

KOMISIJOS REGLAMENTAS (ES) Nr. 1152/2010

2010 m. gruodžio 8 d.

kuriuo iš dalies keičiamas Reglamentas (EB) Nr. 440/2008, nustatantis bandymų metodus pagal Europos Parlamento ir Tarybos reglamentą (EB) Nr. 1907/2006 dėl cheminių medžiagų registracijos, įvertinimo, autorizacijos ir apribojimų (REACH), siekiant jį suderinti su technikos pažanga

(Tekstas svarbus EEE)

EUROPOS KOMISIJA,

atsižvelgdama į Sutartį dėl Europos Sąjungos veikimo,

atsižvelgdama į 2006 m. gruodžio 18 d. Europos Parlamento ir Tarybos reglamentą (EB) Nr. 1907/2006 dėl cheminių medžiagų registracijos, įvertinimo, autorizacijos ir apribojimų (REACH), įsteigiantį Europos cheminių medžiagų agentūrą, iš dalies keičiantį Direktyvą 1999/45/EB bei panaikinantį Tarybos reglamentą (EEB) Nr. 793/93, Komisijos reglamentą (EB) Nr. 1488/94, Tarybos direktyvą 76/769/EEB ir Komisijos direktyvas 91/155/EEB, 93/67/EEB, 93/105/EB bei 2000/21/EB ⁽¹⁾, ypač į jo 13 straipsnio 3 dalį,

kadangi:

- (1) Komisijos reglamente (EB) Nr. 440/2008 ⁽²⁾ pateikti bandymų metodai, taikomi nustatant pagal Reglamentą (EB) Nr. 1907/2006 naudojamų cheminių medžiagų fizikines ir chemines savybes, toksiškumą ir ekotoksiškumą.
- (2) Reglamentą (EB) Nr. 440/2008 būtina atnaujinti, visų pirma įtraukiant į jį du naujus neseniai OECD priimtus *in vitro* akių dirginimo bandymų metodus, taip siekiant sumažinti eksperimentiniais tikslais naudojamų gyvūnų

skaičių, kaip nustatyta 1986 m. lapkričio 24 d. Tarybos direktyvoje 86/609/EEB dėl valstybių narių įstatymų ir kitų teisės aktų, susijusių su eksperimentiniais ir kitais mokslo tikslais naudojamų gyvūnų apsauga, suderinimo ⁽³⁾. Dėl šio pasiūlymo buvo konsultuojamasi su suinteresuotosiomis šalimis.

- (3) Todėl Reglamentą (EB) Nr. 440/2008 reikėtų atitinkamai iš dalies pakeisti.
- (4) Šiame reglamente numatytos priemonės atitinka komiteto, įsteigto pagal Reglamento (EB) Nr. 1907/2006 133 straipsnį, nuomonę,

PRIĖMĖ ŠĮ REGLAMENTĄ:

1 straipsnis

Į Reglamento (EB) Nr. 440/2008 priedo B dalį įtraukiami B.47 ir B.48 skyriai, pateikti šio reglamento priede.

2 straipsnis

Šis reglamentas įsigalioja trečią dieną nuo jo paskelbimo *Europos Sąjungos oficialiajame leidinyje*.

Šis reglamentas yra privalomas visas ir tiesiogiai taikomas visose valstybėse narėse.

Priimta Briuselyje 2010 m. gruodžio 8 d.

Komisijos vardu

Pirmininkas

José Manuel BARROSO

⁽¹⁾ OL L 396, 2006 12 30, p. 1.

⁽²⁾ OL L 142, 2008 5 31, p. 1.

⁽³⁾ OL L 358, 1986 12 18, p. 1.

PRIEDAS

„B.47. GALVIJŲ RAGENOS PADRUMSTĖJIMO IR PRALAUDIMO BANDYMO METODAS AKIS ĖSDINANČIOMS IR STIPRIAİ DIRGINANČIOMS MEDŽIAGOMS NUSTATYTI

ĮVADAS

1. Galvijų ragenos padrumstėjimo ir pralaidumo (angl. *Bovine Corneal Opacity and Permeability*, BCOP) bandymo metodas yra *in vitro* bandymo metodas, kurį tam tikromis aplinkybėmis ir su tam tikrais apribojimais galima taikyti chemines medžiagas ir mišinius klasifikuojant kaip „akis ėsdinančias ir stipriai dirginančias medžiagas“ (1) (2) (3). Pagal šį bandymų metodą stipriai dirginančios medžiagos apibrėžiamos kaip medžiagos, sukeliančios akių pažeidimus, kurie triušiu nepraeina per 21 dieną po paveikimo ta medžiaga. Nors BCOP bandymas nėra laikomas tinkamu visiškai pakeisti triušio akies *in vivo* bandymą, šį bandymą rekomenduojama atlikti kaip vieną iš pakopinės bandymo strategijos, taikomos reguliavimo tikslais klasifikuojant ir ženklinant tam tikroje srityje naudojamas medžiagas, sudedamųjų dalių (4) (5). Bandomąsias medžiagas ir mišinius (6) galima klasifikuoti kaip akis ėsdinančias arba stipriai dirginančias medžiagas neatliekant papildomų bandymų su triušiais. Cheminė medžiaga, kurios bandymo rezultatai neigiami, turėtų būti išbandyta su triušiais, taikant nuosekliąją bandymų metodiką, aprašytą OECD bandymų gairėse Nr. 405 (7) (šio priedo B.5 skyrius).
2. Šio bandymo metodo paskirtis – aprašyti procedūras, taikomas vertinant, ar bandomoji medžiaga gali sukelti ėdinimą arba stiprų dirginimą, sprendžiant pagal jos gebėjimą sukelti izoliuotos galvijo ragenos padrumstėjimą arba didesnę pralaidumą. Toksinis poveikis ragenai vertinamas pagal: i) sumažėjusią šviesos skvarbą (padrumstėjimą) ir ii) padidėjusią fluoresceino natrio druskos dažiklio skvarbą (pralaidumą). Bandomąja medžiaga paveiktos ragenos padrumstėjimo ir pralaidumo vertinimo rezultatai susumuojami siekiant apskaičiuoti *in vitro* dirginimo skaitinę vertę (angl. *In Vitro Irritancy Score*, IVIS), kuri naudojama klasifikuojant bandomosios medžiagos dirginimo lygį.
3. Akis dirginančios medžiagos, sukeliančios akių pažeidimus, kurie praeina mažiau kaip per 21 dieną, ir akių nedirginančios medžiagos taip pat buvo išbandytos taikant BCOP bandymo metodą. Tačiau BCOP bandymo metodo tikslumas ir patikimumas bandant šių kategorijų chemines medžiagas nėra oficialiai įvertintas.
4. Apibrėžtys pateiktos 1 priedėlyje.

PRADINIAI SVARSTYMAI IR APRIBOJIMAI

5. Šis bandymo metodas pagrįstas Alternatyvių metodų patvirtinimo tarpžinybinio koordinavimo komiteto (angl. *Inter-agency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods*, ICCVAM) BCOP bandymo metodo protokolu (8), parengtu atlikus tarptautinį patvirtinimo tyrimą (4) (5) (9), padedant Europos alternatyvių metodų patvirtinimo centrui (angl. *European Centre for the Validation of Alternative Methods*, ECVAM) bei Japonijos alternatyvių metodų patvirtinimo centrui (angl. *Japanese Centre for the Validation of Alternative Methods*, JaCVAM). Šis protokolas parengtas remiantis informacija, gauta iš *In vitro* bandymų metodų instituto (angl. *Institute for In Vitro Sciences*, IIVS) ir iš INVITTOX protokolo Nr. 124 (10), kuris buvo naudojamas 1997–1998 m. atliekant Europos bendrijos finansuotą BCOP bandymo metodo preliminarų patvirtinimo tyrimą. Abu šie protokolai parengti remiantis BCOP bandymo metodika, kurią pirmasis aprašė Gautheron *et al.* (11).
6. Nustatyti šio metodo apribojimai susiję su didele klaidingai teigiamų rezultatų dalimi alkoholių bei ketonų atveju ir didele klaidingai neigiamų rezultatų dalimi kietųjų medžiagų atveju, kaip nurodyta patvirtinimo duomenų bazėje (žr. 44 skirsnį) (5). Iš duomenų bazės pašalinus šių cheminių ir fizikinių kategorijų chemines medžiagas, BCOP bandymo metodo tikslumas pagal ES, EPA ir GHS klasifikavimo sistemas iš esmės pagerėjo (5). Remiantis šių bandymų tikslu (t. y. tiksliai nustatyti akis ėsdinančias ir (arba) stipriai dirginančias medžiagas), klaidingi neigiami rezultatai neturi lemiamos reikšmės, nes šios cheminės medžiagos vėliau bus išbandytos su triušiais arba taikant kitus deramai patvirtintus *in vitro* bandymus, atsižvelgiant į reguliavimo reikalavimus ir taikant nuosekliąją bandymo metodiką pagal įrodomosios duomenų galios metodą. Be to, naudojant dabartinę patvirtinimo duomenų bazę negalima deramai įvertinti tam tikrų klasių cheminių medžiagų arba produktų (pvz., mišinių). Tačiau tyrėjai galėtų apsvarstyti šio bandymo metodo taikymo visų tipų bandomosioms medžiagoms (įskaitant mišinius) galimybes, kai teigiamas rezultatas galėtų būti priimtas kaip orientacinis akių ėdinimo arba stipraus dirginimo atsakas. Tačiau teigiami rezultatai, gauti bandant alkoholius arba ketonus, turėtų būti aiškinami atsargiai, vengiant nepagrįstų prognozių.
7. Visos procedūros su galvijų akimis ir galvijų ragenomis turėtų būti atliekamos pagal bandymų laboratorijos taisykles ir procedūras, taikytinas gyvūninės kilmės medžiagoms, įskaitant audinius ir audinių skysčius, bet neapsiribojant tik jais. Rekomenduojama laikytis bendrųjų laboratorijose taikytinų atsargumo priemonių (12).
8. Šio bandymo metodo apribojimas yra tas, kad, nors pagal jį ir atsižvelgiama į tam tikrą poveikį akims, vertinama pagal triušio akių dirginimo bandymo metodą, ir iš dalies į to poveikio lygį, pagal šį metodą neatsižvelgiama į akies junginės ir raištelės pažeidimus. Be to, nors pagal BCOP bandymo metodą ir negalima įvertinti ragenos pažeidimų grįžtamumo *per se*, pasiūlyta, remiantis triušio akių tyrimais, pagal pradinį ragenos pažeidimų gylio vertinimą nustatyti, ar poveikis negrįžtamas, ar grįžtamas (13). Galiausiai pagal BCOP bandymo metodą negalima įvertinti galimo sisteminio toksiškumo, susijusio su poveikiu akims.

9. Toliau dedamos pastangos siekiant geriau apibūdinti BCOP bandymo metodo naudingumą ir apribojimus, jį naudojant silpnai dirginančioms ir nedirginančioms medžiagoms nustatyti (taip pat žr. 45 skirsnį). Be to, naudotojai kviečiami teikti patvirtinimo organizacijoms pavyzdžius ir (arba) duomenis, kuriais remiantis būtų galima oficialiai įvertinti galimą būsimą BCOP bandymo metodo paskirtį, įskaitant silpnai dirginančių medžiagų ir nedirginančių medžiagų nustatymą.
10. Kiekviena laboratorija, pradėdanti taikyti šį bandymo metodą, turėtų naudoti 2 priedėlyje nurodytas patikros chemines medžiagas (angl. *proficiency substances*). Laboratorija gali naudoti šias chemines medžiagas norėdama įrodyti savo techninę kompetenciją taikyti BCOP bandymo metodą, prieš pateikdama BCOP bandymo duomenis teisės aktuose numatytais pavojų klasifikavimo tikslais.

BANDYMO PRINCIPAS

11. BCOP bandymo metodas yra tipinis konkretaus organo tyrimo modelis, pagal kurį galima išsaugoti normalų trumpalaikį fiziologinį ir biocheminį galvijų ragenos funkcionavimą *in vitro*. Pagal šį bandymo metodą bandomosios medžiagos sukeltas pažeidimas nustatomas kiekybiškai įvertinant ragenos padrumstėjimo ir pralaidumo pokyčius, atitinkamai naudojant drumsties matuoklį (angl. *opacity meter*) ir regimosios šviesos spektrofotometrą. Abu matavimai atliekami siekiant apskaičiuoti IVIS, kuri naudojama *in vitro* dirginimo pavojaus kategorijai nustatyti, kad būtų galima prognozuoti bandomosios medžiagos gebą dirginti akis *in vivo* (žr. „Sprendimo kriterijai“).
12. Pagal BCOP bandymo metodą naudojamos izoliuotos ragenos, paimtos iš kų tik paskerstų galvijų akių. Ragenos padrumstėjimas kiekybiškai įvertinamas matuojant ragenos praleidžiamą šviesos kiekį. Ragenos pralaidumas kiekybiškai įvertinamas kaip fluoresceino natrio druskos dažiklio kiekis, prasiskverbęs per visą ragenos storį, matuojant užpakalinės kameros terpėje. Bandomosios medžiagos uždedamos ant ragenos epitelio paviršiaus jos įdedant į ragenos laikiklio priekinę kamerą. 3 priedėlyje pateiktas ragenos laikiklio, naudojamo atliekant BCOP bandymą, aprašas ir schema. Ragenų laikiklių galima įsigyti iš įvairių komercinių šaltinių arba pasidaryti.

Galvijų akių šaltinis bei amžius ir gyvūnų rūšies pasirinkimas

13. Į skerdyklą atvežti galvijai paprastai paskerdziami vartoti žmonėms arba kitais komerciniais tikslais. Kaip BCOP bandymams skirtų ragenų šaltinis gali būti naudojami tik sveiki gyvūnai, kurie laikomi tinkamais naudoti žmonių maisto grandinėje. Kadangi galvijų svorio intervalas gana didelis ir priklauso nuo veislės, amžiaus bei lyties, rekomenduojamo skerdziamo gyvūno svorio nenustatyta.
14. Ragenų dydžiai gali skirtis dėl gyvūnų amžiaus skirtumo. Ragenos, kurių horizontalus skersmuo didesnis kaip 30,5 mm, o ragenos storis per vidurį ne mažesnis kaip 1 100 µm, paprastai gaunamos iš senesnių kaip aštuonerių metų galvijų, o ragenos, kurių horizontalus skersmuo mažesnis kaip 28,5 mm, o ragenos storis per vidurį mažesnis kaip 900 µm, paprastai gaunamos iš jaunesnių kaip penkerių metų galvijų (14). Dėl šios priežasties senesnių kaip 60 mėnesių galvijų akys paprastai nenaudojamos. Galvijų, kurių amžius mažesnis kaip 12 mėnesių, akys paprastai nebūdavo naudojamos, nes jos dar nevisiškai išsivysčiusios, ir jų ragenos storis bei skersmuo yra gerokai mažesni nei suaugusių galvijų. Tačiau jaunų gyvūnų (t. y. 6–12 mėnesių) ragenas naudoti leidžiama, nes jų naudojimas teikia tam tikrų pranašumų, pvz., jų lengviau gauti, amžiaus intervalas yra nedidelis ir darbuotojams kyla mažiau pavojų, susijusių su galvijų spongiforminės encefalopatijos poveikiu (15). Kadangi būtų naudinga geriau įvertinti ragenos dydžio arba storio sąryšį su esdinančių ir dirginančių medžiagų poveikiu, naudotojai kviečiami teikti duomenis apie apytikslį gyvūnų, iš kurių gautos per tyrimą naudotos ragenos, amžių ir (arba) svorį.

