

II

(Nelegislatīvi akti)

REGULAS

KOMISIJAS REGULA (ES) 2017/735

(2017. gada 14. februāris),

ar kuru, pielāgojot tehnikas attīstībai, groza pielikumu Regulai (EK) Nr. 440/2008 par testēšanas metožu noteikšanu saskaņā ar Eiropas Parlamenta un Padomes Regulu (EK) Nr. 1907/2006, kas attiecas uz ķīmikāliju reģistrēšanu, vērtēšanu, licencēšanu un ierobežošanu (REACH)

(Dokuments attiecas uz EEZ)

EIROPAS KOMISIJA,

ņemot vērā Līgumu par Eiropas Savienības darbību,

ņemot vērā Eiropas Parlamenta un Padomes 2006. gada 18. decembra Regulu (EK) Nr. 1907/2006, kas attiecas uz ķīmikāliju reģistrēšanu, vērtēšanu, licencēšanu un ierobežošanu (REACH) un ar kuru izveido Eiropas Ķīmikāliju aģentūru, groza Direktīvu 1999/45/EK un atceļ Padomes Regulu (EEK) Nr. 793/93 un Komisijas Regulu (EK) Nr. 1488/94, kā arī Padomes Direktīvu 76/769/EEK un Komisijas Direktīvu 91/155/EEK, Direktīvu 93/67/EEK, Direktīvu 93/105/EK un Direktīvu 2000/21/EK ⁽¹⁾, un jo īpaši tās 13. panta 2. punktu,

tā kā:

- (1) Komisijas Regulā (EK) Nr. 440/2008 ⁽²⁾ ir noteiktas Regulas (EK) Nr. 1907/2006 izpildē izmantojamās testēšanas metodes ķīmikāliju fizikālķīmisko īpašību, toksiskuma un ekotoksiskuma noteikšanai.
- (2) Lai ņemtu vērā tehnikas attīstību un gādātu, ka saskaņā ar Eiropas Parlamenta un Padomes Direktīvu 2010/63/ES ⁽³⁾ tiek samazināts eksperimentu vajadzībām izmantoto dzīvnieku skaits, Regula (EK) Nr. 440/2008 ir jāatjaunina, tajā iekļaujot jaunas un atjauninātas testēšanas metodes, ko nesen pieņēmusi Ekonomiskās sadarbības un attīstības organizācija (ESAO). Dokumenta projekts ir apspriests ar ieinteresētajām personām.
- (3) Šis pielāgojums tehnikas attīstībai ietver divdesmit testēšanas metodes: vienu jaunu metodi fizikālķīmiskās īpašības noteikšanai, piecas jaunas un vienu atjauninātu testēšanas metodi ekotoksiskuma novērtēšanai, divas atjauninātas testēšanas metodes, ar kurām novērtē apriti un uzvedību vidē, un četras jaunas un septiņas atjauninātas testēšanas metodes, ar kurām novērtē ietekmi uz cilvēka veselību.
- (4) ESAO testēšanas vadlīnijas regulāri pārskata, lai noteiktu, vai kādas no tām nav zinātniski novecojušas. Ar šo pielāgojumu tehnikas attīstībai tiek svītrotas sešas testēšanas metodes, kurām atbilstošās ESAO testēšanas vadlīnijas ir atceltas.

⁽¹⁾ OV L 396, 30.12.2006., 1. lpp.

⁽²⁾ Komisijas 2008. gada 30. maija Regula (EK) Nr. 440/2008 par testēšanas metožu noteikšanu saskaņā ar Eiropas Parlamenta un Padomes Regulu (EK) Nr. 1907/2006, kas attiecas uz ķīmikāliju reģistrēšanu, vērtēšanu, licencēšanu un ierobežošanu (REACH) (OV L 142, 31.5.2008., 1. lpp.).

⁽³⁾ Eiropas Parlamenta un Padomes 2010. gada 22. septembra Direktīva 2010/63/ES par zinātniskiem mērķiem izmantojamo dzīvnieku aizsardzību (OV L 276, 20.10.2010., 33. lpp.).

- (5) Tāpēc Regula (EK) Nr. 440/2008 būtu attiecīgi jāgroza.
- (6) Šajā regulā paredzētie pasākumi ir saskaņā ar atzinumu, ko sniegusi atbilstoši Regulas (EK) Nr. 1907/2006 133. pantam izveidotā komiteja,

IR PIEŅĒMUSI ŠO REGULU.

1. pants

Regulas (EK) Nr. 440/2008 pielikumu groza saskaņā ar šīs regulas pielikumu.

2. pants

Šī regula stājas spēkā divdesmitajā dienā pēc tās publicēšanas *Eiropas Savienības Oficiālajā Vēstnesī*.

Šī regula uzliek saistības kopumā un ir tieši piemērojama visās dalībvalstīs.

Briselē, 2017. gada 14. februārī

Komisijas vārdā –
priekšsēdētājs
Jean-Claude JUNKER

PIELIKUMS

Regulas (EK) Nr. 440/2008 pielikumu groza šādi:

1) pielikuma A daļā pievieno šādu nodaļu:

“A.25. DISOCIĀCIJAS KONSTANTES ŪDENĪ (TITRĒŠANAS METODE — SPEKTROFOTOMETRISKĀ METODE — KONDUKTOMETRISKĀ METODE)

IEVADS

Šī testēšanas metode ir ekvivalenta ESAO Testēšanas vadlīnijai Nr. 112 (1981).

Priekšnosacījumi

- Piemērota analītiskā metode
- Šķīdība ūdenī

Norādījumi

- Struktūrformula
- Elektrovadītspēja konduktometriskajai metodei

Precizējumi

- Visas testēšanas metodes var veikt ar tīrām vai tirdzniecības kvalitātes vielām. Jāņem vērā piemaisījumu iespējamā ietekme uz rezultātiem.
- Titrēšanas metode nav piemērota vielām ar mazu šķīdību (sk. sadaļu “Testējamie šķīdumi”).
- Spektrofotometriskā metode izmantojama vienīgi tām vielām, kuru disociētajām un nedisociētajām formām ir ievērojami atšķirīgs UV/VIS absorbcijas spektrs. Šī metode var būt piemērota arī vielām ar mazu šķīdību un neskābju/nebāzu disociācijām, piemēram, kompleksveidošanai.
- Gadījumos, kad ir izpildīts Onsagera vienādojums, drīkst izmantot konduktometrisko metodi, pat ja koncentrācijas ir samērā zemas un pat neskābju/nebāzu ķīmiskā līdzsvara gadījumos.

Standarta dokumenti

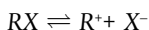
Šī testēšanas metode ir balstīta uz sadaļas “Literatūras saraksts” atsaucēs norādītajām metodēm un dokumentu “Preliminary Draft Guidance for Premanufacture Notification EPA” (1978. gada 18. augusts).

METODE — IEVADS, TESTA MĒRĶIS, PIELIETOJUMS, NOZĪMĪGUMS, IZMANTOŠANA UN IEROBEŽOJUMI

Vielas disociācija ūdenī ir svarīga, novērtējot tās ietekmi uz vidi. Tā nosaka vielas formu, kas savukārt nosaka tās izturēšanos un pārnesi. Tā var ietekmēt ķīmikālijas adsorbciju augsnēs un sedimentos un absorbēšanos bioloģiskās šūnās.

Definīcijas un mērvienības

Disociācija ir atgriezeniskā sadalīšanās divos vai vairākos ķīmiskajos savienojumos, kuri var būt jonizēti. Šo procesu parasti apzīmē ar šādu formulu:



un koncentrācijas līdzsvara konstante, kas nosaka šo reakciju, ir šāda:

$$K = \frac{[R^{+}][X^{-}]}{[RX]}$$

Piemēram, konkrētajā gadījumā R ir ūdeņradis (viela ir skābe) un konstante ir

$$K_a = [H^+] \cdot \frac{[X^-]}{[HX]}$$

vai

$$pK_a = pH - \log \frac{[X^-]}{[HX]}$$

Standartvielas

Pārbaudot jaunu vielu, ne visos gadījumos jāizmanto turpmāk norādītās standartvielas. Tās galvenokārt ir norādītas tādēļ, lai ik pa laikam būtu iespējams veikt metodes kalibrēšanu un salīdzināt rezultātus gadījumos, kad tiek izmantota cita metode.

	pK ⁽¹⁾	Temperatūra (°C)
p-nitrofenols	7,15	25
Benzoskābe	4,12	20
p-hloranilīns	3,93	20

⁽¹⁾ Nav vērtība par 20 °C nav pieejama, taču var pieņemt, ka mērījumu rezultātu mainība ir lielāka nekā paredzamā atkarība no temperatūras.

Būtu lietderīgi izmantot vielu ar vairākiem pK, kā norādīts turpmāk sadaļā "Metodes princips". Tāda viela varētu būt:

Citronskābe	pK _a (8)	Temperatūra (°C)
	1) 3,14	20
	2) 4,77	20
	3) 6,39	20

Testēšanas metodes princips

Pie vides apstākļiem atbilstoša temperatūras diapazona aprakstītais ķīmiskais process parasti ir tikai mazliet atkarīgs no temperatūras. Lai noteiktu disociācijas konstanti, nepieciešams izmērīt ķīmiskās vielas disociēto un nedisociēto formu koncentrācijas. Pateicoties zināšanām, kas iegūtas par iepriekš sadaļā "Definīcijas un mērvienības" norādīto disociācijas reakcijas stehiometriju, ir iespējams noteikt attiecīgo konstanti. Šajā testēšanas metodē aprakstītajā konkrētajā gadījumā viela izturas kā skābe vai bāze, un noteikšana ir ērtāk veicama, nosakot vielas jonizēto un nejonizēto formu relatīvās koncentrācijas un šķīduma pH. Sakarība starp šiem lielumiem ir norādīta iepriekš sadaļā "Definīcijas un mērvienības" sniegtajā pK_a vienādojumā. Dažām vielām novērojama vairāk nekā viena disociācijas konstante, un ir iespējams izstrādāt līdzīgus vienādojumus. Dažas no šeit aprakstītajām metodēm ir piemērotas neskābju/nebāzu disociācijām.

Kvalitātes kritēriji

Atkārtotamība

Disociācijas konstante jāreplīcē (ar vismaz trim mērījumiem) $\pm 0,1$ log vienību robežās.

TESTA PROCEDŪRU APRAKSTS

Ir divas pamatpieejas pK_a noteikšanai. Pirmā pieeja ietver zināma daudzuma vielas titrēšanu ar standarta skābi vai attiecīgā gadījumā — ar bāzi; otra pieeja ietver jonizēto un nejonizēto formu relatīvās koncentrācijas un tās pH atkarības noteikšanu.

Sagatavošanās

Uz minētajiem principiem balstītās metodes var klasificēt kā titrēšanas, spektrofotometriskās un konduktometriskās procedūras.

Testējamie šķīdumi

Titrēšanas metodes un konduktometriskās metodes gadījumā ķīmiskā viela jāizšķīdina destilētā ūdenī. Spektrofotometriskās metodes un citu metožu gadījumā izmanto buferšķīdumus. Testējamās vielas koncentrācija nedrīkst pārsniegt 0,01 M vai pusi no piesātināta šķīduma koncentrācijas, un šķīdumu pagatavošanā jāizmanto iespējami tīrākā pieejamā viela. Ja viela ir tikai vāji šķīstoša, pirms tās pievienošanas iepriekš norādītajām koncentrācijām to var izšķīdināt nelielā daudzumā ar ūdeni pilnīgi sajaucama šķīdinātāja.

Ar Tindala staru jāpārbauda emulsiju klātbūtne šķīdumos, jo īpaši, ja šķīdības uzlabošanai ticis izmantots papildu šķīdinātājs. Ja tiek izmantoti buferšķīdumi, buferšķīduma koncentrācija nedrīkst pārsniegt 0,05 M.

Testēšanas apstākļi

Temperatūra

Temperatūra jāuztur vismaz ± 1 °C apmērā. Noteikšanu vēlams veikt 20 °C temperatūrā.

Ja ir aizdomas par būtisku atkarību no temperatūras, noteikšana jāveic vismaz divās citās temperatūrās. Tādā gadījumā temperatūras intervāliem jābūt 10 °C, bet uzturētajai temperatūrai — $\pm 0,1$ °C.

Analīzes

Metodi nosaka, ņemot vērā testējamās vielas raksturīpašības. Tai jābūt pietiekami jutīgai, lai katrā testējamā šķīduma koncentrācijā būtu iespējams noteikt dažādās ķīmiskās sugas [species].

Testa veikšana

Titrēšanas metode

Testējamo šķīdumu nosaka, titrējot ar standarta bāzes vai attiecīgā gadījumā skābes šķīdumu, pēc katras titrēšanas šķīduma pievienošanas izmērot pH. Pirms ekvivalences punkta pakāpeniski jāpievieno vismaz 10 devas. Ja līdzsvars tiek sasniegts pietiekami ātri, var izmantot registrēšanas potenciometru. Lai izmantotu šo metodi, ir precīzi jāzina vielas kopīgais daudzums un tās koncentrācija. Jāveic piesardzības pasākumi, lai izslēgtu oglekļa dioksīda rašanos. Sīkāka informācija par procedūru, drošības pasākumiem un aprēķinu sniegta standarta testos, piemēram, (1), (2), (3) un (4).

Spektrofotometriskā metode

Viļņa garumu konstatē tad, ja jonizētajām un nejonizētajām vielas formām ir ievērojami atšķirīgi ekstinkcijas koeficienti. UV/VIS absorbcijas spektru iegūst no nemainīgas koncentrācijas šķīdumiem pH apstākļos, kur viela ir būtībā nejonizēta un pilnīgi jonizēta un tai ir vairākas pH starpvērtības. To iespējams paveikt, salīdzinot lielam vielas šķīduma daudzumam daudzkomponentu buferi pakāpeniski pievienojot koncentrētas skābes (bāzes) devas, sākotnēji ar augstu (zemu) pH (atsauces līmenis: 5), vai nemainīgiem dažādu buferšķīdumu daudzumiem, kas aptver vēlamo pH diapazonu, pievienojot līdzvērtīgus vielas izejšķīduma daudzumus, piemēram, ūdenī, metanolā. No pH un absorbcijas vērtībām pie izvēlēta viļņa garuma aprēķina pietiekamu pK_a vērtību skaitu, izmantojot datus no vismaz 5 pH, ja vismaz 10 procenti un mazāk nekā 90 procenti vielas ir jonizēti. Sīkāka informācija par eksperimentu un aprēķināšanas metodi sniegta (1).

Konduktometriskā metode

Izmantojot vadītspējas šūnu ar mazu, zināmu šūnas konstanti, mēra aptuveni 0,1 M vielas šķīduma vadītspējīgā ūdenī vadītspēju. Mēra arī vairāku precīzi sagatavotu šā šķīduma atšķaidījumu vadītspēju. Koncentrāciju ikreiz samazina uz pusi, un šai testu virknei jāaptver vismaz koncentrācijas lieluma kārtā. Robežvadītspēju bezgalīgā atšķaidījumā konstatē, veicot līdzīgu eksperimentu ar Na sāli un ekstrapolējot. Tad, izmantojot Onsagera vienādojumu, pēc katra šķīduma vadītspējas iespējams aprēķināt disociācijas pakāpi un tādējādi, izmantojot Ostvalda atšķaidīšanas likumu, disociācijas konstanti var aprēķināt kā $K = \alpha^2 C / (1 - \alpha)$, kur C ir koncentrācija molos uz vienu litru, bet α — disociētā daļa. Jāveic piesardzības pasākumi, lai izslēgtu CO_2 rašanos. Sīkāka informācija par eksperimentu un aprēķināšanas metodi sniegta standarta tekstos un atsaucēs (1), (6) un (7).

DATI UN PĀRSKATA SNIEGŠANA

Rezultātu apstrāde

Titrēšanas metode

Titrēšanas līknē 10 mērīšanas punktiem aprēķina pK_a . Aprēķina minēto pK_a vērtību vidējo un standartnovirzi. Jāiekļauj grafiks, kurā pH atlikts pret standartbāzes vai standartskābes tilpumu, un šīs informācijas attēlojums tabulā.

Spektrofotometriskās metodes

Tabulā norāda datus par katra spektra absorbciju un pH. No starpposma spektra datu punktiem aprēķina vismaz piecas pK_a vērtības, un aprēķina arī šo rezultātu vidējo un standartnovirzi.

Konduktometriskā metode

Katrai skābes koncentrācijai un katrai tāda maisījuma koncentrācijai, kas ir viena skābes ekvivalenta maisījums ar 0,98 karbonātu nesaturoša nātrija hidroksīda ekvivalentiem, aprēķina ekvivalenta vadītspēju Λ . Skābes daudzums ir pārmērīgi liels, lai novērstu hidrolīzes radītu pārmērīgi lielu OH^- . $1/\Lambda$ atliek pret O_2C , un sāls Λ_0 var noteikt, veicot ekstrapolāciju līdz nulles koncentrācijai.

Skābes Λ_0 iespējams aprēķināt, izmantojot literatūras datus par H^+ un Na^+ . Katrai koncentrācijai iespējams aprēķināt pK_a , izmantojot $\alpha = \Lambda_i / \Lambda_0$ un $K_a = \alpha^2 C / (1 - \alpha)$. K_a vērtības iespējams uzlabot, tās koriģējot pēc mobilitātes un aktivitātes. Jāaprēķina pK_a vērtību vidējais un standartnovirzes.

Testēšanas pārskats

Jāsniedz visi neapstrādātie dati un aprēķinātās pK_a vērtības, kā arī iepriekš aprakstītie statistiskie parametri kopā ar aprēķināšanas metodi (vēlams, tabulas veidā, kā norādīts atsaucē Nr. 1). Attiecībā uz titrēšanas metodēm jānorāda sīka informācija par titrēšanas šķīdumu standartizēšanu.

Attiecībā uz spektrofotometrisko metodi jāiesniedz visi spektri. Attiecībā uz konduktometrisko metodi jāsniedz sīka informācija par šūnas konstantes noteikšanu. Jāsniedz informācija par izmantoto paņēmieni, analītiskajām metodēm un visu izmantoto buferšķīdumu raksturīpašībām.

Jānorāda testēšanas temperatūra(-s).

LITERATŪRAS SARAKSTS

- (1) Albert, A. & Sergeant, E.P.: *Ionization Constants of Acids and Bases*, Wiley, Inc., New York, 1962.
- (2) Nelson, N.H. & Faust, S.D.: Acidic dissociation constants of selected aquatic herbicides, *Env. Sci. Tech.* 3, II, pp. 1186-1188 (1969).

- (3) ASTM D 1293 – Annual ASTM Standards, Philadelphia, 1974.
 - (4) Standard Method 242. APHA/AWWA/WPCF, *Standard Methods for the Examination of Water and Waste Water*, 14th Edition, American Public Health Association, Washington, D.C., 1976.
 - (5) Clark, J. & Cunliffe, A.E.: Rapid spectrophotometric measurement of ionisation constants in aqueous solution. *Chem. Ind. (London)* 281, (March 1973).
 - (6) ASTM D 1125 – Annual ASTM Standards, Philadelphia, 1974.
 - (7) Standard Method 205 – APHA/AWWA/NPCF (skatīt iepriekš).
 - (8) *Handbook of Chemistry and Physics*, 60th ed. CRC-Press, Boca Raton, Florida, 33431 (1980)."
- 2) pielikuma B daļā B.5. nodaļu aizstāj ar šādu:

"B.5. AKŪTS ACU KAIRINĀJUMS/KOROZIJA

IEVADS

Šī testēšanas metode ir ekvivalenta ESAO Testēšanas vadlīnijai (TG) Nr. 405 (2012). ESAO ķīmisko vielu testēšanas vadlīnijas tiek regulāri pārskatītas, lai nodrošinātu, ka tās atspoguļo jaunākos sasniegumus zinātnē. Iepriekšējās šīs testēšanas vadlīnijas pārskatīšanas reizēs īpaša vērība tika veltīta iespējamajiem uzlabojumiem, kas saistīti ar visas par testējamo ķīmikāliju pieejamās informācijas izvērtēšanu, lai nebūtu jāveic nevajadzīgi testi ar laboratorijas dzīvniekiem un tādējādi tiktu ievērotas dzīvnieku labturības prasības. TG 405 (pieņemti 1981. gadā un atjaunināti 1987., 2002. un 2012. gadā) ir iekļauts ieteikums pirms aprakstītā akūta acu kairinājuma/korozijas *in vivo* testa veikšanas veikt relevanto esošo datu pierādījumu svara analīzi (1). Ja esošie dati ir nepietiekami, tos ieteicams papildināt secīgā testēšanā (2) (3). Testēšanas stratēģijā ietilpst validētu un vispārpieņemtu *in vitro* testu veikšana, un tā pievienota kā papildinājums šai testēšanas metodei. Regulas (EK) Nr. 1907/2006, kas attiecas uz ķīmikāliju reģistrēšanu, vērtēšanu, licencēšanu un ierobežošanu (REACH) ⁽¹⁾, vajadzībām attiecīgajos ECHA norādījumos ir ietverta arī integrēta testēšanas stratēģija (21). Testi ar dzīvniekiem jāveic vienīgi tad, ja tāda nepieciešamība ir konstatēta pēc pieejamo alternatīvo metožu apsvēršanas un piemēroto metožu izmantošanas. Šīs atjauninātās testēšanas metodes izstrādes laikā ir konstatēti gadījumi, kad šīs testēšanas metodes izmantošana joprojām ir nepieciešama vai to prasa atsevišķi reglamentējošie noteikumi.

Jaunākais atjauninājums galvenokārt ir vērsts uz analģētisko līdzekļu un anestēzijas līdzekļu izmantošanu un neietekmē testēšanas vadlīnijas pamatkonceptu un struktūru. ICCVAM ⁽²⁾ kopā ar starptautisku neatkarīgu profesionālvērtēšanas komisiju pārskatīja vietējās anestēzijas līdzekļu, sistēmisko analģētisko līdzekļu regulāra izmantojuma un humānu beigupunktu lietderīgumu un ierobežojumus attiecībā uz acu kairinājumu *in vivo* drošuma testos (12). Šajā pārskatā tika secināts, ka vietējās anestēzijas līdzekļu un sistēmisko analģētisko līdzekļu izmantojums varētu novērst visas vai gandrīz visas sāpes un diskomfortu, neietekmējot testa rezultātu, un tika ieteikts vienmēr izmantot šīs vielas. Šajā testēšanas metodē ir ņemts vērā minētais pārskats. Vietējās anestēzijas līdzekļi, sistēmiskie analģētiskie līdzekļi un humāni beigupunkti akūta acu kairinājuma un korozijas *in vivo* testēšanā jāizmanto pastāvīgi. To nelietošana jāpamato. Šajā metodē aprakstītie uzlabojumi vairumā testēšanas gadījumu, kuros joprojām nepieciešams veikt acu drošuma *in vivo* testēšanu, dzīvniekiem būtiski samazinās vai novērsīs sāpes un diskomfortu.

Līdzsvarotā, preventīvā atsāpīnāšanā jāiekļauj: i) standarta pirmapstrāde ar vietējās anestēzijas līdzekli (piemēram, proparakāinu vai tetrakāinu) un sistēmisko analģētisko līdzekli (piemēram, buprenorfinu); ii) standarta pēcapstrāde ar sistēmiskajiem analģētiskajiem līdzekļiem (piemēram, buprenorfinu un meloksikāmu); iii) dzīvnieku ar klīniskām sāpju un/vai diskomforta pazīmēm plānveida novērošana, monitorēšana un reģistrēšana; un iv) visu acu bojājumu veida, smaguma pakāpes un attīstības plānveida novērošana, uzraudzība un reģistrēšana. Sīkāka informācija ir sniegta turpmāk aprakstītajās atjauninātajās procedūrās. Pēc testējamās ķīmikālijas ievadīšanas nedrīkst ievadīt nevienu citu vietējās anestēzijas vai analģētisko līdzekli, lai neradītu traucējumus pētījumā. Analģētiskos līdzekļus ar pretiekaisuma iedarbību (piemēram, meloksikāmu) nedrīkst aplicēt topikāli, un sistēmiski izmantotās devas nedrīkst mainīt ietekmi uz acīm.

Definīcijas ir izklāstītas šīs testēšanas metodes papildinājumā.

⁽¹⁾ Eiropas Parlamenta un Padomes 2006. gada 18. decembra Regula (EK) Nr. 1907/2006, kas attiecas uz ķīmikāliju reģistrēšanu, vērtēšanu, licencēšanu un ierobežošanu (REACH), un ar kuru izveido Eiropas Ķīmikāliju aģentūru, groza Direktīvu 1999/45/EK un atceļ Padomes Regulu (EEK) Nr. 793/93 un Komisijas Regulu (EK) Nr. 1488/94, kā arī Padomes Direktīvu 76/769/EEK un Komisijas Direktīvu 91/155/EEK, 93/67/EEK, 93/105/EK un 2000/21/EK. OV L 304, 22.11.2007., 1. lpp.

⁽²⁾ ASV Alternatīvo metožu validēšanas koordinēšanas starpāģentūru komiteja.

SĀKOTNĒJIE APSVĒRUMI

Gan zinātniskās precizitātes dēļ, gan ņemot vērā dzīvnieku labturības apsvērumus, *in vivo* testi nav jāveic, kamēr pierādījumu svara analīzē nav izvērtēti visi pieejamie relevantie dati par ķīmikālijas iespējamo korozīvo/kairinošo ietekmi uz acīm. Tie ir ar cilvēkiem un/vai laboratorijas dzīvniekiem veiktajos pētījumos iegūtie dati, pierādījumi par vienas vai vairāku strukturāli radniecīgu vielu vai šādu vielu maisījumu korozīvo/kairinošo ietekmi uz acīm, dati, kas liecina, ka attiecīgajai ķīmikālijai ir liels skābums vai sārmainība (4) (5), kā arī validētos un vispārpieņemtos *in vitro* vai *ex vivo* testos iegūti rezultāti par ādas koroziju un korozīvo/kairinošo ietekmi uz acīm (6) (13) (14) (15) (16) (17). Pētījumi var būt veikti pirms pierādījumu svara analīzes vai tās dēļ.

Dažu ķīmikāliju gadījumā šāda analīze var norādīt uz nepieciešamību veikt *in vivo* pētījumus par to potenciālu izraisīt acu koroziju/kairinājumu. Visos tādos gadījumos pirms *in vivo* acu testa apsvēršanas ieteicams vispirms veikt pētījumu par ķīmikālijas korozīvo ietekmi uz ādu *in vitro* un/vai *in vivo* un to izvērtēt saskaņā ar secīgās testēšanas stratēģiju testēšanas metodē B.4. (7) vai ECHA norādījumos (21) aprakstīto integrētās testēšanas stratēģiju.

Secīgās testēšanas stratēģija, kas ietver acu korozijas/kairinājuma validēto *in vitro* vai *ex vivo* testu veikšanu, ir ietverta kā papildinājums šai testēšanas metodei un — REACH regulas izpildei — ECHA norādījumos (21). Pirms *in vivo* testu veikšanas ieteicams izpildīt šādu testēšanas stratēģiju. Attiecībā uz jaunām ķīmikālijām ieteicams izmantot pakāpeniskas testēšanas pieeju, lai iegūtu zinātniski pamatotus datus par ķīmikālijas korozivitāti/kairinātspēju. Attiecībā uz esošajām ķīmikālijām, par kurām nav pietiekamu datu, kas raksturo to korozīvo/kairinošo ietekmi uz ādu un acīm, šo stratēģiju var izmantot trūkstošo datu iegūšanai. Lēmums izmantot atšķirīgu testēšanas stratēģiju vai procedūru vai lēmums neveikt pakāpenisku testēšanu ir jāpamato.

IN VIVO TESTA PRINCIPS

Pēc pirmapstrādes ar sistēmisku analgētisko līdzekli un pienācīgas vietējās anestēzijas inducēšanas testējamo ķīmikāliju vienā devā aplicē vienai no eksperimenta dzīvnieka acīm; neapstrādāto aci izmanto kontrolei. Acs koroziju/kairinājumu novērtē pēc konjunktīvas, radzenes un varavīksnenes bojājumu pakāpes noteiktos laika intervālos. Lai ietekmi novērtētu pilnīgi, apraksta arī citu veidu ietekmi uz aci, kā arī nelabvēlīgu sistēmisku ietekmi. Pētījumi jāveic tik ilgi, lai varētu novērtēt novērotās ietekmes atgriezeniskumu vai neatgriezeniskumu.

Dzīvnieki, kam kādā testa posmā ir stipru sāpju un/vai diskomforta pazīmes vai bojājumi, kuri sakrīt ar šajā testēšanas metodē aprakstītajiem humānajiem beigupunktiem (skatīt 26. punktu), humāni jānonāvē, un testējamā ķīmikālija attiecīgi jānovērtē. Kritēriji, pēc kuriem pieņem lēmumu humāni nonāvēt mirstošus dzīvniekus un dzīvniekus, kam ir smagas ciešanas, ir sniegti ESAO norādījumu dokumentā

SAGATAVOŠANĀS IN VIVO TESTAM

Sugas izvēle

Piemērotākais laboratorijas dzīvnieks ir albīnais trusis; izmanto jaunus, veselus pieaugušus dzīvniekus. Citu celmu [strain] vai sugu izmantošana jāpamato.

Dzīvnieku sagatavošana

Katram provizoriski atlasītajam eksperimenta dzīvniekam ne vairāk kā 24 stundas pirms testa sākšanas pārbauda abas acis. Dzīvnieki ar acu kairinājuma pazīmēm, acu defektiem vai iepriekšējiem radzenes bojājumiem nav izmantojami.

Turēšanas un barošanas apstākļi

Dzīvnieki jātur atsevišķi. Telpā, kurā tur eksperimenta dzīvniekus, trušiem nepieciešama 20 °C ($\pm$ 3 °C) temperatūra. Lai gan, izņemot telpu uzkopšanas laiku, relatīvajam mitrumam jābūt vismaz 30 % un, vēlams, ne vairāk kā 70 %, tas jāuztur 50–60 % robežās. Dzīvniekus 12 stundas diennaktī tur mākslīgā apgaismojumā, bet 12 stundas — tumsā. Jāizvairās no pārmērīgas gaismas intensitātes. Var izmantot parasto laboratorijas barību ar neierobežotu piekļuvi dzeramajam ūdenim.

TESTA PROCEDŪRA

Vietējās anestēzijas līdzekļu un sistēmisko analgētisko līdzekļu lietošana

Lai acs drošības testēšanas procedūru laikā novērstu vai līdz minimumam samazinātu sāpes un diskomfortu, ieteicams izmantot turpmāk norādītās procedūras. Tās iespējams aizstāt ar citām procedūrām, ja ir noteikts, ka tās novērš vai atvieglo sāpes un diskomfortu tikpat labi vai vēl labāk.

- Sešdesmit minūtes pirms testējamās ķīmikālijas aplicēšanas (TCA) ar zemādas injekciju ievada buprenorfinu (0,01 mg/kg), lai nodrošinātu terapeitisku sistēmiskās atsāpīnāšanas līmeni. Nav zināms vai paredzams, ka buprenorfīns un citi līdzīgi analgētiskie līdzekļi opioīdi, kurus sistēmiski ievada, mainītu acs atbildreakciju (12).
- Piecas minūtes pirms TCA katrai acij aplicē vienu vai divus pilienus acu vietējās anestēzijas līdzekļa (piemēram, 0,5 % proksimetakaina hidrohlorīda vai 0,5 % tetrakaina hidrohlorīda). Lai neietekmētu pētījumu, ieteicams izmantot vietējās anestēzijas līdzekli, kura sastāvā nav konservantu. Tā katra dzīvnieka acs, kas nav apstrādāta ar testējamo ķīmikāliju, bet ir apstrādāta ar vietējās anestēzijas līdzekli, kalpo kontroles nolūkiem. Ja paredzams, ka testējamā ķīmikālija radīs būtiskas sāpes un diskomfortu, tai parasti nevajadzētu veikt *in vivo* testu. Tomēr šaubu gadījumā vai tad, ja testēšana ir vajadzīga, jāapsver papildu apstrāde ar vietējās anestēzijas līdzekli, kas pirms TCA jāveic ik pēc 5 minūtēm. Lietotājiem jāapzinās, ka vairākkārtēja apstrāde ar vietējās anestēzijas līdzekli varētu mazliet pasliktināt ķīmikālijas izraisītos bojājumus un/vai pagarināt laiku, kas nepieciešams, lai tie izzustu.
- Astoņas stundas pēc TCA ar zemādas injekciju ievada buprenorfinu — 0,01 mg/kg — SC un meloksikāmu — 0,5 mg/kg —, lai turpinātu nodrošināt terapeitisku sistēmiskās atsāpīnāšanas līmeni. Kaut arī nav datu, kas liecinātu, ka meloksikāmam ir pretiekaisuma ietekme uz aci, ja to reizi dienā ievada ar zemādas injekciju, meloksikāmu nevajadzētu ievadīt, kamēr nav apritējušas vismaz 8 stundas pēc TCA, lai pētījumu nekādi neietekmētu (12).
- Pēc sākotnējās 8 stundu ilgās apstrādes, ko veic pēc TCA, ar zemādas injekciju ik pēc 12 stundām jāievada buprenorfīns — 0,01 mg/kg — kopā ar meloksikāmu — 0,5 mg/kg —, ko ar zemādas injekciju ievada ik pēc 24 stundām, līdz acs bojājumi ir novērsti un nav novērojamas sāpju vai diskomforta klīniskās pazīmes. Ir pieejami ilgstošas iedarbības analgētiskie līdzekļi, kuru izmantošanu varētu apsvērt, lai samazinātu analgētisko līdzekļu devu biežumu.
- Ja ar preventīvo analgētisko līdzekli un vietējās anestēzijas līdzekli nepietiek, tūlīt pēc TCA jāapplicē analgētiskais “glābšanas” līdzeklis. Ja pētījuma laikā dzīvniekam novērojamas sāpju vai diskomforta pazīmes, ar zemādas injekciju nekavējoties ievada buprenorfīna “glābšanas” devu — 0,03 mg/kg —, ko vajadzības gadījumā atkārtoti pat ik pēc 8 stundām, nevis 0,01 mg/kg ar zemādas injekciju ik pēc 12 stundām. Ik pēc 24 stundām, bet ne agrāk kā vismaz 8 stundas pēc TCA kopā ar buprenorfīna “glābšanas” devu ar zemādas injekciju jāievada meloksikāms — 0,5 mg/kg.

Testējamās ķīmikālijas ievadišana

Testējamo ķīmikāliju katram dzīvniekam ievada vienas acs konjunktīvas maisā, pirms tam apakšējo plakstiņu viegli pavelkot nost no acābola. Pēc tam plakstiņus apmēram vienu sekundi viegli tur kopā, lai viela neizplūstu. Otrā acs paliek neapstrādāta, un to izmanto kontroles nolūkos.

Skalošana

Testa dzīvniekiem acis nedrīkst skalot vismaz 24 stundas pēc testējamās ķīmikālijas ievadišanas, izņemot gadījumus, kad ievada cietvielas (skatīt 18. punktu), kā arī tad, kad novērojama tūlītēja kairinoša vai kodīga iedarbība. Pēc 24 stundām acis vajadzības gadījumā var izskalot.

Izņemot gadījumus, kad tas ir zinātniski pamatoti, nav ieteicams veikt pētījumus ar satelītgrupu, lai noskaidrotu skalošanas ietekmi. Ja satelītgrupa ir vajadzīga, jāizmanto divi truši. Precīzi jādokumentē skalošanas apstākļi, piemēram, skalošanas laiks, skalojamā šķidruma sastāvs un temperatūra; ilgums, tīlums un ātrums.

Devas līmenis

1) Šķidrumu testēšana

Šķidrumu testēšanai izmanto 0,1 ml devu. Ķīmikālijas ievadīšanai tieši acī nedrīkst izmantot smidzinātājus. Pirms iepilināt acī 0,1 ml šķidra aerosola, tas vispirms jāizsmidzina un jāsavāc tvertnē.

2) Cietvielu testēšana

Testējot cietvielas, pastas un ķīmikālijas daļiņu veidā, izmantojamajam daudzumam jābūt 0,1 ml pēc tilpuma vai ne vairāk kā 100 mg pēc masas. Testējamā ķīmikālija jāsaaberž smalkā pulverī. Cietu vielu tilpums jāmēra pēc to vieglas sablīvēšanas, piemēram, sakratot mētrauku. Ja testējamā cietā ķīmikālija līdz pirmajam novērojumam laukpunktam 1 stundu pēc ievadīšanas nav no testa dzīvnieka acs izvadīta ar fizioloģiskiem mehānismiem, aci var izskalot ar sālsūdeni vai destilētu ūdeni.

3) Aerosolu testēšana

Visas ar sūkni izsmidzināmās vielas un aerosolus pirms ievadīšanas acī ieteicams vispirms izsmidzināt un savākt tvertnē. Vienīgais izņēmums ir ķīmikālijas aerosola baloniņos zem spiediena, kuras nav iespējams savākt tvertnē iztvaikošanas dēļ. Šādos gadījumos acs jātur atvērta un testējamā ķīmikālija jāievada acī, to apmēram vienu sekundi izsmidzinot no 10 cm attāluma tieši uz acābola. Attālumu var mainīt atkarībā no spiediena aerosola baloniņā un tā satura. Jāraugās, lai acij bojājumus nenodarītu aerosola baloniņa spiediens. Atsevišķos gadījumos var būt vajadzīgs novērtēt iespējamās mehāniskās acs bojājumus, ko varētu radīt aerosola baloniņa spiediens.

Ar aerosola balonu ievadīto devu var noteikt, testu imitējot šādi — ķīmikāliju izsmidzina uz sverampapīra [*weighing paper*] caur truša acs lieluma atveri tieši pie papīra. Acī iesmidzināto devu aptuveni nosaka, izmērot papīra svara palielinājumu. Gaistošām ķīmikālijām devu var noteikt, uztvērējtvētni nosverot pirms testējamās ķīmikālijas izņemšanas un pēc tās.

Sākotnējais tests (acs kairinājuma/korozijas *in vivo* tests ar vienu dzīvnieku)

Stingri ieteicams *in vivo* testus sākt, izmantojot vienu dzīvnieku (sk. šīs testēšanas metodes papildinājumu “Vielas acu kairinājuma un kodīgās iedarbības secīgas testēšanas stratēģija”). Pirms tiek sākta apstiprinošā testa veikšana ar otro dzīvnieku, jābūt iespējai ar novērojumiem noteikt bojājumu smaguma pakāpi un atgriezeniskumu.

Ja pēc iepriekš aprakstītās procedūras iegūtie testa rezultāti liecina, ka ķīmikālijai ir koroziņa vai stipri kairinoša iedarbība uz acīm, tālāku acs kairinājuma testēšanu neveic.

Apstiprinājuma tests (acu kairinājuma *in vivo* tests ar papildu dzīvniekiem)

Ja koroziņa vai stipri kairinoša iedarbība sākotnējā testā nav novērota, kairinošā iedarbība vai tās neesība jāapstiprina testos ar vienu vai diviem papildu dzīvniekiem. Ja sākotnējā testā ir novērojama kairinoša iedarbība, ieteicams apstiprinošo testu veikt secīgi, izmantojot pa vienam dzīvniekam, nevis vienlaikus izmantot divus papildu dzīvniekus. Ja otram dzīvniekam konstatē koroziņu vai stipri kairinošu iedarbību, testu neturpina. Ja no otrā dzīvnieka iegūtie rezultāti ir pietiekami, lai būtu iespējams ķīmikāliju klasificēt pēc bīstamības, turpmāku testēšanu neveic.

Novērošanas periods

Novērojumi jāveic pietiekami ilgi, lai varētu pilnīgi novērtēt novērotās ietekmes intensitāti un atgriezeniskumu. Taču, ja dzīvniekiem parādās stipru sāpju vai diskomforta pazīmes (8), eksperiments vienmēr uzreiz jāpārtrauc. Lai noteiktu ietekmes atgriezeniskumu, dzīvnieki parasti jānovēro 21 dienu pēc testējamās ķīmikālijas ievadīšanas. Ja iedarbības atgriezeniskumu konstatē, pirms ir beidzies 21 dienas periods, eksperimentu attiecīgi beidz ātrāk.

Kliniskie novērojumi un acs reakciju klasificēšana

Vienu stundu pēc TCA acis rūpīgi jāizmeklē attiecībā uz acs bojājumu esamību vai neesību; pēc tam izmeklēšanu veic vismaz reizi dienā. Pirmajās trīs dienās dzīvnieki jāizmeklē vairākas reizes dienā, lai nodrošinātu, ka lēmumi testu beigās tiek pieņemti savlaicīgi. Visa pētījuma laikā regulāri, vismaz divas reizes dienā ar vismaz 6 stundu intervālu starp novērojumiem vai vajadzības gadījumā biežāk, jāizvērtē, vai eksperimenta dzīvniekiem nav sāpju un/vai diskomforta klīnisko pazīmju (piemēram, atkārtota acs aizskaršana vai berzēšana ar ķepu, pārmērīga mirkšķināšana, pārmērīga asarošana) (9) (10) (11). Tas jā dara, lai i) pienācīgi novērtētu dzīvnieku sāpju un diskomforta pazīmes un pieņemtu apzinātus lēmumus par nepieciešamību palielināt analgētisko līdzekļu devu un ii) novērtētu, vai dzīvniekiem nav iestājušās noteikto humāno beigupunktu pazīmes, un pieņemtu informētus lēmumus par to, vai dzīvnieki būtu humāni jāeitanizē, un nodrošinātu tādu lēmumu savlaicīgu pieņemšanu. Standarta kārtā jāizņemto iekrāsošana ar fluoresceīnu, un vajadzības gadījumā jālieto spraugas lampas biomikroskops (piemēram, novērtējot bojājuma dziļumu, ja novērojama radzenes ulcerācija), kas var palīdzēt detektēt un izmērīt acs bojājumus un ar ko novērtē, vai nav sasniegti noteiktie humānas eitanizācijas beigupunkta kritēriji. Novēroto bojājumu digitālās fotogrāfijas var apkopot kā atsaucē materiālus un izmantot par pastāvīgu acs bojājuma apmēra liecību. Dzīvnieki testā nav jātur ilgāk par galīgas informācijas iegūšanai vajadzīgo laiku. Dzīvniekus ar stipru sāpju vai diskomforta pazīmēm nekavējoties humāni nonāvē, un testējamo ķīmikāliju attiecīgi novērtē.

Humāni nonāvē dzīvniekus, kuriem pēc ķīmikālijas iepilināšanas rodas šādi acs bojājumi (skatīt 1. tabulu ar bojājuma pakāpju aprakstiem): radzenes perforācija vai liela radzenes ulcerācija, tostarp stafiloma; asinis acābola priekšējā kamerā; 4. pakāpes radzenes aptumšošanās; nereaģēšana uz gaismu (2. pakāpes varavīksnenes reakcija) ilgāk nekā 72 stundas; konjunktīvas ulcerācija; konjunktīvas vai mirkšķināšanas membrānas nekroze; vai nekrotisko audu lobīšanās. Tā rīkojas tāpēc, ka šādi bojājumi parasti ir neatgriezeniski. Turklāt ieteicams minētos acs bojājumus izmantot par humānajiem beigupunktiem pētījumu pārtraukšanai pirms 21 dienas novērošanas perioda beigām. Tiek uzskatīts, ka šie bojājumi liecina par smagiem kairinošiem vai korozīviem bojājumiem un tādiem bojājumiem, kuru izzūšana līdz 21 dienas novērošanas perioda beigām ir maz ticama: ļoti dziļš bojājums (piem., radzenes ulcerācija pārsniedz stromas virsējos slāņus), > 50 % radzenes malas zaudējums (par ko liecina konjunktīvas audu izbalēšana) un smaga acs infekcija (strutaini izdalījumi). Radzenes virsmas vaskularizācija (t. i., pannuss); ar fluoresceīnu iekrāsotās daļas nemazināšanās, kas konstatēta ikdienas novērtēšanā; un/vai tas, ka 5 dienas pēc testējamās ķīmikālijas aplicēšanas nenotiek reepitelizācija, — arī šo pazīmju kombināciju var uzskatīt par potenciāli lietderīgiem kritērijiem, kas var pamudināt pieņemt klīnisku lēmumu pētījumu priekšlaicīgi izbeigt. Tomēr katrs no šiem konstatējumiem atsevišķi nav pietiekams iemesls pētījuma priekšlaicīgai izbeigšanai. Līdzko ir konstatēta smaga ietekme uz acīm, jākonsultējas ar laboratorijas dzīvnieku ārstējošo ārstu, kvalificētu veterinārārstu vai darbinieku, kurš ir apmācīts klīnisko bojājumu identificēšanā, lai noteiktu, vai šādas ietekmes kopā dod pamatu pētījumu izbeigt priekšlaicīgi. Acs (konjunktīvas, radzenes, varavīksnenes) reakcijas pakāpes nosaka un reģistrē 1, 24, 48 un 72 stundas pēc testējamās ķīmikālijas ievadīšanas (1. tabula). Dzīvniekiem, kuriem acs bojājumi neveidojas, pētījumu var izbeigt ne agrāk kā 3 dienas pēc ķīmikālijas iepilināšanas. Dzīvnieki ar acs bojājumiem, kas nav smagi, jānovēro, līdz bojājumi izzūd, vai 21 dienu periodu, pēc kura apritēšanas pētījumu izbeidz. Novērojumi jāveic un jāreģistrē vismaz 1 stundu, 24 stundas, 48 stundas, 72 stundas, 7 dienas, 14 dienas un 21 dienu, lai novērtētu bojājumu stāvokli un to atgriezeniskumu vai neatgriezeniskumu. Ja nepieciešams, jāveic biežāki novērojumi, lai noteiktu, vai eksperimenta dzīvniekiem humānu apsvērumu dēļ nav jāveic eitanizācija vai tie nav jāizņem no pētījuma negatīvu rezultātu dēļ.

Pēc katras apskates jāreģistrē acs bojājumu pakāpe (1. tabula). Reģistrē arī visus pārējos acs bojājumus (piem., pannusu, iekrāsošanos, izmaiņas acābola priekšējā kamerā) un nelabvēlīgu sistēmisku ietekmi.

Atbildreakciju izvērtēšanai var izmantot binokulāro lupu, pārnēsājamu spraugas lampu, biomikroskopu vai citas piemērotas ierīces. Kad reģistrēti novērojumi pēc 24 stundām, turpmākām acu pārbaudēm var izmantot fluoresceīnu.

Acs atbildreakciju klasifikācija ir neizbēgami subjektīva. Lai veicinātu acs atbildreakciju klasifikācijas saskaņošanu un palīdzētu testēšanas laboratorijām, kā arī novērojumu veicējiem un interpretētājiem, personālam, kas veic novērojumus, jābūt pietiekami apmācītam par izmantojamo klasifikācijas sistēmu.

DATI UN PĀRSKATA SNIEGŠANA

Rezultātu izvērtējums

Acu kairinājuma rādītāji jānovērtē, ņemot vērā bojājumu raksturu un smagumu, to atgriezeniskumu vai neatgriezeniskumu. Atsevišķie rādītāji nav uzskatāmi par ķīmikālijas kairinošo īpašību absolūtu standartu, jo tiek novērtēta arī cita testējamās ķīmikālijas ietekme. Tāpēc atsevišķie rādītāji jāuzskata par atsauces vērtībām un tiem ir nozīme tikai tad, ja tie tiek pamatoti ar pilnīgiem aprakstiem un visu novērojumu izvērtējumu.

Testēšanas pārskats

Testēšanas pārskatā jāiekļauj tālāk norādītā informācija.

In vivo testa veikšanas pamatojums: iepriekš veikto testu datu, tostarp pēc secīgās testēšanas stratēģijas iegūto rezultātu, analīze pēc pierādījumu svara:

- relevantu iepriekš veiktajos testos iegūto datu apraksts,
- katrā testēšanas stratēģijas posmā iegūtie dati,
- veikto *in vitro* testu apraksts, tostarp sākas ziņas par izmantotajām procedūrām, rezultātiem, kas iegūti ar testējamajām/standarta ķīmikālijām,
- veikto *in vivo* ādas kairinājuma/korozijas pētījumu apraksti, tostarp iegūtie rezultāti,
- *in vivo* pētījumam nepieciešamā pierādījumu svara analīze.

Testējamā ķīmikālija:

- identifikācijas dati (piem., ķīmiskais nosaukums un CAS numurs (ja ir), tīrība, zināmie piemaisījumi, avots, sērijas numurs),
- fizikālās un fizikālķīmiskās īpašības (piem., pH, gaistamība, šķīdība, stabilitāte, spēja reaģēt ar ūdeni),
- maisījumam: komponenti jāidentificē, norādot identifikācijas datus par to sastāvā esošajām vielām (piem., ķīmiskie nosaukumi un CAS numuri (ja ir)) un to koncentrācijas,
- aplicētās devas lielums.

Nesējs:

- identifikācija, koncentrācija (attiecīgā gadījumā), izmantotais tilpums,
- nesēja izvēles pamatojums.

Testa dzīvnieki:

- izmantotais celms/līnija, izvēles pamatojums gadījumos, kad neizmanto albīnos trušus,
- katra dzīvnieka vecums pētījuma sākumā,
- katra dzīvnieka dzīvnieku skaits testa un kontroles grupās (ja vajadzīgs),
- katra dzīvnieka svars testa sākumā un beigās,
- izcelsme, turēšanas apstākļi, barošana u. c.

Anestēzijas līdzekļi un analgētiskie līdzekļi:

- vietējās anestēzijas līdzekļu un sistēmisko analgētisko līdzekļu ievadīšanas devas un laiki,
- ja izmantots vietējās anestēzijas līdzeklis, tā identifikācija, tīrība, veids un iespējamā mijiedarbība ar testējamo ķīmikāliju.

Rezultāti:

- visos novērojumu laikos kairinājuma novērtēšanai izmantoto metožu apraksts (piemēram, pārnēsājamā spraugas lampa, biomikroskops, fluoresceīns),
- tabulā apkopoti kairinājuma/korozijas dati par katru dzīvnieku katrā novērošanas laikā līdz attiecīgā dzīvnieka izņemšanai no testa,
- novērotā kairinājuma un korozijas pakāpes un rakstura apraksts,
- citu novēroto acs bojājumu apraksts (piemēram, vaskularizācija, pannusa veidošanās, saaugumi, iekrāsošanās),
- ar aci nesaistītas nelabvēlīgas vietējas vai sistēmiskas ietekmes apraksts, sāpju un diskomforta klīnisko pazīmju pieraksts, digitālās fotogrāfijas un histopatoloģisko izmeklējumu rezultāti, ja tie veikti.

Rezultātu apspriešana**Rezultātu interpretācija**

Laboratorijas dzīvnieku acu kairinājuma pētījumu rezultātus ekstrapolēt uz cilvēkiem ir pamatoti tikai līdz zināmai pakāpei. Daudzos gadījumos albīnie truši pret acīm korozīvām vai kairinošām vielām ir jutīgāki nekā cilvēki.

Interpretējot datus, jāraugās, lai tiktu izslēgts kairinājums, ko radījusi sekundāra infekcija.

LITERATŪRAS SARAKSTS

- (1) Barratt, M.D., *et al.* (1995), The Integrated Use of Alternative Approaches for Predicting Toxic Hazard, ECVAM Workshop Report 8, ATLA 23, 410 – 429.
- (2) de Silva, O., *et al.* (1997), Evaluation of Eye Irritation Potential: Statistical Analysis and Tier Testing Strategies, Food Chem. Toxicol 35, 159 – 164.
- (3) Worth A.P. and Fentem J.H. (1999), A general approach for evaluating stepwise testing strategies ATLA 27, 161-177.
- (4) Young, J.R., *et al.* (1988), Classification as Corrosive or Irritant to Skin of Preparations Containing Acidic or Alkaline Substance Without Testing on Animals, Toxicol. In Vitro, 2, 19 – 26.
- (5) Neun, D.J. (1993), Effects of Alkalinity on the Eye Irritation Potential of Solutions Prepared at a Single pH, J. Toxicol. Cut. Ocular Toxicol. 12, 227 – 231.
- (6) Fentem, J.H., *et al.* (1998), The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team, Toxicology in vitro 12, pp.483 – 524.
- (7) Šā pielikuma B.4. nodaļa “Akūts ādas kairinājums/korozija”.
- (8) OECD (2000), Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. OECD Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 19. (<http://www.oecd.org/ehs/test/monos.htm>).
- (9) Wright EM, Marcella KL, Woodson JF. (1985), Animal pain: evaluation and control, Lab Animal, May/June, 20-36.
- (10) National Research Council (NRC) (2008), Recognition and Alleviation of Distress in Laboratory Animals, Washington, DC: The National Academies Press.
- (11) National Research Council (NRC) (2009), Recognition and Alleviation of Pain in Laboratory Animals, Washington, DC: The National Academies Press.

- (12) ICCVAM (2010), ICCVAM Test Method Evaluation Report: Recommendations for Routine Use of Topical Anesthetics, Systemic Analgesics, and Humane Endpoints to Avoid or Minimize Pain and Distress in Ocular Safety Testing, NIH Publication No. 10-7514, Research Triangle Park, NC, USA: National Institute of Environmental Health Sciences.

<http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/OcuAnest-TMER.htm>

- (13) Šā pielikuma B.40. nodaļa "Ādas korozija *in vitro*: transkutānās elektriskās pretestības (TEP) tests".
- (14) Šā pielikuma B.40.a. nodaļa "Ādas korozija *in vitro*: cilvēka ādas modeļa tests".
- (15) OECD (2006), *Test No. 435: In vitro Membrane Barrier Test Method for Skin corrosion*, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Paris.
- (16) Šā pielikuma B.47. nodaļa "Lielopu radzenes apduļķošanās un caurlaidības testēšanas metode, kurā identificē i) nopietnu acu bojājumu inducētās ķīmikālijas un ii) ķīmikālijas, kuras nav jāklasificē par tādām, kas izraisa acu kairinājumu vai nopietnus acu bojājumus".
- (17) Šā pielikuma B.48. nodaļa "Izolētas vistas acs testēšanas metode, kurā identificē i) nopietnu acu bojājumu inducētās ķīmikālijas un ii) ķīmikālijas, kuras nav jāklasificē par tādām, kas izraisa acu kairinājumu vai nopietnus acu bojājumus".
- (18) U.S. EPA (2003), *Label Review Manual: 3rd Edition*, EPA737-B-96-001, Washington, DC: U.S., Environmental Protection Agency.
- (19) UN (2011), *Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS)*, Fourth revised edition, New York & Geneva: United Nations Publications.
- (20) EK (2008), Eiropas Parlamenta un Padomes 2008. gada 16. decembra Regula (EK) Nr. 1272/2008 par vielu un maisījumu klasificēšanu, marķēšanu un iepakojšanu un ar ko groza un atceļ Direktīvas 67/548/EEK un 1999/45/EK un groza Regulu (EK) Nr. 1907/2006. *Eiropas Savienības Oficiālais Vēstnesis* L353, 1-1355.
- (21) ECHA Guidance on information requirements and chemical safety assessment, Chapter R.7a: Endpoint specific guidance.

http://echa.europa.eu/documents/10162/13632/information_requirements_r7a_en.pdf

1. tabula

Acs bojājumu klasifikācija

Radzene	Pakāpe
Apduļķojums – blīvuma pakāpe (nolasījumi jāveic visblīvākajā zonā) (*)	
Ne ulcerācijas, ne apduļķojuma nav	0
Izkaisītas vai difūzas apduļķojuma zonas (izņemot normāla spīduma vieglu blāvumu); varavīksnenes daļas labi saskatāmas	1
Caurspīdīgā daļa viegli izšķirama; varavīksnenes daļas redzamas nedaudz neskaidri	2
Perlamutra zona; varavīksnenes daļas nav redzamas; acs zīlītes izmērs tikko redzams	3

Radzene	Pakāpe
Radzene necaurredzama; varavīksnene cauri apduļķojumam nav samanāma	4
Maksimāli iespējamie: 4	
Varavīksnene	
Norma	0
Krokas redzami padziļinātas, aizsprostojums, pietūkums, mērena apradzenes hiperēmija;vai asinsizplūdums; varavīksnene reaģē uz gaismu (par reakciju uzskata arī lēnu reakciju)	1
Asiņošana, vispārējs bojājums vai nav reakcijas uz gaismu	2
Maksimāli iespējamie: 2	
Konjunktīva	
Apsārtums (attiecas uz plakstiņu un acābola konjunktīvu, bet ne uz radzeni un varavīksneni)	
Norma	0
Daži asinsvadi izteikti hiperēmiski (piepildīti)	1
Difūza, tumšsarkana krāsa; atsevišķi asinsvadi grūti izšķirami	2
Difūza tumšsarkana liellopu gaļas krāsa	3
Maksimāli iespējamie: 3	
Hemoze	
Pietūkums (attiecas uz plakstiņiem un/vai mirkšķināšanas membrānām)	
Norma	0
Neliels pietūkums virs normas	1
Acīmredzams pietūkums ar plakstiņu daļēju izgriešanos	2
Pietūkums, plakstiņi apmēram pusaizvērti	3
Pietūkums, plakstiņi vairāk nekā pusaizvērti	4
Maksimāli iespējamie: 4	
(*) Jānorāda radzenes apduļķojuma platība.	

Papildinājums

DEFINĪCIJAS

Skābju/sārmu rezerve: skābiem preparātiem — nātrija hidroksīda daudzums (g) uz 100 g preparāta, kas nepieciešams, lai panāktu konkrētu pH; sārmainiem preparātiem — nātrija hidroksīda daudzums (g), kas ir līdzvērtīgs sērskābes daudzumam gramos uz 100 g preparāta, kurš nepieciešams, lai panāktu konkrētu pH (Young *et al.*, 1988).

Ķimikālija: viela vai maisījums.

Kairinājumu neizraisošas vielas: vielas, kas nav klasificētas kā EPA I, II vai III kategorijas acu kairinājumu izraisītājas vai GHS 1., 2., 2.A vai 2.B kategorijas vai ES 1. vai 2. kategorijas acu kairinājumu izraisītājas (17) (18) (19).

Acu korozijas izraisītājs: a) ķimikālija, kas rada acs audu neatgriezenisku bojājumu; b) ķimikālijas, kas klasificētas kā GHS 1. kategorijas, EPA I kategorijas vai ES 1. kategorijas acu kairinājumu izraisītājas (17) (18) (19).

Acu kairinājuma izraisītājs: a) ķimikālija, kas acī izraisa atgriezeniskas izmaiņas; b) ķimikālijas, kas klasificētas kā EPA II vai III kategorijas, GHS 2., 2.A vai 2.B kategorijas vai ES 2. kategorijas acu kairinājumu izraisītājas (17) (18) (19).

Nopietna acu kairinājuma izraisītājs: a) ķimikālija, kas izraisa acs audu bojājumus, kas neizzūd 21 dienas laikā pēc aplicēšanas vai kas izraisa nopietnu fizisku redzes pasliktināšanos; b) ķimikālijas, kas tiek klasificētas kā GHS 1. kategorijas, EPA I kategorijas vai ES 1. kategorijas acu kairinājumu izraisītājas (17) (18) (19).

Testējamā ķimikālija: jebkura viela vai maisījums, ko testē ar šo testēšanas metodi.

Daudzpakāpju testēšanas pieeja: pakāpeniskas testēšanas stratēģija, kurā noteiktā secībā pārskata visu esošo informāciju par testējamo ķimikāliju, katrā pakāpē izmantojot pierādījumu izsvēršanu, lai pirms pārejas uz nākamo pakāpi noteiktu, vai ir pieejams pietiekami daudz informācijas, lai pieņemtu lēmumu par bīstamības klasifikāciju. Ja testējamās ķimikālijas kairinājuma izraisīšanas potenciālu var noteikt, pamatojoties uz esošo informāciju, papildu testēšana nav jāveic. Ja, pamatojoties uz esošo informāciju, testējamās ķimikālijas kairinājuma izraisīšanas potenciālu noteikt nevar, ievēro pakāpenisku secīgu procedūru testēšanai ar dzīvniekiem, līdz var viennozīmīgi pieņemt lēmumu par klasifikāciju.

Pierādījumu izsvēršana (process): izsverot informācijas kopuma stiprās un vājās puses, nonāk pie secinājuma, pie kāda ne vienmēr ļauj nonākt atsevišķa datu daļa. kultūras, kuras neapstrādā (t. i., ne ar testējamo ķimikāliju, ne ar šķīdinātāju), bet ar kurām paralēli izdara tādas pašas manipulācijas kā ar kultūrām, kuras apstrādā ar testējamo ķimikāliju.

TESTĒŠANAS METODES B.5. PAPILDINĀJUMS ⁽¹⁾

SECĪGĀS TESTĒŠANAS STRATĒGIJA ACU KAIRINĀJUMA UN KOROZIJAS NOTEIKŠANAI

Vispārīgi apsvērumi

Ņemot vērā gan zinātnisko rezultātu uzticamības, gan dzīvnieku labturības apsvērumus, ir svarīgi izvairīties no nevajadzīgiem testiem ar dzīvniekiem un pēc iespējas mazāk izmantot testus, kas varētu dzīvniekos izraisīt spēcīgu atbildreakciju. Pirms *in vivo* testēšanas jāizvērtē visa informācija, kas attiecas uz ķīmikālijas potenciālo kairinātspēju/korozivitāti acīm. Var gadīties, ka jau ir pieejami pietiekami pierādījumi, lai testējamo ķīmikāliju attiecībā uz tās spēju izraisīt acu kairinājumu/koroziju klasificētu, neveicot testus ar laboratorijas dzīvniekiem. Tā, izmantojot pierādījumu svāra analīzi un secīgās testēšanas stratēģiju, var līdz minimumam samazināt vajadzību veikt *in vivo* testus, īpaši tad, ja ķīmikālija var izraisīt spēcīgu reakciju.

Ieteicams ar pierādījumu svāra analīzi izvērtēt esošo informāciju par ķīmikāliju kairinošo un korozīvo ietekmi uz acīm un noteikt, vai šīs ietekmes raksturošanai varētu būt jāveic papildu pētījumi, kas nav *in vivo* pētījumi. Ja vajadzīgi papildu pētījumi, attiecīgo eksperimentālo datu iegūšanai ieteicams izmantot secīgās testēšanas stratēģiju. Ja viela nav testēta, tās korozīvās/kairinošās ietekmes uz acīm novērtēšanai nepieciešamo datu iegūšanai jāizmanto secīgās testēšanas stratēģija. Šajā papildinājumā aprakstītā sākotnējā testēšanas stratēģija tika izstrādāta ESAO darbseminārā (1). Pēc tam tā tika apstiprināta un paplašināta Saskaņotajā sistēmā ķīmisko vielu radīto cilvēka veselības un vides apdraudējumu integrētai klasificēšanai, kas atbalstīta Ķīmikāliju komitejas un Ķīmikāliju darba grupas 28. kopīgajā sanāksmē 1998. gada novembrī (2), un atjaunināta ESAO ekspertu grupā 2011. gadā.

