

B.5 AKUTNÍ TOXICITA: DRÁŽDIVÉ A LEPTAVÉ ÚČINKY NA OČI

1 METODA je v souladu s právem Evropských společenství^{7a)}.

1.1 ÚVOD

Při přípravě této aktualizované metody byla zvláštní pozornost věnována možným zlepšením, jichž lze dosáhnout vyhodnocováním veškerých existujících informací o zkoušené látce s cílem vyhnout se nadbytečným zkouškám na pokusných zvířatech a brát tak ohled na dobré zacházení s pokusnými zvířaty. Součástí této metody je doporučení, aby před provedením popsané zkoušky akutních dráždivých/leptavých účinků na oči *in vivo* byla vypracována analýza průkaznosti^{7a)} stávajících relevantních údajů. Pokud jsou k dispozici nedostatečné údaje, doporučuje se je získat pomocí metody postupného zkoušení^{7a)}. Strategie zkoušení zahrnuje provedení validovaných a schválených zkoušek *in vitro* a je popsána v tabulce 10 k této metodě zkoušení. Navíc se před zvažováním očního testu *in vivo* doporučuje provést zkoušku dráždivých/leptavých účinků na kůži *in vivo*, na jejímž základě se předpoví možné leptavé účinky na oči.

V zájmu spolehlivého vědeckého přístupu a rovněž dobrého zacházení s pokusnými zvířaty by se ke zkouškám *in vivo* nemělo přistupovat, dokud nebyly všechny dostupné údaje významné pro potenciální leptavé/dráždivé účinky látky na oči vyhodnoceny na základě analýzy průkaznosti výsledků. Takové údaje budou zahrnovat důkazy ze stávajících studií na lidech nebo pokusných zvířatech, důkazy leptavých/dráždivých účinků jedné nebo více strukturně příbuzných látek nebo směsí těchto látek, údaje dokládající vysokou kyselost nebo zásaditost látky^{7a)} a výsledky validovaných a uznaných zkoušek leptavých a dráždivých účinků na kůži *in vitro* nebo *ex vivo*^{7a)}. Tyto studie mohly být vypracovány před analýzou průkaznosti výsledků nebo na základě zjištění této analýzy.

U některých látek může taková analýza naznačovat nutnost provedení studií potenciálních leptavých/dráždivých účinků látky na oči *in vivo*. Ve všech takových případech se před zvažováním použití oční zkoušky *in vivo* nejprve provede studie účinků látky na kůži *in vivo* a zhodnotí se v souladu s metodou zkoušení B.4^{7a)}. Použití analýzy průkaznosti výsledků a strategie postupného zkoušení by mělo omezit potřebu zkoušení leptavých/dráždivých účinků na oči těch látek, u nichž tyto účinky byly již dostatečně doloženy v jiných studiích. Pokud pomocí strategie postupného zkoušení nelze o možnosti leptavých nebo dráždivých účinků na oči rozhodnout ani po provedení studie leptavých a dráždivých účinků na kůži *in vivo*, lze provést zkoušku leptavých/dráždivých účinků na oči *in vivo*.

Upřednostňovaná strategie postupného zkoušení, jejíž součástí je provedení validovaných zkoušek leptavých/dráždivých účinků *in vitro* nebo *ex vivo*, je uvedena v tabulce 10 k této metodě zkoušení. Tato strategie byla vypracována na semináři OECD^{7a)}, jeho účastníky jednohlasně doporučena a přijata jako doporučená strategie zkoušení v globálně harmonizovaném systému klasifikace chemických látek (GHS)^{7a)}. Doporučuje se, aby se podle této strategie zkoušení postupovalo před prováděním zkoušek *in vivo*. U nových látek se doporučuje metoda zkoušení po krocích, díky níž lze dosáhnout vědecky spolehlivých údajů o leptavých/dráždivých účincích látky. U existujících látek, o jejichž leptavých/dráždivých účincích na kůži a oči není k dispozici dostatek údajů, by se měla tato strategie využít pro doplnění chybějících informací. Použití jiné strategie nebo postupu zkoušení nebo rozhodnutí nepoužít metodu po krocích musí být odůvodněno.

1.2 DEFINICE

Dráždivé účinky na oči: vyvolání změn v oku po aplikaci zkoušené látky na přední povrch oka. Tyto změny jsou plně vratné do 21 dnů po aplikaci.

Leptavé účinky na oči: vyvolání poškození oční tkáně nebo závažné fyzické zhoršení vidění po aplikaci zkoušené látky na přední povrch oka. Toto poškození není plně vratné do 21 dnů po aplikaci.

