

KOMPLEXNÍ STRATEGIE TESTOVÁNÍ SENZIBILIZACE
ALTERNATIVNÍMI METODIKAMI

Výsledek č. TH0301084 – IP1

Číslo projektu: **TH03010284**

Název projektu: **Testování in vitro senzibilizace - metodika komplexního přístupu**

1. Účel

Zajistit standardizaci postupů při provádění testů kožní senzibilizace *in vitro/in chemico* a jejich vyhodnocování pomocí strategie komplexního přístupu k testování.

2. Definice, zkratky

AOP	Adverse Outcome Pathway – Dráha škodlivého účinku
IATA	Integrated Testing Strategy and Assessment – integrovaná strategie testování
ADRA	Amino Acid Derivate Reactivity assay – test reaktivity derivátů aminové kyseliny
DPRA	Direct Peptide Reactivity assay – přímý test reaktivity peptidů
ECHA	Evropská agentura pro chemické látky – <i>dohlíží na uplatňování legislativy EU týkající se chemických látek ve vztahu k životnímu prostředí a lidskému zdraví</i>
NAC	N- (2- (1-naftyl) acetyl) -L-cysteinu
NAL	α-N- (2- (1-) naftyl) acetyl) -L-lysinu
KOW	poměr distribuce látky v prostředí oktanol/voda
logP	logaritmus rozdělovacího koeficientu (rozpuštěnost v polárním rozpouštědle)
MIE	<i>molecular initial event</i> – iniciační událost na úrovni molekuly
ZP	zdravotnický prostředek
KE	<i>Key Events</i> – klíčové události konceptu AOP
CLP	klasifikace, označení a balení chemických látek
MW	molekulová hmotnost

Defined Approach – přesný postup interpretace získaných výsledků, vzniklých z definované sady informačních zdrojů (např. z *in chemico/in vitro/in silico* metod) s cílem rozhodnout o toxikologické predikci *in vivo*

3. ÚVOD

Tato strategie vychází z doporučení OECD metodik a doporučení ECHA (Evropská Chemická Agentura) (ref 1, 2, 3, 4, 5). Strategie testování se používá pro zjištění míry senzibilizace testovaných látek, jako jsou chemikálie, zdravotnické prostředky, kosmetika, farmaceutické přípravky atd. Metodika strategie je založena na konceptu dráhy škodlivého účinku AOP (Adverse Outcome Pathway), který mapuje klíčové biologické události v organismu, při spuštění alergické reakce a imunitní odpovědi, a na přístupu IATA (Integrated Testing Strategy and Assessment) (ref 1, 2).

Jednotlivé alternativní metodiky, používány v rámci této strategie, byly již verifikovány a vychází z OECD TG a mezilaboratorních srovnávacích validací (SOP M/98, SOP/117, M/101, SOP M/118, SOP M/119, M/57, SOP 334). Konkrétní metodiky, které se ve strategii používají, jsou fyzikálně-chemické zkoušky, *in chemico* a *in vitro* testy:

- Metody stanovení rozdělovacího koeficientu (SOP M/57)
- Metoda turbidimetrie (SOP 334)
- Metoda DPRA (SOP M/98)
- Metoda ADRA (SOP M/117)
- Metoda KeratinoSensTM (SOP M/101)
- Metoda IL-8 Luc (SOP M/118)
- Metoda h-CLAT (SOP M/119)

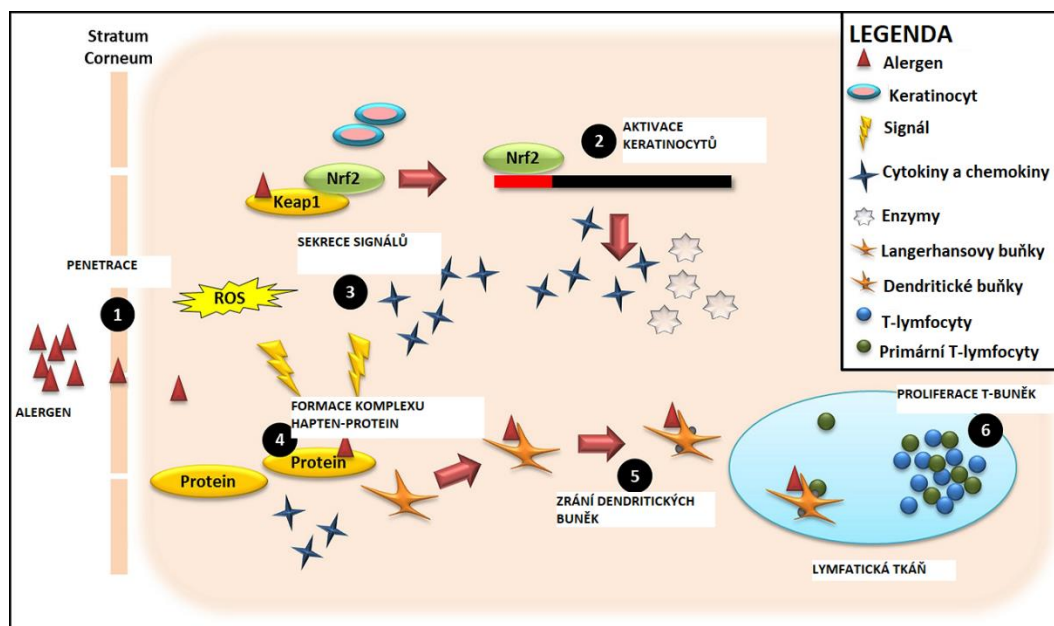
K *in vitro* testům jsou používány buněčné linie (metody KeratinoSens, IL-8 Luc, h-CLAT), *in chemico* testy (DPRA, ADRA) používají kapalinovou chromatografii a fyzikálně-chemické zkoušky se používají ke zjištění rozpustnosti testovaných látek.