Lai gan šī testēšanas stratēģija nav B.5. testēšanas metodes sastāvdaļa, tajā norādīta ieteicamā pieeja, kā nosakāma spēja izraisīt acu kairinājumu/koroziju. Šī pieeja ir gan acu kairinājuma/korozijas *in vivo* testēšanas paraugprakse, gan ētiskais etalons. Šajā testēšanas metodē sniegti norādījumi par *in vivo* testu veikšanu un apkopoti faktori, kas jāņem vērā pirms šāda testa apsvēršanas. Secīgās testēšanas stratēģijā sniegta pierādījumu izsvēršanas pieeja, ar kuru izvērtējami esošie dati par ķīmikāliju kairinošo/korozīvo ietekmi uz acīm, un daudzpakāpju pieeja, ar ko iegūstami attiecīgie dati par ķīmikālijām, par kurām vajadzīgi papildu pētījumi, vai par ķīmikālijām, par kurām pētījumu nav vispār. Stratēģijā vispirms paredzēta validētu un vispārpieņemtu *in vitro* vai *ex vivo* testu veikšana un pēc tam — konkrētos apstākļos — testēšanas metodes B.4. pētījumi (3) (4).

Pakāpeniskās testēšanas stratēģijas apraksts

Pirms veikt testus, kas ir secīgās testēšanas stratēģijas daļa (attēlā), jāizvērtē visa pieejamā informācija, lai noteiktu nepieciešamību veikt *in vivo* acu testus. Lai gan būtisku informāciju var iegūt, izvērtējot atsevišķus rādītājus (piemēram, stipri augsts vai zems pH), jāņem vērā viss esošās informācijas kopums. Pieņemot lēmumu par pierādījumu svaru, jāizvērtē visi relevantie dati par konkrētās ķīmikālijas un tās strukturālo analogu iedarbību, un jāsniedz šā lēmuma pamatojums. Galvenais uzsvārs jāliek uz esošajiem datiem par ķīmikālijas iedarbību uz cilvēka organismu un uz dzīvniekiem un pēc tam uz *in vitro* vai *ex vivo* testu rezultātiem. Ja iespējams, jāvairās veikt korozīvu ķīmikāliju *in vivo* pētījumus. Testēšanas stratēģijā ņemti vērā šādi faktori.

Jāizvērtē esošie dati par ietekmi uz cilvēka organismu un/vai dzīvniekiem un/vai *in vitro* dati, kas iegūti ar validētām un starptautiski vispārpieņemtām metodēm (1. posms).

⁽¹⁾ Integrētas testēšanas stratēģijas izmantošanai attiecībā uz acs kairinājumu saskaņā ar REACH regulu sk. arī ECHA Guidance on information requirements and chemical safety assessment R.7.a nodaļu "Endpoint specific guidance" http://echa.europa.eu/documents/10162/13632/information_requirements_r7a_en.pdf.

Vispirms jāizvērtē esošie dati par ietekmi uz cilvēka organismu, piem., klīniskie pētījumi vai arodekspozīcijas pētījumi un slimības vēstures un/vai testa dati no pētījumiem ar dzīvniekiem par ietekmi uz acīm, un/vai *in vitro* dati, kas iegūti ar validētām un starptautiski vispārpieņemtām metodēm par acu kairinājumu/koroziju, jo tie sniedz informāciju, kas tieši saistīta ar ietekmi uz acīm. Pēc tam jāizvērtē pieejamie dati no pētījumiem ar cilvēkiem un/vai dzīvniekiem, kuros pētīta ādas korozija/kairinājums, un/vai no *in vitro* pētījumiem, kas veikti saskaņā ar validētām un starptautiski vispārpieņemtām ādas korozijas pētīšanas metodēm. Dzīvniekiem acīs nedrīkst pilināt ne ķīmikālijas, par kurām zināms, ka tām ir korozīva vai stipri kairinoša ietekme uz acīm, ne ķīmikālijas, kurām ir korozīva vai stipri kairinoša ietekme uz ādu; jāuzskata, ka tām būs korozīva un/vai kairinoša ietekme arī uz acīm. Tāpat *in vivo* pētījumos nevajadzētu testēt arī ķīmikālijas, par kurām iepriekš veiktajos pētījumos par ietekmi uz acīm iegūti pietiekami zinātniskie dati, kas apliecina, ka tās nav ne korozīvas, ne kairinošas.

Struktūras un aktivitātes sakarību (SAR) analīze (2. posms).

Jāņem vērā strukturāli radniecīgu ķīmikāliju testu rezultāti, ja tie ir pieejami. Ja pētījumos ar cilvēkiem un/vai dzīvniekiem iegūts pietiekami daudz datu par strukturāli radniecīgu vielu vai šādu vielu maisījumu potenciālu atstāt korozīvu/kairinošu ietekmi uz acīm, var pieņemt, ka testējamā ķīmikālija izraisīs tādas pašas atbildreakcijas. Šādos gadījumos veikt testus ar šo ķīmikāliju var nebūt vajadzīgs. Negatīvi dati no pētījumiem par strukturāli radniecīgām vielām vai šādu vielu maisījumiem nav uzskatāmi par pietiekamu pierādījumu, ka ķīmikālija nebūs korozīva vai kairinoša, secīgas testēšanas stratēģijā. Lai konstatētu ķīmikālijas potenciālu atstāt korozīvu vai kairinošu ietekmi uz ādu un acīm, jāizmanto validēta un vispārpieņemta pieeja SAR analīzei.

Fizikālķīmiskās īpašības un ķīmiskā reaģētspēja (3. posms).

Ķīmikālijām ar ļoti zemu vai augstu pH, piemēram, $\leq 2,0$ vai $\geq 11,5$, var būt spēcīga lokāla ietekme. Ja ķīmikālija ir identificēta par acīm korozīvu vai kairinošu, pamatojoties uz ļoti augstu vai zemu pH, var ņemt arī vērā tās skābju/sārmu rezervi (buferkapacitāti) (5) (6) (7). Ja buferkapacitāte liecina, ka ķīmikālija varētu nebūt korozīva acīm (t. i., ķīmikālijas ar ļoti augstu vai zemu pH un zemu skābju/sārmu rezervi), jāveic papildu testēšana, lai par to pārliecinātos, vēlams, izmantojot validētu un vispārpieņemtu *in vitro* vai *ex vivo* testu (sk. 10. punktu).

Jāizskata cita pieejamā informācija (4. posms).

Šajā posmā jāizvērtē visa pieejamā informācija par sistēmisko toksiskumu pie uzņemšanas dermālā ceļā. Jāizskata arī testējamās ķīmikālijas akūtais dermālais toksiskums. Ja pierādīts, ka testējamai ķīmikālijai ir stipri toksiska ietekme pie uzņemšanas dermālā ceļā, iespējams, ka testēt tās ietekmi uz acīm var nebūt vajadzīgs. Lai gan akūts dermālais toksiskums ne vienmēr ir tieši saistāms ar kairinošu/korozīvu ietekmi uz acīm, var pieņemt, ka gadījumos, kad viela, uzņemta dermālā ceļā, ir stipri toksiska, tā būs ļoti toksiska arī tad, ja to iepilinās acī. Šādus datus var apsvērt arī starp 2. un 3. posmu.

Ja tas nepieciešams normatīviem mērķiem, jānovērtē arī ķīmikālijas dermālā korozivitāte (5. posms).

Ādas korozijas un nopietna kairinājuma potenciāls vispirms jāizvērtē saskaņā ar testēšanas metodi B.4. (4) un pievienoto papildinājumu (8), izmantojot arī validētas un starptautiski vispārpieņemtas *in vitro* testēšanas metodes ādas korozijas noteikšanai (9) (10) (11). Ja tiek novērots, ka ķīmikālijai ir korozīva iedarbība uz ādu vai tā rada spēcīgu ādas kairinājumu, var uzskatīt, ka tā ir korozīva vai stipri kairinoša arī acīm. Līdz ar to nav jāveic turpmāki testi. Ja ķīmikālijai nav korozīvas iedarbības uz ādu vai tā nerada spēcīgu ādas kairinājumu, jāveic *in vitro* vai *ex vivo* tests par tās ietekmi uz acīm.

In vitro vai *ex vivo* testu rezultāti (6. posms).

Ķīmikālijas, kurām konstatēta korozīva vai stipri kairinoša ietekme *in vitro* vai *ex vivo* testos (12) (13), kas ir validēti un starptautiski vispārpieņemti tieši acu korozijas/kairinājuma novērtēšanai, nav jāpārbauda testos ar dzīvniekiem. Var uzskatīt, ka šādām ķīmikālijām būs līdzvērtīga spēcīga ietekme arī *in vivo*. Ja validēti un vispārpieņemti *in vitro*/ *ex vivo* testi nav pieejami, 6. posmu izlaiž un pāriet pie 7. posma.

In vivo tests ar trušiem (7. un 8. posms).

In vivo testi uz acīm jāsāk ar sākotnēju testu, kuram izmanto vienu dzīvnieku. Ja tā rezultāti liecina, ka ķīmikālījai ir stipri kairinoša vai koroziņa ietekme uz acīm, turpmāku testēšanu neveic. Ja šajā testā nekāda koroziņa vai kairinoša ietekme konstatēta netiek, jāveic apstiprināšanas tests ar vēl diviem dzīvniekiem. Atkarībā no apstiprinājuma testa rezultātiem var būt nepieciešami papildu testi [sk. testēšanas metodi B.5].

ACU KAIRINĀJUMA/KOROZIJAS TESTĒŠANAS UN NOVĒRTĒŠANAS STRATĒGIJA

	Darbība	Konstatējums	Secinājumi
1.	Izskata esošos datus par ietekmi uz cilvēkiem un/vai dzīvniekiem un/vai <i>in vitro</i> datus no validētām un starptautiski vispārpieņemtām metodēm attiecībā uz ietekmi uz acīm Izskata esošos datus par ietekmi uz cilvēkiem un/vai dzīvniekiem un/vai <i>in vitro</i> datus no validētām un starptautiski vispārpieņemtām metodēm attiecībā uz korozīvu ietekmi uz ādu Izskata esošos datus par ietekmi uz cilvēkiem un/vai dzīvniekiem un/vai <i>in vitro</i> datus no validētām un starptautiski vispārpieņemtām metodēm attiecībā uz stipri kairinošu ietekmi uz ādu	Smagi acu bojājumi Acīm kairinoša Nav acīm korozīva/ kairinoša Korozīva ietekme uz ādu Spēcīgs ādas kairinātājs	Apikālais beigupunkts; uzskata par acīm korozīvu. Testēšana nav vajadzīga. Apikālais beigupunkts; uzskata par acīm kairinošu. Testēšana nav vajadzīga. Apikālais beigupunkts; uzskata, ka nav acīm korozīva vai kairinoša. Testēšana nav nepieciešama Uzskata par acīm korozīvu. Testēšana nav vajadzīga. Uzskata par acīm kairinošu. Testēšana nav vajadzīga.



Informācijas nav vai esošā informācija neļauj izdarīt pārliecinošus secinājumus



2.	Veic SAR attiecībā uz acs koroziju/kairinājumu Apsver iespēju veikt SAR attiecībā uz ādas koroziju	Paredzami smagi acu bojājumi Paredzams acu kairinājums Paredzama ādas korozija	Uzskata par acīm korozīvu. Testēšana nav vajadzīga. Uzskata par acīm kairinošu. Testēšana nav vajadzīga. Uzskata par acīm korozīvu. Testēšana nav vajadzīga.
----	--	---	---



Nav iespējams izdarīt prognozes vai arī prognozes nav pārliecinošas vai ir negatīvas



3.	Veic pH mērījumus (attiecīgā gadījumā nosaka buferkapacitāti)	pH ≤ 2 vai 11,5 (un attiecīgā gadījumā augsta buferkapacitāte)	Uzskata par acīm korozīvu. Testēšana nav vajadzīga.
----	--	---	--



2 < pH < 11,5 vai pH ≤ 2,0 vai 11,5, attiecīgā gadījumā — ar nelielu buferkapacitāti vai bez tās



	Darbība	Konstatējums	Secinājumi
4.	Izskata esošos datus par sistēmisko toksicitāti pie uzņemšanas dermālā ceļā.	Koncentrācijās, kādas tiktu testētas uz acīm, stipri toksiska.	Ķimikālija ir pārāk toksiska, lai ar to veiktu testus. Testēšana nav vajadzīga.
	↓		
	Šādas informācijas nav vai ķimikālija nav ļoti toksiska		
	↓		
5.	Eksperimentā novērtē ādas korozijas potenciālu saskaņā ar šā pielikuma B.4. nodaļā paredzēto testēšanas stratēģiju, ja tas nepieciešams arī normatīviem mērķiem.	Korozijas vai stipra kairinājuma atbildreakcija.	Uzskata par acīm korozīvu. Turpmāka testēšana nav vajadzīga.
	↓		
	Ķimikālijai nav korozīvas vai stipri kairinošas ietekmes uz ādu.		
	↓		
6.	Veic validētu(-s) un vispārpieņemtu(-s) <i>in vitro</i> vai <i>ex vivo</i> testu(-s) acīm.	Korozijas vai stipra kairinājuma atbildreakcija.	Uzskata par acīm korozīvu / stipri kairinošu, ja ar veikto testu var identificēt korozijas / spēcīga kairinājuma izraisītājus un ķimikālija ir testa izmantojamības jomā. Turpmāka testēšana nav vajadzīga.
		Kairinājuma atbildreakcija.	Uzskata par acīm kairinošu, ja veikto(-s) testu(-s) var izmantot, lai pareizi identificētu korozijas / spēcīga kairinājuma izraisītājus un kairinātājus, un ķimikālija ir testa(-u) izmantojamības jomā. Turpmāka testēšana nav vajadzīga.
		Kairinājuma atbildreakcija nav konstatēta.	Uzskata, ka acīm nav kairinoša, ja veikto(-s) testu(-s) var izmantot, lai pareizi identificētu kairinājuma neizraisītājus, tos pareizi nošķirtu no ķimikālijām, kuras ir kairinošas, stipri kairinošas vai korozīvas acīm, un ķimikālija ir testa izmantojamības jomā. Turpmāka testēšana nav vajadzīga.
	↓		
	Secinājumu izdarīšanai nevar izmantot validētu(-s) un vispārpieņemtu(-s) <i>in vitro</i> vai <i>ex vivo</i> testu(-s) acīm		
	↓		
7.	Veic sākotnēju truša acu <i>in vivo</i> testu ar vienu dzīvnieku.	Smagi acu bojājumi.	Uzskata par acīm korozīvu. Turpmāka testēšana nav vajadzīga.
	↓		
	Nav smagu bojājumu vai nav atbildreakcijas		
	↓		

	Darbība	Konstatējums	Secinājumi
8.	Veic apstiprināšanas testu ar vienu vai diviem papildu dzīvniekiem.	Korozīva vai kairinoša.	Uzskata par acīm korozīvu vai kairinošu. Turpmāka testēšana nav vajadzīga.
		Nav korozīva vai kairinoša.	Uzskata, ka nav acīm korozīva vai kairinoša. Turpmāka testēšana nav vajadzīga.

LITERATŪRAS SARAKSTS

- (1) OECD (1996) OECD Test Guidelines Programme: Final Report of the OECD Workshop on Harmonization of Validation and Acceptance Criteria for Alternative Toxicological Test Methods. Held in Solna, Sweden, 22 – 24 January 1996 (<http://www.oecd.org/ehs/test/background.htm>).
- (2) OECD (1998) Harmonized Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances, as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals, November 1998 (<http://www.oecd.org/ehs/Class/HCL6.htm>).
- (3) Worth, A.P. and Fentem J.H. (1999). A General Approach for Evaluating Stepwise Testing Strategies. ATLA 27, 161-177.
- (4) Šā pielikuma B.4. nodaļa "Akūts ādas kairinājums/korozija".
- (5) Young, J.R., How, M.J., Walker, A.P., Worth W.M.H. (1988) Classification as Corrosive or Irritant to Skin of Preparations Containing Acidic or Alkaline Substance Without Testing on Animals. Toxicol. *In Vitro*, 2, 19 – 26.
- (6) Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Edsail, D.J., Holzhutter, H.G. and Liebsch, M. (1998) The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team. Toxicology *in vitro* 12, pp.483 – 524.
- (7) Neun, D.J. (1993) Effects of Alkalinity on the Eye Irritation Potential of Solutions Prepared at a Single pH. J. Toxicol. Cut. Ocular Toxicol. 12, 227 – 231.
- (8) Šā pielikuma B.4. nodaļas papildinājums "Ādas kairinājuma un korozijas secīgās testēšanas stratēģija".
- (9) Šā pielikuma B.40. nodaļa "Ādas korozija *in vitro*: transkutānās elektriskās pretestības (TEP) tests".
- (10) Šā pielikuma B.40bis. nodaļa "Ādas korozija *in vitro*: cilvēka ādas modeļa tests".
- (11) OECD (2006), Test No. 435: *In vitro Membrane Barrier Test Method for Skin corrosion*, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Paris.
- (12) Šā pielikuma B.47. nodaļa "Liellopu radzenes apduļķošanās un caurlaidības testēšanas metode acu koroziju vai nopietnu kairinājumu izraisītāju identificēšanai".
- (13) ESAO (2009b), šā pielikuma B.48. nodaļa "Izolētas vistas acs testēšanas metode acu koroziju vai nopietnu kairinājumu izraisītāju identificēšanai".

3) pielikuma B daļā B.10. nodaļu aizstāj ar šādu:

“B.10. Zīdītāju *in vitro* hromosomālo aberāciju tests

IEVADS

Šī testēšanas metode ir ekvivalenta ESAO Testēšanas vadlīnijai Nr. 473 (2016). Tā ir daļa no ģenētiskās toksikoloģijas testēšanas metožu klāsta. Ir izstrādāts ESAO dokuments, kas īsi informē par testēšanu ģenētiskajā toksikoloģijā un sniedz pārskatu par neseniem šīs vadlīnijas grozījumiem.

In vitro hromosomālo aberāciju testa mērķis ir identificēt ķīmikālijas, kas zīdītāju šūnu kultūrās rada strukturālas hromosomu aberācijas (2) (3) (4). Var būt divu veidu strukturālās aberācijas — hromosomu vai hromatīdu. Hromosomālo aberāciju *in vitro* testos var rasties poliploīdija (tostarp endoreduplikācija). Kaut arī poliploīdiju var izraisīt aneigēni, poliploīdija viena pati neliecina par aneigēnu potenciālu un var vienkārši liecināt par šūnas cikla perturbāciju vai citotoksicitāti (5). Šis tests nav veidots tā, lai mērītu aneiploīdiju. Aneiploīdijas detektēšanai ieteicams veikt *in vitro* mikro kodolu testu (6).

In vitro hromosomālo aberāciju testam var izmantot cilvēka vai grauzēja izcelsmes šūnu līniju kultūras vai primāro šūnu kultūras. Izmantojamās šūnas jāizvēlas pēc to spējas augt kultūrā, kariotipa stabilitātes (tostarp hromosomu skaita) un hromosomu aberāciju spontānā biežuma (7). Šobrīd pieejamie dati neļauj sniegt konkrētus ieteikumus, taču dod pamatu domāt, ka ķīmiskā apdraudējuma izvērtēšanā ir svarīgi ņemt vērā testēšanai izvēlēto šūnu p53 statusu, ģenētisko (kariotipa) stabilitāti, DNS reparācijas spēju un izcelsmi (grauzējs vai cilvēks). Tāpēc, zināšanām šajā jomā aizvien paplašinoties, šīs testēšanas metodes lietotāji tiek mudināti ņemt vērā, kādu ietekmi šīs un citas šūnu īpatnības atstāj uz šūnu līnijas lietošanu hromosomu aberāciju indukcijas detektēšanā.

Izmantotās definīcijas ir sniegtas 1. papildinājumā.

SĀKOTNĒJIE APSVĒRUMI UN IEROBEŽOJUMI

Ja vien šūnas attiecībā uz testējamām ķīmikālijām nav metaboliski kompetentas, *in vitro* testos parasti jāizmanto eksogēns metaboliskās aktivācijas avots. Eksogēnā metaboliskās aktivācijas sistēma *in vivo* apstākļus atdarina nepilnīgi. Jāievēro piesardzība, lai izvairītos no apstākļiem, kas varētu radīt artefaktiski pozitīvus rezultātus, t. i., hromosomas bojājumiem, ko nerada tieša mijiedarbība starp testējamām ķīmikālijām un hromosomām; tādi apstākļi ietver pH vai osmolalitātes izmaiņas (8) (9) (10), mijiedarbību ar barotnes komponentiem (11) (12) vai pārmērīgus citotoksicitātes līmeņus (13) (14) (15) (16).

Šo testu izmanto, lai detektētu hromosomu aberācijas, kas varētu rasties no klastogēniem notikumiem. Hromosomu aberācijas indukcijas analīze jāveic, izmantojot šūnas metafāzē. Tādēļ ir būtiski, lai šūnas gan apstrādātajās, gan neapstrādātajās kultūrās sasniegtu mitozī. Attiecībā uz ražotiem nanomateriāliem šo testēšanas metodi var būt nepieciešams īpaši pielāgot, bet šajā testēšanas metodē tas nav aprakstīts.

Pirms šīs testēšanas metodes izmantošanas maisījumam, lai iegūtu datus kādam normatīvajam mērķim, jāapsver, vai un kādēļ tā varētu sniegt minētajam mērķim piemērotus rezultātus. Ja pastāv normatīva prasība maisījumu testēt, tāda apsvēršana nav vajadzīga.

TESTA PRINCIPS

Cilvēka vai citu zīdītāju izcelsmes šūnu kultūras eksponē testējamajai ķimikālijai gan ar eksogēnu metaboliskās aktivitātes avotu, gan arī bez tā, ja vien nelieto šūnas ar adekvātu metabolisko kapacitāti (sk. 13. punktu). Pienācīgos iepriekšnoteiktos laika intervālos pēc šūnu kultūru sākotnējās ekspozīcijas testējamajai ķimikālijai tās apstrādā ar kādu metafāzi apturošu ķimikāliju (piemēram, kolcemīdu vai kolhicīnu), šūnas metafāzē savāc, iekrāso un mikroskopiski analizē uz hromatīdas tipa un hromosomas tipa aberācijām.

METODES APRAKSTS

Sagatavošanās*Šūnas*

Var izmantot dažādas šūnu līnijas (piemēram, Ķīnas kāmjā olnīcu (CHO), Ķīnas kāmjā plaušu V79, Ķīnas kāmjā plaušu (CHL)/IU, TK6) līnijas vai primārās šūnu kultūras, tostarp cilvēku vai citu zīdītāju perifērisko asiņu limfocītus (7). Šūnu līniju izvēle zinātniski jāpamato. Izmantojot primārās šūnas, dzīvnieku labturības apsvērumu dēļ, ja iespējams, jāapsver cilvēku izcelsmes primāro šūnu izmantošana un paraugošana jāveic saskaņā ar humāniem ētikas principiem un noteikumiem. Cilvēka perifērisko asiņu limfocīti jāiegūst no jauniem (aptuveni 18–35 gadu veciem) nesmēķētājiem, kuriem nav zināmu slimību un kuri pēdējā laikā nav bijuši eksponēti genotoksiskiem faktoriem (piemēram, ķimikālijām, jonizējošajam starojumam) tādā apmērā, kas palielinātu hromosomu aberāciju fona līmeni. Tas nodrošinātu, ka hromosomu aberāciju fona līmenis ir zems un nemainīgs. Palielinoties vecumam, hromosomu aberāciju fona līmenis palielinās, un sievietēm šī tendence novērojama izteiktāk nekā vīriešiem (17) (18). Ja izmanto šūnas no vairāk nekā viena donora, jānorāda donoru skaits. Jāpierāda, ka šūnas kopš to apstrādes sākšanas ar testējamo ķimikāliju līdz šūnu paraugošanai ir dalījušās. Šūnu kultūras uztur šūnu eksponenciālas augšanas fāzē (šūnu līnijas) vai stimulē dalīties (limfocītu primārās kultūras), lai šūnas eksponētu dažādos šūnas cikla posmos, jo konkrētu šūnas attīstības posmu jutība pret testējamo ķimikāliju var nebūt zināma. Primārās šūnas, kuras dalīšanās nolūkos jāstimulē ar mitogēnām vielām, parasti vairs nesinhronizē, kamēr tās eksponē testējamajai ķimikālijai (piemēram, cilvēka limfocīti pēc 48 stundu mitogēnās stimulācijas). Kamēr norit apstrāde ar testējamo ķimikāliju, izmantot sinhronizētas šūnas nav ieteicams, taču tas var būt pieņemami, ja tiek pamatots.

Barotne un kultivēšanas apstākļi

Kultūru uzturēšanai lieto piemērotas barotnes un ievēro atbilstošus inkubācijas apstākļus (kultivēšanas trauki, mitrināta atmosfēra ar 5 % CO₂ koncentrāciju, ja nepieciešams, 37 °C inkubācijas temperatūra). Šūnu līnijām regulāri jāpārbauda modālā hromosomu skaita stabilitāte un jāpārlicinās, ka nav notikusi kontaminācija ar mikoplazmu (7) (19), un šūnas nedrīkst izmantot, ja konstatē mikoplazmu vai ja modālais hromosomu skaits ir mainījies. Jānosaka, kāds ir testēšanas laboratorijā izmantoto šūnu līniju vai primāro kultūru normālais šūnas cikla ilgums, un tam jāsakrīt ar publicētajiem šūnu raksturlielumiem (20).

Kultūru sagatavošana

Šūnu līnijas: šūnas pavairo no pamatkultūrām, ko barotnē uzsēj tādā blīvumā, lai kultūras suspensijās vai monoslānī līdz šūnu savākšanai eksponenciāli augtu piemēram, jāizvairās no monoslānī augošu šūnu konfluences).

Limfocīti: nesadalītas asinis, kas apstrādātas ar antikoagulantu (piem., heparīnu), vai tikai limfocītus kultivē (piem., 48 stundas cilvēka limfocītu gadījumā) mitogēna klātbūtnē [piem., cilvēka limfocītu gadījumā — fitohemaglutinīna (PHA) klātbūtnē], lai pirms šūnu eksponēšanas testējamajai ķimikālijai inducētu to dalīšanos.

Metaboliskā aktivācija

Ja izmanto šūnas ar nepietiekamu endogēno metabolisko kapacitāti, jālieto eksogēnas metaboliskās aktivācijas sistēmas. Visplašāk izmantotā sistēma, kuru iesaka izmantot pēc noklusējuma, ja vien nav pamata izmantot citu, ir ar kofaktoru papildināta postmitohondriālā frakcija (S9) no graužēju (parasti žurku) aknām, kas apstrādātas ar fermentus inducējošām vielām, piemēram, Aroclor 1254 (21) (22) (23) vai fenobarbitālu kombinācijā ar β -naftoflavonu (24) (25) (26) (27) (28) (29). Pēdējā minētā kombinācija nav pretrunā ar Stokholmas Konvenciju par noturīgajiem organiskajiem piesārņotājiem (30) un jauktas funkcijas oksidāžu inducēšanā izrādījusies tikpat efektīva kā Aroclor 1254 (24) (25) (26) (28). S9 frakciju parasti izmanto koncentrācijā 1–2 % (tilp./tilp.), bet galīgajā testa barotnē to var palielināt līdz 10 % (tilp./tilp.). Apstrādes laikā jāizvairās no tādu produktu izmantošanas, kas samazina mitotisko indeksu, jo īpaši kalcija kompleksveidošanas produktiem (31). Eksogēnās metaboliskās aktivācijas sistēmas vai metaboliskā inducētāja veida un koncentrācijas izvēli var ietekmēt testējamo ķīmikāliju klase.

Testējamās ķīmikālijas sagatavošana

Cietas testējamās ķīmikālijas jāgatavo atbilstošos šķīdinātājos un, ja vajadzīgs, pirms šūnu apstrādes jāatšķaida (sk. 23. punktu). Šķīdros testējamās ķīmikālijas var testa sistēmai pievienot tieši un/vai pirms testa sistēmas apstrādes atšķaidīt. Gāzveida vai gaistošas testējamās ķīmikālijas jātestē ar attiecīgām standarta protokolu modifikācijām, piemēram, apstrādi veicot hermētiski noslēgtos kultivēšanas traukos (32) (33) (34). Testējamās ķīmikālijas preparāti jāgatavo tieši pirms apstrādes, ja vien dati par stabilitāti neliecina, ka tos var uzglabāt.

Testēšanas apstākļi

Šķīdinātāji

Šķīdinātājs jāizvēlas tā, lai optimizētu testējamās ķīmikālijas šķīdību, šķīdinātājam neatstājot negatīvu ietekmi uz testa norisi — nemainot šūnu augšanu, neietekmējot testējamās ķīmikālijas integritāti, nereaģējot ar kultivēšanas traukiem, nepasliktinot metabolisko aktivāciju utt. Kad vien iespējams, vispirms jāapsver, vai neizmanto šķīdinātāju (vai barotni) uz ūdens bāzes. Plaši atzīti šķīdinātāji, piemēram, ir ūdens vai dimetilsulfoksīds. Parasti organiskajiem šķīdinātājiem nevajadzētu pārsniegt 1 % (tilp./tilp.) un šķīdinātājiem uz ūdens bāzes (sālsūdens vai ūdens) nevajadzētu pārsniegt 10 % (tilp./tilp.) galīgajā apstrādes barotnē. Ja tiek izmantoti ne tik plaši atzīti šķīdinātāji (piem., etanols vai acetons), to izmantošana jāpamato ar datiem, kas apliecina to saderību ar testējamām ķīmikālijām, izmantoto testa sistēmu un ģenētiskās toksicitātes neesību izmantotajā koncentrācijā. Ja to applicinošu datu nav, ir svarīgi izmantot neapstrādātas kontroles (sk. 1. papildinājumu), lai pierādītu, ka izvēlētais šķīdinātājs nerada nekādu kaitīgu vai klastogēnu ietekmi.

Šūnu savairošanās un citotoksicitātes mērīšana un apstrādes koncentrāciju izvēle

Nosakot augstāko testējamās ķīmikālijas koncentrāciju, neizvēlas koncentrācijas, kas spēj radīt artefaktiski pozitīvas atbildreakcijas, piemēram, tādas koncentrācijas, kas izraisa pārmērīgu citotoksicitāti (sk. 22. punktu), nogulsnes barotnē (sk. 23. punktu) vai manāmi izmaina pH vai osmolalitāti (sk. 5. punktu). Ja testējamā ķīmikālija pievienošanas brīdī ievērojami izmaina barotnes pH, pH var koriģēt, galīgajā apstrādes barotnē pievienojot buferšķīdumu, lai izvairītos no artefaktiski pozitīviem rezultātiem un saglabātu pienācīgus kultivēšanas apstākļus.

Lai nodrošinātu, ka pietiekams skaits apstrādāto šūnu testa laikā ir sasniegušas mitotus un ka apstrāde tiek veikta attiecīgā citotoksicitātes līmenī (sk. 18. un 22. punktu), mēra šūnu savairošanos. Citotoksicitāti nosaka galvenajā eksperimentā ar metabolisko aktivāciju un bez tās, izmantojot piemērotus šūnu nāves un augšanas rādītājus. Kaut arī citotoksicitātes izvērtēšana sākotnējā testā var palīdzēt sekmīgāk noteikt galvenajā eksperimentā izmantojamās koncentrācijas, sākotnējais tests nav jāveic obligāti. Ja to veic, tas nedrīkst aizstāt citotoksicitātes mērījumu galvenajā eksperimentā.

Piemērotas metodes citotoksicitātes novērtēšanai citoģenētiskajos testos ir populācijas relatīvā dubultošanās jeb divkārtšošānās (*RPD*) vai šūnu skaita relatīvais pieaugums (*RICC*) (13) (15) (35) (36) (55) (sk. formulas 2. papildinājumā). Ja apstrāde norit ilgi un paraugošanas laiki pēc apstrādes sākuma vairāk nekā 1,5 reizes pārsniedz normālo šūnas cikla garumu (t. i., kopumā pārsniedz 3 šūnas ciklu garumu), *RPD* var citotoksicitāti novērtēt pārāk zemu (37). Tādos apstākļos piemērotāks rādītājs varētu būt *RICC* vai, ja izmanto *RPD*, noderīgu aplēsi sniegtu citotoksicitātes izvērtēšana pēc 1,5 normāliem šūnas cikliem.

Attiecībā uz limfocītiem primārajās kultūrās, kaut arī mitotiskais indekss (*MI*) ir citotoksiskās/citostatiskās ietekmes rādītājs, tas ir atkarīgs no laika, kas pagājis pēc apstrādes, no izmantotā mitogēna un iespējamām šūnas cikla traucējumiem. Tomēr *MI* ir pieņemams, jo citu citotoksicitātes mērījumu veikšana var būt apgrūtināša un nepraktiska un tie var nebūt piemērojami limfocītu mērķpopulācijai, kas aug, reaģējot uz *PHA* stimulāciju.

Kaut arī ieteicamie citotoksicitātes parametri šūnu līnijām ir *RICC* un *RPD*, bet limfocītu primārajām kultūrām — *MI*, lietderīgu papildinformāciju var sniegt arī citi rādītāji (piem., šūnu integritāte, apoptoze, nekroze, šūnas cikls).

Jāizvērtē vismaz trīs testējamās koncentrācijas (neietverot šķīdinātāju un pozitīvās kontroles), kas atbilst pieņemamības kritērijiem (pienācīga citotoksicitāte, šūnu skaits u. c.). Neatkarīgi no šūnu veidiem (šūnu līnijas vai limfocītu primārās kultūras) katrā no testētajām koncentrācijām drīkst izmantot vienu vai vairākas (replikāti) apstrādātas kultūras. Kaut arī ieteicams izmantot duplikatīvas kultūras, ir pieņemami izmantot arī vienu kultūru, ja vien gan vienas kultūras, gan duplikatīvo kultūru gadījumā tiek novērtēts tāds pats kopējais šūnu skaits. Vienas kultūras izmantošana ir īpaši aktuāla, ja vērtē vairāk nekā 3 koncentrācijas (sk. 31. punktu). Rezultātus, kas pie konkrētas koncentrācijas iegūti no neatkarīgām replikātkultūrām, datu analīzei var apkopot (38). Attiecībā uz testējamām ķīmikālijām, kas uzrāda nelielu citotoksicitāti vai nav citotoksiskas, parasti piemēroti ir koncentrācijas intervāli ar koeficientu aptuveni no 2 līdz 3. Citotoksicitātes rašanās gadījumā izraudzītajām testējamām koncentrācijām jāaptver gan tās, kuras rada citotoksicitāti, kā aprakstīts 22. punktā, gan koncentrācijas, kuras rada vidēju un nelielu citotoksicitāti vai to nerada vispār. Daudzām testējamajām ķīmikālijām ir novērojama stāva koncentrācijas-atbildreakcijas likne un, lai iegūtu datus pie zemas un mērenas citotoksicitātes vai sīki izpētītu devas-atbildreakcijas sakarību, būs jāizmanto savstarpēji tuvāk esošas koncentrācijas un/vai vairāk nekā trīs koncentrācijas (viena kultūra vai replikāti), jo īpaši situācijās, kad eksperiments ir jāatkārto (sk. 47. punktu).

Ja maksimālā koncentrācija ir balstīta uz citotoksicitāti, ar augstāko koncentrāciju jācenšas panākt $55 \pm 5 \%$ citotoksicitāti, izmantojot ieteiktos citotoksicitātes parametrus (t. i., *RICC* un *RPD* samazinājumu šūnas līnijām un *MI* samazinājumu limfocītu primārajām kultūrām līdz $45 \pm 5 \%$ no paralēlās negatīvās kontroles). Interpretējot pozitīvos rezultātus, kas atrodami vienīgi šā $55 \pm 5 \%$ citotoksicitātes diapazona augšgalā (13), jāievēro piesardzība.

Mazšķīstošām testējamām ķīmikālijām, kuras nav citotoksiskas pie koncentrācijām, kas zemākas par zemāko piesātināta šķīduma koncentrāciju, pie augstākās analizētās koncentrācijas pēc apstrādes ar testējamo ķīmikāliju jārodas ar neapbruņotu aci vai ar invertēto mikroskopu redzamai duļķainībai vai nogulsnēm. Pat ja iegūtā citotoksicitāte novērojama pie koncentrācijas, kas augstāka par zemāko piesātināta šķīduma koncentrāciju, ieteicams testēt tikai vienu koncentrāciju, kas rada acīm redzamu duļķainību vai nogulsnes, jo nogulsnes var artefaktiski ietekmēt rezultātus. Pie koncentrācijas, kas rada nogulsnes, īpaši jācenšas nodrošināt, lai nogulsnes netraucētu testa norisi (piem., iekrāsošanu vai novērtēšanu). Pirms eksperimenta var būt lietderīgi noteikt šķīdību barotnē.

Ja netiek novērotas nogulsnes vai ierobežojoša citotoksicitāte, visaugstākajai testa koncentrācijai jāatbilst 10 mM, 2 mg/ml vai 2 µl/ml atkarībā no tā, kura ir zemāka (39) (40) (41). Ja testējamajai ķīmikālijai nav noteikta sastāva, piem., tā ir viela, kuras sastāvs nav zināms vai ir mainīgs, kura ir kompleksi reakcijas produkti vai bioloģisks materiāls (*UVCB*) (42), no vides ekstrahēts produkts u. c., lai palielinātu katra komponenta koncentrāciju, visaugstākajai koncentrācijai jābūt pieņemamam, vajadzēs būt vēl lielākai (piem., 5 mg/ml), ja nav pietiekamas citotoksicitātes. Tomēr jāpiebilst, ka attiecībā uz cilvēku zālēm šīs prasības var būt citādas (43).

Kontroles

Paralēlās negatīvās kontroles (sk. 15. punktu) — šķīdinātāju apstrādes barotnē — iekļauj par katru šūnu ievākšanas reizi, un ar tām rīkojas tieši tāpat kā ar apstrādes kultūrām.

Paralēlās pozitīvās kontroles ir nepieciešamas, lai pierādītu laboratorijas spēju identificēt klastogēnus izmantotā testa protokola apstākļos un attiecīgā gadījumā eksogēnās metaboliskās aktivācijas sistēmas efektivitāti. Pozitīvo kontroļu piemēri ir sniegti tālāk 1. tabulā. Pamatotos gadījumos var izmantot alternatīvas pozitīvās kontroles ķīmikālijas. Tā kā zīdītāju šūnu ģenētiskās toksicitātes *in vitro* testi ir pietiekami standartizēti, pozitīvās kontroles var izmantot vien attiecībā uz klastogēnu, kam nepieciešama metaboliskā aktivācija. Ja vien tas tiek veikts paralēli ar testu bez aktivācijas un apstrādes ilgums ir vienāds, šī viena pozitīvās kontroles atbildreakcija pierāda gan metaboliskās aktivācijas sistēmas darbību, gan testa sistēmas reaģētspēju. Taču attiecībā uz ilgtermiņa apstrādi (bez S9) jānodrošina atsevišķas pozitīvās kontroles, jo apstrādes ilgums atšķirsies no testa, kurā izmantota metaboliskā aktivācija. Katra pozitīvā kontrole jāizmanto pie vienas vai vairākām koncentrācijām, ar kurām paredzēts radīt reproducējamus un detektējamus pieaugumus virs fona līmeņa, lai parādītu testa sistēmas jutību (t. i., ietekme ir skaidri redzama, taču nolasītājs nevar uzreiz atklāt kodēto priekšmetstikliņu identitāti), un atbildreakciju nedrīkst traucēt testēšanas metodē noteikto citotoksicitātes robežu pārsniegumi.

1. tabula

Standartķīmikālijas, kuras ieteicams izmantot laboratorijas kompetences novērtēšanā un pozitīvo kontroļu atlasē

Kategorija	Ķīmikālija	CAS Nr.
1. Klastogēni, kuriem metaboliskā aktivācija nav vajadzīga		
	Metilmetānsulfonāts	66-27-3
	Mitomicīns C	50-07-7
	4-4-nitrohinolīn-N-oksīds	56-57-5
	Citozīnarabinozīds	147-94-4
2. Klastogēni, kam metaboliskā aktivācija ir vajadzīga		
	Benz(a)pirēns	50-32-8
	Ciklofosfamīds	50-18-0

PROCEDŪRA

Apstrāde ar testējamo ķīmikāliju

Šūnas, kas vairojas, apstrādā ar testējamo ķīmikāliju gan piemērotas metabolisma aktivācijas sistēmas klātbūtnē, gan bez tās.

Kultūru ievākšanas laiks

Lai veiktu pilnīgu izvērtēšanu, kas būtu vajadzīga, lai secinātu, ka rezultāts ir negatīvs, jāizpilda visi trīs turpmāk norādītie eksperimentālie nosacījumi, veicot īstermiņa apstrādi gan ar metabolisko aktivāciju, gan bez tās un ilgtermiņa apstrādi bez metaboliskās aktivācijas (sk. 43., 44. un 45. punktu):

- šūnas 3–6 stundas eksponē testējamai ķimikālijai bez metaboliskās aktivācijas, un paraugošanu veic tad, kad kopš apstrādes sākuma apritējuši aptuveni 1,5 normāli šūnas cikli (18),
- šūnas 3–6 stundas eksponē testējamai ķimikālijai ar metabolisko aktivāciju, un paraugošanu veic tad, kad kopš apstrādes sākuma apritējuši aptuveni 1,5 normāli šūnas cikli (18),
- šūnas nepārtraukti eksponē bez metaboliskās aktivācijas līdz paraugošanai, ko veic tad, kad apritējuši aptuveni 1,5 normāli šūnas cikli. Dažas ķimikālijas (piemēram, nukleozīdu analogi) var būt vieglāk detektējamas, ja apstrādes/paraugošanas laiks pārsniedz 1,5 normālos šūnas ciklus (24).

Gadījumos, kad kāds no iepriekš norādītajiem eksperimentālajiem nosacījumiem rada pozitīvu atbildreakciju, nav vajadzības veikt pētījumus ar pārējiem apstrādes režīmiem.

Hromosomu sagatavošana

Šūnu kultūras 1–3 stundas pirms ievākšanas apstrādā ar kolcemīdu vai kolhicīnu. Hromosomu sagatavošanai paredzētās šūnu kultūras ievāc un apstrādā katru atsevišķi. Hromosomu sagatavošana ietver šūnu hipotonisku apstrādi, fiksāciju un iekrāsošanu. Monoslāņa kultūrās 3–6 stundu apstrādes beigās var būt mitotiskās šūnas (ko var atpazīt pēc tā, ka tās ir apaļas un atdalās no virsmas). Tā kā mitotiskās šūnas viegli atdalās, tās var tikt nejauši aizvēktas kopā ar testējamo ķimikāliju saturošo barotni. Ja konstatē mitotisko šūnu skaita būtisku pieaugumu salīdzinājumā ar kontrolēm, kas norāda uz ticamu mitozes apstāji (*mitotic arrest*), šīs šūnas centrifugējot jāsavāc un jāievieto atpakaļ kultūrās, lai izvairītos no mitozes fāzes un hromosomu aberācijas riska šūnu zuduma ievākšanas laikā.

Analīze

Visi priekšmetstikliņi, arī pozitīvās un negatīvās kontroles priekšmetstikliņi pirms mikroskopiskās analīzes, kurā konstatē hromosomu aberācijas, neatkarīgi jākodē. Tā kā fiksācijas procedūrā bieži rodas metafāzes šūnas, kas zaudējušas hromosomas, centromēru skaitam novērtētajās šūnās jābūt vienādam ar modālo skaitu +/- 2.

Lai secinātu, ka testējamā ķimikālija ir viennozīmīgi negatīva, pie katras koncentrācijas un katrā kontrolē jānovērtē vismaz 300 labi izkliedētu šūnu metafāzē (sk. 45. punktu). Gadījumos, kad tiek izmantotas replikātkultūras, 300 šūnām jābūt līdzīgi sadalītām pa replikātiem. Ja uz katru koncentrāciju tiek izmantota viena kultūra (sk. 21. punktu), šajā vienā kultūrā jānovērtē vismaz 300 labi izkliedētu šūnu metafāzē. 300 šūnu novērtēšana uzlabo testa statistisko jaudu, turklāt tad retāk novērojamas nulles vērtības (paredzams, ka tikai 5 %) (44). Novērtējamo metafāzes šūnu skaitu var samazināt, ja tiek novērots liels skaits šūnu ar hromosomu aberācijām un testējamā ķimikālija tiek uzskatīta par viennozīmīgi pozitīvu.

Jāvērtē šūnas ar strukturālu(-ām) hromosomu aberāciju(-ām), ieskaitot un neieskaitot pārtraukumus. Pārāvumi un pārtraukumi ir definēti 1. papildinājumā saskaņā ar (45) (46). Hromatīdas tipa hromosomas tipa aberācijas jāreģistrē atsevišķi un jāklasificē apakštipos (pārāvumi, apmaiņas). Laboratorijā izmantotajām procedūrām jānodrošina, ka hromosomu aberāciju analīzi veic apmācīti vērtētāji un attiecīgā gadījumā to profesionālizvērtē.

Kaut arī testa mērķis ir detektēt hromosomu strukturālas aberācijas, ir jāreģistrē poliploidijas un endoreduplikācijas biežums, ja šīs parādības tiek novērotas. (Sk. 2. punktu.)

Laboratorijas kompetence

Lai pirms testa regulāras izmantošanas pierādītu, ka laboratorijai ir pietiekama pieredze ar šo testu, laboratorijai jāveic virkne eksperimentu ar pozitīvās kontroles standartķīmikālijām, kurām ir dažādi iedarbības mehānismi, un dažādām negatīvām kontrolēm (izmantojot dažādus šķīdinātājus/nesējus). Šo pozitīvo un negatīvo kontroļu atbildreakcijām jāatbilst literatūrai. Tas neattiecas uz laboratorijām, kurām ir pieredze, t. i., kuru rīcībā ir vēsturisko datu bāze, kas aprakstīta 37. punktā.

Lai pierādītu kompetenci detektēt klastogēniskās ķīmikālijas un noteiktu metaboliskās aktivācijas sistēmas efektivitāti, pozitīvās kontroles ķīmikāliju izlase (sk. 1. tabulu 26. punktā) jāpēta ar īsām un garām apstrādēm bez metaboliskās aktivācijas un ar īsu apstrādi ar metabolisko aktivāciju. Atlasīto ķīmikāliju koncentrāciju klāsts jāizvēlas tā, lai radītu reproducējamus un ar koncentrācijām saistītus pieaugumus virs fona līmeņa un parādītu testa sistēmas jutību un dinamisko diapazonu.

Dati par vēsturiskajām kontrolēm

Laboratorijā jānosaka:

- vēsturisko pozitīvo kontroļu diapazons un sadalījums,
- vēsturisko negatīvo (neapstrādāto, šķīdinātāja) kontroļu diapazons un sadalījums.

Pirmoreiz iegūstot datus par vēsturisko negatīvo kontroļu sadalījumu, paralēlajām negatīvajām kontrolēm jāatbilst publicētajiem datiem par kontrolēm, ja tādi ir. Kontroļu sadalījumam tiekot papildinātam ar arvien lielāku daudzumu eksperimentālo datu, paralēlajām negatīvajām kontrolēm ideālā gadījumā jābūt 95 % minētā sadalījuma kontroles robežās (44) (47). Laboratorijas vēsturisko negatīvo kontroļu datu bāze sākotnēji jāveido ar vismaz 10 eksperimentiem, bet vēlams, lai tā sastāvētu no vismaz 20 eksperimentiem, kas veikti salīdzināmos eksperimenta apstākļos. Lai noteiktu laboratorijas pozitīvo un negatīvo kontroļu datu variabilitāti un parādītu, ka laboratorijā šī metodoloģija "tiek kontrolēta" (44), laboratorijām jāizmanto kvalitātes kontroles metodes, piem., kontroldiagrammas (piem., C diagrammas vai X joslu diagrammas (48)). Papildu ieteikumi par vēsturisko datu izveidi un izmantošanu (t. i., kritēriji datu iekļaušanai vēsturiskajos datos un izslēgšanai no tiem un konkrēta eksperimenta pieņemamības kritēriji) atrodami literatūrā (47).

Jebkādas izmaiņas eksperimenta protokolā jāapsver, ņemot vērā to atbilstību laboratorijas esošajai vēsturisko kontroļu datubāzei. Jebkādu būtisku neatbilstību gadījumā jāveido jauna vēsturisko kontroļu datubāze.

Negatīvo kontroļu datus jāietver informācija par to, cik bieži vienīgajā kultūrā vai visās replikātkultūrās kopā sastopamas šūnas ar hromosomu aberācijām, kā aprakstīts 21. punktā. Paralēlajām negatīvajām kontrolēm ideālā gadījumā jābūt 95 % laboratorijas vēsturiskās negatīvo kontroļu datu bāzes sadalījuma kontroles robežās (44) (47). Ja dati no paralēlajām negatīvajām kontrolēm neietilpst 95 % kontroles robežās, tie var būt pieņemami iekļaušanai vēsturisko kontroļu sadalījumā, ja vien šie dati nav pārmērīgi anomālas vērtības un ir pierādījumi, ka testa sistēma "tiek kontrolēta" (skatīt 37. punktu) un ka nav pieļautas tehniskas vai cilvēka kļūdas.

DATI UN PĀRSKATA SNIEGŠANA

Rezultātu izklāsts

Jāizvērtē šūnu ar strukturālu(-ām) hromosomu aberāciju(-ām) īpatsvars. Hromatīdas tipa un hromosomas tipa aberācijas, kas klasificētas pēc apakštipa (pārrāvumi, apmaiņas) jāuzskaita atsevišķi, norādot to skaitu un biežumu eksperimenta un kontrolkultūrās. Pārtraukumus uzskaita un norāda atsevišķi, bet kopējā aberāciju biežumā neiekļauj. Ziņo par poliploidijas un/vai endoreduplicētu šūnu īpatsvaru, ja tādas tiek novērotas.

Reģistrē paralēli veiktos citotoksicitātes mērījumus visās apstrādātajās kultūras, negatīvajās un pozitīvajās kontrolkultūrās galvenajā(-os) aberāciju noteikšanas eksperimentā(-os).

Norāda datus par atsevišķām kultūrām. Turklāt visus datus apkopo tabulas veidā.

Pieņemamības kritēriji

Testa pieņemšanas pamatā ir šādi kritēriji:

- paralēlā negatīvā kontrole tiek uzskatīta par pieņemamu iekļaušanai laboratorijas vēsturisko negatīvo kontroļu datubāzē, kā aprakstīts 39. punktā,
- paralēlās pozitīvās kontroles (sk. 26. punktu) inducē atbildreakcijas, kas atbilst tām, kuras ģenerētas vēsturisko pozitīvo kontroļu datubāzē iekļautajās kontrolēs, un izsaka statistiski ievērojamu pieaugumu salīdzinājumā ar paralēlo negatīvo kontroli,
- šķīdinātāja kontrolē ir izpildīti šūnu savairošanās kritēriji (17. un 18. punkts),
- ir testēti visi trīs eksperimentālie nosacījumi, ja vien vienam no tiem nav bijis pozitīvs rezultāts (sk. 28. punktu),
- analizējams ir bijis pietiekams šūnu un koncentrāciju skaits (31. un 21. punkts),
- maksimālās koncentrācijas izvēles kritēriji atbilst 22., 23. un 24. punktā aprakstītajiem kritērijiem.

Rezultātu izvērtēšana un interpretēšana

Ja ir izpildīti visi pieņemamības kritēriji, testējamo ķimikāliju uzskata par viennozīmīgi pozitīvu, ja kādā no izvērtētajiem eksperimentālajiem nosacījumiem (sk. 28. punktu):

- a) vismaz vienai no testa koncentrācijām salīdzinājumā ar paralēlo negatīvo kontroli novērojams statistiski nozīmīgs palielinājums,
- b) minēto palielinājumu izvērtējot ar atbilstošu trenda testu, konstatējams, ka tas saistīts ar devu,
- c) kādi rezultāti ir ārpus vēsturisko negatīvo kontroļu datu sadalījuma (piem., 95 % kontroles robežām pēc Puasona sadalījuma; sk. 39. punktu).

Ja visi šie kritēriji ir izpildīti, testējamo ķimikāliju uzskata par spējīgu šajā testa sistēmā inducēt hromosomas aberācijas kultivētajās zīdītāju šūnās. Ieteikumi par piemērotākajām statistiskajām metodēm atrodami literatūrā (49) (50) (51).

Ja ir izpildīti visi pieņemamības kritēriji, testējamo ķimikāliju uzskata par viennozīmīgi negatīvu, ja visos izvērtētajos eksperimentālajos nosacījumos (sk. 28. punktu):

- a) nevienai no testa koncentrācijām salīdzinājumā ar paralēlo negatīvo kontroli nav novērojams statistiski nozīmīgs palielinājums,

- b) ar atbilstošu trenda testu nav konstatējams ar koncentrāciju saistīts palielinājums,
- c) visi rezultāti atrodas vēsturisko negatīvo kontroļu datu sadalījuma robežās (piem., 95 % kontroles robežās pēc Puasona sadalījuma; sk. 39. punktu).

Testējamo ķīmikāliju šajā testa sistēmā tad uzskata par nespējīgu inducēt hromosomas aberācijas kultivētās zīdītāju šūnās.

Nav prasības viennozīmīgi pozitīvu vai negatīvu atbildreakciju verificēt.

Ja atbildreakcija nav ne viennozīmīgi negatīva, ne viennozīmīgi pozitīva, kā aprakstīts iepriekš, vai lai palīdzētu noteikt rezultāta bioloģisko relevantumu, šie dati jānovērtē ekspertam un/vai jāveic sīkāka izskatīšana. Var būt lietderīgi novērtēt papildu šūnas (attiecīgā gadījumā) vai veikt atkārtotu eksperimentu, iespējams, izmantojot mainītus eksperimenta apstākļus (piem., atstatumus starp koncentrācijām, citus metaboliskās aktivācijas apstākļus (t. i., S9 koncentrāciju vai S9 izcelsmi)).

Retos gadījumos pat pēc sīkākas izskatīšanas datu kopums neļauj secināt, ka testējamā ķīmikālija rada pozitīvus vai negatīvus rezultātus, un tad uzskata, ka atbildreakcija uz testējamo ķīmikāliju nav skaidra.

Poliploīdo šūnu skaita palielināšanās var norādīt uz to, ka testējamā ķīmikālija, iespējams, inhibē mitotiskos procesus un izraisa skaitliskas hromosomu aberācijas (52). Šūnu ar endoreduplicētām hromosomām skaita palielināšanās var norādīt uz to, ka testējamai ķīmikālijai, iespējams, piemīt potenciāls inhibēt šūnas cikla norisi (53) (54) (sk. 2. punktu). Tāpēc atsevišķi jāreģistrē poliploīdo šūnu un šūnu ar endoreduplicētām hromosomām sastopamība.

Testēšanas pārskats

Testēšanas pārskatā jāiekļauj tālāk norādītā informācija.

Testējamā ķīmikālija:

- avots, sērijas numurs, izmantošanas termiņš, ja pieejams,
- pašas testējamās ķīmikālijas stabilitāte, ja tā zināma,
- testējamās ķīmikālijas šķīdība un stabilitāte šķīdinātājā, ja tā zināma,
- pH, osmolalitātes un nogulšņu mērījums barotnē, kurā testējamā ķīmikālija tika pievienota (attiecīgā gadījumā).

Vienkomponenta viela:

- fiziskais izskats, šķīdība ūdenī un citas relevantas fizikālķīmiskās īpašības,
- ķīmiskās identifikācijas dati, piem., IUPAC vai CAS nosaukums, CAS numurs, SMILES vai InChI kods, struktūrformula, tīrība, attiecīgā gadījumā, ja tas ir praktiski iespējams, piemaisījumu ķīmiskā identitāte u. c.

Daudzkomponentu viela, UVCB un maisījumi:

- ciktāl iespējams, raksturoti ar sastāvdaļu ķīmisko identitāti (sk. iepriekš), kvantitatīvo saturu un relevantajām fizikālķīmiskajām īpašībām.

Šķīdinātājs:

- šķīdinātāja izvēles pamatojums;
- jānorāda arī šķīdinātāja īpatsvars galīgajā barotnē.

Šūnas:

- šūnu tips un avots,
- izmantoto šūnu kariotipa īpatnības un piemērotība,
- šūnu līnijām — mikoplazmas neesība,
- šūnu līnijām — informācija par šūnas cikla garumu, dubultošanās laiks vai proliferācijas indekss,
- asins donoru dzimums, vecums un visa relevantā informācija par donoru, nesadalītas asinis vai atdalīti limfocīti, izmantotais mitogēns,
- šūnu līnijām — ja pieejams, pasāžu jeb pārsējumu skaits,
- šūnu līnijām — šūnu kultūru uzturēšanas metodes,
- šūnu līnijām — modālais hromosomu skaits.

Testēšanas apstākļi:

- metafāzes apturēšanai izmantojamās ķimikālijas identitāte, tās koncentrācija un šūnu ekspozīcijas ilgums,
- testējamās ķimikālijas koncentrācija, izteikta kā galīgā koncentrācija barotnē (piem., barotnes μg vai mg/mL vai mM),
- koncentrāciju izvēles un kultūru skaita izvēles pamatojums, piem., dati par citotoksicitāti un šķīdības robežām,
- barotnes sastāvs, attiecīgā gadījumā CO_2 koncentrācija, mitruma līmenis,
- barotnē pievienotā šķīdinātāja un testējamās ķimikālijas koncentrācija (un/vai tilpums),
- inkubācijas temperatūra,
- inkubācijas laiks,
- apstrādes ilgums,
- šūnu ievākšanas laiks pēc apstrādes,
- attiecīgā gadījumā šūnu blīvums uzsēšanas laikā,
- metaboliskās aktivācijas sistēmas veids un sastāvs (S9 avots, S9 maisījuma sagatavošanas metode, S9 maisījuma koncentrācija vai tilpums un S9 koncentrācija vai tilpums galīgajā barotnē, S9 kvalitātes kontroles),
- pozitīvās un negatīvās kontroles ķimikālijas, galīgās koncentrācijas katram no apstrādes apstākļiem,
- priekšmetstikliņu sagatavošanas metodes un izmantotais šūnu iekrāsošanas paņēmieni,
- testu pieņemamības kritēriji,
- aberāciju novērtēšanas kritēriji,
- analizēto metafāzes šūnu skaits,
- citotoksicitātes mērīšanas metodes,
- jebkāda papildu informācija, kas attiecas uz citotoksicitāti un izmantoto metodi,
- kritēriji, pēc kuriem novērtē, vai pētījuma rezultāts ir pozitīvs, negatīvs vai neskaidrs,
- pH, osmolalitātes un nogulšņu noteikšanai izmantotās metodes.

Rezultāti:

- apstrādāto šūnu skaits un ievākto šūnu skaits katrai kultūrai, ja tiek izmantotas šūnu līnijas,
- citotoksicitātes rādītāji, piem., RPD, RICC, MI, citi novērojumi, ja tādi ir,
- šūnu līnijām — informācija par šūnas cikla garumu, dubultošanās laiks vai proliferācijas indekss,
- nogulšņu pazīmes un noteikšanas laiks,
- aberāciju, tostarp pārtraukumu, definīcija,
- novērtēto šūnu skaits, šūnu ar hromosomu aberācijām skaits un hromosomu aberāciju veids, kas norādīts atsevišķi par katru apstrādāto kultūru un kontrolkultūru, ar pārtraukumiem un bez tiem,
- ploiditātes izmaiņas (poliploīdas šūnas un šūnas ar endoreduplicētām hromosomām norāda atsevišķi), ja tādas novērotas,
- ja iespējams, koncentrācijas-atbildreakcijas sakarība,
- paralēlo negatīvo (šķīdinātājs) un pozitīvo kontroļu dati (koncentrācijas un šķīdinātāji),
- vēsturisko negatīvo (šķīdinātāja) un pozitīvo kontroļu dati, diapazoni, vidējās vērtības un standartnovirzes, 95 % sadalījuma kontroles robežas, kā arī datu skaits,
- statistiskā analīze, p-vērtības, ja tādas ir.

*Rezultātu iztirzājums.**Secinājumi.*

LITERATŪRAS SARAKSTS

- (1) OECD (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, No. 234, OECD, Paris.
- (2) Evans, H.J. (1976), "Cytological Methods for Detecting Chemical Mutagens", in *Chemical Mutagens, Principles and Methods for their Detection*, Vol. 4, Hollaender, A. (ed.), Plenum Press, New York and London, pp. 1-29
- (3) Ishidate, M. Jr., T. Sofuni (1985), "The *in vitro* Chromosomal Aberration Test Using Chinese Hamster Lung (CHL) Fibroblast Cells in Culture" in *Progress in Mutation Research*, Vol. 5, Ashby, J. et al. (eds.), Elsevier Science Publishers, Amsterdam-New York- Oxford, pp. 427-432.
- (4) Galloway, S.M. et al. (1987), Chromosomal aberration and sister chromatid exchanges in Chinese hamster ovary cells: Evaluation of 108 chemicals, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 10/suppl. 10, pp. 1-175.
- (5) Muehlbauer, P.A. et al. (2008), Improving dose selection and identification of aneugens in the *in vitro* chromosome aberration test by integration of flow cytometry-based methods, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 49/4, pp. 318-327.
- (6) Šā pielikuma B.49. nodaļa "Zidītāju *in vitro* šūnu mikrokodolu tests".
- (7) ILSI paper (draft), Lorge, E., M. Moore, J. Clements, M. O Donovan, F. Darroudi, M. Honma, A. Czich, J van Benthem, S. Galloway, V. Thybaud, B. Gollapudi, M. Aardema, J. Kim, D.J. Kirkland, Recommendations for good cell culture practices in genotoxicity testing.
- (8) Scott, D. et al. (1991), Genotoxicity under Extreme Culture Conditions. A report from ICPEMC Task Group 9, *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*, Vol.257/2, pp. 147-204.

- (9) Morita, T. *et al.* (1992), Clastogenicity of Low pH to Various Cultured Mammalian Cells, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 268/2, pp. 297-305.
- (10) Brusick, D. (1986), Genotoxic effects in cultured mammalian cells produced by low pH treatment conditions and increased ion concentrations, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 8/6, pp. 789-886.
- (11) Long, L.H. *et al.* (2007), Different cytotoxic and clastogenic effects of epigallocatechin gallate in various cell-culture media due to variable rates of its oxidation in the culture medium, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 634/1-2, pp. 177-183.
- (12) Nessler, F. *et al.* (2008), Characterization of the Genotoxicity of Nitrilotriacetic Acid, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 49/6, pp. 439-452.
- (13) Galloway, S. (2000), Cytotoxicity and chromosome aberrations *in vitro*: Experience in industry and the case for an upper limit on toxicity in the aberration assay, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 35/3, pp. 191-201.
- (14) Kirkland, D. *et al.* (2005), Evaluation of the ability of a battery of three *in vitro* genotoxicity tests to discriminate rodent carcinogens and non-carcinogens. I: Sensitivity, specificity and relative predictivity, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 584/1-2, pp. 1-256.
- (15) Greenwood, S. *et al.* (2004), Population doubling: a simple and more accurate estimation of cell growth suppression in the *in vitro* assay for chromosomal aberrations that reduces irrelevant positive results, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 43/1, pp. 36-44.
- (16) Hilliard, C.A. *et al.* (1998), Chromosome aberrations *in vitro* related to cytotoxicity of nonmutagenic chemicals and metabolic poisons, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 31/4, pp. 316-326.
- (17) Hedner K. *et al.* (1982), Sister chromatid exchanges and structural chromosomal aberrations in relation to age and sex, *Human Genetics*, Vol. 62, pp. 305-309.
- (18) Ramsey M.J. *et al.* (1995), The effects of age and lifestyle factors on the accumulation of cytogenetic damage as measured by chromosome painting, *Mutation Research*, Vol. 338, pp. 95-106.
- (19) Coecke S. *et al.* (2005), Guidance on Good Cell Culture Practice. A Report of the Second ECVAM Task Force on Good Cell Culture Practice, *ATLA*, Vol. 33/3, pp. 261-287.
- (20) Henderson, L. *et al.* (1997), Industrial Genotoxicology Group collaborative trial to investigate cell cycle parameters in human lymphocyte cytogenetics studies, *Mutagenesis*, Vol.12/3, pp.163-167.
- (21) Ames, B.N., J. McCann, E. Yamasaki (1975), Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian Microsome Mutagenicity Test, *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, Vol. 31/6, pp. 347-363.
- (22) Maron, D.M., B.N. Ames (1983), Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test, *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, Vol. 113/3-4, pp. 173-215.
- (23) Natarajan, A.T. *et al.* (1976), Cytogenetic Effects of Mutagens/Carcinogens after Activation in a Microsomal System *In Vitro*, I. Induction of Chromosomal Aberrations and Sister Chromatid Exchanges by Diethylnitrosamine (DEN) and Dimethylnitrosamine (DMN) in CHO Cells in the Presence of Rat-Liver Microsomes, *Mutation Research*, Vol. 37/1, pp. 83-90.
- (24) Matsuoka, A., M. Hayashi, M. Jr. Ishidate (1979), Chromosomal Aberration Tests on 29 Chemicals Combined with S9 Mix *in vitro*, *Mutation Research/Genetic Toxicology*, Vol. 66/3, pp. 277-290.
- (25) Ong, T.-m. *et al.* (1980), Differential effects of cytochrome P450-inducers on promutagen activation capabilities and enzymatic activities of S-9 from rat liver, *Journal of Environmental Pathology and Toxicology*, Vol. 4/1, pp. 55-65.