1.3 PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

Látka, která má být zkoušena, se nanese v jedné dávce na jedno oko pokusného zvířete, přičemž neexponované oko slouží jako kontrola. V určitých intervalech se na základě určení lézí spojivky, rohovky a duhovky vyhodnotí stupeň dráždivých/leptavých účinků na oči. Popíší se také jiné účinky na oko a nežádoucí systémové účinky, aby bylo možno provést úplné posouzení účinků. Doba studie by měla být dostatečně dlouhá, aby bylo možné zhodnotit vratnost nebo nevratnost účinků.

Pokusná zvířata, která v jakékoli fázi zkoušky vykazují přetrvávající příznaky značného utrpení nebo bolesti, se humánně utratí a látka se odpovídajícím způsobem vyhodnotí. Kritéria rozhodování o utracení umírajících a závažně trpících pokusných zvířat lze nalézt v literatuře^{7a)}.

1.4 POPIS ZKUŠEBNÍ METODY

1.4.1 Příprava na zkoušku *in vivo*

1.4.1.1 Výběr živočišných druhů

Upřednostňovaným pokusným zvířetem je albín králíka a používají se zdravá mladá dospělá pokusná zvířata. Při použití jiných kmenů nebo druhů by se mělo podat zdůvodnění.

1.4.1.2 *Příprava pokusných zvířat*

Pokusná zvířata jsou vybrána s ohledem na druh, pohlaví a stáří v souladu s ustanovením § 15 zvláštního právního předpisu¹⁰⁾ a označena tak, aby byla možná identifikace jednotlivých pokusných zvířat. Dobu navykání stanoví § 10 zvláštního právního předpisu¹⁰⁾. 24 h před zkouškou se u každého z předběžně vybraných pokusných zvířat provede vyšetření obou očí. Pokusná zvířata, u kterých se zjistí podráždění očí, oční defekt nebo poškození rohovky, se nepoužijí.

1.4.1.3 *Podmínky chovu a krmení*

Pokusná zvířata by měla být chována samostatně. Teplota v místnosti pro pokusná zvířata by měla u králíků činit (20 ± 3) °C. Ačkoliv by relativní vlhkost měla činit minimálně 30 % a pokud možno nepřesáhnout 70 % během úklidu místnosti, cílem by měla být hodnota 50 – 60 %. Osvětlení by mělo být umělé, mělo by se střídát 12 h světla a 12 h tmy, není-li v chovné místnosti denní světlo. Ke krmení lze použít obvyklé krmivo určené pro pokusná zvířata od registrovaného výrobce s neomezenou dodávkou pitné vody. Pokusná zvířata mohou být chována v klecích ve skupinách v souladu s příslušným právním předpisem¹⁰⁾, pokud není stanoveno projektem pokusů jinak, ale počet pokusných zvířat v kleci nesmí bránit nerušenému pozorování každého pokusného zvířete.

1.4.2 **Postup zkoušky**

1.4.2.1 *Aplikace zkoušené látky*

Zkoušená látka se aplikuje každému pokusnému zvířeti do spojivkového vaku jednoho oka tak, že se spodní víčko lehce odchlípne od oční bulvy. Víčka se pak asi na jednu sekundu lehce přidrží u sebe, aby nedošlo ke ztrátě látky. Druhé oko, do kterého se látka neaplikuje, slouží jako kontrola.

1.4.2.2 *Výplach*

Oči pokusných zvířat se do 24 h po instilaci zkoušené látky nevyplachují, s výjimkou pevných látek (viz část 1.4.2.3.2) a v případě okamžitých leptavých nebo dráždivých účinků. Použití satelitní skupiny pokusných zvířat k vyšetření vlivu výplachu očí se nedoporučuje, pokud to není vědecky odůvodněno. Je-li satelitní skupina nezbytná, použijí se dva králíci. Podmínky výplachu se podrobně zdokumentují, např. doba výplachu, složení a teplota promývacího roztoku, trvání, objem a rychlost aplikace.

1.4.2.3 *Úroveň dávek*

1.4.2.3.1 *Zkoušení kapalin*

Při zkoušení kapalin se použije dávka 0,1 ml. K instilaci látky přímo do oka by se neměly používat aerosolové rozstřikovače s čerpadlem. Před

instilací 0,1 ml do oka by se měla tekutina z rozstřikovače vypudit a shromáždit do nádobky.