4. PRINCIP STRATEGIE

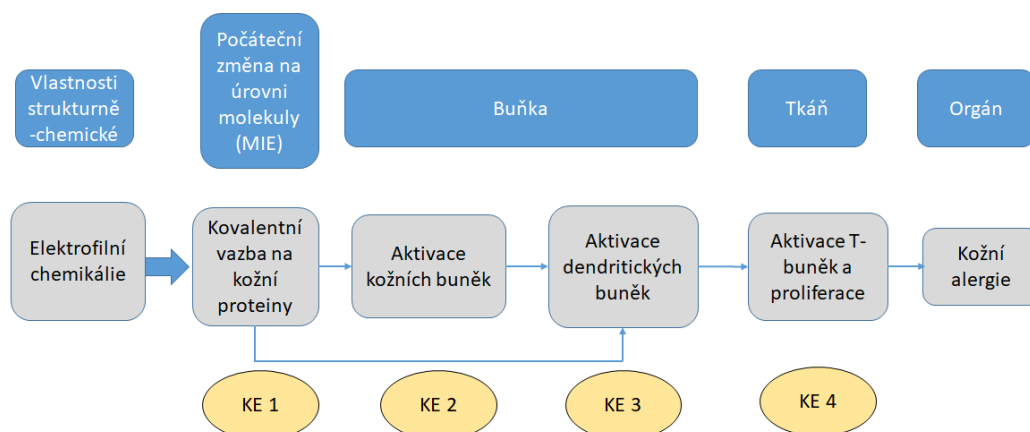
Strategie testování senzibilizace je založena na konceptu AOP (Adverse Outcome Pathway = Dráha škodlivého účinku) (Obr. 1), které reprezentuje biologické události (*Key events*) mající za následek kaskádu dalších dějů vedoucích ke škodlivým účinkům látky na organismus, tedy ke vzniku alergické kontaktní dermatitidy (ref 6). Tento koncept je používán v rámci OECD a je založen na validovaných metodikách a přístupech *in vitro/in chemico/in silico*.

První spouštěcí biologickou událostí v AOP je molekulární kovalentní vazba látky na kožní proteiny (KE 1). Druhou biologickou událostí je spuštění imunitní zánětlivé reakce v kožních buňkách (keratinocytech) (KE 2). Tato reakce zahrnuje i změny v expresi genů spojených se specifickými signálními dráhami. Třetím klíčovým bodem je aktivace specifických buněk imunitní odpovědi (dendritických nebo-li Langerhansových buněk), které jsou spojeny s expresí buněčných povrchových markerů, chemokinů nebo cytokinů (KE 3). Poslední, čtvrtou událostí této dráhy, je aktivace a proliferace T-lymfocytů, které se množí při imunitní reakci organismu (KE 4) (Obr. 1 a 2) (ref 6).

Obr. 1: Kaskáda dějů – klíčové body senzibilizace *in vivo* (AOP) (ref 6, 13): KE 1 - Klíčová událost 1 = č. 1; KE 2 - Klíčová událost 2 = č. 2; KE 3 - Klíčová událost 3 = č. 3, 4, 5; KE 4 - Klíčová událost 4 = č. 6



Obr. 2: Schéma konceptu AOP senzibilizace (převzato ze schématu v ref 6, 7)



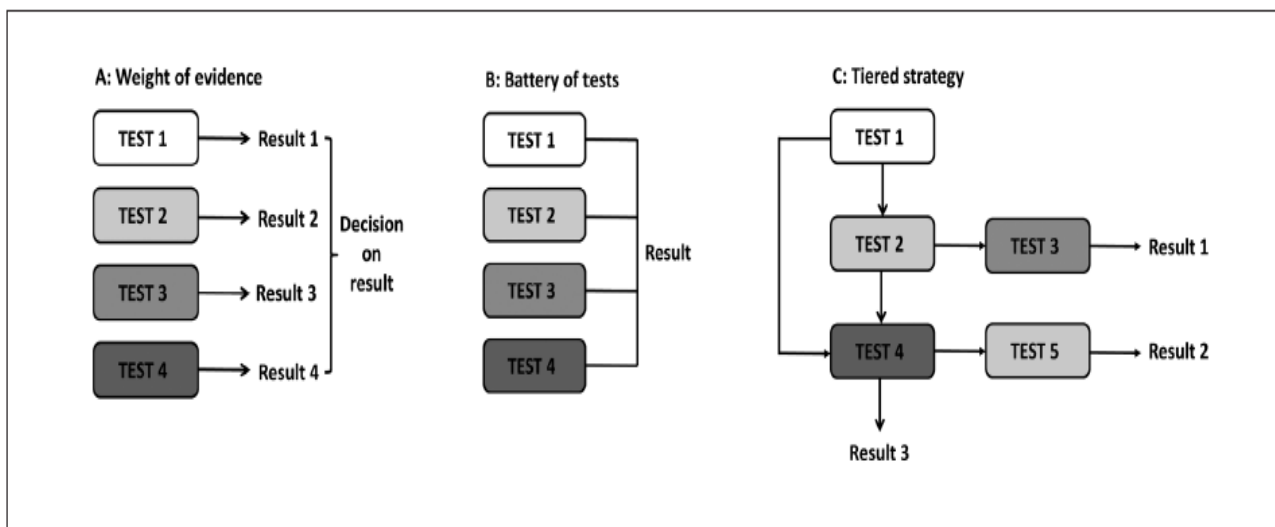
Strategie komplexního testování senzibilizace v tomto SOP vychází z doporučení OECD metodik a doporučení ECHA (ref 1, 2, 3, 4, 5). Strategie testování se bude používat pro zjištění míry senzibilizace testovaných látek, jako jsou chemikálie, zdravotnické prostředky, kosmetika, farmaceutické přípravky atd. Metodika je založena na konceptu AOP, na přístupu IATA (Integrated Testing Strategy and Assessment) (ref 1, 2) a přístupu „Defined Approaches“ (Definované postupy hodnocení výsledků alternativních přístupů a informací k predikci *in vivo*) (ref 7, 8).