Akių rinkimas ir gabenimas į laboratoriją

15. Akis surenka skerdyklų darbuotojai. Kad mechaninis ir kitoks akių pažeidimas būtų kuo mažesnis, gyvūną paskerdus, akys turi būti išimamos kuo greičiau. Kad ant akių nepatektų galinčių dirginti cheminių medžiagų, skerdyklų darbuotojai turėtų nenaudoti valiklių gyvūno galvai nuplauti.
16. Akys turi būti visiškai panardintos į Hankso subalansuotą druskos tirpalą (angl. *Hanks' Balanced Salt Solution*, HBSS), supiltą į tinkamo dydžio talpyklą, ir vežamos į laboratoriją taip, kad būtų kuo mažiau pažeistos ir (arba) užkrėstos bakterijomis. Kadangi akys renkamos skerdziant gyvūnus, jos gali būti išteptos krauju ir kitomis biologinėmis medžiagomis, įskaitant bakterijas ir kitus mikroorganizmus. Todėl svarbu užtikrinti, kad užteršimo pavojus būtų kuo mažesnis (pvz., laikant indą su akimis ant drėgno ledo, į HBSS, naudojamą vežant akis, įdedant antibiotikų [pvz., 100 IU/mL penicilino ir 100 µg/mL streptomicino]).
17. Laikotarpis nuo akių surinkimo iki ragenų panaudojimo per BCOP bandymą turėtų būti kuo mažesnis (paprastai renkama ir naudojama tą pačią dieną), ir turi būti įrodyta, kad šis laiko tarpas neturės neigiamos įtakos bandymo rezultatams. Šie rezultatai grindžiami akių atrankos kriterijais ir atsaku į teigiamas bei neigiamas kontrolines medžiagas. Visos akys, naudojamos atliekant bandymą, turėtų būti iš to paties tam tikrą dieną surinktos akių rinkinio.

BCOP bandymui skirtų akių atrankos kriterijai

18. Akis atvežus į laboratoriją, atidžiai apžiūrinama, ar jos neturi trūkumų, įskaitant padidėjusį drumstumą, įbrėžimus ir neovaskuliarizaciją. Turėtų būti naudojamos tik tokių trūkumų neturinčių akių ragenos.
19. Be to, vėliau, per tam tikrus bandymo etapus, įvertinama kiekvienos ragenos kokybė. Ragenos, kurių padrumstėjimas po pradinio vienos valandos trukmės kalibravimo laikotarpio yra didesnė kaip septyni drumsties vienetai, atmetamos (PASTABA: drumsties matuoklis turėtų būti kalibruotas pagal standartus, taikomus drumsties vienetais nustatyti, žr. 3 priedėlį).
20. Kiekviena apdorojamų (bandomąją medžiaga, kartu naudojamomis neigiamomis ir teigiamomis kontrolinėmis medžiagomis) mėginių grupė turi būti sudaryta ne mažiau kaip iš trijų akių. Atliekant BCOP bandymą trys ragenos turėtų būti apdorojamos neigiamomis kontrolinėmis medžiagomis. Kadangi visos ragenos yra išimamos iš viso akies obuolio ir įdedamos į ragenų kameras, gali likti šių žmogaus veiksmų padarinių, kurie turės įtakos kai kurių ragenų padrumstėjimo ir pralaidumo vertėms (atsižvelgiant į neigiamas kontrolines medžiagas). Be to, padrumstėjimo ir pralaidumo vertės, gautos naudojant neigiamas kontrolines grupes, naudojamos bandomosios medžiagos ir teigiamos kontrolinės grupės padrumstėjimo ir pralaidumo vertėms, naudojamoms apskaičiuojant IVIS vertes, pakoreguoti.

EIGA**Akių paruošimas**

21. Trūkumų neturinčios ragenos, stengiantis nepažeisti ragenos epitelio ir endotelio, išpjauamos su 2–3 mm pločio skleros apvadu, kuris paliekamas tam, kad vėliau būtų patogiau paimti rageną. Izoliuotos ragenos įdedamos į specialius ragenų laikiklius, sudarytus iš priekinių ir užpakalinių kamerų, kurios liečiasi su atitinkamai ragenos epitelio ir endotelio paviršiumi. Abi kameros iki viršaus pripildomos pašildyta Eagle'o minimalia pagrindine terpe (angl. *Eagle's Minimum Essential Medium*, EMEM) (pirmiau užpakalinė kamera) taip, kad nesusidarytų burbulų. Tada ne trumpiau kaip vieną valandą palaikoma 32 ± 1 °C įtaiso temperatūra, kad susilygintų ragenų bei terpės temperatūra ir, kiek tai įmanoma, būtų pasiektas normalus medžiagų apykaitos aktyvumas (apytikslė ragenos paviršiaus temperatūra *in vivo* yra 32 °C).
22. Po temperatūros nusistovėjimo laikotarpio, abi kameros pripildomos naujos pašildytos EMEM, ir registruojami pamatiniai kiekvienos ragenos padrumstėjimo rodmenys. Visos ragenos, turinčios makroskopinių audinio pažeidimų (pvz., įbrėžimų, pigmento sankaupų, neovaskuliarizacijos požymių) arba kurių drumstis yra didesnė kaip septyni drumsties vienetai, atmetamos. Apskaičiuojama visų stabilios būsenos ragenų drumsties vidutinė vertė. Ne mažiau kaip trys ragenos, kurių drumsties vertės yra artimos vidutinei visų ragenų drumsties vertei, pasirenkamos kaip neigiama (arba tirpiklio) kontrolinė mėginių grupė. Likusios ragenos padalijamos į bandomąją grupę ir teigiamą kontrolinę grupę.
23. Kadangi vandens šiluminė talpa didesnė už oro, vanduo užtikrina stabilesnę inkubacinę temperatūrą. Todėl ragenos laikiklį ir jo turinį rekomenduojama laikyti vandens vonioje, kurioje būtų palaikoma 32 ± 1 °C temperatūra. Tačiau gali būti naudojami ir oro inkubatoriai, jeigu bus imtasi priemonių vienodai temperatūrai palaikyti (pvz., iš anksto pašildant laikiklius ir terpę).

Bandomosios medžiagos uždėjimas

24. Taikomi du skirtingi apdorojimo protokolai: vienas – skysčiams ir paviršinio aktyvumo medžiagoms (kietosioms medžiagoms arba skysčiams), kitas – kietosioms ne paviršinio aktyvumo medžiagoms.
25. Skysčiai bandomi neskiesti, o paviršinio aktyvumo medžiagos – naudojant 10 proc. koncentracijos tirpalą (pagal masę), medžiagą ištirpinant 0,9 % natrio chlorido tirpale, distiliuotame vandenyje arba kitame tirpiklyje, kuris, kaip buvo įrodyta, neturi neigiamo poveikio bandymo sistemai. Pusiau kietosios medžiagos, tepalai ir vaškai paprastai bandomi kaip skysčiai. Jeigu naudojama kitokia skiedimo koncentracija, tai turi būti deramai pagrįsta. Ragenos veikiamos skysčiais ir paviršinio aktyvumo medžiagomis 10 minučių. Jeigu taikoma kitokia poveikio trukmė, tai turi būti tinkamai mokslškai pagrįsta.
26. Nepaviršinio aktyvumo medžiagos paprastai bandomos naudojant 20 proc. koncentracijos tirpalus arba suspensijas, pagamintus medžiagą ištirpinus 0,9 % natrio chlorido tirpale, distiliuotame vandenyje arba kitame tirpiklyje, kuris, kaip buvo įrodyta, neturi neigiamo poveikio bandymo sistemai. Tam tikromis aplinkybėmis ir pateikus deramą mokslinį pagrindimą, kietosios medžiagos taip pat gali būti bandomos neatskiestos, jas tiesiogiai uždėdant ant ragenos paviršiaus, taikant atviros kameros metodą (žr. 29 skirsnį). Ragenos veikiamos kietosiomis medžiagomis keturias valandas, tačiau skysčių ir aktyviųjų paviršiaus medžiagų atveju gali būti taikoma kitokia poveikio trukmė, pateikiant tinkamą mokslinį pagrindimą.
27. Atsižvelgiant į bandomosios medžiagos fizikines ir chemines savybes (pvz., ar tai kietoji medžiaga, ar klampus arba neklampus skystis), galima taikyti įvairius apdorojimo būdus. Pagrindinis kriterijus – užtikrinti, kad bandomoji medžiaga tinkamai padengtų epitelio paviršių ir kad ji būtų gerai nuvalyta per plovimo etapus. Neklampiems ir mažai klampiems skysčiams paprastai taikomas uždaro kameros metodas, o pusiau klampioms bei klampioms skystoms bandomosioms medžiagoms ir neatskiestoms kietosioms medžiagoms – atviros kameros metodas.

28. Pagal uždaro kameros metodą bandomosios medžiagos kiekis, kurio pakanka ragenos epitelio paviršiui padengti (750 µL), įdedamas į priekinę kamerą per dozavimo angas, esančias viršutiniame kameros paviršiuje; veikimo laikotarpiui kameros angos uždaromos. Svarbu užtikrinti, kad kiekviena ragena būtų veikiamą bandomąja medžiaga tinkamą laiko tarpą.
29. Pagal atviros kameros metodą prieš apdorojimą iš priekinės kameros išimamas lango užrakto žiedas ir stiklinis langas. Kontrolinė arba bandomoji medžiaga (750 µL arba toks bandomosios medžiagos kiekis, kurio pakaktų visai ragenai padengti) tiesiogiai uždedama ant ragenos epitelio paviršiaus naudojant mikropipetę. Jeigu bandomąją medžiagą sunku įtraukti į pipetę, bandomoji medžiaga gali būti spaudimo būdu įstumiami į stūmoklinę pipetę, naudojamą dozuojant. Stūmoklinės pipetės galas įkišamas į švirkšto dozavimo galiuką taip, kad cheminę medžiagą spaudimo būdu būtų galima įšvirkšti į stūmoklinės pipetės galiuką. Švirkšto stūmoklis stumiamas, tuo pat metu pipetės stūmoklį traukiant į viršų. Jeigu pipetės galiuke atsiranda oro burbuliukų, bandomoji medžiaga pašalinama (išstumiama), ir procedūra kartojama tol, kol galiukas užpildomas be oro burbuliukų. Prireikus gali būti naudojamas įprastas švirkštas (be adatos), kadangi jį naudojant galima tiksliai išmatuoti bandomosios medžiagos kiekį ir lengviau padengti ragenos epitelio paviršių. Baigus dozuoti, stiklinis langas įdedamas atgal į priekinę kamerą, taip vėl atkuriant uždara sistemą.

Inkubacija pasibaigus veikimui medžiaga

30. Pasibaigus veikimo laikotarpiui, bandomoji medžiaga, neigiama kontrolinė medžiaga arba teigiama kontrolinė medžiaga pašalinama iš priekinės kameros, epitelis nuplaunamas ne mažiau kaip tris kartus (arba kol nelieta matomų bandomosios medžiagos žymių) naudojant EMEM (kurios sudėtyje yra raudonojo fenolio). Nuplovimui naudojama terpė, kurios sudėtyje yra raudonojo fenolio, nes taip galima stebėti raudonojo fenolio spalvos pokytį ir nustatyti rūgštinių arba šarminių medžiagų nuplovimo veiksmingumą. Jeigu raudonasis fenolis vis dar praranda spalvą (yra geltonas arba purpurinis) arba jeigu bandomoji medžiaga yra vis dar matoma, ragenos plaunamos daugiau kaip tris kartus. Iš terpės pašalinus bandomąją medžiagą, ragenos paskutinį kartą nuplaunamos naudojant EMEM (be raudonojo fenolio). EMEM (be raudonojo fenolio) paskutiniam plovimui naudojama tam, kad prieš drumsties matavimą raudonasis fenolis tikrai būtų pašalintas iš priekinės kameros. Tada priekinė kamera iš naujo pripildoma nauja EMEM be raudonojo fenolio.
31. Jeigu bandymas atliekamas naudojant skysčius arba paviršinio aktyvumo medžiagas, nuplaautos ragenos dar dvi valandas laikomos 32 ± 1 °C temperatūroje. Tam tikrais atvejais ragenas gali būti naudinga palaikyti ir ilgiau nei dvi valandas po veikimo bandomąja medžiaga; dėl to sprendžiama kiekvienu konkrečiu atveju. Ragenos, kurios buvo veikiamos kietosiomis medžiagomis, pasibaigus keturių valandų veikimo laikotarpiui kruopščiai nuplaunamos, bet papildomai inkubuoti jų nereikia.
32. Pasibaigus inkubacijos laikotarpiui, jeigu bandymai atliekami su skysčiais ir paviršinio aktyvumo medžiagomis, ir pasibaigus keturių valandų veikimo laikotarpiui, jeigu bandymai atliekami su kietosiomis nepaviršinio aktyvumo medžiagomis, registruojamas kiekvienos ragenos padrumstėjimas ir pralaidumas. Be to, kiekviena ragena apžiūrinama vizualiai ir registruojamos susijusios pastabos (pvz., audinio nusilupimas, bandomosios medžiagos likučiai, nevienodas padrumstėjimas). Šios pastabos gali būti svarbios, nes jos gali būti susijusios su drumsties matuoklio rodmenų svyravimais.

Kontrolinės medžiagos

33. Per kiekvieną bandymą kartu naudojamos neigiamos kontrolinės medžiagos arba tirpiklis (nešiklis) bei teigiamos kontrolinės medžiagos.
34. Kai bandoma 100 % grynumo skysta cheminė medžiaga, pagal BCOP bandymo metodą kartu naudojama neigiama kontrolinė medžiaga (pvz., 0,9 % natrio chlorido tirpalas arba distiliuotas vanduo), kad bandymo sistemoje būtų galima aptikti netipinius pokyčius ir gauti pamatinius duomenis, kuriais remiantis būtų galima įvertinti bandymo rezultatus. Be to, taip užtikrinama, kad bandymo sąlygos neturėtų netinkamos įtakos atsakui į dirginimą.
35. Kai bandoma atskiesta skysta, paviršinio aktyvumo arba kietoji cheminė medžiaga, pagal BCOP bandymo metodą tuo pat metu išbandoma tirpiklio (nešiklio) kontrolinė mėginių grupė, kad bandymo sistemoje būtų galima aptikti netipinius pokyčius ir gauti pamatinius duomenis, kuriais remiantis būtų galima įvertinti bandymo rezultatus. Galima naudoti tik tokius tirpiklius (nešiklius), kurie, kaip buvo įrodyta, neturi neigiamos įtakos bandymo sistemai.
36. Norint patikrinti, ar sukeliamas tinkamas atsakas, per kiekvieną bandymą tuo pat metu patikrinama teigiama kontrolinė medžiaga, kuri yra žinoma kaip akis dirginanti medžiaga. Kadangi pagal šį bandymo metodą BCOP bandymas atliekamas siekiant nustatyti esdinančias arba stipriai dirginančias medžiagas, geriausia kaip teigiamą kontrolinę medžiagą naudoti etaloninę cheminę medžiagą (angl. *reference substance*), kuri naudojama pagal šį bandymo metodą sukelia stiprų atsaką. Tačiau norint užtikrinti galimybę įvertinti atsaką į teigiamą kontrolinę medžiagą kaitę per tam tikrą laiką, dirginamasis poveikis neturėtų būti pernelyg stiprus.
37. Pavyzdžiui, bandant skystas medžiagas tinkamos naudoti teigiamos kontrolinės medžiagos yra dimetilformamidas arba 1 % natrio hidroksidas. Bandant kietas medžiagas tinkamos naudoti teigiamos kontrolinės medžiagos pavyzdys yra 20 % (m/t) imidazolis 0,9 % natrio chlorido tirpale.