1.4.2.3.2 *Zkoušení pevných látek*

Při zkoušení pevných látek, past a zrnitých látek se použije objem 0,1 ml nebo hmotnost nejvýše 100 mg. Zkoušená látka se rozemele na jemný prášek. Objem pevného materiálu se stanoví až po opatrném zhutnění, např. poklepáním odměrnou nádobkou. Pokud se pevná zkoušená látka z oka pokusného zvířete neodstranila pomocí fyziologických mechanismů do doby prvního pozorování po 1 h po aplikaci, lze oko vypláchnout fyziologickým roztokem nebo destilovanou vodou.

1.4.2.3.3 *Zkoušení aerosolů*

Před instilací látek do oka se doporučuje zachytit látky obsažené v rozstřikovačích nebo aerosolech do nádobky. Jedinou výjimkou jsou látky obsažené v aerosolové nádobce pod tlakem, které z důvodu odpařování zachytit nelze. V takových případech se oko podrží otevřené a látka se do oka aplikuje vstříknutím trvajícím jednu sekundu ze vzdálenosti 10 cm přímo před okem. Vzdálenost se může podle tlaku v rozprašovači a jeho obsahu lišit. Je třeba dbát na to, aby nedošlo k poškození oka tlakem z rozprašovače. V příslušných případech může být nutné vyhodnotit potenciál „mechanického“ poškození oka v důsledku rozprašovacího tlaku.

Dávku aerosolu lze odhadnout na základě této simulované zkoušky: látka se nastříká na odvažovací papír skrz otvor o velikosti králičího oka, přičemž tento otvor se nachází bezprostředně před papírem. Na základě zvýšení hmotnosti papíru se odhadne množství látky, která se vstříkne do oka. U těkavých látek lze dávku odhadnout pomocí zvážení odběrové nádobky před odstraněním zkoušené látky a po jejím odstranění.

1.4.2.4 *Počáteční zkouška (zkouška dráždivých/leptavých účinků na oči in vivo na jednom pokusném zvířeti)*

Jak je uvedeno ve strategii postupného zkoušení (viz tabulka 10), důrazně se doporučuje, aby byla zkouška *in vivo* provedena nejprve na jednom pokusném zvířeti.

Pokud výsledky této zkoušky naznačují, že látka má leptavé nebo vysoce dráždivé účinky na oči při použití popsaného postupu, další zkoušení dráždivých účinků na oči se neprovede.

1.4.2.5 *Lokální anestetika*

V jednotlivých případech lze použít lokální anestetika. Pokud analýza průkaznosti výsledků naznačuje, že látka může způsobit bolest, nebo pokud počáteční zkoušky ukazují, že se objeví bolestivá reakce, lze před instilací zkoušené látky použít lokální anestetika. Typ, koncentraci a dávku lokálního anestetika je třeba pečlivě zvolit, aby bylo zajištěno, že

v důsledku jeho použití nedojde k odlišným reakcím na zkoušenou látku. Podobně se musí znecitlivit i kontrolní oko.

1.4.2.6 *Potvrzující zkouška (zkouška dráždivých účinků na oči in vivo na dalších pokusných zvířatech)*

Pokud během počáteční zkoušky není pozorován leptavý účinek, měla by se dráždivá nebo negativní reakce potvrdit na maximálně dalších dvou pokusných zvířatech. Pokud je během počáteční zkoušky pozorován značný leptavý účinek, který naznačuje možný silný (nevratný) účinek v potvrzující zkoušce, doporučuje se provést potvrzující zkoušku metodou postupného zkoušení na jednom pokusném zvířeti spíše než exponováním dalších dvou pokusných zvířat současně. Pokud se u druhého pokusného zvířete projeví leptavé nebo vysoce dráždivé účinky, ve zkoušce se nepokračuje. K potvrzení slabých nebo mírných dráždivých reakcí může být nutné použít další pokusná zvířata.

1.4.2.7 *Doba pozorování*

Doba pozorování by měla být dostatečně dlouhá, aby bylo možné plně zhodnotit míru a vratnost pozorovaných účinků. Zkouška by však měla být ukončena kdykoliv v okamžiku, kdy pokusné zvíře vykazuje přetrvávající příznaky značné bolesti nebo utrpení^{7a)}. Za účelem určení vratnosti účinků by se pokusná zvířata měla obvykle pozorovat 21 dnů po podání zkoušené látky. Pokud je vratnost pozorována před uplynutím 21 dnů, zkouška by se měla v tomto okamžiku ukončit.