Ve strategii hodnocení výsledků z alternativních testů (*in vitro/in chemico/in silico*), případně ostatních toxikologických a chemických informací o látce, existuje několik přístupů. U přístupu IATA nebo stupňovité strategie (tzv. „tiered strategy“) mají alternativní metodiky zpravidla první místo ve schématu testování toxikologických vlastností látky a doplňují chybějící informace o látce, např. o mechanismu působení (ref 1). Alternativní metoda sama o sobě nemůže predikovat chování testované látky *in vivo*, avšak kombinace alternativních metod spolu s dalšími přístupy např. *in silico* informace nebo analogická predikce (tzn. na základě toxikologického chování chemických analogů testované látky), mohou podat důležité informace o toxikologických vlastnostech testované látky (ref 8).

Tzv. integrovaná strategie IATA, používaná v rámci hodnocení OECD, je přístup založený na nejnovějších vědeckých informacích důležitých pro charakterizaci chemických rizik, který se opírá o integrovanou analýzu stávajících informací o vlastnostech látek spolu s generováním nových informací, pomocí strategie testování. IATA může zahrnovat kombinace metod (QSAR, *in chemico*, *in vitro*, *ex vivo*, *in vivo*) a dalších vědeckých konceptů jako např. AOP (ref 1). IATA může mít také různá rozhodovací schémata/strategie o získaných informacích a tedy různou podobu postupu použití

testů/metod, např. tzv. schéma váhy důkazu („weight of evidence“), baterie testů nebo víceúrovňová strategie testování (viz obr. 3) (ref 9).

Obr. 3: Příklady různých rozhodovacích schémat toxikologického testování IATA přístupu (ref. 9)



Vysvětlivky:

- Váha důkazu (Weight of evidence, WoE): nejprve se otestuje soubor nezávislých testů/metodik a dle výsledků ze všech metodik se udělá finální rozhodnutí o sledované vlastnosti, žádný test/metodika sám o sobě nestačí k finálnímu rozhodnutí, pouze soubor všech může dát konečný výsledek, i když metodiky nebyly prováděny standardním způsobem.
- Baterie testů (Battery of tests): Finální výsledek je definován součtem výsledků mnoha testů, které musí být provedeny všechny k získání rozhodnutí.
- Víceúrovňová strategie (Tiered strategy, stupňovitá): Dle výsledku prvního kroku se rozhodne, jaký následující test bude proveden. Je to otevřený systém a neexistuje zde přesná kombinace testů, kterýkoli výsledek testu může změnit úroveň následujícího.

Výsledky z různých metod a informací mohou být také použity pro tzv. *Defined Approaches* (definovaný postup, DA). Cílem tohoto konceptu je získat informace pro hodnocení toxikologických rizik na srovnatelné úrovni jako poskytují studie *in vivo*. DA se skládá z pevně daného postupu interpretace údajů aplikovaných na získaná data (např. *in chemico/in vitro/in silico* metody) vzniklých z definované sady informačních zdrojů s cílem rozhodnout o predikci (ref 7).

Zatímco v IATA přístupu je při predikci vždy zahrnut stupeň odborného posouzení, predikce přístupů DA jsou rozhodovány dle definovaných pravidel a mohou být použity samy o sobě, pokud jsou považovány za vhodné pro daný účel, nebo jsou použity společně s jinými zdroji informací v souvislosti s IATA (ref 7, 8, 10). Interpretace dat dle DA je transparentní a řídí se přesnými pravidly pro rozhodnutí o výsledné predikci (ref 10).

OECD zveřejnila draft TG (ref 8), kde jsou prezentovány tři přístupy DA pro rozhodnutí o senzibilizačních vlastnostech látky a pro klasifikaci senzibilizačního potenciálu. KE 1 – 3 („Key events 1 – 3“) konceptu AOP jsou reprezentovány 3 validovanými metodami (např. DPRa, KeratinosensTM a h-CLAT). Všechny tyto metodiky i zmíněné DA mají nějakou limitaci a tzv. hraniční rozsah, kde mohou být výsledky zkreslené, zejména pokud je $\log P > 3,5$. Při hodnocení predikce je tedy důležité brát vždy tyto informace na vědomí a v tomto dokumentu (ref 8) je také popsáno rozhodovací schéma při nejasných/hraničních výsledcích, které lze na takovéto situace uplatnit (podrobně viz ref 8 a 10).

5. STRATEGIE TESTOVÁNÍ

Tato strategie je založena na výše zmiňovaném konceptu AOP senzibilizace (dle OECD), metodik OECD a nařízení ECHA (ref 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10).

Výběr přístupu/konceptu

V rámci tohoto SOP byl na základě výsledků z verifikace komplexní metodiky vybrán přístup DA 2 ze 3, popsáný v rámci OECD hodnocení (ref 8, 10) a/nebo přístup IATA a hodnocení dle ECHA (ref 2).

