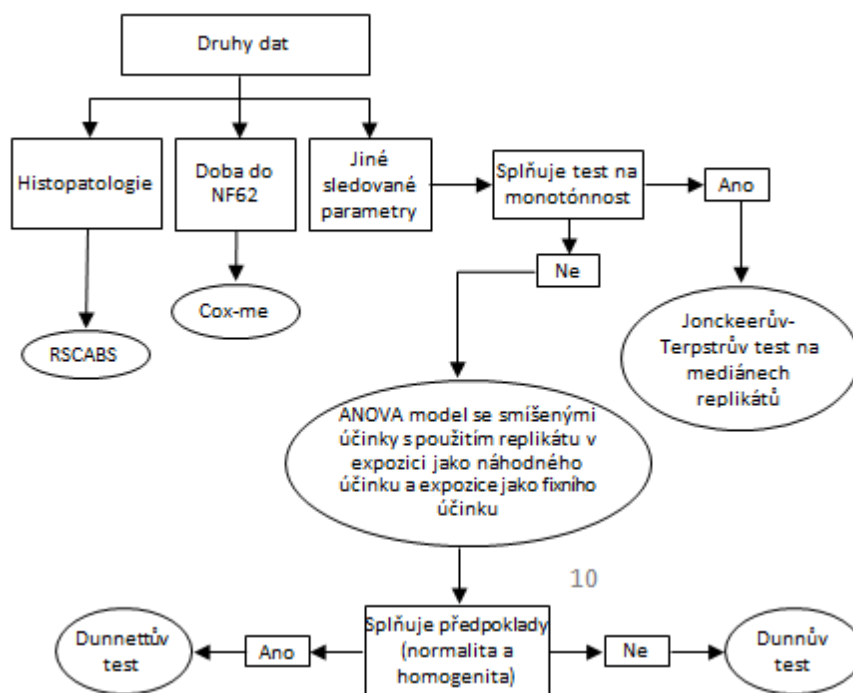
Hmotnosti jater je třeba normalizovat jako podíly z hmotností celého těla (tj. LSI) a analyzovat zvlášť podle genetického pohlaví.

Doba do stádia NF 62

Údaje o době do metamorfózy se považují za data o času do události, přičemž mortality nebo jednotlivci, kteří nedosáhli stádia NF 62 do 70 dnů, se považují za vpravo cenzurovaná data (tj. skutečná hodnota je větší než 70 dnů, ale studie končí dříve, než zvířata dosáhla stádia NF 62 do 70 dnů). K určení data ukončení zkoušky by se měla použít střední doba do stádia NF 62 dokončení metamorfózy v kontrolách s ředicí vodou. Střední doba do dokončení metamorfózy by mohla být určena podle Kaplanových-Meierových odhadů funkce přežití. Tento cílový parametr by se měl analyzovat pomocí Coxova modelu proporcionálních rizik u smíšených účinků, který zohledňuje replikátovou strukturu studie.

Histopatologické údaje (stupně závažnosti a vývojová stádia)

Histopatologické údaje jsou ve formě stupňů závažnosti nebo vývojových stádií. Test s názvem RSCABS (Rao-Scottův, Cochranův-Armitagův testu využívající dílčí testy) používá sestupný Cochranův-Armitagův trend test s korekcí podle Rao-Scotta na každé úrovni závažnosti histopatologické odpovědi (Green *et al.*, 2014). Korekce podle Rao-Scotta začleňuje do testu uspořádání experimentu formou replikátových nádob. Postup „využívající dílčí testy“ zahrnuje biologické očekávání, že stupně závažnosti budou mít tendenci se zvyšovat s rostoucími koncentracemi expozice, přičemž budou uchovávat stupně jednotlivých subjektů a odhalovat závažnost jakéhokoli zjištěného účinku. Postup RSCABS určuje nejen, jaké expozice jsou statisticky odlišné od kontrol (tj. mají závažnější patologii než kontroly), ale určuje také, na jakém stupni závažnosti k rozdílu dochází, čímž poskytuje velmi potřebný rámec analýzy. V případě určování vývojového stádia gonád a reprodukčního traktu je třeba na data aplikovat další manipulaci, protože předpoklad testu RSCABS je, že závažnost účinku se zvyšuje s dávkou. Pozorovaný účinek může být opoždění nebo urychlení vývoje. Proto je třeba data o vývojovém stádiu analyzovat tak, jak jsou uvedena, aby bylo možné detekovat urychlení vývoje, a poté je před druhou analýzou manuálně invertovat, aby bylo možné detekovat opoždění vývoje.



Obrázek 1: Rozhodovací schéma statistické analýzy pro data LAGDA.

LITERATURA

Green JW, Springer TA, Saulnier AN, Swintek J. 2014. Statistical analysis of histopathology endpoints. Environmental Toxicology and Chemistry 33, 1108-1116.

Dodatek 8

POZNÁMKY KE SLEDOVÁNÍ A MINIMALIZACI VZNIKU SKOLIÓZY

Idiopatická skolióza, projevující se u pulců *Xenopus laevis* obvykle jako „zahnutý ocas“, může komplikovat morfologické pozorování a pozorování chování ve zkušebních populacích. Je třeba usilovat o minimalizaci nebo eliminaci výskytu skoliózy, a to jak v zásobní populaci, tak i ve zkušebních podmínkách. Při definitivním testu se doporučuje, aby byla prevalence střední a těžké skoliózy menší než 10 %, aby se zlepšila spolehlivost, že test dokáže detekovat vývojové účinky závislé na expozici u jinak zdravých larev obojživelníků.