38. Lyginamosios cheminės medžiagos (angl. *benchmark substances*) yra naudingos norint įvertinti tam tikrai cheminių medžiagų arba produktų kategorijai priskiriamų nežinomų cheminių medžiagų akių dirginimo potencialą arba santykinį akis dirginančios medžiagos dirginimo potencialą tam tikrame atsako į dirginimą intervale.

Išmatuoti rezultatai

39. Padrumstėjimas nustatomas pagal ragenos praleidžiamą šviesos kiekį. Ragenos padrumstėjimas kiekybiškai vertinamas naudojant drumsties matuoklį, kuriuo gaunamos drumsties vertės tolydžioje skalėje.
40. Pralaidumas nustatomas pagal fluoresceino natrio druskos dažiklio kiekį, prasiskverbusį per visus ragenos ląstelių sluoksnius (t. y. nuo išorinio ragenos paviršiaus epitelio per vidinio ragenos paviršiaus endotelį). Į priekinę ragenos laikiklio kamerą, kuri liečiasi su ragenos epitelio paviršiumi, įpilama 1 mL fluoresceino natrio druskos tirpalo (4 arba 5 mg/mL, kai atitinkamai bandomos skystos ir paviršinio aktyvumo medžiagos arba nepaviršinio aktyvumo medžiagos), o į užpakalinę kamerą, kuri liečiasi su ragenos endotelio paviršiumi, pripilama naujos EMEM. Tada laikiklis horizontalioje padėtyje 90 ± 5 min. laikomas 32 ± 1 °C temperatūroje. Naudojant UV/VIS spektrofotometrijos metodiką, išmatuojamas fluoresceino natrio druskos, prasiskverbusios į užpakalinę kamerą, kiekis. Spektrofotometrinio matavimo duomenys, gauti naudojant 490 nm ilgio bangas, registruojami kaip optinio tankio (OD_{490}) arba sugerties vertės, išmatuotos tolydžioje skalėje. Fluoresceino pralaidumo vertės nustatomos kaip OD_{490} vertės, išmatuotos regimosios šviesos spektrofotometru, taikant standartinį 1 cm storio sluoksnį.
41. Arba galima naudoti 96 duobučių mikrotitravimo lėkštelės skaitytuvą, jeigu: i) galima nustatyti lėkštelės skaitytuvo, skirto fluoresceino OD_{490} vertėms nustatyti, tiesinį intervalą ir ii) 96 duobučių plokštelėje, naudojamoje OD_{490} vertėms, atitinkančioms standartinį 1 cm storio sluoksnį, nustatyti, naudojamas tinkamas fluoresceino mėginių kiekis (tam gali reikėti pilnai pripildyti duobutę [įprastas kiekis – 360 µL]).

DUOMENYS IR JŲ TEIKIMAS

Duomenų vertinimas

42. Padrumstėjimo ir vidutinio pralaidumo (OD_{490}) vertės pakoregavus atsižvelgiant į normalios drumsties ir neigiamos kontrolinės medžiagos pralaidumo OD_{490} vertes, kiekvienos apdorotų mėginių grupės vidutinės padrumstėjimo ir pralaidumo OD_{490} vertės turi būti įrašytos į empiriniu būdu gautą formulę, skirtą kiekvienos apdorotų mėginių grupės *in vitro* dirginimo skaitinei vertei (IVIS) apskaičiuoti:

$$IVIS = \text{vidutinė padrumstėjimo vertė} + (15 \times \text{vidutinė pralaidumo } OD_{490} \text{ vertė}).$$

Sina *et al.* (16) nurodė, kad ši formulė buvo gauta atliekant vidaus ir tarplaboratorinius tyrimus. Buvo atlikta duomenų, gautų atlikus 36 junginių serijos tyrimą daugelyje laboratorijų, daugiavariantė analizė, siekiant gauti geriausiai *in vivo* ir *in vitro* duomenis atitinkančią lygtį. Šią analizę atlikę dviejų skirtingų bendrovių mokslininkai gavo beveik tapačias lygtis.

43. Be to, padrumstėjimo ir pralaidumo vertės turėtų būti įvertintos atskirai, siekiant nustatyti, ar bandomoji medžiaga sukėlė ėsdinimą arba stiprų dirginimą vien dėl padrumstėjimo arba vien dėl pralaidumo rezultatų (žr. „Sprendimo kriterijai“).

Sprendimo kriterijai

44. Cheminė medžiaga, kurios IVIS ne mažesnė kaip 55,1, laikoma ėsdinančia arba stipriai dirginančia medžiaga. Kaip nurodyta 1 skirsnyje, jeigu nenustatoma, kad cheminė medžiaga yra akis ėsdinanti arba stipriai dirginanti medžiaga, klasifikavimo ir ženklinimo tikslais turėtų būti atlikti papildomi bandymai. Lyginant su triušio akies *in vivo* bandymo metodo duomenimis, klasifikuojamais pagal EPA (1), ES (2) arba GHS (3) klasifikavimo sistemas, bendras BCOP bandymo metodo tikslumas – nuo 79 % (113/143) iki 81 % (119/147), klaidingai teigiamų rezultatų dalis – nuo 19 % (20/103) iki 21 % (22/103), klaidingai neigiamų rezultatų dalis – nuo 16 % (7/43) iki 25 % (10/40). Iš duomenų bazės pašalinus tam tikrų cheminių (pvz., alkoholių, ketonus) arba fizikinių (pvz., kietąsias medžiagas) kategorijų chemines medžiagas, BCOP bandymo metodo tikslumas pagal ES, EPA ir GHS klasifikavimo sistemas yra nuo 87 % (72/83) iki 92 % (78/85), klaidingai teigiamų rezultatų dalis – nuo 12 % (7/58) iki 16 % (9/56), klaidingai neigiamų rezultatų dalis – nuo 0 % (0/27) iki 12 % (3/26).
45. Net jeigu bandomoji medžiaga nepriskiriama akis ėsdinančių arba stipriai dirginančių medžiagų kategorijai, BCOP bandymų duomenys, naudojami kartu su triušio akies *in vivo* bandymo arba deramai patvirtinto *in vitro* bandymo duomenimis, gali būti naudingi toliau vertinant BCOP bandymų, kuriais siekiama nustatyti silpnai dirginančias ir nedirginančias medžiagas, metodo naudingumą ir apribojimus (šiuo metu rengiamos toksiškumo akims *in vitro* bandymų metodų rekomendacinis dokumentas).

Tyrimo priimtino kriterijai

46. Tyrimas laikomas priimtinu, jeigu naudojant teigiamą kontrolinę medžiagą gauta IVIS neviršija dviejų dabartinio istorinio vidurkio, atnaujinamo ne rečiau kaip kartą per tris mėnesius arba, kai bandymai atliekami nedažnai (t. y. rečiau kaip kartą per mėnesį), kiekvieną kartą laboratorijose atlikus priimtina bandymą, standartinių nuokrypių. Vertinant atsaką į neigiamą kontrolinę medžiagą arba tirpiklį (nešiklį) gautos padrumstėjimo ir pralaidumo vertės neturėtų viršyti nustatytų normalios drumsties ir pralaidumo verčių viršutinių ribų, nustatytų galvijų ragenoms, apdorotoms tinkama neigiama kontroline medžiaga arba tirpikliu (nešikliu).

Bandymo ataskaita

47. Bandymų ataskaitoje turėtų būti pateikta toliau nurodyta informacija, jeigu ji yra svarbi atlikto tyrimo atžvilgiu.

Bandomosios ir kontrolinės medžiagos

Cheminės medžiagos pavadinimas (-ai), pvz., Cheminių medžiagų santrumpų tarnybos (angl. *Chemical Abstracts Service*, CAS) naudojamas struktūrinis pavadinimas ir kiti pavadinimai, jeigu jie žinomi;

CAS registracijos numeris (RN), jeigu jis žinomas;

cheminės medžiagos arba mišinio grynumas ir sudėtis (masės procentinėmis dalimis), kiek tai žinoma remiantis turima informacija;

tyrimui svarbios fizikinės ir cheminės savybės, pvz., fizinis būvis, lakumas, pH, stabilumas, cheminių junginių klasė, tirpumas vandenyje;

bandomosios ir (arba) kontrolinės cheminės medžiagos apdorojimas prieš bandymą, jeigu tai atliekama (pvz., pašildymas, sumalimas);

stabilumas, jeigu jis žinomas.

Informacija apie rėmėją ir bandymų laboratoriją

Rėmėjo pavadinimas ir adresas, bandymų laboratorija ir tyrimo vadovas;

informacija apie akių šaltinį (t. y. vieta, kurioje buvo paimtos akys);

akių laikymo ir gabenimo sąlygos (pvz., akių paėmimo data ir laikas, laikotarpis iki bandymų pradžios, gabenimo terpė ir temperatūra, antibiotikai (jei jie naudoti));

jeigu yra informacijos, specifinės gyvūnų, iš kurių buvo paimtos akys, charakteristikos (pvz., gyvūno, kurio akys buvo paimtos, amžius, lytis, svoris).

*Taikyto bandymo metodo ir protokolo pagrindimas**Bandymo metodo integralumas*

Bandymo metodo integralumo (t. y. tikslumo ir patikimumo) užtikrinimo per tam tikrą laiką procedūra (pvz., periodiniai bandymai su patikros medžiagomis, istorinių duomenų apie neigiamas ir teigiamas kontrolines medžiagas naudojimas).

Bandymo priimtino kriterijai

Priimtini kartu naudojamų teigiamų ir neigiamų kontrolinių grupių verčių intervalai, atsižvelgiant į istorinius duomenis;

jeigu turima, priimtini kartu naudojamų lyginamųjų medžiagų kontrolinės grupės verčių intervalai, atsižvelgiant į istorinius duomenis.

Bandymo sąlygos

Taikytos bandymo sistemos aprašas;

naudoto ragenų laikiklio tipas;

prietaisų, naudotų matuojant padrumstėjimą ir pralaidumą (pvz., drumsties matuoklio ir spektrofotometro), kalibravimo informacija;

informacija apie naudotas galvijų ragenas, įskaitant informaciją apie jų kokybę;

išsami informacija apie taikytą bandymo metodą;

naudota (-os) bandomosios medžiagos koncentracija (-os);

bandymo metodo pakeitimų, jeigu jų buvo padaryta, aprašas;

informacija apie istorinius duomenis, gautus taikant šį modelį (pvz., neigiamos ir teigiamos kontrolinės medžiagos; patikros medžiagos, lyginamosios cheminės medžiagos);

taikytų vertinimo kriterijų aprašas.

Rezultatai

Atskirų mėginių duomenų lentelė (pvz., padrumstėjimo ir OD₄₉₀ vertės, bandomajai medžiagai ir teigiamoms, neigiamoms bei lyginamosioms cheminėms medžiagoms [jeigu jos naudojamos] apskaičiuotos IVIS vertės, pateiktos lentelės pavidalu, jeigu taikytina, kartu pateikiant atliktų pakartotinių bandymų duomenis ir vidutines kiekvieno bandymo rezultatų vertes su standartiniais nuokrypiais);

kitų nustatytų poveikių apibūdinimas.

Aptarimas ir rezultatai

Išvada

LITERATŪRA

- (1) U.S. EPA (1996). Label Review Manual: 2nd Edition. EPA737-B-96-001. Washington, DC: U.S. Environmental Protection Agency.

- (2) 2008 m. gruodžio 16 d. Europos Parlamento ir Tarybos reglamentas (EB) Nr. 1272/2008 dėl cheminių medžiagų ir mišinių klasifikavimo, ženklinimo ir pakavimo, iš dalies keičiantis ir panaikinantis direktyvas 67/548/EEB bei 1999/45/EB ir iš dalies keičiantis Reglamentą (EB) Nr. 1907/2006; OL L 353, 2008 12 31, p. 1.

- (3) UN (2007). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Second revised edition, New York & Geneva: United Nations Publications, 2007. Paskelbta:

[http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev02/02files_e.html]

- (4) ESAC (2007). Statement on the conclusion of the ICCVAM retrospective study on organotypic *in vitro* assays as screening tests to identify potential ocular corrosives and severe eye irritants. Paskelbta:

[<http://ecvam.jrc.it/index.htm>]

- (5) ICCVAM (2007). Test Method Evaluation Report - *In Vitro* Ocular Toxicity Test Methods for Identifying Ocular Severe Irritants and Corrosives. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Centre for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No.: 07-4517. Paskelbta:

[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmter.htm]

- (6) EB (2006). 2006 m. gruodžio 18 d. Europos Parlamento ir Tarybos reglamentas (EB) Nr. 1907/2006 dėl cheminių medžiagų registracijos, įvertinimo, autorizacijos ir apribojimų (REACH), įsteigiantis Europos cheminių medžiagų agentūrą, iš dalies keičiantis Direktyvą 1999/45/EB bei panaikinantis Tarybos reglamentą (EEB) Nr. 793/93, Komisijos reglamentą (EB) Nr. 1488/94, Tarybos direktyvą 76/769/EEB ir Komisijos direktyvas 91/155/EEB, 93/67/EEB, 93/105/EB bei 2000/21/EB; OL L 396, 2006 12 30, p. 1.