DA 2 ze 3 lze používat pro identifikaci rizika a je založen na datech z alternativních *in chemico* (KE 1) a *in vitro* (KE 2/3) metod – to znamená, že predikce je založena na shodném výsledku alespoň 2 validovaných testů postihujících KE ze 3. Přístup predikuje kožní senzibilizaci pomocí sekvenčního testování v nedefinovaném sledu. Pokud jsou první dvě metody rozdílné ve výsledné predikci, je nutné udělat i třetí metodu. O výsledku lze rozhodnout na základě 2 shodných predikcí (viz kapitola 4.4, Obr. 6).

Dle aktuálního nařízení ECHA (ref 2) jsou potřebné, pro rozhodnutí o senzibilizačních vlastnostech látky *in vivo*, výsledky ze všech tří alternativních testů, které postihují 3 klíčové biologické události („Key event 1 – 3“) dle konceptu AOP. Alternativní metodiky, sledující poslední klíčovou událost imunitní odpovědi organismu („Key 4“), zatím nebyly validovány. Pokud tedy

některý alternativní test nelze použít kvůli specifickým vlastnostem látky (např. nerozpustnost), musí být zváženo získání více informací, např. pomocí QSAR modelů, informací o pH, vlastností jako je kožní leptavost anebo lze použít i validované *in vivo* testy, zejména v případě potřeby klasifikace do kategorií dle CLP (1A, 1B) (ref 2).

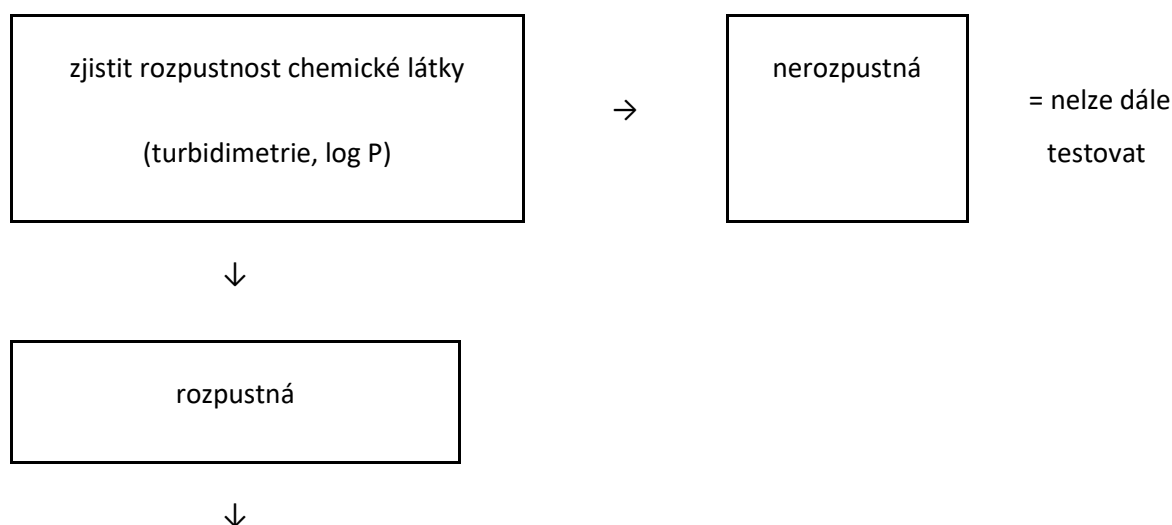
Postup testování v rámci strategie

Klíčová informace pro začátek testování alternativními metodikami je rozpustnost testované látky, případně účel testování (budoucí použití – zdravotnický prostředek, kosmetika, chemická látka atd.).

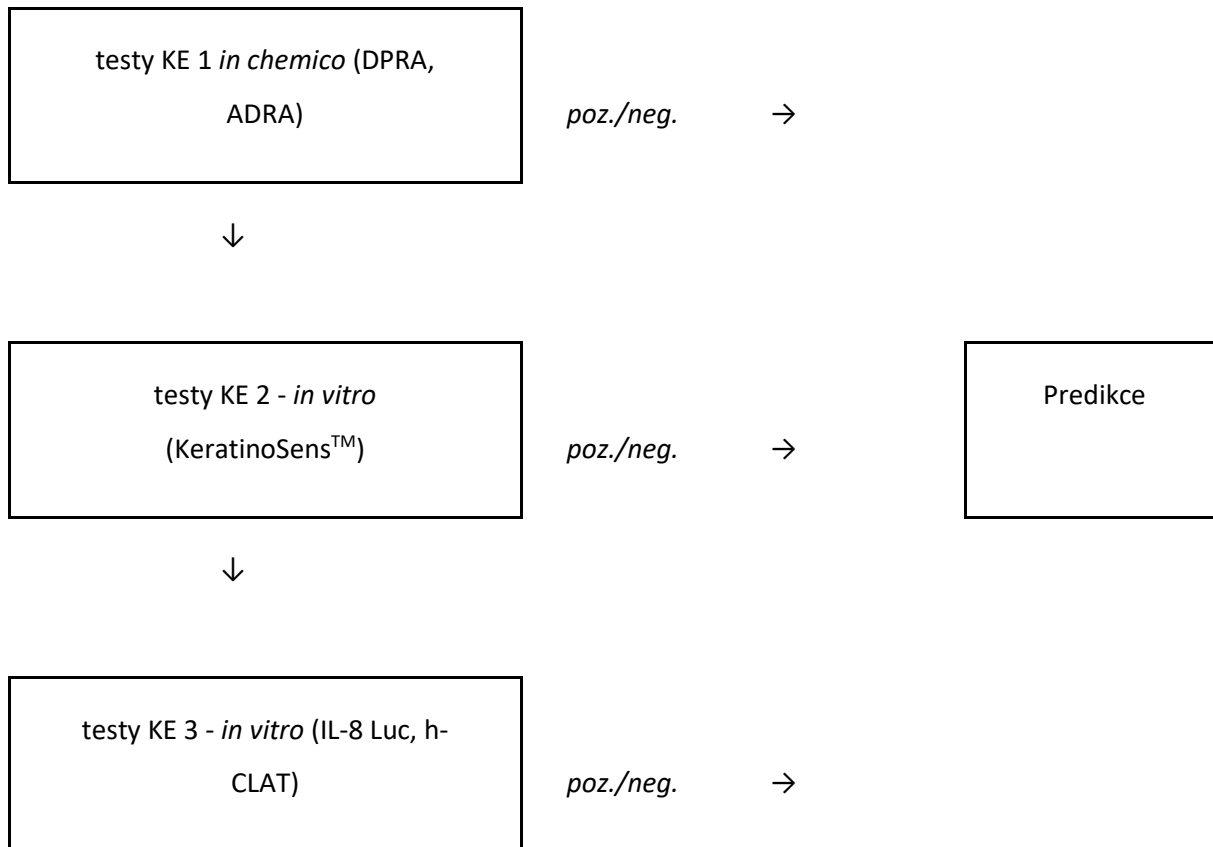
Pokud je testovaná látka rozpustná, lze postupovat na alternativní metodiky, v podstatě lze použít všechny (viz Obr. 4). Pokud jde o nerozpustnou látku a nejedná se o zdravotnický materiál, nelze alternativní metodiky použít a je nutné získat informace o toxikologických vlastnostech např. pomocí modelování (*in silico* – QSAR) anebo testování validovanými metodikami *in vivo* (LLNA test – SOP M/75). Avšak toto *in vivo* testování a *in silico* modelování není součástí tohoto SOP a strategie.