- (26) Elliot, B.M. *et al.* (1992), Report of UK Environmental Mutagen Society Working Party. Alternatives to Aroclor 1254-induced S9 in *in vitro* Genotoxicity Assays, *Mutagenesis*, Vol. 7/3, pp. 175-177.
- (27) Matsushima, T. *et al.* (1976), "A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems", in *In Vitro Metabolic Activation in Mutagenesis Testing*, de Serres, F.J. *et al.* (eds.), Elsevier, North-Holland, pp. 85-88.
- (28) Galloway, S.M. *et al.* (1994). Report from Working Group on *in vitro* Tests for Chromosomal Aberrations, *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, Vol. 312/3, pp. 241-261.
- (29) Johnson, T.E., D.R. Umbenhauer, S.M. Galloway (1996), Human liver S-9 metabolic activation: proficiency in cytogenetic assays and comparison with phenobarbital/beta-naphthoflavone or Aroclor 1254 induced rat S-9, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 28/1, pp. 51-59.
- (30) UNEP (2001), Stokholmas Konvencija par noturīgajiem organiskajiem piesārņotājiem, Apvienoto Nāciju Organizācijas Vides programma (UNEP). Pieejama tīmekļa vietnē <http://www.pops.int/>.
- (31) Tucker, J.D., M.L. Christensen (1987), Effects of anticoagulants upon sister-chromatid exchanges, cell-cycle kinetics, and mitotic index in human peripheral lymphocytes, *Mutation Research*, Vol. 190/3, pp. 225-8.
- (32) Krahm, D.F., F.C. Barsky, K.T. McCooey (1982), "CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids", in *Genotoxic Effects of Airborne Agents*, Tice, R.R., D.L. Costa, K.M. Schaich (eds.), Plenum, New York, pp. 91-103.
- (33) Zamora, P.O. *et al.* (1983), Evaluation of an Exposure System Using Cells Grown on Collagen Gels for Detecting Highly Volatile Mutagens in the CHO/HGPRT Mutation Assay, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 5/6, pp. 795-801.
- (34) Asakura, M. *et al.* (2008), An improved system for exposure of cultured mammalian cells to gaseous compounds in the chromosomal aberration assay, *Mutation Research*, Vol. 652/2, pp. 122-130.
- (35) Lorge, E. *et al.* (2008), Comparison of different methods for an accurate assessment of cytotoxicity in the *in vitro* micronucleus test. I. Theoretical aspects, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 655/1-2, pp. 1-3.
- (36) Galloway, S. *et al.* (2011), Workshop summary: Top concentration for *in vitro* mammalian cell genotoxicity assays; and Report from working group on toxicity measures and top concentration for *in vitro* cytogenetics assays (chromosome aberrations and micronucleus), *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 723/2, pp. 77-83.
- (37) Honma, M. (2011), Cytotoxicity measurement in *in vitro* chromosome aberration test and micronucleus test, *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, Vol. 724/1-2, pp. 86-87.
- (38) Richardson, C. *et al.* (1989), *Analysis of Data from In Vitro Cytogenetic Assays. In: Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data*, Kirkland, D.J. (ed.) Cambridge University Press, Cambridge, pp. 141-154.
- (39) OECD (2014), Document supporting the WNT decision to implement revised criteria for the selection of the top concentration in the *in vitro* mammalian cell assays on genotoxicity (Test Guidelines 473, 476 and 487) ENV/JM/TG(2014)17. Pieejams pēc pieprasījuma.
- (40) Morita, T., M. Honma, K. Morikawa (2012), Effect of reducing the top concentration used in the *in vitro* chromosomal aberration test in CHL cells on the evaluation of industrial chemical genotoxicity, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 741/1-2, pp. 32-56.
- (41) Brookmire, L., J.J. Chen, D.D. Levy (2013), Evaluation of the Highest Concentrations Used in the In Vitro Chromosome Aberrations Assay, *Environmental and Molecular Muagenesis*, Vol. 54/1, pp. 36-43.

- (42) EPA, Office of Chemical Safety and Pollution Prevention (2011), Chemical Substances of Unknown or Variable Composition, Complex Reaction Products and Biological Materials: UVCB Substances, <http://www.epa.gov/opptintr/newchemicals/pubs/uvcb.txt>.
- (43) USFDA (2012), International Conference on Harmonisation (ICH) Guidance S2 (R1) on Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended For Human Use. Pieejams tīmekļa vietnē <https://federalregister.gov/a/2012-13774>.
- (44) OECD (2014), Statistical analysis supporting the revision of the genotoxicity Test Guidelines, OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, No. 198, OECD Publishing, Paris.
- (45) ISCN (2013), *An International System for Human Cytogenetic Nomenclature*, Schaffer, L.G., J. MacGowan-Gordon, M. Schmid (eds.), Karger Publishers Inc., Connecticut.
- (46) Scott, D. *et al.* (1990), "Metaphase chromosome aberration assays *in vitro*", in *Basic Mutagenicity Tests: UKEMS Recommended Procedures*, Kirkland, D.J. (ed.), Cambridge University Press, Cambridge, pp. 62-86.
- (47) Hayashi, M. *et al.* (2011), Compilation and use of genetic toxicity historical control Data, *Mutation Research*, Vol. 723/2, pp. 87-90.
- (48) Ryan, T. P. (2000), *Statistical Methods for Quality Improvement*, 2nd Edition, John Wiley and Sons, New York.
- (49) Fleiss, J. L., B. Levin, M.C. Paik (2003), *Statistical Methods for Rates and Proportions*, 3rd ed., John Wiley & Sons, New York.
- (50) Galloway, S.M. *et al.* (1987), Chromosome aberration and sister chromatid exchanges in Chinese hamster ovary cells: Evaluation of 108 chemicals, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 10/suppl. 10, pp. 1-175.
- (51) Richardson, C. *et al.* (1989), "Analysis of Data from *In Vitro* Cytogenetic Assays", in *Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data*, Kirkland, D.J. (ed.), Cambridge University Press, Cambridge, pp. 141-154.
- (52) Warr, T.J., E.M. Parry, J.M. Parry (1993), A comparison of two *in vitro* mammalian cell cytogenetic assays for the detection of mitotic aneuploidy using 10 known or suspected aneugens, *Mutation Research*, Vol. 287/1, pp. 29-46.
- (53) Locke-Huhle, C. (1983), Endoreduplication in Chinese hamster cells during alpha-radiation induced G2 arrest, *Mutation Research*, Vol. 119/3, pp. 403-413.
- (54) Huang, Y., C. Change, J.E. Trosko (1983), Aphidicolin – induced endoreduplication in Chinese hamster cells, *Cancer Research*, Vol. 43/3, pp. 1362-1364.
- (55) Soper, K.A., S.M. Galloway (1994), Cytotoxicity measurement in *in vitro* chromosome aberration test and micronucleus test, *Mutation Research*, Vol. 312, pp. 139-149.
-

1. papildinājums

DEFINĪCIJAS

Aneiploīdija: novirze no normālā diploīdā (vai haploīdā) hromosomu skaita par vienu vai vairākām atsevišķām hromosomām, bet ne par veselu hromosomu komplektu vai komplektiem (poliploīdija).

Apoptoze: programmēta šūnu nāve, ko raksturo virkne posmu, kuros šūnas sabrūk membrānās ieslēgtās daļiņās, kas pēc tam tiek iznīcinātas fagocitozē vai izvadītas.

Šūnu savairošanās: šūnu skaita pieaugums šūnu mitotiskās dalīšanās rezultātā.

Ķimikālija: viela vai maisījums.

Hromatīdas pārrāvums: vienas hromatīdas pārtrūkums, kurā vienas hromatīdas daļas ir acīmredzami nobīdītas viena no otras.

Hromatīdas pārtraukums: vienas hromatīdas rajons, kas neiekrāsojas (ahromatisks bojājums), kurā hromatīdas daļas ir nobīdītas minimāli.

Hromatīdas tipa aberācija: strukturāls hromosomas bojājums, kas izpaužas kā atsevišķas hromatīdas pārrāvums vai hromatīdu pārrāvums un savienošana.

Hromosomas tipa aberācija: strukturāls hromosomas bojājums, kas izpaužas kā abu hromatīdu pārrāvums vai pārrāvums un savienošana vienā un tajā pašā vietā.

Klastogēns: jebkura ķimikālija, kas izraisa strukturālas hromosomas tipa aberācijas šūnu vai eikariotu populācijās.

Koncentrācijas: testējamās ķimikālijas galīgās koncentrācijas barotnē.

Citotoksicitāte: šajā testēšanas metodē ietvertajiem testiem, kuros izmanto šūnu līnijas, citotoksicitāte ir apstrādāto šūnu populācijas relatīvās dubultošanās rādītāja (RPD) vai šūnu skaita relatīvā pieauguma (RICC) samazinājums salīdzinājumā ar negatīvo kontroli (sk. 17. punktu un 2. papildinājumu). Šajā testēšanas metodē ietvertajiem testiem, kuros izmanto limfocītu primārās kultūras, citotoksicitāte ir apstrādāto šūnu mitotiskā indeksa (MI) samazinājums salīdzinājumā ar negatīvo kontroli (sk. 18. punktu un 2. papildinājumu).

Endoreduplikācija: process, kurā pēc DNS replikācijas S perioda nevis notiek šūnas kodola mitoze, bet sākas jauns S periods. Tā izveidojas hromosomas ar 4, 8, 16... hromatīdām.

Genotoksisks: vispārīgs termins, kas aptver visu veidu bojājumus DNS vai hromosomās, tostarp pārrāvumus, delēcijas, aduktus, nukleotīdu modifikācijas un saiknes, pārkārtojumus, gēnu mutācijas, hromosomu aberācijas un aneiploīdiju. Ne visas genotoksiskās ietekmes rada mutācijas vai pastāvīgus hromosomu bojājumus.

Mitotiskais indekss (MI): metafāzē esošo šūnu skaita attiecība pret šūnu kopējo skaitu šūnu populācijā; raksturo šūnu savairošanās pakāpi šajā populācijā.

Mitoze: šūnas kodola dalīšanās process, kuru parasti sīkāk iedala šādās stadijās: profāze, prometafāze, metafāze, anafāze un telofāze.

Mutagēns: faktors, kas izraisa pārmantojamas DNS bāzu pāru sekvences vai sekvenču izmaiņas gēnos vai hromosomu struktūrā (hromosomu aberācijas).

Hromosomu skaita aberācija: testam izmantojamajām šūnām raksturīgā parastā hromosomu skaita izmaiņas.

Poliploīdija: tāda hromosomu skaita aberācija šūnās vai organismos, kas skar veselu(-s) hromosomu komplektu(-s) (pretstatā aneiploīdijai, kas skar vienu vai vairākas atsevišķas hromosomas).

p53 statuss: p53 proteīns ir iesaistīts šūnas cikla regulēšanā, apoptozē un DNS reparācijā. Šūnām, kurām funkcionāla p53 proteīna nav un kuras tāpēc nespēj, reaģējot uz DNS bojājumiem, apturēt šūnas ciklu vai likvidēt bojātās šūnas ar apoptozi vai citiem paņēmieniem (piem., inducējot DNS reparāciju), kas saistīti ar p53 funkcijām, teorētiski vajadzētu būt uzņēmīgākām pret gēnu mutācijām vai hromosomu aberācijām.

Šūnu skaita relatīvais pieaugums (RICC): šūnu skaita palielināšanās ķimikālijai eksponētās kultūrās attiecībā pret to skaita palielināšanos neapstrādātās kultūrās, izteikta procentos.

Populācijas relatīvā dubultošanās (RPD): populācijas dubultošanas skaita palielināšanās ķimikālijai eksponētās kultūrās attiecībā pret to skaita palielināšanos neapstrādātās kultūrās, izteikta procentos.

S9 aknu frakcija: aknu homogenāta supernatants pēc 9 000 g centrifugēšanas, t. i., jēlu aknu ekstrakts.

S9 maisījums: S9 aknu frakcijas un metabolisko fermentu darbībai nepieciešamo kofaktoru maisījums.

Šķīdinātāja kontrole: vispārīgs termins to kontrolkultūru apzīmēšanai, kuras saņem vienīgi testējamās ķimikālijas šķīdināšanai izmantoto šķīdinātāju.

Strukturāla aberācija: hromosomas struktūras izmaiņas, kas detektēamas, ar mikroskopu apskatot šūnas to dalīšanās metafāzē, un kas izpaužas kā delēcijas un fragmentācija, intrahromosomiskas modifikācijas [*intrachanges*] vai interhromosomiskas modifikācijas [*interchanges*].

Testējamā ķimikālija: jebkura viela vai maisījums, ko testē ar šo testēšanas metodi.

Neapstrādātās kontroles: kultūras, kuras neapstrādā (t. i., ne ar testējamo ķimikāliju, ne ar šķīdinātāju), bet ar kurām paralēli izdara tādas pašas manipulācijas kā ar kultūrām, kuras apstrādā ar testējamo ķimikāliju.

2. papildinājums

FORMULAS CITOTOKSICITĀTES NOVĒRTĒŠANAI

Mitotiskais indekss (MI):

$$MI(\%) = \frac{\text{Mitotisku šūnu skaits}}{\text{Kopējais saskaitīto šūnu skaits}} \times 100$$

ieteicams lietot **šūnu skaita relatīvā pieauguma (RICC)** vai **populācijas relatīvās dubultošanās (RPD)** rādītājus, jo tie abi ņem vērā to šūnu populācijas daļu, kura ir dalījiesies.

$$RICC(\%) = \frac{(\text{Šūnu skaita palielinājums apstrādātajās kultūrās (beigu sk. - sākumsk.)})}{(\text{Šūnu skaita palielinājums kontrolkultūrās (beigu sk. - sākumsk.)})} \times 100$$

$$RPD(\%) = \frac{(\text{Populācijas dubultošanās apstrādātās kultūrās: reižu sk.})}{(\text{Populācijas dubultošanās kontrolkultūrās: reižu sk.})} \times 100$$

kur:

Populācijas dubultošanās = $[\log (\text{šūnu skaits pēc apstrādes} \div \text{šūnu skaits sākumā})] \div \log 2$

Piemēram, RICC vai RPD 53 % apmērā norāda uz 47 % citotoksicitāti/citostāzi, un 55 % ar MI izmērītā citotoksicitāte/citostāze nozīmē, ka faktiskais MI ir 45 % kontroles.

Jebkurā gadījumā šūnu skaits pirms apstrādes jāizmēra, un apstrādātajās kultūrās un negatīvās kontroles kultūrās tam jābūt vienādam.

Kaut arī iepriekš par citotoksicitātes parametru ticis izmantots RCC (t. i., šūnu skaits apstrādātajās kultūrās/šūnu skaits kontrolkultūrās), to izmantot vairs nav ieteicams, jo tas var citotoksicitāti novērtēt pārāk zemu.

Negatīvās kontroles kultūrās populācijas dubultojumam jābūt savietojamam ar prasību pēc apstrādes šūnu paraugošanu veikt tad, kad apritējuši aptuveni 1,5 normāli šūnas cikli, un mitotiskajam indeksam jābūt pietiekami augstākam, lai iegūtu pietiekamu mitozē esošu šūnu skaitu un droši aprēķinātu 50 % samazinājumu.;

- 4) pielikuma B daļā B.11. nodaļu aizstāj ar šādu:

“B.11. Zīdītāju kaulu smadzeņu hromosomu aberācijas tests

IEVADS

Šī testēšanas metode ir ekvivalenta ESAO Testēšanas vadlīnijai Nr. 475 (2016). Tā ir daļa no ģenētiskās toksikoloģijas testēšanas metožu klāsta. Ir izstrādāts ESAO dokuments, kas īsi informē par testēšanu ģenētiskajā toksikoloģijā un sniedz pārskatu par neseniem šīs vadlīnijas grozījumiem.

Zīdītāju kaulu smadzeņu hromosomu aberācijas *in vivo* tests genotoksicitātes novērtēšanā ir īpaši svarīgs, jo, kaut arī tie var atšķirties atkarībā no sugas, *in vivo* metabolisma, farmakokinētikas un DNS reparācijas procesu faktori ir aktīvi un sekmē atbildreakcijas rašanos. *In vivo* testu var izmantot arī tam, lai sīkāk izpētītu *in vitro* sistēmā detektētu genotoksicitāti.

Zīdītāju hromosomu aberācijas *in vivo* testu izmanto tādu strukturālu hromosomu aberāciju noteikšanai, ko testējamās ķīmikālijas izraisa dzīvnieku, parasti grauzēju, kaulu smadzeņu šūnās (2) (3) (4) (5). Ir iespējamas divu veidu strukturālās hromosomu aberācijas — hromosomu vai hromatīdu. Kaut arī lielākā daļa genotoksisko ķīmikāliju izraisa hromatīdas tipa aberācijas, tomēr rodas arī hromosomas tipa aberācijas. Hromosomu bojājumi un ar tām saistītie notikumi ir daudzu cilvēka ģenētisko slimību cēlonis, turklāt ir vērā ņemami pierādījumi, ka gadījumos, kad šie bojājumi un ar tām saistītie notikumi rada onkogēnu un tumorsupresorgēnu izmaiņas, tie cilvēkos un eksperimentu sistēmās ir saistāmi ar vēzi. Hromosomu aberāciju *in vivo* testos var rasties poliploidija (tostarp endoreduplikācija). Tomēr poliploidijas palielinājums pats par sevi neliecina par aneigēnu potenciālu un var vienkārši liecināt par šūnas cikla perturbāciju vai citotoksicitāti. Šis tests nav veidots, lai mēritu aneiploidiju. Aneiploidijas detektēšanai ieteicamie *in vivo* un *in vitro* testi ir attiecīgi zīdītāju eritrocītu mikrokodolu *in vivo* tests (šā pielikuma B.12. nodaļa) vai zīdītāju šūnu mikrokodolu *in vitro* tests (šā pielikuma B.49. nodaļa).

Izmantoto terminu definīcijas ir izklāstītas 1. papildinājumā.

SĀKOTNĒJIE APSVĒRUMI

Šajā testā parasti izmanto grauzējus, bet dažos gadījumos ir vietā izmantot citas sugas, ja tas ir zinātniski pamatoti. Šajā testā mērķaudi ir kaulu smadzenes, jo tās ir ļoti labi apasiņotas, turklāt šo audu šūnu cikls ir īss un tās ir viegli izolējamas un apstrādājamas. Ja žurku un peļu vietā izmanto citas sugas, pārskatā jāsniedz to izmantošanas zinātniskais pamatojums. Ja grauzējus neizmanto, ieteicams kaulu smadzeņu hromosomu aberācijas mērījumu integrēt citā piemērotā toksicitātes testā.

Ja ir pierādījumi, ka testējamā(-s) ķīmikālija(-s) vai tās metabolīts(-i) mērķaudos nenonāk, šo testu izmantot var nebūt lietderīgi.

Pirms šīs testēšanas metodes izmantošanas maisījumam, lai iegūtu datus kādam normatīvajam mērķim, jāapsver, vai un kādēļ tā varētu sniegt minētajam mērķim piemērotus rezultātus. Ja pastāv normatīva prasība maisījumu testēt, tāda apsvēršana nav vajadzīga.

TESTĒŠANAS METODES PRINCIPS

Dzīvniekus piemērotā ekspozīcijas ceļā eksponē testējamai ķīmikālijai un pēc apstrādes pienācīgā laikā humāni eitanazē. Pirms eitanāzijas dzīvniekiem ievada metafāzi apturošu vielu (piem., kolhicīnu vai kolcemīdu). Tad no kaulu smadzeņu šūnām pagatavo hromosomu preparātus, kurus iekrāso, un metafāzes šūnām nosaka hromosomu aberācijas.

LABORATORIJAS KVALIFIKĀCIJAS VERIFICĒŠANA

Kompetences noskaidrošana

Lai pirms testa regulāras izmantošanas pierādītu, ka laboratorijai ir pietiekama pieredze ar šo testu, laboratorijai jādemonstrē spēja reproducēt publicētajos datos paredzētos rezultātus (piem., (6)) attiecībā uz hromosomu aberācijas biežumu ar vismaz divām pozitīvās kontroles ķīmikālijām (tostarp vāju atbildreakciju, kas inducēta ar mazām pozitīvo kontroļu devām), piemēram, tām, kuras uzskaitītas 1. tabulā, un ar saderīgām nesēja/šķīdinātāja kontrolēm (sk. 22. punktu). Šajos eksperimentos jāizmanto devas, kas rada reproducējamus un ar devām saistītus pieaugumus un parāda interesējošo audu (kaulu smadzeņu) testēšanas sistēmas jutību un dinamisko diapazonu, un tajos izmanto to novērtēšanas metodi, kas tiks izmantota laboratorijā. Šī prasība neattiecas uz laboratorijām, kurām ir pieredze, t. i., kuru rīcībā ir vēsturisko datu bāze, kas aprakstīta 10.–14. punktā.

Dati par vēsturiskajām kontrolēm

Kompetences noskaidrošanas laikā laboratorijai jānosaka:

- vēsturisko pozitīvo kontroļu diapazons un sadalījums un
- vēsturisko negatīvo kontroļu diapazons un sadalījums.

Pirmoreiz iegūstot datus par vēsturisko negatīvo kontroļu sadalījumu, paralēlajām negatīvajām kontrolēm jāatbilst publicētajiem datiem par kontrolēm, ja tādi ir. Vēsturisko kontroļu sadalījumam tiekot papildinātam ar arvien lielāku daudzumu eksperimentālo datu, paralēlajām negatīvajām kontrolēm ideālā gadījumā jābūt 95 % minētā sadalījuma kontroles robežās. Laboratorijas vēsturisko negatīvo kontroļu datubāzei jābūt statistiski robustai, lai nodrošinātu laboratorijas spēju novērtēt tās negatīvo kontroļu datu sadalījumu. Avoti liecina, ka jāveic vismaz 10 eksperimenti, bet vēlami būtu vismaz 20 eksperimenti, kas veikti salīdzināmos eksperimenta apstākļos. Lai noteiktu laboratorijas datu variabilitāti un parādītu, ka laboratorijā šī metodoloģija "tiek kontrolēta", laboratorijām jāizmanto kvalitātes kontroles metodes, piem., kontroldiagrammas (piem., C diagrammas vai X joslu diagrammas (7)). Papildu ieteikumi par vēsturisko datu izveidi un izmantošanu (t. i., kritēriji datu iekļaušanai vēsturiskajos datos un izslēgšanai no tiem un konkrētā eksperimenta pieņemamības kritēriji) atrodami literatūrā (8).

Ja laboratorija kompetences noskaidrošanas laikā (sk. 9. punktu) neveic pietiekami daudz eksperimentu, lai izveidotu statistiski robustu negatīvo kontroļu sadalījumu (sk. 11. punktu), ir pieņemami šo sadalījumu izveidot, veicot pirmos regulārās izmantošanas testus. Tādā gadījumā jāievēro literatūrā (8) izklāstītie ieteikumi, un šajos eksperimentos iegūtajiem negatīvo kontroļu rezultātiem jāatbilst publicētajiem negatīvo kontroļu datiem.

Jebkādas izmaiņas eksperimenta protokolā jāapsver, ņemot vērā to ietekmi uz eksperimentā iegūtajiem datiem; jā saglabā to atbilstība laboratorijas esošajai vēsturisko kontroļu datubāzei. Jauna vēsturisko kontroļu datubāze jāveido vienīgi būtisku neatbilstību rezultātā, ja eksperts atzinis, ka sadalījums atšķiras no iepriekšējā sadalījuma (sk. 11. punktu). Veidojot jaunu datubāzi, lai varētu veikt testu, nav nepieciešama pilnīga negatīvo kontroļu datubāze, ja vien laboratorija var pierādīt, ka paralēlo negatīvo kontroļu vērtības atbilst vai nu iepriekšējās datubāzes datiem, vai arī ar attiecīgajiem publicētajiem datiem.

Negatīvo kontroļu datus jāietver informācija par hromosomu strukturālo aberāciju (izņemot pārtraukumus) sastopamību katrā dzīvniekā. Paralēlajām negatīvajām kontrolēm ideālā gadījumā jābūt 95 % laboratorijas vēsturisko negatīvo kontroļu datubāzes sadalījuma kontroles robežās. Ja dati no paralēlajām negatīvajām kontrolēm neietilpst 95 % kontroles robežās, tie var būt pieņemami iekļaušanai vēsturisko kontroļu sadalījumā, ja vien šie dati nav pārmērīgi anomālas vērtības un ir pierādījumi, ka testa sistēma "tiek kontrolēta" (skatīt 11. punktu), un nav pierādījumu, ka būtu pieļautas tehniskas vai cilvēka kļūdas.

METODES APRAKSTS

Sagatavošanās

Dzīvnieku sugas izvēle

Jāizmanto veseli, jauni pieauguši tipisku laboratorijas celmu dzīvnieki. Parasti izmanto žurkas, bet var izmantot arī peles. Var izmantot arī jebkuras citas piemērotas sugas zīdītājus, ja pārskatā tiek sniegts zinātnisks pamatojums.

Dzīvnieku turēšanas un barošanas apstākļi

Attiecībā uz graužējiem telpā, kurā tur eksperimenta dzīvniekus, jābūt 22°C ($\pm 3^{\circ}\text{C}$) temperatūrai. Ideālā gadījumā relatīvajam mitrumam jābūt 50–60 % robežās, bet katrā ziņā vismaz 40 % un, vēlams, ne augstākam par 70 %, izņemot telpu uzkopšanas laiku. Dzīvniekus 12 stundas diennaktī tur maksimālā apgaismojumā, bet 12 stundas — tumsā. Var izmantot parasto laboratorijas barību ar neierobežotu piekļuvi dzeramajam ūdenim. Barības izvēli var ietekmēt vajadzība tai piemaisīt testējamo ķīmikāliju, ja ķīmikāliju ievada šādā ceļā. Ja nav gaidāma agresīva uzvedība, graužēji jātur nelielās (ne vairāk par pieciem uz vienu būri) viena dzimuma un vienādas apstrādes grupās, vēlams, būros ar cietu grīdu un pienācīgu vides bagātinājumu. Vienīgi tad, ja tas ir zinātniski pamatoti, dzīvniekus var turēt atsevišķi.

Dzīvnieku sagatavošana

Parasti izmanto veselus, jaunus pieaugušus dzīvniekus (ja tie ir graužēji, apstrādes sākumā tiem vēlams būt 6–10 nedēļas veciem, taču ir pieņemami arī mazliet vecāki dzīvnieki), kurus pēc nejaušības principa iedala kontroles un apstrādes grupās. Katru dzīvnieku unikālā veidā identificē, izmantojot humānu, minimāli invazīvu metodi (piem., apgredzenojot, izmantojot krotālijas, mikročipējot vai izmantojot biometrisku identificēšanu, bet ne apgriežot ausis vai pirkstus) un vismaz piecas dienas aklimatizē laboratorijas apstākļiem. Būrus izvieto tā, lai iespējami mazinātu būru novietojuma varbūtējo ietekmi. Jāizvairās no pozitīvās kontroles un testējamās ķīmikālijas savstarpējās kontaminācijas. Pētījuma sākumā dzīvnieku svara atšķirībām jābūt minimālām un tās nedrīkst pārsniegt $\pm 20\%$ no vidējā svara, kas noteikts katram dzimumam atsevišķi.

Devu sagatavošana

Pirms dzīvniekiem dot devas, cietas testējamās ķīmikālijas jāizšķīdina vai jāsuspendē piemērotos šķīdinātājos vai nesējos vai jāpiejauca barībai vai dzeramajam ūdenim. Šķīdras testējamās ķīmikālijas var dot tādas pašas vai pirms došanas atšķaidīt. Atkarībā no testējamās ķīmikālijas fizikālķīmiskajām īpašībām inhalatīvā ekspozīcija var notikt ar gāzi, tvaiku vai cietu/šķīdru daļiņu aerosolu. Ja vien dati par testējamās ķīmikālijas preparātu stabilitāti neliecina, ka tos var uzglabāt, un neparedz pienācīgus uzglabāšanas apstākļus, jāizmanto svaigi pagatavoti preparāti.

Šķīdinātājs/nesējs

Lietotajās devās šķīdinātājam vai nesējam nedrīkst būt toksiskas ietekmes un tas nedrīkst būt spējīgs reaģēt ar testējamo ķīmikāliju. Citu, mazāk izplatītu šķīdinātāju vai nesēju izmantošana jāpamato ar atsaucē datiem par to saderību. Kad vien iespējams, vispirms jāapsver, vai neizmantojot šķīdinātāju vai nesēju uz ūdens bāzes. Plaši izmantoti saderīgi šķīdinātāji/nesēji ir, piem., ūdens, fizioloģiskais šķīdums, metilcelulozes šķīdums, karboksimetilcelulozes nātrija sāls šķīdums, olīveļļa un kukurūzas eļļa. Ja nav pieejami vēsturiski vai publicēti kontroļu dati, kas apliecinātu, ka izvēlētais atipiskais šķīdinātājs/nesējs neinducē strukturālas aberācijas vai citu kaitīgu ietekmi, jāveic sākotnējs pētījums, lai noteiktu šķīdinātāja/nesēja kontroles pieņemamību.

Kontroles

Pozitīvās kontroles

Parasti katrā testā jāiekļauj dzīvnieku grupa, kas apstrādāta ar pozitīvās kontroles ķīmikāliju. To var nedarīt, ja testējošā laboratorija ir pierādījusi savu kompetenci šā testa veikšanā un ir izveidojusi pozitīvās kontroles vēsturisko diapazonu. Ja paralēlā pozitīvā kontrolgrupa netiek ietverta, katrā eksperimentā jāiekļauj novērtēšanas kontroles (fiksēti un neiekrāsoti priekšmetstikliņi). To var panākt, pētījuma novērtēšanā iekļaujot pienācīgus etalonparaugus, kas iegūti un saglabāti no atsevišķa pozitīvās kontroles eksperimenta, ko periodiski (piem., ik pēc 6–18 mēnešiem) veic testējošā laboratorija, piem., kompetences testēšanas laikā un pēc tam regulāri pēc vajadzības.

Pozitīvās kontroles ķimikālijām pastāvīgi jārada detektējams tādu šūnu biežuma pieaugums, kurām ir strukturālas hromosomu aberācijas, kas pārsniedz spontāno līmeni. Pozitīvās kontroles devas izvēlas tā, lai to ietekme būtu skaidri redzama, tomēr vērtējais nevarētu uzreiz atklāt kodēto paraugu identitāti. Ir pieļaujami pozitīvo kontroli ievadīt citā ceļā nekā testējamo ķimikāliju, izmantojot citu apstrādes grafiku, un paraugošanu veikt tikai vienā brīdī. Turklāt attiecīgā gadījumā var apsvērt tādu pozitīvās kontroles ķimikāliju izmantošanu, kas pieder pie atbilstošās ķimikāliju klases. Pozitīvās kontroles ķimikāliju piemēri sniegti 1. tabulā.

1. tabula

Pozitīvās kontroles ķimikāliju piemēri

Ķimikālija	CAS Nr.
Etilmetānsulfonāts	62-50-0
Metilmetānsulfonāts	66-27-3
Etilnitrozourīnviela	759-73-9
Mitomicīns C	50-07-7
Ciklofosfamīds (monohidrāts)	50-18-0 (6055-19-2)
Trietilēnmelamīns	51-18-3

Negatīvās kontroles

Negatīvās kontroles dzīvnieku grupu paraugo visās paraugošanas reizēs un ar to apietas tāpat kā ar apstrādes grupu, bet to neapstrādā ar testējamo ķimikāliju. Ja testējamo ķimikāliju ievada ar šķīdinātāju/nesēju, šis šķīdinātājs/nesējs jāsaņem arī kontrolgrupai. Tomēr, ja testējošās laboratorijas vēsturiskie negatīvo kontroļu dati par katru paraugošanas reizi liecina, ka atšķirības starp dzīvniekiem pastāvīgi ir līdzīgas un līdzīgs ir arī to šūnu sastopamības biežums, kurām ir strukturālas aberācijas, var būt pietiekami negatīvo kontroli paraugot tikai vienreiz. Ja negatīvo kontroļu paraugošanu veic tikai vienreiz, to vajadzētu darīt pirmajā paraugošanas reizē.

PROCEDŪRA

Dzīvnieku skaits un dzimums

Parasti mikrokodolu atbildreakcija tēviņiem un mātītēm ir līdzīga (9), un tas pats ir paredzams hromosomu strukturālo aberāciju gadījumā, tāpēc lielāko daļu pētījumu iespējams veikt ar tiklab viena kā otra dzimuma dzīvniekiem. Dati, kas liecinātu par relevantām atšķirībām starp tēviņiem un mātītēm (piem., atšķirībām, kas saistītas ar sistēmisko toksicitāti, metabolismu, biopieejamību, toksicitāti kaulu smadzenēm u. c., piem., diapazona noteikšanas pētījumā), mudinātu izmantot abus dzimumus. Tādā gadījumā var būt lietderīgi veikt pētījumu ar abu dzimumu dzīvniekiem, piemēram, atkārtotas devas toksicitātes pētījuma ietvaros. Ja izmanto abu dzimumu dzīvniekus, var būt lietderīgi izmantot faktoriālo plānu. Sīkāka informācija par to, kā analizēt datus, izmantojot šo plānu, ir sniegta 2. papildinājumā.

Sākot pētījumu, jāizveido pietiekami lielas grupas, lai vienā grupā būtu vismaz pieci analizējami viena dzimuma dzīvnieki vai, ja tiek izmantoti abu dzimumu dzīvnieki, vismaz pieci analizējami katra dzimuma dzīvnieki. Gadījumos, kad cilvēka organisma eksponētība ķīmikālijām var būt atšķirīga atkarībā no dzimuma, kā ir, piemēram, ar dažiem farmaceitiskajiem preparātiem, testu veic ar attiecīgā dzimuma dzīvniekiem. Maksimālo tipisko dzīvnieku skaita prasību piemērs: kaulu smadzeņu pētījumā ar divām paraugošanas reizēm ar trīs devu grupām un paralēlu negatīvo kontrolgrupu, kā arī pozitīvo kontrolgrupu (pieci viena dzimuma dzīvnieki katrā grupā) būtu nepieciešami 45 dzīvnieki.

Devu lielums

Ja tiek veikts iepriekšējs diapazona noteikšanas pētījums, jo nav pieejami piemēroti dati, kas palīdzētu izvēlēties devu, tas jāveic tajā pašā laboratorijā, izmantojot to pašu sugu, celmu, dzimumu un apstrādes režīmu, kas tiks izmantots galvenajā testā (10). Pētījums jāveic ar mērķi identificēt maksimālo panesamo devu (MTD), kas ir lielākā pieļaujamā deva, kura pētījuma ilgumam atbilstošā laikā ir panesama bez pētījumu ierobežojošas toksicitātes pazīmju izraisīšanas (piem., inducē ķermeņa svara samazināšanos vai hematopoētiskās sistēmas citotoksicitāti), bet neizraisa nāvi vai tādas sāpju, ciešanu vai diskomforta pazīmes, kā dēļ būtu jāveic humāna eitanāzija (11).

Lielāko devu var definēt arī kā tādu devu, pie kuras novērojamas dažas pazīmes, kas liecina par toksicitāti kaulu smadzenēs.

Ķīmikālijas, pie kurām novērojams toksikokinētisko procesu piesātinājums vai kuras inducē detoksifikācijas procesus, kas pēc ilgtermiņa apstrādes var radīt eksponētības samazinājumu, var būt devu noteikšanas kritēriju izņēmumi, un katrs gadījums jāizvērtē atsevišķi.

Lai iegūtu informāciju par devas-atbildreakcijas sakarību, pilnīgā pētījumā jāiekļauj negatīvā kontrolgrupa un vismaz trīs devu līmeņi, kuru atstatuma koeficients parasti ir 2, bet nepārsniedz 4. Ja testējamā ķīmikālija diapazona noteikšanas pētījumā toksicitāti nerada vai to nerada saskaņā ar esošajiem datiem, lielākajai vienreizējai devai jābūt 2 000 mg/kg ķermeņa svara. Ja testējamā ķīmikālija toksicitāti tomēr izraisa, MTD jābūt augstākajai ievadītajai devai un izmantotajiem devu līmeņiem būtu jāaptver diapazons, kas aptver gan maksimālo devu, gan devu, kas ir maztoksiska vai netoksiska. Ja pie visiem testētajiem devu līmeņiem tiek novērota toksiska ietekme uz mērķaudiem (kaulu smadzenēm), ieteicams veikt vēl vienu pētījumu ar netoksiskām devām. Pētījumos, kuros plānots pilnīgāk raksturot kvantitatīvo atbildreakciju uz devu, var būt nepieciešams izmantot papildu devu grupas. Atsevišķiem testējamo ķīmikāliju veidiem (piem., cilvēku zālēm), uz kuriem attiecas konkrētas prasības, šīs robežas var atšķirties.

Robežtests

Ja devu diapazona noteikšanas eksperimenti vai dati no saistītiem dzīvnieku celmiem liecina, ka apstrādes režīms vismaz ar robeždevu (sk. tālāk) nekādu novērojamu toksisku ietekmi (ne pazeminātu kaulu smadzeņu sūnradī, ne citas pazīmes, kas liecinātu par citotoksisku ietekmi uz mērķaudiem) nerada, un ja, pamatojoties uz genotoksicitātes *in vitro* pētījumiem vai datiem par strukturāli radniecīgām ķīmikālijām, genotoksicitāte nav paredzama, var uzskatīt, ka veikt pilnu pētījumu ar trim devu līmeņiem nav nepieciešams, ja vien ir pierādīts, ka testējamā(-s) ķīmikālija(-s) mērķaudus (kaulu smadzenes) sasniedz. Tādos gadījumos var pietikt ar vienu devas līmeni — robeždevu. Attiecībā uz > 14 dienu ievadīšanas periodu robeždeva ir 1 000 mg/kg ķermeņa svara dienā. Attiecībā uz 14 dienu vai īsāku ievadīšanas periodu robeždeva ir 2 000 mg/kg ķermeņa svara dienā.

Devu ievadišana

Testa plānošanā jāņem vērā, kāds varētu būt cilvēka ekspozīcijas ceļš. Ja vien tas ir pamatoti, var izvēlēties dažādus ekspozīcijas ceļus, piem., uzņemšanu ar barību, dzeramo ūdeni, vietēju aplicēšanu, zemādas ievadišanu, intravenozu ievadišanu, uzņemšanu orālā ceļā (ar gavāžu), inhalāciju, uzņemšanu intratraheāli vai implantācijas ceļā. Jebkurā gadījumā ceļš jāizvēlas tā, lai nodrošinātu mērķaudu pienācīgu ekspozīciju. Parasti nav ieteicama intraperitoneāla injekcija, jo cilvēkam šāds ekspozīcijas ceļš nav raksturīgs, un tā būtu jāizmanto tikai ar konkrētu zinātnisko pamatojumu. Ja testējamo ķīmikāliju piejauc barībai vai dzeramajam ūdenim, jo īpaši ar vienreizēju devu, jā rūpējas, lai starp pārtikas un ūdens patēriņu un paraugošanu pārietu pietiekami daudz laika, lai būtu iespējams detektēt ietekmes (sk. 33.–34. punktu). Maksimālais šķidruma tilpums, ko vienā paņēmienā var ievadīt ar gavāžu vai injekciju, ir atkarīgs no testa dzīvnieka lieluma. Parasti tilpums nedrīkst pārsniegt 1 ml uz 100 g ķermeņa svara, izņemot ūdens šķīdumu gadījumu, kad var lietot ne vairāk kā 2 ml uz 100 g ķermeņa svara. Ja izmanto lielāku tilpumu, tas jāpamato. Izņemot gadījumus, kad tiek izmantotas kairinošas vai korozīvas testējamās ķīmikālijas, kuru ietekme lielākās koncentrācijās parasti ir izteiktāka, ir līdz minimumam jāsamazina tilpuma variabilitāte, koriģējot koncentrāciju tā, lai visos devu līmeņos tilpuma attiecība pret ķermeņa svaru saglabātos vienāda.

Apstrādes kārtība

Parasti testējamās ķīmikālijas ievada vienā apstrādes reizē, taču tās var ievadīt arī dalīti (t. i., divās vai vairākās reizēs vienā un tajā pašā dienā ar ne vairāk kā 2–3 stundu starplaiku), kas var būt vajadzīgs gadījumos, kad jāievada liels tilpums. Tādā gadījumā vai ievadot testējamo ķīmikāliju ar inhalāciju, paraugošanas laiks jāplāno, pamatojoties uz pēdējās devas laiku vai ekspozīcijas beigām.

Par atkārtotas devas protokola piemērotību šim testam ir pieejams maz datu. Tomēr gadījumos, kad ir vēlams šo testu integrēt ar atkārtotas devas toksicitātes testu, jā rūpējas par to, lai novērstu hromosomāli bojātu mitotisko šūnu zudumu, kas var rasties pie toksiskām devām. Tāda integrēšana ir pieņemama, ja lielākā deva pārsniedz robeždevu vai ir vienāda ar to (sk. 29. punktu) un devas grupai apstrādes perioda laiku dod robeždevu. Kad vajadzīga integrēšana ar citiem pētījumiem, par vēlamo *in vivo* testu hromosomu aberāciju noteikšanai uzskatāms mikrokodolu tests (testēšanas metode B.12.)

Pēc vienreizējas apstrādes kaulu smadzeņu paraugi jāņem divos dažādos laikos. Attiecībā uz grauzējiem pirmajam paraugošanas intervālam vajadzētu būt laikam, kas nepieciešams 1,5 normālu šūnas ciklu apritēšanai (parasti 12–18 stundas pēc apstrādes). Tā kā testējamās(-o) ķīmikālijas(-u) uzņemšanai un metabolizēšanai, kā arī tās iedarbībai uz šūnas cikla kinētiku vajadzīgs laiks, kas var ietekmēt hromosomu aberāciju noteikšanas optimālo laiku, otro paraugošanu ieteicams veikt 24 stundas pēc pirmās paraugošanas. Pirmajā paraugošanas reizē jāapstrādā visas devu grupas un jāsavāc paraugi analīzei, taču nākamajā(-s) paraugošanas reizē(-s) jāievada tikai lielākā deva. Ja ar zinātnisku pamatojumu tiek izmantoti devu režīmi, kuri aptver vairāk nekā vienu dienu, parasti jāizmanto viens paraugošanas laiks — aptuveni 1,5 normālo šūnu ciklus pēc galīgās apstrādes.

Pēc apstrādes un pirms paraugošanas dzīvniekiem intraperitoneāli injicē atbilstošu devu metafāzi apturoša faktora (piem., kolcemīda vai kolhicīna) un pēc atbilstoša intervāla veic paraugošanu. Pelēm šis intervāls ir aptuveni 3–5 stundas pirms paraugošanas, bet žurkām — 2–5 stundas. Savāc kaulu smadzeņu šūnas, tās piebriedina, fiksē un iekrāso un analizē uz hromosomu aberācijām (12).

Novērojumi

Katru dienu vismaz reizi dienā, vēlams — vienā laikā vai laikos un ņemot vērā gaidāmo ietekmju maksimumperiodu pēc aplicēšanas, jāizdara vispārēji testa dzīvnieku klīniskie novērojumi un jāreģistrē novērotās klīniskās pazīmes. Devas došanas periodā visus dzīvniekus vismaz divreiz dienā novēro attiecībā uz morbiditāti un mirstību. Pētījuma sākumā, atkārtotas devas pētījumos vismaz reizi nedēļā un eitanāzijas laikā visi dzīvnieki jānosver. Pētījumos, kuri ilgst vismaz vienu nedēļu, vismaz reizi nedēļā jāmēra pārtikas patēriņš. Ja testējamo ķīmikāliju ievada ar dzeramo ūdeni, ūdens patēriņš jāmēra katru reizi, kad ūdens tiek mainīts, un vismaz reizi nedēļā. Dzīvniekus, kam novērojamas pārliekas toksicitātes neletālas pazīmes, pirms testa perioda beigām humāni eitanazē (11).

Mērķaudu ekspozīcija

Asins paraugi jāņem pienācīgā(-os) laikā(-os), lai būtu iespējams noskaidrot testējamās ķīmikālijas līmeni plazmā un gadījumos, kad tas vajadzīgs un citu datu par ekspozīciju nav, varētu pierādīt, ka kaulu smadzeņu ekspozīcija ir notikusi (sk. 44. punktu).

Kaulu smadzeņu un hromosomu sagatavošana

Uzreiz pēc humānas eitanāzijas no augststilba kaula vai lielā lielakaula iegūst kaulu smadzeņu šūnas, ko apstrādā ar hipotonisku šķīdumu un fiksē. Tad metafāzes šūnas uznes uz priekšmetstikliņiem un iekrāso, izmantojot vispārpieņemtas metodes (sk. (3) (12)).

Analīze

Visi priekšmetstikliņi, tostarp no pozitīvajām un negatīvajām kontrolēm, pirms analīzes neatkarīgi jākodē un jārandomizē, lai vērtētājam nebūtu zināms, vai un kā tie apstrādāti.

Lai noteiktu citotoksicitāti, jānosaka mitotiskais indekss vismaz 1 000 šūnām no katra apstrādātā dzīvnieka (tostarp pozitīvajām kontrolēm), kā arī no katra neapstrādātā vai nesēja/šķīdinātāja negatīvās kontroles dzīvnieka.

Vismaz 200 katra dzīvnieka metafāzes analizē uz strukturālajām hromosomu aberācijām (ar pārtraukumiem un bez tiem) (6). Tomēr, ja vēsturisko negatīvo kontroļu datubāze liecina, ka vidējais strukturālu hromosomu aberāciju fona biežums testējošajā laboratorijā ir < 1 %, jāapsver papildu šūnu novērtēšana. Hromatīdas un hromosomas tipa aberācijas jāreģistrē atsevišķi un jāklasificē apakštipos (pārrāvumi un apmaiņas). Laboratorijā izmantotajām procedūrām jānodrošina, ka hromosomu aberāciju analīzi veic apmācīti vērtētāji un ka attiecīgā gadījumā to profesionālizvērtē. Apzinoties, ka priekšmetstikliņu sagatavošanas procedūrā bieži tiek bojāta daļa metafāzes šūnu, kuras zaudē hromosomas, centromēru skaitam novērtētajās šūnās jābūt vienādam ar vismaz $2n \pm 2$, kur n ir konkrētās sugas haploidālais hromosomu skaits.

DATI UN PĀRSKATA SNIEGŠANA

Rezultātu apstrāde

Datus par katru dzīvnieku apkopo tabulā. Izvērtē katra dzīvnieka šūnu mitotisko indeksu, novērtēto metafāzes šūnu skaitu, aberāciju skaitu uz vienu metafāzes šūnu un to šūnu procentuālo daļu, kurām novērojama(-s) strukturāla(-s) hromosomu aberācija(-s). Uzskaita dažādu veidu strukturālās hromosomu aberācijas, norādot to skaitu un biežumu gan apstrādātajās grupās, gan kontrolgrupās. Atsevišķi reģistrē pārtraukumus, kā arī poliploīdas šūnas un šūnas ar endoreduplicētām hromosomām. Ziņo par pārtraukumu biežumu, bet strukturālo aberāciju kopējā biežuma analīzē to parasti neiekļauj. Ja nekas neliecina par atšķirīgu atbildreakciju atkarībā no dzīvnieku dzimuma, statistiskās analīzes veikšanai datus var apvienot. Jāziņo arī dati par dzīvniekiem novēroto toksicitāti un klīniskajām pazīmēm.

Pieņemamības kritēriji

Testa pieņemamību nosaka, pamatojoties uz šādiem kritērijiem:

- a) paralēlās negatīvās kontroles datiem tiek uzskatīti par pieņemamiem iekļaušanai laboratorijas vēsturisko kontroļu datubāzē (sk. 11.–14. punktu);
- b) paralēlās pozitīvās kontroles vai novērtēšanas kontroles inducē atbildreakcijas, kas atbilst tām, kuras ģenerētas vēsturisko pozitīvo kontroļu datubāzē iekļautajās kontrolēs, un izsaka statistiski ievērojamu pieaugumu salīdzinājumā ar negatīvo kontroli (sk. 20.–21. punktu);
- c) ir analizēts pienācīgs devu un šūnu skaits;
- d) lielākās devas izvēles kritēriji atbilst 25.–28. punktā aprakstītajiem kritērijiem.

Rezultātu izvērtēšana un interpretēšana

Ja ir izpildīti visi pieņemamības kritēriji, testējamo ķimikāliju uzskata par viennozīmīgi pozitīvu, ja:

- a) vismaz vienai no apstrādes grupām novērojams statistiski nozīmīgs tādu šūnu biežuma pieaugums, kurām ir strukturālas hromosomu aberācijas (izņemot pārtraukumus), salīdzinājumā ar paralēlo negatīvo kontroli;
- b) šo pieaugumu izvērtējot ar atbilstošu trenda testu, vismaz vienā paraugošanas reizē ir konstatējama pieauguma sakarība ar devu un
- c) kāds no šiem rezultātiem atrodas ārpus vēsturisko negatīvo kontroļu datu sadalījuma (piem., 95 % kontroles robežām pēc Puasona sadalījuma).

Ja konkrētajā paraugošanas reizē tiek izvērtēta tikai lielākā deva, testējamo ķimikāliju uzskata par viennozīmīgi pozitīvu, ja novērojams statistiski nozīmīgs pieaugums salīdzinājumā ar paralēlo negatīvo kontroli un rezultāti atrodas ārpus vēsturisko negatīvo kontroļu datu sadalījuma (piem., 95 % kontroles robežām pēc Puasona sadalījuma). Ieteikumi par piemērotākajām statistiskajām metodēm atrodami literatūras sarakstā (13). Veicot devas–atbildreakcijas analīzi, jāanalizē vismaz trīs apstrādātas devu grupas. Statistikas testos eksperimenta vienība ir dzīvnieks. Pozitīvi hromosomālo aberāciju testa rezultāti liecina, ka testējamā ķimikālija testa sugas dzīvnieku kaulu smadzenēs inducē strukturālas hromosomu aberācijas.

Ja ir izpildīti visi pieņemamības kritēriji, testējamo ķimikāliju uzskata par viennozīmīgi negatīvu, ja visos izvērtētajos eksperimentālajos nosacījumos:

- a) nevienai no apstrādes grupām nav novērojams statistiski nozīmīgs tādu šūnu biežuma pieaugums, kurām ir strukturālas hromosomu aberācijas (izņemot pārtraukumus), salīdzinājumā ar paralēlo negatīvo kontroli;

- b) to izvērtējot ar atbilstošu trenda testu, nevienā paraugošanas reizē nav novērojams ar devu saistīts palielinājums;
- c) visi rezultāti atrodas vēsturisko negatīvo kontroļu datu sadalījuma robežās (piem., 95 % kontroles robežās pēc Puasona sadalījuma); un
- d) kaulu smadzenes ir bijušas eksponētas testējamai(-ām) ķīmikālijai(-ām).

Ieteikumi par piemērotākajām statistiskajām metodēm atrodami literatūrā (13). Par kaulu smadzeņu eksponētību testējamajai ķīmikālijai var liecināt, piemēram, mitotiskā indeksa samazināšanās vai testējamās(-o) ķīmikālijas(-u) līmeņa mērījums plazmā vai asinīs. Intravenozas ievadīšanas gadījumā pierādījumi par eksponētību nav nepieciešami. Alternatīvi kaulu smadzeņu eksponētības pierādīšanai var izmantot ADME datus, kas iegūti neatkarīgā pētījumā, kurā izmantots tas pats ceļš un tā pati suga. Negatīvi rezultāti liecina, ka testa apstākļos testējamā ķīmikālija neinducē strukturālas hromosomu aberācijas testa sugas dzīvnieku kaulu smadzenēs.

Nav prasības viennozīmīgi pozitīvu vai viennozīmīgi negatīvu atbildreakciju verificēt.

Gadījumos, kad atbildreakcija nav viennozīmīgi negatīva vai pozitīva, lai palīdzētu noteikt rezultāta bioloģisko relevantumu (piem., vājš vai neskaidrs pieaugums), dati jānovērtē ekspertam un/vai jāpabeidz esošo eksperimentu sīkāka izskatīšana. Dažos gadījumos varētu būt lietderīgi analizēt lielāku skaitu šūnu vai veikt atkārtotu eksperimentu, izmantojot mainītus eksperimenta apstākļus.

Retos gadījumos pat pēc sīkākas izskatīšanas dati neļauj secināt, ka testējamā ķīmikālija rada pozitīvus vai negatīvus rezultātus, un tad uzskata, ka pētījuma rezultāts ir neskaidrs.

Poliploīdu un endoreduplicētu metafāzes šūnu biežums attiecībā pret metafāzes šūnām kopā jāreģistrē atsevišķi. Poliploīdo/endoreduplicēto šūnu skaita pieaugums var norādīt uz to, ka testējamajai ķīmikālijai, iespējams, piemīt potenciāls inhibēt mitotiskos procesus vai šūnu cikla progresu (sk. 3. punktu).

Testēšanas pārskats

Testēšanas pārskatā jāiekļauj tālāk norādītā informācija.

Kopsavilkums

Testējamā ķīmikālija:

- avots, sērijas numurs, izmantošanas termiņš, ja pieejams,
- testējamās ķīmikālijas stabilitāte, ja tā zināma.

Vienkomponenta viela:

- fiziskais izskats, šķīdība ūdenī un citas relevantas fizikālķīmiskās īpašības,
- ķīmiskās identifikācijas dati, piem., IUPAC vai CAS nosaukums, CAS numurs, SMILES vai InChI kods, struktūrformula, tīrība, attiecīgā gadījumā, ja tas ir praktiski iespējams, piemaisījumu ķīmiskā identitāte u. c.

Daudzkomponentu viela, UVCB un maisījumi:

- ciktāl iespējams, raksturoti ar sastāvdaļu ķīmisko identitāti (sk. iepriekš), kvantitatīvo saturu un relevantajām fizikālķīmiskajām īpašībām.

Testējamās ķīmikālijas sagatavošana:

- nesēja izvēles pamatojums,
- testējamās ķīmikālijas šķīdība un stabilitāte šķīdinātājā/nesējā, ja tā zināma,
- barības, dzeramā ūdens vai inhalāciju preparātu sagatavošana,
- analītiskie secinājumi par preparātiem (piem., stabilitāte, homogenitāte, nominālās koncentrācijas), ja tie izdarīti.

Testa dzīvnieki:

- izmantotā suga/celms un tā izmantošanas pamatojums,
- dzīvnieku skaits, vecums un dzimums,
- izcelsme, turēšanas apstākļi, barošana u. c.,
- dzīvnieku unikālās identificēšanas metode,
- īstermiņa pētījumiem: katra dzīvnieka svars testa sākumā un beigās; pētījumiem, kas notiek ilgāk par nedēļu: katra dzīvnieka svars pētījuma laikā un pārtikas patēriņš. Iekļauj katras grupas dzīvnieku ķermeņa svara diapazonu, vidējo vērtību un standartnovirzi.

Testēšanas apstākļi:

- pozitīvās un negatīvās (nesēja/šķīdinātāja) kontroles,
- diapazona noteikšanas testa rezultāti, ja tas veikts,
- devu līmeņa izvēles pamatojums,
- sīka informācija par testējamās ķīmikālijas sagatavošanu,
- sīka informācija par testējamās ķīmikālijas ievadīšanu,
- izvēlēta ievadīšanas ceļa un ilguma pamatojums,
- metodes, kā verificēts, ka testējamā(-s) ķīmikālija(-s) nonākusi(-šas) vispārējā asinsritē vai kaulu smadzenēs,
- faktiskā deva (mg uz vienu kg ķermeņa svara dienā), kas aprēķināta pēc testējamās ķīmikālijas koncentrācijas (ppm) barībā / dzeramajā ūdenī un pēc uzņemtā daudzuma (attiecīgā gadījumā),
- sīka informācija par barības un ūdens kvalitāti,
- eitanāzijas paņēmieni,
- atsāpināšanas metode (ja tāda izmantota),
- detalizēts apstrādes un paraugošanas grafiku apraksts un izvēles pamatojums,
- priekšmetstikliņu sagatavošanas metodes,
- toksicitātes novērtēšanas metodes,
- metafāzes apturēšanai izmantotās ķīmikālijas identitāte, tās koncentrācija, deva un laiks no ievadīšanas līdz paraugošanai,
- paraugu izolēšanas un saglabāšanas procedūras,
- aberāciju novērtēšanas kritēriji,

- analizēto katra dzīvnieka metafāzes šūnu skaits un mitotiskā indeksa noteikšanai analizēto šūnu skaits,
- pētījuma pieņemamības kritēriji,
- kritēriji, pēc kuriem novērtē, vai pētījuma rezultāts ir pozitīvs, negatīvs vai neskaidrs,

Rezultāti:

- dzīvnieka stāvoklis pirms testēšanas perioda un tā laikā, arī toksicitātes pazīmes,
- mitotiskais indekss, ko norāda par katru dzīvnieku atsevišķi,
- aberāciju un aberanto šūnu tips un skaits, ko norāda par katru dzīvnieku atsevišķi,
- kopējais aberāciju skaits grupās, vidējās vērtības un standartnovirzes,
- šūnu ar aberācijām skaits katrā grupā, vidējās vērtības un standartnovirzes,
- ploīdijas izmaiņas, ja tās tiek novērotas, tostarp poliploīdo un/vai endoreduplicēto šūnu biežums,
- ja iespējams, devas-atbildreakcijas sakarība,
- izmantotā statistiskā analīze un metode,
- kaulu smadzeņu eksponētību apliecinājoši dati,
- paralēlo negatīvo un pozitīvo kontroļu dati, diapazoni, vidējās vērtības un standartnovirzes,
- vēsturisko negatīvo un pozitīvo kontroļu dati, diapazoni, vidējās vērtības, standartnovirzes un 95 % kontroles robežas sadalījumam, kā arī aptvertais laikposms un novērojumu skaits,
- izpildītie pozitīvas vai negatīvas atbildreakcijas kritēriji.

Rezultātu iztirzājums.

Secinājumi.

Atsauces.

LITERATŪRAS SARAKSTS

- (1) OECD (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, No. 234, OECD, Paris.
- (2) Adler, I.D. (1984), "Cytogenetic Tests in Mammals", in *Mutagenicity Testing: A Practical Approach*, Venittand, S., J.M. Parry (eds.), IRL Press, Washington, DC, pp. 275-306.
- (3) Preston, R.J. *et al.* (1987), *Mammalian in vivo cytogenetic assays. Analysis of chromosome aberrations in bone marrow cells*, Mutation Research, Vol. 189/2, pp. 157-165.
- (4) Richold, M. *et al.* (1990), "In Vivo Cytogenetics Assays", in *Basic Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report. Part I revised*, Kirkland, D. J. (ed.), Cambridge University Press, Cambridge, pp. 115-141.
- (5) Tice, R.R. *et al.* (1994), Report from the working group on the *in vivo* mammalian bone marrow chromosomal aberration test, Mutation Research, Vol. 312/3, pp. 305-312.

-
- (6) Adler, I.D. *et al.* (1998), Recommendations for statistical designs of *in vivo* mutagenicity tests with regard to subsequent statistical analysis, Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, Vol. 417/1, pp. 19-30.
- (7) Ryan, T.P. (2000), Statistical Methods for Quality Improvement, 2nd ed., John Wiley and Sons, New York.
- (8) Hayashi, M. *et al.* (2011), Compilation and use of genetic toxicity historical control data, Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, Vol. 723/2, pp. 87-90.
- (9) Hayashi, M. *et al.* (1994), *in vivo* rodent erythrocyte micronucleus assay, Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects, Vol. 312/3, pp. 293-304.
- (10) Fielder, R.J. *et al.* (1992), Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group. Dose setting in *in vivo* mutagenicity assays, Mutagenesis, Vol. 7/5, pp. 313-319.
- (11) OECD (2000), "Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation", OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, N°19, OECD Publishing, Paris.
- (12) Pacchierotti, F., V. Stocchi (2013), Analysis of chromosome aberrations in somatic and germ cells of the mouse, Methods in Molecular Biology, Vol. 1044, pp. 147-163.
- (13) Lovell, D.P. *et al.* (1989), "Statistical Analysis of *in vivo* Cytogenetic Assays", in Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. UKEMS SubCommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing, Report, Part III, Kirkland, D.J. (ed.), Cambridge University Press, Cambridge, pp. 184-232.
-

1. papildinājums

DEFINĪCIJAS

Aneiploīdija: jebkāda novirze no normālā diploīdā (vai haploīdā) hromosomu skaita par vienu vai vairākām hromosomām, bet ne par veselu hromosomu komplektu(-iem) (sal. "poliploīdija").

Centromērs: hromosomas rajons(-i), ar kuru(-iem) šūnas dalīšanās laikā saistās vārpstas šķiedras, nodrošinot meithromosomu pareizu pārvietošanos uz meitšūnu poliem.

Ķīmikālija: viela vai maisījums.

Hromatīdas tipa aberācija: strukturāls hromosomas bojājums, kas izpaužas kā atsevišķas hromatīdas pārrāvums vai hromatīdu pārrāvums un savienošānās.

Hromosomas tipa aberācija: strukturāls hromosomas bojājums, kas izpaužas kā abu hromatīdu pārrāvums vai pārrāvums un savienošānās vienā un tajā pašā vietā.

Endoreduplikācija: process, kurā pēc DNS replikācijas S perioda nevis notiek šūnas kodola mitoze, bet sākas jauns S periods. Rezultātā izveidojas hromosomas ar 4, 8, 16... hromatīdām.

Pārtraukums: ahromatisks bojājums, kurš ir mazāks par vienas hromatīdas platumu un kurā hromatīdas daļas ir nobīdītas minimāli.

Mitotiskais indekss: attiecība starp mitozes šūnu skaitu un šūnu kopējo skaitu populācijā, kas ir vairošanās statusa mērs attiecīgajā šūnu populācijā.

Hromosomu skaita aberācija: testam izmantoto dzīvnieku parastā hromosomu skaita izmaiņas (aneiploīdija).