- (7) OECD (2002). Test Guideline 405. OECD Guideline for Testing of Chemicals. Acute eye irritation/corrosion. Paskelbta:

[http://www.oecd.org/document/40/0,2340,en_2649_34377_37051368_1_1_1_1,00.html]

- (8) ICCVAM (2007). ICCVAM Recommended BCOP Test Method Protocol. In: ICCVAM Test Method Evaluation Report - *In Vitro* Ocular Toxicity Test Methods for Identifying Ocular Severe Irritants and Corrosives. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Centre for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No.: 07-4517. Paskelbta:
- [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmter.htm]
- (9) ICCVAM. (2006). Current Status of *In Vitro* Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants: Bovine Corneal Opacity and Permeability Test Method. NIH Publication No.: 06-4512. Research Triangle Park: National Toxicology Program. Paskelbta:
- [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_ice.htm]
- (10) INVITTOX (1999). Protocol 124: Bovine Corneal Opacity and Permeability Assay – SOP of Microbiological Associates Ltd. Ispra, Italy: European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM).
- (11) Gautheron, P., Dukic, M., Alix, D. and Sina, J.F. (1992). Bovine corneal opacity and permeability test: An *in vitro* assay of ocular irritancy. *Fundam. Appl. Toxicol.* 18:442-449.
- (12) Siegel, J.D., Rhinehart, E., Jackson, M., Chiarello, L., and the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (2007). Guideline for Isolation Precautions: Preventing Transmission of Infectious Agents in Healthcare Settings. Paskelbta:
- [<http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/pdf>].
- (13) Maurer, J.K., Parker, R.D. and Jester, J.V. (2002). Extent of corneal injury as the mechanistic basis for ocular irritation: key findings and recommendations for the development of alternative assays. *Reg. Tox. Pharmacol.* 36:106-117.
- (14) Doughty, M.J., Petrou, S. and Macmillan, H. (1995). Anatomy and morphology of the cornea of bovine eyes from a slaughterhouse. *Can. J. Zool.* 73:2159-2165.
- (15) Collee, J. and Bradley, R. (1997). BSE: A decade on - Part I. *The Lancet* 349: 636-641.
- (16) Sina, J.F., Galer, D.M., Sussman, R.S., Gautheron, P.D., Sargent, E.V., Leong, B., Shah, P.V., Curren, R.D., and Miller, K. (1995). A collaborative evaluation of seven alternatives to the Draize eye irritation test using pharmaceutical intermediates. *Fundam Appl Toxicol* 26:20-31.
- (17) ICCVAM (2006). Background review document, Current Status of *In Vitro* Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants: Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) Test Method. Paskelbta:
- [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_bcop.htm]
- (18) ICCVAM (2006). Background review document, Current Status of *In Vitro* Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants: Isolated Chicken Eye (ICE) Test Method. Paskelbta:
- [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_bcop.htm]

1 priedėlis

APIBRĖŽTYS

Tikslumas – bandymo metodo rezultatų ir patvirtintų pamatinių verčių sutapimo artumas. Tikslumas yra bandymo metodo naudojimo charakteristikų matas ir vienas iš tinkamumo aspektų. Terminas dažnai vartojamas pakaitomis su terminu „sutapimas“ reikšme „tinkamų bandymo metodo rezultatų dalis“.

Lyginamoji cheminė medžiaga – cheminė medžiaga, naudojama kaip standartas, su kuriuo lyginama bandomoji medžiaga. Lyginamoji cheminė medžiaga turi turėti tokias savybes: i) tinkamą (-us) ir patikimą (-us) šaltinį (-ius); ii) jos struktūrinės ir funkcinės savybės turi būti panašios į bandomųjų medžiagų kategorijos savybes; iii) turi būti žinomos jos fizinės ir cheminės savybės; iv) turi būti duomenų, patvirtinančių žinomą poveikį; v) turi būti žinomas jos stiprumas pageidaujamo poveikio intervalo ribose.

Ragena – permatoma priekinė akies obuolio dalis, dengianti rainelę bei vyzdį ir praleidžianti šviesą į vidų.

Ragenos padrumstėjimas – išmatuota ragenos padrumstėjimo vertė, gauta rageną baigus veikti bandomąja medžiaga. Padidėjusi ragenos drumstis rodo ragenos pažeidimą. Padrumstėjimą galima vertinti subjektyviai, kaip tai daroma per Draize'o triušio akies bandymą, arba objektyviai, naudojant prietaisą, pvz., drumsties matuoklį.

Ragenos pralaidumas – kiekybinis ragenos epitelio pažeidimo įvertinimas nustatant fluoresceino natrio druskos dažiklio kiekį, prasiskverbiantį per visus ragenos ląstelių sluoksnius.

EPA 1 kategorija – ėsdinimas (negrįžtamas akies audinio suardymas) arba ragenos pakenkimas arba dirginimas, trunkantis ilgiau kaip 21 dieną (1).

ES R41 kategorija – akies audinio pažeidimas arba smarkus fizinis regėjimo pablogėjimas po to, kai ant išorinio akies paviršiaus buvo uždėta bandomosios medžiagos, iki galo nepraeinantis per 21 dieną nuo uždėjimo.

Klaidingai neigiamų rezultatų dalis – visų teigiamų medžiagų, kurios taikant bandymo metodą buvo klaidingai identifikuotos kaip neigiamos, dalis. Tai yra vienas iš bandymo metodo naudojimo charakteristikų rodiklių.

Klaidingai teigiamų rezultatų dalis – visų neigiamų medžiagų, kurios taikant bandymo metodą buvo klaidingai identifikuotos kaip teigiamos, dalis. Tai yra vienas iš bandymo metodo naudojimo charakteristikų rodiklių.

GHS (Visuotinai suderinta cheminių medžiagų klasifikavimo ir ženklavimo sistema) – sistema, kurioje pateikiama cheminių medžiagų (medžiagų ir mišinių) klasifikacija pagal standartizuotus fizikinių pavojų, pavojų sveikatai bei aplinkai tipus ir nagrinėjami atitinkami informaciniai elementai, pvz., piktogramos, signaliniai žodžiai, pavojingumo frazės, atsargumo frazės ir saugos duomenų lapai, kad būtų galima informuoti apie medžiagų neigiamą poveikį, siekiant apsaugoti žmones (įskaitant darbuotojus, darbininkus, vežėjus, vartotojus ir avarių likvidatorius) ir aplinką (3).

GHS 1 kategorija – akies audinio pažeidimas arba smarkus fizinis regėjimo pablogėjimas po to, kai ant išorinio akies paviršiaus buvo uždėta bandomosios medžiagos, iki galo nepraeinantis per 21 dieną nuo uždėjimo (3).

Pavojus – medžiagos savybė arba aplinkybės, dėl kurių organizmui, sistemai arba populiacijai (arba jos daliai), kurią veikia toji medžiaga, gali būti padarytas kenksmingas poveikis.

In vitro dirginimo skaitinė vertė (IVIS) – empiriniu būdu gauta formulė, naudojama atliekant BCOP bandymą, kai kiekvienos bandomųjų mėginių grupės vidutinės padrumstėjimo ir pralaidumo vertės susumuojamos, kad būtų apskaičiuota kiekvienos bandomųjų mėginių grupės bendra *in vitro* skaitinė vertė. $IVIS = \text{vidutinė padrumstėjimo vertė} + (15 \times \text{vidutinė pralaidumo vertė})$.

Neigiamas kontrolinis mėginys – bandomąja medžiaga neapdorota mėginio kopija, turinti visas sudedamąsias bandymo sistemos dalis. Šis mėginys tiriamas kartu su bandomąja medžiaga apdorotais mėginiais ir kitais kontroliniais mėginiais, siekiant nustatyti, ar tirpiklis veikia bandymo sistemą.

Nedirginančios medžiagos – cheminės medžiagos, nepriskiriamos EPA I, II arba III kategorijos, ES R41 arba R36 kategorijos arba GHS 1, 2A arba 2B kategorijos akis dirginančioms medžiagoms.

Akis ėsdinanti medžiaga – a) cheminė medžiaga, negrįžtamai suardanti akies audinį; b) cheminės medžiagos, priskiriamos GHS 1 kategorijos, EPA I kategorijos arba ES R41 kategorijos akis dirginančioms medžiagoms (1) (2) (3).

Akis dirginanti medžiaga – a) cheminė medžiaga, kuri, uždėta ant priekinio akies paviršiaus, sukelia grįžtamus akies pažeidimus; b) cheminės medžiagos, priskiriamos EPA II arba III kategorijos, ES R36 kategorijos arba GHS 2A arba 2B kategorijos akis dirginančioms medžiagoms (1) (2) (3).

Akis stipriai dirginanti medžiaga – a) cheminė medžiaga, kuri, uždėta ant priekinio akies paviršiaus, sukelia akies audinio pažeidimus, nepraeinančius per 21 dieną nuo tos medžiagos uždėjimo, arba sukelia didelį fizinį regos pablogėjimą; b) cheminės medžiagos, priskiriamos GHS 1 kategorijos, EPA I kategorijos arba ES R41 kategorijos akis dirginančioms medžiagoms (1) (2) (3).

Drumsties matuoklis – prietaisas, naudojamas ragenos padrumstėjimui išmatuoti kiekybiškai įvertinant šviesos prasiskverbimą per rageną. Paprastai šis prietaisas yra sudarytas iš dviejų skyrių, iš kurių kiekvienas turi savo šviesos šaltinį ir fotoelementą. Vienas skyrius skirtas apdorotai ragenai, kitas – prietaisui kalibruoti ir prietaiso nulinei padėčiai nustatyti. Halogeninės lempos šviesa perduodama per kontrolinį skyrių (tuščią kamerą be langų ar skysčių) į fotoelementą ir lyginama su šviesa, perduota į fotoelementą per bandymo skyrių, kuriame yra kamera su rageną. Palyginamas iš fotoelementų perduoto šviesos kiekio skirtumas ir skaitmeniniame ekrane parodoma skaitinė drumsties vertė.

Teigiamas kontrolinis mėginys – mėginio kopija, turinti visas sudedamąsias bandymo sistemos dalis ir apdorota chemine medžiaga, kuri, kaip yra žinoma, sukelia teigiamą atsaką. Norint užtikrinti galimybę įvertinti atsaką į teigiamą kontrolinę medžiagą kaitą per tam tikrą laiką, dirginamasis poveikis neturėtų būti pernelyg stiprus.

Patikimumas – bandymo metodo, taikomo pagal tą patį protokolą, atkuriamumo toje pačioje laboratorijoje ir kitose laboratorijose matas. Patikimumas įvertinamas apskaičiuojant atkuriamumą laboratorijoje ir tarp laboratorijų ir pakartojamumą laboratorijoje.

Tirpiklio (nešiklio) kontrolinis mėginys – neapdorotas mėginys, turintis visas sudedamąsias bandymo sistemos dalis, įskaitant tirpiklį (nešiklį), kuris tiriamas kartu su bandomąja medžiaga apdorotais mėginiais ir kitais kontroliniais mėginiais, siekiant nustatyti pamatinį mėginių, apdorotų tuo pačiu tirpikliu (nešikliu), atsaką. Atliekant bandymą kartu su neigiamu kontroliniu mėginiu, šis mėginys taip pat parodo, ar tirpiklis (nešiklis) veikia bandymo sistemą.

Pakopiniai bandymai – nuosekli bandymo metodika, pagal kurią tam tikra eilės tvarka nagrinėjama visa turima informacija apie bandomąją medžiagą, kiekvienoje pakopoje taikant įrodomosios duomenų galios metodiką siekiant nustatyti, ar yra pakankamai duomenų sprendimui dėl pavojingumo kategorijos priimti, prieš pereinant prie kitos pakopos. Jeigu bandomosios medžiagos gebą dirginti akis galima nustatyti remiantis turima informacija, papildomų bandymų atlikti nereikia. Jeigu bandomosios medžiagos dirginamosios gebos nustatyti remiantis turima informacija negalima, taikoma nuosekli gyvūnų bandymo metodika, kol gaunami duomenys, kuriais remiantis galima aiškiai nustatyti tos medžiagos kategoriją.

Patvirtintas bandymo metodas – bandymo metodas, kurio patvirtinimo tyrimai buvo atlikti siekiant nustatyti jo tinkamumą (įskaitant tikslumą) ir patikimumą konkrečiai paskirčiai. Svarbu atkreipti dėmesį, kad patvirtintas bandymo metodas gali būti nepakankamai tikslus ir patikimas, kad jį būtų galima pripažinti tinkamu siūlomai paskirčiai.

Įrodomoji duomenų galia – metodika, pagal kurią vertinamos tam tikrų informacijos dalių privalumai ir trūkumai, siekiant priimti ir pagrįsti sprendimą dėl cheminės medžiagos pavojingumo.

2 priedėlis

Patikros medžiagos BCOP bandymo atveju

Prieš pradėdamos sistemingai taikyti bandymo metodą, susijusį su šiuo bandymo metodu, laboratorijos gali pageidauti įsitikinti savo techniniu tinkamumu šiam bandymui atlikti. Tokiu tikslu jos pamėgina teisingai nustatyti dešimties 1 lentelėje siūlomų cheminių medžiagų akių ėsdinimo kategoriją. Šios cheminės medžiagos parinktos atsižvelgiant į įvairių vietinio akies dirginimo ir (arba) ėsdinimo atsaką, pagrįstą triušio akies *in vivo* bandymo rezultatais (TG 405) (t. y. JT GHS 1, 2A, 2B kategorijos arba „Neklasifikuojama ir neženklinama“) (3) (7). Tačiau, atsižvelgiant į patvirtintą šių bandymų naudingumą (t. y. tik nustatyti akis ėsdinančias ir (arba) stipriai dirginančias medžiagas), klasifikavimui aktualūs rezultatai, susiję su tinkamumo patikrinimu, yra tik du (ėsdinanti ir (arba) stipriai dirginanti arba neėsdinanti ir (arba) stipriai nedirginanti medžiaga). Kiti atrankos kriterijai yra šie: cheminės medžiagos turi būti parduodamos rinkoje, turi būti kokybiškų *in vivo* pamatinių duomenų ir turi būti kokybiškų duomenų apie abu *in vitro* metodus, apie kuriuos yra rengiamos bandymų gairės. Dėl šios priežasties dirginančios cheminės medžiagos buvo atrinktos iš ICCVAM rekomenduojamų 122 etaloninių cheminių medžiagų, skirtų *in vitro* toksiškumo akims bandymo metodams patvirtinti, sąrašo (žr. H priedėlį: ICCVAM rekomenduojamos etaloninės cheminės medžiagos) (5). Pamatiniai duomenys pateikti ICCVAM istorinės apžvalgos dokumentuose, skirtuose BCOP ir izoliuotos vištos akies (angl. *Isolated Chicken Eye*, ICE) bandymo metodams (17) (18).

1 lentelė

BCOP bandymo atveju rekomenduojamos techninės patikros cheminės medžiagos

Cheminė medžiaga	CASNR	Cheminės medžiagos klasė ⁽¹⁾	Fizinis būvis	<i>In vivo</i> kategorija ⁽²⁾	<i>In vitro</i> kategorija ⁽³⁾
Benzalkonio chloridas (5 %)	8001-54-5	Onio junginys	Skysta	1 kategorija	Ėsdinanti ir (arba) stipriai dirginanti
Chlorheksidinas	55-56-1	Aminas, amidinas	Kieta	1 kategorija	Ėsdinanti ir (arba) stipriai dirginanti
Dibenzoil-L-vyno rūgštis	2743-38-6	Karboksirūgšties esteris	Kieta	1 kategorija	Ėsdinanti ir (arba) stipriai dirginanti
Imidazolas	288-32-4	Heterociklinis junginys	Kieta	1 kategorija	Ėsdinanti ir (arba) stipriai dirginanti
Trichloracto rūgštis (30 %)	76-03-9	Karboksirūgštis	Skysta	1 kategorija	Ėsdinanti ir (arba) stipriai dirginanti
2,6-dibenzoilchloridas	4659-45-4	Acilhalogenidas	Skysta	2A kategorija	Neėsdinanti ir (arba) stipriai nedirginanti
Etil-2-metil acetoacetatas	609-14-3	Ketonas, esteris	Skysta	2B kategorija	Neėsdinanti ir (arba) stipriai nedirginanti
Amonio nitratas	6484-52-2	Neorganinė druska	Kieta	2A kategorija	Neėsdinanti ir (arba) stipriai nedirginanti
Glicerinas	56-81-5	Alkoholis	Skysta	Neženklina-ma	Neėsdinanti ir (arba) stipriai nedirginanti
n-heksanas	110-54-3	Angliavandenilis (aciklinis)	Skysta	Neženklina-ma	Neėsdinanti ir (arba) stipriai nedirginanti

Santrumpos: CASRN – Cheminių medžiagų pavadinimų santrumpų tarnybos registracijos numeris.