Pokud se jedná o zdravotnický materiál, testovaná látka může být extrahována a tento extrakt lze použít pro alternativní metodiky KE 2 a 3 (viz další kapitoly).

Obr. 4: Základní postupová strategie komplexního testování senzibilizace dle rozpustnosti chemikálií



T A Č R



1) *Rozpustnost testované látky*

Alternativní metodiky, verifikované a používané v této strategii, jsou pro testování senzibilizace omezeny zejména rozpustností testované látky. Klíčovou informací pro začátek testování a výběr konkrétního testu je tedy rozpustnost a informace, zda se jedná o zdravotnický materiál nebo jinou kategorii látek. V rámci alternativních metodik jsou používána pro testování pouze polární rozpouštědla (viz Tab. 1). Důležitým parametrem v rozpustnosti je tedy hodnota KOW (poměr distribuce látky v prostředí oktanol/voda) nebo jinak se také nazývá jako rozdělovací koeficient (log P), který udává informaci o rozpustnosti v polárních nebo nepolárních rozpouštědlech nebo-li distribuci ve vodném nebo lipofilním prostředí. Konkrétně nabývá těchto hodnot:

- KOW < 5 potom je látka rozpustná v polárních rozpouštědlech
- KOW = 5 – 7 nelze určit, o rozpustnosti existují jen omezené informace
- KOW > 7 extrémně hydrofobní, tedy nerozpustné v polárních rozpouštědlech

Tab. 1: Rozpouštědla používaná v rámci jednotlivých metodik

DPRA	ADRA	KeratinoSens™ test	IL-8 Luc test	h-CLAT
Acetonitril	Acetonitril	DMSO	X-VIVO 15	Kultivační buněčné médium (RPMI 1640 + 10% FBS)
Aceton	Voda	Kultivační buněčné médium (DMEM + 9,1% FBS)	DMSO	Fyziologický roztok (0,91% NaCl ve vodě)
DMSO	Aceton			DMSO
Voda	DMSO			

DMSO: dimethylsulfoxid, DMEM: Dulbeccos modified Eagles medium – modifikované základní buněčné médium, FBS: fetální bovinní sérum, RPMI 1640: růstové buněčné médium

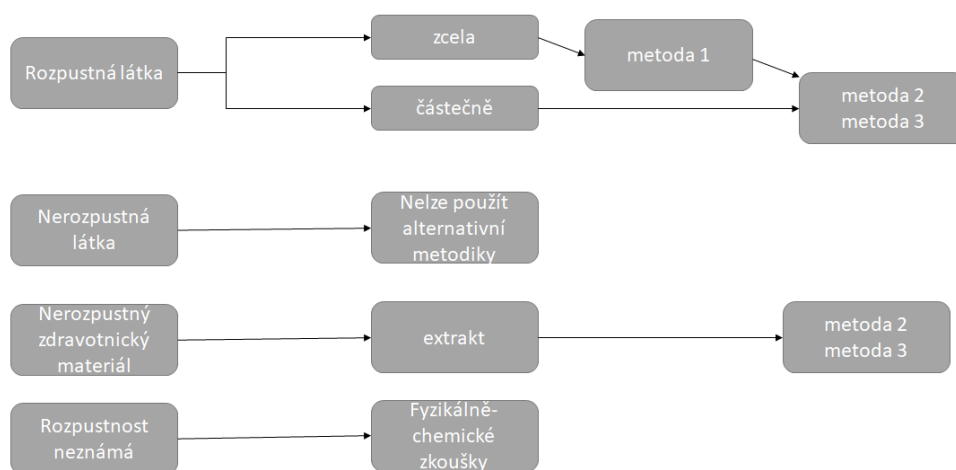
Pokud tedy rozpustnost testované látky není známa (od výrobce, dodavatele, z literatury), lze použít jednu nebo více z fyzikálně-chemických zkoušek, konkrétně tedy metodu stanovení rozdělovacího koeficientu (SOP M/57) nebo metodu turbidimetrie (SOP 334).