Při denních pozorováních v průběhu definitivního testu je třeba zaznamenávat výskyt (jednotlivý počet) i závažnost skoliózy, je-li zjištěna. Je třeba popsat povahu abnormality s ohledem na umístění (např. před kloakou nebo za kloakou) a směr zakřivení (např. laterální nebo dorzálně ventrální). Závažnost může být odstupňována takto:

(NR) Nenápadné: žádné zakřivení

1) Minimální: mírné laterální zakřivení za kloakou; zjevné pouze v klidu

2) Střední: laterální zakřivení za kloakou; viditelné vždy, ale neinhibuje pohyb

3) Těžké: laterální zakřivení před kloakou; NEBO jakékoli zakřivení, které inhibuje pohyb; NEBO jakékoli dorzálně ventrální zakřivení

Americký vědecký poradní panel EPA FIFRA (FIFRA SAP 2013) provedl revizi souhrnných dat o skolióze v patnácti analýzách metamorfózy obojživelníků s *X. laevis* (stádium NF 51 až 60+) a stanovil obecná doporučení pro redukci prevalence této abnormality ve zkušebních populacích. Doporučení jsou relevantní pro analýzu LAGDA, i když tato zkouška zahrnuje delší vývojovou časovou řadu.

Historická výkonnost tření

Obecně by se jako chovné páry měli používat kvalitní, zdraví dospělí jedinci; eliminace chovných párů, které produkují potomstvo se skoliózou, může minimalizovat její výskyt v čase. Přínosná může být zejména minimalizace používání chovné populace odlovené v přírodě. Expoziční doba ve zkoušce LAGDA začíná stádiem NF 8 až 10 embryí a není prakticky možné stanovit při zahájení zkoušky, zda budou daní jednotlivci jevit známky skoliózy. Kromě sledování incidence skoliózy u zvířat, která jsou zařazena do zkoušky, je proto třeba zadokumentovat také historickou výkonnost snůšky (včetně prevalence skoliózy u všech larev ponechaný ve vývoji). Může být užitečné dále monitorovat část každé snůšky nepoužitou v dané studii a uvést tato pozorování (FIFRA SAP 2013).

Kvalita vody

Důležité je zajistit adekvátní kvalitu vody, a to jak v laboratorním zásobním chovu, tak i v průběhu zkoušky. Kromě kritérií kvality vody rutinně hodnocených při zkouškách vodní toxicity může být užitečné monitorovat a korigovat případné deficity živin (např. deficit vitamínu C, vápníku, fosforu) nebo nadměrné hladiny selenu a mědi, o nichž se uvádí, že u laboratorně chovaných druhů *Rana* sp. a *Xenopus* sp. působí skoliózu různého stupně (Marshall *et al.* 1980; Leibovitz *et al.* 1992; Martinez *et al.* 1992; jak se uvádí v publikaci FIFRA SAP 2013). Použití vhodného krmného režimu (viz dodatek 4) a pravidelné čištění nádrže obvykle zlepší kvalitu vody a zdraví pokusných druhů.

Potrava

Konkrétní doporučení pro krmný režim, o němž bylo zjištěno, že je ve zkoušce LAGDA úspěšný, jsou podrobně uvedena v dodatku 4. Doporučuje se prověřovat zdroje krmiva, zda neobsahují toxiny, herbicidy a jiné pesticidy, o nichž je známo, že u druhů *X. laevis* nebo jiných vodních živočichů působí skoliózu (Schlenk and Jenkins 2013). Například expozice některým inhibitorům cholinesterázy souvisí se skoliózou u ryb (Schultz *et al.* 1985) a žab (Bacchetta *et al.* 2008).

LITERATURA

- Bacchetta, R., P. Mantecca, M. Andrioletti, C. Vismara, and G. Vailati. 2008. Axial-skeletal defects caused by carbaryl in *Xenopus laevis* embryos. *Science of the Total Environment* 392: 110 – 118.
- Schultz, T.W., J.N. Dumont, and R.G. Epler. 1985. The embryotoxic and osteolathyrogenic effects of semicarbazide. *Toxicology* 36: 185-198.
- Leibovitz, H.E., D.D. Culley, and J.P. Geaghan. 1982. Effects of vitamin C and sodium benzoate on survival, growth and skeletal deformities of intensively culture bullfrog larvae (*Rana catesbeiana*) reared at two pH levels. *Journal of the World Aquaculture Society* 13: 322-328.
- Marshall, G.A., R.L. Amborski, and D.D. Culley. 1980. Calcium and pH requirements in the culture of bullfrog (*Rana catesbeiana*) larvae. *Journal of the World Aquaculture Society* 11: 445-453.
- Martinez, I., R. Alvarez, I. Herraiez, and P. Herraiez. 1992. Skeletal malformations in hatchery reared *Rana perezi* tadpoles. *Anatomical Records* 233(2): 314-320.
- Schlenk, D., and Jenkins, F. 2013. Endocrine Disruptor Screening Prog (EDSP) Tier 1 Screening Assays and Battery Performance. US EPA FIFRA SAP Minutes No. 2013-03. May 21-23, 2013. Washington, DC. “