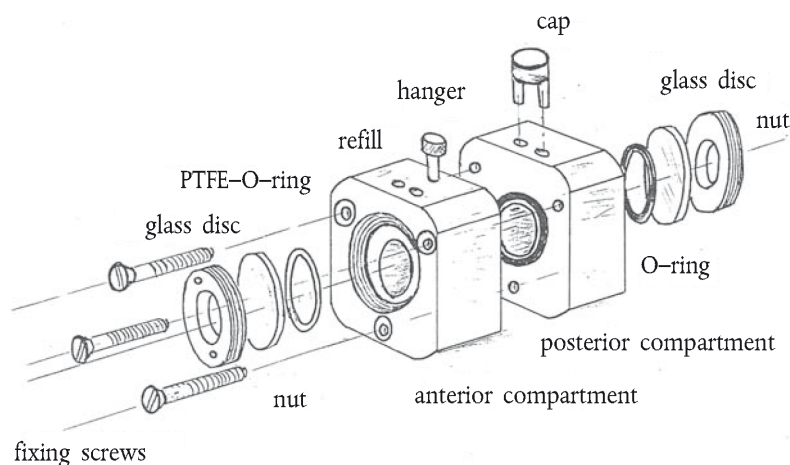
⁽¹⁾ Cheminės medžiagos klasės kiekvienai bandomajai medžiagai priskirtos taikant standartinę klasifikavimo sistemą, remiantis Nacionalinės medicinos bibliotekos medicinos objektų pavadinimų (MeSH) klasifikavimo sistema (paskelbta <http://www.nlm.nih.gov/mesh>).⁽²⁾ Remiantis rezultatais, gautais atlikus triušio akies *in vivo* bandymą (OECD TG 405), ir taikant JT GHS (3)(7).⁽³⁾ Remiantis BCOP ir ICE rezultatais.

3 priedėlis

BCOP BANDYMU NAUDOJAMAS RAGENOS LAIKIKLIS

1. BCOP ragenų laikikliai gaminami iš inertinės medžiagos (pvz., polipropileno). Laikikliai yra sudaryti iš dviejų dalių (priekinės ir užpakalinės kameros) ir turi dvi panašias cilindro pavidalo vidines kameras. Kiekvienos kameros talpa yra 5 ml, jų galuose yra stikliniai langai, per kuriuos registruojamos padrumstėjimo matavimų vertės. Kiekviena vidinė kamera yra 1,7 cm skersmens ir 2,2 cm gylio ⁽¹⁾. Kad būtų išvengta nutekėjimo, ant užpakalinės kameros uždedamas apvalus žiedas. Ragenos endoteliumui apačiai padedamos ant apvalaus užpakalinių kameros žiedo, o priekinės kameros padedamos ant ragenų epitelio. Kameros įtvirtinamos trimis nerūdijančiais varžtais, esančiais ties išoriniais kameros kraštais. Kiekvienos kameros gale yra stiklinis langas, kurį galima išimti, kad būtų patogiau pasiekti rageną. Kad būtų išvengta nutekėjimo, tarp stiklinio lango ir kameros taip pat įdedamas apvalus žiedas. Kiekvienos kameros viršuje yra dvi angos, per kurias įpilama bei pašalinama terpė ir bandomieji junginiai. Apdorojimo ir inkubacijos laikotarpiu jos uždaromos guminiiais dangteliais.

⁽¹⁾ Pateikti matmenys yra pagrįsti ragenos laikikliu, naudojamu 12–60 mėnesių karvėms. Jeigu naudojami 6–12 mėnesių gyvūnai, laikiklis turėtų būti pagamintas taip, kad kiekvienos kameros talpa būtų 4 ml, o kiekvienos vidinės kameros skersmuo – 1,5 cm, gylis – 2,2 cm. Projektuojant naujus ragenų laikiklius, labai svarbu užtikrinti, kad priekinėje kameroje veikiamo ragenos paviršiaus ploto ir užpakalinės kameros talpos santykis būtų toks pat, kaip įprastam ragenų laikikliui apskaičiuotas santykis. Tai yra būtina tam, kad būtų teisingai nustatytos pralaidumo vertės, nustatomos IVIS skaičiavimams pagal siūlomą formulę.



Žodynėlis:

Glass disc: stiklinis diskas

PTFE-O-ring: PTFE apvalus žiedas

Refill: pripildymo anga

Hanger: laikiklis

Cap: dangtelis

Nut: veržlė

O-ring: apvalus žiedas

Posterior compartment: galinis skyrius

Anterior compartment: priekinis skyrius

Fixing screws: fiksuojamieji varžtai

DRUMSTIES MATUOKLIS

- Drumsties matuoklis yra šviesos skvarbos matavimo prietaisas. Halogeninės lempos šviesa perduodama per kontrolinį skyrių (tuščią kamerą be langų ar skysčių) į fotoelementą ir lyginama su šviesa, į fotoelementą perduota per bandymo skyrių, kuriame yra kamera su rageną. Palyginamas iš fotoelementų perduoto šviesos kiekio skirtumas ir skaitmeniniame ekrane parodoma skaitinė drumsties vertė. Nustatomi drumsties vienetai.
- Drumsties matuokliu turi būti gaunamas tiesinis atsakas tam tikrame drumsties rodmenų intervale, apimančiame ribas, taikomas pagal įvairius klasifikatorius, aprašytus pagal prognozavimo modelį (t. y. iki ribos, susijusios su ėsdinimu ir (arba) stipriu dirginimu). Norint užtikrinti tikslius tiesinius rodmenis iki 75–80 drumsties vienetų, būtina sukalibruoti drumsties matuoklį naudojant įvairius kalibratorius. Kalibratoriai (neskaidrūs poliesterio lapai) įdedami į kalibravimo kamerą (ragenos kamerą, pritaikytą kalibravimo priemonėms laikyti) ir registruojami drumsties matuoklio rodmenys. Kalibravimo kamerą pritaikoma laikyti kalibratorius tarp šviesos šaltinio ir fotoelemento daugmaž tokiu atstumu, koku įdedamos ragenos atliekant padrumstėjimo matavimus. Pirmiausia drumsties matuoklis sukalibruojamas iki 0 drumsties vienetų, naudojant kalibravimo kamerą be kalibratoriaus. Tada vienas po kito į kalibravimo kamerą dedami trys kalibratoriai ir matuojama drumstis. Naudojant kalibratorius Nr. 1, 2 ir 3 turėtų būti gauti drumsties rodmenys, atitinkantys nustatytas tų kalibratorių vertes – atitinkamai 75, 150 ir 225 drumsties vienetus su 5 proc. paklaida.

B.48. IZOLIUOTOS VIŠTOS AKIES BANDYMO METODAS AKIS ĖSDINANČIOMS IR STIPRIAİ DIRGINANČIOMS MEDŽIAGOMS NUSTATYTI**ĮVADAS**

1. Izoliuotos vištos akies (angl. *Isolated Chicken Eye*, ICE) bandymo metodas yra *in vitro* bandymo metodas, kurį tam tikromis aplinkybėmis ir su tam tikrais apribojimais galima taikyti siekiant chemines medžiagas ir mišinius suklasifikuoti kaip akis ėsdinančias ir stipriai dirginančias medžiagas (1) (2) (3). Šiose bandymų gairėse stipriai dirginančios medžiagos apibrėžiamos kaip medžiagos, sukeliančios akių pažeidimus, kurie triušiui nepraeina per 21 dieną po paveikimo ta medžiaga. Nors šis bandymo metodas nėra laikomas tinkamu visiškai pakeisti triušio akies *in vivo* bandymą, ICE bandymo metodą rekomenduojama taikyti kaip vieną iš pakopinės bandymo strategijos, taikomos reguliavimo tikslais klasifikuojant ir ženklinant tam tikroje srityje naudojamas medžiagas, sudedamųjų dalių (4) (5). Bandomąsias medžiagas ir mišinius (6), kurie, atliekant šį bandymą, priskiriami teigiamų medžiagų kategorijai, galima klasifikuoti kaip akis ėsdinančias arba stipriai dirginančias medžiagas neatliekant papildomų bandymų su triušiais. Cheminė medžiaga, kurios bandymo rezultatai neigiami, turėtų būti išbandyta su triušiais, taikant nuosekliąją bandymo metodiką, aprašytą OECD bandymų gairėse Nr. 405 (7) (šio priedo B.5 skyrius).
2. Šio bandymo metodo paskirtis – aprašyti procedūras, taikomas vertinant, ar bandomoji medžiaga gali sukelti ėdinimą arba stiprų dirginimą, sprendžiant pagal jos gebėjimą sukelti toksinį poveikį išimtai vištos akiai. Toksinis poveikis ragenai matuojamas šiais būdais: i) kokybiškai vertinant padrumstėjimą, ii) kokybiškai vertinant epitelio pažeidimus ant akies uždėjus fluoresceino (fluoresceino sulaikymas), iii) kiekybiškai matuojant storio padidėjimą (pabrinkimą) ir iv) kokybiškai vertinant makroskopinius morfologinius paviršiaus pažeidimus. Ragenos padrumstėjimo, pabrinkimo ir pažeidimų vertinimas baigus veikti bandomąja medžiaga atliekamas atskirai ir tada susumuojamas siekiant nustatyti akies dirginimo kategorijas.
3. Akis dirginančios medžiagos, sukeliančios akių pažeidimus, kurie praeina mažiau kaip per 21 dieną, ir akių nedirginančios medžiagos taip pat buvo išbandytos taikant ICE bandymo metodą. Tačiau ICE bandymo metodo tikslumas ir patikimumas bandant šių kategorijų chemines medžiagas nėra oficialiai įvertintas.
4. Apibrėžtyje pateiktos 1 priedėlyje.

PRADINIAI SVARSTYMAI IR APRIBOJIMAI

5. Šis bandymo metodas pagrįstas Alternatyvių metodų patvirtinimo tarpžinybinio koordinavimo komiteto (ICCVAM) ICE bandymo metodo protokolu (8), parengtu atlikus tarptautinį patvirtinimo tyrimą (4) (5) (9), padedant Europos alternatyvių metodų patvirtinimo centrui, Japonijos alternatyvių metodų patvirtinimo centrui ir TNO Gyvenimo kokybės – Toksikologijos ir taikomosios farmakologijos departamentui (Nyderlandai). Protokolas pagrįstas informacija, gauta iš paskelbtų protokolų ir iš TNO dabar taikomo protokolo (10) (11) (12) (13) (14).
6. Nustatyti šio metodo apribojimai pagrįsti klaidingai teigiamų rezultatų dalimi alkoholių atveju ir klaidingai neigiamų rezultatų dalimis kietųjų medžiagų ir paviršinio aktyvumo medžiagų atveju (žr. 47 skirsnį) (4). Iš duomenų bazės pašalinus šių cheminių ir fizikinių kategorijų chemines medžiagas, ICE bandymo metodo tikslumas pagal ES, EPA ir GHS klasifikavimo sistemas iš esmės pagerėjo (4). Remiantis šių bandymų tikslu (t. y. tikslai nustatyti akis ėsdinančias ir (arba) stipriai dirginančias medžiagas), klaidingi neigiami rezultatai neturi lemiamos reikšmės, nes šios cheminės medžiagos vėliau bus išbandytos su triušiais arba taikant kitus deramai patvirtintus *in vitro* bandymus, atsižvelgiant į reguliavimo reikalavimus ir taikant nuosekliąją bandymo metodiką pagal įrodomosios duomenų galios metodą. Be to, naudojant dabartinę patvirtinimo duomenų bazę negalima deramai įvertinti tam tikrų klasių cheminių medžiagų arba produktų (pvz., mišinių). Tačiau tyrėjai galėtų apvarstyti šio bandymo metodo taikymo visų tipų cheminėms medžiagoms (įskaitant mišinius) galimybes, kai teigiamas rezultatas galėtų būti priimtas kaip orientacinis akių ėdinimo arba stipraus dirginimo atsakas. Tačiau teigiami rezultatai, gauti bandant alkoholius, turėtų būti aiškinami atsargiai, vengiant nepagrįstų prognozių.
7. Visos procedūros su vištų akimis turėtų būti atliekamos pagal bandymų laboratorijos taikytinas žmogaus arba gyvūninės kilmės medžiagų, įskaitant audinius ir audinių skysčius, bet neapsiribojant tik jais, tvarkymo taisykles ir procedūras. Rekomenduojama laikytis bendrųjų laboratorijose taikytinų atsargumo priemonių (15).
8. Šio bandymo metodo apribojimas yra tas, kad, nors pagal jį ir atsižvelgiama į tam tikrą poveikį akims, vertinama pagal triušio akių dirginimo bandymo metodą, ir iš dalies į to poveikio lygį, pagal šį metodą neatsižvelgiama į akies junginės ir raištelės pažeidimus. Be to, nors pagal ICE bandymo metodą ir negalima įvertinti ragenos pažeidimų grįžtamumo *per se*, remiantis triušio akių tyrimais pasiūlyta naudoti pradinį ragenos pažeidimų gylio vertinimą, siekiant atskirti, ar poveikis negrįžtamas, ar grįžtamas (16). Galiausiai pagal ICE bandymo metodą negalima įvertinti galimo sisteminio toksiškumo, susijusio su poveikiu akims.
9. Toliau dedamos pastangos siekiant geriau apibūdinti ICE bandymo metodo naudingumą ir apribojimus, siekiant nustatyti silpnai dirginančias ir nedirginančias medžiagas (taip pat žr. 48 skirsnį). Be to, naudotojai kviečiami teikti patvirtinimo organizacijoms pavyzdžius ir (arba) duomenis, kuriais remiantis būtų galima oficialiai įvertinti galimą būsimą ICE bandymo metodo paskirtį, įskaitant silpnai dirginančių akis medžiagų ir nedirginančių medžiagų nustatymą.

10. Kiekviena laboratorija, pradėdanti taikyti šį bandymo metodą, turėtų naudoti 2 priedėlyje nurodytas patikros chemines medžiagas. Laboratorija gali naudoti šias chemines medžiagas norėdama įrodyti savo techninę kompetenciją taikyti ICE bandymo metodą, prieš pateikdama ICE bandymų duomenis teisės aktuose numatytais pavojų klasifikavimo tikslais.