Pokud je rozpustnost známá nebo byla zjištěna fyzikálně-chemickou zkouškou (SOP M/57) a látka je rozpustná v polárním prostředí, postupuje se dále na výběr metody (Obr. 5).

Pokud je látka nerozpustná a jedná se o zdravotnický materiál, lze použít pro testování alternativními testy jeho extrakt. Příprava extraktu je uvedena v jednotlivých metodikách a řídí se dle ISO norem 10993-10 a 10993-12 (ref 11, 12).

Pokud je látka nerozpustná v polárních rozpouštědlech a nejedná se o zdravotnický materiál, nelze použít alternativní metodiky a je nutné získat o vlastnostech látky informace z dostupné vědecké literatury, případně postupovat na validovanou metodiku *in vivo* (např. LLNA test – SOP M/75).

Obr. 5: Rozhodovací schéma - rozpustnost testované látky v polárním rozpouštědle (vodném prostředí)



2) Metodiky KE 1 konceptu AOP (DPRA, ADRA)

Pokud je testovaná látka rozpustná v polárním rozpouštědle postupuje se dle schématu na metodiky, které interpretují 1. klíčovou biologickou událost vyvolání alergické reakce v organismu, konkrétně schopnost navázání testované látky na peptidy (popř. aminokyseliny) kožních buněk. Jedná se o metodiky *in chemico*.

Pro toto zjištění lze použít metodiky dvě – konkrétně DPRA a/nebo ADRA. Metodiky jsou založené na kapalinové chromatografii (HPLC). Každá z nich má trochu odlišné možnosti v použití rozpouštědel pro testování látky a tudíž i výsledek testování může být odlišný. Jsou také založeny na jiném použití substrátu, kam se testovaná látka může navázat – DPRA sleduje kovalentní vazbu na peptidy lysin a cystein, ADRA kvantifikuje zbytkové koncentrace derivátu N-(2-(1-naftyl) acetyl) -L-cysteinu (NAC) a derivátu α -N-(2-(1-) naftyl) acetyl)-L-lysinu (NAL). Pokud je tedy látka dobře

rozpustná, je vhodné použít nejprve metodu DPRA, pokud je rozpustná méně je vhodnější použít metodu ADRA. Avšak v rámci verifikace komplexní strategie senzibilizace byla metoda ADRA shledána jako výhodnější, protože má širší použitelnost (náklady, podmínky akceptovatelnosti výsledků) a menší omezení (koeluce, rozpustnost).

Metodiky jsou tedy vhodné pro rozpustné látky s definovanou molekulovou hmotností (MW). Naopak nejsou vhodné pro testování komplexních směsí, extrakty zdravotnických materiálů, nestabilní látky v alkalickém prostředí nebo kovové sloučeniny.

Výsledek z těchto metodik může být hodnocen dle predikčního modelu jako pozitivní/negativní, případně neprůkazný, pokud výsledky nebo podmínky metody nemohou splnit akceptační kritéria, případně nelze získat opakovaně jasný výsledek.

3) *Metodiky KE 2 konceptu AOP (KeratinosensTM)*

Pokud je testovaná látka rozpustná v polárních rozpouštědlech nebo se jedná o extrakt zdravotnického materiálu, postupuje se na metodu KeratinosensTM, která interpretuje schopnost testované látky spustit 2. klíčovou událost, tedy signální dráhy v kožní buňce a následný přepis genů pro aktivaci imunitní odpovědi.

Metodika je založená na spuštění signální dráhy v buňce, což je kvantifikováno zvýšenou mírou luminiscenčního svícení. Jedná se o *in vitro* metodiku. Pro tuto metodiku a i všechny ostatní metodiky, které pracují s tkáňovými kulturami, je důležitá také sterilita testované látky. Pokud informace o sterilitě není známa, je nutné zjistit, zda se případně dá testovaná látka sterilizovat a pokud ne, je důležité takovou informaci vzít v potaz při závěrečném hodnocení o výsledku testování.

Metoda je tedy vhodná pro testování rozpustných látek, komplexních směsí i kovových sloučenin a extraktů zdravotnických materiálů. Nelze testovat látky s obsahem lysinových reziduí, vysoce cytotoxické anebo fytoestrogeny.

Výsledek z této metody může být hodnocen dle predikce jako negativní/positivní nebo neprůkazný.

4) *Metodiky KE 3 konceptu AOP (IL-8 Luc, h-CLAT)*

Pokud je testovaná látka rozpustná v polárních rozpouštědlech nebo se jedná o extrakt zdravotnického materiálu, další metodikou pro testování bude vybrána metoda IL-8 Luc nebo metoda h-CLAT.

Obě tyto metodiky používají buněčné tkáňové linie a sledují spuštění genů, které mají za příčinu vznik protilátek, které jsou kvantifikovány. U metody IL-8 Luc pomocí luminiscenčního svícení, v případě h-CLAT je měření kvantifikováno pomocí průtokového cytometru a odezvy fluorescenčně značených protilátek. Jedná se o metody *in vitro*.

Metoda IL-8 Luc je vhodná pro zcela rozpustné látky, nerozpustné látky lze také testovat, ale v případě negativního výsledku nelze rozhodnout o predikci (vzhledem k nedostatečné rozpustnosti) a výsledek je tak hodnocen jako neprůkazný. Dále je vhodná i pro komplexní směsi, extrakty zdravotnických materiálů, nevhodná je pro surfaktanty nebo anhydridy.