1.4.2.7.1 *Klinická pozorování a hodnocení očních reakcí*

Oči se vyšetří po 1, 24, 48 a 72 h po podání zkoušené látky. Jakmile se získají konečné informace, nemělo by zkoušení na pokusných zvířatech probíhat déle, než je nezbytné. Pokusná zvířata se známkami přetrvávajících prudkých bolestí nebo utrpení se neprodleně humánně utratí a látka se odpovídajícím způsobem vyhodnotí. Humánně se utratí ta pokusná zvířata, u nichž došlo po instilaci k těmto očním lézím: perforace rohovky nebo výrazné zvědovatění rohovky včetně stafylomu; krev v přední komoře oční; zákal rohovky stupně 4 přetrvávající 48 h; absence reakce na osvit (reakce duhovky stupně 2) přetrvávající 72 h; zvědovatění spojivkové membrány; nekróza spojivek nebo slzné žlázy; nebo odlupování nekrotické hmoty. Tento postup je dán nevratností takových lézí.

Pokusná zvířata, u nichž oční léze nevzniknou, nelze utratit dříve než 3 dny po instilaci. Pokusná zvířata s mírnými až středními lézemi se pozorují, dokud léze nevymizí, nebo po 21 dnů, po jejichž uplynutí se studie ukončí. Po 7, 14 a 21 dnech se provádí pozorování, aby se určil stav lézí a jejich vratnost nebo nevratnost.

Stupeň reakce oka (spojivek, rohovky a duhovky) je třeba zaznamenat při každém vyšetření (tabulka 11). Uvedou se také jakékoli jiné oční léze (např. panus, zbarvení) nebo nežádoucí systémové účinky.

Vyšetřování reakcí lze usnadnit použitím binokulární lupy, ruční šterbinové lampy, očního mikroskopu nebo jiných vhodných zařízení. Po zaznamenání pozorování po 24 h mohou být oči pokusných zvířat dále vyšetřeny fluoresceinem.

Hodnocení očních reakcí je nevyhnutelně subjektivní. S cílem podporovat harmonizaci hodnocení očních reakcí a napomáhat zkušebními laboratořím a těm, kdo provádějí a interpretují pozorování, musí být zaměstnanci provádějící pozorování odpovídajícím způsobem kvalifikováni pro práci s používaným systémem vyhodnocování.

2 DATA

2.1 HODNOCENÍ VÝSLEDKŮ

Stupně dráždivých účinků na oči se zhodnotí ve spojení s povahou a stupněm závažnosti lézí a jejich vratností nebo nevratností. Jednotlivé stupně nepředstavují absolutní měřítko dráždivých vlastností látky, neboť se hodnotí také jiné účinky zkoušené látky. Jednotlivé stupně by spíše měly být považovány za referenční hodnoty, které jsou smysluplné, pouze pokud se opírají o úplný popis a hodnocení veškerých pozorování.

3 PROJEKT POKUSU, PROTOKOL POKUSU A ZÁVĚREČNÁ ZPRÁVA

V souladu s příslušnými právními předpisy^{9),10)} musí být zpracován projekt pokusu a o průběhu pokusu je nutno vést protokol.

3.1 Zpráva o průběhu pokusu obsahuje následující informace.

zdůvodnění zkoušení *in vivo*: analýza průkaznosti výsledků předchozích pokusů, včetně výsledků strategie postupného zkoušení:

- popis relevantních údajů z předchozích zkoušek,
- údaje získané v každém kroku strategie zkoušení,
- popis provedených zkoušek *in vitro*, včetně podrobných údajů o postupech a o výsledcích získaných se zkoušenými/referenčními látkami,
- popis provedené studie dráždivých/leptavých účinků na kůži *in vivo*, včetně získaných výsledků,
- analýza průkaznosti výsledků odůvodňující provedení studie *in vivo*.

Zkoušená látka:

- identifikační údaje (např. číslo CAS, zdroj, čistota, známé nečistoty, šarže),

- fyzikální povaha a fyzikálně-chemické vlastnosti (např. hodnota pH, těkavost, rozpustnost, stabilita, reaktivita s vodou),
- v případě směsi její složení a relativní podíl složek vyjádřený v procentech,
- je-li použito lokální anestetikum, jeho identifikace, čistota, typ, dávka a potenciální interakce se zkoušenou látkou.

Vehikulum:

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

Pokusná zvířata:

- použitý druh/kmen, zdůvodnění použití jiných pokusných zvířat, není-li použit albín králík,
- stáří každého pokusného zvířete na začátku studie,
- počet pokusných zvířat každého pohlaví ve zkušebních a kontrolních skupinách (je-li to nutné),
- hmotnosti jednotlivých pokusných zvířat na začátku a na konci zkoušky,
- původ, podmínky chovu, krmivo atd.