BANDYMO PRINCIPAS

11. ICE bandymo metodas yra tipinis konkretaus organo tyrimo modelis, pagal kurį galima išsaugoti trumpalaikį vištos akies funkcionavimą *in vitro*. Pagal šį bandymo metodą bandomosios medžiagos padarytas pažeidimas nustatomas įvertinant ragenos pabrėkimą, padrumstėjimą ir fluoresceino sulaikymą. Pirmieji du parametrai vertinami kokybiškai, o ragenos pabrėžimas – kiekybiškai. Kiekvieno matavimo rezultatai paverčiami skaitine verte, kuri naudojama bendram dirginimo indeksui apskaičiuoti, arba priskiriami tam tikrai kokybinei kategorijai, kuri naudojama *in vitro* akies išdinimo ir stipraus dirginimo kategorijai nustatyti. Tada kiekvieną iš šių rezultatų galima naudoti prognozuoti bandomosios medžiagos gebą išdinti arba stipriai dirginti akis *in vivo* (žr. „Sprendimo kriterijai“).

Vištų akių šaltinis ir amžius

12. Paprastai šiam bandymui būdavo naudojamos vištų akys, paimtos skerdykloje, kurioje vištos būdavo paskerdžiamos vartoti žmonėms, taip pašalinant poreikį naudoti laboratorinius gyvūnus. Naudojamos tik sveikų gyvūnų, kurie laikomi tinkamais naudoti žmonių maisto grandinėje, akys.
13. Nors kontroliuojamas tyrimas, kuriuo būtų siekiama įvertinti tinkamiausią vištų amžių, nebuvo atliktas, pagal šį bandymo metodą anksčiau būdavo naudojamos tokio amžiaus ir svorio vištos, kokio paprastai būna pavasariniai viščiukai, apdorojami paukščių skerdykloje (t. y. apie 7 savaičių amžiaus, 1,5–2,5 kg svorio).

Akių paėmimas ir gabenimas į laboratoriją

14. Galvos turėtų būti nuimtos iš karto po to, kai viščiukai numarinami, paprastai elektrošoku, ir įpjauant kaklą, kad nubėgtų kraujas. Turėtų būti rastas netoli laboratorijos esantis vietinis vištų šaltinis, kad galvas būtų galima nuvežti iš skerdyklos į laboratoriją pakankamai greitai, taip užtikrinant, kad jų pažeidimo ir (arba) užteršimo bakterijomis tikimybė būtų kuo mažesnė. Laikotarpis nuo vištų galvų surinkimo iki akių panaudojimo per ICE bandymą turėtų būti kuo mažesnis (paprastai iki dviejų valandų), ir turi būti įrodyta, kad šis laikotarpis neturės neigiamos įtakos bandymo rezultatams. Šie rezultatai grindžiami akių atrankos kriterijais ir atsaku į teigiamų ir neigiamų kontrolinių medžiagų poveikį. Visos akys, naudojamos atliekant bandymą, turėtų būti iš to paties tam tikrą dieną surinkto akių rinkinio.
15. Kadangi akys išpjauamos laboratorijoje, iš skerdyklos vežamos sveikos galvos laikomos aplinkos temperatūroje, plastikinėse dėžėse, drėkinamose izotoniniu druskos tirpalu sudrėkintomis audinio skiautėmis.

ICE bandymui skirtų akių atrankos kriterijai

16. Išimtos akys, kurių pamatinės nusidažymo fluoresceinu arba ragenos padrumstėjimo vertės yra didelės (t. y. didesnės kaip 0,5), išmetamos.
17. Kiekviena apdorojamų mėginių grupė ir kartu naudojama kontrolinė mėginių grupė sudaroma ne mažiau kaip iš trijų akių. Neigiama kontrolinė grupė ir tirpiklio (nešiklio) kontrolinė grupė (jeigu naudojamas tirpiklis nėra druskos tirpalas) sudaroma bent iš vienos akies.

EIGA

Akių paruošimas

18. Atsargiai, nepažeidžiant ragenos, išpjaujami akių vokai. Ragenos sveikumas greitai įvertinamas ant ragenos paviršiaus kelioms sekundėms užlašinus 2 % (m/t) fluoresceino natrio druskos tirpalo lašą ir jį nuplovus izotoniniu druskos tirpalu. Tada fluoresceinu apdorotos akys apžiūrimos naudojant mikroskopą su plyšine lempa, siekiant įsitikinti, kad ragena yra nepažeista (t. y. kad fluoresceino sulaikymo ir ragenos padrumstėjimo vertės yra ne didesnės kaip 0,5).
19. Jeigu ragena nepažeista, akis išpjauinama iš kaukolės, nepažeidžiant ragenos. Akies obuolys ištraukiamas iš akiduobės tvirtai suimant mirksimąją membraną chirurginėmis žnyplėmis, tada lenktomis, bukais galais žirkėmis nupjaujami akies raumenys. Svarbu pernelyg nespauti ragenos (pvz., spaudžiamaisiais įrankiais), kad ji nebūtų pažeista.
20. Akį išėmus iš akiduobės, matoma regos nervo dalis turėtų būti palikta. Iš akiduobės išimta akis padedama ant sugeriamojo audinio, tada nupjauinama mirksimoji membrana ir kiti jungiamieji audiniai.

21. Išimta akis įtvirtinama nerūdijančio plieno dėkle taip, kad ragena būtų pasukta vertikaliai. Tada dėklas perkeliamas į superfuzijos aparato kamerą (16). Dėklai superfuzijos aparate padedami taip, kad lašantis izotoninio druskos tirpalas patektų ant visos ragenos. Superfuzijos aparato kameroje turėtų būti palaikoma $32 \pm 1,5$ °C temperatūra. 3 priedėlyje pateikta superfuzijos aparato ir akių dėklų, kuriuos galima nusipirkti arba pasigaminti, schema. Aparato konstrukcija gali būti pakeista atsižvelgiant į konkrečios laboratorijos poreikius (pvz., norint sudaryti galimybę įdėti kitokių akių skaičių).
22. Akis įdėjus į superfuzijos aparatą, jos dar kartą apžiūrimos per plyšinį mikroskopą, siekiant įsitikinti, ar jos nebuvo pažeistos per išpjovimo procedūrą. Kartu turi būti išmatuotas ragenos storis ties ragenos viršūne, naudojant gylio matavimo prietaisą, įrengtą mikroskope su plyšine lempa. Akys, kurių i) fluoresceino sulaikymo skaitinė vertė didesnė kaip 0,5, ii) ragenų drumstis didesnė kaip 0,5 arba kurios iii) turi kitokių pažeidimo požymių, turėtų būti pakeistos. Iš akių, kurios nebuvo atvestos pagal kurį nors iš šių kriterijų, grupės turi būti atvestos tos akys, kurių ragenos storio nuokrypis nuo visų akių vidurkio didesnis kaip 10 %. Naudotojai turėtų žinoti, kad naudojant mikroskopus su plyšine lempa gauti ragenų storio duomenys gali skirtis, jeigu bus pasirinktos nevienodos plyšio pločio nuostatos. Turėtų būti nustatytas 0,095 mm pločio plyšys.
23. Apžiūrėjus akis ir įsitikinus jų tinkamumą, jos daugmaž 45–60 minučių laikomos inkubacinėmis sąlygomis, kad iki dozavimo jų temperatūra susilygintų su bandymo sistemos temperatūra. Pasibaigus temperatūros nusistovėjimo laikotarpiui, registruojamos ragenos storio ir drumsties nulinės atskaitos vertės, kurios bus naudojamos kaip pamatinės (t. y. laikas = 0). Kaip pamatinė vertė naudojama fluoresceino skaitinė vertė išpjovimo metu.

Bandomosios medžiagos uždėjimas

24. Iš karto po to, kai užrašomi nulinės atskaitos matavimai, akis (su dėklu) išimama iš superfuzijos aparato, padedama horizontaliai ir ant ragenos uždedama bandomosios medžiagos.
25. Skystos bandomosios medžiagos paprastai bandomos grynos, tačiau prireikus (t. y. pagal tam tikrą tyrimo plano dalį) jas galima atskiesti. Pageidautina, kad cheminėms medžiagoms skiesti būtų naudojamas fiziologinis tirpalas. Kontroluojamomis sąlygomis gali būti naudojami ir kiti tirpikliai, tačiau būtina įrodyti tirpiklio, kuris nėra fiziologinis tirpalas, tinkamumą.
26. Skystos bandomosios medžiagos ant ragenos užlašinamos taip, kad visas ragenos paviršius būtų tolygiai padengtas bandomąja medžiaga; standartinis kiekis yra 0,03 ml.
27. Jeigu įmanoma, kietosios medžiagos turėtų būti kuo smulkiau sutrinamos grūstuvėje su piesta arba panašioje smulkinimo priemonėje. Milteliai ant ragenos beriami taip, kad jos paviršius būtų tolygiai padengtas bandomąja medžiaga; standartinis kiekis yra 0,03 g.
28. Bandomoji medžiaga (skysta arba kietą) uždėta palaikoma 10 sekundžių, tada nuplaunama nuo akies aplinkos temperatūros izotoniniu druskos tirpalu (naudojant apie 20 ml tirpalo). Tada akis (įdėta į laikiklį) vėl įdedama į superfuzijos aparatą, į pradinę vertikalią padėtį.

Kontrolinės medžiagos

29. Per kiekvieną bandymą kartu turėtų būti naudojami kontroliniai neigiami mėginiai, tirpiklio (nešiklio) kontroliniai mėginiai ir teigiami kontroliniai mėginiai.
30. Kai bandomi gryni skysčiai arba kietosios cheminės medžiagos, pagal ICE bandymo metodą kartu kaip neigiama kontrolinė medžiaga naudojamas fiziologinis tirpalas, kad būtų galima aptikti netipinius bandymo sistemos pokyčius ir kad bandymo sąlygos neturėtų netinkamos įtakos atsakui į dirginimą.
31. Kai bandomi atskiesti skysčiai, tam, kad būtų galima aptikti netipinius bandymo sistemos pokyčius ir kad bandymo sąlygos neturėtų netinkamos įtakos atsakui į dirginimą, taikant bandymo metodą kartu naudojama kontrolinė tirpiklio (nešiklio) mėginių grupė. Kaip nurodyta 25 skirsnyje, galima naudoti tik tokius tirpiklius (nešiklius), kurie, kaip įrodyta, neturi neigiamos įtakos bandymo sistemai.

32. Norint patikrinti, ar sukeliamas tinkamas atsakas, per kiekvieną bandymą kaip teigiama kontrolinė medžiaga naudojama žinoma akis dirginanti medžiaga. Kadangi pagal šį bandymo metodą ICE bandymas atliekamas siekiant nustatyti esdinančias arba stipriai dirginančias medžiagas, kaip teigiamą kontrolinę medžiagą reikėtų naudoti etaloninę cheminę medžiagą, kuri naudojama pagal šį bandymo metodą sukelia stiprų dirginimą. Tačiau, norint užtikrinti galimybę įvertinti atsako į teigiamą kontrolinę medžiagą kaitą per tam tikrą laiką, dirginamasis poveikis neturėtų būti pernelyg stiprus. Turėtų būti gauta pakankamai *in vitro* duomenų apie teigiamą kontrolinę medžiagą, kad būtų galima apskaičiuoti statistškai apibrėžtą priimtina teigiamos kontrolinės medžiagos poveikio intervalą. Jeigu tinkamų istorinių ICE bandymo metodo duomenų apie tam tikrą teigiamą kontrolinę medžiagą nėra, gali reikėti atlikti tyrimus šiai informacijai gauti.
33. Pavyzdžiui, per skystų cheminių medžiagų bandymus tinkamos naudoti teigiamos kontrolinės medžiagos yra 10 % acto rūgštis arba 5 % benzalkonio chloridas, o kietųjų cheminių medžiagų bandymams tinkamų naudoti teigiamų kontrolinių medžiagų pavyzdžiai yra natrio hidroksidas arba imidazolis.
34. Lyginamosios cheminės medžiagos yra naudingos norint įvertinti tam tikrai cheminių medžiagų arba gaminių kategorijai priskiriamų nežinomų cheminių medžiagų gebą dirginti akis arba santykinę akis dirginančios medžiagos dirginamąją gebą tam tikrame atsako į dirginimą intervale.

Išmatuoti rezultatai

35. Apdorojamos ragenos vertinamos prieš apdorojimą ir po 30, 75, 120, 180 bei 240 minučių (± 5 minutės) nuo nuplovimo apdorojus. Taikant šiuos laiko momentus, užtikrinamas tinkamas matavimų kiekis per keturių valandų veikimo laikotarpį, o tarp matavimų paliekama pakankamai laiko reikiams visų akių apžiūroms.
36. Vertinami tokie poveikiai: ragenos padrumstėjimas, pabrinkimas, fluoresceino sulaikymas ir morfologiniai padariniai (pvz., epitelio išopėjimas arba atsilaisvinimas). Visi poveikiai, išskyrus fluoresceino sulaikymą (jis nustatomas tik prieš apdorojimą ir po 30 minučių nuo apdorojimo bandomąja medžiaga), vertinami kiekvienu pirmiau nurodytu laiko momentu.
37. Patariama padaryti ragenos padrumstėjimo, fluoresceino sulaikymo, morfologinių padarinių ir, jei atliekami histopatologiniai tyrimai, jų metu nustatytų padarinių nuotraukas.
38. Baigus keturių valandų tyrimą, naudotojams siūloma išsaugoti akis tinkamame fiksatyve (pvz., neutraliame biferiniame formalino tirpale), kad būtų galima ištirti galimus histopatologinius pakitimus.
39. Ragenų pabrinkimas nustatomas remiantis ragenos storio matavimais, atliekamais optiniu stomačiu, įrengtu mikroskope su plyšine lempa. Jis išreiškiamas procentais ir apskaičiuojamas remiantis ragenos storio matavimais pagal šią formulę:

$$\left(\frac{\text{ragenos storis laiko momentu } t - \text{ragenos storis laiko momentu } = 0}{\text{ragenos storis laiko momentu } = 0} \right) \times 100$$

40. Apskaičiuojamas visų bandomųjų akių vidutinis procentinis ragenos pabrinkimas kiekvienu stebėjimo laiko momentu. Remiantis didžiausią vidutine ragenos pabrinkimo verte, nustatyta kuriuo nors laiko momentu, kiekvienai bandomajai medžiagai priskiriama bendra kategorinė vertė.
41. Nustatant skaitines vertes, ragenos padrumstėjimas skaičiuojamas tame ragenos plote, kuris labiausiai nepraleidžia šviesos. Apskaičiuojama visų bandomųjų akių vidutinė ragenos padrumstėjimo vertė kiekvienu stebėjimo laiko momentu. Remiantis didžiausia vidutine ragenos padrumstėjimo verte, nustatyta kuriuo nors laiko momentu, kiekvienai bandomajai medžiagai suteikiama bendra kategorinė vertė (1 lentelė).

1 lentelė

Ragenos padrumstėjimo vertės

Vertė	Stebėjimo išvados
0	Jokios padrumstėjimo
0,5	Labai nežymus padrumstėjimas

Vertė	Stebėjimo išvados
1	Padrumstėję pavieniai ploteliai; rainelės raštas aiškiai matomas
2	Aiškiai matomas pusskaidris plotas; rainelės raštas šiek tiek neryškus
3	Stiprus ragenos padrumstėjimas; rainelės rašto aiškiai nematyti; vyzdžio dydis beveik nežžiūrimas
4	Visiškas ragenos susidrumstimas; rainelės nematyti

42. Vidutinė fluoresceino sulaikymo vertė visoms bandomosioms akims apskaičiuojama tik po 30 minučių nuo stebėjimo pradžios; pagal šią vertę nustatoma kiekvienos bandomosios medžiagos bendra kategorinė vertė (2 lentelė).