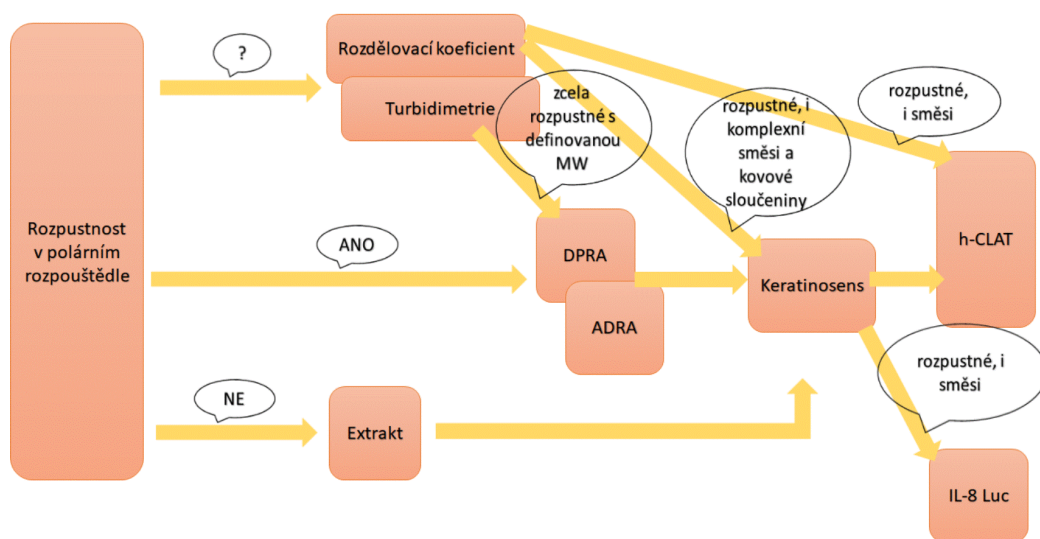
Metoda h-CLAT je vhodná pro rozpustné látky, komplexní směsi i extrakty zdravotnických materiálů, není vhodná pro prohapteny (látky, které jsou aktivovány enzymaticky, např. pomocí P450 enzymů) a prehapteny (látky, které jsou aktivovány oxidací) nebo látky s fluorescenční aktivitou emitující stejně jako např. propidium jodid. Pro látky s KOW > 3,5 mohou produkovat falešně negativní výsledky, proto jsou tyto výsledky u těchto látek neprůkazné.

Výsledek těchto metod může být hodnocen jako negativní/pozitivní anebo neprůkazný dle predikce u jednotlivých metod.

6. SOUHRN STRATEGIE, ANALÝZA VÝSLEDKŮ A ZÁVĚREČNÉ HODNOCENÍ

Nejprve je nutné zjistit rozpustnost testované látky, její zařazení a případně přípustné použití jednotlivých metodik (např. odlišná legislativa je v případě testování zdravotnických prostředků a kosmetických látek). Pokud rozpustnost neznáme a ani nemůžeme zjistit, je nutné udělat fyzikálně-chemické zkoušky, které určí míru rozpustnosti v rozpouštědlech pro dané metodiky (metoda turbidimetrie) a/nebo zjistí hodnotu logP (KOW) (Obr. 6). Dle získané informace se dále postupuje na metodiky KE 1, v případě plné rozpustnosti a definované MW. V případě nerozpustnosti zdravotnického materiálu nebo špatné rozpustnosti testované látky (komplexní směsi) se postupuje na metodiku KE 2, a nakonec KE 3. Pokud nemají testované látky nějaké omezující vlastnosti v rámci metody (viz přehled v Tab. 3), je snaha této strategie získat 3 výsledky alternativních metodik (hodnotící 3 klíčové události) a/nebo 2 shodné výsledky ze 3 metod.

Obr. 6: Shrnující schéma strategie testování senzibilizace bez použití *in vivo* metodik, založené na rozpustnosti látky, včetně extraktů zdravotnických materiálů



Konečné hodnocení predikce se provádí nejlépe ze všech 3 výsledků (Tab. 2) dle aktuálních doporučení ECHA (ref 2) a/nebo ze dvou shodných výsledků ze 3 metod – dle přístupu Defined Approach 2o3 (ref 8, 10) (Obr. 6).

Hodnocení dle ECHA

Pokud jsou všechny 3 výsledky shodné, potom je i konečný výsledek stejný. Pokud je alespoň 1 metoda ze 3 hodnocena odlišně, je nutné mít ke konečnému rozhodnutí nejlépe ještě další informace o testované látce (pH, leptavost, QSAR, více výsledků z různých alternativních testů např. ADRA i DPRA), jinak je výsledek hodnocen jako neprůkazný. To samé v případě odlišného výsledku u 2 testů ze 3, je konečný výsledek/predikce hodnocena jako neprůkazná.

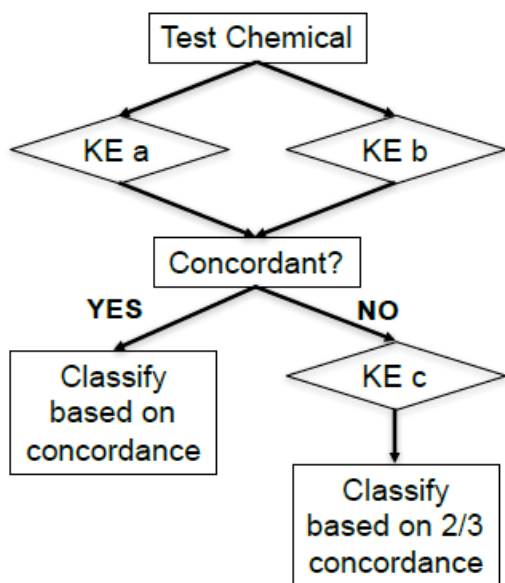
Tab. 2: Schéma hodnocení výsledků a závěrečná predikce – dle ECHA

Výsledek 1	Výsledek 2	Výsledek 3	Další informace	Konečné rozhodnutí
negativní	negativní	negativní	ano/ne	negativní
pozitivní	pozitivní	pozitivní	ano/ne	pozitivní
negativní	pozitivní	pozitivní	ano	pozitivní/neprůkazný
pozitivní	negativní	negativní	ano	negativní/neprůkazný
negativní	pozitivní	pozitivní	ne	neprůkazný
pozitivní	negativní	negativní	ne	neprůkazný

Hodnocení DA 2 ze 3

Pokud mají alespoň 2 z testů (ADRA/DPRA, KeratinoSensTM, IL-8 Luc/h-CLAT) postihujících KE shodný výsledek, pak je výsledek predikce stejný jako shodný výsledek. Pokud jsou první dvě metody rozdílné ve výsledné predikci, je nutné udělat i třetí metodu.