Výsledky:

- popis metody vyhodnocení dráždivosti při každém pozorování (např. ruční štěrbinová lampa, biomikroskop, fluorescein),
- údaje ve formě tabulky o reakcích na dráždivé nebo leptavé účinky u jednotlivých pokusných zvířat při každém pozorování až do vyjmutí každého pokusného zvířete ze zkoušky,
- podrobný popis stupně a charakteru pozorovaných dráždivých nebo leptavých účinků,
- popis všech dalších pozorovaných očních lézí (např. vaskularizace, tvorba panu, srůst sousedních tkání, zbarvení),
- popis místních a systémových nepříznivých účinků mimo oči a případné histopatologické nálezy.

Diskuse a interpretace výsledků.

Extrapolace výsledků studií dráždivých účinků na oči pokusných zvířat na člověka je platná jen v omezené míře. Albinotický králík je ve většině případů na dráždivé a žíravé látky pro oči citlivější než člověk.

Je třeba dbát na to, aby byla při interpretaci údajů vyloučena dráždivost pramenící ze sekundární infekce.

Závěry.

TABULKA 11: STUPNICE OČNÍCH LÉZÍ

Rohovka

Zákal: stupeň hustoty (vyšetří se nejvíce zakalené oblasti)*

Žádné zvředovatění ani zákal	0
Rozptýlené nebo difúzní oblasti zákalu (jiné než slabé zastření normálního lesku), detaily duhovky jasně viditelné	1
Snadno identifikovatelná průhledná oblast, detaily duhovky lehce zastřené	2
Přítomnost zóny opalescence, detaily duhovky nejsou viditelné, velikost zornice stěží rozeznatelná	3
Úplná neprůhlednost rohovky, duhovka je zcela neviditelná	4

Maximálně možné: 4

* Zaznamená se oblast zákalu rohovky.

Duhovka

Normální	0
Výrazně prohloubené řasy, městnání, otoky, střední překrvení kolem rohovky, nebo překrvení při zánětu; rohovka reaguje na světlo (zpožděná reakce je považována za účinek).....	1
Krvácení, makroskopické poškození nebo bez reakce na světlo	2

Maximálně možné: 2

Spojivky

Zčervenání (podle nejzávažnější změny pozorované na víčkové nebo bulbární spojivce, kromě rohovky a duhovky)

Normální	0
Některé krevní cévy hyperemické (překrvené)	1
Difúzní, rudá barva, jednotlivé cévy nesnadno rozeznatelné	2
Difúzní temně rudá barva	3

Maximálně možné: 3

Otoky (chemosis)

(týká se víček nebo slzných žláz)

Normální	0
Slabě abnormální otok	1
Patrný otok, s částečným obrácením víček	2
Otok způsobující uzavření víček zhruba na polovinu	3
Otok způsobující uzavření víček více než na polovinu	4

Maximálně možné: 4

Tabulka 10

Strategie postupného zkoušení dráždivých a leptavých účinků na oči

OBECNÉ ÚVAHY

V zájmu spolehlivého vědeckého přístupu a dobrého zacházení s pokusnými zvířaty je důležité vyhýbat zbytečnému používání pokusných zvířat a minimalizovat jakékoli zkoušky, které u pokusných zvířat pravděpodobně vyvolají závažné reakce. Veškeré informace týkající se potenciálních leptavých/dráždivých účinků látky na oči by se měly hodnotit před zvažováním zkoušení *in vivo*. Může již existovat dostatek důkazů pro klasifikaci zkoušené látky podle jejího potenciálu dráždivých nebo leptavých účinků na oči, aniž by bylo nutné provádět zkoušky na pokusných zvířatech. Proto využití analýzy průkaznosti výsledků a strategie postupného zkoušení sníží potřebu provádět zkoušení *in vivo*, zejména pokud látka pravděpodobně vyvolá závažné reakce.