Poliploīdija: tāda hromosomu skaita aberācija, kas skar veselu hromosomu komplektu, pretstatā hromosomu skaita izmaiņām hromosomu komplekta daļā (sal. "aneiploīdija").

Strukturāla hromosomas aberācija: hromosomas struktūras izmaiņas, kas detektējamās, ar mikroskopu apskatot šūnas to dalīšanās metafāzē, un kas izpaužas kā delēcijas un fragmentācija, intrahromosomiskas vai interhromosomiskas modifikācijas.

Testējamā ķīmikālija: jebkura viela vai maisījums, ko testē ar šo testēšanas metodi.

2. papildinājums

FAKTORIĀLAIS PLĀNS DZIMUMATŠĶIRĪBU IDENTIFICĒŠANAI IN VIVO HROMOSOMĀLO ABERĀCIJU TESTĀ**Faktoriālais plāns un tā analīze**

Saskaņā ar šo plānu pie katra koncentrācijas līmeņa testē vismaz 5 tēviņus un 5 mātītes, tātad plānā tiek izmantoti vismaz 40 dzīvnieki (20 tēviņi un 20 mātītes un attiecīgās pozitīvās kontroles).

Šis plāns ir viens no vienkāršajiem faktoriālajiem plāniem un ir līdzvērtīgs dispersijas divfaktoru analīzei, kur galvenie aplūkoto efekti ir dzimuma un koncentrācijas līmeņa efekti. Šos datus var analizēt, izmantojot daudzas statistikas programmatūras standartpaketes, piem., SPSS, SAS, STATA, Genstat, kā arī izmantojot R.

Šajā analīzē datu kopas dispersiju sadala dispersijā, kas saistīta ar dzimumu, dispersijā, kas saistīta ar koncentrāciju, un dispersijā, kas saistīta ar dzimumu un koncentrāciju mijiedarbību. Katru no šiem locekļiem salīdzina ar aplēsto dispersiju starp replikātdzīvniekiem viena dzimuma dzīvnieku grupās pie vienas un tās pašas koncentrācijas. Pilnīga informācija par pamatā esošo metodoloģiju pieejama daudzās standarta statistikas mācību grāmatās (sk. atsauces) un statistiskajās paketēs pieejamajos palīgrikos.

Analīzi turpina, ANOVA tabulā ⁽¹⁾ apskatot mijiedarbības locekli "dzimums x koncentrācija". Ja mijiedarbības loceklis nav nozīmīgs, visu dzimumu vai visu koncentrācijas līmeņu apkopotās vērtības ļauj veikt derīgus starplīmeņu statistikas testus, pamatojoties uz ANOVA grupā apkopotās dispersijas locekli.

Analīzi turpina, dažādām koncentrācijām aplēsto dispersiju sadalot kontrastos, tādējādi iegūstot lineārus un kvadrātiskus atbildreakciju kontrastus visiem koncentrācijas līmeņiem. Ja mijiedarbības loceklis "dzimums x koncentrācija" ir nozīmīgs, arī šo locekli var sadalīt mijiedarbības kontrastos "lineārais loceklis x dzimums" un "kvadrātloceklis x dzimums". Šie locekļi ļauj pārbaudīt, vai koncentrāciju atbildreakcijas abiem dzimumiem ir paralēlas vai katram dzimumam ir atšķirīga atbildreakcija.

Grupā apkopotās dispersijas aplēsi var izmantot, lai pārveida testos [*pair-wise test*] testētu vidējo vērtību starpību. Šos salīdzinājumus var veikt starp abu dzimumu vidējām vērtībām un starp dažādu koncentrācijas līmeņu vidējām vērtībām, piem., salīdzinājumiem ar negatīvās kontroles līmeņiem. Nozīmīgas mijiedarbības gadījumos iespējams veikt salīdzinājumus starp dažādu koncentrāciju vidējām vērtībām viena dzimuma ietvaros vai abu dzimumu vidējām vērtībām pie vienādas koncentrācijas.

Atsauces

Ir daudz statistikas mācību grāmatu, kurās apspriesta faktoriālo plānu teorija, struktūra, metodoloģija, analīze un interpretācija diapazonā no vienkāršākajām divfaktoru analīzēm un līdz sarežģītākām formām, ko izmanto eksperimentu plānošanas metodoloģijā. Tālāk sniegtais saraksts nav izsmelošs. Dažās grāmatās sniegti izstrādāti salīdzināmu plānu piemēri, un dažos gadījumos norādīts kods analīžu veikšanai ar dažādām programmatūras paketēm.

Box, G.E.P, Hunter, W.G. and Hunter, J.S. (1978). Statistics for Experimenters. An Introduction to Design, Data Analysis, and Model Building. New York: John Wiley & Sons.

Box G.E.P. & Draper, N.R. (1987). Empirical model-building and response surfaces. John Wiley & Sons Inc.

Doncaster, C.P. & Davey, A.J.H. (2007). Analysis of Variance and Covariance: How to Choose and Construct Models for the Life Sciences. Cambridge University Press.

Mead, R. (1990). The Design of Experiments. Statistical principles for practical application. Cambridge University Press.

⁽¹⁾ Statistiķi, kuri izmanto modelēšanas pieeju, piemēram, *General Linear Models (GLM)*, var veikt analīzi citādā, bet salīdzināmā veidā, taču ne vienmēr sastādīs ierasto ANOVA tabulu, kuru sāka izmantot, kad vēl pirmsdatorizācijas laikmetā statistiskajiem aprēķiniem izmantoja algoritmiskas pieejas.

Montgomery D.C. (1997). Design and Analysis of Experiments. John Wiley & Sons Inc.

Winer, B.J. (1971). Statistical Principles in Experimental Design. McGraw Hill.

Wu, C.F.J & Hamada, M.S. (2009). Experiments: Planning, Analysis and Optimization. John Wiley & Sons Inc.”

5) pielikuma B daļā B.12. nodaļu aizstāj ar šādu:

“B.12. Zīdītāju eritrocītu mikro kodolu tests

Ievads

Šī testēšanas metode ir ekvivalenta ESAO Testēšanas vadlīnijai Nr. 474 (2016). Tā ir daļa no ģenētiskās toksikoloģijas testēšanas metožu klāsta. Ir izstrādāts ESAO dokuments, kas īsi informē par testēšanu ģenētiskajā toksikoloģijā un sniedz pārskatu par neseniem šīs vadlīnijas grozījumiem.

Zīdītāju mikro kodolu *in vivo* tests genotoksicitātes novērtēšanā ir īpaši svarīgs, jo, kaut arī tie var atšķirties atkarībā no sugas, *in vivo* metabolisma, farmakokinētikas un DNS reparācijas procesu faktori ir aktīvi un sekmē atbildreakcijas rašanos. *In vivo* testu var izmantot arī tam, lai sīkāk izpētītu *in vitro* sistēmā detektētu genotoksicitāti.

Zīdītāju mikro kodolu *in vivo* testu izmanto, lai detektētu bojājumus, ko testējamā ķīmikālija inducējusi hromosomās vai eritroblastu mitotiskajā aparātā. Ar šo testu izvērtē mikro kodolu veidošanos eritrocītos, kas paraugoti dzīvnieku, parasti grauzēju, kaulu smadzenēs vai perifērisko asiņu šūnās.

Ar mikro kodolu testu nosaka, kādas ķīmikālijas izraisa citoģenētiskus bojājumus, kuru dēļ veidojas mikro kodoli, kuros ir vai nu aizkavējušos hromosomu fragmenti, vai veselas hromosomas.

Kad kaulu smadzeņu eritroblasts attīstās par nobriedušu eritrocītu (dažreiz to sauc arī par polihromatocītu vai retikulocītu), galvenais kodols tiek izspiests; izveidojušies mikro kodoli var palikt citoplazmā. Šajās šūnās ieraudzīt vai detektēt mikro kodolus ir vieglāk, jo tām nav galvenā kodola. Tas, ka apstrādātajos dzīvniekos pieaug tādu nobriedušu eritrocītu skaits, kuriem ir mikro kodoli, liecina par izraisītām strukturālām vai skaitliskām hromosomālām aberācijām.

Jaunizveidojušos eritrocītus ar mikro kodoliem identificē un kvantificē ar iekrāsošanu, kam seko vai nu vizuāla novērtēšana, izmantojot mikroskopu, vai automātiska analīze. Pietiekami daudzu nobriedušu eritrocītu saskaitīšanu pieaugušu dzīvnieku perifēriskajās asinīs vai kaulu smadzenēs būtiski atvieglo automātiskas novērtēšanas platforma. Tādas platformas ir pieņemamas alternatīvas manuālai izvērtēšanai (2). Salīdzinošie pētījumi ir pierādījuši, ka tādas metodes, izmantojot pienācīgus kalibrēšanas standartus, var uzlabot reproducējamību citās laboratorijās un tajā pašā laboratorijā un dot labāku jutību nekā manuāla novērtēšana ar mikroskopu (3) (4). Automātiskas sistēmas, kas var izmērīt mikro kodolu eritrocītu biežumu, ir plūsmas citometri (5), attēlu analizēšanas platformas (6) (7) un lāzerskenēšanas citometri (8), bet ne tikai.

Kaut arī parasti testā to nedara, hromosomu fragmentus pēc vairākiem kritērijiem var atšķirt no veselām hromosomām. Pie tiem pieder kinetohora vai centromēriskas DNS klātbūtne vai trūkums, kas abi ir raksturīgi neskartām hromosomām. Kinetohora vai centromēriskas DNS trūkums norāda, ka mikro kodols satur vienīgi hromosomu fragmentus, savukārt to klātesamība norāda uz hromosomu zudumu.

Izmantoto terminu definīcijas ir sniegtas 1. papildinājumā.

SĀKOTNĒJIE APSVĒRUMI

Šajā testā par mērķaudiem ģenētisko bojājumu noteikšanai parasti izmanto jaunu pieaugušu grauzēju kaulu smadzenes, jo šajos audos veidojas eritrocīti. Citām zīdītāju sugām, kurām ir konstatēta pietiekama jutība pret ķīmikālijām, kas šajās šūnās rada strukturālas hromosomu aberācijas vai hromosomu skaita aberācijas (nenobriedušos eritrocītus inducējot mikrokodolus), ja ir sniegts zinātnisks pamatojums, nenobriedušu eritrocītu mikrokodolus var mērīt perifēriskajās asinīs. Galvenais beigupunkts ir mikrokodolus saturošu nenobriedušu eritrocītu biežums. Ja sugai nav raksturīga izteikta mikrokodolus saturošu šūnu atdalīšana liesā un dzīvnieku pastāvīgas apstrādes periods pārsniedz attiecīgās sugas eritrocītu dzīves cikla garumu (piem., peļu gadījumā — vismaz 4 nedēļas), par beigupunktu var izmantot arī mikrokodolus saturošu nobriedušu eritrocītu biežumu perifēriskajās asinīs.

Ja ir pierādījumi, ka testējamā(-s) ķīmikālija(-s) vai tās/to metabolīts(-i) mērķaudos nenonāk, šo testu izmantot var nebūt piemēroti.

Pirms šīs testēšanas metodes izmantošanas maisījumam, lai iegūtu datus kādam normatīvajam mērķim, jāapsver, vai un kādēļ tā varētu sniegt minētajam mērķim piemērotus rezultātus. Ja pastāv normatīva prasība maisījumu testēt, tāda apsvēršana nav vajadzīga.

TESTĒŠANAS METODES PRINCIPS

Dzīvniekus piemērotā ceļā eksponē testējamajai ķīmikālijai. Ja izmanto kaulu smadzenes, dzīvniekus piemērotā(-os) laikā(-os) pēc apstrādes humāni eitanazē, no tiem ekstrahē kaulu smadzenes un sagatavo un iekrāso preparātus (9) (10) (11) (12) (13) (14) (15). Ja izmanto perifēriskās asinis, pēc apstrādes noteiktā(-os) laikā(-os) ņem asinis un sagatavo un iekrāso preparātus (12) (16) (17) (18). Veicot akūtu apstrādi, ir svarīgi izvēlēties tādus kaulu smadzeņu vai asiņu ņemšanas laikus, kuros iespējams detektēt ar apstrādi saistītu mikrokodolus saturošu nenobriedušu eritrocītu inducēšanos. Ja paraugo perifēriskās asinis, jābūt pagājušam pietiekami ilgam periodam, lai šīs pārmaiņas būtu novērojamas asinsritē. Preparātos mikrokodolu klātbūtni nosaka, veicot apskati ar mikroskopu, attēlu analīzi, plūsmas citometriju vai lāzerskenēšanas citometriju.

LABORATORIJAS KOMPETENCES VERIFICĒŠANA

Kompetences noskaidrošana

Lai pirms testa regulāras izmantošanas pierādītu, ka laboratorijai ir pietiekama pieredze ar šo testu, laboratorijai jādemonstrē spēja reproducēt publicētajos datos paredzētos rezultātus (17) (19) (20) (21) (22) attiecībā uz mikrokodolu biežumu ar vismaz divām pozitīvās kontroles ķīmikālijām (tostarp vāju atbildreakciju, kas inducēta ar mazām pozitīvo kontroļu devām), piem., tām, kuras uzskaitītas 1. tabulā, un ar saderīgām nesēja/šķīdinātāja kontrolēm (sk. 26. punktu). Šajos eksperimentos jāizmanto devas, kas rada reproducējamus un ar devām saistītus pieaugumus un parāda interesējošo audu (kaulu smadzeņu vai perifērisko asiņu) testēšanas sistēmas jutību un dinamisko diapazonu, un tajos izmanto to novērtēšanas metodi, kas tiks izmantota laboratorijā. Šī prasība neattiecas uz laboratorijām, kurām ir pieredze, t. i., kuru rīcībā ir vēsturisko datu bāze, kas aprakstīta 14.–18. punktā.

Dati par vēsturiskajām kontrolēm

Kompetences noskaidrošanas laikā laboratorijai jānosaka:

- vēsturisko pozitīvo kontroļu diapazons un sadalījums un
- vēsturisko negatīvo kontroļu diapazons un sadalījums.

Pirmoreiz iegūstot datus par vēsturisko negatīvo kontroļu sadalījumu, paralēlajām negatīvajām kontrolēm jāatbilst publicētajiem datiem par kontrolēm, ja tādi ir. Vēsturisko kontroļu sadalījumam tiek papildinātam ar arvien lielāku daudzumu eksperimentālo datu, paralēlajām negatīvajām kontrolēm ideālā gadījumā jābūt 95 % minētā sadalījuma kontroles robežās. Laboratorijas vēsturisko negatīvo kontroļu datubāzei jābūt statistiski robustai, lai nodrošinātu laboratorijas spēju novērtēt tās negatīvo kontroļu datu sadalījumu. Avoti liecina, ka jāveic vismaz 10 eksperimenti, bet vēlami būtu vismaz 20 eksperimenti, kas veikti salīdzināmos eksperimenta apstākļos. Lai noteiktu laboratorijas datu variabilitāti un parādītu, ka laboratorijā šī metodoloģija "tiek kontrolēta", laboratorijām jāizmanto kvalitātes kontroles metodes, piem., kontroldiagrammas (piem., C diagrammas vai X joslu diagrammas (23)). Papildu ieteikumi par vēsturisko datu izveidi un izmantošanu (t. i., kritēriji datu iekļaušanai vēsturiskajos datos un izslēgšanai no tiem un konkrētā eksperimenta pieņemamības kritēriji) atrodami literatūrā (24).

Ja laboratorija kompetences noskaidrošanas laikā (sk. 13. punktu) neveic pietiekami daudz eksperimentu, lai izveidotu statistiski robustu negatīvo kontroļu sadalījumu (sk. 15. punktu), ir pieņemami šo sadalījumu izveidot, veicot pirmos regulārās izmantošanas testus. Tādā gadījumā jāievēro literatūrā (24) izklāstītie ieteikumi, un šajos eksperimentos iegūtajiem negatīvo kontroļu rezultātiem jāatbilst publicētajiem negatīvo kontroļu datiem.

Jebkādas izmaiņas eksperimenta protokolā jāapsver, ņemot vērā to ietekmi uz eksperimentā iegūtajiem datiem; jā saglabā to atbilstība laboratorijas esošajai vēsturisko kontroļu datubāzei. Jauna vēsturisko kontroļu datubāze jāveido vienīgi būtisku neatbilstību rezultātā, ja eksperts atzinis, ka sadalījums atšķiras no iepriekšējā sadalījuma (sk. 15. punktu). Veidojot jaunu datubāzi, lai varētu veikt testu, nav nepieciešama pilnīga negatīvo kontroļu datubāze, ja vien laboratorija var pierādīt, ka paralēlo negatīvo kontroļu vērtības atbilst vai nu iepriekšējās datubāzes datiem, vai arī ar attiecīgajiem publicētajiem datiem.

Negatīvo kontroļu datus jāietver informācija par mikrokodolus saturošu nenobriedušu eritrocītu sastopamību katrā dzīvniekā. Paralēlajām negatīvajām kontrolēm ideālā gadījumā jābūt 95 % laboratorijas vēsturisko negatīvo kontroļu datubāzes sadalījuma kontroles robežās. Ja dati no paralēlajām negatīvajām kontrolēm neietilpst 95 % kontroles robežās, tie var būt pieņemami iekļaušanai vēsturisko kontroļu sadalījumā, ja vien šie dati nav pārmērīgi anomālas vērtības un ir pierādījumi, ka testa sistēma "tiek kontrolēta" (skatīt 15. punktu), un nav pierādījumu, ka būtu pieļautas tehniskas vai cilvēka kļūdas.

METODES APRAKSTS

Sagatavošanās

Dzīvnieku sugas izvēle

Jāizmanto veseli, jauni pieauguši tipisku laboratorijas celmu dzīvnieki. Var izmantot peles, žurkas vai citas piemērotas sugas zīdītājus. Ja tiek izmantotas perifēriskās asinis, jānosaka, vai inducēto mikrokodolu detektēšanu izraudzītajā sugā netraucē mikrokodolus saturošo šūnu atdalīšana no asinīm liesā. Tas skaidri pierādīts attiecībā uz peļu un žurku perifēriskajām asinīm (2). Ja žurku un peļu vietā izmanto citas sugas, pārskatā jāsniedz to izmantošanas zinātniskais pamatojums. Ja grauzējus neizmanto, ieteicams inducētā mikrokodola mērījumu integrēt citā piemērotā toksicitātes testā.

Dzīvnieku turēšanas un barošanas apstākļi

Grauzēju gadījumā telpā, kurā tur eksperimenta dzīvniekus, jābūt $22\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($\pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$) temperatūrai. Ideālā gadījumā relatīvajam mitrumam jābūt 50–60 % robežās, bet katrā ziņā vismaz 40 % un, vēlams, ne augstākam par 70 %, izņemot telpu uzkopšanas laiku. Dzīvniekus 12 stundas diennaktī tur mākslīgā apgaismojumā, bet 12 stundas — tumsā. Var izmantot parasto laboratorijas barību ar neierobežotu piekļuvi dzeramajam ūdenim. Barības izvēli var ietekmēt vajadzība tai piemaisīt testējamo ķīmikāliju, ja ķīmikāliju ievada šādā ceļā. Ja nav gaidāma agresīva uzvedība, grauzēji jātur nelielās (ne vairāk par pieciem uz vienu būri) viena dzimuma un vienādas apstrādes grupās, vēlams, būros ar cietu grīdu un pienācīgu vides bagātinājumu. Vienīgi tad, ja tas ir zinātniski pamatoti, dzīvniekus var turēt atsevišķi.

Dzīvnieku sagatavošana

Parasti izmanto veselus, jaunus pieaugušus dzīvniekus (vēlams, 6–10 nedēļas vecus grauzējus apstrādes sākumā, taču ir pieņemami arī mazliet vecāki dzīvnieki), kurus pēc nejaušības principa sadala kontroles un apstrādes grupās. Katru dzīvnieku unikālā veidā identificē, izmantojot humānu, minimāli invazīvu metodi (piem., apgredzenojot, izmantojot krotālijas, ievietojot mikrosķēmu vai izmantojot biometrisku identificēšanu, bet ne apgriežot ausis vai pirkstus) un vismaz piecas dienas aklimatizē laboratorijas apstākļiem. Būrus izvieto tā, lai iespējami mazinātu būru novietojuma varbūtējo ietekmi. Jāizvairās no pozitīvās kontroles un testējamās ķīmikālijas savstarpējas kontaminācijas. Pētījuma sākumā dzīvnieku svara atšķirībām jābūt minimālām un tās nedrīkst pārsniegt $\pm 20\text{ }%$ no vidējā svara, kas noteikts katram dzimumam atsevišķi.

Devu sagatavošana

Pirms dzīvniekiem dot devas, cietas testējamās ķīmikālijas jāizšķīdina vai jāsuspendē piemērotos šķīdinātājos vai nesējos vai jāpievieno barībai vai dzeramajam ūdenim. Šķīdros testējamās ķīmikālijas var dot tādas pašas vai pirms došanas atšķaidīt. Atkarībā no testējamās ķīmikālijas fizikālķīmiskajām īpašībām inhalatīvā ekspozīcija var notikt ar gāzi, tvaiku vai cietu/šķīdru daļiņu aerosolu. Ja vien dati par testējamās ķīmikālijas preparātu stabilitāti nelielā mērā, ka tos var uzglabāt, un neparedz pienācīgus uzglabāšanas apstākļus, jāizmanto svaigi pagatavoti preparāti.

Testēšanas apstākļi*Šķīdinātājs/nesējs*

Lietotajās devās šķīdinātājam vai nesējam nedrīkst būt toksiskas ietekmes un tas nedrīkst būt spējīgs reaģēt ar testējamo ķīmikāliju. Citu, mazāk izplatītu šķīdinātāju vai nesēju izmantošana jāpamato ar atsaucies datiem par to saderību. Kad vien iespējams, vispirms jāapsver, vai neizmantojot šķīdinātāju vai nesēju uz ūdens bāzes. Plaši izmantoti saderīgi šķīdinātāji/nesēji ir, piem., ūdens, fizioloģiskais šķīdums, metilcelulozes šķīdums, karboksimetilcelulozes nātrijs sāls šķīdums, olīveļļa un kukurūzas eļļa. Ja nav pieejami vēsturiski vai publicēti kontroļu dati, kas apliecinātu, ka izvēlētais atipiskais šķīdinātājs/nesējs neinducē mikrokodolus vai citu kaitīgu ietekmi, jāveic sākotnējs pētījums, lai noteiktu šķīdinātāja/nesēja kontroles pieņemamību.

Kontroles

Pozitīvās kontroles

Parasti katrā testā jāiekļauj dzīvnieku grupa, kas apstrādāta ar pozitīvās kontroles ķīmikāliju. To var nedarīt, ja testa laboratorija ir pierādījusi savu kompetenci šā testa veikšanā un ir izveidojusi vēsturisko pozitīvo kontroļu diapazonu. Ja paralēla pozitīvā kontrolgrupa netiek ietverta, katrā eksperimentā jāiekļauj novērtēšanas kontroles (fiksēti un neiekrāsoti priekšmetstikliņi vai šūnu suspensiju paraugi — atkarībā no novērtēšanas metodes). To var panākt, pētījuma novērtēšanā iekļaujot pienācīgus etalonparaugus, kas iegūti un saglabāti no atsevišķa pozitīvās kontroles eksperimenta, ko veic periodiski (piem., ik pēc 6–18 mēnešiem), piem., kompetences testēšanas laikā un pēc tam regulāri pēc vajadzības.

Pozitīvās kontroles ķīmikālijām konsekvēnti jārada detektējams mikrokodolu biežuma pieaugums, kas pārsniedz spontāno līmeni. Veicot manuālu novērtēšanu ar mikroskopu, pozitīvās kontroles devas izvēlas tā, lai to ietekme būtu skaidri redzama, tomēr nolasītājs nevarētu uzreiz atklāt kodēto paraugu identitāti. Ir pieļaujami pozitīvo kontroli ievadīt citā ceļā nekā testējamo ķīmikāliju, izmantojot citu apstrādes grafiku, un paraugošanu veikt tikai vienā brīdī. Turklāt attiecīgā gadījumā var apsvērt tādu pozitīvās kontroles ķīmikāliju izmantošanu, kas pieder pie atbilstošām ķīmikāliju grupām. Pozitīvās kontroles ķīmikāliju piemēri sniegti 1. tabulā.

1. tabula

Pozitīvās kontroles ķīmikāliju piemēri

Ķīmikālijas un CAS Nr.
Etilmetānsulfonāts [CAS Nr. 62-50-0]
Metilmetānsulfonāts [CAS Nr. 66-27-3]
Etilnitrozourīnviela [CAS Nr. 759-73-9]
Mitomicīns C [CAS Nr. 50-07-7]
Ciklofosfamīds (monohidrāts) [CAS Nr. 50-18-0 (CAS Nr. 6055-19-2)]
Trietilēnmelamīns [CAS Nr. 51-18-3]
Kolhicīns [CAS Nr. 64-86-8] vai vinblastīns [CAS Nr. 865-21-4] — kā aneigēni

Negatīvās kontroles

Negatīvās kontroles dzīvnieku grupu iekļauj visos paraugošanas laikos un ar to apietas tāpat kā ar apstrādes grupu, bet to neapstrādā ar testējamo ķīmikāliju. Ja testējamo ķīmikāliju ievada ar šķīdinātāju/nesēju, šis šķīdinātājs/nesējs jāsaņem arī kontrolgrupai. Tomēr, ja testējošās laboratorijas vēsturiskie negatīvo kontroļu dati par katru paraugošanas laiku liecina, ka atšķirības starp dzīvniekiem pastāvīgi ir līdzīgas un līdzīgs ir arī to šūnu sastopamības biežums, kurām ir mikrokodoli, var būt pietiekami negatīvo kontroli paraugot tikai vienreiz. Ja negatīvo kontroļu paraugošanu veic tikai vienreiz, to vajadzētu darīt pirmajā paraugošanas reizē.

Ja izmanto perifēriskās asinis, tad gadījumos, kad iegūtie dati saskan ar testējošās laboratorijas vēsturisko kontroļu datubāzi, paralēlas negatīvās kontroles vietā īstermiņa pētījumos ir pieņemami izmantot pirmsapstrādes paraugu. Ir pierādīts, ka žurkām pirmsapstrādes paraugošana mazos tilpumos (piem., nepārsniedzot 100 µl dienā) mikrokodolu fona biežumu ietekmē minimāli (25).

PROCEDŪRA

Dzīvnieku skaits un dzimums

Parasti mikrokodolu atbildreakcija tēviņiem un mātītēm ir līdzīga, tāpēc lielāko daļu pētījumu iespējams veikt ar tiklab viena kā otra dzimuma dzīvniekiem (26). Dati, kas liecinātu par relevantām atšķirībām starp tēviņiem un mātītēm (piem., atšķirībām, kas saistītas ar sistēmisko toksicitāti, metabolismu, biopieejamību, toksicitāti kaulu smadzenēm u. c., piem., diapazona noteikšanas pētījumā), mudinātu izmantot abus dzimumus. Tādā gadījumā var būt lietderīgi veikt pētījumu ar abu dzimumu dzīvniekiem, piemēram, atkārtotas devas toksicitātes pētījuma ietvaros. Izmantojot abu dzimumu dzīvniekus, var būt lietderīgi izmantot faktoriālo plānu. Sīkāka informācija par datu analizēšanu, izmantojot šo plānu, ir sniegta 2. papildinājumā.

Sākot pētījumu, jāizveido pietiekami lielas grupas, lai vienā grupā būtu vismaz pieci analizējami viena dzimuma dzīvnieki vai, ja tiek izmantoti abu dzimumu dzīvnieki, vismaz pieci analizējami katra dzimuma dzīvnieki. Gadījumos, kad cilvēka organisma eksponētība ķīmikālijām var būt atšķirīga atkarībā no dzimuma, kā ir, piemēram, ar dažiem farmaceitiskajiem preparātiem, testu veic ar attiecīgā dzimuma dzīvniekiem. Ar piemēru ilustrējot maksimālā tipiskā dzīvnieku skaita prasības — atbilstīgi 37. punktā paredzētajiem parametriem kaulu smadzeņu pētījumā ar trim devu grupām un paralēlām negatīvajām un pozitīvajām kontrolēm (pieci viena dzimuma dzīvnieki katrā grupā) būtu nepieciešami 25–35 dzīvnieki.

Devu lielums

Ja tiek veikts iepriekšējs diapazona noteikšanas pētījums, jo nav pieejami piemēroti dati, kas palīdzētu izvēlēties devu, tas jāveic tajā pašā laboratorijā, izmantojot to pašu sugu, celmu, dzimumu un apstrādes režīmu, kas tiks izmantots galvenajā testā (27). Pētījums jāveic ar mērķi identificēt maksimālo panesamo devu (MTD), kas ir lielākā pieļaujamā deva, kura pētījuma ilgumam atbilstošā laikā ir panesama bez pētījumu ierobežojošas toksicitātes pazīmju izraisīšanas (piem., inducē ķermeņa svara samazināšanos vai hematopoētiskās sistēmas citotoksicitāti, bet neizraisa nāvi vai tādas sāpju, ciešanu vai diskomforta pazīmes, kā dēļ būtu jāveic humāna eitanāzija (28)).

Lielāko devu var definēt arī kā tādu devu, kas rada toksicitāti kaulu smadzenēs (piem., nenobriedušu eritrocītu īpatsvara samazināšanās attiecībā pret to kopējo skaitu kaulu smadzenēs vai perifēriskajās asinīs par vairāk nekā 50 %, bet ne mazāk kā līdz 20 % no kontroles vērtības). Tomēr, analizējot CD71-pozitīvas šūnas perifēriskajā asinsritē (t. i., ar plūsmas citometriju), šī pavisam jaunā nenobriedušu eritrocītu frakcija uz toksiskiem faktoriem reaģē ātrāk nekā lielāka nenobriedušu RNS-pozitīvu eritrocītu kohorta. Tāpēc akūtas ekspozīcijas testos, kuros analizē CD71-pozitīvo nenobriedušu eritrocītu frakciju, var būt novērojama lielāka šķietamā toksicitāte nekā testos, kuros nenobriedušus eritrocītus identificē pēc RNS satura. Šā iemesla dēļ, ja apstrādi eksperimentā veic piecas dienas vai mazāk, toksicitāti izraisošo testējamo ķīmikāliju lielāko devu var definēt kā devu, kas statistiski nozīmīgā apmērā samazina CD71-pozitīvo nenobriedušu eritrocītu īpatsvaru attiecībā pret kopējo eritrocītu skaitu, tam nekļūstot mazākam par 5 % no kontroles vērtības (29).

Ķīmikālijas, pie kurām novērojams toksikokinētisko procesu piesātinājums vai kuras inducē detoksifikācijas procesus, kas pēc īltermiņa ievadīšanas var radīt eksponētības samazinājumu, var būt devu noteikšanas kritēriju izņēmumi, un katrs gadījums jāizvērtē atsevišķi.

Lai iegūtu informāciju par devas–atbildreakcijas sakarību, pilnīgā pētījumā jāiekļauj negatīvā kontrolgrupa un vismaz trīs devu līmeņi, kuru atstatuma koeficients parasti ir 2, bet nepārsniedz 4. Ja testējamā ķīmikālija diapazona noteikšanas pētījumā toksicitāti nerada vai to nerada saskaņā ar esošajiem datiem, lielākajai devai 14 dienu vai garākā ievadīšanas periodā jābūt 1 000 mg/kg ķermeņa svara dienā, bet ievadīšanas periodos līdz 14 dienām — 2 000 mg/kg ķermeņa svara dienā. Ja testējamā ķīmikālija toksicitāti tomēr izraisa, MTD jābūt augstākajai ievadītajai devai un izmantotajiem devu līmeņiem būtu jāaptver diapazons, kas aptver gan maksimālo devu, gan devu, kas ir maztoksiska vai netoksiska. Ja pie visiem testētajiem devu līmeņiem tiek novērota toksiska ietekme uz mērķaudiem (kaulu smadzenēm), ieteicams veikt vēl vienu pētījumu ar netoksiskām devām. Pētījumos, kuros plānots pilnīgāk raksturot kvantitatīvo atbildreakciju uz devu, var būt nepieciešams izmantot papildu devu grupas. Atsevišķiem testējamo ķīmikāliju veidiem (piem., cilvēku zālēm), uz kuriem attiecas konkrētas prasības, šīs robežas var atšķirties.

Robežtests

Ja devu diapazona noteikšanas eksperimenti vai dati no saistītiem dzīvnieku celmiem liecina, ka apstrādes režīms vismaz ar robeždevu (sk. tālāk) nekādu novērojamu toksisku ietekmi (ne pazeminātu kaulu smadzeņu šūnradī, ne citas pazīmes, kas liecinātu par citotoksisku ietekmi uz mērķaudiem) nerada, un ja, pamatojoties uz genotoksicitātes *in vitro* pētījumiem vai datiem par strukturāli radniecīgām ķīmikālijām, genotoksicitāte nav paredzama, var uzskatīt, ka veikt pilnu pētījumu ar trim devu līmeņiem nav nepieciešams, ja vien ir pierādīts, ka testējamā(-s) ķīmikālija(-s) mērķaudus (kaulu smadzenes) sasniedz. Tādos gadījumos var pietikt ar vienu devas līmeni — robeždevu. Attiecībā uz 14 dienu vai garāku ievadīšanas periodu robeždeva ir 1 000 mg/kg ķermeņa svara dienā. Attiecībā uz ievadīšanas periodu līdz 14 dienām robeždeva ir 2 000 mg/kg ķermeņa svara dienā.

Devu ievadīšana

Testa plānošanā jāņem vērā, kāds varētu būt cilvēka ekspozīcijas ceļš. Ja vien tas ir pamatoti, var izvēlēties dažādas ekspozīcijas ceļus, piem., uzņemšanu ar barību, dzeramo ūdeni, ievadīšanu zemādas audos, intravenozu ievadīšanu, uzņemšanu orālā ceļā (ar gavāžu), inhalāciju, uzņemšanu intratraheāli vai implantācijas ceļā. Jebkurā gadījumā ceļš jāizvēlas tā, lai nodrošinātu mērķaudu pienācīgu ekspozīciju. Parasti nav ieteicama intraperitoneāla injekcija, jo cilvēkam šāds ekspozīcijas ceļš nav raksturīgs, un tā būtu jāizmanto tikai ar konkrētu zinātnisko pamatojumu. Ja testējamo ķīmikāliju piejauc barībai vai dzeramajam ūdenim, jo īpaši ar vienreizēju devu, jā rūpējas, lai starp pārtikas un ūdens patēriņu un paraugošanu pārietu pietiekami daudz laika, lai būtu iespējams detektēt ietekmes (sk. 37. punktu). Maksimālais šķidrums tilpums, ko vienā paņēmienā var ievadīt ar gavāžu vai injekciju, ir atkarīgs no testa dzīvnieka lieluma. Parasti tilpums nedrīkst pārsniegt 1 ml uz 100 g ķermeņa svara, izņemot ūdens šķidrumu gadījumu, kad var lietot ne vairāk kā 2 ml uz 100 g ķermeņa svara. Ja izmanto lielāku tilpumu, tas jāpamato. Izņemot gadījumus, kad tiek izmantotas kairinošas vai korozīvas testējamās ķīmikālijas, kuru ietekme lielākās koncentrācijās parasti ir izteiktāka, ir līdz minimumam jāsamazina tilpuma variabilitāte, koriģējot koncentrāciju tā, lai visos devu līmeņos tilpuma attiecība pret ķermeņa svaru saglabātos vienāda.

Apstrādes kārtība

Vēlams veikt 2 vai vairākas apstrādes, ievadīšanu veicot ik pēc 24 stundām, jo īpaši tad, ja šis tests tiek integrēts citos toksicitātes pētījumos. Alternatīvā gadījumā apstrādes var veikt vienu reizi, ja tas ir zinātniski pamatoti (piem., ir zināms, ka testējamās ķīmikālijas bloķē šūnas ciklu). Testējamās ķīmikālijas devu var dot arī daļēti, t. i., divreiz vai biežāk vienā un tajā pašā dienā ne vairāk kā ik pēc 2–3 stundām, kas var būt vajadzīgs gadījumos, kad jāievada liels tilpums. Tādā gadījumā vai tad, ja testējamo ķīmikāliju ievada ar inhalāciju, paraugošanas laiks jāplāno, pamatojoties uz pēdējās devas laiku vai ekspozīcijas beigām.

Testu var veikt ar pelēm vai žurkām vienā no tālāk norādītajiem trim veidiem.

- a. Dzīvniekus ar testējamo ķīmikāliju apstrādā vienreiz. Kaulu smadzeņu paraugus ņem vismaz divas reizes (no neatkarīgām dzīvnieku grupām) ne ātrāk kā 24 stundas pēc apstrādes un ne vēlāk kā 48 stundas pēc apstrādes ar pienācīgu(-iem) intervālu(-iem) starp paraugšanas reizēm, ja vien nav zināms, ka testējamajai ķīmikālijai ir ļoti garš pussabrukšanas periods. Paraugu ņemšana ātrāk nekā 24 stundas pēc apstrādes ir jāpamato. Perifērisko asiņu paraugus (no vienas un tās pašas dzīvnieku grupas) ņem vismaz divreiz: pirmo reizi ne ātrāk kā 36 stundas pēc apstrādes, ar piemērotu(-iem) intervālu(-iem) pēc pirmās paraugšanas, bet ne vēlāk kā 72 stundas pēc apstrādes. Pirmajā paraugšanas reizē jāapstrādā visas devu grupas un jāsavāc paraugi analīzei, taču nākamajā(-s) paraugšanas reizē(-s) jāievada tikai lielākā deva. Ja vienā paraugšanas reizē tiek detektēta pozitīva atbildreakcija, papildu paraugšana nav jāveic, ja vien nav nepieciešams iegūt kvantitatīvu informāciju par atbildreakciju uz devu. Aprakstītie ievākšanas laiki izriet no mikro kodolu parādīšanās un pazušanas kinētikas šo divu veidu audos.
- b. Gadījumos, kad veic divas apstrādes dienā (piem., divas apstrādes ar 24 stundu intervālu), paraugus ņem vienu reizi 18 līdz 24 stundu laikā pēc galīgās apstrādes gadījumos, kad ņem kaulu smadzeņu paraugus, vai 36 līdz 48 stundu laikā pēc galīgās apstrādes gadījumos, kad ņem perifērisko asiņu paraugus (30). Aprakstītie ievākšanas laiki izriet no mikro kodolu parādīšanās un pazušanas kinētikas šo divu veidu audos.
- c. Ja apstrāde notiek trīs vai vairāk reizes dienā (piem., trīs vai vairāk apstrādes ar apmēram 24 stundu intervāliem), kaulu smadzeņu paraugšana jāveic ne vēlāk kā 24 stundas pēc pēdējās apstrādes, bet perifēriskās asinis jāsavāc ne vēlāk kā 40 stundas pēc pēdējās apstrādes (31). Šajā apstrādes variantā var apvienot “komētas” testu (piem., paraugojot 2–6 stundas pēc pēdējās apstrādes) un mikro kodolu testu un mikro kodolu testu integrēt atkārtotas devas toksicitātes pētījumos. Apkopotie dati liecina, ka mikro kodolu inducēšanos šādos garākos laikposmos iespējams novērot, ja ievadīšana ir veikta 3 vai vairāk reizi (15).

Attiecīgā un zinātniski pamatotā gadījumā, kā arī gadījumos, kad tas atvieglo testu savienojumu ar citiem toksicitātes testiem, drīkst izmantot citus devu došanas vai paraugšanas režīmus.

Novērojumi

Katru dienu vismaz reizi dienā, vēlams — vienā laikā vai laikos un ņemot vērā gaidāmo ietekmju maksimumperiodu pēc aplicēšanas, jāizdara vispārēji testa dzīvnieku klīniskie novērojumi un jāreģistrē novērotās klīniskās pazīmes. Devas došanas periodā visus dzīvniekus vismaz divreiz dienā novēro attiecībā uz morbiditāti un mirstību. Pētījuma sākumā, atkārtotas devas pētījumos vismaz reizi nedēļā un eitanāzijas laikā visi dzīvnieki jānosver. Pētījumos, kuri ilgst vismaz vienu nedēļu, vismaz reizi nedēļā jāmēra pārtikas patēriņš. Ja testējamo ķīmikāliju ievada ar dzeramo ūdeni, ūdens patēriņš jāmēra katru reizi, kad ūdens tiek mainīts, un vismaz reizi nedēļā. Dzīvniekus, kam novērojamas pārliedas toksicitātes neletālas pazīmes, pirms testa perioda beigām humāni eitanāzē (28). Dažos gadījumos var monitorēt dzīvnieku ķermeņa temperatūru, jo ir pamats domāt, ka apstrādes izraisīta hipertermija un hipotermija var radīt maldinošus rezultātus (32) (33) (34).

Mērķaudu ekspozīcija

Asins paraugi jāņem pienācīgā(-os) laikā(-os), lai būtu iespējams noskaidrot testējamās ķīmikālijas līmeni plazmā un gadījumos, kad tas vajadzīgs un citu datu par ekspozīciju nav, varētu pierādīt, ka kaulu smadzeņu ekspozīcija ir notikusi (sk. 48. punktu).

Kaulu smadzeņu/asiņu sagatavošana

Kaulu smadzeņu šūnas parasti iegūst no dzīvnieku augšstilba kaula vai lielkaula tūlīt pēc humānas eitanāzijas. Parasti šūnas izņem, sagatavo un iekrāso ar vispārpieņemtām metodēm. Mazus perifērisko asiņu daudzumus saskaņā ar atbilstīgajām dzīvnieku labturības normām var iegūt, izmantojot metodi, kas testa dzīvniekam ļauj izdzīvot, piemēram, ņemot asinis no astes vēnas vai cita piemērota asinsvada vai veicot sirds punkciju vai paraugošanu no liela asinsvada dzīvnieka eitanāzijas brīdī. Gan uz kaulu smadzeņu, gan perifērisko asiņu eritrocītu gadījumā atkarībā no analīzes metodes šūnas var nekavējoties supravītāli iekrāsot (16) (17) (18), sagatavo uztriepes, ko pēc tam iekrāso apskatīšanai mikroskopā vai pienācīgi fiksē un iekrāso plūsmas citometriskajai analīzei. Lietojot DNS specifisku krāsvielu [piemēram, akridīnoranžo (35) vai Hoechst 33258 ar pironīnu Y (36)], iespējams izvairīties no daļas artefaktu, kas saistīti ar DNS nespecifisku krāsvielu izmantošanu. Šī priekšrocība neizslēdz tradicionālo krāsvielu izmantošanu (piem., Gimzas krāsvielu mikroskopiskajai analīzei). Var izmantot arī papildu sistēmas [piem., celulozes kolonnas to šūnu atdalīšanai, kurām ir kodoli (37) (38)], ar nosacījumu, ka ir pierādīts šo sistēmu saderīgums ar paraugu sagatavošanu laboratorijā.

Gadījumos, kad šīs metodes ir izmantojamas, var izmantot antikinetoheora antivielu metodi (39), FISH ar pancentromēriskām DNS sondēm (40) vai *in situ* iezīmēšanu ar pancentromērpecifiskiem praimeriem kombinācijā ar DNS iekrāsošanu ar kontrasta krāsvielu (41), lai identificētu mikro kodolu īpatnības (hromosomas / hromosomu fragmenti) ar mērķi noteikt, vai mikro kodolu inducēšanās mehānisms ir saistīts ar klastogēnu un/vai ar aneigēnu aktivitāti. Ja ir pierādīta to efektivitāte, var izmantot citas klastogēnu un aneigēnu diferenciācijas metodes.

Analīze (manuāla un automātiska)

Visi analizējamie priekšmetstikliņi vai paraugi, tostarp no pozitīvajām un negatīvajām kontrolēm, pirms jebkāda veida analīzes neatkarīgi jākodē un jārandomizē, lai manuālajam vērtētājam nebūtu zināms, vai un kā tie apstrādāti; tāda kodēšana nav jāveic, ja izmanto automātiskās novērtēšanas sistēmas, kurās neveic vizuālu apskati un kuras nevar ietekmēt operatora neobjektivitāte. Katram dzīvniekam nosaka nenobriedušo eritrocītu skaita attiecību pret eritrocītu kopējo skaitu (nenobriedušie + nobriedušie), saskaitot vismaz 500 eritrocītus, ja izmanto kaulu smadzenes, un vismaz 2 000 eritrocītus, ja izmanto perifēriskās asinis (42). Lai noteiktu mikro kodolus saturošu nenobriedušo eritrocītu biežumu, novērtē vismaz 4000 nenobriedušo mikro kodolus saturošu eritrocītu no katra dzīvnieka (43). Ja vēsturisko negatīvo kontroļu datubāzes dati liecina, ka vidējais mikro kodolus saturošu nenobriedušo eritrocītu fona biežums testējošajā laboratorijā ir < 0,1 %, jāapsver papildu šūnu novērtēšana. Analizējot paraugus, nenobriedušo eritrocītu īpatsvars attiecībā pret kopīgo eritrocītu skaitu apstrādātajos dzīvniekos nedrīkst būt mazāks par 20 % no nesēja/šķīdinātāja kontroles īpatsvara, ja uzskaiti veic ar mikroskopu, un nedrīkst būt mazāks par apmēram 5 % no nesēja/šķīdinātāja kontroles īpatsvara, ja CD71+ nenobriedušos eritrocītus novērtē ar citometriskām metodēm (sk. 31. punktu) (29). Piemēram, ja kaulu smadzeņu testā, kurā novērtēšanu veic ar mikroskopu, nenobriedušo eritrocītu kontroles īpatsvars kaulu smadzenēs ir 50 %, toksicitātes augšējā robeža būtu 10 % nenobriedušo eritrocītu.

Tā kā žurku liesa mikro kodolus saturošus eritrocītus izolē un iznīcina, lai žurku perifērisko asiņu analīzē saglabātu augstu testa jutību, vēlams analizēt tikai mikro kodolus saturošo nenobriedušo eritrocītu jaunāko frakciju. Izmantojot automātiskas analīzes metodes, nenobriedušākos eritrocītus iespējams identificēt, pamatojoties uz to augsto RNS saturu vai augsto transferīna receptoru (CD71+) līmeni uz virsmas (31). Tomēr dažādu iekrāsošanas metožu tiešā salīdzināšanā konstatēts, ka apmierinošus rezultātus iespējams iegūt ar dažādām metodēm, tostarp ar tradicionālo iekrāsošanu ar akridīnoranžo (3) (4).

DATI UN PĀRSKATA SNIEGŠANA

Rezultātu apstrāde

Datus par katru dzīvnieku apkopo tabulā. Katram analizējamajam dzīvniekam atsevišķi norāda novērtēto nenobriedušu eritrocītu skaitu, nenobriedušu mikrokodolus saturošo eritrocītu skaitu un nenobriedušu eritrocītu īpatsvaru attiecībā pret visiem eritrocītiem. Ja peles nepārtraukti apstrādā 4 nedēļas vai ilgāk, jāsniedz arī dati par nobriedušu mikrokodolus saturošo eritrocītu skaitu un īpatsvaru, ja tādi dati tiek iegūti. Jāziņo arī dati par dzīvniekiem novēroto toksicitāti un klīniskajām pazīmēm.

Pieņemamības kritēriji

Testa pieņemamību nosaka, pamatojoties uz šādiem kritērijiem:

- a. paralēlās negatīvās kontroles dati tiek uzskatīti par pieņemamiem iekļaušanai laboratorijas vēsturisko kontroļu datubāzē (sk. 15.–18. punktu);
- b. paralēlās pozitīvās kontroles vai novērtēšanas kontroles inducē atbildreakcijas, kas atbilst tām, kuras ģenerētas vēsturisko pozitīvo kontroļu datubāzē iekļautajās kontrolēs, un izsaka statistiski ievērojamu pieaugumu salīdzinājumā ar paralēlo negatīvo kontroli (sk. 24.–25. punktu);
- c. ir analizēts pienācīgs devu un šūnu skaits;
- d. lielākās devas izvēles kritēriji atbilst 30.–33. punktā aprakstītajiem kritērijiem.

Rezultātu izvērtēšana un interpretēšana

Ja ir izpildīti visi pieņemamības kritēriji, testējamo ķīmikāliju uzskata par viennozīmīgi pozitīvu, ja:

- a. vismaz vienai no apstrādes grupām novērojams statistiski nozīmīgs nenobriedušu mikrokodolus saturošu eritrocītu biežuma pieaugums salīdzinājumā ar paralēlo negatīvo kontroli;
- b. šo pieaugumu izvērtējot ar atbilstošu trenda testu, vismaz vienā paraugošanas reizē ir konstatējama pieauguma sakarība ar devu; un
- c. kāds no šiem rezultātiem atrodas ārpus vēsturisko negatīvo kontroļu datu sadalījuma (piem., 95 % kontroles robežām pēc Puasona sadalījuma).

Ja konkrētajā paraugošanas laikā tiek izvērtēta tikai lielākā deva, testējamo ķīmikāliju uzskata par viennozīmīgi pozitīvu, ja novērojams statistiski nozīmīgs pieaugums salīdzinājumā ar paralēlo negatīvo kontroli un rezultāti atrodas ārpus vēsturisko negatīvo kontroļu datu sadalījuma (piem., 95 % kontroles robežām pēc Puasona sadalījuma). Ieteikumi par piemērotākajām statistiskajām metodēm atrodami literatūrā (44) (45) (46) (47). Veicot devas–atbildreakcijas analīzi, jāanalizē vismaz trīs apstrādātās devu grupas. Statistikas tests eksperimenta vienība ir dzīvnieks. Pozitīvi mikrokodolu testa rezultāti liecina, ka testējamās ķīmikālijas ietekmē hromosomu bojājumu vai mitotiskā aparāta bojājumu rezultātā testā izmantotās sugas dzīvnieku eritroblastos veidojas mikrokodoli. Ja tika veikts tests centromēru detektēšanai mikrokodolos, testējamā ķīmikālija, kas rada centromērus saturošus mikrokodolus (centromēriska DNS vai kinetohors norāda uz visas hromosomas zudumu), kalpo par pierādījumu tam, ka testējamā ķīmikālija ir aneigēns.

Ja ir izpildīti visi pieņemamības kritēriji, testējamo ķīmikāliju uzskata par viennozīmīgi negatīvu, ja visos izvērtētajos eksperimentālajos nosacījumos:

- a. nevienai no apstrādes grupām nav novērojams statistiski nozīmīgs nenobriedušu mikrokodolus saturošu eritrocītu biežuma pieaugums salīdzinājumā ar paralēlo negatīvo kontroli;

- b. to izvērtējot ar atbilstošu trenda testu, nevienā paraugošanas reizē nav konstatējama pieauguma sakarība ar devu;
- c. visi rezultāti atrodas vēsturisko negatīvo kontroļu datu sadalījuma robežās (piem., 95 % kontroles robežās pēc Puasona sadalījuma) un
- d. kaulu smadzenes ir bijušas eksponētas testējamai(-ām) ķīmikālijai(-ām).

Ieteikumi par piemērotākajām statistiskajām metodēm atrodami literatūrā (44) (45) (46) (47). Par kaulu smadzeņu eksponētību testējamajai ķīmikālijai var liecināt, piemēram, nenobriedušo/nobriedušo eritrocītu attiecības samazināšanās vai testējamās(-o) ķīmikālijas(-u) līmeņa mērījums plazmā vai asinīs. Intravenozas ievadišanas gadījumā pierādījumi par eksponētību nav nepieciešami. Alternatīvi kaulu smadzeņu eksponētības pierādīšanai var izmantot ADME datus, kas iegūti neatkarīgā pētījumā, kurā izmantots tas pats ceļš un tā pati suga. Negatīvi rezultāti liecina, ka testa apstākļos testējamā ķīmikālija testa sugas dzīvniekos neinducē mikrokodolu veidošanos nenobriedušos eritrocītos.

Nav prasības viennozīmīgi pozitīvu vai viennozīmīgi negatīvu atbildreakciju verificēt.

Gadījumos, kad atbildreakcija nav viennozīmīgi negatīva vai pozitīva, lai palīdzētu noteikt rezultāta bioloģisko relevantumu (piem., vājš vai neskaidrs pieaugums), dati jānovērtē ekspertam un/vai jāpabeidz esošo eksperimentu sīkāka izskatīšana. Dažos gadījumos varētu būt lietderīgi analizēt lielāku skaitu šūnu vai veikt atkārtotu eksperimentu, izmantojot mainītus eksperimenta apstākļus.

Retos gadījumos pat pēc sīkākas izskatīšanas dati neļauj secināt, ka testējamā ķīmikālija rada pozitīvus vai negatīvus rezultātus, un tad uzskata, ka pētījuma rezultāts ir neskaidrs.

Testēšanas pārskats

Testēšanas pārskatā jāiekļauj tālāk norādītā informācija.

Kopsavilkums

Testējamā ķīmikālija:

- avots, sērijas numurs, izmantošanas termiņš, ja pieejams,
- testējamās ķīmikālijas stabilitāte, ja tā zināma.

Vienkomponenta viela:

- fiziskais izskats, šķīdība ūdenī un citas relevantas fizikālķīmiskās īpašības,
- ķīmiskās identifikācijas dati, piem., IUPAC vai CAS nosaukums, CAS numurs, SMILES vai InChI kods, struktūrformula, tīrība, attiecīgā gadījumā, ja tas ir praktiski iespējams, piemaisījumu ķīmiskā identitāte u. c.

Daudzkomponentu viela, UVCB un maisījumi:

- ciktāl iespējams, raksturoti ar sastāvdaļu ķīmisko identitāti (sk. iepriekš), kvantitatīvo saturu un relevantajām fizikālķīmiskajām īpašībām.

Testējamās ķīmikālijas sagatavošana:

- nesēja izvēles pamatojums,
- testējamās ķīmikālijas šķīdība un stabilitāte šķīdinātājā/nesējā, ja tā zināma,

- barības, dzeramā ūdens vai inhalāciju preparātu sagatavošana,
- analītiskie secinājumi par preparātiem (piem., stabilitāte, homogenitāte, nominālās koncentrācijas), ja tie izdarīti.

Testa dzīvnieki:

- izmantotā suga/celms un tā izmantošanas pamatojums,
- dzīvnieku skaits, vecums un dzimums,
- izcelsme, turēšanas apstākļi, barošana u. c.,
- dzīvnieku unikālās identificēšanas metode,
- īstermiņa pētījumiem: katra dzīvnieka svars testa sākumā un beigās; pētījumiem, kas notiek ilgāk par nedēļu: katra dzīvnieka svars un pārtikas patēriņš pētījuma laikā. Iekļauj katras grupas dzīvnieku ķermeņa svara diapazonu, vidējo vērtību un standartnovirzi.

Testēšanas apstākļi:

- pozitīvās un negatīvās (nesēja/šķīdinātāja) kontroles dati,
- diapazona noteikšanas testa rezultāti, ja tas veikts,
- devu līmeņa izvēles pamatojums,
- sīka informācija par testējamās ķimikālijas sagatavošanu,
- sīka informācija par testējamās ķimikālijas ievadišanu,
- izvēlētajā ievadišanas ceļā un ilguma pamatojums,
- metodes, kā verificēts, ka testējamā(-s) ķimikālija(-šas) vispārējā asinsritē vai kaulu smadzenēs,
- faktiskā deva (mg uz vienu kg ķermeņa svara dienā), kas aprēķināta pēc testējamās ķimikālijas koncentrācijas (ppm) barībā / dzeramajā ūdenī un pēc uzņemtā daudzuma (attiecīgā gadījumā),
- sīka informācija par barības un ūdens kvalitāti,
- eitanāzijas paņēmieni,
- atsāpināšanas metode (ja tāda izmantota),
- detalizēts apstrādes un paraugošanas grafiku apraksts un izvēles pamatojums,
- priekšmetstikliņu sagatavošanas metodes,
- paraugu izolēšanas un saglabāšanas procedūras,
- toksicitātes novērtēšanas metodes,
- kritēriji, pēc kuriem novērtē mikrokodolus saturošus nenobriedušus eritrocītus,
- mikrokodolus saturošu nenobriedušu eritrocītu biežuma noteikšanai un nenobriedušo/nobriedušo eritrocītu attiecības noteikšanai analizēto katra dzīvnieka šūnu skaits,
- pētījuma pieņemamības kritēriji,
- metodes, piem., antikinetohoru antivielu vai centromērspecifisku DNS zonžu metode, ar kurām noteikts, vai mikrokodoli satur veselas vai fragmentētas hromosomas (attiecīgā gadījumā).

Rezultāti:

- dzīvnieka stāvoklis pirms testa perioda un tā laikā, arī toksitātes pazīmes,
- nenobriedušu eritrocītu īpatsvars attiecībā pret eritrocītu kopējo skaitu,
- mikrokodolus saturošu nenobriedušu eritrocītu skaits par katru dzīvnieku atsevišķi,
- mikrokodolus saturošu nenobriedušu eritrocītu vidējais skaits $\pm$ standartnovirze katrā grupā,
- ja iespējams, devas-atbildreakcijas sakarība,
- izmantotā statistiskā analīze un metodes,
- paralēlo negatīvo un pozitīvo kontroļu dati, diapazoni, vidējās vērtības un standartnovirzes,
- vēsturisko negatīvo un pozitīvo kontroļu dati, diapazoni, vidējās vērtības, standartnovirzes un 95 % kontroles robežas sadalījumam, kā arī aptvertais laikposms un novērojumu skaits,
- kaulu smadzeņu eksponētību apliecinājoši dati,
- raksturojoši dati, kas norāda, vai mikrokodoli satur veselas vai fragmentētas hromosomas (attiecīgā gadījumā),
- izpildītie pozitīvas vai negatīvas atbildreakcijas kritēriji.

*Rezultātu iztirzājums.**Secinājumi.**Atsauces.*

LITERATŪRAS SARAKSTS

- (1) OECD (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, No. 234, OECD, Paris.
- (2) Hayashi, M. *et al.* (2007), *in vivo* erythrocyte micronucleus assay III. Validation and regulatory acceptance of automated scoring and the use of rat peripheral blood reticulocytes, with discussion of non-hematopoietic target cells and a single dose-level limit test, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 627/1, pp. 10-30.
- (3) MacGregor, J.T. *et al.* (2006), Flow cytometric analysis of micronuclei in peripheral blood reticulocytes: II. An efficient method of monitoring chromosomal damage in the rat, *Toxicology Sciences*, Vol. 94/1, pp. 92-107.
- (4) Dertinger, S.D. *et al.* (2006), Flow cytometric analysis of micronuclei in peripheral blood reticulocytes: I. Intra- and interlaboratory comparison with microscopic scoring, *Toxicological Sciences*, Vol. 94/1, pp. 83-91.
- (5) Dertinger, S.D. *et al.* (2011), Flow cytometric scoring of micronucleated erythrocytes: an efficient platform for assessing *in vivo* cytogenetic damage, *Mutagenesis*, Vol. 26/1, pp. 139-145.
- (6) Parton, J.W., W.P. Hoffman, M.L. Garriott (1996), Validation of an automated image analysis micronucleus scoring system, *Mutation Research*, Vol. 370/1, pp. 65-73.
- (7) Asano, N. *et al.* (1998), An automated new technique for scoring the rodent micronucleus assay: computerized image analysis of acridine orange supravital stained peripheral blood cells, *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, Vol. 404/1-2, pp. 149-154.

- (8) Styles, J.A. *et al.* (2001), Automation of mouse micronucleus genotoxicity assay by laser scanning cytometry, *Cytometry*, Vol. 44/2, pp. 153-155.
- (9) Heddle, J.A. (1973), A rapid *in vivo* test for chromosomal damage, *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, Vol. 18/2, pp. 187-190.
- (10) Schmid, W. (1975), The micronucleus test, *Mutation Research*, Vol. 31/1, pp. 9-15.
- (11) Heddle, J.A. *et al.* (1983), The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program, *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*, Vol. 123/1, pp. 61-118.
- (12) Mavournin, K.H. *et al.* (1990), The *in vivo* micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program, *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*, Vol. 239/1, pp. 29-80.
- (13) MacGregor, J.T. *et al.* (1983), Micronuclei in circulating erythrocytes: a rapid screen for chromosomal damage during routine toxicity testing in mice, *Developments in Toxicology Environmental Science*, Vol. 11, pp. 555-558.
- (14) MacGregor, J.T. *et al.* (1987), Guidelines for the conduct of micronucleus assays in mammalian bone marrow erythrocytes, *Mutation Research/Genetic Toxicology*, Vol. 189/2, pp. 103-112.
- (15) MacGregor, J.T. *et al.* (1990), The *in vivo* erythrocyte micronucleus test: measurement at steady state increases assay efficiency and permits integration with toxicity studies, *Fundamental and Applied Toxicology*, Vol. 14/3, pp. 513-522.
- (16) Hayashi, M. *et al.* (1990), The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides, *Mutation Research/Genetic Toxicology*, Vol. 245/4, pp. 245-249.
- (17) CSGMT/JEMS.MMS – The Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (1992), Micronucleus test with mouse peripheral blood erythrocytes by acridine orange supravital staining: the summary report of the 5th collaborative study, *Mutation Research/Genetic Toxicology*, Vol. 278/2-3, pp. 83-98.
- (18) CSGMT/JEMS.MMS – The Mammalian Mutagenesis Study Group of the Environmental Mutagen Society of Japan (1995), Protocol recommended by the CSGMT/JEMS.MMS for the short-term mouse peripheral blood micronucleus test. The Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (CSGMT) (CSGMT/JEMS.MMS, The Mammalian Mutagenesis Study Group of the Environmental Mutagen Society of Japan), *Mutagenesis*, Vol. 10/3, pp. 153-159.
- (19) Salamone, M.F., K.H. Mavournin (1994), Bone marrow micronucleus assay: a review of the mouse stocks used and their published mean spontaneous micronucleus frequencies, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 23/4, pp. 239-273.
- (20) Krishna, G., G. Urda, J. Paulissen (2000), Historical vehicle and positive control micronucleus data in mice and rats, *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, Vol. 453/1, pp. 45-50.
- (21) Hayes, J. *et al.* (2009), The rat bone marrow micronucleus test—study design and statistical power, *Mutagenesis*, Vol. 24/5, pp. 419-424.
- (22) Wakata, A. *et al.* (1998), Evaluation of the rat micronucleus test with bone marrow and peripheral blood: summary of the 9th collaborative study by CSGMT/JEMS. MMS. Collaborative Study Group for the Micronucleus Test. Environmental Mutagen Society of Japan. Mammalian Mutagenicity Study Group, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 32/1, pp. 84-100.
- (23) Ryan, T.P. (2000), *Statistical Methods for Quality Improvement*, 2nd ed., John Wiley and Sons, New York.