2 lentelė

Fluoresceino sulaikymo vertės

Vertė	Stebėjimo išvados
0	Fluoresceino sulaikymo nepastebėta
0,5	Labai mažas sulaikymas pavienėse ląstelėse
1	Sulaikymas pavienėse ląstelėse, išsidėsčiusiose per visą apdorotą ragenos plotą
2	Sulaikymas sutelktuose arba susisiekiančiuose pavienių ląstelių plotuose
3	Fluoresceino sulaikymas dideliuose susisiekiančiuose ragenos plotuose

43. Morfologinis poveikis apima ragenos epitelio ląstelių „išopėjimą“, epitelio „atsilaisvinimą“, ragenos paviršiaus „šiurkštėjimą“ ir bandomosios medžiagos „prilipimą“ prie ragenos. Šių požymių lygis gali būti įvairus, požymiai gali pasireikšti kartu. Šių požymių klasifikavimas yra subjektyvus, priklauso nuo tyrėjo interpretacijos.

DUOMENYS IR JŲ TEIKIMAS

Duomenų vertinimas

44. Nustatant kiekvieno ICE bandymų metu gauto rezultato kategoriją, ragenų padrumstėjimo, pabrinkimo ir fluoresceino sulaikymo matavimo rezultatai turėtų būti vertinami atskirai. Tada visų ICE bandymų rezultatų kategorijos susumuojamos ir nustatoma kiekvienos bandomosios medžiagos dirginimo kategorija.

Sprendimo kriterijai

45. Įvertinus kiekvieną rezultatą, remiantis iš anksto nustatytais intervalais, galima nustatyti ICE kategorijas. Ragenos storio (3 lentelė), padrumstėjimo (4 lentelė) ir fluoresceino sulaikymo (5 lentelė) rezultatai aiškinami pagal šias skales:

3 lentelė

ICE klasifikavimo kriterijai atsižvelgiant į ragenos storį

Vidutinis ragenos pabrinkimas (proc.) (*)	ICE kategorija
0–5	I
Daugiau kaip 5, bet ne daugiau kaip 12	II
Daugiau kaip 12, bet ne daugiau kaip 18 (praėjus daugiau kaip 75 min. nuo apdorojimo)	II
Daugiau kaip 12, bet ne daugiau kaip 18 (praėjus ne daugiau kaip 75 min. nuo apdorojimo)	III
Daugiau kaip 18, bet ne daugiau kaip 26	III

Vidutinis ragenos pabrinkimas (proc.) (*)	ICE kategorija
Daugiau kaip 26, bet ne daugiau kaip 32 (praėjus daugiau kaip 75 min. nuo apdorojimo)	III
Daugiau kaip 26, bet ne daugiau kaip 32 (praėjus ne daugiau kaip 75 min. nuo apdorojimo)	IV
Daugiau kaip 32	IV

(*) Ragenų pabrinkimo vertės naudojamos tik tada, kai storis matuojamas naudojant *Haag-Streit BP900* mikroskopą su plyšine lempa su gylio matuokliu Nr. I ir nustatius plyšio plotį ties rodmeniu $9\frac{1}{2}$, atitinkančiu 0,095 mm. Naudotojams reikėtų žinoti, kad naudojant mikroskopus su plyšine lempa gauti ragenų storio duomenys gali skirtis, jeigu bus pasirinktas nevienodas plyšio plotis.

4 lentelė

ICE klasifikavimo kriterijai atsižvelgiant į padrumstėjimą

Vidutinė didžiausia padrumstėjimo vertė (*)	ICE kategorija
0,0–0,5	I
0,6–1,5	II
1,6–2,5	III
2,6–4,0	IV

(*) Žr. 1 lentelę.

5 lentelė

ICE klasifikavimo kriterijai atsižvelgiant į vidutinį fluoresceino sulaikymą

Vidutinė fluoresceino sulaikymo vertė praėjus 30 min. nuo apdorojimo (*)	ICE kategorija
0,0–0,5	I
0,6–1,5	II
1,6–2,5	III
2,6–3,0	IV

(*) Žr. 2 lentelę.

46. Bendra bandomosios medžiagos *in vitro* dirginimo kategorija nustatoma pagal dirginimo klasifikatorių, kuriuo apibendrinamos nustatytos ragenų pabrinkimo, padrumstėjimo ir fluoresceino sulaikymo kategorijos pagal 6 lentelėje pateiktą sistemą.

6 lentelė

Bendrosios *in vitro* dirginimo kategorijos

Kategorija	Trijų rezultatų deriniai
Ėsdinanti ir (arba) stipriai dirginanti cheminė medžiaga	$3 \times IV$ $2 \times IV, 1 \times III$ $2 \times IV, 1 \times II$ (*) $2 \times IV, 1 \times I$ (*) Ragenos drumstis po 30 min. ne mažesnė kaip 3 (ne mažiau kaip dviejų akių) Ragenos drumstis kuriuo nors laiko momentu yra lygi 4 (ne mažiau kaip dviejų akių) Didelis epitelio susilpnėjimas (bent vienos akies)

(*) Retai pasitaikantys deriniai.

47. Kaip nurodyta 1 skirsnyje, jeigu nenustatoma, kad cheminė medžiaga yra akis ėsdinanti arba stipriai dirginanti medžiaga, klasifikavimo ir ženklinimo tikslais turėtų būti atlikti papildomi bandymai. Lyginant su triušio akies *in vivo* bandymo metodo duomenimis, klasifikuojamais pagal EPA (1), ES (2) arba GHS (3) klasifikavimo sistemas, bendras ICE bandymo metodo tikslumas nustatant akis ėsdinančias ir stipriai dirginančias medžiagas yra nuo 83 % (120/144) iki 87 % (134/154), klaidingai teigiamų rezultatų dalis – nuo 6 % (7/122) iki 8 % (9/116), klaidingai neigiamų rezultatų dalis – nuo 41 % (13/32) iki 50 % (15/30). Iš duomenų bazės pašalinus tam tikrų cheminių (pvz., alkoholių ir aktyviasias paviršiaus medžiagas) arba fizikinių (pvz., kietąsias medžiagas) klasių chemines medžiagas, ICE bandymo metodo tikslumas pagal ES, EPA ir GHS klasifikavimo sistemas yra nuo 91 % (75/82) iki 92 % (69/75), klaidingai teigiamų rezultatų dalis – nuo 5 % (4/73) iki 6 % (4/70), klaidingai neigiamų rezultatų dalis – nuo 29 % (2/7) iki 33 % (3/9) (4).
48. Net jeigu bandomoji medžiaga nepriskiriama akis ėsdinančių arba stipriai dirginančių medžiagų kategorijai, ICE bandymų duomenys, naudojami kartu su triušio akies *in vivo* bandymo arba deramai patvirtinto *in vitro* bandymo duomenimis, gali būti naudingi toliau vertinant ICE bandymų, kuriais siekiama nustatyti silpnai dirginančias ir nedirginančias medžiagas, metodo naudingumą ir apribojimus (šiuo metu rengiamos toksiškumo akims *in vitro* bandymų metodų rekomendacinis dokumentas).

Tyrimo priimtumo kriterijai

49. Tyrimas laikomas priimtiniu, jeigu kartu naudojant neigiamą kontrolinę grupę, tirpiklio (nešiklio) kontrolinę grupę ir teigiamą kontrolinę grupę, nustatoma, kad cheminė medžiaga atitinkamai priskirtina nedirginančių medžiagų arba stipriai dirginančių ir (arba) ėsdinančių medžiagų kategorijai.

Bandymo ataskaita

50. Bandymų ataskaitoje turėtų būti pateikta toliau nurodyta informacija, jeigu ji yra svarbi atlikto tyrimo atžvilgiu.

Bandomosios ir kontrolinės medžiagos

Cheminės medžiagos pavadinimas (-ai), pvz., Cheminių medžiagų santrumpų tarnybos (angl. *Chemical Abstracts Service*, CAS) naudojamas struktūrinis pavadinimas ir kiti pavadinimai, jeigu jie žinomi;

CAS registracijos numeris (RN), jeigu jis žinomas;

cheminės medžiagos arba mišinio grynumas ir sudėtis (masės procentinėmis dalimis), kiek tai žinoma remiantis turima informacija;

tyrimui svarbios fizikinės ir cheminės savybės, pvz., fizinis būvis, lakumas, pH, stabilumas, cheminės medžiagos klasė, tirpumas vandenyje;

bandomosios ir (arba) kontrolinės medžiagos apdorojimas prieš bandymą, jeigu tai atliekama (pvz., pašildymas, sumalimas);

stabilumas, jeigu jis žinomas.

Informacija apie rėmėją ir bandymų laboratoriją

Rėmėjo pavadinimas ir adresas, bandymų laboratorija ir tyrimo vadovas;

informacija apie akių šaltinį (pvz., vieta, kurioje buvo paimtos akys);

akių laikymo ir gabenimo sąlygos (pvz., akių surinkimo data ir laikas, laikotarpis iki bandymų pradžios);

jeigu yra informacijos, specifinės gyvūnų, iš kurių buvo paimtos akys, charakteristikos (pvz., gyvūno, kurio akys buvo paimtos, amžius, lytis, svoris).

Taikyto bandymo metodo ir protokolo pagrindimas

Bandymo metodo integralumas

Bandymo metodo integralumo (t. y. tikslumo ir patikimumo) užtikrinimo per tam tikrą laiką procedūra (pvz., periodiniai bandymai su patikros cheminėmis medžiagomis, istorinių duomenų apie neigiamas ir teigiamas kontrolines medžiagas naudojimas).

Bandyto priimtumo kriterijai

Jeigu turima, priimtini kartu naudojamų lyginamųjų kontrolinių medžiagų poveikio intervalai, pagrįsti istoriniais duomenimis.

Bandyto sąlygos

Taikytos bandymo sistemos aprašas;

naudotas mikroskopas su plyšine lempa (pvz., modelis);

naudoto mikroskopo su plyšine lempa instrumentinės nuostatos;

informacija apie naudotas vištų akis, įskaitant informaciją apie jų kokybę;

išsami informacija apie taikytą bandymo metodiką;

naudota (-os) bandomosios medžiagos koncentracija (-os);

bandymo metodikos pakeitimų, jeigu jų buvo padaryta, aprašas;

informacija apie istorinius duomenis, gautus taikant šį modelį (pvz., neigiamos ir teigiamos kontrolinės medžiagos, patikros cheminės medžiagos, lyginamosios cheminės medžiagos);

taikytų vertinimo kriterijų aprašas.

Rezultatai

Kitų nustatytų poveikių apibūdinimas;

akies nuotraukos, jeigu reikia.

*Aptarimas ir rezultatai**Išvada**LITERATŪRA*

- (1) U.S. EPA (1996). Label Review Manual: 2nd Edition. EPA737-B-96-001. Washington, DC: U.S. Environmental Protection Agency.
- (2) 2008 m. gruodžio 16 d. Europos Parlamento ir Tarybos reglamentas (EB) Nr. 1272/2008 dėl cheminių medžiagų ir mišinių klasifikavimo, ženklinimo ir pakavimo, iš dalies keičiantis ir panaikinantį direktyvas 67/548/EEB bei 1999/45/EB ir iš dalies keičiantis Reglamentą (EB) Nr. 1907/2006; OL L 353, 2008 12 31, p. 1.
- (3) United nations (UN) (2007). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Second revised edition, UN New York and Geneva, 2007. Paskelbta:

[http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev02/02files_e.html]

- (4) ICCVAM (2007). Test Method Evaluation Report - *In Vitro Ocular Toxicity* Test Methods for Identifying Ocular Severe Irritants and Corrosives. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No.: 07-4517. Paskelbta:

[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmter.htm]

- (5) ESAC (2007). Statement on the conclusion of the ICCVAM retrospective study on organotypic *in vitro* assays as screening tests to identify potential ocular corrosives and severe eye irritants. Paskelbta:

[<http://ecvam.jrc.it/index.htm>].

- (6) EB (2006). 2006 m. gruodžio 18 d. Europos Parlamento ir Tarybos reglamentas (EB) Nr. 1907/2006 dėl cheminių medžiagų registracijos, įvertinimo, autorizacijos ir apribojimų (REACH), įsteigiantis Europos cheminių medžiagų agentūrą, iš dalies keičiantis Direktyvą 1999/45/EB bei panaikinantį Tarybos reglamentą (EEB) Nr. 793/93, Komisijos reglamentą (EB) Nr. 1488/94, Tarybos direktyvą 76/769/EEB ir Komisijos direktyvas 91/155/EEB, 93/67/EEB, 93/105/EB bei 2000/21/EB; OL L 396, 2006 12 30, p. 1.
- (7) OECD (2002). Test Guideline 405. OECD Guideline for Testing of Chemicals. Acute eye irritation/corrosion. Paskelbta:
- [http://www.oecd.org/document/40/0,2340,en_2649_34377_37051368_1_1_1_1,00.html]
- (8) ICCVAM (2007). ICCVAM Recommended ICE Test Method Protocol. In: ICCVAM Test Method Evaluation Report - *In Vitro* Ocular Toxicity Test Methods for Identifying Ocular Severe Irritants and Corrosives. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No.: 07-4517. Paskelbta:
- [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmter.htm]
- (9) ICCVAM. (2006). Current Status of *In Vitro* Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants: Isolated Chicken Eye Test Method. NIH Publication No.: 06-4513. Research Triangle Park: National Toxicology Program. Paskelbta:
- [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_ice.htm]
- (10) Prinsen, M.K. and Koëter, B.W.M. (1993). Justification of the enucleated eye test with eyes of slaughterhouse animals as an alternative to the Draize eye irritation test with rabbits. *Fd. Chem. Toxicol.* 31:69-76.
- (11) INVITTOX (1994). Protocol 80: Chicken enucleated eye test (CEET). Paskelbta:
- [<http://ecvam.jrc.it/index.htm>].
- (12) Balls, M., Botham, P.A., Bruner, L.H. and Spielmann H. (1995). The EC/HO international validation study on alternatives to the Draize eye irritation test. *Toxicol. In Vitro* 9:871-929.
- (13) Prinsen, M.K. (1996). The chicken enucleated eye test (CEET): A practical (pre)screen for the assessment of eye irritation/corrosion potential of test materials. *Food Chem. Toxicol.* 34:291-296.
- (14) Chamberlain, M., Gad, S.C., Gautheron, P. and Prinsen, M.K. (1997). IRAG Working Group I: Organotypic models for the assessment/prediction of ocular irritation. *Food Chem. Toxicol.* 35:23-37.
- (15) Siegel, J.D., Rhinehart, E., Jackson, M., Chiarello, L., and the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (2007). Guideline for Isolation Precautions: Preventing Transmission of Infectious Agents in Healthcare Settings. Paskelbta:
- [<http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/pdf/isolation2007.pdf>].
- (16) Maurer, J.K., Parker, R.D. and Jester J.V. (2002). Extent of corneal injury as the mechanistic basis for ocular irritation: key findings and recommendations for the development of alternative assays. *Reg. Tox. Pharmacol.* 36:106-117.
- (17) Burton, A.B.G., M. York and R.S. Lawrence (1981). The *in vitro* assessment of severe irritants. *Fd. Cosmet.-Toxicol.* 19, 471-480.
- (18) ICCVAM (2006). Background review document, Current Status of *In Vitro* Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants: Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) Test Method.
- Paskelbta: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_bcop.htm]
- (19) ICCVAM (2006). Background review document, Current Status of *In Vitro* Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants Isolated Chicken Eye (ICE) Test Method. Paskelbta:
- [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_bcop.htm]

1 priedėlis

APIBRĖŽTYS

Tikslumas – bandymo metodo rezultatų ir patvirtintų pamatinių verčių sutapimo artumas. Tikslumas yra bandymo metodo naudojimo charakteristikų matas ir vienas iš tinkamumo aspektų. Terminas dažnai vartojamas pakaitomis su terminu „sutapimas“ reikšme „tinkamų bandymo metodo rezultatų dalis“.