Doporučuje se, aby se stávající informace týkající se dráždivých a leptavých účinků látky na oči hodnotily pomocí analýzy průkaznosti výsledků, na jejímž základě se rozhodne o tom, zda by se k lepší charakteristice tohoto potenciálu měly provést další studie jiné než oční studie *in vivo*. Jsou-li nutné další studie, doporučuje se využít strategie postupného zkoušení a jejím prostřednictvím získat relevantní experimentální údaje. U látek, které doposud nebyly zkoušeny, by se měla strategie postupného zkoušení využít k získání údajů, které jsou nezbytné k vyhodnocení jejich leptavých nebo dráždivých účinků na oči. Strategie zkoušení popsaná v této tabulce 10 byla vypracována na semináři OECD^{7a)}. Následně byla tato strategie potvrzena a rozpracována v Harmonizovaném integrovaném systému klasifikace nebezpečí chemických látek pro lidské zdraví a jejich vlivu na životní prostředí, který schválilo 28. společné zasedání Výboru pro chemické látky a Pracovní skupiny pro chemické látky v listopadu 1998^{7a)}.

Ačkoliv tato strategie postupného zkoušení není nedílnou součástí zkušební metody B.5, vyjadřuje doporučený postup stanovení dráždivých/leptavých účinků na oči. Tento postup představuje nejlepší praktický i etický standard pro zkoušení dráždivých/leptavých účinků na oči *in vivo*. Metoda zkoušení poskytuje pokyny pro provádění zkoušky *in vivo* a shrnuje faktory, kterým je nutno před zvažováním takové zkoušky věnovat pozornost. Strategie postupného zkoušení představuje přístup posuzování existujících údajů o dráždivých a leptavých účincích látek na oči a odstupňovaný přístup k získávání relevantních údajů o látkách, u kterých je nutné provést další studie, nebo u nichž žádné studie nebyly doposud provedeny. Součástí této strategie je provedení nejprve validovaných a uznaných zkoušek *in vitro* nebo *ex vivo* a poté za určitých okolností provedení studií dráždivých/leptavých účinků na kůži metodou zkoušení B.4^{7a)}.

POPIS STRATEGIE ZKOUŠENÍ PO KROCÍCH

Před zahájením zkoušek v rámci strategie postupného zkoušení (tabulka 10 pokračování) se vyhodnotí veškeré dostupné informace, aby se mohlo rozhodnout o nutnosti provést zkoušení *in vivo*. Ačkoliv lze významné informace získat z vyhodnocení jednotlivých parametrů (např. extrémní hodnota pH), stávající informace by se měly hodnotit jako celek. Všechny relevantní údaje o účincích zkoušené látky a jejích strukturních obdob se vyhodnotí na základě rozhodnutí založeném na průkaznosti výsledků. Mělo by se podat zdůvodnění tohoto rozhodnutí. Hlavní důraz by se měl klást na již existující údaje o účincích látky na člověka a zvířata a dále na výsledky zkoušení *in vitro* nebo *ex vivo*. Studie žíravých látek *in vivo* by se měly provádět co nejméně. Mezi faktory uvedené ve strategii zkoušení patří:

Hodnocení existujících údajů o účincích látky na člověka a zvířata (krok 1). Nejprve je nutné vzít v úvahu existující údaje o účincích na člověka, např. klinické studie nebo studie nemocí z povolání, záznamy subjektů hodnocení nebo údaje o zkouškách na pokusných zvířatech získaná z očních studií, protože z těchto dat lze získat informace přímo se vztahující k účinkům na oči. Poté se zhodnotí dostupné údaje ze studií na lidech nebo na pokusných zvířatech zabývajících se leptavými/dráždivými účinky na kůži. Látky, jejichž leptavé nebo vysoce dráždivé účinky na oči jsou známy, se do očí pokusných zvířat neaplikují. To platí rovněž pro látky vykazující leptavé nebo dráždivé účinky na kůži; takové látky se považují za látky s leptavými nebo dráždivými účinky rovněž na oči. Látky, o nichž byly v předchozích očních studiích získány dostatečné důkazy, že jsou nežíravé a nedráždivé, se v očních studiích *in vivo* také nezkoušejí.

Analýza vztahů mezi strukturou a biologickou aktivitou (SAR) (krok 2). Vezmou se v úvahu výsledky zkoušek strukturně příbuzných chemických látek, jsou-li k dispozici. Pokud jsou k dispozici dostatečné údaje o účincích strukturně příbuzných látek nebo jejich směsí na člověka nebo zvířata naznačující, že mají potenciál leptavých/dráždivých účinků na oči, lze předpokládat, že zkoušená látka vyvolá stejné reakce. V takových případech není nutné tuto látku zkoušet. Negativní údaje získané ze studií strukturně příbuzných látek nebo jejich směsí nezakládají podle strategie postupného zkoušení dostatečný důkaz nežíravosti/nedráždivosti látky. Ke stanovení potenciálu leptavých/dráždivých účinků na kůži i oči by měl být použitý validované a uznané postupy vycházející z analýzy SAR.