- (24) Hayashi, M. *et al.* (2011), Compilation and use of genetic toxicity historical control data, Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, Vol. 723/2, pp. 87-90.
- (25) Rothfuss, A. *et al.* (2011), Improvement of *in vivo* genotoxicity assessment: combination of acute tests and integration into standard toxicity testing, Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, Vol. 723/2, pp. 108-120.
- (26) Hayashi, M. *et al.* (1994), *in vivo* rodent erythrocyte micronucleus assay, Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects, Vol. 312/3, pp. 293-304.
- (27) Fielder, R.J. *et al.* (1992), Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group. Dose setting in *in vivo* mutagenicity assays, Mutagenesis, Vol. 7/5, pp. 313-319.
- (28) OECD (2000), "Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation", OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, No. 19, OECD Publishing, Paris.
- (29) LeBaron, M.J. *et al.* (2013), Influence of counting methodology on erythrocyte ratios in the mouse micronucleus test, Environmental and Molecular Mutagenesis, Vol. 54/3, pp. 222-228.
- (30) Higashikuni, N., S. Sutou (1995), An optimal, generalized sampling time of 30 +/- 6 h after double dosing in the mouse peripheral blood micronucleus test, Mutagenesis, Vol. 10/4, pp. 313-319.
- (31) Hayashi, M. *et al.* (2000), *in vivo* rodent erythrocyte micronucleus assay. II. Some aspects of protocol design including repeated treatments, integration with toxicity testing, and automated scoring, Environmental and Molecular Mutagenesis, Vol. 35/3, pp. 234-252.
- (32) Asanami, S., K. Shimono (1997), High body temperature induces micronuclei in mouse bone marrow, Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, Vol. 390/1-2, pp. 79-83.
- (33) Asanami, S., K. Shimono, S. Kaneda (1998), Transient hypothermia induces micronuclei in mice, Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, Vol. 413/1, pp. 7-14.
- (34) Spencer, P.J. *et al.* (2007), Induction of micronuclei by phenol in the mouse bone marrow: I. Association with chemically induced hypothermia, Toxicological Sciences, Vol. 97/1, pp. 120-127.
- (35) Hayashi, M., T. Sofuni, M. Jr. Ishidate (1983), An application of Acridine Orange fluorescent staining to the micronucleus test, Mutation Research Letters, Vol. 120/4, pp. 241-247.
- (36) MacGregor, J.T., C.M. Wehr, R.G. Langlois (1983), A simple fluorescent staining procedure for micronuclei and RNA in erythrocytes using Hoechst 33258 and pyronin Y, Mutation Research, Vol. 120/4, pp. 269-275.
- (37) Romagna, F., C.D. Staniforth (1989), The automated bone marrow micronucleus test, Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, Vol. 213/1, pp. 91-104.
- (38) Sun, J.T., M.J. Armstrong, S.M. Galloway (1999), Rapid method for improving slide quality in the bone marrow micronucleus assay; an adapted cellulose column procedure, Mutation Research, Vol. 439/1, pp. 121-126.
- (39) Miller, B.M., I.D. Adler (1990), Application of antikinetochore antibody staining (CREST staining) to micronuclei in erythrocytes induced *in vivo*, Mutagenesis, Vol. 5/4, pp. 411-415.
- (40) Miller, B.M. *et al.* (1991), Classification of micronuclei in murine erythrocytes: immunofluorescent staining using CREST antibodies compared to *in situ* hybridization with biotinylated gamma satellite DNA, Mutagenesis, Vol. 6/4, pp. 297-302.

- (41) Russo, A. (2002), PRINS tandem labeling of satellite DNA in the study of chromosome damage, *American Journal of Medical Genetics*, Vol. 107/2, pp. 99-104.
 - (42) Gollapudi, B.B., L.G. McFadden (1995), Sample size for the estimation of polychromatic to normochromatic erythrocyte ratio in the bone marrow micronucleus test, *Mutation Research*, Vol. 347/2, pp. 97-99.
 - (43) OECD (2014), "Statistical analysis supporting the revision of the genotoxicity Test Guidelines", OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, No. 198, OECD Publishing, Paris.
 - (44) Richold, M. *et al.* (1990), "In Vivo Cytogenetics Assays", in *Basic Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report. Part I revised*, Kirkland, D. J. (ed.), Cambridge University Press, Cambridge, pp. 115-141.
 - (45) Lovell, D.P. *et al.* (1989), "Statistical Analysis of *in vivo* Cytogenetic Assays", in *Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. UKEMS SubCommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing, Report, Part III*, Kirkland, D.J. (ed.), Cambridge University Press, Cambridge, pp. 184-232.
 - (46) Hayashi, M. *et al.* (1994), Statistical analysis of data in mutagenicity assays: rodent micronucleus assay, *Environmental Health Perspectives*, Vol. 102/Suppl 1, pp. 49-52.
 - (47) Kim, B.S., M. Cho, H.J. Kim (2000), Statistical analysis of *in vivo* rodent micronucleus assay, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 469/2, pp. 233-241.
-

1. papildinājums

DEFINĪCIJAS

Centromērs: hromosomas rajons(-i), ar kuru(-iem) šūnas dalīšanās laikā saistās vārpstas šķiedras, nodrošinot meitohromosomu pareizu pārvietošanos uz meitšūnu poliem.

Ķimikālija: viela vai maisījums.

Eritroblasts: šūna, kura joprojām satur kodolu, agrīnā eritrocīta attīstības posmā tieši pirms pārveidošanās par nenobriedušu eritrocītu.

Kinetohors: proteīnstruktūra, kas veidojas uz eikariotisku šūnu centromēra, mitozes un mejozes laikā savieno hromosomu ar mitozes vārpstas mikrocaurulīšu polimēriem un šūnu dalīšanās laikā atdala māshromatīdas.

Mikrokodoli: mazi kodoli, kas mitozes (mejozes) telofāzē izveidojas no aizkavējušos hromosomu fragmentiem vai veselām hromosomām atsevišķi no šūnu galvenajiem kodoliem un tiem papildus.

Normohromatocīts jeb nobriedis eritrocīts: pilnīgi nobriedis eritrocīts, kam vairs nav pēc enukleācijas atlikušās RNS un/vai citu īslaicīgu šūnu marķieru, kuriem ir raksturīgi izzust pēc enukleācijas, kas notiek pēc galīgās eritroblasta dalīšanās.

Polihromatocīts jeb nenobriedis eritrocīts: jaunizveidojies eritrocīts attīstības vidējā posmā, kas iekrāsojas gan ar zilajām, gan sarkanajām klasisko asins krāsvielu, piem., Raita–Gimzas krāsvielas, daļām, jo jaunajā šūnā vēl ir RNS atlikums. Tādas jaunizveidojušās šūnas ir apmēram tādas pašas kā retikulocīti, kurus vizualizē, izmantojot vitālās krāsvielas, kas RNS liek sabiezēt retikulā. Jaunizveidojušos sarkano asinsķermenīšu identificēšanai mūsdienās bieži izmanto citas metodes, tostarp RNS monohromatisku iekrāsošanu ar fluorescējošām krāsvielām vai īslaicīgu virsmas marķieru, piemēram, CD71, iezīmēšanu ar fluorescējošām antivielām. Polihromatocīti, retikulocīti un CD71-pozitīvi eritrocīti visi ir nenobrieduši eritrocīti, bet katram no tiem ir mazliet atšķirīga attīstības pakāpe.

Retikulocīts: jaunizveidojies eritrocīts, iekrāsots ar vitālo krāsvielu, kas atlikušajai šūnu RNS liek sabiezēt raksturīgā retikulā. Retikulocītiem un polihromatocītiem ir līdzīgas šūnu attīstības pakāpes.

Testējamā ķimikālija: jebkura viela vai maisījums, ko testē ar šo testēšanas metodi.

2. papildinājums

FAKTORĀLAIS PLĀNS DZIMUMATŠĶIRĪBU IDENTIFICĒŠANAI IN VIVO MIKROKODOLU TESTĀ

Faktoriālais plāns un tā analīze

Saskaņā ar šo plānu pie katra koncentrācijas līmeņa testē vismaz 5 tēviņus un 5 mātītes, tātad plānā tiek izmantoti vismaz 40 dzīvnieki (20 tēviņi un 20 mātītes un attiecīgās pozitīvās kontroles).

Šis plāns ir viens no vienkāršajiem faktoriālajiem plāniem un ir līdzvērtīgs dispersijas divfaktoru analīzei, kur galvenie aplūkoti efekti ir dzimuma un koncentrācijas līmeņa efekti. Šos datus var analizēt, izmantojot daudzas statistikas programmatūras standartpaketes, piem., SPSS, SAS, STATA, Genstat, kā arī izmantojot R.

Šajā analīzē datu kopas dispersiju sadala dispersijā, kas saistīta ar dzimumu, dispersijā, kas saistīta ar koncentrāciju, un dispersijā, kas saistīta ar dzimumu un koncentrāciju mijiedarbību. Katru no šiem locekļiem salīdzina ar aplēsto dispersiju starp replikātdzīvniekiem viena dzimuma dzīvnieku grupās pie vienas un tās pašas koncentrācijas. Pilnīga informācija par pamatā esošo metodoloģiju pieejama daudzās standarta statistikas mācību grāmatās (sk. atsauces) un statistiskajās paketēs pieejamajos palīgriekos.

Analīzi turpina, ANOVA tabulā ⁽¹⁾ apskatot mijiedarbības locekli "dzimums x koncentrācija". Ja mijiedarbības loceklis nav nozīmīgs, visu dzimumu vai visu koncentrācijas līmeņu apkopotās vērtības ļauj veikt derīgus starplīmeņu statistikas testus, pamatojoties uz ANOVA grupā apkopotās dispersijas locekli.

Analīzi turpina, dažādām koncentrācijām aplēsto dispersiju sadalot kontrastos, tādējādi iegūstot lineārus un kvadrātiskus atbildreakciju kontrastos visiem koncentrācijas līmeņiem. Ja mijiedarbības loceklis "dzimums x koncentrācija" ir nozīmīgs, arī šo locekli var sadalīt mijiedarbības kontrastos "lineārais loceklis x dzimums" un "kvadrātloceklis x dzimums". Šie locekļi dod iespēju pārbaudīt, vai koncentrāciju atbildreakcijas abiem dzimumiem ir paralēlas vai katram dzimumam ir atšķirīga atbildreakcija.

Grupā apkopotās dispersijas aplēsi var izmantot, lai pārveida testos testētu vidējo vērtību starpību. Šos salīdzinājumus var veikt starp abu dzimumu vidējām vērtībām un starp dažādu koncentrācijas līmeņu vidējām vērtībām, piem., salīdzinājumiem ar negatīvās kontroles līmeņiem. Nozīmīgas mijiedarbības gadījumos iespējams veikt salīdzinājumus starp dažādu koncentrāciju vidējām vērtībām viena dzimuma ietvaros vai abu dzimumu vidējām vērtībām pie vienādas koncentrācijas.

Atsauces

Ir daudz statistikas mācību grāmatu, kurās apspriesta faktoriālo plānu teorija, struktūra, metodoloģija, analīze un interpretācija diapazonā no vienkāršākajām divfaktoru analīzēm un līdz sarežģītākām formām, ko izmanto "Eksperimentu plānošanas" ("Design of Experiment") metodoloģijā. Tālāk sniegtais saraksts nav izsmeļošs. Dažās grāmatās sniegti izstrādāti salīdzināmu plānu piemēri, un dažos gadījumos norādīts kods analīžu veikšanai ar dažādām programmatūras paketēm.

Box, G.E.P, Hunter, W.G. and Hunter, J.S. (1978). Statistics for Experimenters. An Introduction to Design, Data Analysis, and Model Building. New York: John Wiley & Sons.

Box G.E.P. & Draper, N.R. (1987). Empirical model-building and response surfaces. John Wiley & Sons Inc.

Doncaster, C.P. & Davey, A.J.H. (2007). Analysis of Variance and Covariance: How to Choose and Construct Models for the Life Sciences. Cambridge University Press.

Mead, R. (1990). The Design of Experiments. Statistical principles for practical application. Cambridge University Press.

⁽¹⁾ Statistiķi, kuri izmanto modelēšanas pieeju, piemēram, *General Linear Models (GLM)*, var veikt analīzi citādā, bet salīdzināmā veidā, taču ne vienmēr sastādīs ierasto ANOVA tabulu, kuru sāka izmantot, kad vēl pirmsdatorizācijas laikmetā statistiskajiem aprēķiniem izmantoja algoritmiskas pieejas.

Montgomery D.C. (1997). Design and Analysis of Experiments. John Wiley & Sons Inc.

Winer, B.J. (1971). Statistical Principles in Experimental Design. McGraw Hill.

Wu, C.F.J & Hamada, M.S. (2009). Experiments: Planning, Analysis and Optimization. John Wiley & Sons Inc;”

- 6) pielikuma B daļā svītros B.15. nodaļu;
- 7) pielikuma B daļā svītros B.16. nodaļu;
- 8) pielikuma B daļā svītros B.18. nodaļu;
- 9) pielikuma B daļā svītros B.19. nodaļu;
- 10) pielikuma B daļā svītros B.20. nodaļu;
- 11) pielikuma B daļā svītros B.24. nodaļu;
- 12) pielikuma B daļā B.47. nodaļu aizstāj ar šādu:

“B.47. Lielopu radzenes apduļķošanās un caurlaidības testēšanas metode, kurā identificē i) nopietnu acu bojājumu inducētās ķīmikālijas un ii) ķīmikālijas, kuras nav jāklasificē par tādām, kas izraisa acu kairinājumu vai nopietnus acu bojājumus

IEVADS

Šī testēšanas metode ir ekvivalenta ESAO Testēšanas vadlīnijai (TG) Nr. 437 (2013). Lielopu radzenes apduļķošanās un caurlaidības (BCOP) testēšanas metodi 2006. un 2010. gadā izvērtēja Alternatīvo metožu validēšanas starptautisku koordinācijas komiteja (ICCVAM) kopā ar Eiropas Alternatīvo metožu validēšanas centru (ECVAM) un Japānas Alternatīvo metožu validēšanas centru (JaCVAM) (1) (2). Pirmajā izvērtēšanā BCOP testēšanas metode tika analizēta attiecībā uz tās lietderīgumu acu nopietnu bojājumu izraisītāju ķīmikāliju (vielu un maisījumu) identificēšanā (1). Otrajā izvērtēšanā BCOP testēšanas metode tika analizēta attiecībā uz tās lietderīgumu tādu ķīmikāliju (vielu un maisījumu) identificēšanā, kuras nav klasificētas par tādām, kas izraisa acu kairinājumu un nopietnus acu bojājumus (2). BCOP validācijas datubāzē kopumā bija ietvertas 113 vielas un 100 maisījumi (2) (3). No šīm izvērtēšanām un to profesionālvērtēšanas tika secināts, ka ar šo testēšanas metodi ir iespējams pareizi identificēt ķīmikālijas (gan vielas, gan maisījumus), kuras izraisa nopietnus acu bojājumus (1. kategorija), kā arī tādās, kuras nav jāklasificē par tādām, kas izraisa acu kairinājumu vai nopietnus acu bojājumus, atbilstoši definīcijām, kas dotas Apvienoto Nāciju Organizācijas (ANO) Ķīmikāliju klasificēšanas un marķēšanas globālā harmonizētajā sistēmā (GHS) (4) un Regulu (EK) Nr. 1272/2008 par vielu un maisījumu klasificēšanu, marķēšanu un iepakojšanu (CLP regula) (¹), tāpēc tā tika atzīta par zinātniski derīgu abiem nolūkiem. Nopietni acu bojājumi ir acs audu bojājumi vai nopietna fiziska redzes pasliktināšanās, kas rodas pēc testējamās ķīmikālijas aplicēšanas uz acs priekšējās virsmas un kas 21 dienas laikā pēc aplicēšanas nav pilnīgi atgriezeniska. Testējamās ķīmikālijas, kas izraisa nopietnus acu bojājumus, ir klasificētas ANO GHS 1. kategorijā. Ķīmikālijas, kuras nav klasificētas par tādām, kas izraisa acu kairinājumu vai nopietnus acu bojājumus, saskaņā ar definīciju ir ķīmikālijas, kuras neatbilst priekšnosacījumiem klasificēšanai ANO GHS 1. vai 2. kategorijā (2.A vai 2.B), t. i., tās tiek uzskatītas par ANO GHS nekategorizētām ķīmikālijām. Šajā testēšanas metodē ietilpst BCOP testēšanas metodes ieteicamais lietojums un ierobežojumi, pamatojoties uz tās izvērtējumiem. Galvenās atšķirības starp ESAO testēšanas vadlīnijas sākotnējo 2009. gada versiju un atjaunināto 2013. gada versiju attiecas uz (bet ne tikai): BCOP testēšanas metodes izmantošanu tādu ķīmikāliju identificēšanai, kuras nav klasificējamās saskaņā ar ANO GHS (2. un 7. punkts); skaidrojumiem par BCOP testēšanas metodes pielietojamību spirtu, ketonu un cietvielu (6. un 7. punkts) un vielu un maisījumu testēšanai (8. punkts); skaidrojumiem par to, kā būtu jātestē virsmaktīvas vielas un virsmaktīvu vielu saturoši maisījumi (28. punkts); atjauninājumiem un skaidrojumiem par pozitīvajām kontrolēm (39. un 40. punkts); atjauninātajiem BCOP testēšanas metodes lēmuma pieņemšanas kritērijiem (47. punkts); atjauninātajiem pētījuma pieņemšanas kritērijiem (48. punkts); testēšanas pārskata elementu atjauninājumiem (49. punkts); atjaunināto 1. papildinājumu par definīcijām; pievienoto 2. papildinājumu par BCOP testēšanas metodes prognozētspēju dažādās klasifikācijas sistēmās; atjaunināto 3. papildinājumu — standarta ķīmikāliju sarakstu; un atjaunināto 4. papildinājumu par BCOP radzenes turētāju (1. punkts) un par opacitometru (2. un 3. punkts).

(¹) Eiropas Parlamenta un Padomes 2008. gada 16. decembra Regula (EK) Nr. 1272/2008 par vielu un maisījumu klasificēšanu, marķēšanu un iepakojšanu un ar ko groza un atceļ Direktīvas 67/548/EEK un 1999/45/EK un groza Regulu (EK) Nr. 1907/2006 (OV L 353, 31.12.2008., 1. lpp.).

Šobrīd ir vispārpieņemts, ka tuvākajā nākotnē neviens atsevišķs *in vitro* acu kairinājuma tests nevarēs aizstāt Dreiza *in vivo* acu testu un prognozēt visus kairinājuma veidus dažādām ķīmikāliju klasēm. Tomēr Dreiza acu testu varētu būt iespējams aizstāt, (pakāpjveida) testēšanas stratēģijā stratēģiski apvienojot vairākas alternatīvas testēšanas metodes (5). Lejupējā pieeja (5) ir izstrādāta gadījumiem, kad, pamatojoties uz esošo informāciju, ķīmikālijai ir paredzams augsts kairinājuma izraisīšanas potenciāls, savukārt augšupējā pieeja (5) ir izstrādāta gadījumiem, kad, pamatojoties uz esošo informāciju, paredzams, ka ķīmikālija neizraisīs tādu acu kairinājumu, ka tā būtu jāklasificē. BCOP testēšanas metode ir *in vitro* testēšanas metode, ko konkrētos apstākļos un ar noteiktiem ierobežojumiem var izmantot tam, lai ķīmikālijas klasificētu un marķētu kā acīm bīstamas. Kaut arī šo BCOP testēšanas metodi vienu pašu neuzskata par derīgu aizstājēju trušu acu *in vivo* testam, to ieteicams izmantot par sākotnējo soli testēšanas stratēģijā, piemēram, Scott *et al.* (5) ierosinātajā lejupējā pieejā, lai identificētu ķīmikālijas, kas izraisa nopietnus acu bojājumus, t. i., ķīmikālijas, kuras bez papildu testēšanas jāklasificē ANO GHS 1. kategorijā (4). BCOP testēšanas metodi ieteicams izmantot arī tam, lai identificētu ķīmikālijas, kuras nav jāklasificē sakarā ar acu kairinājumu vai nopietniem acu bojājumiem, saskaņā ar ANO GHS (ANO GHS nekategorizētās ķīmikālijas) (4) tādā testēšanas stratēģijā kā augšupējā pieeja (5). Taču, ja ar BCOP testēšanas metodi netiek prognozēts, ka ķīmikālija izraisa nopietnus acu bojājumus vai klasificējama par acu kairinājumu/nopietnu acu bojājumu izraisītāju, tā jātestē papildus (*in vitro* un/vai *in vivo*), lai noteiktu tās galīgo klasifikāciju.

Šajā testēšanas metodē aprakstītas procedūras, ko izmanto, lai izvērtētu testējamās ķīmikālijas potenciālo bīstamību acīm, ko mēra ar tās spēju izraisīt izolētas liellopu acs radzenes apduļķošanas un palielināt tās caurlaidību. Toksisko ietekmi uz radzeni mēra ar šādiem parametriem: (i) gaismas caurlaidības samazināšanās (apduļķošanās), (ii) krāsvielas fluoresceīna nātrija sāls caurlaidības palielināšanās (caurlaidība). Radzenes apduļķošanās un caurlaidības vērtējumu pēc ekspozīcijas testējamajai ķīmikālijai apvieno, lai noteiktu *in vitro* kairinājuma rādītāju (IVIS), ko izmanto testējamās ķīmikālijas radītā kairinājuma pakāpes klasificēšanai.

Definīcijas ir sniegtas 1. papildinājumā.

SĀKOTNĒJIE APSVĒRUMI UN IEROBEŽOJUMI

Šīs testēšanas metodes pamatā ir ICCVAM BCOP testēšanas metodes protokols (6) (7), kas sākotnēji tika izstrādāts no informācijas, kas iegūta no *In vitro* pētījumu institūta (IIVS) protokola un INVITTOX protokola Nr. 124 (8). Pēdējais ir Eiropas Kopienas sponsorētajā 1997.–1998. gadā veiktajā prevalidācijas pētījumā izmantotais protokols. Abu protokolu pamatā bija BCOP testēšanas metode, ko pirmoreiz aprakstījuši Gautheron *et al.* (9).

Ar BCOP testēšanas metodi var identificēt ķīmikālijas, kas izraisa nopietnus acu bojājumus, saskaņā ar ANO GHS definīciju, t. i., ANO GHS 1. kategorijā klasificējamās ķīmikālijas (4). Ja BCOP testēšanas metodi izmanto šim nolūkam, tās vispārējā pareizība ir 79 % (150/191), pseidopozitīvo rezultātu īpatsvars ir 25 % (32/126) un pseido-negatīvo rezultātu īpatsvars ir 14 % (9/65), salīdzinot ar trušu acu *in vivo* testēšanas metodes datiem, kas klasificēti atbilstoši ANO GHS klasifikācijas sistēmai (3) (sk. 1. tabulu 2. papildinājumā). Ja no datubāzes izslēdz testējamās

ķimikālijas, kuras ietilpst noteiktu ķīmisko (t. i., spirti, ketoni) vai fizikālo (t. i., cietvielas) īpašību grupās, BCOP testēšanas metodes vispārējā pareizība ANO GHS klasifikācijas sistēmā ir 85 % (111/131), pseidopozitīvo rezultātu īpatsvars ir 20 % (16/81) un pseidonegatīvo rezultātu īpatsvars ir 8 % (4/50) (3). BCOP testēšanas metodes iespējamie trūkumi, ja ar to identificē ķimikālijas, kas rada nopietnus acu bojājumus (ANO GHS 1. kategorija), attiecas uz validācijas datubāzē novērotu lielu pseidopozitīvu rezultātu īpatsvaru spirtiem un ketoniem un lielu pseidonegatīvu rezultātu īpatsvaru cietvielām (1) (2) (3). Tomēr, tā kā ne visi spirti un ketoni ar BCOP testēšanas metodi ir pārvērtēti un daži ir pareizi novērtēti ANO GHS 1. kategorijā, netiek uzskatīts, ka šīs divas organiskās funkcionālās grupas neietilpst šīs testēšanas metodes piemērojamības jomā. Šīs testēšanas metodes lietotājam pašam jāizlemj, vai spirta vai ketona iespējamā pārvērtēšana ir pieņemama vai arī jāveic turpmāka testēšana, izsverot pierādījumus. Attiecībā uz cietvielu pseidonegatīvo rezultātu rādītāju jāpiemin, ka cietvielas Dreiza acu kairinājuma *in vivo* testā var izraisīt mainīgas un pārmērīgas ekspozīcijas apstākļus, kā rezultātā var rasties neatbilstošas prognozes par to patieso kairinājuma potenciālu (10). Vēl jāpiebilst, ka nevienam no ICCVAM validācijas datubāzē identificētajiem pseidonegatīvajiem rezultātiem (2) (3) saistībā ar acu nopietnu bojājumu izraisītāju ķimikāliju identificēšanai par ANO GHS nekategorizētu ķimikāliju. Turklāt šajā gadījumā BCOP pseidonegatīvo rezultātu īpatsvaram nav būtiskas nozīmes, jo, izmantojot pierādījumu izsvēršanu secīgas testēšanas stratēģijā, visas testējamās ķimikālijas, kuras rada $3 < IVIS \leq 55$, pēc tam tiktu testētas ar citiem pienācīgi validētiem *in vitro* testiem vai, ja citas iespējas nebūtu, ar trušiem — atkarībā no normatīvajām prasībām. Ņemot vērā to, ka BCOP testēšanas metode pareizi novērtē dažas cietās ķimikālijas kā ANO GHS 1. kategorijai piederošas, netiek arī uzskatīts, ka šīs fizikālais stāvoklis neietilpst šīs testēšanas metodes piemērojamības jomā. Pētnieki var apsvērt šīs testēšanas metodes izmantošanu visu veidu ķimikālijām, $IVIS > 55$ pieņemot kā norādi uz nopietnus acu bojājumus izraisīšu atbildreakciju, kas liecina, ka ķimikālija bez tālākas testēšanas klasificējama ANO GHS 1. kategorijā. Taču, kā norādīts iepriekš, ar spirtiem un ketoniem iegūtie pozitīvie rezultāti jāinterpretē piesardzīgi pārvērtēšanas iespējamības dēļ.

BCOP testēšanas metodi var izmantot arī tādu ķimikāliju identificēšanai, kuras saskaņā ar ANO GHS klasifikācijas sistēmu nav jāklasificē par acu kairinājuma vai nopietnu acu bojājumu izraisītājām (4). Ja BCOP testēšanas metodi izmanto šim nolūkam, tās vispārējā pareizība ir 69 % (135/196), pseidopozitīvo rezultātu īpatsvars ir 69 % (61/89) un pseidonegatīvo rezultātu īpatsvars ir 0 % (0/107), salīdzinot ar truša acu *in vivo* testēšanas metodes datiem, kas klasificēti atbilstīgi ANO GHS klasifikācijas sistēmai (3) (sk. 2. tabulu 2. papildinājumā). Iegūtais pseidopozitīvo rezultātu īpatsvars (*in vivo* ANO GHS nekategorizētas ķimikālijas, kuras rada $IVIS > 3$, sk. 47. punktu) ir ievērojami liels, bet šajā gadījumā tam nav būtiskas nozīmes, jo, izmantojot pierādījumu izsvēršanu secīgas testēšanas stratēģijā, visas testējamās ķimikālijas, kuras rada $3 < IVIS \leq 55$, pēc tam tiktu testētas ar citiem pienācīgi validētiem *in vitro* testiem vai, ja citas iespējas nebūtu, ar trušiem — atkarībā no normatīvajām prasībām. BCOP testēšanas metodei nav konkrētu trūkumu spirtu, ketonu un cietvielu testēšanā, ja mērķis ir identificēt ķimikālijas, kuras nav jāklasificē par acu kairinājuma vai nopietnu acu bojājumu izraisītājām (ANO GHS nekategorizētas ķimikālijas) (3). Pētnieki var apsvērt šīs testēšanas metodes izmantošanu visu veidu testējamajām ķimikālijām, negatīvu rezultātu ($IVIS \leq 3$) pieņemot par norādi, ka klasificēšana nav nepieciešama (ANO GHS nekategorizētas ķimikālijas). Tā kā ar BCOP testēšanas metodi iespējams pareizi identificēt tikai 31 % ķimikāliju, kuras nav jāklasificē par acu kairinājuma vai nopietnu acu bojājumu izraisītājām, šī testēšanas metode nebūtu jāizvēlas kā pirmā, sākot augšupēju pieeju (5), ja ir pieejamas citas validētas un vispārpieņemtas *in vitro* metodes ar tikpat augstu jutību, bet lielāku specifiskumu.

BCOP validācijas datubāzē kopumā bija ietvertas 113 vielas un 100 maisījumi (2) (3). Tādēļ BCOP testēšanas metode tiek uzskatīta par piemērojamu gan vielu, gan maisījumu testēšanai.

BCOP testēšanas metodi nav ieteicams izmantot tādu testējamo ķīmikāliju identificēšanai, kuras jāklasificē kā acīm kairinošas (ANO GHS 2. vai 2.A kategorija) vai tādu testējamo ķīmikāliju identificēšanai, kuras jāklasificē kā acīm viegli kairinošas (ANO GHS 2.B kategorija), jo ievērojams skaits ANO GHS 1. kategorijas ķīmikāliju ar metodi klasificētas zemākā kategorijā — ANO GHS 2., 2.A vai 2.B kategorijā, bet ANO GHS nekategorizētās ķīmikālijas ir klasificētas augstākā kategorijā — 2., 2.A vai 2.B kategorijā (2) (3). Šim nolūkam var būt nepieciešams veikt turpmāku testēšanu ar citu piemērotu metodi.

Visās procedūrās ar liellopu acīm un liellopu radzenēm testēšanas iestādēm jāievēro piemērojamie noteikumi un procedūras darbībām ar dzīvnieku izcelsmes materiāliem, pie kuriem pieder arī audi un audu šķidrumi. Ieteicams ievērot vispārējos piesardzības pasākumus darbam laboratorijā (11).

Kaut arī BCOP testēšanas metodē neņem vērā konjunktīvas un varavīksnenes bojājumus, tajā apskata ietekmi uz radzeni, kas ir noteicošais faktors *in vivo* klasifikācijā, izmantojot ANO GHS klasifikāciju. Izmantojot BCOP testēšanas metodi, nevar *per se* novērtēt radzenes bojājumu atgriezeniskumu. Pamatojoties uz trušu acu pētījumu rezultātiem, ir ierosināts dažu veidu neatgriezeniskas ietekmes identificēšanai izmantot radzenes bojājuma sākotnējā dziļuma novērtējumu (12). Tomēr, lai izprastu, kā rodas ar sākotnējo ārkārtīgi nopietno bojājumu nesaistīta neatgriezeniska ietekme, ir nepieciešamas papildu zinātniskās zināšanas. Visbeidzot, izmantojot BCOP testēšanas metodi, nevar novērtēt ar acu eksponētību saistītas sistēmiskas toksicitātes potenciālu.

Šī testēšanas metode tiks periodiski atjaunināta, ņemot vērā jaunu informāciju un datus. Piemēram, gadījumos, kad nepieciešams pilnīgāk raksturot radzenes bojājumus, var potenciāli noderēt histopatoloģija. Kā aprakstīts ESAO Norādījumu dokumentā Nr. 160 (13), lietotāji tiek mudināti saglabāt radzenes un sagatavot histopatoloģijas paraugus, kurus iespējams izmantot datubāzes izveidē un lēmuma pieņemšanas kritēriju pilnveidošanā, kas vēl vairāk uzlabotu šīs testēšanas metodes pareizību.

Laboratorijām, kas sāk lietot šo testēšanas metodi, jāizmanto 3. papildinājumā norādītās standartķīmikālijas. Laboratorija šīs ķīmikālijas var izmantot BCOP testēšanas metodes izmantošanas tehniskās kompetences demonstrēšanai pirms BCOP testēšanas metodes datu iesniegšanas izmantošanai normatīvajos aktos reglamentētajai bīstamības klasifikācijai.

TESTA PRINCIPS

BCOP testēšanas metode ir organotipisks modelis, kas dod iespēju īslaicīgi saglabāt liellopu acs radzenes normālās fizioloģiskas un bioķīmiskas funkcijas *in vitro*. Šajā testēšanas metodē testējamās ķīmikālijas radītos bojājumus novērtē, veicot radzenes apduļķošanās un gaismas caurlaidības izmaiņu kvantitatīvus mērījumus attiecīgi ar opacimetru un redzamās gaismas spektrofotometru. Abus mērījumus izmanto IVIS aprēķināšanai, pēc kura nosaka kairinājuma izraisīšanas bīstamības klasifikācijas kategoriju *in vitro*, ko izmanto testējamās ķīmikālijas acu kairinājumu izraisīšanas potenciāla *in vivo* prognozēšanai (sk. "Lēmuma pieņemšanas kritēriji" 48. punktā).

BCOP testēšanas metodē tiek izmantotas izolētas tikko kautu liellopu acu radzenes. Radzenes apduļķošanas mēra kvantitatīvi kā radzenes gaismas caurlaidību. Radzenes caurlaidību mēra kvantitatīvi kā krāsvielas nātrija fluoresceīna daudzumu, kas izgājis cauri visai radzenei un ko detektē aizmugurējā kamerā. Testējamo ķīmikāliju aplicē uz radzenes epitēlija virsmas, to iepildot radzenes turētāja priekšējā kamerā. 4. papildinājumā dots BCOP testēšanas metodē izmantojamā radzenes turētāja apraksts un shēma. Radzenes turētājus var nopirkt gatavus no dažādiem piegādātājiem vai izgatavot pašu spēkiem.

Liellopu acu avots un vecums un izmantojamo dzīvnieku sugas izvēle

Uz kautuvēm nosūtītos liellopus parasti kauj izmantošanai patēriņam cilvēku pārtikā vai citām komerciālām vajadzībām. BCOP testa metodē vajadzīgo radzeņu iegūšanai izmanto tikai veselīgus dzīvniekus, ko uzskata par piemērotiem cilvēku pārtikai. Liellopu svars var ievērojami atšķirties atkarībā no šķirnes, vecuma un dzimuma, tāpēc netiek noteikts ieteicamais dzīvnieka svars kaušanas laikā.

Ja tiek izmantotas dažāda vecuma dzīvnieku acis, to radzeņu izmēri var atšķirties. No liellopiem, kas vecāki par astoņiem gadiem, parasti iegūst radzenes, kuru diametrs horizontāli ir $> 30,5$ mm un kuru biezums centrā (CCT) ir ≥ 1100 μm , savukārt no liellopiem, kas ir jaunāki par pieciem gadiem, parasti iegūst radzenes, kuru diametrs horizontāli ir $< 28,5$ mm un CCT < 900 μm (14). Šā iemesla dēļ tāpēc parasti neizmanto par 60 mēnešiem vecāku liellopu acis. Parasti neizmanto arī par 12 mēnešiem jaunāku liellopu acis, jo tās vēl attīstās un to radzenes biezums un diametrs ir ievērojami mazāki nekā pieaugušu liellopu acīm. Taču izmantot jaunlopu (t. i., 6 līdz 12 mēnešus vecu) radzenes ir pieļaujami, jo tām ir dažas priekšrocības, piem., lielāka pieejamība, mazs vecuma diapazons un mazāks risks, ka darbinieki varētu tikt eksponēti govju sūkļveida encefalopātijai (15). Tā kā būtu lietderīgi sīkāk novērtēt, kā radzenes lielums vai biezums ietekmē tās reakciju uz korozīvu un kairinošu ķīmikāliju iedarbību, lietotāji tiek rosināti norādīt to dzīvnieku aptuveno vecumu un/vai svaru, no kuriem ņemtas pētījumā izmantotās radzenes.

Acu ņemšana un nogādāšana laboratorijā

Acis ņem kautuvju darbinieki. Lai pēc iespējas ierobežotu acu mehāniskos un cita veida bojājumus, acis enukleē iespējami drīz pēc dzīvnieka nonāvēšanas un nekavējoties pēc enukleācijas un transportēšanas laikā atdzesē. Lai novērstu acu eksponētību potenciāli kairinošām ķīmikālijām, kautuvju darbinieki dzīvnieka galvas skalošanai nedrīkst izmantot detergentus.

Acis pilnīgi iegremdē atdzesētā Henksa šķīdumā (*Hanks' Balanced Salt Solution, HBSS*) piemērota izmēra konteinerā un nogādā laboratorijā tā, lai pēc iespējas ierobežotu to bojāšanos un/vai bakteriālo kontamināciju. Tā kā acis tiek ņemtas kaušanas laikā, tās var būt eksponētas asinīm un citiem bioloģiskiem materiāliem, kā arī baktērijām u. c. mikroorganismiem. Tāpēc ir svarīgi pēc iespējas samazināt kontaminācijas risku (piem., acu ņemšanas un transportēšanas laikā konteineru ar acīm turot uz parastā ledus un Henksa šķīdumam, kurā acis atrodas transportēšanas laikā, pievienojot antibiotikas [piem., penicilīnu koncentrācijā 100 IU/ml un streptomcīnu koncentrācijā 100 $\mu\text{g/ml}$]).

Pēc iespējas saīsina laiku no acu ņemšanas līdz radzeņu izmantošanai BCOP testa metodē (parasti acis ņem un radzenes izmanto tajā pašā dienā), un uzskatāmi parāda, ka tam nav ietekmes uz testēšanas rezultātiem. Šo rezultātu pamatā ir acu izvēles kritēriji, kā arī pozitīvās un negatīvās kontroles atbildreakcijas. Visām testēšanai izmantotajām acīm ir jābūt no vienas noteiktā dienā ņemtu acu grupas.

BCOP testēšanas metodē izmantoto acu izvēles kritēriji

Pēc acu nonākšanas laboratorijā uzmanīgi pārbauda, vai tām nav defektu, tostarp palielinātas duļķainības, skrambu vai neovaskularizācijas. Jāizmanto tikai tādu acu radzenes, kam šādu defektu nav.

Vēlāk testēšanas procesā novērtē arī katras radzenes kvalitāti. Nav derīgas radzenes, kuru apduļķojuma rādītājs pēc sākotnējā vienas stundas līdzsvarošanās perioda ir septiņas apduļķošanās vienības vai vairāk (PIEZĪME: opacitometrs jākalibrē ar duļķainības standartiem, kurus izmanto apduļķošanās vienību noteikšanai, sk. 4. papildinājumu).

Katrā apstrādes grupā (testējamā ķīmikālija, paralēlās negatīvās un pozitīvās kontroles) jābūt vismaz trīs acīm. BCOPI testēšanas metodes negatīvajai kontrolei izmanto trīs radzenes. Tā kā visas radzenes izņem no acābola un nostiprina radzeņu kamerās, ir iespējami atsevišķu radzeņu apduļķošanās un caurlaidības rādītāju artefakti no manipulācijām ar tām (tostarp negatīvajā kontrolē). Turklāt, veicot IVIS aprēķinus, negatīvās kontroles radzeņu apduļķošanās un caurlaidības vērtības izmanto to radzeņu apduļķošanās un caurlaidības vērtību korekcijai, kuras apstrādā ar testējamo ķīmikāliju un izmanto pozitīvajai kontrolei.

PROCEDŪRA

Acu sagatavošana

Nebojātas radzenes izpreparē kopā ar 2–3 mm platu cīpslenes daļu, lai atvieglotu turpmākās operācijas, uzmanoties nesabojāt radzenes epitēliju un endotēliju. Izolētās radzenes nostiprina šim nolūkam paredzētos radzenes turētājos, kas sastāv no priekšējā un aizmugurējā nodalījuma, kuri saskaras attiecīgi ar radzenes epitēlija un endotēlija virsmu. Abas kameras (vispirms aizmugurējā kameru) tā, lai neveidotos burbuļi, pilnīgi piepilda ar fenolsarkano nesaturošu siltu Īgla barotni (*Eagle's Minimum Essential Medium, EMEM*). Pēc tam vismaz vienu stundu ierīci iztur pie 32 ± 1 °C, lai radzene būtu līdzsvarota attiecībā pret barotni un iespēju robežās tiktu panākta normāla metaboliskā aktivitāte (radzenes virsmas temperatūra *in vivo* ir apmēram 32 °C).

Pēc līdzsvarošanas perioda abās kamerās iepilda svaigu, iepriekš uzsildītu fenolsarkano nesaturošu EMEM un katrai radzenei nolasa sākotnējās apduļķošanās rādījumus. Radzenes, kam tiek konstatēti makroskopiski audu bojājumi (piem., skrumbas, pigmentācija, neovaskularizācija) vai kuru apduļķošanās rādītājs ir lielāks par septiņām apduļķošanās vienībām vai attiecīgajam opacitometra un izmantoto radzenes turētāju ekvivalentam, nav derīgas. Vismaz trīs radzenes izmanto negatīvajai (vai šķīdinātāja) kontrolei. Pārējās radzenes iedala apstrādes un pozitīvās kontroles grupās.

Tā kā ūdens siltumietilpība ir lielāka par gaisa siltumietilpību, ūdens nodrošina stabilākus temperatūras apstākļus inkubācijai. Tāpēc radzenes turētāja un tā satura uzturēšanai 32 ± 1 °C temperatūrā ieteicams izmantot ūdens vannu. Taču var izmantot arī inkubatorus ar gaisu, ja tiek veikti temperatūras stabilitātes uzturēšanai vajadzīgie pasākumi (piem., turētāju un barotnes iepriekšēja sasildīšana).

Testējamās ķīmikālijas ievadīšana

Izmanto divus dažādus apstrādes protokolus, vienu šķīdumiem un virsmaktīvām vielām (cietvielām vai šķīdumiem), bet otru cietvielām, kas nav virsmaktīvas.

Šķīdumus testē neatšķaidītus. Pusšķīdus, krēmveida un vaskveida materiālus parasti testē kā šķīdumus. Neatšķaidītas virsmaktīvās vielas testē 10 % (masas) koncentrācijā 0,9 % nātrija hlorīda šķīdumā, destilētā ūdenī vai citā šķīdinātājā, par kuriem ir iegūtas liecības, ka tiem nav nelabvēlīgas ietekmes uz testēšanas sistēmu. Ja izmanto citu atšķaidīšanas koncentrāciju, tas ir attiecīgi jāpamato. Virsmaktīvās vielas saturošus maisījumus var testēt neatšķaidītus vai atšķaidītus līdz attiecīgai koncentrācijai, atkarībā no *in vivo* ekspozīcijas scenārija. Testētās koncentrācijas izvēle ir pienācīgi jāpamato. Šķīdumiem un virsmaktīvām vielām radzenes eksponē 10 minūtes. Ja izmanto citu ekspozīcijas laiku, tam jāsniedz pienācīgs zinātnisks pamatojums. Virsmaktīvās vielas un virsmaktīvu vielu saturoša maisījuma definīcija sniegta 1. papildinājumā.

Cietvielas, kas nav virsmaktīvas, parasti testē šķīdumu vai suspensiju veidā 20 % (masas) koncentrācijā 0,9 % nātrija hlorīda šķīdumā, destilētā ūdenī vai citā šķīdinātājā, par kuriem ir iegūtas liecības, ka tiem nav nevēlamas ietekmes uz testa sistēmu. Zināmos apstākļos ar pienācīgu zinātnisku pamatojumu cietvielas var testēt tīrā veidā, izmantojot vaļējās kameras metodi (sk. 32. punktu), tās tieši aplicējot uz radzenes virsmas. Cietvielām radzenes eksponē četras stundas, taču, tāpat kā šķīdumu un virsmaktīvu vielu gadījumā, ar pienācīgu zinātnisku pamatojumu drīkst izmantot citu ekspozīcijas laiku.

Atkarībā no testējamās ķīmikālijas fizikālajām un ķīmiskajām īpašībām (piem., cietviela, šķidrums, viskozs vai neviskozs šķidrums) var izmantot dažādas apstrādes metodes. Galvenais ir nodrošināt, lai testējamā ķīmikālija pienācīgi pārklātu epitēlija virsmu un skalojot tiktu pienācīgi noskalota. Slēgtās kameras metodi parasti izmanto neviskozām vai nedaudz viskozām šķidrām testējamām ķīmikālijām, bet vaļējās kameras metodi parasti izmanto daļēji viskozām un viskozām šķidrām testējamajām ķīmikālijām un cietvielām tīrā veidā.

Izmantojot slēgtās kameras metodi, pietiekamu daudzumu testējamās ķīmikālijas (750 µL), lai tiktu pārklāta radzenes epitēlija virsma, ievieto priekšējā kamerā pa dozēšanas atverēm kameras augšpusē un atveres pēc tam uz ekspozīcijas laiku noslēdz ar kameras aizbāžņiem. Svarīgi ir nodrošināt, lai katra radzene tiktu eksponēta testējamai ķīmikālijai atbilstošu laiku.

Izmantojot vaļējās kameras metodi, pirms apstrādes noņem priekšējās kameras lodziņa slēggredzenu un pašu stikla lodziņu. Kontroles vai testējamo ķīmikāliju (750 µL vai tādu testējamās ķīmikālijas daudzumu, ar ko var pilnīgi noklāt radzeni) aplicē tieši uz radzenes epitēlija virsmas ar mikropipeti. Ja testējamo ķīmikāliju dozēt ar pipeti ir grūti, to var zem spiediena iepildīt pozitīvās izspiedes pipetē [*positive displacement pipet*], lai dozēt būtu vieglāk. Pozitīvās izspiedes pipetes uzgali ievieto šļirces dozēšanas uzgali, lai spiediena iedarbības rezultātā materiālu varētu iespiest dozēšanas uzgalī. Vienlaikus, pipetes virzulim pārvietojoties augšup, nospiež šļirces virzuli. Ja pipetes uzgali parādās gaisa burbuļi, testējamo ķīmikāliju izņem (izspiež) un procesu atkārto, kamēr uzgalis ir pilns un tajā nav gaisa burbuļu. Ja vajadzīgs, var izmantot parastu šļirci (bez adatas), jo ar to var izmērīt precīzu testējamās ķīmikālijas tilpumu un vielu ir vieglāk uzklāt radzenes epitēlija virsmai. Pēc aplicēšanas priekšējai kamerai ieliek stikla lodziņu, lai atkal izveidotu noslēgtu sistēmu.

Pēcekspozīcijas inkubēšana

Pēc ekspozīcijas perioda testējamo, negatīvās kontroles vai pozitīvās kontroles ķīmikāliju izņem no priekšējās kameras un epitēliju vismaz trīs reizes (vai kamēr vairs nav vizuāli novērojamas testējamās ķīmikālijas paliekas) noskalo ar EMEM (kas satur fenolsarkano). Skalošanai barotni, kurā ir fenolsarkana, izmanto tāpēc, ka var novērot fenolsarkanā krāsas izmaiņas, lai noteiktu, cik sekmīgi noskalotas skābas vai sārmainas testējamās ķīmikālijas. Ja fenolsarkana joprojām maina krāsu (uz dzeltenu vai violetu) vai ja ir redzamas testējamās ķīmikālijas atliekas, radzenes skalo vairāk nekā trīs reizes. Kad barotnē vairs nav testējamās ķīmikālijas, radzenes pēdējo reizi noskalo ar EMEM (bez fenolsarkanā). Pēdējā skalošanas reizē EMEM (bez fenolsarkanā) izmanto tāpēc, lai pirms apduļķošanās mērīšanas noskalotu fenolsarkano no priekšējās kameras. Pēc tam priekšējo kameru no jauna piepilda ar svaigu EMEM, kas nesatur fenolsarkano.

Testējot šķidrumus vai virsmaktīvas vielas, pēc skalošanas radzenes vēl divas stundas inkubē 32 ± 1 °C temperatūrā. Zināmos apstākļos var būt noderīgs ilgāks pēcekspozīcijas laiks, bet to izlemj katrā gadījumā atsevišķi. Ar cietvielām apstrādātas radzenes pēc četras stundas ilgā ekspozīcijas perioda beigām rūpīgi noskalo, bet tām nav vajadzīga papildu inkubācija.

Pēc pēcekspozīcijas inkubācijas perioda beigām šķidrumu un virsmaktīvu vielu gadījumā un pēc četru stundu ilgās ekspozīcijas nevirsmaktīvo cietvielu gadījumā reģistrē katras radzenes apduļķošanas un caurlaidību. Katru radzeni apskata un reģistrē novērojumus (piem., audu lobīšanās, testējamās ķīmikālijas atliekas, nevienmērīgas apduļķošanās pazīmes). Šie novērojumi var būt svarīgi, jo ar tiem var būt izskaidrojamas opacimetra rādījumu atšķirības.

Kontroles ķīmikālijas

Katrā eksperimentā iekļauj paralēlās negatīvās vai šķēdinātāja/nesēja kontroles un pozitīvās kontroles.

Testējot vielu, kas ir 100 % šķidrums, BCOP testēšanas metodē paralēli iekļauj negatīvo kontroli (piem., 0,9 % nātrija hlorīda šķīdumu vai destilētu ūdeni), lai varētu konstatēt neraksturīgas izmaiņas testēšanas sistēmā un iegūtu testa beigupunktu sākumvērtības. Tas arī ļauj pārliecināties, ka kairinājuma atbildreakciju neizraisa testa apstākļi.

Testējot atšķaidītu šķidrumu, virsmaktīvo vielu vai cietvielu, BCOP testēšanas metodē iekļauj paralēlu šķīdinātāja/nesēja kontrolgrupu, lai varētu konstatēt neraksturīgas testēšanas sistēmas izmaiņas un noteikt testa beigupunktu bāzlinijas vērtības. Drīkst izmantot tikai tādu šķīdinātāju/nesēju, par kuru iegūtas liecības, ka tam nav nevēlamas ietekmes uz testēšanas sistēmu.

Lai verificētu testa sistēmas integritāti un tās pareizu darbību, katrā eksperimentā kā paralēlu pozitīvo kontroli iekļauj ķīmikāliju, par kuru zināms, ka tā inducē pozitīvu atbildreakciju. Tomēr, lai varētu novērtēt pozitīvās kontroles atbildreakcijas mainību laikā, kairinājuma atbildreakcijas intensitāte nedrīkstētu būt pārmērīgi liela.

Piemēri šķidru testējamo ķīmikāliju pozitīvajām kontrolēm ir 100 % etanols vai 100 % dimetilformamīds. Piemērs cietu testējamo ķīmikāliju pozitīvajām kontrolēm ir 20 % (masas) imidazola 0,9 % nātrija hlorīda šķīduma.

Etalonķīmikālijas palīdz novērtēt nezināmas konkrētas ķīmikāliju vai produktu kategorijas ķīmikālijas spēju izraisīt acu kairinājumu vai novērtēt acu kairinātāja salīdzinošo spēju izraisīt noteiktas intensitātes kairinājuma atbildreakciju.

Mērāmie beigupunkti

Apduļķojumu nosaka pēc radzenes gaismas caurlaidības. Radzenes apduļķojumu mēra kvantitatīvi ar opacimetru, iegūstot apduļķošanās vērtības nepārtrauktā skalā

Caurlaidību nosaka pēc krāsvielas nātrija fluoresceīna daudzuma, kas iziet cauri visiem radzenes šūnu slāņiem (t. i., no epitēlija uz radzenes ārējās virsmas līdz endotēlijam uz radzenes iekšējās virsmas). Radzenes turētāja priekšējā kamerā, kas saskaras ar radzenes epitēlija virsmu, iepilda vienu ml nātrija fluoresceīna šķīduma (attiecīgi 4 vai 5 mg/ml, testējot šķidrumus un virsmaktīvas vielas vai cietvielas, kas nav virsmaktīvas), savukārt aizmugurējo kameru, kas saskaras ar radzenes endotēlija virsmu, piepilda ar svaigu EMEM. Pēc tam turētāju horizontālā stāvoklī uz 90 ± 5 min inkubē 32 ± 1 °C temperatūrā. Izmantojot UV/VIS spektrofotometriju, kvantitatīvi izmēra nātrija fluoresceīna daudzumu, kas nonāk aizmugurējā kamerā. Spektrofotometriskos mērījumus pie 490 nm reģistrē kā optiskā blīvuma (OD490) vai absorbcijas vērtības, ko mēra nepārtrauktā skalā. Fluoresceīna caurlaidības vērtības nosaka, izmantojot OD490 vērtības, pamatojoties uz redzamās gaismas spektrofotometru ar standarta 1 cm optiskā ceļa garumu.

Var izmantot arī 96 iedobju mikrotitrēšanas plati, ja i) var noteikt fluoresceīna OD490 vērtību noteikšanai izmantotā plates lasītāja lineāro diapazonu un ii) 96 iedobju platē izmantoti pareiza tilpuma fluoresceīna paraugi, lai iegūtu OD490 vērtības, kas ekvivalentas standarta 1 cm optiskā ceļa garumam (tam var būt vajadzīga pilnīgi pilna iedobe [parasti 360 µl]).

DATI UN PĀRSKATA SNIEGŠANA

Datu izvērtēšana

Pēc apduļķošanās un vidējo caurlaidības (OD490) vērtību korekcijas, ņemot vērā fona apduļķošanās un negatīvās kontroles caurlaidības OD490 vērtības, lai katrai apstrādes grupai aprēķinātu *in vitro* kairinājuma rādītāju (IVIS), katras apstrādes grupas vidējās apduļķošanās un caurlaidības OD490 vērtības apvieno, izmantojot šādu empīriski iegūtu formulu:

$$IVIS = \text{vidējā apduļķošanās vērtība} + (15 \times \text{vidējā caurlaidības OD490 vērtība})$$

Sina et al. (16) norāda, ka šī formula ir iegūta iekšējos un starplaboratoriju pētījumos. Datiem, kas, izmantojot 36 savienojumus, iegūti vairāku laboratoriju veiktā pētījumā, tika veikta daudzfaktoru analīze, lai iegūtu vienādojumu, kas vislabāk apraksta *in vivo* un *in vitro* datu savstarpējo sakarību. Šo analīzi veica divas atsevišķas zinātnieku grupas, iegūstot gandrīz identiskus vienādojumus.

Apduļķošanās un caurlaidības vērtības jānovērtē arī neatkarīgi viena no otras, lai noteiktu, vai testējamā ķīmikālija inducējusi koroziju vai nopietnu kairinājumu ar tikai vienu no diviem beigupunktiem (sk. "Lēmuma pieņemšanas kritēriji").

Lēmuma pieņemšanas kritēriji

Tālāk norādītas IVIS robežvērtības tādu testējamo ķīmikāliju identificēšanai, kuras inducē nopietnus acu bojājumus (ANO GHS 1. kategorija), un arī tādu testējamo ķīmikāliju identificēšanai, kuras nav jāklasificē kā acīm kairinošas vai nopietnus acu bojājumus izraisošas (ANO GHS nekategorizētās ķīmikālijas).

IVIS	ANO GHS
≤ 3	Nekategorizēta
$> 3; \leq 55$	Nav iespējams prognozēt
> 55	1. kategorija

Pētījuma pieņemamības kritēriji

Testu uzskata par pieņemamu, ja pozitīvajā kontrolē tiek iegūta IVIS vērtība, kas divkārtšas standartnovirzes robežās sakrīt ar pašreizējo vēsturisko vidējo vērtību, kura jāatjaunina vismaz reizi trīs mēnešos vai, ja laboratorijā testēšanu veic reti (t. i., retāk nekā reizi mēnesī), ikreiz, kad veic pieņemamu testu. No negatīvās vai šķīdinātāja/nesēja kontroles atbildreakcijām jāiegūst tādas apduļķošanās un caurlaidības vērtības, kas ir mazākas nekā iepriekšnoteiktās fona apduļķošanās un caurlaidības augstākās vērtības liellopu radzenēm, kas apstrādātas ar attiecīgo negatīvo vai šķīdinātāja/nesēja kontroli. Kad testējamās ķīmikālijas klasifikācija ir viennozīmīga, vajadzētu pietikt ar vienu testēšanas reizi, kurā izmanto vismaz trīs radzenes. Tomēr, ja pirmajā testēšanas reizē iegūti neskaidri rezultāti, jāapsver iespēja testēšanu veikt vēlreiz (lai gan tas nav obligāti) un vēl arī trešo reizi, ja pirmajās divās reizēs iegūtas nesaderīgas vidējās IVIS vērtības. Šajā kontekstā pirmās testēšanas reizes rezultāti uzskatāmi par strīdīgiem, ja prognozes no 3 radzenēm bijušas nesaderīgas:

- prognozes no 2 no 3 radzenēm nesader ar visu 3 radzeņu vidējo prognozi VAI
- prognoze no 1 no 3 radzenēm nesader ar visu 3 radzeņu vidējo prognozi UN nesaderīgais rezultāts ir > 10 IVIS vienības no noteiktā sliekšņa 55.
- Ja atkārtotas testēšanas reize apstiprina sākotnējās testēšanas reizes prognozi (pamatojoties uz vidējo IVIS vērtību), tad galīgo lēmumu var pieņemt, neveicot turpmāku testēšanu. Ja atkārtotas testēšanas reizes rezultāts nesader ar sākotnējās testēšanas reizes prognozi (pamatojoties uz vidējo IVIS vērtību), tad jāveic trešā un pēdējā testēšanas reize, lai atrisinātu neskaidrās prognozes un testējamo ķīmikāliju klasificētu. Ja kādā testēšanas reizē tiek prognozēta klasificēšana ANO GHS 1. kategorijā, var būt pieļaujami testēšanu klasificēšanai un marķēšanai neturpināt.

Testēšanas pārskats

Ja tā attiecas uz pētījuma norisi, testēšanas pārskatā jāiekļauj šāda informācija:

Testējamās un kontroles ķīmikālijas

- Ķīmiskais(-ie) nosaukums(-i), piem., *Chemical Abstracts Service (CAS)* izmantotais nosaukums un citi nosaukumi, ja tādi ir zināmi; CAS reģistra numurs (RN), ja tas ir zināms.

- Testējamās/kontroles ķīmikālijas tīrība un sastāvs (masas procentos), ciktāl šī informācija ir pieejama.
- Fizikālķīmiskās īpašības, kas attiecas uz pētījuma norisi, piem., fizikālais stāvoklis, gaistamība, pH, stabilitāte, ķīmiskā klase, šķīdība ūdenī.
- Testējamo/kontroles ķīmikāliju sagatavošana pirms testēšanas, ja tāda veikta (piem., sildīšana, smalcināšana).
- Stabilitāte, ja zināma.

Informācija par sponsoru un testējošo iestādi

- Sponsora, testējošās iestādes, pētījuma vadītāja vārds/nosaukums un adrese.

Testēšanas metodes apstākļi

- Izmantotais opacitometrs (piem., modelis un specifikācijas) un instrumentu iestatījumi.
- Informācija par apduļķošanās un caurlaidības mērierīču (piemēram, opacitometra un spektrofotometra) kalibrēšanu, lai nodrošinātu mērījumu linearitāti.
- Izmantotā radzenes turētāja tips (piemēram, modelis un specifikācijas).
- Cita izmantotā aprīkojuma apraksts.
- Procedūra, ko izmanto, lai nodrošinātu testēšanas metodes integritāti (t. i., pareizību un ticamību) laikā (piem., periodiska standartķīmikāliju testēšana).

Testa pieņemamības kritēriji

- Pieņemams paralēlo pozitīvo un negatīvo kontroļu rezultātu diapazons, pamatojoties uz vēsturiskajiem datiem.
- Ja vajadzīgs, pieņemami paralēlo etalonkontroļu diapazoni, pamatojoties uz vēsturiskajiem datiem.

Acu ņemšana un sagatavošana

- Norāde par acu ņemšanas vietu (t. i., iestāde, kur tās ņemtas).
- Radzenes diametrs, kas liecina par izcelsmes dzīvnieka vecumu un piemērotību testam.
- Acu glabāšanas un transportēšanas apstākļi (piem., acu ņemšanas datums un laiks, līdz testēšanas sākumam pagājušais laiks, transportēšanas veids un temperatūra, izmantotās antibiotikas, ja tādas izmantotas).
- Liellopu radzeņu sagatavošana un nostiprināšana, tostarp ziņas par to kvalitāti, radzenes turētāju temperatūra un testēšanā izmantoto radzeņu atlases kritēriji.

Testa procedūra

- Izmantoto replikātu skaits.
- Izmantoto negatīvo un pozitīvo kontroļu (attiecīgā gadījumā arī šķīdinātāja kontroļu un etalonkontroļu) identitāte.
- Izmantotās testējamās ķīmikālijas koncentrācija(-s), aplicēšana, ekspozīcijas laiks un pēcekspozīcijas inkubācijas periods.
- Izmantoto izvērtēšanas un lēmuma pieņemšanas kritēriju apraksts.
- Izmantoto pētījuma pieņemamības kritēriju apraksts.
- Testa procedūras modifikāciju apraksts, ja tādas bijušas.
- Izmantoto lēmuma pieņemšanas kritēriju apraksts.

Rezultāti

- Tabulas veidā apkopoti dati par katru testējamo paraugu (piem., apduļķošanās un OD490 vērtības un aprēķinātais testējamās ķimikālijas IVIS, un pozitīvās kontroles, negatīvās kontroles un etalonkontroles [ja tādas bijušas], attiecīgā gadījumā arī dati no atkārtotiem eksperimentiem un katra eksperimenta vidējā vērtība $\pm$ standartnovirze).
- Jebkādas citas novērotās ietekmes apraksts.
- Iegūtā *in vitro* ANO GHS klasifikācija (attiecīgā gadījumā).

Rezultātu iztirzājums

Secinājumi

LITERATŪRAS SARAKSTS

- (1) ICCVAM (2006). 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. Pieejams: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmter.htm].
- (2) ICCVAM (2010). ICCVAM Test Method Evaluation Report: Current Validation Status of *In Vitro* Test Methods Proposed for Identifying Eye Injury Hazard Potential of Chemicals and Products. NIH Publication No.10-7553. Research Triangle Park, NC:National Institute of Environmental Health Sciences. Pieejams: [<http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/MildMod-TMER.htm>].
- (3) OECD (2013). Streamlined Summary Document supporting the Test Guideline 437 for eye irritation/corrosion. Series on Testing and Assessment, No.189, OECD, Paris.
- (4) UN (2011). United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), ST/SG/AC.10/30 Rev 4, New York and Geneva: United Nations. Pieejams: [http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev04/04files_e.html].
- (5) Scott, L., Eskes, C., Hoffmann, S., Adriaens, E., Alépée, N., Bufo, M., Clothier, R., Facchini, D., Faller, C., Guest, R., Harbell, J., Hartung, T., Kamp, H., Le Varlet, B., Meloni, M., McNamee, P., Osborne, R., Pape, W., Pfannenbecker, U., Prinsen, M., Seaman, C., Spielman, H., Stokes, W., Trouba, K., Van den Berghe, C., Van Goethem, F., Vassallo, M., Vinardell, P., and Zuang, V. (2010). A proposed eye irritation testing strategy to reduce and replace *in vivo* studies using Bottom-Up and Top-Down approaches. *Toxicol. in Vitro* 24:1-9.
- (6) ICCVAM (2006). 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 Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No.: 07-4517. Pieejams: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmter.htm].
- (7) ICCVAM (2010). ICCVAM Recommended BCOP Test Method Protocol. In: ICCVAM Test Method Evaluation Report – Current Validation Status of *In Vitro* Test Methods Proposed for Identifying Eye Injury Hazard Potential of Chemicals and Products. 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.: 10-7553A. Pieejams: [<http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/MildMod-TMER.htm>].
- (8) 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).
- (9) 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.

- (10) Prinsen, M.K. (2006). The Draize Eye Test and *in vitro* alternatives; a left-handed marriage? *Toxicol. in Vitro* 20:78-81.
- (11) 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. Pieejams: [<http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/pdf>].
- (12) 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.
- (13) OECD (2011). Guidance Document on The Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) and Isolated Chicken Eye (ICE) Test Methods: Collection of Tissues for Histological Evaluation and Collection of Data on Non-severe Irritants. Series on Testing and Assessment, No. 160. Adopted October 25, 2011. Paris: Organisation for Economic Co-operation and Development.
- (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) Šā pielikuma B.5. nodaļa “Akūts acu kairinājums/korozija”.
- (18) 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. Pieejams: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_bcop.html].
- (19) OECD (1998). Series on Good Laboratory Practice and Compliance Monitoring. No. 1: OECD Principles on Good Laboratory Practice (revised in 1997).

