

## 208

## VYHLÁŠKA

Ministerstva zdravotnictví

ze dne 8. června 2001,

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

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

## Čl. I

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

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

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

**„B. VŠEOBECNÝ ÚVOD**

## 1. ZÁKLADNÍ POJMY

## 1.1 AKUTNÍ TOXICITA

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

## 1.2 ZJEVNÁ TOXICITA

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

## 1.3 DÁVKA

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

#### 1.4 DISKRIMINUJÍCÍ DÁVKA

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

#### 1.5 DÁVKOVÁNÍ

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

#### 1.6 LD<sub>50</sub> (STŘEDNÍ SMRTNÁ DÁVKA)

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

#### 1.7 LC<sub>50</sub> (STŘEDNÍ SMRTNÁ KONCENTRACE)

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

#### 1.8 NOAEL

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

#### 1.9 TOXICITA PO OPAKOVANÉ DÁVCE/SUBCHRONICKÁ TOXICITA

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

#### 1.10 NEJVYŠŠÍ TOLEROVANÁ DÁVKA (MTD - MAXIMUM TOLERATED DOSE)

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

#### 1.11 PODRÁŽDĚNÍ KŮŽE

je vyvolání zánětlivých změn na kůži po aplikaci testované látky.

#### 1.12 PODRÁŽDĚNÍ OČÍ

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

### 1.13 SENZIBILIZACE KŮŽE (ALERGICKÁ KONTAKTNÍ DERMATITIDA)

je imunologicky vyvolaná reakce kůže na testovanou látku.

### 1.14 POLEPTÁNÍ KŮŽE

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

### 1.15 TOXIKOKINETIKA

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

### 1.16 ABSORPCE

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

### 1.17 EXKRECE

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

### 1.18 DISTRIBUCE

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

### 1.19 METABOLISMUS

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

## 2. AKUTNÍ - OPAKOVANÁ APLIKACE/ SUBCHRONICKÁ A CHRONICKÁ TOXICITA

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

V závislosti na toxicitě látky lze zvolit různé postupy od limitního testu až po kompletní stanovení  $LD_{50}$ . Pro inhalační studie není limitní test navržen, protože nebylo možné definovat limitní hodnotu jednorázové inhalační expozice.

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

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

### 3. MUTAGENITA - GENOTOXICITA

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

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

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

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

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

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

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

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

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

#### 4. KARCINOGENITA

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

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

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

#### 5. REPRODUKČNÍ TOXICITA

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

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

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

#### 6. NEUROTOXICITA

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

## 7. IMUNOTOXICITA

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

## 8. TOXIKOKINETIKA

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

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

## 9. CHARAKTERISTIKY TESTOVANÉ LÁTKY

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

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

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

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

## 10. PÉČE O ZVÍŘATA

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

### 10.1 PODMÍNKY CHOVU

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

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

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

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

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

## 10.2 PODMÍNKY KRMENÍ

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

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

## 11. OCHRANA ZVÍŘAT

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

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

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

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

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

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

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

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

## 12. HODNOCENÍ A INTERPRETACE

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

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

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

2. Metody B.10., B.11. a B.12 znějí:

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

#### 1. METODA

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

#### 1.1 ÚVOD

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