Fyzikálně-chemické vlastnosti a chemická reaktivita (krok 3). Látky vykazující extrémní hodnoty pH jako $\leq 2,0$ nebo $\geq 11,5$ mohou mít silné místní účinky. Pokud se leptavé nebo dráždivé účinky látky na oči stanoví na základě extrémních hodnot pH, lze také vzít v úvahu kyselou/alkalickou rezervu (pufrační kapacitu)^{7a)}. Pokud lze podle pufrační kapacity soudit, že látka možná nemá leptavé účinky na oči, musí tento předpoklad potvrdit další zkoušky, pokud možno s využitím validované a uznané zkoušky *in vitro* nebo *ex vivo* (viz kroky 5 a 6).

Zvážení dalších existujících informací (krok 4). V této fázi se vyhodnotí veškeré dostupné informace o systémové toxicitě dermální cestou. Vezme se v úvahu také akutní dermální toxicita zkoušené látky. Pokud se u zkoušené látky ukázalo, že je při podání dermální cestou vysoce toxická, nemusí být nutné zkoušet ji na oku. Ačkoliv mezi akutní dermální toxicitou a dráždivými/leptavými účinky na oči nemusí nezbytně existovat souvislost, lze se domnívat, že pokud je látka při podání dermální cestou vysoce toxická, bude vysokou toxicitu vykazovat také při instilaci podání do oka. Takové údaje lze také vzít v úvahu mezi kroky 2 a 3.

Výsledky ze zkoušek in vitro nebo ex vivo (kroky 5 a 6). Látky, které vykazovaly leptavé nebo výrazně dráždivé vlastnosti ve zkoušce *in vitro* nebo *ex vivo*^{7a)}, která byla validována a uznána pro hodnocení výlučně leptavých/dráždivých účinků na oči nebo na kůži, není nutné zkoušet na pokusných zvířatech. Lze předpokládat, že takové látky vyvolají ve zkoušce *in vivo* podobné závažné účinky. Nejsou-li validované a uznané zkoušky *in vitro* nebo *ex vivo* k dispozici, kroky 5 a 6 se přeskočí a přejde se přímo ke kroku 7.

Posouzení dráždivých nebo leptavých účinků na kůži in vivo (krok 7). Pokud stávající důkazy k provedení přesvědčivé analýzy průkaznosti výsledků potenciálních dráždivých/leptavých účinků látky na oči opírající se o údaje z výše uvedených studií nepostačují, nejprve se s využitím metody B.4^{7a)} a průvodní přílohy^{7a)} vyhodnotí potenciál dráždivých/leptavých účinků na kůži *in vivo*. Jestliže se u látky prokáží leptavé nebo silné dráždivé účinky na kůži, považuje se za látku s leptavými a dráždivými účinky na oči, pokud odlišný závěr nepodporují jiné informace. Oční zkoušku *in vivo* by tak nebylo nutné provádět. Pokud látka leptavé nebo výrazně dráždivé účinky na kůži nemá, oční zkouška *in vivo* se provede.

Zkouška *in vivo* na králících (kroky 8 a 9). Oční zkoušení *in vivo* se zahájí počáteční zkouškou na jednom pokusném zvířeti. Pokud výsledky této zkoušky naznačují, že látka má silně dráždivé nebo leptavé účinky na oči, nemělo by se další zkoušení provádět. Pokud zkouška žádné leptavé nebo silně dráždivé účinky neodhalí, provede se potvrzující zkouška na dvou dalších pokusných zvířatech.