Pieejams: http://www.oecd.org/document/63/0,3343,en_2649_34381_2346175_1_1_1_1,00.html

1. papildinājums

DEFINĪCIJAS

Pareizība: pakāpe, kādā ar testēšanas metodi iegūto mērījumu rezultāti sakrīt ar pieņemtajām atsaucēs vērtībām. Tas ir testēšanas metodes veikspējas raksturlielums un viens no tās “relevantuma” aspektiem. Šo terminu bieži izmanto ar nozīmi “konkordantums”, ar to domājot testēšanas metodes pareizo rezultātu īpatsvaru.

Etalonķimikālija: ķimikālija, ko izmanto par standartu salīdzināšanā ar testējamo ķimikāliju. Etalonķimikālijai jāpiemīt šādām īpašībām: (i) pastāvīgs(-i) un uzticams(-i) ieguves avots(-i); (ii) struktūras un funkciju līdzība ar testējamo ķimikāliju klasi, (iii) zināmas fizikālās/ķīmiskās īpašības; (iv) papildu dati par zināmajiem ietekmes veidiem un (v) zināma potence vēlamās atbildreakcijas diapazonā.

Augšupēja pieeja: pakāpeniska pieeja, ko izmanto ķimikālijai, par kuru ir aizdomas, ka tā nav jāklasificē kā acu kairinājuma vai nopietna acu bojājuma izraisītāja, un kas sākas ar to ķimikāliju nošķiršanu, kuras nav jāklasificē (negatīvs rezultāts), no citām ķimikālijām (pozitīvs rezultāts).

Ķimikālija: viela vai maisījums.

Radzene: acābola priekšējā caurspīdīgā daļa, kas pārklāj varavīksneni un zīlīti un ielaiž acī gaismu.

Radzenes apduļķojums: izmērītā radzenes apduļķošanās pakāpe pēc ekspozīcijas testējamajai ķimikālijai. Radzenes apduļķojuma palielināšanās liecina par radzenes bojājumiem. Apduļķojumu var novērtēt subjektīvi, piem., Dreiza testā ar truša acīm, vai objektīvi — ar instrumentu, piem., opacitometru.

Radzenes caurlaidība: kvantitatīvs radzenes epitēlija bojājumu mērījums, kuru izdara, nosakot krāsvielas nātrija fluoresceīna daudzumu, kas iziet cauri visām radzenes šūnu kārtām.

Acu kairinājums: izmaiņas acī, kas rodas pēc testējamās ķimikālijas aplicēšanas uz acs priekšējās virsmas un kas 21 dienas laikā pēc aplicēšanas ir pilnīgi atgriezeniskas. Nozīmē to pašu, ko “atgriezeniska ietekme uz acīm” un “ANO GHS 2. kategorija” (4).

Pseudonegatīvu rezultātu īpatsvars: tas, cik liela daļa no visām pozitīvajām ķimikālijām ar testēšanas metodi aplami iznāk negatīvas. Tas ir viens no testēšanas metodes veikspējas raksturlielumiem.

Pseudopozitīvu rezultātu īpatsvars: tas, cik liela daļa no visām negatīvajām ķimikālijām ar testēšanas metodi aplami iznāk pozitīvas. Tas ir viens no testēšanas metodes veikspējas raksturlielumiem.

Bīstamība: īpašība, kas raksturo tādu aģentu vai situāciju, kurai piemīt potenciāls atstāt nelabvēlīgu ietekmi uz šim aģentam eksponētu organismu, sistēmu vai (apakš)populāciju.

In vitro kairinājuma rādītājs (IVIS): pēc empīriski iegūtas formulas aprēķināts rādītājs, kuru izmanto BCOP testēšanas metodē un kurā katras apstrādes grupas vidējā apduļķošanās vērtība un vidējā caurlaidības vērtība tiek apkopota vienā *in vitro* rezultātā katrai apstrādes grupai. $IVIS = \text{vidējā apduļķošanās vērtība} + (15 \times \text{vidējā caurlaidības vērtība})$.

Neatgriezeniska ietekme uz acīm: sk. “Nopietni acu bojājumi”.

Maisījums: maisījums vai šķīdums, kas sastāv no divām vai vairāk vielām, kuras tajā savstarpēji nereaģē (4).

Negatīvā kontrole: neapstrādāts replikāts, kurā ir visi testa sistēmas komponenti. Ar šo paraugu rīkojas tāpat, kā ar paraugiem, kas apstrādāti ar testējamo ķimikāliju, un citiem kontrolparaugiem, lai noteiktu, vai šķīdinātājs mijiedarbojas ar testa sistēmu.

Neklasificētas ķimikālijas: ķimikālijas, kuras nav klasificētas kā acu kairinājuma (ANO GHS 2., 2.A vai 2. B kategorija) vai nopietnu acu bojājumu (ANO GHS 1. kategorija) izraisītājas. Nozīmē to pašu, ko “ANO GHS nekategorizētas ķimikālijas”.

Opacitometrs: instruments, ar ko mēra radzenes apduļķojumu, kvantitatīvi izvērtējot radzenes gaismas caurlaidību. Instrumentam parasti ir divi nodalījumi, katram savs gaismas avots un fotoelements. Vienā nodalījumā ievieto apstrādāto radzeni, bet otru izmanto instrumenta kalibrēšanai un nulles vērtību iestatīšanai. Halogēnlampas gaisma, kas iet cauri kontroles nodalījumam (tukša kamera bez lodziņiem un šķidruma), krītot uz fotoelementu, tiek salīdzināta ar gaismu, kas krīt uz fotoelementu, izejot cauri nodalījumam, kurā ir kamera ar radzeni. Tiek salīdzināta abu fotoelementu uztvertās gaismas vērtību starpība un uz digitālā displeja attēlota skaitliska apduļķošanās vērtība.

Pozitīvā kontrole: replikāts, kurā ir visi testa sistēmas komponenti un kurš apstrādāts ar ķimikāliju, par ko ir zināms, ka tā izraisa pozitīvu atbildreakciju. Lai būtu iespēja novērtēt pozitīvās kontroles atbildreakcijas mainību laikā, pozitīvās atbildreakcijas intensitāte nedrīkstētu būt pārlietu liela.

Atgriezeniska ietekme uz acīm: sk. “Acu kairinājums”.

Ticamība: parametrs, kas izsaka, kādā pakāpē tajā pašā vai citā laboratorijā ilgākā laikā, izmantojot to pašu protokolu, var iegūt reproducējamus rezultātus. To novērtē, aprēķinot metodes reproducējamību tajā pašā laboratorijā un dažādās laboratorijās un atkārtojamību tajā pašā laboratorijā.

Nopietni acu bojājumi: acs audu bojājums vai nopietna fiziska redzes pasliktināšanās, kas rodas pēc testējamās ķimikālijas aplicēšanas uz acs priekšējās virsmas un kas 21 dienas laikā pēc aplicēšanas nav pilnīgi atgriezeniska. Nozīmē to pašu, ko “neatgriezeniska ietekme uz acīm” un “ANO GHS 1. kategorija” (4).

Šķīdinātāja/nesēja kontrole: neapstrādāts paraugs, kurā ir visi testa sistēmas komponenti, tostarp šķīdinātājs vai nesējs, ko izmanto ar testējamo ķimikāliju apstrādātajos paraugos un citos kontrolparaugos, un kuru izmanto, lai noteiktu bāzlinijas atbildreakciju paraugiem, kas apstrādāti ar attiecīgajā šķīdinātājā vai nesējā izšķīdinātu testējamo ķimikāliju. Ja testā izmanto arī paralēlu negatīvo kontroli, šis paraugs parāda arī to, vai šķīdinātājs vai nesējs mijiedarbojas ar testa sistēmu.

Viola: dabiski radušies vai ražošanas procesā iegūti ķīmiskie elementi un to savienojumi, ieskaitot produkta stabilizācijai vajadzīgās piedevas, kā arī izmantotajos procesos radušos piejaukumus, bet izņemot šķīdinātājus, kurus var atdalīt, neietekmējot vielas stabilitāti un neizmainot tās sastāvu (4).

Virsmaktīva viela: saukta arī par virsmaktīvu aģentu, ir viela, piem., deterģents, kas var samazināt šķidruma virsmas spraigumu un tādējādi ļauj tam putot vai penetrēt cietvielās; to dēvē arī par mitrinātāju.

Virsmaktīvu vielu saturošs maisījums: šīs testēšanas metodes kontekstā tas ir maisījums, kas satur vienu vai vairākas virsmaktīvas vielas galīgajā koncentrācijā > 5 %.

Lejupēja pieeja: pakāpeniska pieeja, ko izmanto ķimikālijai, par kuru ir aizdomas, ka tā izraisa nopietnus acu bojājumus, un kas sākas ar to ķimikāliju nošķiršanu, kuras inducē nopietnus acu bojājumus (pozitīvs rezultāts), no citām ķimikālijām (negatīvs rezultāts).

Testējamā ķimikālija: jebkura viela vai maisījums, ko testē ar šo testēšanas metodi.

Daudzpakāpju testēšanas stratēģija: pakāpeniskas testēšanas stratēģija, kurā noteiktā secībā pārskata visu esošo informāciju par testējamo ķimikāliju, katrā pakāpē izmantojot pierādījumu izsvēršanu, lai pirms pārejas uz nākamo pakāpi noteiktu, vai ir pieejams pietiekami daudz informācijas, lai pieņemtu lēmumu par bīstamības klasifikāciju. Ja testējamās ķimikālijas kairinājuma izraisīšanas potenciālu var noteikt, pamatojoties uz esošo informāciju, papildu testēšana nav jāveic. Ja, pamatojoties uz esošo informāciju, testējamās ķimikālijas kairinājuma izraisīšanas potenciālu noteikt nevar, ievēro pakāpenisku secīgu procedūru testēšanai ar dzīvniekiem, līdz var viennozīmīgi pieņemt lēmumu par klasifikāciju.

Apvienoto Nāciju Organizācijas Ķimikāliju klasificēšanas un marķēšanas globāli harmonizētā sistēma (ANO GHS): sistēma, kurā ķimikālijas (vielas un maisījumus) klasificē pēc standartizētiem fizisko apdraudējumu, veselības apdraudējumu un vidisko apdraudējumu tipiem un līmeņiem un kura paredz atbilstošus saziņas elementus, piem., piktogrammas, signālvārdus, bīstamības apzīmējumus, drošības prasību apzīmējumus un drošības datu lapas, ar mērķi sniegt informāciju par ķimikāliju nelabvēlīgo ietekmi, lai aizsargātu cilvēkus (tostarp darba devējus, darba ņēmējus, transporta darbiniekus, patērētājus un avārijas dienestu darbiniekus) un vidi (4).

ANO GHS 1. kategorija: sk. "Nopietni acu bojājumi".

ANO GHS 2. kategorija: sk. "Acu kairinājums".

ANO GHS nekategorizētas ķimikālijas: ķimikālijas, kuras neatbilst kritērijiem klasificēšanai ANO GHS 1. vai 2. (2.A vai 2.B) kategorijā. Nozīmē to pašu, ko "neklasificētas ķimikālijas".

Validēta testēšanas metode: testēšanas metode, kuras relevantums (ieskaitot pareizību) un ticamība attiecībā uz lietošanu konkrētā nolūkā ir pārbaudīta validācijas pētījumos. Jāievēro, ka validētas testēšanas metodes veikspēja pareizības un ticamības ziņā var nebūt pietiekama, lai to izmantotu paredzētajam nolūkam.

Pierādījumu izsvēršana: process, kurā izsver dažādu informācijas elementu stiprās un vājās puses, cenšoties izdarīt un pamatot secinājumu par testējamās ķimikālijas bīstamības potenciālu.

2. papildinājums

BCOP TESTĒŠANAS METODES PROGNOZĒTSPĒJA

1. tabula

BCOP prognozētspēja tādu ķīmikāliju identificēšanā, kuras izraisa nopietnus acu bojājumus [ANO GHS / ES CLP, 1. kat. vai nav 1. kat. (2. kat.+nekat.); ASV EPA I kat. vai nav I kat. (II kat.+III kat.+IV kat.)]

Klasifikācijas sistēma	Sk.	Pareizība		Jutība		Pseidonegatīvi rezultāti		Specifiskums		Pseidopozitīvi rezultāti	
		%	Sk.	%	Sk.	%	Sk.	%	Sk.	%	Sk.
ANO GHS ES CLP	191	78,53	150/191	86,15	56/65	13,85	9/65	74,60	94/126	25,40	32/126
ASV EPA	190	78,95	150/190	85,71	54/63	14,29	9/63	75,59	96/127	24,41	31/127

2. tabula

BCOP prognozētspēja tādu ķīmikāliju identificēšanā, kuras nav jāklasificē kā acu kairinājuma vai nopietnu acu bojājumu izraisītājas ("nekairinātājas") [ANO GHS / ES CLP, nekat. vai nav nekat. (1. kat.+2. kat.); ASV EPA IV kat. vai nav IV kat. (I kat.+II kat.+III kat.)]

Klasifikācijas sistēma	Sk.	Pareizība		Jutība		Pseidonegatīvi rezultāti		Specifiskums		Pseidopozitīvi rezultāti	
		%	Sk.	%	Sk.	%	Sk.	%	Sk.	%	Nr.
ANO GHS ES CLP	196	68,88	135/196	100	107/107	0	0/107	31,46	28/89	68,54	61/89
ASV EPA	190	82,11	156/190	93,15	136/146	6,85	10/146	45,45	20/44	54,55	24/44

3. papildinājums

BCOP TESTĒŠANAS METODES STANDARTĶIMIKĀLIJAS

Pirms šīs testēšanas metodes regulāras izmantošanas laboratorijām jāapliecina sava tehniskā kompetence, pareizi nosakot klasifikāciju 1. tabulā ieteiktajām 13 ķīmikālijām. Šīs ķīmikālijas ir atlasītas tā, lai tās reprezentētu acu apdraudējumu izraisīto atbildreakciju diapazonu, kura pamatā ir *in vivo* tests ar truša acīm (TG 405) (17) un ANO GHS klasifikācijas sistēma (t. i., 1., 2.A, 2.B kategorija vai neklasificētas ķīmikālijas) (4). Citi atlases kritēriji bija ķīmikāliju pieejamība tirgū, kvalitatīvu *in vivo* atsaucē datu pieejamība un kvalitatīvu ar BCOP testēšanas metodi iegūtu *in vitro* datu pieejamība. Atsaucē dati ir pieejami vienkāršotajā kopsavilkumā (3) un ICCVAM papildinformācijas pārskata dokumentā par BCOP testēšanas metodi (2) (18).

1. tabula

Ķīmikālijas, kuras ieteicams izmantot, lai pierādītu tehnisko kompetenci izmantot BCOP testēšanas metodi

Ķīmikālija	CAS Nr.	Ķīmikāliju klase ⁽¹⁾	Agregārstāvoklis	In vivo klasifikācija ⁽²⁾	BCOP klasifikācija
Benzalkonija hlorīds (5 %)	8001-54-5	Onijsavienojums	Šķidr	1. kategorija	1. kategorija
Hlorheksidīns	55-56-1	Amīns, amidīns	Ciets	1. kategorija	1. kategorija
Dibenzoil-L-vīnskābe	2743-38-6	Karbonskābe, esters	Ciets	1. kategorija	1. kategorija
Imidazols	288-32-4	Heterocikliski savienojumi	Ciets	1. kategorija	1. kategorija
Trihloretiķskābe (30 %)	76-03-9	Karbonskābe	Šķidr	1. kategorija	1. kategorija
2,6-Dihlorobenzoilhlorīds	4659-45-4	Acilhalogenīds	Šķidr	2.A kategorija	Nav iespējams pareizi/ticami prognozēt
Etil-2-metilacetoacetāts	609-14-3	Ketons, esters	Šķidr	2.B kategorija	Nav iespējams pareizi/ticami prognozēt
Amonija nitrāts	6484-52-2	Neorganisks sāls	Ciets	2. ⁽³⁾ kategorija	Nav iespējams pareizi/ticami prognozēt
EDTA dikālija sāls	25102-12-9	Amīns, karbonskābe (sāls)	Ciets	Neklasificēts	Neklasificēts
Tween 20	9005-64-5	Esters, poliēters	Šķidr	Neklasificēts	Neklasificēts

Ķīmikālija	CAS Nr.	Ķīmikāliju klase ⁽¹⁾	Aggregātsstāvoklis	In vivo klasifikācija ⁽²⁾	BCOP klasifikācija
2-merkaptopirimi- dīns	1450-85-7	Acilhalogenīds	Ciets	Neklasificēts	Neklasificēts
Fenilbutazons	50-33-9	Heterocikliskais sa- vienojums	Ciets	Neklasificēts	Neklasificēts
Polioksietilēna 23 laurilēteris (BRIJ-35) (10 %)	9002-92-0	Spirts	Šķidrums	Neklasificēts	Neklasificēts

Saīsinājumi: CAS Nr. = *Chemical Abstracts Service* reģistra numurs

⁽¹⁾ Katra testējamā ķīmikālija ķīmikāliju klasē iekļauta, izmantojot standarta klasifikācijas shēmu, kuras pamatā ir National Library of Medicine Medical Subject Headings (MeSH) klasifikācijas sistēma (pieejama <http://www.nlm.nih.gov/mesh>).

⁽²⁾ Pamatojoties uz truša acu in vivo testa rezultātiem (ESAO TG 405) (17) un izmantojot ANO GHS sistēmu (4).

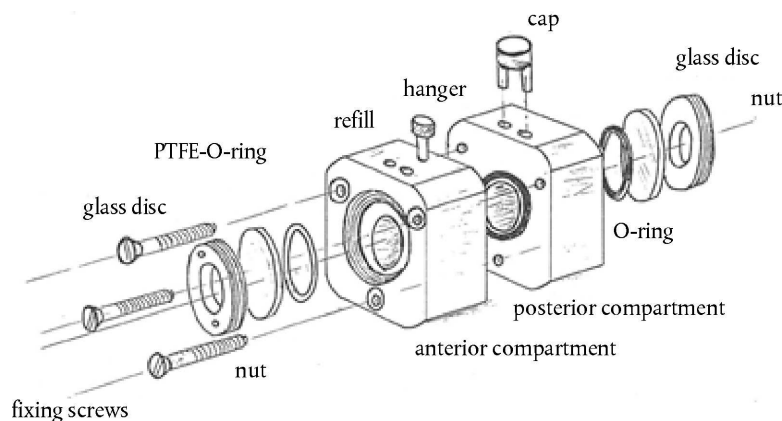
⁽³⁾ Klasificēšana 2.A vai 2.B kategorijā ir atkarīga no tā, kā interpretē ANO GHS kritēriju, ar ko šīs divas kategorijas nošķir, t. i., lai ķīmikāliju klasificētu 2.A kategorijā, 7. dienā ietekmei jābūt novērojamai 1 no 3 dzīvniekiem vai 2 no 3 dzīvniekiem. In vivo pētījums ietvēra 3 dzīvniekus. Visi beigupunkti, izņemot konjunktīvas apsārtumu vienam dzīvniekam, līdz 7. dienai vai ātrāk saruka līdz nullei. Vienam dzīvniekam, kurš pilnīgi neatlaba līdz 7. dienai, konjunktīvas apsārtuma rādītājs bija 1 (7. dienā), bet 10. dienā tas pilnīgi izzuda.

4. papildinājums

BCOP RADZENES TURĒTĀJS

BCOP radzenes turētāji ir izgatavoti no inerta materiāla (piem., polipropilēna). Turētājs sastāv no divām pusēm (priekšējā un aizmugurējā kamera), un tam ir divas līdzīgas cilindriskas iekšējās kameras. Katra kamera ir konstruēta tā, lai tās tilpums būtu aptuveni 5 ml, un tās galā ir stikla lodziņš, caur kuru reģistrē apduļķojuma mērījumus. Katras iekšējās kameras diametrs ir 1,7 cm un dziļums 2,2 cm⁽¹⁾. Lai nepieļautu noplūdes, aizmugurējai kamerai uzliek gredzenveida blīvi. Radzeni novieto ar endotēlija pusi uz leju pret aizmugurējās kameras blīvi, un priekšējo kameru novieto uz radzenes epitēlija virsmas. Kameras vietā notur trīs nerūsoša tērauda skrūves kameras ārmaļā. Lai nodrošinātu vieglu piekļuvi radzenei, katras kameras galā ir noņemams stikla lodziņš. Lai nepieļautu noplūdes, arī starp stikla lodziņu un kameru ir blīve. Barotnes un testējamo ķīmikāliju ievadīšanai un izvadišanai ir paredzētas divas atveres katras kameras augšpusē. Iedarbības un inkubācijas perioda laikā tās noslēdz ar gumijas tapām. Radzenes turētāju gaismas caurlaidība var mainīties, jo gaismas izkliedi vai atstarojumu var ietekmēt nolietojums vai noteiktu ķīmikāliju atlieku uzkrāšanās uz iekšējās kameras sienām vai stikla lodziņiem. Tā rezultātā var palielināties vai samazināties radzenes turētāju bāzlinijas gaismas caurlaidība (un līdz ar to attiecīgi samazināties vai palielināties bāzlinijas apduļķojuma rādījumi) un var būt novērojamas būtiskas izmaiņas paredzētajos sākotnējos radzenes apduļķojuma bāzlinijas mērījumos atsevišķās kamerās (t. i., sākotnējās radzenes apduļķojuma vērtības konkrētos atsevišķos radzenes turētājos no gaidītajām bāzlinijas vērtībām bieži var atšķirties par vairāk nekā 2 vai 3 apduļķojuma vienībām). Katrai laboratorijai atkarībā no testēto ķīmikāliju veida un kameru izmantošanas biežuma jāapsver, vai nav jāizveido programma radzenes turētāju gaismas caurlaidības izmaiņu izvērtēšanai. Lai noteiktu bāzlinijas vērtības, radzenes turētājus var pirms parastās izmantošanas pārbaudīt, izmērot apduļķojuma (vai gaismas caurlaidības) bāzlinijas vērtības kamerām, kuras ir piepildītas ar pilnīgu barotni bez radzenēm. Pēc tam periodiski pārbauda radzenes turētāju gaismas caurlaidības izmaiņas izmantošanas perioda laikā. Katra laboratorija var noteikt radzenes turētāju pārbaudes biežumu atkarībā no testētajām ķīmikālijām, izmantošanas biežuma un radzenes apduļķojuma bāzlinijas vērtību izmaiņu novērojumiem. Ja ir novērojamas ievērojamas radzenes turētāja gaismas caurlaidības izmaiņas, jāapsver iespēja radzenes turētāju iekšējās virsmas pienācīgi notīrīšanas un/vai noplūēt vai tās nomainīt.

Radzenes turētājs: izvērsta diagramma.



⁽¹⁾ Norādītie izmēri attiecas uz radzenes turētāju, kas paredzēts 12 līdz 60 mēnešus vecu govju acīm. Ja izmanto 6 līdz 12 mēnešus vecu dzīvnieku acis, abu turētāja kameru tilpumam jābūt 4 ml, bet abu iekšējo kameru diametram 1,5 cm un dziļumam 2,2 cm. Katra jaunas konstrukcijas radzenes turētāja gadījumā ir ļoti svarīgi, lai eksponētā radzenes virsmas laukuma attiecība pret aizmugurējās kameras tilpumu būtu tāda pati kā standarta radzenes turētājam. Tas ir vajadzīgs, lai tiktu pareizi noteiktas caurlaidības vērtības, kas izmantojamas IVIS aprēķināšanai ar piedāvāto formulu.

5. papildinājums

OPACITOMETERS

Opacitometrs ir gaismas caurlaidības mērierīce. Piemēram, BCOP testēšanas metodes validēšanā izmantotajā *Electro Design* (Rioma, Francija) OP-KIT aprīkojumā halogēnlampas gaismā, kas iet cauri kontroles nodalījumam (tukša kamera bez lodziņiem un šķidruma), krīt uz fotoelementu, tiek salīdzināta ar gaismu, kas krīt uz fotoelementu, izejot cauri nodalījumam, kurā ir kamera ar radzeni. Tiek salīdzināta abu fotoelementu uztvertās gaismas vērtību starpība un uz digitālā displeja attēlota skaitliska apduļķošanās vērtība. Tiek noteiktas apduļķojuma vienības. Var izmantot citu veidu opacitometrus ar citādu konfigurāciju (piem., kuriem nav paralēli jāizdara kontroles un eksperimenta nodalījuma mērījumi), ja ir pierādīts, ka tie sniedz līdzīgus rezultātus kā validētais aprīkojums.

Opacitometra rādījumu grafikam visā apduļķojuma mērījumu diapazonā, kas aptver arī dažādo klasifikāciju robežvērtības prognozēšanas modeļi (t. i., līdz robežvērtībai, pēc kuras nosaka koroziju / spēcīgu kairinājumu), jābūt lineāram. Lai nodrošinātu lineārus un precīzus rādījumus līdz 75–80 apduļķošanās vienībām, opacitometrs jākalibrē ar vairākiem kalibratoriem. Kalibratorus ievieto kalibrēšanas kamerā (radzenes kamera, kas paredzēta kalibratoriem) un opacitometrā nolasa rezultātus. Kalibrēšanas kamera ir izveidota tā, lai kalibrators atrastos apmēram tādā pašā attālumā no gaismas un fotoelementa, kādā apduļķošanās mērījumu laikā būtu novietota radzene. Atsauces vērtības un sākotnējie iestatījumi ir atkarīgi no izmantotā aprīkojuma veida. Ar pienācīgām (instrumentspecifiskām) procedūrām jānodrošina apduļķojuma mērījumu linearitāte. Piemēram, *Electro Design* (Rioma, Francija) OP-KIT aprīkojuma opacitometru vispirms kalibrē uz 0 apduļķojuma vienībām, izmantojot kalibrēšanas kameru bez kalibratora. Pēc tam pārmaiņus pa vienam kalibrēšanas kamerā ievieto trīs dažādus kalibratorus un mēra apduļķojumu. Apduļķojuma rādījumiem pie 1., 2. un 3. kalibratora ievietošanas jābūt attiecīgi 75, 150 un 225 apduļķojuma vienības $\pm 5\%$.”

- 13) pielikuma B daļā B.48. nodaļu aizstāj ar šādu:

“B.48. Izolētas vistas acs testēšanas metode, kurā identificē i) nopietnu acu bojājumu inducētās ķīmikālijas un ii) ķīmikālijas, kuras nav jāklasificē par tādām, kas izraisa acu kairinājumu vai nopietnus acu bojājumus

IEVADS

Šī testēšanas metode ir ekvivalenta ESAO Testēšanas vadlīnijai (TG) Nr. 438 (2013. gads). Izolētas vistas acs (ICE) testēšanas metodi 2006. un 2010. gadā izvērtēja Alternatīvo metožu validēšanas starpaģentūru koordinācijas komiteja (ICCVAM) kopā ar Eiropas Alternatīvo metožu validēšanas centru (ECVAM) un Japānas Alternatīvo metožu validēšanas centru (JaCVAM) (1) (2) (3). Pirmajā izvērtēšanā ICE tika atzīta par zinātniski derīgu testēšanas metodi izmantošanai par skrīninga testu tādu ķīmikāliju (vielu un maisījumu) identificēšanai, kuras izraisa nopietnus acu bojājumus (1. kategorija), atbilstoši definīcijai, kas dota Apvienoto Nāciju Organizācijas (ANO) Ķīmikāliju klasificēšanas un marķēšanas globālī harmonizētajā sistēmā (GHS) (1) (2) (4) un Regulā (EK) Nr. 1272/2008 par vielu un maisījumu klasificēšanu, marķēšanu un iepakojšanu (CLP regula) ⁽¹⁾. Otrajā izvērtēšanā ICE testēšanas metode tika izvērtēta attiecībā uz tās izmantošanu par skrīninga testu tādu ķīmikāliju identificēšanā, kuras nav klasificētas kā acu kairinājuma un nopietnu acu bojājumu izraisītājas saskaņā ar ANO GHS (3) (4). Validācijas pētījuma rezultāti un profesionālvērtēšanas grupas ieteikumi apstiprināja sākotnējo ieteikumu ICE izmantot tam, lai klasificētu ķīmikālijas, kuras izraisa nopietnus acu bojājumus (ANO GHS 1. kategorija), jo pieejamā datu bāze kopš ICCVAM sākotnējās apstiprināšanas nebija mainījusies. Mīnētājā posmā netika ierosināti ieteikumi ICE pielietojamības jomu paplašināt, tajā ietverot arī citas kategorijas. Tika veikta validācijas pētījumā izmantotās *in vitro* un *in vivo* datu kopas atkārtota izvērtēšana, kuras mērķis bija izvērtēt ICE lietderīgumu tādu ķīmikāliju identificēšanā, kuras nav jāklasificē sakarā ar acu kairinājumu vai nopietniem acu bojājumiem (5).

⁽¹⁾ Eiropas Parlamenta un Padomes 2008. gada 16. decembra Regula (EK) Nr. 1272/2008 par vielu un maisījumu klasificēšanu, marķēšanu un iepakojšanu un ar ko groza un atceļ Direktīvas 67/548/EEK un 1999/45/EK un groza Regulu (EK) Nr. 1907/2006 (OV L 353, 31.12.2008., 1. lpp.).

Atkārtotajā izvērtēšanā tika secināts, ka ICE testēšanas metodi var izmantot arī tādu ķīmikāliju identificēšanai, kuras saskaņā ar ANO GHS klasifikācijas sistēmu nav jāklasificē kā acu kairinājuma vai nopietnu acu bojājumu izraisītājas (4) (5). Šajā testēšanas metodē ietilpst ICE testēšanas metodes ieteicamie lietojumi un ierobežojumi, kuru pamatā ir šie izvērtējumi. Galvenās atšķirības starp ESAO testēšanas norādījumu sākotnējo 2009. gada redakciju un atjaunināto 2013. gada redakciju attiecas uz (bet ne tikai) ICE testēšanas metodes izmantošanu tādu ķīmikāliju identificēšanai, kuras nav jāklasificē saskaņā ar ANO GHS klasifikācijas sistēmu, testēšanas pārskata elementu atjauninājumu, 1. papildinājuma — definīciju — atjauninājumu un 2. papildinājuma par standartķīmikālijām atjauninājumu.

Šobrīd ir vispārpieņemts, ka tuvākajā nākotnē neviens atsevišķs *in vitro* acu kairinājuma tests nevarēs aizstāt Dreiza *in vivo* acu testu un prognozēt visus kairinājuma veidus dažādām ķīmikāliju klasēm. Tomēr *in vivo* acu testu varētu būt iespējams aizstāt, (pakāpjveida) testēšanas stratēģijā stratēģiski apvienojot vairākas alternatīvas testēšanas metodes (6). Lejupējā pieeja (7) ir izstrādāta gadījumiem, kad, pamatojoties uz esošo informāciju, ķīmikālijai ir paredzams augsts kairinājuma izraisīšanas potenciāls, savukārt augšupējā pieeja (7) ir izstrādāta gadījumiem, kad, pamatojoties uz esošo informāciju, paredzams, ka ķīmikālija neizraisīs tādu acu kairinājumu, ka tā būtu jāklasificē. ICE testēšanas metode ir *in vitro* testēšanas metode, ko konkrētos apstākļos un ar noteiktiem ierobežojumiem, kas aprakstīti 8.–10. punktā, var izmantot tam, lai ķīmikālijas klasificētu un marķētu kā acīm bīstamas. Kaut arī šo ICE testēšanas metodi vienu pašu neuzskata par derīgu aizstājēju trušu acu *in vivo* testam, to ieteicams izmantot par sākotnējo soli testēšanas stratēģijā, piemēram, Scott *et al.* (7) ierosinātajā lejupējā pieejā, lai identificētu ķīmikālijas, kas izraisa nopietnus acu bojājumus, t. i., ķīmikālijas, kuras bez papildu testēšanas jāklasificē ANO GHS 1. kategorijā (4). ICE testēšanas metodi ieteicams arī izmantot tam, lai identificētu ķīmikālijas, kuras nav jāklasificē sakarā ar acu kairinājumu vai nopietniem acu bojājumiem, saskaņā ar ANO GHS (ANO GHS neklasificētās ķīmikālijas) (4), tāpēc to var izmantot par sākotnējo soli augšupējā testēšanas stratēģijā (7). Taču, ja ar ICE testēšanas metodi netiek prognozēts, ka ķīmikālija izraisa nopietnus acu bojājumus vai klasificējama par acu kairinājumu/nopietnu acu bojājumu izraisītāju, tā jātestē papildus (*in vitro* un/vai *in vivo*), lai noteiktu tās galīgo klasifikāciju. Turklāt pirms ICE izmantošanas augšupējā pieejā, izmantojot klasifikācijas shēmu, kas nav ANO GHS, jākonsultējas ar attiecīgajām regulatīvajām iestādēm.

Šajā testēšanas metodē aprakstītas procedūras, ko izmanto, lai izvērtētu testējamās ķīmikālijas potenciālo bīstamību acīm, ko mēra ar tās spēju toksisku iedarboties uz enukleātu vistas aci. Toksisko ietekmi uz radzeni mēra ar šādiem parametriem: (i) kvalitatīvs apduļķošanās novērtējums, (ii) kvalitatīvs epitēlija bojājumu novērtējums, pamatojoties uz fluoresceīna aplicēšanu acij (fluoresceīna aizturēšana), (iii) kvantitatīvs biežuma palielināšanās (pietūkuma) novērtējums un (iv) kvalitatīvs makroskopisko morfoloģisko virsmas bojājumu novērtējums. Radzenes apduļķošanās, pietūkuma un bojājumu novērtējumu pēc ekspoziācijas testējamajai ķīmikālijai novērtē atsevišķi un pēc tam apvieno, lai noteiktu acu kairinājuma klasifikāciju.

Definīcijas ir sniegtas 1. papildinājumā.

SĀKOTNĒJIE APSVĒRUMI UN IEROBEŽOJUMI

Šīs testēšanas metodes pamatā ir ESAO Norādījumu dokuments 160 (8), kas tika izstrādāts pēc ICCVAM starptautiskā validācijas pētījuma (1) (3) (9), kurā piedalījās Eiropas Alternatīvo metožu validēšanas centrs, Japānas Alternatīvo metožu validēšanas centrs un TNO Dzīves kvalitātes nodaļas toksikoloģijas un praktiskās farmakoloģijas departaments (Nīderlande). Protokola pamatā ir informācija, kas iegūta no publicētiem protokoliem, kā arī TNO pašlaik izmantotā protokola (10) (11) (12) (13) (14).

Šīs testēšanas metodes validēšanā tika testēts plašs ķīmikāliju klāsts, un validācijas pētījuma empīriskā datubāze aptvēra 152 ķīmikālijas, tostarp 72 vielas un 80 maisījumus (5). Šī testēšanas metode ir izmantojama cietvielām, šķīdriem, emulsijām un gēliem. Šķīdriem var būt ūdens vai neūdens šķīdumi, cietvielas var būt gan ūdenī šķīstošas, gan nešķīstošas. Validācijas pētījumā vēl nav novērtētas gāzes un aerosoli.

ICE testēšanas metodi var izmantot, lai identificētu acu nopietnu bojājumu izraisītājas ķimikālijas, t. i., ANO GHS 1. kategorijā klasificējamās ķimikālijas (4). Ja metodi izmanto šim nolūkam, konstatētie ICE testēšanas metodes ierobežojumi ir saistīti ar lielu pseidopozitīvu rezultātu īpatsvaru spirtam un lielu pseidonegatīvu rezultātu īpatsvaru cietvielām un virsmaktīvām vielām (1) (3) (9). Tomēr šajā kontekstā pseidonegatīvo rezultātu īpatsvaram (ANO GHS 1. kategorijas ķimikālija identificēta kā tāda, kas nav ANO GHS 1. kategorijas ķimikālija) nav būtiskas nozīmes, jo, izmantojot pierādījumu izsvēršanu secīgas testēšanas stratēģijā, visas testējamās ķimikālijas, kuru testēšanā iegūst negatīvu rezultātu, pēc tam tiktu testētas ar citiem pienācīgi validētu(-iem) *in vitro* testu(-iem) vai, ja citas iespējas nebūtu, ar trušiem — atkarībā no normatīvajām prasībām. Jāpiemin, ka cietvielas Dreiza acu kairinājuma *in vivo* testā var izraisīt mainīgus un pārmērīgus ekspozīcijas apstākļus, kā rezultātā var rasties neatbilstošas prognozes par to patieso kairinājuma potenciālu (15). Pētnieki var apsvērt šīs testēšanas metodes izmantošanu visu veidu ķimikālijām, pozitīvu rezultātu pieņemot kā norādi uz nopietnus acu bojājumus izraisošu atbildreakciju, t. i., liecību, ka ķimikālija bez tālākas testēšanas jāklasificē ANO GHS 1. kategorijā. Taču spirtu testēšanā iegūti pozitīvi rezultāti jāinterpretē piesardzīgi pārvērtēšanas riska dēļ.

Ja ICE testēšanas metodi izmanto tādu ķimikāliju identificēšanai, kuras izraisa nopietnus acu bojājumus (ANO GHS 1. kategorija), tās vispārējā pareizība ir 86 % (120/140), pseidopozitīvo rezultātu īpatsvars ir 6 % (7/113) un pseidonegatīvo rezultātu īpatsvars ir 48 % (13/27), salīdzinot ar datiem, kas iegūti ar truša acu *in vivo* testēšanas metodi un kas klasificēti atbilstīgi ANO GHS klasifikācijas sistēmai (4) (5).

ICE testēšanas metodi var izmantot arī tādu ķimikāliju identificēšanai, kuras saskaņā ar ANO GHS klasifikācijas sistēmu nav jāklasificē kā acu kairinājuma vai nopietnu acu bojājumu izraisītājas. Pirms ICE izmantošanas augšupējā pieejā, izmantojot klasifikācijas shēmu, jākonsultējas ar attiecīgajām regulatīvajām iestādēm. Šo testēšanas metodi var izmantot visu veidu ķimikālijām, negatīvu rezultātu pieņemot par norādi, ka ķimikālija nav jāklasificē attiecībā uz acu kairinājumu vai nopietniem acu bojājumiem. Tomēr, pamatojoties uz vienu validācijas datubāzes rezultātu, krāsas, kuras satur organisku pretapaugšanas šķīdinātāju, var tikt prognozētas par zemu (5).

Ja ICE testēšanas metodi izmanto tādu ķimikāliju identificēšanai, kuras nav jāklasificē kā acu kairinājumu un nopietnu acu bojājumu izraisītājas, tās vispārējā pareizība ir 82 % (125/152), pseidopozitīvo rezultātu īpatsvars ir 33 % (26/79) un pseidonegatīvo rezultātu īpatsvars ir 1 % (1/73), salīdzinot ar datiem, kas iegūti pēc truša acu *in vivo* testēšanas metodes un kas klasificēti atbilstīgi ANO GHS klasifikācijas sistēmai (4) (5). Ja no datu bāzes izslēdz testējamās ķimikālijas, kuras ietilpst noteiktās klasēs (t. i., organisku pretapaugšanas šķīdinātāju saturošas krāsas), ICE testēšanas metodes vispārējā pareizība ANO GHS klasifikācijas sistēmā ir 83 % (123/149), pseidopozitīvo rezultātu īpatsvars ir 33 % (26/78) un pseidonegatīvo rezultātu īpatsvars ir 0 % (0/71) (4) (5).

ICE testēšanas metodi nav ieteicams izmantot tādu testējamo ķimikāliju identificēšanai, kuras jāklasificē kā acīm kairinošas (t. i., ANO GHS 2. vai 2.A kategorija) vai kuras jāklasificē kā acīm viegli kairinošas (ANO GHS 2. B kategorija), jo ievērojams skaits ANO GHS 1. kategorijas ķimikāliju ar metodi ir klasificētas zemākā kategorijā — ANO GHS 2., 2.A vai 2.B kategorijā, bet ANO GHS nekategorizētās ķimikālijas ir klasificētas augstākā kategorijā — ANO GHS 2., 2.A vai 2.B kategorijā. Šim nolūkam var būt nepieciešams veikt turpmāku testēšanu ar citu piemērotu metodi.

Visās procedūrās ar vistu acīm testējošajām iestādēm jāievēro piemērojamie noteikumi un procedūras darbībām ar cilvēku vai dzīvnieku izcelsmes materiāliem, pie kuriem pieder arī audi un audu šķidrumi. Ieteicams ievērot vispārējos piesardzības pasākumus darbam laboratorijā (16).

Kaut arī ICE testēšanas metode neņem vērā konjunktīvas un varavīksnienes bojājumus, ko izvērtē truša acu kairinājuma testēšanas metodē, tā apskata ietekmi uz radzeni, kas ir noteicošais faktors *in vivo* klasifikācijā, ja izmanto ANO GHS klasifikāciju. Kaut gan radzenes bojājumu atgriezeniskumu ar ICE testēšanas metodi novērtēt nevar, pamatojoties uz truša acu pētījumiem, ir ierosināts dažu neatgriezenisko ietekmes veidu novērtēšanai izmantot radzenes bojājuma sākotnējā dziļuma novērtējumu (17). Lai izprastu, kā rodas ar sākotnējo ārkārtīgi nopietno bojājumu nesaistīta neatgriezeniska ietekme, ir nepieciešamas papildu zinātniskās zināšanas. Visbeidzot, izmantojot ICE testēšanas metodi, nevar novērtēt ar acu eksponētību saistītas sistēmiskas toksicitātes potenciālu.

Šī testēšanas metode tiks periodiski atjaunināta, ņemot vērā jaunu informāciju un datus. Piemēram, gadījumos, kad nepieciešams pilnīgāk raksturot radzenes bojājumus, var potenciāli noderēt histopatoloģija. Lai šo iespējamību izvērtētu, lietotāji tiek mudināti acis saglabāt un sagatavot histopatoloģijas paraugus, kurus iespējams izmantot datubāzes izveidē un lēmuma pieņemšanas kritēriju pilnveidošanā, kas vēl vairāk uzlabotu šīs testēšanas metodes pareizību. ESAO ir izstrādājusi Norādījumu dokumentu par toksicitātes acīm *in vitro* testēšanas metožu izmantošanu, kas ietver sīki izklāstītas procedūras par histopatoloģijas paraugu ņemšanu un informāciju par to, kur paraugi un/vai histopatoloģijas dati jāiesniedz (8).

Laboratorijām, kas sāk lietot šo testēšanas metodi, jāizmanto 2. papildinājumā norādītās standartķīmikālijas. Laboratorija šīs ķīmikālijas var izmantot ICE testēšanas metodes izmantošanas tehniskās kompetences demonstrēšanai pirms ICE testēšanas rezultātu datu iesniegšanas izmantošanai normatīvajos aktos reglamentētajai bīstamības klasifikācijai.

TESTA PRINCIPS

ICE testēšanas metode ir organotipisks modelis, kas dod iespēju īslaicīgi saglabāt vistas aci *in vitro*. Šajā testēšanas metodē testējamās ķīmikālijas radītos bojājumus novērtē, nosakot radzenes pietūkumu, apduļķojumu un fluoresceīna aizturi. Divi pēdējie parametri tiek novērtēti kvalitatīvi, bet radzenes pietūkumu nosaka kvantitatīvi. Katru novērtējumu pārvērš kvantitatīvā rezultātā, ko izmanto, lai aprēķinātu kopējo kairinājuma rādītāju, vai tam piešķir kvalitatīvu kategoriju, ko izmanto, lai noteiktu acu *in vitro* apdraudējuma klasifikāciju vai klasificētu ANO GHS 1. kategorijā vai atzītu par ANO GHS neklasificējamu ķīmikāliju. Jebkuru no šiem rezultātiem var izmantot, lai prognozētu, ka testējamā ķīmikālija potenciāli varētu izraisīt nopietnus acu bojājumus *in vivo* vai ka tā attiecībā uz acu apdraudējumu nav klasificējama (sk. "Lēmuma pieņemšanas kritēriji"). Tomēr nevar klasificēt ķīmikālijas, par kurām nav prognožu, ka tās izraisīs nopietnus acu bojājumus vai ka tās ir neklasificējamās, izmantojot ICE testēšanas metodi (sk. 11. punktu).

Vistu acu avots un vecums

Parasti šajā testā izmanto acis, kas ņemtas no kautuvē cilvēka patēriņam kautām vistām, tāpēc laboratorijas dzīvnieki nav jāizmanto. Izmanto tikai tādu veselīgu dzīvnieku acis, kurus uzskata par piemērotiem cilvēku pārtikai.

Kaut gan nav veikts kontrolēts pētījums vistu optimālā vecuma novērtēšanai, šajā testēšanas metodē parasti izmanto pavasara cāļus, kurus parasti apstrādā mājputnu kautuvē (t. i., aptuveni 7 nedēļas vecus, 1,5–2,5 kg).

Acu ņemšana un nogādāšana laboratorijā

Galvas atdala tūlīt pēc vistu apduļķināšanas, parasti ar elektriskās strāvas triecienu, un asiņu nolaišanas pa griezumam kaklā. Jāizvēlas vietējs vistu sagādes avots, kas atrodas iespējami tuvu laboratorijai, lai vistu galvas no kautuves varētu nogādāt laboratorijā tik ātri, ka tiktu ierobežota to bojāšanās un/vai bakteriālā kontaminācija. Laiks no vistu galvu ņemšanas līdz acu ievietošanai superfūzijas kamerā [*superfusion chamber*] pēc enukleācijas ir iespējami jāsamazina (parasti tam jānotiek divu stundu laikā), lai nodrošinātu testa pieņemamības kritēriju izpildi. Visām testēšanai izmantotajām acīm ir jābūt no vienas noteiktā dienā ņemtu acu grupas.

Tā kā acis tiek preparētas laboratorijā, no kautuves apkārtējās vides temperatūrā transportē veselās galvas (parasti no 18 °C līdz 25 °C) plastmasas kārbās, kurās mitrumu uztur ar izotoniskā sāls šķīdumā samitrinātām salvetēm.

ICE izmantoto acu izvēles kritēriji un skaits

Nelieto acis, kurām pēc enukleācijas ir augsts bāzlinijas fluoresceīna iekrāsošanās rādītājs (t. i., $> 0,5$) vai radzenes apduļķojuma rādītājs (t. i., $> 0,5$).

Katrā apstrādes grupā un paralēlajā pozitīvajā kontrolē testē vismaz trīs acis. Negatīvajā kontrolgrupā vai šķīdinātāja kontrolē (ja izmanto šķīdinātāju, kas nav sāls šķīdums) ir jābūt vismaz vienai acij.

Ja cieta ķīmikālija tiek atzīta par GHS neklasificējamu, ieteicams trīs acis testēt vēlreiz, lai negatīvo rezultātu apstiprinātu vai atmestu.

PROCEDŪRA

Acu sagatavošana

Uzmanīgi noņem plakstiņus, nesabojājot radzeni. Radzenes integritāti ātri novērtē, uz dažām sekundēm tās virsmai uzpilot 2 % (masas) nātrija fluoresceīnu, ko pēc tam noskalo ar izotonisku sāls šķīdumu. Pēc tam ar fluoresceīnu apstrādātas acis pārbauda ar spraugas lampas mikroskopu, lai pārliecinātos, ka radzene nav bojāta (t. i., ja fluoresceīna aiztures un radzenes duļķošanās rādītāji ir $\leq 0,5$).

Ja acs nav bojāta, to uzmanīgi, nebojājot radzeni, izpreparē no galvaskausa. Acābolu izvelk no dobuma, mirkšķināšanas membrānu stingri pieturot ar ķirurģiskajām knaiblēm, un acs muskuļus pārgriež ar liektām šķērēm ar noapaļotiem galiem. Svarīgi ir nepieļaut radzenes bojājumus pārmērīga spiediena dēļ (t. i., saspiešanas artefaktus).

Aci izņemot no dobuma, pie tās atstāj redzamu daļu redzes nerva. Pēc izņemšanas no dobuma aci novieto uz absorbējoša paliktņa un nogriež mirkšķināšanas membrānu un citus saistaudus.

superfūzijas aparāta kamerā (18). Skavas superfūzijas aparāta kamerā jānovieto tā, lai pilnīgi visa radzene tiktu apstrādāta ar izotonisko sāls šķīdumu (3–4 pilieni minūtē vai 0,1 līdz 0,15 ml/min). Superfūzijas aparāta kameru temperatūrai jābūt $32 \pm 1,5$ °C. Tipisku mitrināšanas aparāta (ko var iegādāties vai izgatavot) un acu stiprinājuma skavu shēmu sk. 3. papildinājumā. Aparātu var pārveidot atbilstoši konkrētās laboratorijas vajadzībām (piemēram, atšķirīgam acu skaitam).

Pēc ievietošanas superfūzijas aparātā acis vēlreiz apskata ar spraugas lampas mikroskopu, lai pārliecinātos, ka preparēšanas procedūrā tās nav bojātas. Šajā brīdī ar spraugas lampas mikroskopa dziļuma mērīšanas ierīci izmēra radzenes biezumu radzenes virsotnē. Jānomaina acis ar (i) fluoresceīna aiztures rādītāju $> 0,5$, (ii) radzenes apduļķojumu $> 0,5$ vai (iii) jebkādam citam bojājumu pazīmēm. No tām acīm, kas netiek izbrāķētas neviena šī kritērija dēļ, izbrāķē tās, kuru radzenes biezums par vairāk nekā 10 % atšķiras no visu acu radzenes vidējā biezuma rādītāja. Lietotājiem jāņem vērā, ka, izmantojot spraugas lampas mikroskopu, ar dažādu spraugas platumu var iegūt atšķirīgus radzenes biezuma mērījumus. Spraugas platums jāiestata 0,095 mm.

Kad visas acis ir pārbaudītas un atzītas par derīgām, acis apmēram 45 līdz 60 min inkubē, lai pirms devas ievadīšanas tās līdzsvarotu ar testēšanas sistēmu. Pēc līdzsvarošanas reģistrē radzenes biezuma un apduļķošanās reģistrē nulles punkta mērījumu, ko izmanto par bāzliniju (t. i., laiks = 0). Šim testēšanas beigupunktam par bāzlinijas mērījumu izmanto fluoresceīna aiztures rādītāju, kas noteikts acs preparēšanas laikā.

Testējamās ķīmikālijas ievadīšana

Tūlīt pēc nulles punkta mērījumiem (turētājā ievietotu) aci izņem no superfūzijas aparāta, novieto horizontāli un uz radzenes aplicē testējamo ķīmikāliju.

Testējamās ķīmikālijas, kas ir šķidrumi, parasti testē neatšķaidītas, taču tās var atšķaidīt, ja tas tiek uzskatīts par vajadzīgu (piem., tas paredzēts pētījuma plānā). Testējamo ķīmikāliju atšķaidīšanai ieteicams izmantot fizioloģisko šķidrumu. Kontrolētos apstākļos var izmantot arī citus šķīdinātājus, taču, izņemot fizioloģisko šķidrumu, citu šķīdinātāju piemērotība ir uzskatāmi jāparāda.

Testējamās ķīmikālijas, kas ir šķidrumi, uz radzenes aplicē tā, lai visa radzenes virsma tiktu vienmērīgi noklāta ar testējamo ķīmikāliju; standarta tilpums ir 0,03 ml.

Cietas testējamās ķīmikālijas iespējami sīki jāsasmalcina piestā vai līdzīgā smalcināšanas ierīcē. Pulveri uz radzenes aplicē tā, lai virsmu vienmērīgi pārklātu ar testējamo ķīmikāliju; standarta daudzums ir 0,03 g.

Testējamo ķīmikāliju (šķidrumu vai cietvielu) aplicē uz 10 sekundēm un pēc tam noskalo no acs ar izotonisku istabas temperatūras sāls šķidrumu (apmēram 20 ml). Pēc tam aci (ievietotu turētājā) atkal ievieto superfūzijas aparātā sākotnējā vertikālajā stāvoklī. Ja nepieciešams, pēc 10 sekunžu aplicēšanas un laukpunktos pēc tās var veikt papildu skalošanu (piem., atklājot testējamās ķīmikālijas atliekas uz radzenes). Parasti papildu skalošanai izmantotā sāls šķidruma daudzumam nav būtiskas nozīmes, svarīgi ir, vai ir novērojama ķīmikālijas pielipšana pie radzenes.

Kontroles ķīmikālijas

Katrā eksperimentā iekļauj paralēlas negatīvās vai šķīdinātāja/nesēja kontroles un pozitīvās kontroles.

Testējot šķidrumus 100 % koncentrācijā vai cietvielas, ICE testēšanas metodē par paralēlu negatīvo kontroli izmanto fizioloģisko šķidrumu, lai konstatētu neraksturīgas izmaiņas testēšanas sistēmā un pārlicinātos, ka kairinājuma atbildreakcija nerodas testa apstākļu dēļ.

Testējot atšķaidītus šķidrumus, testēšanas metodē iekļauj paralēlu šķīdinātāja/nesēja kontrolgrupu, lai konstatētu neraksturīgas izmaiņas testēšanas sistēmā un pārlicinātos, ka kairinājuma atbildreakcija nerodas testa apstākļu dēļ. Kā noteikts 31. punktā, drīkst izmantot tikai tādu šķīdinātāju/nesēju, par kuru ir pierādīts, ka tam nav nelabvēlīgas ietekmes uz testēšanas sistēmu.

Katrā eksperimentā kā paralēlu pozitīvo kontroli iekļauj zināmu acu kairinātāju, lai pārlicinātos, ka tiek inducēta atbilstoša atbildreakcija. Tā kā šajā testēšanas metodē ICE tests tiek izmantots nopietnu acu bojājumu vai nopietnu kairinājumu izraisītāju identificēšanai, pozitīvajai kontrolei jābūt standartķīmikālijai, kas šajā testēšanas metodē izraisa spēcīgu atbildreakciju. Tomēr, lai varētu novērtēt pozitīvās kontroles atbildreakcijas mainību laikā, kairinājuma atbildreakcijas intensitāte nedrīkstētu būt pārlietu liela. Par pozitīvo kontroli jāiegūst pietiekami daudz *in vitro* datu, lai pozitīvajai kontrolei varētu aprēķināt statistiski noteiktu pieņemamo vērtību intervālu. Ja par konkrētu pozitīvo kontroli nav pieejams pietiekams daudzums vēsturisko ICE testēšanas metodes datu, iespējams, jāveic pētījumi, lai šo informāciju iegūtu.

Pozitīvās kontroles piemēri testējamajām ķīmikālijām, kas ir šķidrumi, ir 10 % etiķskābe vai 5 % benzalkonija hlorīds, bet cietajām testējamajām ķīmikālijām — nātrija hidroksīds vai imidazols.

Etalonķīmikālijas palīdz novērtēt nezināmas konkrētas ķīmikāliju vai produktu kategorijas ķīmikālijas spēju izraisīt acu kairinājumu vai novērtēt acu kairinātāja salīdzinošo spēju izraisīt noteiktas intensitātes kairinājuma atbildreakciju.

Mērāmie beigupunkti

Apstrādātās radzenes novērtē pirms aplicēšanas un 30, 75, 120, 180 un 240 min (± 5 min) pēc skalošanas, kas veikta pēc apstrādes. Ar šiem laikiem pietiek, lai četru stundu ilgajā apstrādes periodā veiktu pietiekamu skaitu mērījumu un starp mērījumiem būtu pietiekami ilgs laiks vajadzīgo novērojumu veikšanai visām acīm.

Novērtē šādus parametrus: radzenes apduļķojums, pietūkums, fluoresceīna aizture un morfoloģiskās izmaiņas (piem., epitēlija bedrainums vai atslābšana). Katrā no iepriekš minētajiem laikiem nosaka visus beigupunktus, izņemot fluoresceīna aizturi (ko nosaka tikai pirms aplicēšanas un 30 min pēc ekspozīcijas testējamajai ķīmikālijai).

Radzenes apduļķojumu, fluoresceīna aizturi, morfoloģiskās izmaiņas un histopatoloģiskos novērojumus, ja tādi tiek izdarīti, ieteicams dokumentēt fotogrāfijās.

Pēc pēdējās apskates četru stundu perioda beigās ieteicams acis saglabāt piemērotā fiksatīvā (piem., neitrālā buferētā formalīnā) iespējamai histopatoloģiskai izmeklēšanai (sīkāku informāciju sk. 14. punktā un (8)).

Radzenes pietūkumu nosaka no radzenes biezuma mērījumiem ar spraugas lampas mikroskopa optisko pahimetru. To izsaka procentos un aprēķina pēc radzenes biezuma mērījumiem saskaņā ar šādu formulu:

$$\left(\frac{\text{corneal thickness at time } t - \text{corneal thickness at time } = 0}{\text{corneal thickness at time } = 0} \right) \times 100$$

Visiem novērojumu laikiem aprēķina visu testa acu radzeņu vidējo pietūkumu procentos. Pamatojoties uz jebkurā laukumā novēroto augstāko vidējo radzenes pietūkuma rādītāju, katrai testējamajai ķīmikālijai piešķir kopējo kategorijas vērtējumu (sk. 51. punktu).

Radzenes apduļķojumu izvērtē, novērtējot to radzenes daļu, kas ir visapduļķotākā, kā redzams 1. tabulā. Aprēķina visu testa acu vidējo radzenes apduļķojumu visos novērojumu laukumos. Pamatojoties uz jebkurā laukumā novēroto augstāko vidējo radzenes apduļķojuma rādītāju, katrai testējamajai ķīmikālijai piešķir kopējo kategorijas vērtējumu (sk. 51. punktu).

1. tabula

Radzenes apduļķojuma rādītājs

Vērtējums	Piezīmes
0	Apduļķojuma nav
0,5	Ļoti vājš apduļķojums
1	Izkaisītas vai difūzas zonas, labi redzamas varavīksnenes daļas
2	Labi izšķirama caurspīdīgā daļa, varavīksnenes daļas redzamas nedaudz neskaidri
3	Izteikts radzenes apduļķojums, varavīksnenes daļas nav redzamas, acs zīlītes izmērs tikko saskatāms
4	Pilnīgs radzenes apduļķojums, varavīksnene nav saskatāma

Fluoresceīna aizturi izvērtē tikai 30 min novērošanas laikpunktā, kā redzams 2. tabulā. Pēc tam aprēķina visu testa acu vidējo fluoresceīna aiztures vērtību 30 min novērošanas laikpunktā un to izmanto, lai katrai testējamai ķimikālijai piešķirtu kopējo kategorijas vērtējumu (sk. 51. punktu).

2. tabula.

Fluoresceīna aiztures rādītājs

Vērtējums	Novērojums
0	Fluoresceīna aiztures nav
0,5	Ļoti neliela atsevišķu šūnu iekrāsošanās
1	Neregulāra atsevišķu šūnu iekrāsošanās visā apstrādātajā radzenes daļā
2	Koncentrēta vai konfluēta blīva atsevišķu šūnu iekrāsošanās
3	Lielas, konfluētas radzenes daļas iekrāsošanās ar fluoresceīnu

Morfoloģisko izmaiņu veidi ir radzenes epitēlija šūnu “bedrošanās” [pitting], epitēlija “atslābšana” [loosening], radzenes virsmas “sarepēšana” [roughening] un testējamās ķimikālijas “pielipšana” [sticking] pie radzenes. Šo bojājumu smaguma pakāpe var atšķirties, un vairākas šīs pazīmes var konstatēt vienlaicīgi. Atkarībā no testēšanas veicēja interpretācijas šo bojājumu klasifikācija ir subjektīva.

DATI UN PĀRSKATA SNIEGŠANA**Datu izvērtēšana**

Radzenes apduļķošanās, pietūkuma un fluoresceīna aiztures rezultāti jānovērtē atsevišķi, lai katram beigupunktam iegūtu ICE klasi. Pēc tam attiecīgās testējamās ķimikālijas izraisītā kairinājuma klasifikācijas noskaidrošanai visiem beigupunktiem noteiktās ICE klases apvieno.

Lēmuma pieņemšanas kritēriji

Pēc visu beigupunktu novērtēšanas var piešķirt ICE klases, pamatojoties uz iepriekš noteiktiem rādītāju vērtību intervāliem. Radzenes pietūkumu (3. tabula), apduļķošanos (4. tabula) un fluoresceīna aizturi (5. tabula) atbilstoši četrām ICE klasēm interpretē šādi: Ir svarīgi piebilst, ka 3. tabulā norādītos radzenes pietūkuma rādītājus izmanto tikai tad, ja biezums ir mērīts ar spraugas lampas mikroskopu (piem., ar Haag-Streit BP900), izmantojot dziļuma mērīšanas ierīci Nr. 1 un spraugas platuma iestatījuma vērtību 9½, kas ir 0,095 mm. Lietotājiem jāņem vērā, ka, izmantojot spraugas lampas mikroskopu, ar dažādu spraugas platumu var iegūt atšķirīgus radzenes biezuma mērījumus.

3. tabula

ICE radzenes pietūkuma klasifikācijas kritēriji

Vidējais radzenes pietūkums (%) (*)	ICE klase
no 0 līdz 5	I
> 5 līdz 12	II

Vidējais radzenes pietūkums (%) (*)	ICE klase
> 12 līdz 18 (> 75 min pēc apstrādes)	II
> 12 līdz 18 ($\leq$ 75 min pēc apstrādes)	III
> 18 līdz 26	III
> 26 līdz 32 (> 75 min pēc apstrādes)	III
> 26 līdz 32 ($\leq$ 75 min pēc apstrādes)	IV
> 32	IV

(*) Augstākais novērotais vidējais rādītājs jebkurā laikpunktā.

4. tabula

ICE klasifikācijas kritēriji duļķošanās novērtēšanai

Maksimālais vidējais apduļķošanās rādītājs (*)	ICE klase
0,0-0,5	I
0,6-1,5	II
1,6-2,5	III
2,6-4,0	IV

(*) Augstākais novērotais vidējais rādītājs jebkurā laikpunktā (atbilstoši 1. tabulā noteiktajiem duļķošanās vērtējumiem).

5. tabula

ICE klasifikācijas kritēriji fluoresceīna aiztures vidējā rādītāja novērtēšanai

Fluoresceīna aiztures vidējais rādītājs 30 min pēc apstrādes (*)	ICE klase
0,0-0,5	I
0,6-1,5	II
1,6-2,5	III
2,6-3,0	IV

(*) Atbilstoši 2. tabulā noteiktajiem vērtējumiem.

Testējamās ķīmikālijas *in vitro* klasifikāciju nosaka pēc GHS klasifikācijas, kas atbilst radzenes pietūkuma, radzenes apduļķošanās un fluoresceīna aiztures rādītāju kategoriju kombinācijai, kā aprakstīts 6. tabulā.

6. tabula

Kopējās in vitro klasifikācijas

ANO GHS klasifikācija	3 beigupunktu kombinācijas
Nekategorizēta	3 x I 2 x I, 1 x II
Nav iespējams prognozēt	Citas kombinācijas
1. kategorija	3 x IV 2 x IV, 1 x III 2 x IV, 1 x II (*) 2 x IV, 1 x I (*) Radzenes apduļķošanās 30 min laikā ≥ 3 (vismaz 2 acīm) Radzenes apduļķošanās kādā laikā = 4 (vismaz 2 acīm) Ievērojama epitēlija atslābšana (vismaz 1 acij)
(*) Mazāk varbūtīgas kombinācijas.	

Pētījuma pieņemamības kritēriji

Testu uzskata par pieņemamu, ja paralēlās negatīvās vai nesēja/šķīdinātāja kontroles un paralēlās pozitīvās kontroles tiek attiecīgi identificētas kā GHS neklasificējamās un GHS 1. kategorijas ķīmikālijas.