Obr. 6: Schéma hodnocení výsledků a závěrečná predikce – dle DA 2 z 3



Vyvětlivky:

Test chemical – testovaná chemikálie, *concordant* – shodný, *classify based on concordance* – klasifikuj dle shodného výsledku, *classify based on 2/3 concordance* – klasifikuj dle shodnosti 2 ze 3

7. OMEZENÍ

Omezení jednotlivých metod je uvedeno v rámci popisu metodik v jednotlivých kapitolách, zde je v Tab. 3 celkový souhrn omezení pro přehledné srovnání. Obecně je hlavním omezením pro výběr a použití alternativních metodik senzibilizace rozpustnost testované látky v polárních rozpouštědlech, případně zařazení do kategorie zdravotnického materiálu.

Tab. 3: Použití jednotlivých pro různé druhy testovaných látek - srovnání

Testy	DPRA	ADRA	KeratinoSens™	IL-8 Luc	h-CLAT
jsou vhodné pro	rozpustné látky s definovanou molekulovou hmotností (MW)		testování rozpustných látek, komplexních směsí i kovových sloučenin a extraktů zdravotnických materiálů	zcela rozpustné látky pro komplexní směsi, extrakty zdravotnických materiálů	rozpustné látky, komplexní směsi i extrakty zdravotnických materiálů
nejsou vhodné pro	testování komplexních směsí, extrakty zdravotnických materiálů, nestabilní látky v alkalickém prostředí nebo kovové sloučeniny		látky s obsahem lysinových reziduí, vysoce cytotoxické anebo fytoestrogeny	surfaktanty nebo anhydridy	prohapteny a prehapteny nebo látky s fluorescenční aktivitou emitující stejně jako např. propidium jodid. Pro látky s KOW > 3,5

8. VÝSLEDKY KOMPLEXNÍ STRATEGIE TESTOVÁNÍ

Výsledky budou prezentovány formou závěrečné zprávy. Zpráva bude obsahovat:

- návrh provedení komplexní strategie pro konkrétní látku
- výsledky testů provedených podle tohoto návrhu
- predikci účinků *in vivo* provedenou na základě získaných výsledků

Zpráva by měla pokud možno obsahovat (ref 10):

- Definici a popis sledovaného mechanismu predikce
- Definici cíle/účelu predikce
- Popis základního odůvodnění predikce
- Popis jednotlivých informačních zdrojů (výsledků metodik)
- Popis způsobu zpracování údajů z jednotlivých informačních zdrojů
- Zohlednění známých nejistot

9. Literatura

- 1 OECD Guidance Document No. 260: Series on Testing Assessment – Guidance Document for the Use of Adverse Outcome Pathways in Developing Integrated Approaches to Testing and Assessment (IATA).
- 2 ECHA (revised in February 2018): How to use new or revised *in vitro* test methods to address skin sensitisation. Alvaible at: https://echa.europa.eu/documents/10162/21650280/oecd_test_guidelines_skin_sensitisation_en.pdf
- 3 OECD Test Guideline No. 442C, In Chemico Skin Sensitisation. Adopted: June 2020.
- 4 OECD Test Guideline No. 442D: In Vitro Skin Sensitisation: ARE Nrf2 Luciferase Test Method, Adopted in June 2018.
- 5 OECD Test Guideline No. 442E – In Vitro Skin Sensitisation Assays Addressing The Key Event On Activation Of Dendritic Cells On the Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation, Adopted June 2018.

- 6 ENV/JM/MONO(2012)10/PART1: The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding Proteins, Part 1: Scientific Evidence, Series on Testing and Assessment No. 168, May 2012.
- 7 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, ENV/JM/HA(2016). Available at: [<https://community.oecd.org/community/iatass>].
- 8 Draft OECD Guideline Defined Approaches for Skin Sensitisation, September 2020, staženo 24.02.2021, Alvaible at: (<https://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/draft-guideline-for-defined-approaches-for-skin-sensitisation.pdf>).
- 9 Rovida, C. et al. Integrated Testing Strategies (ITS) for safety assessment. To cite this version : HAL ID: hal-01127740 Integrated Testing Strategies (ITS) for Safety Assessment (2015).
- 10 OECD Guidance Document on the Reporting of Defined Approaches and Individual Information Sources to Be Used Within Integrated Approaches to Testing and Assessment. Series on Testing and Assessment No. 255.
- 11 ČSN ISO 10993-10: Biologické hodnocení zdravotnických prostředků – Část 10: Zkoušky dráždivosti a senzibilizace kůže, Duben 2014.
- 12 ČSN ISO 10993-12: Biologické hodnocení zdravotnických prostředků – Část 12: Příprava vzorků a referenční materiály, Prosinec 2012.
- 13 Wong et al.: In Vitro Methods for hazard assessment of industrial chemicals – opportunities and challenges. Front. Pharmacol. 2015 (<https://doi.org/10.3389/fphar.2015.00094>).