Tabulka 10 pokračování

STRATEGIE ZKOUŠENÍ A HODNOCENÍ DRÁŽDIVÝCH/LEPTAVÝCH ÚČINKŮ NA OČI

	Aktivita	Nález	Závěr
1	<p>Existující údaje o účincích na lidské nebo zvířecí oči</p> <p>Existující údaje o leptavých účincích na lidskou nebo zvířecí kůži</p> <p>Existující údaje o silně dráždivých účincích na lidskou nebo zvířecí kůži</p>	<p>Závažné poškození očí</p> <p>Dráždivá pro oči</p> <p>Nežíravá nebo nedráždivá pro oči</p> <p>Leptavé účinky na kůži</p> <p>Silně dráždivé účinky na kůži</p>	<p>Dominantní ukazatel; považována za žíravou pro oči. Není nutné zkoušet.</p> <p>Dominantní ukazatel; považována za dráždivou pro oči. Není nutné zkoušet.</p> <p>Dominantní ukazatel; považována za nežíravou a nedráždivou pro oči. Nevyžaduje zkoušet.</p> <p>Předpoklad leptavých účinků na oči. Není nutné zkoušet.</p> <p>Předpoklad dráždivých účinků na oči. Není nutné zkoušet.</p>
	↓		
	<i>Nejsou k dispozici žádné informace, nebo informace nejsou přesvědčivé</i>		
	↓		
2	<p>Proveďte hodnocení leptavých/dráždivých účinků na oči podle analýzy SAR</p> <p>Proveďte analýzu SAR leptavých účinků na kůži</p>	<p>Předpoklad závažného poškození očí</p> <p>Předpoklad dráždivých účinků na oči</p> <p>Předpoklad leptavých účinků na kůži</p>	<p>Předpoklad žíravosti pro oči. Není nutné zkoušet.</p> <p>Předpoklad dráždivosti pro oči. Není nutné zkoušet.</p> <p>Předpoklad žíravosti pro oči. Není nutné zkoušet.</p>
	↓		

Aktivita	Nález	Závěr
<p><i>Nelze stanovit žádné předpoklady, nebo jsou předpoklady nepřesvědčivé nebo negativní</i></p>		
↓		
<p>3 Změřte hodnotu pH (pufrační kapacita, je-li významná)</p>	<p>pH ≤ 2 nebo ≥ 11,5 (s vysokou pufrací kapacitou, pokud je významná)</p>	<p>Předpoklad žíravosti pro oči. Není nutné zkoušet.</p>
↓		
<p><i>2 < pH < 11,5, nebo pH ≤ 2 nebo ≥ 11,5 s nízkou/žádnou pufrací kapacitou, pokud je významná</i></p>		
↓		
<p>4 Posuďte systémovou toxicitu dermální cestou</p>	<p>Vysoce toxické při koncentracích, které by byly zkoušeny na očích.</p>	<p>Látka by byla pro zkoušení příliš toxická. Není nutné zkoušet.</p>
↓		
<p><i>Takové informace nejsou k dispozici, nebo látka není vysoce toxická</i></p>		
↓		
<p>5 Provedte validovanou a uznanou zkoušku leptavých účinků na oči <i>in vitro</i> nebo <i>ex vivo</i></p>	<p>Leptavé účinky</p>	<p>Předpoklad leptavých účinků na oči. Není třeba žádné další zkoušení.</p>
↓		
<p><i>Látka není žíravá, nebo validované metody zkoušení žíravosti pro oči <i>in vitro</i> nebo <i>ex vivo</i> dosud nejsou k dispozici</i></p>		
↓		
<p>6 Provedte validovanou a uznanou zkoušku dráždivých účinků na oči <i>in vitro</i> nebo <i>ex vivo</i></p>	<p>Dráždivé účinky</p>	<p>Předpoklad dráždivých účinků na oči. Není třeba žádné další zkoušení.</p>

Aktivita	Nález	Závěr
<p>↓</p> <p><i>Látka není dráždivá, nebo validované metody zkoušení dráždivých účinků na oči in vitro nebo ex vivo dosud nejsou k dispozici</i></p> <p>↓</p>		
<p>7 Experimentálně vyhodnoťte potenciál dráždivých nebo leptavých účinků na kůži <i>in vivo</i> (viz metoda zkoušení B.4, včetně její přílohy)</p>	<p>Leptavé nebo dráždivé účinky</p>	<p>silně Předpoklad leptavých účinků na oči. Není třeba žádné další zkoušení.</p>
<p>↓</p> <p><i>Látka není žíravá ani silně dráždivá pro kůži</i></p> <p>↓</p>		
<p>8 Proveďte počáteční oční zkoušku na králících <i>in vivo</i> na jednom pokusném zvířeti</p>	<p>Závažné poškození očí</p>	<p>Považována za dráždivou pro oči. Není třeba žádné další zkoušení.</p>
<p>↓</p> <p><i>Žádné výrazné poškození, nebo žádná odezva</i></p> <p>↓</p>		
<p>9 Proveďte potvrzující zkoušku na jednom nebo dalších dvou pokusných zvířatech</p>	<p>Žíravá nebo dráždivá</p> <p>Nežíravá nebo nedráždivá</p>	<p>Považována za žíravou nebo dráždivou pro oči. Není třeba žádné další zkoušení.</p> <p>Považována za nedráždivou a nežíravou pro oči. Není třeba žádné další zkoušení.</p>