Testēšanas pārskats

Ja tā attiecas uz pētījuma norisi, testēšanas pārskatā jāiekļauj šāda informācija:

Testējamās un kontroles ķīmikālijas

- ķīmiskais(-ie) nosaukums(-i), piem., *Chemical Abstracts Service (CAS)* izmantotais nosaukums un citi nosaukumi, ja tādi ir zināmi;
- CAS reģistra numurs, ja tas ir zināms;
- testējamās/kontroles ķīmikālijas tīrība un sastāvs (masas procentos), ciktāl šī informācija ir pieejama;
- fizikālķīmiskās īpašības, kas attiecas uz pētījuma norisi, piem., fizikālais stāvoklis, gaistamība, pH, stabilitāte, ķīmiskā klase, šķīdība ūdenī;
- testējamo/kontroles ķīmikāliju sagatavošana pirms testēšanas, ja tāda veikta (piem., sildīšana, smalcināšana);
- stabilitāte, ja zināma.

Informācija par sponzoru un testējošo iestādi

- sponsora, testējošās iestādes, pētījuma vadītāja vārds/nosaukums un adrese;
- norāde par acu ņemšanas vietu (t. i., iestāde, kur tās ņemtas).

Testēšanas metodes apstākļi

- izmantotās testa sistēmas apraksts;

- izmantotais sprauga lampas mikroskops (piem., modelis) un izmantotā spraugas lampas mikroskopa instrumentu iestatījumi;
- norāde uz vēsturisko negatīvo un pozitīvo kontroļu rezultātiem un vēsturiskie dati, kas apliecina pieņemamus paralēlo etalonkontroļu diapazonus, ja tādi ir pieejami;
- procedūra, ko izmanto, lai nodrošinātu testēšanas metodes integritāti (t. i., pareizību un ticamību) laikā (piem., periodiska standartķīmikāliju testēšana).

Acu ņemšana un sagatavošana

- donordzīvnieka vecums un svars un citas specifiskas to dzīvnieku raksturīpašības, no kuriem acis ņemtas (piem., dzimums, celms);
- acu glabāšanas un transportēšanas apstākļi (piem., acu ņemšanas datums un laiks, laiks no vistu galvu ņemšanas līdz enukleēto acu ievietošanai superfūzijas kamerā);
- acu sagatavošana un novietošana, ieskaitot ziņas par to kvalitāti, acu kameru temperatūru un testēšanai izmantoto acu atlases kritērijiem.

Testa procedūra

- izmantoto replikātu skaits;
- izmantoto negatīvo un pozitīvo kontroļu (attiecīgā gadījumā arī šķīdinātāja kontroļu un etalonkontroļu) identitāte;
- testējamās ķīmikālijas deva, aplicēšana un ekspozīcijas laiks;
- novērošanas laikapunkti (pirms un pēc apstrādes);
- izmantoto izvērtēšanas un lēmuma pieņemšanas kritēriju apraksts;
- izmantoto pētījuma pieņemamības kritēriju apraksts;
- testa procedūras modifikāciju apraksts, ja tādas bijušas.

Rezultāti

- tabula ar radzenes pietūkuma, apduļķojuma un fluoresceīna aiztures rādītājiem par katru aci atsevišķi un katrā novērojumu laikapunktā, tostarp katras testa acs vidējie rādītāji katrā novērojumu laikā;
- augstākie novērotie vidējie radzenes pietūkuma, apduļķojuma un fluoresceīna aiztures rādītāji (no jebkura laikapunkta) un to attiecīgā ICE klase;
- jebkādas citas novērotās ietekmes apraksts;
- iegūtā *in vitro* GHS klasifikācija;
- attiecīgos gadījumos acs fotogrāfijas.

Rezultātu iztirzājums

Secinājumi

LITERATŪRAS SARAKSTS

- (1) 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. Pieejams: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmer.htm]
- (2) 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. Pieejams: [<http://ecvam.jrc.it/index.htm>].

- (3) ICCVAM (2010). ICCVAM Test Method Evaluation Report – Current Status of *in vitro* Test Methods for Identifying Mild/Moderate Ocular Irritants: The Isolated Chicken Eye (ICE) Test Method. 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.: 10-7553A. Pieejams: [<http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/MildMod-TMER.htm>]
 - (4) United Nations (UN) (2011). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Fourth revised edition, UN New York and Geneva, 2011. Pieejams: [http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev04/04files_e.html]
 - (5) Streamlined Summary Document Supporting OECD Test Guideline 438 on the Isolated Chicken Eye for Eye Irritation/Corrosion. Series on Testing and Assessment no. 188 (Part 1 and Part 2), OECD, Paris.
 - (6) Šā pielikuma B.5. nodaļa “Akūts acu kairinājums/korozija”.
 - (7) Scott L, Eskes C, Hoffman S, Adriaens E, Alepee N, Bufo M, Clothier R, Facchini D, Faller C, Guest R, Hamernik K, Harbell J, Hartung T, Kamp H, Le Varlet B, Meloni M, Mcnamee P, Osborn R, Pape W, Pfannenbecker U, Prinsen M, Seaman C, Spielmann H, Stokes W, Trouba K, Vassallo M, Van den Berghe C, Van Goethem F, Vinardell P, Zuang V (2010). A proposed Eye Irritation Testing Strategy to Reduce and Replace *in vivo* Studies Using Bottom-up and Top-down Approaches. *Toxicology In Vitro* 24, 1-9.
 - (8) OECD (2011) Guidance Document on “The Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) and Isolated Chicken Eye (ICE) Test Methods: Collection of Tissues for Histological Evaluation and Collection of Data on Non-Severe Irritants”. Series on Testing and Assessment no. 160, OECD, Paris.
 - (9) ICCVAM. (2006). Background review document: 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. Pieejams: [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) DB-ALM (INVITTOX) (2009). Protocol 80: Chicken enucleated eye test (CEET) / Isolated Chicken Eye Test, 13pp. Pieejams: [<http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/>].
 - (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) Prinsen, M.K. (2006). The Draize Eye Test and *in vitro* alternatives; a left-handed marriage? *Toxicology in Vitro* 20,78-81.
 - (16) 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. Pieejams: [<http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/pdf/isolation2007.pdf>].
 - (17) 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.
 - (18) Burton, A.B.G., M. York and R.S. Lawrence (1981). The *in vitro* assessment of severe irritants. *Fd. Cosmet.-Toxicol.* 19, 471-480.
-

1. papildinājums

DEFINĪCIJAS

Pareizība: pakāpe, kādā ar testēšanas metodi iegūto mērījumu rezultāti sakrīt ar pieņemtajām atsauces vērtībām. Tas ir testēšanas metodes veikspējas raksturlielums un viens no tās “relevantuma” aspektiem. Šo terminu bieži izmanto ar nozīmi “konkordantums”, ar to domājot testēšanas metodes pareizo rezultātu īpatsvaru.

Etalonķimikālija: ķimikālija, ko izmanto par standartu salīdzināšanā ar testējamo ķimikāliju. Etalonķimikālijai jāpiemīt šādām īpašībām: (i) pastāvīgs(-i) un uzticams(-i) ieguves avots(-i); (ii) struktūras un funkciju līdzība ar testējamo ķimikāliju klasi, (iii) zināmas fizikālās/ķīmiskās īpašības; (iv) papildu dati par zināmajiem ietekmes veidiem un (v) zināma potence vēlamās atbildreakcijas diapazonā.

Augšupēja pieeja: pakāpeniska pieeja, ko izmanto ķimikālijai, par kuru ir aizdomas, ka tā nav jāklasificē kā acu kairinājuma vai nopietna acu bojājuma izraisītāja, un kas sākas ar to ķimikāliju nošķiršanu, kuras nav jāklasificē (negatīvs rezultāts), no citām ķimikālijām (pozitīvs rezultāts).

Ķimikālija: viela vai maisījums.

Radzene: acābola priekšējā caurspīdīgā daļa, kas pārklāj varavīksneni un zīlīti un ielaiž acī gaismu.

Radzenes apduļķojums: izmērītā radzenes apduļķošanās pakāpe pēc ekspozīcijas testējamajai ķimikālijai. Radzenes apduļķojuma palielināšanās liecina par radzenes bojājumiem.

Radzenes pietūkums: objektīvs ICE testa mērījums, kas norāda, kādā mērā radzene pēc ekspozīcijas testējamajai ķimikālijai ir pietūkusi. To izsaka procentos un aprēķina pēc radzenes bāzlīnijas (pirms devas ievadīšanas) biezuma mērījumiem un biezuma, kas ICE testā regulāros intervālos reģistrēts pēc ekspozīcijas testējamajai ķimikālijai. Radzenes pietūkuma pakāpe ir radzenes bojājumu indikators.

Acu kairinājums: izmaiņas acī, kas rodas pēc testējamās ķimikālijas aplicēšanas uz acābola priekšējās virsmas un kas 21 dienas laikā pēc aplicēšanas ir pilnīgi atgriezeniskas. Nozīmē to pašu, ko “atgriezeniska ietekme uz acīm” un “ANO GHS 2. kategorijā” (4).

Pseudonegatīvu rezultātu īpatsvars: tas, cik liela daļa no visām pozitīvajām ķimikālijām ar testēšanas metodi aplami iznāk negatīvas. Tas ir viens no testēšanas metodes veikspējas rādītājiem.

Pseudopozitīvu rezultātu īpatsvars: tas, cik liela daļa no visām negatīvajām ķimikālijām ar testēšanas metodi aplami iznāk pozitīvas. Tas ir viens no testēšanas metodes veikspējas rādītājiem.

Fluoresceīna aizture: subjektīvs ICE testa rādītājs, kas norāda, kādā mērā radzenes epitēlija šūnas pēc ekspozīcijas testējamajai vielai aiztur nātrija fluoresceīnu. Fluoresceīna aiztures pakāpe ir radzenes epitēlija bojājumu indikators.

Bīstamība: īpašība, kas raksturo tādu aģentu vai situāciju, kurai piemīt potenciāls atstāt nelabvēlīgu ietekmi uz šim aģentam eksponētu organismu, sistēmu vai (apakš)populāciju.

Neatgriezeniska ietekme uz acīm: sk. “Nopietni acu bojājumi” un “ANO GHS 1. kategorija”.

Maisījums: maisījums vai šķīdums, kas sastāv no divām vai vairāk vielām, kuras tajā savstarpēji nereaģē (4).

Negatīvā kontrole: neapstrādāts replikāts, kurā ir visi testa sistēmas komponenti. Ar šo paraugu rīkojas tāpat, kā ar paraugiem, kas apstrādāti ar testējamo ķimikāliju, un citiem kontrolparaugiem, lai noteiktu, vai šķīdinātājs mijiedarbojas ar testa sistēmu.

Neklasificētas ķīmikālijas: vielas, kuras nav klasificētas kā acu kairinājumu (ANO GHS 2. kategorija) vai nopietnu acu bojājumu (ANO GHS 1. kategorija) izraisītājas. Nozīmē to pašu, ko “ANO GHS nekategorizētas ķīmikālijas”.

Pozitīvā kontrole: replikāts, kurā ir visi testa sistēmas komponenti un kurš apstrādāts ar ķīmikāliju, par ko ir zināms, ka tā izraisa pozitīvu atbildreakciju. Lai būtu iespēja novērtēt pozitīvās kontroles atbildreakcijas mainību laikā, spēcīgās atbildreakcijas intensitāte nedrīkstētu būt pārlietu liela.

Ticamība: parametrs, kas izsaka, kādā pakāpē tajā pašā vai citā laboratorijā ilgākā laikā, izmantojot to pašu protokolu, var iegūt reproducējamus rezultātus. To novērtē, aprēķinot metodes reproducējamību tajā pašā laboratorijā un dažādās laboratorijās un atkārtojamību tajā pašā laboratorijā.

Atgriezeniska ietekme uz acīm: sk. “Acu kairinājums” un “ANO GHS 2. kategorija”.

Nopietni acu bojājumi: acs audu bojājums vai nopietna fiziska redzes pasliktināšanās, kas rodas pēc testējamās ķīmikālijas aplicēšanas uz acs priekšējās virsmas un kas 21 dienas laikā pēc aplicēšanas nav pilnīgi atgriezeniska. Nozīmē to pašu, ko “neatgriezeniska ietekme uz acīm” un “ANO GHS 1. kategorija” (4).

Spraugas lampas mikroskops: instruments, ko izmanto acs tiešai apskatīšanai binokulārā mikroskopa palielinājumā un kas rada stereoskopisku, vertikālu attēlu. ICE testēšanas metodē šo instrumentu izmanto, lai apskatītu vistas acs priekšējās struktūras, kā arī objektīvi izmēritu radzenes biezumu ar dziļuma mērīšanai paredzētu palīgierīci.

Šķīdinātāja/nesēja kontrole: neapstrādāts paraugs, kurā ir visi testa sistēmas komponenti, tostarp šķīdinātājs vai nesējs, ko izmanto ar testējamo ķīmikāliju apstrādātajos paraugos un citos kontrolparaugos, un kuru izmanto, lai noteiktu bāzlinijas atbildreakciju paraugiem, kas apstrādāti ar attiecīgajā šķīdinātājā vai nesējā izšķīdinātu testējamo ķīmikāliju. Ja testā izmanto arī paralēlu negatīvo kontroli, šis paraugs parāda arī to, vai šķīdinātājs vai nesējs mijiedarbojas ar testa sistēmu.

Vielā: dabiski radušies vai ražošanas procesā iegūti ķīmiskie elementi un to savienojumi, ieskaitot produkta stabilizācijai vajadzīgās piedevas, kā arī izmantotajos procesos radušos piejaukumus, bet izņemot šķīdinātājus, kurus var atdalīt, neietekmējot vielas stabilitāti un neizmainot tās sastāvu (4).

Virsmaktīva viela: saukta arī par virsmaktīvu aģentu, ir viela, piem., deterģents, kas var samazināt šķidruma virsmas spraigumu un tādējādi ļauj tam putot vai penetrēt cietvielās; to dēvē arī par mitrinātāju.

Lejupēja pieeja: pakāpeniska pieeja, ko izmanto ķīmikālijai, par kuru ir aizdomas, ka tā izraisa nopietnus acu bojājumus, un kas sākas ar to ķīmikāliju nošķiršanu, kuras inducē nopietnus acu bojājumus (pozitīvs rezultāts), no citām ķīmikālijām (negatīvs rezultāts).

Testējamā ķīmikālija: jebkura viela vai maisījums, ko testē ar šo testēšanas metodi.

Daudzpakāpju testēšanas stratēģija: pakāpeniskas testēšanas stratēģija, kurā noteiktā secībā pārskata visu esošo informāciju par testējamo ķīmikāliju, katrā pakāpē izmantojot pierādījumu izsvēršanu, lai pirms pārejas uz nākamo pakāpi noteiktu, vai ir pieejams pietiekami daudz informācijas, lai pieņemtu lēmumu par bīstamības klasifikāciju. Ja testējamās ķīmikālijas kairinājuma izraisīšanas potenciālu var noteikt, pamatojoties uz esošo informāciju, papildu testēšana nav jāveic. Ja, pamatojoties uz esošo informāciju, testējamās ķīmikālijas kairinājuma izraisīšanas potenciālu noteikt nevar, ievēro pakāpenisku secīgu procedūru testēšanai ar dzīvniekiem, līdz var viennozīmīgi pieņemt lēmumu par klasifikāciju.

Apvienoto Nāciju Organizācijas Ķīmikāliju klasificēšanas un marķēšanas globāli harmonizētā sistēma (ANO GHS): sistēma, kurā ķīmikālijas (vielas un maisījumus) klasificē pēc standartizētiem fizisko apdraudējumu, veselības apdraudējumu un vidisko apdraudējumu tipiem un līmeņiem un kura paredz atbilstošus saziņas elementus, piem., piktogrammas, signālvārdus, bīstamības apzīmējumus, drošības prasību apzīmējumus un drošības datu lapas, ar mērķi sniegt informāciju par ķīmikāliju nelabvēlīgo ietekmi, lai aizsargātu cilvēkus (tostarp darba devējus, darba ņēmējus, transporta darbiniekus, patērētājus un avārijas dienestu darbiniekus) un vidi (4).

ANO GHS 1. kategorija: sk. “Nopietni acu bojājumi” un/vai “Neatgriezeniska ietekme uz acīm”.

ANO GHS 2. kategorija: sk. “Acu kairinājums” un/vai “Atgriezeniska ietekme uz acīm”.

ANO GHS neklasificēta ķīmikālija: vielas, kuras neatbilst kritērijiem klasificēšanai ANO GHS 1. vai 2. (2.A vai 2.B) kategorijā. Nozīmē to pašu, ko “neklasificēta ķīmikālija”.

Validēta testēšanas metode: testēšanas metode, kuras relevantums (ieskaitot pareizību) un ticamība attiecībā uz lietošanu konkrētā nolūkā ir pārbaudīta validācijas pētījumos. Jāievēro, ka validētas testēšanas metodes veikspēja pareizības un ticamības ziņā var nebūt pietiekama, lai to izmantotu paredzētajam nolūkam.

Pierādījumu izsvērsana: process, kurā izsver dažādu informācijas elementu stiprās un vājās puses, cenšoties izdarīt un pamatot secinājumu par testējamās ķīmikālijas bīstamības potenciālu.

2. papildinājums

ICE TESTĒŠANAS METODES STANDARTĶĪMIKĀLIJAS

Pirms šai testēšanas metodei atbilstīgas testēšanas metodes regulāras izmantošanas laboratorijas uzskatāmi apliecina savu tehnisko kompetenci, pareizi nosakot klasifikāciju 1. tabulā ieteiktajām 13 vielām, kas izraisa acu apdraudējumus. Šīs ķīmikālijas ir atlasītas tā, lai tās reprezentētu acu apdraudējumu izraisīto atbildreakciju diapazonu, kura pamatā ir *in vivo* tests ar truša acīm (TG 405) un ANO GHS klasifikācijas sistēmu (t. i., ANO GHS 1., 2.A, 2.B kategorija vai nekategorizētas ķīmikālijas) (4) (6). Citi atlasē kritēriji bija ķīmikāliju pieejamība tirgū, kvalitatīvu *in vivo* atsaucē datu pieejamība un kvalitatīvu ar ICE testēšanas metodi iegūtu *in vitro* datu pieejamība. Atsaucē dati ir pieejami SSD (5) un ICCVAM papildinformācijas pārskata dokumentos par ICE testēšanas metodi (9).

1. tabula

Ķīmikālijas, kuras ieteicams izmantot, lai pierādītu tehnisko kompetenci izmantot ICE testēšanas metodi

Ķīmikālija	CAS Nr.	Ķīmiskā klase ⁽¹⁾	Agregārstāvoklis	<i>In vivo</i> klasifikācija ⁽²⁾	<i>In vitro</i> klasifikācija ⁽³⁾
Benzalkonija hlorīds (5 %)	8001-54-5	Onijsavienojums	Šķidr	1. kategorija	1. kategorija
Hlorheksidīns	55-56-1	Amīns, amidīns	Ciets	1. kategorija	1. kategorija
Dibenzoil-L-vīnskābe	2743-38-6	Karbonskābe, esters	Ciets	1. kategorija	1. kategorija
Imidazols	288-32-4	Heterociklisk	Ciets	1. kategorija	1. kategorija
Trihloretiķskābe (30 %)	76-03-9	Karbonskābe	Šķidr	1. kategorija	1. kategorija
2,6-Dihlorbenzoilhlorīds	4659-45-4	Acilhalogenīds	Šķidr	2.A kategorija	Nav iespējams prognozēt ⁽⁴⁾
Amonija nitrāts	6484-52-2	Neorganisk sāls	Ciets	2.A kategorija ⁽⁵⁾	Nav iespējams prognozēt ⁽⁴⁾
Etil-2-metilacetoacetāts	609-14-3	Ketons, esters	Šķidr	2.B kategorija	Nav iespējams prognozēt ⁽⁴⁾
Dimetilsulfoksīds	67-68-5	Organisk sēra savienojums	Šķidr	Nekategorizēta	Nekategorizēta
Glicerīns	56-81-5	Spirts	Šķidr	Nekategorizēta	Nekategorizēta (robežgadījums)

Ķīmikālija	CAS Nr.	Ķīmiskā klase ⁽¹⁾	Aggregāts- voklis	<i>In vivo</i> klasifikācija ⁽²⁾	<i>In vitro</i> klasifikācija ⁽³⁾
Metilciklopentāns	96-37-7	Ogļūdeņradis (cikliskais)	Šķidr	Nekategorizēta	Nekategorizēta
n-heksāns	110-54-3	Ogļūdeņradis (cikliskais)	Šķidr	Nekategorizēta	Nekategorizēta
Triacetīns	102-76-1	Lipīds	Šķidr	Neklasificēta	Nekategorizēta

Saīsinājumi: CAS Nr. = *Chemical Abstracts Service* reģistra numurs

⁽¹⁾ Ķīmikāliju klases katrai testējamai ķīmikālijai piešķirtas, izmantojot standarta klasifikācijas shēmu, kuras pamatā ir *National Library of Medicine Medical Subject Headings (MeSH)* klasifikācijas sistēma (pieejama <http://www.nlm.nih.gov/mesh>).

⁽²⁾ Pamatojoties uz trūša acu *in vivo* testa rezultātiem (ESAO TG 405) un izmantojot ANO GHS sistēmu ⁽⁴⁾(6).

⁽³⁾ Pamatojoties uz 6. tabulā norādītajiem ICE rezultātiem.

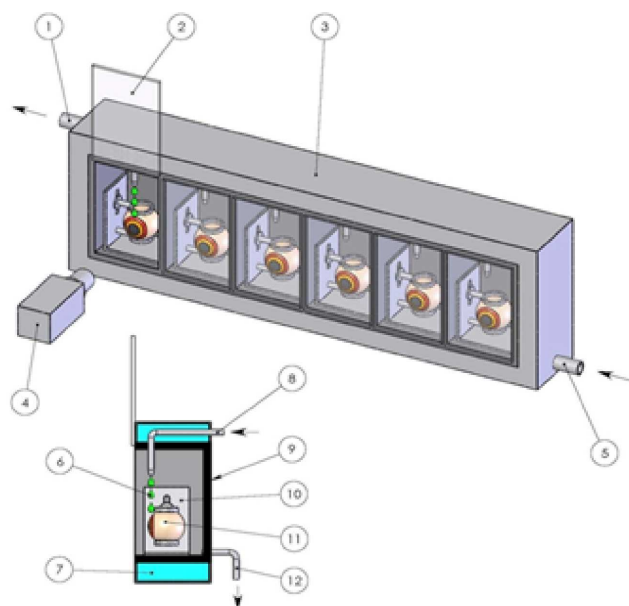
⁽⁴⁾ Apvienoti ICE rādītāji, izņemot tos, kas norādīti 6. tabulā GHS neklasificējamo ķīmikāliju kategorijas un GHS 1. kategorijas identificēšanai (sk. 6. tabulu).

⁽⁵⁾ Klasificēšana 2.A vai 2.B kategorijā ir atkarīga no tā, kā interpretē ANO GHS kritēriju, ar ko šīs divas kategorijas nošķir, t. i., lai ķīmikāliju klasificētu 2.A kategorijā, 7. dienā ietekmei jābūt novērojama 1 no 3 dzīvniekiem vai 2 no 3 dzīvniekiem. *In vivo* pētījums aptvēra 3 dzīvniekus. Visi beigupunkti, izņemot konjunktīvas apsārtumu vienam dzīvniekam, līdz 7. dienai vai ātrāk saruka līdz nullei. Vienam dzīvniekam, kurš pilnīgi neatlaba līdz 7. dienai, konjunktīvas apsārtuma rādītājs bija 1 (7. dienā), bet 10. dienā tas pilnīgi izzuda.

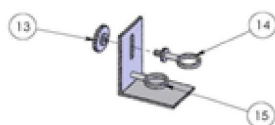
3. papildinājums

ICE SUPERFŪZIJAS APARĀTA UN ACU SKAVU SHĒMAS

(Papildu vispārējus aprakstus par superfūzijas aparātu un acu skavu sk. Burton et al. (18))



CROSS SECTION COMPARTMENT



EYE HOLDER

Detaļas Nr.	Apraksts	Detaļas Nr.	Apraksts
1	Siltā ūdens izvadkanāls	9	Nodalījums
2	Bīdāmas durvis	10	Acs turētājs
3	Superfūzijas aparāts	11	Vistas acs
4	Optiskais mērinstruments	12	Sāls šķīduma izvadkanāls
5	Siltā ūdens ievadkanāls	13	Iestatīšanas skrūve
6	Sāls šķīdums	14	Regulējams augšējais turētājs
7	Silts ūdens	15	Fiksēts apakšējais turētājs;"
8	Sāls šķīduma ievadkanāls		

14) pielikuma B daļā B.49. nodaļu aizstāj ar šādu:

“B.49. Zīdītāju Šūnu Mikrokodolu *In Vitro* Tests

IEVADS

Šī testēšanas metode ir ekvivalenta ESAO Testēšanas vadlīnijai Nr. 487 (2016). Tā ir daļa no ģenētiskās toksikoloģijas testēšanas metožu klāsta. Ir izstrādāts ESAO dokuments, kas īsi informē par testēšanu ģenētiskajā toksikoloģijā un sniedz pārskatu par neseniem šīs vadlīnijas grozījumiem.

In vitro mikrokodolu (MNvit) tests ir genotoksicitātes tests mikrokodolu (MN) detektēšanai interfāzes šūnu citoplazmā. Mikrokodoli var būt no acentriskiem hromosomu fragmentiem (t. i., tādiem, kuriem nav centromēra) vai no veselām hromosomām, kuras šūnu dalīšanās anafāzē nespēj atvirzīties uz šūnas poliem. Tādējādi MNvit tests ir *in vitro* metode, kas dod visaptverošu pamatu hromosomu bojājumu potenciāla izpētei *in vitro*, jo ļauj detektēt gan aneigēnus, gan klastogēnus (2) (3) šūnās, kurās laikā, kad tās eksponētas testējamajai ķīmikālijai, vai pēc tam ir notikusi šūnu dalīšanās (sīkāku informāciju sk. 13. punktā). Mikrokodoli reprezentē meitšūnām nodotos bojājumus, bet metafāzes šūnās uzskaitītās hromosomu aberācijas tālāk nodotas nereti netiek. Jebkurā gadījumā pārmaiņas var nebūt saderīgas ar šūnu izdzīvošanu.

Šī testēšanas metode ļauj izmantot testēšanas protokolu ar aktīva polimerizācijas inhibitoru citohalazīnu B (*cytoB*) vai bez tā. *CytoB* pievienošana pirms mitozes rada divkodolu šūnas un līdz ar to ļauj identificēt un analizēt mikrokodolus tikai tajās šūnās, kurās ir noslēgusies viena mitoze (4) (5). Turklāt, ja ir pierādījumi tam, ka analizējamā šūnu populācijā ir notikusi mitoze, šī testēšanas metode ļauj izmantot testēšanas protokolus, kuri neparedz citokinēzes bloķēšanu.

Papildus MNvit testa izmantojumam mikrokodolus inducējošu ķīmikāliju identificēšanai papildu informāciju par hromosomu bojājumu mehānismiem un mikrokodolu veidošanos var iegūt ar citiem noderīgiem paņēmieniem, piem., kinetohoru imūnķīmisko iezīmēšanu vai hibridizēšanu ar centromēru/telomēru zondēm (fluorescenta *in situ* hibridizēšana, *FISH*) (6) (7) (8) (9) (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16) (17). Tādas iezīmēšanas un hibridizēšanas procedūras var izmantot, ja konstatēta pastiprināta mikrokodolu veidošanās un pētnieks vēlas noskaidrot, vai šā pastiprinājuma izraisītāja iedaba ir klastogēniska un/vai aneigēniska.

Tā kā mikrokodolus interfāzes šūnās var novērtēt salīdzinoši objektīvi, laboratorijas personāla vienīgais uzdevums ir noteikt, kāds ir divkodolu šūnu skaits, kad ir izmantots *cytoB*, un (visos gadījumos) mikrokodolu incidenci. Tā priekšmetstiklīšus novērtēt var relatīvi ātri un analīzi var automatizēt. Tāpēc ir praktiski iespējams vienā apstrādes reizē novērtēt tūkstošiem, nevis simtiem šūnu un tādā veidā palielināt testa jaudu. Visbeidzot, tā kā mikrokodoli var izveidoties no hromosomām, kas ir aizkavējušās hromosomas, ar šo metodi potenciāli var detektēt aneiploidiju inducējošus aģentus, kurus ir sarežģīti pētīt ar parastajiem hromosomu aberācijas testiem, piem., šā pielikuma B.10. nodaļas testu (18). Tomēr šajā testēšanas metodē aprakstītais MNvit tests bez īpašiem paņēmieniem, piem., 4. punktā minētās *FISH*, neļauj tās ķīmikālijas, kuras inducē hromosomu skaita izmaiņas un/vai ploīdiju, diferencēt no tām, kuras inducē klastogēnitāti.

MNvit tests ir robusts, un to var veikt ar dažādu tipu šūnām, ar *cytoB* vai bez tā. Bagātīgs datu klāsts apstiprina MNvit testa derīgumu dažādu veidu šūnām (šūnu līniju kultūrām vai primāro šūnu kultūrām) (19) (20) (21) (22) (23) (24) (25) (26) (27) (28) (29) (30) (31) (32) (33) (34) (35) (36). Īpaši jāatzīmē starptautiskie validācijas pētījumi, kuru norisi koordinējusi Francijas Genotoksikoloģijas biedrība [*Société Française de Toxicologie Génétique*] (*SFTG*) (19) (20) (21) (22) (23), un Starptautiskā Genotoksikoloģijas darbsemināra ziņojumi (5) (17). Veicot apliecinājuma nozīmes retrospektīvu validācijas pētījumu, pieejamos datus turklāt atkārtoti izvērtējis Eiropas Komisijas (EK) izveidotais Eiropas Alternatīvo metožu validēšanas centrs (*ECVAM*), un *ECVAM* zinātniskā padome (*ESAC*) šo testēšanas metodi ir atzinusi par zinātniski derīgu (37) (38) (39).

Zīdītāju šūnu MNvit testam var izmantot cilvēka vai grauzēja izcelsmes šūnu līniju kultūras vai primāro šūnu kultūras. Testa jutīgumu ietekmē mikrokodolu fona biežums, tāpēc ieteicams izmantot šūnu tipus ar stabiliem un noteiktiem mikrokodolu veidošanās biežuma fona rādītājiem. Izmantojamās šūnas izvēlas pēc to spējas labi augt kultūrā, kariotipa stabilitātes (tostarp hromosomu skaita) un mikrokodolu spontānā biežuma (40). Šobrīd pieejamie dati neļauj sniegt stingrus ieteikumus, taču vedina domāt, ka ķīmiskā apdraudējuma izvērtēšanā ir svarīgi ņemt vērā p53 statusu, ģenētisko (kariotipa) stabilitāti, DNS reparācijas spēju un testēšanai izvēlēto šūnu izcelsmi (grauzēja vai cilvēka). Līdz ar to šīs testēšanas metodes lietotāji tiek mudināti ņemt vērā, kā šīs un citas šūnu īpatnības ietekmē šūnu līnijas veiktspēju mikrokodolu indukcijas detektēšanā, ņemot vērā zināšanu attīstību šajā jomā.

Izmantotās definīcijas ir sniegtas 1. papildinājumā.

SĀKOTNĒJIE APSVĒRUMI UN IEROBEŽOJUMI

Ja vien šūnas attiecībā uz testējamām ķīmikālijām nav metaboliski kompetentas, *in vitro* testos parasti jāizmanto eksogēns metaboliskās aktivācijas avots. Eksogēnā metaboliskās aktivācijas sistēma *in vivo* apstākļus atdarina nepilnīgi. Jāievēro piesardzība, lai izvairītos no apstākļiem, kas varētu radīt artefaktiski pozitīvus rezultātus, kuri neatspoguļo testējamo ķīmikāliju genotoksicitāti. Tādi apstākļi ietver pH vai osmolalitātes izmaiņas (41) (42) (43), mijiedarbību ar šūnu barotni (44) (45) vai pārmērīgus citotoksicitātes līmeņus (sk. 29. punktu).

Lai varētu analizēt mikrokodolu inducēšanos, ir izšķirīgi svarīgi, lai apstrādātajās un neapstrādātajās kultūrās būtu notikusi mitoze. Visnoderīgāk mikrokodolus uzskaitīt ir tad, kad šūnās laikā, kad tās apstrādā ar testējamo ķīmikāliju, vai pēc tam ir noslēdzies viens mitozes cikls. Attiecībā uz ražotiem nanomateriāliem šo testēšanas metodi var būt nepieciešams īpaši pielāgot, bet šajā testēšanas metodē tas nav aprakstīts.

Pirms šīs testēšanas metodes izmantošanas maisījumam, lai iegūtu datus kādam normatīvajam mērķim, jāapsver, vai un kādēļ tā varētu sniegt minētajam mērķim piemērotus rezultātus. Ja pastāv normatīva prasība maisījumu testēt, tāda apsvēršana nav vajadzīga.

TESTA PRINCIPS

Uz cilvēka vai citu zīdītāju izcelsmes šūnu kultūrām iedarbojas ar testējamo ķīmikāliju, izmantojot eksogēnu metaboliskās aktivācijas avotu un arī bez tā, ja vien nelieto šūnas ar adekvātu metabolisko kapacitāti (sk. 19. punktu).

Laikā, kad šūnas tiek eksponētas testējamajai ķīmikālijai vai pēc tam šūnas audzē pietiekami ilgi, lai hromosomu bojājumi vai cita ietekme uz šūnu ciklu / šūnu dalīšanos varētu izpausties kā mikrokodolu rašanās interfāzes šūnās. Lai inducētos aneiploīdija, parasti mitozei jānotiek testējamās ķīmikālijas klātbūtnē. Savāktās un iekrāsotās interfāzes šūnas analizē uz mikrokodolu klātbūtni. Ideālā gadījumā mikrokodoli jāuzskaita tikai tajās šūnās, kurās mitoze noslēgusies laikā, kad šūnas eksponētas testējamajai ķīmikālijai, vai pēc apstrādes perioda, ja tāds ir. Ar citokinēzes bloķētāju apstrādātās kultūrās to ir vienkārši panākt, uzskaitot tikai divkodolu šūnas. Ja nav pieejams citokinēzes bloķētājs, ir svarīgi pierādīt, ka analizētajās šūnās, visticamāk, ir notikusi šūnu dalīšanās, pamatojoties uz šūnu populācijas pieaugumu laikā, kad tās eksponētas testējamajai ķīmikālijai vai pēc tam. Visu protokolu gadījumā ir svarīgi pierādīt, ka šūnu savairošanās ir notikusi gan kontroles, gan apstrādātajā kultūrā; visās kultūrās, kurās uzskaita mikrokodolus, jānovērtē testējamās ķīmikālijas inducētās citotoksicitātes vai citostāzes pakāpe.

METODES APRAKSTS

Šūnas

Iespējams izmantot kultivētus primāros cilvēku vai citu zīdītāju perifērisko asiņu limfocītus (7) (20) (46) (47) un vairākas grauzēju šūnu līnijas, piemēram, CHO, V79, CHL/IU un L5178Y šūnas vai cilvēka šūnu līnijas, piemēram, TK6 (19) (20) (21) (22) (23) (26) (27) (28) (29) (31) (33) (34) (35) (36) (sk. 6. punktu). Mikro kodolu testēšanā ir izmantotas arī citas šūnu līnijas, piem., HT29 (48), Caco-2 (49), HepaRG (50) (51), HepG2 šūnas (52) (53), A549 un Sīrijas kāmjā embrija primārās šūnas (54), taču tās vēl nav plaši validētas. Tādēļ, ja izmanto kādu no šīm šūnu līnijām un tiem, tas jāpamato ar uzskatāmi parādītu veiktspēju testā, kā aprakstīts sadaļā par pieņemamības kritērijiem. Ir ziņots, ka *cytoB* potenciāli ietekmē L5178Y šūnu augšanu, tādēļ to izmantot ar šo šūnu līniju nav ieteicams (23). Ja izmanto primārās šūnas, dzīvnieku labturības apsvērumu dēļ jāapsver cilvēka izcelsmes šūnu izmantošana, ja tā iespējama, un tās jāparaugo saskaņā ar attiecīgajiem ētikas principiem un noteikumiem.

Cilvēka perifērisko asiņu limfocīti jāiegūst no jauniem (aptuveni 18–35 gadus veciem) nesmēķētājiem, kuriem nav zināmu slimību vai kuri pēdējā laikā nav tikuši eksponēti genotoksiskiem faktoriem (piem., ķīmikālijām, jonizējošajam starojumam) tādā apmērā, kas palielinātu mikro kodolus saturošu šūnu fona incidenci. Tas nodrošinātu, ka mikro kodolus saturošu šūnu fona incidence ir zema un nemainīga. Palielinoties vecumam, mikro kodolus saturošu šūnu bāzlīnijas līmenis palielinās, un sievietēm šī tendence novērojama izteiktāk nekā vīriešiem (55). Ja izmanto šūnas no vairāk nekā viena donora, jānorāda donoru skaits. Jāpierāda, ka šūnas no laika, kad sāka apstrāde ar testējamo ķīmikāliju, līdz šūnu paraugošānai ir dalījušās. Šūnu kultūras uztur šūnu eksponenciālas augšanas fāzē (šūnu līnijas) vai stimulē dalīties (limfocītu primārās kultūras), lai šūnas eksponētu dažādos šūnas cikla posmos, jo konkrētu šūnas attīstības posmu jutība pret testējamo ķīmikāliju var nebūt zināma. Primārās šūnas, kuras dalīšanas nolūkos jāstimulē ar mitogēnām vielām, parasti vairs nesinhronizē, kamēr tās eksponē testējamai ķīmikālijai (piem., cilvēka limfocīti pēc 48 stundu mitogēnās stimulācijas). Kamēr norit apstrāde ar testējamo ķīmikāliju, izmantot sinhronizētas šūnas nav ieteicams, taču tas var būt pieņemami, ja tiek pamatots.

Barotne un kultivēšanas apstākļi

Kultūru uzturēšanai lieto piemērotas barotnes un ievēro atbilstošus kultivēšanas apstākļus (kultivēšanas trauki, mitrināta atmosfēra ar 5 % CO₂ koncentrāciju, ja nepieciešams, 37 °C temperatūra). Šūnu līnijām regulāri jāpārbauda modālā hromosomu skaita stabilitāte un jāpārlicinās, ka nav notikusi kontaminācija ar mikoplazmu, un šūnas nedrīkst izmantot, ja konstatē kontamināciju vai ja modālais hromosomu skaits ir mainījies. Jānosaka, kāds ir testēšanas laboratorijā izmantoto šūnu līniju vai primāro kultūru normālais šūnas cikla ilgums, un tam jāsakrīt ar publicētajiem šūnu raksturlielumiem.

Kultūru sagatavošana

Šūnu līnijas: šūnas pavairo no pamatkultūrām, ko barotnē uzsēj tādā blīvumā, lai kultūras suspensijās vai monoslānī eksponenciāli augtu līdz šūnu savākšanai (piem., jāizvairās no monoslānī augošu šūnu konfluences).

Limfocīti: nesadalītas asinis, kas apstrādātas ar antikoagulantu (piem., heparīnu), vai tikai limfocītus kultivē (piem., 48 stundas cilvēka limfocītu gadījumā) mitogēna klātbūtnē (piem., cilvēka limfocītu gadījumā — fitohemaglutinīna (PHA) klātbūtnē), lai pirms šūnu eksponēšanas testējamai ķīmikālijai un *cytoB* inducētu to dalīšanos.

Metaboliskā aktivācija

Ja izmanto šūnas ar nepietiekamu endogēno metabolisko kapacitāti, jālieto eksogēnas metabolizācijas sistēmas. Visplašāk izmantotā sistēma, kuru iesaka izmantot pēc noklusējuma, ja vien nav pamata izmantot citu, ir ar kofaktoru papildināta postmitohondriālā frakcija (S9) no graužēju (parasti žurku) aknām, kas apstrādātas ar fermentus inducējošām vielām, piem., Aroclor 1254 (56) (57) vai fenobarbitālu kombinācijā ar b-naftoflavonu (58) (59) (60). Pēdējā minētā kombinācija nav pretrunā ar Stokholmas Konvenciju par noturīgajiem organiskajiem piesārņotājiem (30) un jauktas funkcijas oksidāžu inducēšanā izrādījusies tikpat efektīva kā Aroclor 1254 (24) (25) (26) (28). S9 frakciju parasti izmanto koncentrācijā 1–2 % (tilp./tilp.), bet galīgajā testa barotnē to var palielināt līdz 10 % (tilp./tilp.). Apstrādes laikā jāizvairās no tādu produktu izmantošanas, kas samazina mitotisko indeksu, jo īpaši kalcija kompleksveidošanas produktiem (62). Eksogēnās metaboliskās aktivācijas sistēmas vai metaboliskā inducētāja veida un koncentrācijas izvēli var ietekmēt testējamo ķīmikāliju klase.

Testējamās ķīmikālijas sagatavošana

Cietas testējamās ķīmikālijas jāgatavo atbilstošos šķīdinātājos un, ja vajadzīgs, pirms šūnu apstrādes jāatšķaida. Šķidrās testējamās ķīmikālijas var testa sistēmai pievienot tieši un/vai pirms testa sistēmas apstrādes atšķaidīt. Gāzveida vai gaistošas testējamās ķīmikālijas jātestē ar attiecīgām standarta protokolu modifikācijām, piem., apstrādi veicot hermētiski noslēgtos traukos (63) (64) (65). Testējamās ķīmikālijas preparāti jāgatavo tieši pirms apstrādes, ja vien dati par stabilitāti neliecina, ka tos var uzglabāt.

Testēšanas apstākļi

Šķīdinātāji

Šķīdinātājs jāizvēlas tā, lai optimizētu testējamās ķīmikālijas šķīdību, šķīdinātājam neatstājot negatīvu ietekmi uz testa norisi — nemainot šūnu augšanu, neietekmējot testējamās ķīmikālijas integritāti, nereaģējot ar kultivēšanas traukiem, nepasliktinot metabolisko aktivāciju utt. Kad vien iespējams, vispirms jāapsver, vai neizmanto šķīdinātāju (vai barotni) uz ūdens bāzes. Plaši atzīti šķīdinātāji ir ūdens vai dimetilsulfoksīds (DMSO). Parasti organiskajiem šķīdinātājiem nevajadzētu pārsniegt 1 % (tilp./tilp.). Ja *cytoB* izšķīdina DMSO, testējamai ķīmikālijai un *cytoB* izmantotais kopējais organiskā šķīdinātāja daudzums nedrīkst pārsniegt 1 % (tilp./tilp.); pretējā gadījumā jāizmanto neapstrādātas kontroles, lai nodrošinātu, ka organiskā šķīdinātāja īpatsvaram nav negatīvas ietekmes. Šķīdinātājiem uz ūdens (vai sālsūdens) bāzes nevajadzētu pārsniegt 10 % (tilp./tilp.) galīgajā apstrādes barotnē. Ja tiek izmantoti ne tik plaši atzīti šķīdinātāji (piem., etanols vai acetons), to izmantošana jāpamato ar datiem, kas apliecina to saderību ar testējamo ķīmikāliju, izmantoto testa sistēmu un ģenētiskās toksicitātes neesību izmantotajā koncentrācijā. Ja to apliecināšu datu nav, ir svarīgi izmantot neapstrādātas kontroles (sk. 1. papildinājumu), kā arī šķīdinātāja kontroles, lai parādītu, ka izvēlētais šķīdinātājs nerada nekādu kaitīgu ietekmi un neietekmē hromosomas (piem., izraisot aneiploidiju vai klastogenitāti).

CytoB kā citokinēzes bloķētāja lietošana

Viens no svarīgākajiem apsvērumiem MNvit testa veikspējas aspektā ir tas, lai vērtēto šūnu mitoze būtu pilnīgi noritējusi apstrādes laikā vai pēcapstrādes inkubēšanas laikā, ja tāds ir. Mikro kodolu uzskaitē jāveic tikai tajās šūnās, kurās mitoze ir noritējusi apstrādes laikā vai pēc tās. *CytoB* ir aģents, kas par citokinēzes bloķētāju izmantots visplašāk, jo tas inhibē aktīva veidošanos un tādējādi neļauj meitšūnām pēc mitozes atdalīties; tā rodas divkodolu šūnas (6) (66) (67). Izmantojot *cytoB*, vienlaikus var mērīt testējamās ķimikālijas ietekmi uz šūnu savairošanās kinētiku. *CytoB* ieteicams izmantot par citokinēzes bloķētāju, ja izmanto cilvēka limfocītus, jo šūnu cikla ilgumi dažādiem donoriem atšķiras un ne visi limfocīti reaģē uz stimulāciju ar PHA. *CytoB* nav obligāti izmantot citu veidu šūnām, ja ir iespējams noteikt, ka ir notikusi to dalīšanās, kā aprakstīts 27. punktā. Turklāt *cytoB* parasti neizmanto, kad paraugi attiecībā uz mikro kodolu klātbūtni tiek izvērtēti, izmantojot plūsmas citometriju.

Laboratorijā katram šūnu veidam jānosaka atbilstošā *cytoB* koncentrācija, lai šķīdinātāja kontrolkultūrās panāktu divkodolu šūnu optimālo biežumu, un jāparāda, ka tā nodrošina labu divkodolu šūnu daudzumu vērtēšanai. Piemērotas *cytoB* koncentrācijas parasti ir starp 3 un 6 µg/ml (19).

Šūnu savairošanās un citotoksicitātes mērīšana un apstrādes koncentrācijas izvēle

Nosakot augstāko testējamās ķimikālijas koncentrāciju, neizvēlas koncentrācijas, kas spēj radīt artefaktiski pozitīvas atbildreakcijas, piemēram, tādas koncentrācijas, kas izraisa pārmērīgu citotoksicitāti (sk. 29. punktu), nogulsnes barotnē (sk. 30. punktu) vai manāmi izmaina pH vai osmolalitāti (sk. 9. punktu). Ja testējamā ķimikālija pievienošanas brīdī manāmi izmaina barotnes pH, pH var koriģēt, galīgajā apstrādes barotnē pievienojot buferšķīdumu, lai izvairītos no artefaktiski pozitīviem rezultātiem un saglabātu pienācīgus kultivēšanas apstākļus.

Mēra šūnu savairošanos, lai nodrošinātu, ka pietiekami daudzās apstrādātajās šūnās testēšanas laikā ir beigusies mitoze un ka apstrāde tiek veikta attiecīgā citotoksicitātes līmenī (sk. 29. punktu). Citotoksicitāti nosaka galvenajā eksperimentā ar metabolisma aktivāciju un bez tās, izmantojot piemērotus šūnu nāves un augšanas rādītājus (sk. 26. un 27. punktu). Kaut arī citotoksicitātes izvērtēšana sākotnējā iepriekš veiktā testā var būt lietderīga, lai sekmīgāk noteiktu galvenajā eksperimentā izmantojamās koncentrācijas, sākotnējais tests nav jāveic obligāti. Ja to veic, tas nedrīkst aizstāt citotoksicitātes mērījumu galvenajā eksperimentā.

Kultūru apstrāde ar *cytoB* un vienkodola, divkodolu un daudzkodolu šūnu relatīvā biežuma noteikšana kultūrā ir laba metode, kā kvantitatīvi noteikt ietekmi uz šūnu savairošanos un apstrādes citotoksisko vai citostatisko darbību (6), un nodrošina, ka mikroskopiski novērtētas tiek tikai šūnas, kas dalījušās apstrādes laikā vai pēc tās. Lai aplēstu apstrādes citotoksisko un citostatisko darbību, salīdzinot apstrādāto kultūru un kontrolkultūru vērtības, ieteicams izmantot proliferācijas indeksu pēc citokinēzes blokādes (*cytokinesis-block proliferation index* — CBPI) (6) (27) (68) vai replīcēšanās indeksu (RI), kas noteikts vismaz 500 katras kultūras šūnām (sk. formulas 2. papildinājumā). Citu citotoksicitātes rādītāju (piem., šūnu integritātes, apoptozes, nekrozes, metafāzē esošu šūnu skaita, šūnas cikla) novērtēšana varētu sniegt lietderīgu informāciju, taču tos nedrīkst izmantot CBPI vai RI vietā.

Pētījumos bez *cytoB* ir jāpierāda, ka šūnas kultūrā ir dalījušās, lai būtiska novērtēto šūnu daļa būtu dalījušās apstrādes laikā vai pēc apstrādes ar testējamo ķīmikāliju, citādi var iegūt pseidonegatīvus rezultātus. Lai aplēstu apstrādes citotoksicitāti un citostatisko darbību, ieteicams izmērīt populācijas relatīvo dubultošanos (RPD) vai šūnu skaita relatīvo pieaugumu (RICC) (17) (68) (69) (70) (71) (sk. formulas 2. papildinājumā). Pagarinātos paraugšanas laikos (piem., apstrādājot 1,5–2 normālus šūnas ciklus ilgi un šūnas ievācot pēc vēl 1,5–2 normāliem šūnas cikliem, kā rezultātā paraugšanas laiki kopumā pārsniedz 3–4 normālos šūnas ciklus, kā aprakstīts 38. un 39. punktā) RPD var citotoksicitāti novērtēt pārāk zemu. Tādos apstākļos piemērotāks rādītājs varētu būt RICC vai noderīgu aplēsi sniegtu citotoksicitātes izvērtēšana pēc 1,5–2 normāliem šūnas cikliem. Citu citotoksicitātes vai citostāzes marķieru (piem., šūnu integritāte, apoptoze, nekroze, metafāzē esošu šūnu skaits, proliferācijas indekss (PI), šūnas cikls, nukleoplazmatiskie tilti [*nucleoplasmic bridges*] vai kodolu pumpuri [*nuclear buds*]) novērtēšana varētu sniegt lietderīgu papildinformāciju, taču tos nedrīkst izmantot RPD vai RICC vietā.

Jāizvērtē vismaz trīs testējamās koncentrācijas (neietverot šķīdinātāju un pozitīvās kontroles), kas atbilst pieņemamības kritērijiem (pienācīga citotoksicitāte, šūnu skaits u. c.). Neatkarīgi no šūnu veidiem (šūnu līnijas vai limfocītu primārās kultūras) katrā no testētajām koncentrācijām drīkst izmantot vienu vai vairākas (replikāti) apstrādātas kultūras. Kaut arī ieteicams izmantot duplikatīvas kultūras, ir pieņemami izmantot arī vienu kultūru, ja vien gan vienas kultūras, gan duplikatīvo kultūru gadījumā tiek novērtēts tāds pats kopējais šūnu skaits. Vienas kultūras izmantošana ir īpaši aktuāla, ja vērtē vairāk nekā 3 koncentrācijas (sk. 44.–45. punktu). Rezultātus, kas pie konkrētas koncentrācijas iegūti no neatkarīgām replikātkultūrām, datu analīzei var apkopot. Attiecībā uz testējamām ķīmikālijām, kas uzrāda nelielu citotoksicitāti vai nav citotoksiskas, parasti piemēroti ir koncentrācijas intervāli ar koeficientu aptuveni no 2 līdz 3. Citotoksicitātes rašanās gadījumā izvēlētajām testējamām koncentrācijām jāaptver gan tās, kuras rada citotoksicitāti, kā aprakstīts 29. punktā, gan koncentrācijas, kuras rada vidēju un nelielu citotoksicitāti vai to nerada vispār. Daudzām testējamajām ķīmikālijām ir novērojama stāva koncentrācijas–atbildreakcijas likne, un, lai iegūtu datus pie zemas un mērenas citotoksicitātes vai sīki izpētītu devas–atbildreakcijas sakarību, jāizmanto koncentrācijas ar maziem savstarpējiem atstatumiem un/vai vairāk nekā trīs koncentrācijas (vienu kultūra vai replikāti), jo īpaši situācijās, kad eksperiments ir jāatkārto (sk. 60. punktu).

Ja maksimālā koncentrācija ir balstīta uz citotoksicitāti, ar augstāko koncentrāciju jācenšas panākt 55 ± 5 % citotoksicitāti, izmantojot ieteiktos citotoksicitātes parametrus (t. i., RICC un RPD samazinājumu šūnu līnijām, kad *cytoB* netiek izmantots, un CBPI vai RI samazinājumu, ja *cytoB* tiek izmantots, līdz 45 ± 5 % no paralēlās negatīvās kontroles) (72). Interpretējot pozitīvos rezultātus, kas atrodami vienīgi šā 55 ± 5 % citotoksicitātes diapazona augšgalā, jāievēro piesardzība (71).

Mazšķīstošām testējamām ķīmikālijām, kuras nav citotoksiskas pie koncentrācijām, kas zemākas par zemāko piesātināta šķīduma koncentrāciju, pie augstākās analizētās koncentrācijas pēc apstrādes ar testējamo ķīmikāliju jārodas ar neapbruņotu aci vai ar invertēto mikroskopu redzamai duļķainībai vai nogulsnēm. Pat ja iegūtā citotoksicitāte novērojama pie koncentrācijas, ka augstāka par zemāko piesātināta šķīduma koncentrāciju, ieteicams testēt tikai vienu koncentrāciju, kas rada acīm redzamu duļķainību vai nogulsnes, jo nogulsnes var artefaktiski ietekmēt rezultātus. Pie koncentrācijas, kas rada nogulsnes, īpaši jācenšas nodrošināt, lai nogulsnes netraucētu testa norisi (piem., iekrāsošanu vai novērtēšanu). Pirms eksperimenta var būt lietderīgi noteikt šķīdību barotnē.

Ja netiek novērotas nogulsnes vai ierobežojoša citotoksicitāte, visaugstākajai testa koncentrācijai jāatbilst 10 mM, 2 mg/ml vai 2 µl/ml atkarībā no tā, kura ir zemāka (73) (74) (75). Ja testējamajai ķīmikālijai nav noteikta sastāva, piem., tā ir viela, kuras sastāvs nav zināms vai ir mainīgs, kura ir kompleksi reakcijas produkti vai bioloģisks materiāls (UVCB) (76), no vides ekstrahēts produkts u. c., lai palielinātu katra komponenta koncentrāciju, visaugstākajai koncentrācijai, iespējams, vajadzēs būt vēl lielākai (piem., 5 mg/ml), ja nav pietiekamas citotoksicitātes. Tomēr jāpiebilst, ka attiecībā uz cilvēku zālēm šīs prasības var būt citādas (93).

Kontroles

Paralēlas negatīvās kontroles (sk. 21. punktu) — šķīdinātāju apstrādes barotnē — iekļauj par katru šūnu ievākšanas reizi, un ar tām rīkojas tieši tāpat kā ar apstrādes kultūrām.

Paralēlas pozitīvās kontroles ir nepieciešamas, lai pierādītu laboratorijas spēju identificēt klastogēnus izmantotā testa protokola apstākļos un attiecīgā gadījumā eksogēnās metaboliskās aktivācijas sistēmas efektivitāti. Pozitīvo kontroļu piemēri ir sniegti tālāk 1. tabulā. Pamatotos gadījumos var izmantot alternatīvas pozitīvās kontroles ķīmikālijas.

Patlaban nav zināms neviens aneigēns, kam vajadzīga metaboliska aktivācija, lai tas kļūtu genotoksiski aktīvs (17). Tā kā zīdītāju šūnu ģenētiskās toksicitātes *in vitro* testi ir pietiekami standartizēti īstermiņa apstrādēm, kas tiek veiktas paralēli ar metabolisko aktivāciju un bez tās, izmantojot tādu pašu apstrādes ilgumu, pozitīvās kontroles var izmantot vien attiecībā uz klastogēnu, kam nepieciešama metaboliskā aktivācija. Tādā gadījumā viena klastogēniska pozitīvās kontroles atbildreakcija pierādīs gan metabolisma aktivācijas sistēmas darbību, gan testa sistēmas reaģētspēju. Taču attiecībā uz ilgtermiņa apstrādi (bez S9) jānodrošina atsevišķas pozitīvās kontroles, jo apstrādes ilgums atšķirsies no testa, kurā izmantota metaboliskā aktivācija. Ja klastogēnu izvēlas par vienīgo pozitīvo kontroli īstermiņa apstrādei ar metabolisko aktivāciju un bez tās, attiecībā uz ilgtermiņa apstrādi bez metaboliskās aktivācijas jāizvēlas aneigēns. Metaboliski kompetentām šūnām, kurām nav nepieciešams S9, izmanto gan klastogēnītātes un aneigenītātes pozitīvās kontroles.

Katra pozitīvā kontrole jāizmanto pie vienas vai vairākām koncentrācijām, ar kurām paredzēts radīt reproducējamus un detektējamus pieaugumus virs fona līmeņa, lai parādītu testa sistēmas jutību (t. i., ietekme ir skaidri redzama, taču nolasītājs nevar uzreiz atklāt kodēto priekšmetstikliņu identitāti), un atbildreakciju nedrīkst traucēt testēšanas metodē noteikto citotoksicitātes robežu pārsniegumi.

1. tabula.

Standartķīmikālijas, kuras ieteicams izmantot laboratorijas kompetences novērtēšanā un pozitīvo kontroļu atlasē

Kategorija	Ķīmikālija	CAS Nr.
1. Klastogēni, kuriem metabolisma aktivācija nav vajadzīga		
	Metilmetānsulfonāts	66-27-3
	Mitomicīns C	50-07-7
	4-nitrohinolīn-N-oksīds	56-57-5
	Citozīnarabinozīds	147-94-4
2. Klastogēni, kam metaboliskā aktivācija ir vajadzīga		
	Benz(a)pirēns	50-32-8
	Ciklofosfamīds	50-18-0

Kategorija	Ķimikālija	CAS Nr.
3. Aneigēni		
	Kolhicīns	64-86-8
	Vinblastīns	143-67-9

PROCEDŪRA

Apstrādes kārtība

Lai palielinātu varbūtību, ka tiks detektēta aneigēna vai klastogēna darbība konkrētā šūnas cikla posmā, ir svarīgi ar testējamo ķimikāliju apstrādāt pietiekamu skaitu šūnu, kas reprezentē visus šūnas cikla posmus. Visām apstrādēm jā sākas un jābeidzas laikā, kad šūnas aug eksponenciāli, un šūnu augšanai jāturpinās līdz pat paraugošanas brīdim. Tādējādi šūnu līniju un primāro šūnu kultūru apstrādes grafiki var mazliet atšķirties no to limfocītu apstrādes grafika, jo limfocītu šūnas cikla ierosināšanai jāveic mitogēnā stimulācija (17). Attiecībā uz limfocītiem visefektīvākā pieeja ir apstrādi ar testējamo ķimikāliju sākt 44–48 stundas pēc stimulēšanas ar PHA, kad šūnas dalās asinhroni (6).

Publicētie dati (19) norāda, ka lielākā daļa aneigēnu un klastogēnu tiks detektēti 3–6 stundu īstermiņa periodā gan S9 klātbūtnē, gan bez tā, kam seko testējamās ķimikālijas noņemšana un paraugošana laikā, kas atbilst aptuveni 1,5–2,0 normāliem šūnas cikliem pēc apstrādes sākuma (7).

Tomēr, lai veiktu pilnīgu izvērtēšanu, kas būtu vajadzīga, lai secinātu, ka rezultāts ir negatīvs, jāizpilda visi trīs turpmāk norādītie eksperimentālie nosacījumi, veicot īstermiņa apstrādi gan ar metabolisko aktivāciju, gan bez tās un ilgtermiņa apstrādi bez metaboliskās aktivācijas (sk. 56., 57. un 58. punktu):

- šūnas 3–6 stundas eksponē testējamai ķimikālijai bez metaboliskās aktivācijas, un paraugšanu veic tad, kad kopš apstrādes sākuma apritējuši aptuveni 1,5–2,0 normāli šūnas cikli (19),
- šūnas 3–6 stundas eksponē testējamai ķimikālijai ar metabolisko aktivāciju, un paraugšanu veic tad, kad kopš apstrādes sākuma apritējuši aptuveni 1,5–2,0 normāli šūnas cikli (19),
- šūnas nepārtraukti eksponē bez metaboliskās aktivācijas līdz paraugšanai, ko veic tad, kad apritējuši aptuveni 1,5–2,0 normāli šūnas cikli.

Gadījumos, kad kāds no iepriekš norādītajiem eksperimentālajiem nosacījumiem rada pozitīvu atbildreakciju, nav vajadzības veikt pētījumus ar pārējiem apstrādes režīmiem.

Ja ir zināms vai ir aizdomas par to, ka testējamā ķimikālija ietekmē šūnas cikla garumu (piem., ja testē nukleozīdu analogus), jo īpaši attiecībā uz p53 kompetentām šūnām (35) (36) (77), paraugošanas vai rekuperācijas laikus var pagarināt par vēl 1,5–2,0 normāliem šūnas cikliem (t. i., kopumā 3,0–4,0 šūnas cikliem pēc īstermiņa un ilgtermiņa apstrāžu sākuma). Tas attiecas uz situācijām, kurās var būt bažas par iespējamo mijiedarbību starp testējamo ķimikāliju un *cytoB*. Izmantojot pagarinātus paraugošanas laikus (t. i., kopumā 3,0–4,0 šūnas ciklu laikus), jā rūpējas, lai šūnas joprojām aktīvi dalītos. Piemēram, limfocītu eksponenciālā augšana 96 stundas pēc stimulācijas var samazināties un šūnu monoslāņu kultūras var kļūt konfluentes.

Ieteiktās šūnu apstrādes kārtības kopsavilkums ir sniegts 2. tabulā. Šo vispārīgo apstrādes kārtību var modificēt (tas jāpamato) atkarībā no testējamās ķīmikālijas stabilitātes vai reaģētspējas vai no izmantoto šūnu augšanas īpatnībām.

2. tabula

Šūnu apstrādes un ievākšanas laiks MNvit testā

Limfocīti, primārās šūnas un šūnu līnijas <i>arctoB</i>	+ S9 Īsā apstrāde	3–6 stundas apstrādā S9 klātbūtnē; aizvāc S9 un apstrādes barotni; pievieno svaigu barotni un <i>cytoB</i> ; šūnas ievāc 1,5–2,0 normālos šūnas ciklus pēc apstrādes sākuma.
	– S9 Īsā apstrāde	Apstrādā 3–6 stundas; aizvāc apstrādes barotni; pievieno svaigu barotni un <i>cytoB</i> ; šūnas ievāc 1,5–2,0 normālos šūnas ciklus pēc apstrādes sākuma.
	– S9 Pagarināta apstrāde	1,5–2 normālus šūnas ciklus ilgi šūnas apstrādā <i>cytoB</i> klātbūtnē; šūnas ievāc apstrādes perioda beigās.

Šūnu līnijas, ko apstrādā bez *cytoB*

(Apstrāde identiska iepriekš aprakstītajai, taču bez *cytoB* pievienošanas.)

Monoslāņa kultūrās 3–6 stundu apstrādes beigās var būt mitotiskās šūnas (ko var atpazīt pēc tā, ka tās ir apaļas un atdalās no virsmas). Tā kā mitotiskās šūnas viegli atdalās, tās var tikt nejauši aizvāktas kopā ar testējamo ķīmikāliju saturošo barotni. Ja konstatē mitotisko šūnu skaita būtisku pieaugumu salīdzinājumā ar kontrolēm, kas norāda uz ticamu mitozes apstāji, šīs šūnas centrifugējot jāsavāc un jāievieto atpakaļ kultūrās, lai izvairītos no mitozes fāzes un mikrokodolus saturošu / hromosomu aberācijas riska šūnu zuduma ievākšanas laikā.