Lyginamoji cheminė medžiaga – cheminė medžiaga, naudojama kaip standartas, su kuriuo lyginama bandomoji medžiaga. Lyginamoji cheminė medžiaga turi turėti tokias savybes: i) tinkamą (-us) ir patikimą (-us) šaltinį (-ius); ii) jos struktūrinės ir funkcinės savybės turi būti panašios į bandomųjų medžiagų kategorijos savybes; iii) turi būti žinomos jos fizinės ir cheminės savybės; iv) turi būti duomenų, patvirtinančių žinomą poveikį; v) turi būti žinomas jos stiprumas pageidaujamo atsako intervalo ribose.

Ragena – permatoma priekinė akies obuolio dalis, dengianti rainelę bei vyzdį ir praleidžianti šviesą į vidų.

Ragenos padrumstėjimas – išmatuota ragenos padrumstėjimo vertė, gauta rageną baigus veikti bandomąja medžiaga. Padidėjusi ragenos drumstis rodo ragenos pažeidimą.

Ragenos pabrinkimas – objektyvi per ICE bandymą nustatoma ragenos išsipūtimo lygio vertė, gauta rageną baigus veikti bandomąja medžiaga. Išreiškiamas procentais ir apskaičiuojamas remiantis išmatuotu pamatiniu (nustatytu prieš skiriant dozę) ragenos storiu ir ragenos storiu, vienodais intervalais užregistruotu rageną baigus veikti bandomąja medžiaga per ICE bandymą. Ragenos pabrinkimo lygis rodo ragenos pažeidimą.

EPA 1 kategorija – ėsdinimas (negrįžtamas akies audinio suardymas) arba ragenos pakenkimas arba dirginimas, trunkantis ilgiau kaip 21 dieną (1).

ES R41 kategorija – akies audinio pažeidimas arba smarkus fizinis regėjimo pablogėjimas, ant išorinio akies paviršiaus uždėjus bandomosios medžiagos, iki galo nepraeinantis per 21 dieną nuo uždėjimo (2).

Klaidingai neigiamų rezultatų dalis – visų teigiamų medžiagų, kurios taikant bandymo metodą buvo klaidingai identifikuotos kaip neigiamos, dalis. Tai yra vienas iš bandymo metodo naudojimo charakteristikų rodiklių.

Klaidingai teigiamų rezultatų dalis – visų neigiamų medžiagų, kurios taikant bandymo metodą buvo klaidingai identifikuotos kaip teigiamos, dalis. Tai yra vienas iš bandymo metodo naudojimo charakteristikų rodiklių.

Fluoresceino sulaikymas – per ICE bandymą subjektyviai nustatomas fluoresceino natrio druskos kiekis, išlikęs ragenos epitelio ląstelėse, rageną baigus veikti bandomąja medžiaga. Fluoresceino sulaikymo laipsnis rodo ragenos epitelio pažeidimą.

GHS (Visuotinai suderinta cheminių medžiagų klasifikavimo ir ženklinimo sistema) – sistema, kurioje pateikiama cheminių medžiagų (medžiagų ir mišinių) klasifikacija pagal standartizuotus fizikinių pavojų, pavojų sveikatai bei aplinkai tipus ir nagrinėjami atitinkami informaciniai elementai, pvz., piktogramos, signaliniai žodžiai, pavojingumo frazės, atsargumo frazės ir saugos duomenų lapai, kad būtų galima informuoti apie medžiagų neigiamą poveikį, siekiant apsaugoti žmones (įskaitant darbuotojus, darbininkus, vežėjus, vartotojus ir avarijų likvidatorius) ir aplinką (3).

GHS 1 kategorija – akies audinio pažeidimas arba smarkus fizinis regėjimo pablogėjimas, ant išorinio akies paviršiaus uždėjus bandomosios medžiagos, iki galo nepraeinantis per 21 dieną nuo uždėjimo (3).

Pavojus – medžiagos savybė arba aplinkybės, dėl kurių organizmui, sistemai arba populiacijai (arba jos daliai), kurią veikia toji medžiaga, gali būti padarytas kenksmingas poveikis.

Neigiamas kontrolinis mėginys – bandomąja medžiaga neapdorota mėginio kopija, turinti visas sudedamąsias bandymo sistemos dalis. Šis mėginys tiriamas kartu su bandomąja medžiaga paveiktais mėginiais ir kitais kontroliniais mėginiais, siekiant nustatyti, ar tirpiklis veikia bandymo sistemą.

Nedirginančios medžiagos – cheminės medžiagos, nepriskiriamos EPA I, II arba III kategorijos, ES R41 arba R36 kategorijos arba GHS 1, 2A arba 2B kategorijos akis dirginančioms medžiagoms (1) (2) (3).

Akis esdinanti medžiaga – a) cheminė medžiaga, negrįžtamai suardanti akies audinį; b) cheminės medžiagos, priskiriamos GHS 1 kategorijos, EPA I kategorijos arba ES R41 kategorijos akis dirginančioms medžiagoms (1) (2) (3).

Akis dirginanti medžiaga – a) cheminė medžiaga, kuri, uždėta ant priekinio akies paviršiaus, sukelia grįžtamus akies pažeidimus; b) cheminės medžiagos, priskiriamos EPA II arba III kategorijos, ES R36 kategorijos arba GHS 2A arba 2B kategorijos akis dirginančioms medžiagoms (1) (2) (3).

Akis stipriai dirginanti medžiaga – a) cheminė medžiaga, kuri, uždėta ant priekinio akies paviršiaus, sukelia akies audinio pažeidimus, nepraeinančius per 21 dieną nuo tos medžiagos uždėjimo, arba sukelia didelį fizinį regos pablogėjimą; b) cheminės medžiagos, priskiriamos GHS 1 kategorijos, EPA I kategorijos arba ES R41 kategorijos akis dirginančioms medžiagoms (1) (2) (3).

Teigiamas kontrolinis mėginys – mėginio kopija, turinti visas sudedamąsias bandymo sistemos dalis ir apdorota chemine medžiaga, kuri, kaip yra žinoma, sukelia teigiamą atsaką. Norint užtikrinti galimybę įvertinti atsaką į teigiamą kontrolinę medžiagą kaitą per tam tikrą laiką, dirginamasis poveikis neturėtų būti pernelyg stiprus.

Patikimumas – bandymo metodo, taikomo pagal tą patį protokolą, atkuriamumo toje pačioje laboratorijoje ir kitose laboratorijose matas. Patikimumas įvertinamas apskaičiuojant atkuriamumą laboratorijoje ir tarp laboratorijų ir pakartojamumą laboratorijoje.

Mikroskopas su plyšine lempa – prietaisas, naudojamas tiesiogiai ištirti akį, jos vaizdą padidinant binokuliniu mikroskopu ir sukuriant tiesioginį stereoskopinį vaizdą. Taikant ICE bandymo metodą, šis prietaisas naudojamas vištos akies priekinėms sudedamosios dalims apžiūrėti ir ragenos storiui objektyviai išmatuoti pritaisytu gylio matavimo prietaisu.

Tirpiklio (nešiklio) kontrolinis mėginys – neapdorotas mėginys, turintis visas sudedamąsias bandymo sistemos dalis, įskaitant tirpiklį (nešiklį), kuris tiriamas kartu su bandomąja medžiaga apdorotais mėginiais ir kitais kontroliniais mėginiais, siekiant nustatyti pamatinį mėginių, apdorotų tuo pačiu tirpikliu (nešikliu), atsaką. Atliekant bandymą kartu su neigiamu kontroliniu mėginiu, šis mėginys taip pat parodo, ar tirpiklis (nešiklis) veikia bandymo sistemą.

Pakopiniai bandymai – nuosekli bandymo metodika, pagal kurią tam tikra eilės tvarka nagrinėjama visa turima informacija apie bandomąją medžiagą, kiekvienoje pakopoje taikant įrodomosios duomenų galios metodiką siekiant nustatyti, ar yra pakankamai duomenų sprendimui dėl pavojingumo kategorijos priimti, prieš pereinant prie kitos pakopos. Jeigu bandomosios medžiagos gebą dirginti akis galima nustatyti remiantis turima informacija, papildomų bandymų atlikti nereikia. Jeigu bandomosios medžiagos dirginamosios gebos nustatyti remiantis turima informacija negalima, taikoma nuosekli gyvūnų bandymo metodika, kol gaunami duomenys, kuriais remiantis galima aiškiai nustatyti tos medžiagos kategoriją.

Patvirtintas bandymo metodas – bandymo metodas, kurio patvirtinimo tyrimai buvo atlikti siekiant nustatyti jo tinkamumą (įskaitant tikslumą) ir patikimumą konkrečiai paskirčiai. Svarbu atkreipti dėmesį, kad patvirtintas bandymo metodas gali būti nepakankamai tikslus ir patikimas, kad jį būtų galima pripažinti tinkamu siūlomai paskirčiai.

Įrodomoji duomenų galia – metodika, pagal kurią vertinamos tam tikrų informacijos dalių privalumai ir trūkumai, siekiant priimti ir pagrįsti sprendimą dėl cheminės medžiagos pavojingumo.

2 priedėlis

PATIKROS CHEMINĖS MEDŽIAGOS ICE BANDYMŲ METODO ATVEJU

Prieš pradėdamos sistemingai taikyti bandymo metodą, susijusį su šiomis bandymų gairėmis, laboratorijos gali pageidauti įsitikinti savo techniniu tinkamumu pamėgindamos teisingai nustatyti dešimties 1 lentelėje siūlomų cheminių medžiagų akių ėsdinimo kategoriją. Šios cheminės medžiagos parinktos atsižvelgiant į įvairių vietinio akies dirginimo ir (arba) ėsdinimo atsaką, pagrįstą triušio akies *in vivo* bandymo rezultatais (TG 405) (t. y. JT GHS 1, 2A, 2B kategorijos arba „Neklasifikuojama arba neženklinama“) (3) (7). Tačiau, atsižvelgiant į patvirtintą šių bandymų naudingumą (t. y. tik nustatyti akis ėsdinančias ir (arba) stipriai dirginančias medžiagas), klasifikavimui aktualūs rezultatai, susiję su techninio tinkamumo pasitikrinimu, yra tik du (ėsdinanti ir (arba) stipriai dirginanti arba neėsdinanti ir (arba) stipriai nedirginanti medžiaga). Kiti atrankos kriterijai yra šie: cheminės medžiagos turi būti parduodamos rinkoje, turi būti kokybiškų *in vivo* pamatinių duomenų ir turi būti kokybiškų duomenų apie abu *in vitro* metodus, apie kuriuos yra rengiamos bandymų gairės. Dėl šios priežasties dirginančios cheminės medžiagos buvo atrinktos iš ICCVAM rekomenduojamų 122 etaloninių cheminių medžiagų, skirtų *in vitro* toksiškumo akims bandymo metodams patvirtinti, sąrašo (žr. H priedėlyje pateiktą ICCVAM rekomenduojamų etaloninių cheminių medžiagų sąrašą) (4). Pamatiniai duomenys pateikti ICCVAM istorinės apžvalgos dokumentuose, skirtuose galvijų ragenos padrumstėjimo ir pralaidumo (BCOP) ir ICE bandymo metodams (17) (18).

1 lentelė

ICE bandymų metodo atveju rekomenduojamos patikros cheminės medžiagos

Cheminė medžiaga	CASNR	Cheminės medžiagos klasė ⁽¹⁾	Fizinis būvis	<i>In vivo</i> kategorija ⁽²⁾	<i>In vitro</i> kategorija ⁽³⁾
Benzalkonio chloridas (5 %)	8001-54-5	Onio junginys	Skysta	1 kategorija	Ėsdinanti ir (arba) stipriai dirginanti
Chlorheksidinas	55-56-1	Aminas, amidinas	Kieta	1 kategorija	Ėsdinanti ir (arba) stipriai dirginanti
Dibenzoil-L-vyno rūgštis	2743-38-6	Karboksirūgšties esteris	Kieta	1 kategorija	Ėsdinanti ir (arba) stipriai dirginanti
Imidazolas	288-32-4	Heterociklinis junginys	Kieta	1 kategorija	Ėsdinanti ir (arba) stipriai dirginanti
Trichloracto rūgštis (30 %)	76-03-9	Karboksirūgštis	Skysta	1 kategorija	Ėsdinanti ir (arba) stipriai dirginanti
2,6-dichlorbenzoil-chloridas	4659-45-4	Acilhalogenidas	Skysta	2A kategorija	Neėsdinanti ir (arba) stipriai nedirginanti
Etil-2-metil acetoacetatas	609-14-3	Ketonas, esteris	Skysta	2B kategorija	Neėsdinanti ir (arba) stipriai nedirginanti
Amonio nitratas	6484-52-2	Neorganinė druska	Kieta	2A kategorija	Neėsdinanti ir (arba) stipriai nedirginanti
Glicerinas	56-81-5	Alkoholis	Skysta	Neženklinama	Neėsdinanti ir (arba) stipriai nedirginanti
n-heksanas	110-54-3	Angliavandėnis (aciklinis)	Skysta	Neženklinama	Neėsdinanti ir (arba) stipriai nedirginanti

Santrumpos: CASRN – Cheminių medžiagų pavadinimų santrumpų tarnybos registracijos numeris.

⁽¹⁾ Cheminės klasės kiekvienai bandomajai medžiagai priskirtos taikant standartinę klasifikavimo sistemą, remiantis Nacionalinės medicinos bibliotekos medicinos objektų pavadinimų (MeSH) klasifikavimo sistema (paskelbta <http://www.nlm.nih.gov/mesh>).

⁽²⁾ Remiantis rezultatais, gautais atlikus triušio akies *in vivo* bandymą (OECD TG 405), ir taikant JT GHS (3)(7).

⁽³⁾ Remiantis BCOP ir ICE rezultatais.

3 priedėlis

ICE superfuzijos aparato ir akių dėklų schemos

(Daugiau bendrosios informacijos apie superfuzijos aparatą ir akies dėklą pateikta Burton et al. (17))