Šūnu ievākšana un priekšmetstikliņu sagatavošana

Šūnas no katras kultūras savāc un apstrādā atsevišķi. Šūnu preparātu sagatavošana var ietvert hipotonisku apstrādi, bet tā nav nepieciešama, ja pietiekamu šūnu izklājumu panāk citā veidā. Var izmantot dažādus priekšmetstikliņu sagatavošanas paņēmienus, ja vien vērtēšanas vajadzībām tiek iegūti augstas kvalitātes šūnu preparāti. Lai būtu iespējams detektēt mikrokodolus un (ja izmanto citokinēzes blokādi) droši identificēt divkodolu šūnas, jāpatur šūnas ar neskartu šūnas membrānu un neskartu citoplazmu.

Priekšmetstikliņus iekrāsot var ar dažādām metodēm, piem., Gimzas krāsvielu vai fluorescentām DNS specifiskām krāsvielām. Lietojot atbilstošas fluorescentas krāsvielas (piem., akridīnoranžo (78) vai *Hoechst 33258* ar pironīnu Y (79)), iespējams izvairīties no daļas artefaktu, kas saistīti ar DNS nespecifisku krāsvielu izmantošanu. Ja vajadzīga informācija par to veidošanās mehāniku, mikrokodolu saturu var identificēt ar antikinetohoru antivielu metodi, *FISH* ar pancentromēriskām DNS zondēm vai *in situ* iezīmēšanu ar pancentromērspecifiskiem praimeriem kombinācijā ar DNS iekrāsošanu ar kontrasta krāsvielu (veselas hromosomas tiek iekrāsotas, bet acentriski hromosomu fragmenti iekrāsoti netiek) (16) (17). Ja ir pierādīta to efektivitāte un tās ir validētas, var izmantot citas klastogēnu un aneigēnu diferenciācijas metodes. Piemēram, attiecībā uz atsevišķām šūnu līnijām noderīgu informāciju varētu sniegt arī sub-2N kodolu kā hipodiploīdu pārmaiņu mērījumi ar tādiem paņēmieniem paņēmieni kā attēlu analīze, lāzerskenēšanas citometrija vai plūsmas citometrija (80) (81) (82). Arī morfoloģiski kodolu novērojumi var liecināt par iespējamu aneiploīdiju. Turklāt arī metafāzes hromosomu aberāciju tests, vēlams, ar tāda paša tipa šūnām un protokolu ar salīdzināmu jutību, var būt noderīgs veids, kā noteikt, vai mikrokodoli ir radušies hromosomu pārrāvumu dēļ (zinot, ka hromosomu zudums hromosomu aberāciju testā netiktu detektēts).

Analīze

Visi priekšmetstikliņi, tostarp no šķīdinātāja un neapstrādātajām (ja tādas ir) un pozitīvajām kontrolēm, pirms mikrokodolu sastopamības mikroskopiskās analīzes neatkarīgi jākodē. Lai kontrolētu jebkādu pārvērtējumus vai novirzes, izmantojot automātisku uzskaites sistēmu, piem., plūsmas citometriju, lāzerskenēšanas citometriju vai attēlu analīzi, jāizmanto pienācīgi paņēmieni. Neatkarīgi no tā, vai mikrokodolu uzskaitē tiek vai netiek izmantota automātiskā platforma, paralēli jānovērtē *CBPI*, *RI*, *RPD* vai *RICC*.

Ar *cytoB* apstrādātās kultūrās mikrokodolu biežums jāanalizē vismaz 2000 divkodolu šūnu pie katras koncentrācijas (83), kas vienlīdzīgi sadalītas starp replikātiem, ja izmanto replikātus. Ja katrai devai izmanto tikai vienu kultūru (sk. 28. punktu), tajā jānovērtē vismaz 2000 divkodolu šūnu no vienas kultūras (83). Ja pie katras koncentrācijas novērtēšanai ir pieejamas ievērojami mazāk nekā 1 000 divkodolu šūnu no katras kultūras (duplikatīvu kultūru gadījumā) vai 2000 divkodolu šūnu (vienas kultūras gadījumā) un ja nav detektēts ievērojams mikrokodolu skaita pieaugums, testēšana jāatkārto ar lielāku daudzumu šūnu vai ar mazāk citotoksiskām koncentrācijām atkarībā no tā, kas ir piemērotāk. Jāraugās, lai nevērtētu divkodolu šūnas ar neregulāru formu vai tādas, kuru abi kodoli pēc lieluma ir ļoti nevienādi. Turklāt nedrīkst divkodolu šūnas sajaukt ar sliktā izklājumā esošām daudzkodolu šūnām. Šūnas, kas satur vairāk nekā divus galvenos kodolus, attiecībā uz mikrokodoliem nav jāanalizē, jo šajās šūnās mikrokodolu bāzlinijas biežums var būt lielāks (84). Vienkodola šūnu vērtēšana ir pieņemama tad, ja ir pierādīts, ka testējamā ķimikālija maina *cytoB* aktivitāti. Šādos gadījumos var būt lietderīgi testu atkārtot, neizmantojot *cytoB*. Papildus divkodolu šūnām vērtējot daudzkodolu šūnas, var iegūt lietderīgu informāciju (85) (86), bet tas nav jāveic obligāti.

Bez *cytoB* testētās šūnu līnijās mikrokodolus uzskaita vismaz 2000 šūnu katrā testa koncentrācijā un kontrolē (83), kas vienlīdzīgi sadalītas starp replikātiem, ja replikātus izmanto. Kad pie katras koncentrācijas tiek izmantota viena kultūra (sk. 28. punktu), šajā vienā kultūrā jāuzskaita vismaz 2000 šūnu. Ja pie katras koncentrācijas novērtēšanai ir pieejamas ievērojami mazāk nekā 1 000 šūnu katrā kultūrā (duplikatīvu kultūru gadījumā) vai 2000 šūnu (vienas kultūras gadījumā) un ja nav detektēts ievērojams mikrokodolu skaita pieaugums, testēšana jāatkārto ar lielāku daudzumu šūnu vai ar mazāk citotoksiskām koncentrācijām atkarībā no tā, kas ir piemēroti.

Ja lieto *cytoB*, jānosaka *CBPI* vai *RI*, lai novērtētu šūnu savairošanos (sk. 2. papildinājumu), izmantojot vismaz 500 šūnu no katras kultūras. Ja apstrādi veic bez *cytoB*, ir būtiski pierādīt, ka šūnas kultūrā ir dalījušās, kā aprakstīts 24.–28. punktā.

Laboratorijas kompetence

Lai pirms testa regulāras izmantošanas pierādītu, ka laboratorijai ir pietiekama pieredze ar šo testu, laboratorijai jāveic virkne eksperimentu ar pozitīvās kontroles standartķīmikālijām, kurām ir dažādi iedarbības mehānismi (vismaz vieni no tām jābūt ar metabolisko aktivāciju un vienai bez tās, un vienai ar aneigēnu iedarbības mehānismu, izraudzītām no 1. tabulā uzskaitītajām ķīmikālijām), un dažādām negatīvajām kontrolēm (tostarp neapstrādātām kultūrām un dažādiem šķīdinātājiem/nesējiem). Šo pozitīvo un negatīvo kontroļu atbildreakcijām jāatbilst literatūrai. Tas neattiecas uz laboratorijām, kurām ir pieredze, t. i., kuru rīcībā ir vēsturisko datu bāze, kas aprakstīta 49.–52. punktā.

Lai pierādītu kompetenci detektēt klastogēniskās un aneigēniskās ķīmikālijas, noteiktu metaboliskās aktivācijas sistēmas efektivitāti un pierādītu novērtēšanas procedūru (mikroskopiskās vizuālās analīzes, plūsmas citometrijas, lāzerskenēšanas citometrijas vai attēlu analīzes) piemērotību, pozitīvās kontroles ķīmikāliju izlase (sk. 1. tabulu) jāpēta ar īsām un garām apstrādēm bez metaboliskās aktivācijas un ar īsu apstrādi ar metabolisko aktivāciju. Atlasīto ķīmikāliju koncentrāciju klāsts jāizvēlas tā, lai radītu reproducējamus un ar koncentrācijām saistītus pieaugumus virs fona līmeņa un tā pierādītu testa sistēmas jutību un dinamisko diapazonu.

Dati par vēsturiskajām kontrolēm

Laboratorijā jānosaka:

- vēsturisko pozitīvo kontroļu diapazons un sadalījums,
- vēsturisko negatīvo (neapstrādāto, šķīdinātāja) kontroļu diapazons un sadalījums.

Pirmoreiz iegūstot datus par vēsturisko negatīvo kontroļu sadalījumu, paralēlajām negatīvajām kontrolēm jāatbilst publicētajiem datiem par negatīvajām kontrolēm, ja tādi ir. Kontroļu sadalījumam tiekot papildinātam ar arvien lielāku daudzumu eksperimentālo datu, paralēlajām negatīvajām kontrolēm ideālā gadījumā jābūt 95 % minētā sadalījuma kontroles robežās (87) (88). Laboratorijas vēsturisko negatīvo kontroļu datu bāze sākotnēji jāveido ar vismaz 10 eksperimentiem, bet vēlams, lai tā sastāvētu no vismaz 20 eksperimentiem, kas veikti salīdzināmos eksperimenta apstākļos. Lai noteiktu laboratorijas pozitīvo un negatīvo kontroļu datu variabilitāti un parādītu, ka laboratorijā šī metodoloģija 'tiek kontrolēta' (83), laboratorijām jāizmanto kvalitātes kontroles metodes, piem., kontroldiagrammas (piem., C diagrammas vai X joslu diagrammas (88)). Papildu ieteikumi par vēsturisko datu izveidi un izmantošanu (t. i., kritēriji datu iekļaušanai vēsturiskajos datos un izslēgšanai no tiem un konkrētā eksperimenta pieņemamības kritēriji) atrodami literatūrā (87).

Jebkādas izmaiņas eksperimenta protokolā jāapsver, ņemot vērā to atbilstību laboratorijas esošajai vēsturisko kontroļu datubāzei. Jebkādu būtisku neatbilstību gadījumā jāveido jauna vēsturisko kontroļu datubāze.

Negatīvo kontroļu datus jāietver informācija par to, cik bieži vienīgajā kultūrā vai visās replikātkultūrās kopā sastopamas šūnas ar mikrokodolēm, kā aprakstīts 28. punktā. Paralēlajām negatīvajām kontrolēm ideālā gadījumā jābūt 95 % laboratorijas vēsturisko negatīvo kontroļu datubāzes sadalījuma kontroles robežās. Ja dati no paralēlajām negatīvajām kontrolēm neietilpst 95 % kontroles robežās, tie var būt pieņemami iekļaušanai vēsturisko kontroļu sadalījumā, ja vien šie dati nav pārmērīgi anomālas vērtības un ir pierādījumi, ka testa sistēma 'tiek kontrolēta' (skatīt 37. punktu) un ka nav pieļautas tehniskas vai cilvēka kļūdas.

DATI UN PĀRSKATA SNIEGŠANA

Rezultātu izklāsts

Ja izmanto citokinēzes bloķēšanas paņēmieni, mikrokodolu inducēšanos novērtē tikai pēc tā, cik biežas ir divkodolu šūnas ar mikrokodoliem (neatkarīgi no mikrokodolu skaita šūnā). Vienu, divu vai vairāku mikrokodolus saturošo šūnu skaitu pārskatā var norādīt atsevišķi, un tas var sniegt noderīgu informāciju, bet tāda uzskaitē nav jāveic obligāti.

Jānosaka paralēlie citotoksicitātes un/vai citostāzes rādītāji visām apstrādātajām kultūrām, negatīvās un pozitīvās kontroles kultūrām (16). Ja izmanto citokinēzes bloķēšanas metodes, visām apstrādātajām un kontrolkultūrām kā šūnas cikla aizkaves rādītājs jāaprēķina CBPI vai RI. Ja *cytoB* nav, izmanto RPD vai RICC (sk. 2. papildinājumu).

Norāda datus par atsevišķām kultūrām. Turklāt visus datus apkopo tabulas veidā.

Pieņemamības kritēriji

Testa pieņemamības pamatā ir šādi kritēriji:

- paralēlā negatīvā kontrole tiek uzskatīta par pieņemamu iekļaušanai laboratorijas vēsturisko negatīvo kontroļu datubāzē, kā aprakstīts 50. punktā,
- paralēlās pozitīvās kontroles (sk. 50. punktu) inducē atbildreakcijas, kas atbilst tām, kuras ģenerētas laboratorijas vēsturisko pozitīvo kontroļu datubāzē iekļautajās kontrolēs, un izsaka statistiski ievērojamu pieaugumu salīdzinājumā ar paralēlo negatīvo kontroli,
- šķīdinātāja kontrolē ir izpildīti šūnu savairošanās kritēriji (25.–27. punkts),
- ja vien vienam no tiem nav bijis pozitīvs rezultāts, ir testēti visi eksperimentālie nosacījumi (36.–40. punkts),
- analizējams ir bijis pietiekams šūnu un koncentrāciju skaits (28. punkts un 44.–46. punkts),
- maksimālās koncentrācijas izvēles kritēriji atbilst 24.–31. punktā aprakstītajiem kritērijiem.

Rezultātu izvērtēšana un interpretēšana

Ja ir izpildīti visi pieņemamības kritēriji, testējamo ķimikāliju uzskata par viennozīmīgi pozitīvu, ja kādā no izvērtētajiem eksperimentālajiem nosacījumiem (sk. 36.–39. punktu):

- vismaz vienai no testējamām koncentrācijām salīdzinājumā ar paralēlo negatīvo kontroli novērojams statistiski nozīmīgs palielinājums (89),
- šo pieaugumu izvērtējot ar atbilstošu trenda testu, vismaz viena eksperimenta nosacījuma gadījumā ir konstatējama pieauguma sakarība ar devu (sk. 28. punktu),
- kāds no rezultātiem atrodas ārpus vēsturisko negatīvo kontroļu datu sadalījuma (piem., 95 % kontroles robežām pēc Puasona sadalījuma).

Ja visi šie kritēriji ir izpildīti, testējamo ķimikāliju uzskata par spējīgu šajā testa sistēmā inducēt hromosomas pārrāvumus un/vai rādītāja palielinājumu vai samazinājumu. Ieteikumi par piemērotākajām statistiskajām metodēm atrodami arī literatūrā (90) (91) (92).

Ja ir izpildīti visi pieņemamības kritēriji, testējamo ķīmikāliju uzskata par viennozīmīgi negatīvu, ja visos izvērtētajos eksperimentālajos nosacījumos (sk. 36.–39. punktu):

- nevienai no testējamām koncentrācijām salīdzinājumā ar paralēlo negatīvo kontroli nav novērojams statistiski nozīmīgs palielinājums,
- ar atbilstošu trenda testu nav konstatējams ar koncentrāciju saistīts palielinājums,
- visi rezultāti atrodas vēsturisko negatīvo kontroļu datu sadalījuma robežās (piem., 95 % kontroles robežās pēc Puasona sadalījuma; sk. 52. punktu).

Testējamo ķīmikāliju tad uzskata par nespējīgu šajā testa sistēmā inducēt hromosomu pārrāvumus un/vai papildinājumu vai zaudējumu. Ieteikumi par piemērotākajām statistiskajām metodēm atrodami arī literatūrā (90) (91) (92).

Nav prasības viennozīmīgi pozitīvu vai negatīvu atbildreakciju verificēt.

Ja atbildreakcija nav ne viennozīmīgi negatīva, ne viennozīmīgi pozitīva, kā aprakstīts iepriekš, un/vai lai palīdzētu noteikt rezultāta bioloģisko relevantumu, šie dati jānovērtē ekspertam un/vai jāveic sīkāka izskatīšana. Var būt lietderīgi novērtēt papildu šūnas (attiecīgā gadījumā) vai veikt atkārtotu eksperimentu, iespējams, izmantojot mainītus eksperimenta apstākļus (piem., atstatumus starp koncentrācijām, citus metaboliskās aktivācijas apstākļus (t. i., S9 koncentrāciju vai S9 izcelsmi)).

Retos gadījumos pat pēc sīkākas izskatīšanas datu kopums neļauj secināt, ka testējamā ķīmikālija rada pozitīvus vai negatīvus rezultātus, un tad uzskata, tas ir neskaidrs.

Testējamās ķīmikālijas var inducēt mikro kodolu veidošanos MNvit testā tāpēc, ka tās inducē hromosomu pārrāvumus, hromosomu zaudējumu vai abus kopā. Var veikt papildu analīzi ar antikinetohoru antivielām vai centromēriem specifiskām *in situ* zondēm vai izmantot citas metodes, lai noteiktu, vai mikro kodolu inducēšanas mehānisms ir saistīts ar klastogēnu un/vai aneigēnu aktivitāti.

Testēšanas pārskats

Testēšanas pārskatā jāiekļauj tālāk norādītā informācija.

Testējamā ķīmikālija:

- avots, sērijas numurs, izmantošanas termiņš, ja pieejams,
- pašas testējamās ķīmikālijas stabilitāte, ja tā zināma,
- testējamās ķīmikālijas spēja reaģēt ar šķīdinātāju/nesēju vai šūnu barotni,
- testējamās ķīmikālijas šķīdība un stabilitāte šķīdinātājā/nesējā, ja tā zināma,
- pH, osmolalitātes un nogulšņu mērījums barotnē, kurā testējamā ķīmikālija tika pievienota (attiecīgā gadījumā).

Vienkomponenta viela:

- fiziskais izskats, šķīdība ūdenī un citas relevantas fizikālķīmiskās īpašības,
- ķīmiskās identifikācijas dati, piem., IUPAC vai CAS nosaukums, CAS numurs, SMILES vai InChI kods, struktūrformula, tīrība, attiecīgā gadījumā, ja tas ir praktiski iespējams, piemaisījumu ķīmiskā identitāte u. c.

Daudzkomponentu viela, UVCB un maisījumi:

- ciktāl iespējams, raksturoti ar sastāvdaļu ķīmisko identitāti (sk. iepriekš), kvantitatīvo saturu un relevantajām fizikālķīmiskajām īpašībām.

Šķīdinātājs:

- šķīdinātāja izvēles pamatojums,
- šķīdinātāja īpatsvars galīgajā barotnē.

Šūnas:

- izmantoto šūnu tips un avots,
- izmantotā šūnu tipa piemērotība,
- šūnu līnijām — mikoplazmas neesība,
- šūnu līnijām — informācija par šūnu cikla garumu vai proliferācijas indekss,
- ja izmanto limfocītus — asins donoru dzimums, vecums un visa relevantā informācija par donoru, nesadalītas asinis vai atdalīti limfocīti, izmantotais mitogēns,
- normālais šūnas cikla ilgums (negatīvā kontrole),
- šūnu līnijām — ja pieejams, pasāžu skaits,
- šūnu līnijām — šūnu kultūru uzturēšanas metodes,
- šūnu līnijām — modālais hromosomu skaits.

Testēšanas apstākļi:

- ja izmanto citokinēzes bloķētāju (piem., *cytoB*), vielas identitāte, koncentrācija un šūnu ekspozīcijas ilgums,
- testējamās ķīmikālijas koncentrācija, izteikta kā galīgā koncentrācija barotnē (piem., barotnes μg vai mg/mL , vai mM),
- vielas koncentrāciju un šūnu kultūru skaita izvēles pamatojums, piem., dati par citotoksiskajām īpašībām un šķīdības robežām,
- barotnes sastāvs, attiecīgā gadījumā CO_2 koncentrācija, mitruma līmenis,
- barotnē pievienotā šķīdinātāja un testējamās ķīmikālijas koncentrācija (un/vai daudzums),
- inkubācijas temperatūra un ilgums,
- apstrādes ilgums,
- šūnu ievākšanas laiks pēc apstrādes,
- attiecīgā gadījumā šūnu blīvums uzsēšanas laikā,
- metaboliskās aktivācijas sistēmas veids un sastāvs (S9 avots, S9 maisījuma sagatavošanas metode, S9 maisījuma un S9 koncentrācija vai tilpums galīgajā barotnē, S9 kvalitātes kontroles (piem., fermenta aktivitāte, sterilitāte, metaboliskā spēja),
- pozitīvās un negatīvās kontroles ķīmikālijas, galīgās koncentrācijas, apstrādes un rekuperācijas periodu apstākļi un ilgums;
- priekšmetstikliņu sagatavošanas metodes un izmantotais šūnu iekrāsošanas paņēmieni,
- mikrokodolus saturošu šūnu novērtēšanas kritēriji (analizējamo šūnu izvēle un mikrokodolu identificēšana),
- analizēto šūnu skaits,

- citotoksicitātes mērīšanas metodes,
- jebkāda papildu informācija, kas attiecas uz citotoksicitāti un izmantoto metodi,
- kritēriji, pēc kuriem novērtē, vai pētījuma rezultāts ir pozitīvs, negatīvs vai neskaidrs,
- izmantotā(-s) statistiskās analīzes metode(-s),
- metodes, piemēram, tādas kā kinetohoru antivielas vai pancentromērspecifisko zonžu izmantošana, lai noskaidrotu, vai mikrokodoli satur veselas vai fragmentētas hromosomas (attiecīgā gadījumā).
- pH, osmolalitātes un izgulsnēšanās noteikšanai izmantotās metodes.

Rezultāti:

- analīzei pieņemamo šūnu definīcija,
- ja neizmanto *cytoB* — apstrādāto šūnu skaits un ievāktu šūnu skaits katrai kultūrai, ja tiek izmantotas šūnu līnijas,
- izmantotais citotoksicitātes rādītājs, piemēram, CBPI vai RI, ja izmanto citokinēzes bloķēšanas metodi; RICC vai RPD, ja citokinēzes bloķēšanas metodes neizmanto; citi novērojumi, ja tādi ir (piem., šūnu konfluence, apoptoze, nekroze, metafāzē esošo šūnu skaits, divkodolu šūnu biežums),
- izgulsnēšanās pazīmes un noteikšanas laiks,
- dati par apstrādes barotnes pH un osmolalitāti, ja tie noteikti,
- vienkodola, divkodolu un daudzkodolu šūnu izkliede, ja izmanto citokinēzes bloķēšanas metodi,
- par katru apstrādāto kultūru un kontrolkultūru atsevišķi norādīts to šūnu skaits, kurām ir mikrokodoli, un norāde, vai mikrokodoli ir no divkodolu vai no vienkodola šūnām (attiecīgā gadījumā),
- ja iespējams, koncentrācijas-atbildreakcijas sakarība,
- paralēlās negatīvās (šķīdinātāja) un pozitīvās kontroles dati (koncentrācijas un šķīdinātāji),
- vēsturisko negatīvo (šķīdinātāja) un pozitīvo kontroļu dati, diapazoni, vidējās vērtības un standartnovirzes, 95 % sadalījuma kontroles robežas, kā arī datu skaits,
- statistiskā analīze; p-vērtības (attiecīgā gadījumā).

Rezultātu iztirzājums.

Secinājumi.

LITERATŪRAS SARAKSTS

- (1) OECD (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, No. 234, OECD, Paris.
- (2) Kirsch-Volders, M. (1997). Towards a validation of the micronucleus test. *Mutation Research*, Vol. 392/1-2, pp. 1-4.
- (3) Parry, J.M., A. Sors (1993). The detection and assessment of the aneugenic potential of environmental chemicals: the European Community aneuploidy project. *Mutation Research*, Vol. 287/1, pp. 3-15.
- (4) Fenech, M., A.A. Morley (1985). Solutions to the kinetic problem in the micronucleus assay. *Cytobios*, Vol. 43/172-173, pp. 233-246.

- (5) Kirsch-Volders, M. *et al.* (2000). Report from the *In Vitro* Micronucleus Assay Working Group. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 35/3, pp. 167-172.
- (6) Fenech, M. (2007). Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nature Protocols*, Vol. 2/5, pp. 1084-1104.
- (7) Fenech, M., A.A. Morley (1986). Cytokinesis-block micronucleus method in human lymphocytes: effect of *in-vivo* ageing and low dose X-irradiation. *Mutation Research*, Vol. 161/2, pp. 193-198.
- (8) Eastmond, D.A., J.D. Tucker (1989). Identification of aneuploidy-inducing agents using cytokinesis-blocked human lymphocytes and an antikinetochores antibody. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 13/1, pp. 34-43.
- (9) Eastmond, D.A., D. Pinkel (1990). Detection of aneuploidy and aneuploidy-inducing agents in human lymphocytes using fluorescence *in-situ* hybridisation with chromosome-specific DNA probe. *Mutation Research*, Vol. 234/5, pp. 9-20.
- (10) Miller, B.M. *et al.* (1991). Classification of micronuclei in murine erythrocytes: immunofluorescent staining using CREST antibodies compared to *in situ* hybridization with biotinylated gamma satellite DNA. *Mutagenesis*, Vol. 6/4, pp. 297-302.
- (11) Farooqi, Z., F. Darroudi, A. T. Natarajan (1993). The use of fluorescence *in-situ* hybridisation for the detection of aneuploids in cytokinesis-blocked mouse splenocytes. *Mutagenesis*, Vol. 8/4, pp. 329-334.
- (12) Migliore, L. *et al.* (1993). Cytogenetic damage induced in human lymphocytes by four vanadium compounds and micronucleus analysis by fluorescence *in situ* hybridization with a centromeric probe. *Mutation Research*, Vol. 319/3, pp. 205-213.
- (13) Norppa, H., L. Renzi, C. Lindholm (1993). Detection of whole chromosomes in micronuclei of cytokinesis-blocked human lymphocytes by antikinetochores staining and *in situ* hybridization. *Mutagenesis*, Vol. 8/6, pp. 519-525.
- (14) Eastmond, D.A., D.S. Rupa, L.S. Hasegawa (1994). Detection of hyperdiploidy and chromosome breakage in interphase human lymphocytes following exposure to the benzene metabolite hydroquinone using multicolor fluorescence *in situ* hybridization with DNA probes. *Mutation Research*, Vol. 322/1, pp. 9-20.
- (15) Marshall, R.R. *et al.* (1996). Fluorescence *in situ* hybridisation (FISH) with chromosome-specific centromeric probes: a sensitive method to detect aneuploidy. *Mutation Research*, Vol. 372/2, pp. 233-245.
- (16) Zijno, P. *et al.* (1996). Analysis of chromosome segregation by means of fluorescence *in situ* hybridization: application to cytokinesis-blocked human lymphocytes. *Mutation Research*, Vol. 372/2, pp. 211-219.
- (17) Kirsch-Volders *et al.* (2003). Report from the *in vitro* micronucleus assay working group. *Mutation Research*, Vol. 540/2, pp. 153-163.
- (18) Ša pielikuma B.10. nodaļa "Ziditāju hromosomu aberāciju *in vitro* tests".
- (19) Lorge, E. *et al.* (2006). SFTG International collaborative Study on *in vitro* micronucleus test. I. General conditions and overall conclusions of the study. *Mutation Research*, Vol. 607/1, pp. 13-36.
- (20) Clare, G. *et al.* (2006). SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test. II. Using human lymphocytes. *Mutation Research*, Vol. 607/1, pp. 37-60.
- (21) Aardema, M.J. *et al.* (2006). SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test, III. Using CHO cells. *Mutation Research*, Vol. 607/1, pp. 61-87.
- (22) Wakata, A. *et al.* (2006). SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test, IV. Using CHO/IU cells. *Mutation Research*, Vol. 607/1, pp. 88-124.

- (23) Oliver, J. *et al.* (2006). SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test, V. Using L5178Y cells. *Mutation Research*, Vol. 607/1, pp. 125-152.
- (24) Albertini, S. *et al.* (1997). Detailed data on *in vitro* MNT and *in vitro* CA: industrial experience. *Mutation Research*, Vol. 392/1-2, pp. 187-208.
- (25) Miller, B. *et al.* (1997). Comparative evaluation of the *in vitro* micronucleus test and the *in vitro* chromosome aberration test: industrial experience. *Mutation Research*, Vol. 392/1-2, pp. 45-59.
- (26) Miller, B. *et al.* (1998). Evaluation of the *in vitro* micronucleus test as an alternative to the *in vitro* chromosomal aberration assay: position of the GUM Working Group on the *in vitro* micronucleus test. Gesellschaft für Umwelt-Mutations-forschung, *Mutation Research*, Vol. 410, pp. 81-116.
- (27) Kalweit, S. *et al.* (1999). Chemically induced micronucleus formation in V79 cells – comparison of three different test approaches. *Mutation Research*, Vol. 439/2, pp. 183-190.
- (28) Kersten, B. *et al.* (1999). The application of the micronucleus test in Chinese hamster V79 cells to detect drug-induced photogenotoxicity. *Mutation Research*, Vol. 445/1, pp. 55-71.
- (29) von der Hude, W. *et al.* (2000). *In vitro* micronucleus assay with Chinese hamster V79 cells – results of a collaborative study with *in situ* exposure to 26 chemical substances. *Mutation Research*, Vol. 468/2, pp. 137-163.
- (30) Garriott, M.L., J.B. Phelps, W.P. Hoffman (2002). A protocol for the *in vitro* micronucleus test, I. Contributions to the development of a protocol suitable for regulatory submissions from an examination of 16 chemicals with different mechanisms of action and different levels of activity. *Mutation Research*, Vol. 517/1-2, pp. 123-134.
- (31) Matsushima, T. *et al.* (1999). Validation study of the *in vitro* micronucleus test in a Chinese hamster lung cell line (CHL/IU). *Mutagenesis*, Vol. 14/6, pp. 569-580.
- (32) Elhajouji, A., E. Lorge (2006). Special Issue: SFTG International collaborative study on *in vitro* micronucleus test. *Mutation Research*, Vol. 607/1, pp. 1-152.
- (33) Kirkland, D. (2010). Evaluation of different cytotoxic and cytostatic measures for the *in vitro* micronucleus test (MNVit): Introduction to the collaborative trial. *Mutation Research*, Vol. 702/2, pp. 139-147.
- (34) Hashimoto K. *et al.* (2011). Comparison of four different treatment conditions of extended exposure in the *in vitro* micronucleus assay using TK6 lymphoblastoid cells. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, Vol. 59/1, pp. 28-36.
- (35) Honma, M., M. Hayashi (2011). Comparison of *in vitro* micronucleus and gene mutation assay results for p53-competent versus p53-deficient human lymphoblastoid cells. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 52/5, pp. 373-384.
- (36) Zhang, L.S. *et al.* (1995). A comparative study of TK6 human lymphoblastoid and L5178Y mouse lymphoma cell lines in the *in vitro* micronucleus test. *Mutation Research Letters*, Vol. 347/3-4, pp. 105-115.
- (37) ECVAM (2006). Statement by the European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM) Scientific Advisory Committee (ESAC) on the scientific validity of the *in vitro* micronucleus test as an alternative to the *in vitro* chromosome aberration assay for genotoxicity testing. ESAC 25th meeting, 16-17 November 2006, pieejams: <http://ecvam.jrc.it/index.htm>.
- (38) ESAC (2006). ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC) Peer Review, Retrospective Validation of the *In Vitro* Micronucleus Test, Summary and Conclusions of the Peer Review Panel. Pieejams: <http://ecvam.jrc.it/index.htm>.
- (39) Corvi, R. *et al.* (2008). ECVAM Retrospective Validation of *in vitro* Micronucleus Test (MNT). *Mutagenesis*, Vol. 23/4, pp. 271-283.

- (40) ILSI paper (draft). Lorge, E., M.M. Moore, J. Clements, M. O'Donovan, M. Honma, A. Kohara, J. van Benthem, S. Galloway, M.J. Armstrong, A. Sutter, V. Thybaud, B. Gollapudi, M. Aardema, J. Young-Tannir. Standardized Cell Sources and Recommendations for Good Cell Culture Practices in Genotoxicity Testing. *Mutation Research*.
- (41) Scott, D. *et al.* (1991). International Commission for Protection Against Environmental Mutagens and Carcinogens, Genotoxicity under extreme culture conditions. A report from ICPEMC Task Group 9. *Mutation Research*, Vol. 257/2, pp. 147-205.
- (42) Morita, T. *et al.* (1992). Clastogenicity of low pH to various cultured mammalian cells. *Mutation Research*, Vol. 268/2, pp. 297-305.
- (43) Brusick, D. (1986). Genotoxic effects in cultured mammalian cells produced by low pH treatment conditions and increased ion concentrations. *Environmental Mutagenesis*, Vol. 8/6, pp. 789-886.
- (44) Long, L.H. *et al.* (2007). Different cytotoxic and clastogenic effects of epigallocatechin gallate in various cell-culture media due to variable rates of its oxidation in the culture medium. *Mutation Research*, Vol. 634/1-2, pp. 177-183.
- (45) Nesslany, F. *et al.* (2008). Characterization of the Genotoxicity of Nitrilotriacetic Acid. *Environmental and Molecular Mutation.*, Vol. 49, pp. 439-452.
- (46) Fenech, M., A.A. Morley (1985). Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutation Research*, Vol. 147/1-2, pp. 29-36.
- (47) Fenech, M. (1997). The advantages and disadvantages of cytokinesis-blood micronucleus method. *Mutation Research*, Vol. 392, pp. 11-18.
- (48) Payne, C.M. *et al.* (2010). Hydrophobic bile acid-induced micronuclei formation, mitotic perturbations, and decreases in spindle checkpoint proteins: relevance to genomic instability in colon carcinogenesis. *Nutrition and Cancer*, Vol. 62/6, pp. 825-840.
- (49) Bazin, E. *et al.* (2010). Genotoxicity of a Freshwater Cyanotoxin, Cylindrospermopsin, in Two Human Cell Lines: Caco-2 and HepaRG. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 51/3, pp. 251-259.
- (50) Le Hegarat, L. *et al.* (2010). Assessment of the genotoxic potential of indirect chemical mutagens in HepaRG cells by the comet and the cytokinesis-block micronucleus assays. *Mutagenesis*, Vol. 25/6, pp. 555-560.
- (51) Josse, R. *et al.* (2012). An adaptation of the human HepaRG cells to the *in vitro* micronucleus assay. *Mutagenesis*, Vol. 27/3, pp. 295-304.
- (52) Ehrlich, V. *et al.* (2002). Fumonisin B₁ is genotoxic in human derived hepatoma (HepG2) cells. *Mutagenesis*, Vol. 17/3, pp. 257-260.
- (53) Knasmüller, S. *et al.* (2004). Use of human-derived liver cell lines for the detection of environmental and dietary genotoxins; current state of knowledge. *Toxicology*, Vol. 198/1-3, pp. 315-328.
- (54) Gibson, D.P. *et al.* (1997). Induction of micronuclei in Syrian hamster embryo cells: comparison to results in the SHE cell transformation assay for National Toxicology Program test chemicals. *Mutation Research*, Vol. 392/1-2, pp. 61-70.
- (55) Bonassi, S. *et al.* (2001). HUMAN MicroNucleus Project: international database comparison for results with the cytokinesis-block micronucleus assay in human lymphocytes, I. Effect of laboratory protocol, scoring criteria and host factors on the frequency of micronuclei. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 37/1, pp. 31-45.
- (56) Maron, D.M., B.N. Ames (1983). Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutation Research*, Vol. 113/3-4, pp. 173-215.
- (57) Ong, T.-m. *et al.* (1980). Differential effects of cytochrome P450-inducers on promutagen activation capabilities and enzymatic activities of S-9 from rat liver. *Journal of Environmental Pathology and Toxicology*, Vol. 4/1, pp. 55-65.

- (58) Elliott, B.M. *et al.* (1992). Alternatives to Aroclor 1254-induced S9 in *in-vitro* genotoxicity assays. *Mutagenesis*, Vol. 7, pp. 175-177.
- (59) Matsushima, T. *et al.* (1976). "A safe substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems", in *In Vitro Metabolic Activation in Mutagenesis Testing*, de Serres, F.J. *et al.* (eds), Elsevier, North-Holland, pp. 85-88.
- (60) Johnson, T.E., D. R. Umbenhauer, S.M. Galloway (1996). Human liver S-9 metabolic activation: proficiency in cytogenetic assays and comparison with phenobarbital/beta-naphthoflavone or Aroclor 1254 induced rat S-9. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 28, pp. 51-59.
- (61) UNEP (2001). Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants, United Nations Environment Programme (UNEP). Pieejams: <http://www.pops.int/>
- (62) Tucker, J.D., M.L. Christensen (1987). Effects of anticoagulants upon sister-chromatid exchanges, cell-cycle kinetics, and mitotic index in human peripheral lymphocytes. *Mutation Research*, Vol.190/3, pp. 225-8.
- (63) Krahn, D.F., F.C. Barsky, K.T. McCooey (1982). "CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids", in *Genotoxic Effects of Airborne Agents*. Tice, R.R., D.L. Costa, K.M. Schaich (eds.), Plenum, New York, pp. 91-103.
- (64) Zamora, P.O. *et al.* (1983). Evaluation of an exposure system using cells grown on collagen gels for detecting highly volatile mutagens in the CHO/HGPRT mutation assay. *Environmental Mutagenesis*, Vol. 5/6, pp. 795-801.
- (65) Asakura, M. *et al.* (2008). An improved system for exposure of cultured mammalian cells to gaseous compounds in the chromosomal aberration assay. *Mutation Research*, Vol. 652/2, pp. 122-130.
- (66) Fenech, M. (1993). The cytokinesis-block micronucleus technique: a detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations. *Mutation Research*, Vol. 285/1, pp. 35-44.
- (67) Phelps, J.B., M.L. Garriott, W.P. Hoffman (2002). A protocol for the *in vitro* micronucleus test. II. Contributions to the validation of a protocol suitable for regulatory submissions from an examination of 10 chemicals with different mechanisms of action and different levels of activity. *Mutation Research*, Vol. 521/1-2, pp. 103-112.
- (68) Kirsch-Volders, M. *et al.* (2004). Corrigendum to "Report from the *in vitro* micronucleus assay working group". *Mutation Research*, 564, 97-100.
- (69) Lorge, E. *et al.* (2008). Comparison of different methods for an accurate assessment of cytotoxicity in the *in vitro* micronucleus test. I. Theoretical aspects. *Mutation Research*, Vol. 655/1-2, pp. 1-3.
- (70) Surrallés, J. *et al.* (1995). Induction of micronuclei by five pyrethroid insecticides in whole-blood and isolated human lymphocyte cultures. *Mutation Research*, Vol. 341/3, pp. 169-184.
- (71) Honma, M. (2011). Cytotoxicity measurement in *in vitro* chromosome aberration test and micronucleus test. *Mutation Research*, Vol. 724, pp. 86-87.
- (72) Pfuhler, S. *et al.* (2011). *In vitro* genotoxicity test approaches with better predictivity: Summary of an IWGT workshop. *Mutation Research*, Vol. 723/2, pp. 101-107.
- (73) OECD (2014). Document supporting the WNT decision to implement revised criteria for the selection of the top concentration in the *in vitro* mammalian cell assays on genotoxicity (Test Guidelines 473, 476 and 487). ENV/JM/TG(2014)17. Pieejams pēc pieprasījuma.
- (74) Morita T., M. Honma, K. Morikawa (2012). Effect of reducing the top concentration used in the *in vitro* chromosomal aberration test in CHL cells on the evaluation of industrial chemical genotoxicity. *Mutation Research*, Vol. 741, pp. 32-56.
- (75) Brookmire L., J.J. Chen, D.D. Levy (2013). Evaluation of the Highest Concentrations Used in the *in vitro* Chromosome Aberrations Assay. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 54/1, pp. 36-43.

- (76) EPA, Office of Chemical Safety and Pollution Prevention (2011). Chemical Substances of Unknown or Variable Composition, Complex Reaction Products and Biological Materials: UVCB Substances. <http://www.epa.gov/opptintr/newchemicals/pubs/uvcb.txt>.
- (77) Sobol, Z. *et al.* (2012). Development and validation of an *in vitro* micronucleus assay platform in TK6 cells. *Mutation Research*, Vol. 746/1, pp. 29-34.
- (78) Hayashi, M., T. Sofuni, M. Jr. Ishidate (1983). An Application of Acridine Orange Fluorescent Staining to the Micronucleus Test. *Mutation Research*, Vol. 120/4, pp. 241-247.
- (79) MacGregor, J. T., C.M. Wehr, R.G. Langlois (1983). A Simple Fluorescent Staining Procedure for Micronuclei and RNA in Erythrocytes Using Hoechst 33258 and Pyronin Y. *Mutation Research*, Vol. 120/4, pp. 269-275.
- (80) Bryce, S.M. *et al.* (2011). Miniaturized flow cytometry-based CHO-K1 micronucleus assay discriminates aneugenic and clastogenic modes of action. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 52/4, pp. 280-286.
- (81) Nicolette, J. *et al.* (2011). *in vitro* micronucleus screening of pharmaceutical candidates by flow cytometry in Chinese hamster V79 cells. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 52/5, pp. 355-362.
- (82) Shi, J., R. Bezabhe, A. Szkudlinska (2010). Further evaluation of a flow cytometric *in vitro* micronucleus assay in CHO-K1 cells: a reliable platform that detects micronuclei and discriminates apoptotic bodies. *Mutagenesis*, Vol. 25/1, pp. 33-40.
- (83) OECD (2014). Statistical analysis supporting the revision of the genotoxicity Test Guidelines. OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on testing and assessment, No.198, OECD Publishing, Paris.
- (84) Fenech, M. *et al.* (2003). HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutation Research*, Vol. 534/1-2, pp. 65-75.
- (85) Elhajoui, A., M. Cunha, M. Kirsch-Volders (1998). Spindle poisons can induce polyploidy by mitotic slippage and micronucleate mononucleates in the cytokinesis-block assay. *Mutagenesis*, Vol. 13/2, pp. 193-8.
- (86) Kirsch-Volders, M. *et al.* (2011). The *in vitro* MN assay in 2011: origin and fate, biological significance, protocols, high throughput methodologies and toxicological relevance. *Archives of Toxicology*, Vol. 85/8, pp. 873-99.
- (87) Hayashi, M. *et al.* (2010). Compilation and use of genetic toxicity historical control Data. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 723/2, pp. 87-90.
- (88) Ryan, T. P. (2000). *Statistical Methods for Quality Improvement*. 2nd ed., John Wiley and Sons, New York.
- (89) Hoffman, W.P., M.L. Garriott, C. Lee (2003). *In vitro* micronucleus test', in *Encyclopedia of Biopharmaceutical Statistics*, 2nd ed. Chow, S. (ed.), Marcel Dekker, Inc. New York, pp. 463-467.
- (90) Fleiss, J. L., B. Levin, M.C. Paik (2003). *Statistical Methods for Rates and Proportions*, 3rd ed. John Wiley & Sons, New York.
- (91) Galloway, S.M. *et al.* (1987). Chromosome aberration and sister chromatid exchanges in Chinese hamster ovary cells: Evaluation of 108 chemicals. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 10/suppl. 10, pp. 1-175.
- (92) Richardson, C. *et al.* (1989). Analysis of Data from *in vitro* Cytogenetic Assays. in *Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data*, Kirkland, D.J. (ed), Cambridge University Press, Cambridge, pp. 141-154.
- (93) International Conference on Harmonisation (ICH) Guidance S2 (R1) on Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended For Human Use.
-

1. papildinājums

DEFINĪCIJAS

Aneigēns: jebkura ķimikālija vai process, kas mijiedarbībā ar mitotiskā un meiotiskā šūnu dalīšanās cikla aparāta komponentiem izraisa šūnu vai organismu aneiploīdiju.

Aneiploīdija: novirze no normālā diploīdā (vai haploīdā) hromosomu skaita par vienu vai vairākām atsevišķām hromosomām, bet ne veselu hromosomu komplektu vai komplektiem (poliploīdija).

Apoptoze: programmēta šūnu nāve, ko raksturo virkne posmu, kuros šūnas sabrūk membrānās ieslēgtās daļiņās, kas pēc tam tiek iznīcinātas fagocitozē vai izvadītas.

Šūnu savairošanās: šūnu skaita pieaugums šūnu mitotiskās dalīšanās rezultātā.

Centromērs: hromosomas DNS reģions, kurā abas hromatīdas ir saistītas un uz kura šūnu pie sāna piestiprinājušies abi kinetohori.

Ķimikālija: viela vai maisījums.

Koncentrācijas: testējamās ķimikālijas galīgās koncentrācijas barotnē.

Klastogēns: jebkura ķimikālija vai notikums, kas izraisa strukturālas hromosomas tipa aberācijas šūnu vai eikariotu populācijās.

Citokinēze: šūnas dalīšanās process, kurš notiek tūlīt pēc mitozes un kurā izveidojas divas meitšūnas, katra ar savu kodolu.

Prolifērācijas indekss pēc citokinēzes blokādes (CBPI): otrā dalīšanās viļņa šūnu īpatsvars apstrādātajā populācijā salīdzinājumā ar neapstrādāto kontroli (formulu sk. 2. papildinājumā).

Citostāze: šūnu augšanas inhibēšanās (formulu sk. 2. papildinājumā).

Citotoksicitāte: šajā testēšanas metodē ietvertajiem testiem, kuros izmanto citohalazīnu B, citotoksicitāte ir apstrādāto šūnu proliferācijas indeksa pēc citokinēzes blokādes (CBPI) vai replicēšanās indeksa (RI) samazinājums salīdzinājumā ar negatīvo kontroli (sk. 26. punktu un 2. papildinājumu).

Šajā testēšanas metodē ietvertajiem testiem, kuros citohalazīnu B neizmanto, citotoksicitāte ir apstrādāto šūnu populācijas relatīvās dubultošanās (RPD) vai šūnu skaita relatīvā pieauguma (RICC) samazinājums salīdzinājumā ar negatīvo kontroli (sk. 27. punktu un 2. papildinājumu).

Genotoksisks: vispārīgs termins, kas aptver visu veidu bojājumus DNS vai hromosomās, tostarp pārrāvumus, delēcijas, aduktus, nukleotīdu modifikācijas un saiknes, pārkārtojumus, gēnu mutācijas, hromosomu aberācijas un aneiploīdiju. Ne visas genotoksiskās ietekmes rada mutācijas vai pastāvīgus hromosomu bojājumus.

Interfāzes šūnas: šūnas, kas neatrodas mitotiskajā stadijā.

Kinetohors: proteīnstruktūra, kura sagrupējas pie centromēra hromosomā un ar kuru šūnas dalīšanās laikā saistās vārpstas šķiedras, nodrošinot meitohromosomu pareizu pārvietošanos uz meitšūnu poliem.

Mikrokodoli: mazi kodoli, kas mitozes vai mejozes telofāzē izveidojas no aizkavējušos hromosomu fragmentiem vai veselām hromosomām atsevišķi no šūnu galvenajiem kodoliem un tiem papildus.

Mitoze: šūnas kodola dalīšanās process, kuru parasti sīkāk iedala šādās stadijās: profāze, prometafāze, metafāze, anafāze un telofāze.

Mitotiskais indekss: metafāzē esošu šūnu skaita attiecība pret šūnu kopējo skaitu populācijā; raksturo šūnu savairošanās pakāpi šajā populācijā.

Mutagēns: faktors, kas izraisa pārmantojamas DNS bāzu pāru sekvences vai sekvenču izmaiņas gēnos vai hromosomu struktūrā (hromosomu aberācijas).

Neatdalīšanās: pārchromatīdu neatdalīšanās un pienācīga nevirzīšanās uz topošajām meitšūnām, kas noved pie anormāla hromosomu skaita meitšūnās.

p53 statuss: p53 proteīns ir iesaistīts šūnas cikla regulēšanā, apoptozē un DNS reparācijā. Šūnām, kurām funkcionāla p53 proteīna nav un kuras tāpēc nespēj, reaģējot uz DNS bojājumiem, apturēt šūnas ciklu vai likvidēt bojātās šūnas ar apoptozi vai citiem paņēmieniem (piem., inducējot DNS reparāciju), kas saistīti ar p53 funkcijām, teorētiski vajadzētu būt uzņēmīgākām pret gēnu mutācijām vai hromosomu aberācijām.

Poliploidija: tāda hromosomu skaita aberācija šūnās vai organismos, kas skar veselu(-s) hromosomu komplektu(-s) (pretstatā aneiploidijai, kas skar vienu vai vairākas atsevišķas hromosomas).

Proliferācijas indekss (PI): citotoksicitātes mērīšanas metode, ja neizmanto *cytoB* (formulu sk. 2. papildinājumā).

Šūnu skaita relatīvais pieaugums (RICC): citotoksicitātes mērīšanas metode, ja neizmanto *cytoB* (formulu sk. 2. papildinājumā).

Populācijas relatīvā dubultošanās (RPD): citotoksicitātes mērīšanas metode, ja neizmanto *cytoB* (formulu sk. 2. papildinājumā).

Replicēšanās indekss (RI): pabeigtu šūnu dalīšanās ciklu daļa apstrādātā kultūrā ekspozīcijas un rekuperācijas laikā attiecībā pret neapstrādāto kontroli (formulu sk. 2. papildinājumā).

S9 aknu frakcija: aknu homogenāta supernatants pēc 9 000 g centrifugēšanas, t. i., jēlu aknu ekstrakts.

S9 maisījums: S9 aknu frakcijas un metabolisko fermentu darbībai nepieciešamo kofaktoru maisījums.

Šķīdinātāja kontrole: vispārīgs termins to kontrolkultūru apzīmēšanai, kuras saņem vienīgi testējamās ķīmikālijas šķīdināšanai izmantoto šķīdinātāju.

Testējamā ķīmikālija: jebkura viela vai maisījums, ko testē ar šo testēšanas metodi.

Neapstrādātās kontroles: kultūras, kuras neapstrādā (t. i., ne ar testējamo ķīmikāliju, ne ar šķīdinātāju), bet ar kurām paralēli izdara tādas pašas manipulācijas kā ar kultūrām, kuras apstrādā ar testējamo ķīmikāliju.

2. papildinājums

CITOTOKSICITĀTES NOVĒRTĒJUMA FORMULAS

Ja izmanto cytoB, citotoksicitātes izvērtējuma pamatā ir **proliferācijas indekss pēc citokinēzes blokādes (CBPI)** vai **replīcēšanās indekss (RI)** (17) (69). CBPI norāda mikrokodolu vidējo skaitu vienā šūnā, un to var izmantot šūnu savairošanās aprēķinos. RI norāda šūnas ciklu relatīvo skaitu vienai šūnai laikā, kad apstrādātajās kultūrās tā tiek eksponēta *cytoB*, salīdzinājumā ar kontrolkultūrām, un to var izmantot, lai aprēķinātu % citostāzi:

$$\% \text{ citostāze} = 100 - 100\{(CBPI_T - 1) \div (CBPI_C - 1)\}$$

un:

T = ar testējamo ķīmikāliju apstrādātā kultūra

C = kontrolkultūra

kur:

$$CBPI = \frac{((\text{No.mononucleate cells}) + (2 \times \text{No.binucleate cells}) + (3 \times \text{No.multinucleate cells}))}{(\text{Total number of cells})}$$

Tātad CBPI vērtība 1 (visas šūnas ir vienkodola šūnas) ir līdzvērtīga 100 % citostāzei.

Citostāze = 100-RI

$$RI = \frac{((\text{No.binucleate cells}) + (2 \times \text{No.multinucleate cells})) / (\text{Total number of cells})_T}{((\text{No.binucleate cells}) + (2 \times \text{No.multinucleate cells})) / (\text{Total number of cells})_C} \times 100$$

T = apstrādātās kultūras

C = kontrolkultūras

Tātad, ja RI ir 53 %, tas nozīmē, ka, salīdzinot ar kontrolkultūras šūnu skaitu, kuras dalījušās, izveidojot divkodolu un daudzkodolu šūnas, apstrādātajā kultūrā šādi dalījušies tikai 53 % no tāda paša šūnu skaita, t. i., 47 % citostāze.

Ja cytoB neizmanto, citotoksicitātes izvērtējuma pamatā ieteicams likt **šūnu skaita relatīvā pieauguma (RICC)** vai **populācijas relatīvās dubultošanās (RPD)** rādītājus (69), jo tie abi ņem vērā, kāda šūnu populācijas daļa ir dalījusies.

$$RICC(\%) = \frac{(\text{Increase in number of cells in treated cultures}(\text{final} - \text{starting}))}{(\text{Increase in numbers of cells in control cultures}(\text{final} - \text{starting}))} \times 100$$

$$RPD(\%) = \frac{(\text{No.of Population doublings in treated cultures})}{(\text{No.of population doublings in control cultures})} \times 100$$

kur:

Populācijas dubultošanās = [log (šūnu skaits pēc apstrādes ÷ šūnu skaits sākumā)] ÷ log 2

Tātad, ja RICC vai RPD ir 53 %, tas uzrāda 47 % citotoksicitāti/citostāzi.

Ar **proliferācijas indeksu (PI)** citotoksicitāti var novērtēt, saskaitot klonus, ko veido 1 šūna (cl1), 2 šūnas (cl2), 3 līdz 4 šūnas (cl4) un 5 līdz 8 šūnas (cl8).

$$PI = \frac{((1 \times cl1) + (2 \times cl2) + (3 \times cl4) + (4 \times cl8))}{(cl1 + cl2 + cl4 + cl8)}$$

PI tiek izmantots par vērtīgu un ticamu citotoksicitātes parametru arī šūnu līnijām, kas kultivētas *in vitro* bez *cytoB* (35) (36) (37) (38), un to var uzskatīt par lietderīgu papildu parametru.

Jebkurā gadījumā pirms apstrādes šūnu skaitam apstrādātajās kultūrās un negatīvās kontroles kultūrās jābūt vienādam.

Kaut arī iepriekš par citotoksicitātes parametru ticis izmantots RCC (t. i., šūnu skaits apstrādātajās kultūrās/šūnu skaits kontrolkultūrās), to izmantot vairs nav ieteicams, jo tas var citotoksicitāti novērtēt pārāk zemu.

Izmantojot automātiskas novērtēšanas sistēmas, piem., plūsmas citometriju, lāzerskenēšanas citometriju vai attēlu analīzi, šūnu skaitu formulā var aizstāt ar mikrokodolu skaitu.

Negatīvās kontroles kultūrās populācijas dubultošanās vai replicēšanās indeksam jābūt saderīgam ar prasību šūnu paraugšanu veikt tad, kad pēc apstrādes apritējuši aptuveni 1,5–2,0 normāliem šūnas cikli.”

15) pielikuma B daļā pievieno šādas nodaļas:

“B.59. *In chemico* ādas sensibilizācija: tiešais peptīdreaģētspējas tests (DPRA)

IEVADS

Šī testēšanas metode (TM) ir ekvivalenta ESAO testēšanas vadlīnijai (TG) Nr. 442C (2015). Ādas sensibilizators ir viela, kas, nonākot saskarē ar ādu, izraisa alerģisku atbildreakciju, atbilstoši definīcijai, kas dota Apvienoto Nāciju Organizācijas (ANO) Ķīmikāliju klasificēšanas un marķēšanas globāli harmonizētajā sistēmā (GHS) (1) un Regulā (EK) Nr. 1272/2008 par vielu un maisījumu klasificēšanu, marķēšanu un iepakojšanu (CLP regula) ⁽¹⁾. Šī testēšanas metode piedāvā *in chemico* procedūru (tiešo peptīdreaģētspējas testu [Direct Peptide Reactivity Assay], DPRA), kas izmantojama, lai saskaņā ar ANO GHS un CLP regulu nošķirtu ādas sensibilizatorus no ādas nesensibilizatoriem.

Pastāv vispārēja vienprātība par galvenajiem bioloģiskajiem notikumiem, kas ir ādas sensibilizācijas pamatā. Esošās zināšanas par ķīmiskajiem un bioloģiskajiem mehānismiem, kas saistīti ar ādas sensibilizāciju, ir apkopotas, izveidojot nelabvēlīga iznākuma ceļu (Adverse Outcome Pathway, AOP) (2) — no molekulārā iniciācijas notikuma un starpposma notikumiem līdz nelabvēlīgajai ietekmei, proti, alerģiskam kontaktdermatītam cilvēkos vai kontakthipersensibilizācijai grauzējos. Ādas sensibilizācijas AOP kontekstā molekulārais iniciācijas notikums ir elektrofilu vielu kovalenta saistīšanās ar nukleofilajiem centriem ādas proteīnos.

Līdz šim ādas sensibilizācijas novērtēšanai parasti izmantoti laboratorijas dzīvnieki. Ar klasiskām metodēm, kurās izmanto jūrascūciņas, — Magnusona–Kligmana maksimizācijas testu jūrascūciņām (Magnusson Kligman Guinea Pig Maximisation Test, GMPT) un Bīlera [Buehler] testu (TM B.6 (3)) — tiek pētīta gan ādas sensibilizācijas indukcijas fāze, gan tās izpausmes fāze. Atzinīgi novērtēts ir arī tests ar pelēm, proti, limfmezglu lokālās stimulācijas tests (Local Lymph Node Assay, LLNA, TM B.42 (4)) un abas šīs metodes modifikācijas, kurās nav radioaktīvo komponentu, proti, LLNA: DA (TM B.50 (5)) un LLNA:BrdU-ELISA (TM B.51 (6)), kurās visās novērtē vienīgi indukcijas reakciju, jo visas šīs metodes dzīvnieku labturības un objektīva ādas sensibilizācijas indukcijas fāzes mērījuma ziņā ir pārākas par testēšanas metodēm ar jūrascūciņām.

Pēdējā laikā mehānistiskās *in chemico* un *in vitro* testēšanas metodes tiek uzskatītas par zinātniski derīgām metodēm ķīmikāliju radīto ādas sensibilizācijas apdraudējumu izvērtēšanai. Tomēr, lai būtu iespējams pilnīgi aizstāt pašreizējos testus ar dzīvniekiem, integrētās testēšanas un novērtēšanas pieejās (Integrated Approaches to Testing and Assessment, IATA) jākombinē vairākas metodes (*in silico*, *in chemico*, *in vitro*), kurās dzīvniekus neizmanto, ņemot vērā, ka katrai pašreiz pieejamajai bezdzīvnieku metodei ir ierobežots mehānistiskais AOP tvērums (2) (7).

⁽¹⁾ Eiropas Parlamenta un Padomes 2008. gada 16. decembra Regula (EK) Nr. 1272/2008 par vielu un maisījumu klasificēšanu, marķēšanu un iepakojšanu un ar ko groza un atceļ Direktīvas 67/548/EEK un 1999/45/EK un groza Regulu (EK) Nr. 1907/2006 (OV L 353, 31.12.2008., 1. lpp.).

DPRA tiek piedāvāta, lai varētu pētīt ādas sensibilizācijas AOP molekulāro iniciācijas notikumu, proti, proteīnreaģētspēju, kvantitatīvi izsakot testējamo ķīmikāliju spēju reaģēt uz sintētiskiem modeļpeptīdiem, kuri satur lizīnu vai cisteīnu (8). Pēc tam cisteīna un lizīna peptīdu procentuālā samazinājuma vērtības izmanto, lai vielu klasificētu kādā no četrām reaģētspējas klasēm, ar kurām nošķir ādas sensibilizatorus no ādas nesensibilizatoriem (9).

DPRA ir izvērtēts validācijas pētījumā, ko vadīja Eiropas Savienības references laboratorija dzīvnieku testēšanai alternatīvu metožu jomā (EURL ECVAM), un vēlākā neatkarīgā profesionālvērtēšanā, ko veica EURL ECVAM zinātniskā padome (ESAC), un tika atzīts par zinātniski derīgu (10) izmantošanai IATA ietvaros un ādas sensibilizatoru un nesensibilizatoru nošķiršanai nolūkā klasificēt un marķēt apdraudējumus. Piemēri DPRA datu izmantošanai kombinācijā ar citu informāciju ir pieejami literatūrā (11) (12) (13) (14).

Definīcijas ir sniegtas 1. papildinājumā.

SĀKOTNĒJIE APSVĒRUMI, PIEMĒROJAMĪBA UN IEROBEŽOJUMI

Ir labi zināma proteīnreaģētspējas korelācija ar ādas sensibilizācijas potenciālu (15) (16) (17). Tomēr, tā kā proteīna saistīšana atspoguļo tikai vienu būtisku notikumu (pat ja tas ir ādas sensibilizācijas AOP molekulārais iniciācijas notikums), ar informāciju par proteīnreaģētspēju, kas iegūta ar testēšanas metodēm un tādām metodēm, kas neietver testēšanu, var nepietikt, lai izdarītu secinājumu, ka ķīmikālijai ādas sensibilizācijas potenciāls nepiemīt. Tādēļ ar šo testēšanas metodi iegūtie dati jāskata integrētas pieejas, piemēram, IATA, satvarā un jāapvieno ar citu papildinformāciju, piem., tādu, kas iegūta *in vitro* testos, kuros apskatīti citi būtiski ādas sensibilizācijas AOP notikumi, kā arī ar metodēm, kuras neietver testēšanu un kurās pēc analogijas principa ("aplūkot līdzīgu") tiek izmantota informācija par ķīmiskajiem analogiem.

Šo testēšanas metodi apvienojumā ar citu papildinformāciju var izmantot tam, lai saskaņā ar IATA būtu vieglāk ādas sensibilizatorus (t. i., ANO GHS/CLP 1. kategorija) nošķirt no ādas nesensibilizatoriem. Šo testēšanas metodi nevar izmantot vienu pašu ne ādas sensibilizatoru klasificēšanai apakškategoriās 1.A un 1.B saskaņā ar ANO GHS/CLP, ne potences prognozēšanai drošuma novērtējuma lēmumiem. Tomēr atkarībā no tiesiskā regulējuma pozitīvu rezultātu, kas iegūts ar DPRA, var vienu pašu izmantot ķīmikālijas klasificēšanai ANO GHS/CLP 1. kategorijā.

Ir pierādīts, ka DPRA testēšanas metode ir pārnesama uz laboratorijām, kurām ir pieredze augstas izšķirtspējas šķīdumhromatogrāfijas (HPLC) analīzes veikšanā. Prognožu reproducējamības līmenis, kas sagaidāms no šīs testēšanas metodes, ir aptuveni 85 % tajā pašā laboratorijā un 80 % citās laboratorijās (10). Validācijas pētījumā (18) un publicētajos pētījumos (19) iegūtie rezultāti kopumā liecina, ka ādas sensibilizatoru (t. i., ANO GHS/CLP 1. kat.) nošķiršanā no ādas nesensibilizatoriem DPRA pareizība ir 80 % (N = 157), jutība — 80 % (88/109) un specifiskums — 77 % (37/48) salīdzinājumā ar LLNA rezultātiem. Visticamāk, DPRA testā pārāk zemu tiks novērtētas tās ķīmikālijas, kurām novērojama zema līdz vidēja ādas sensibilizācijas potence (t. i., ANO GHS/CLP 1. B apakš kategorija), nevis tās ķīmikālijas, kurām novērojama augsta ādas sensibilizācijas potence (t. i., ANO GHS/CLP 1.A apakš kategorija) (18) (19). Tomēr pareizības vērtības, kas šeit sniegtas attiecībā uz DPRA kā atsevišķu testēšanas metodi, ir tikai orientējošas, jo šī testēšanas metode jāskata kombinācijā ar citiem informācijas avotiem saskaņā ar IATA un atbilstīgi 9. punkta noteikumiem. Turklāt, izvērtējot ādas sensibilizācijas novērtēšanas metodes, kurās neizmanto dzīvniekus, jāņem vērā, ka LLNA tests, kā arī citi testi ar dzīvniekiem var nepilnīgi atspoguļot situāciju interesējošajā sugā, t. i., cilvēkos. Pamatojoties uz vispārējiem pieejamajiem datiem, ir pierādīts, ka DPRA var izmantot testējamām ķīmikālijām, kas aptver dažādas organiskās funkcionālās grupas, atbildreakciju mehānismus, ādas sensibilizācijas potence (kā noteikts *in vivo* pētījumos) un fizikālķīmiskās īpašības (8) (9) (10) (19). Visa šī informācija kopā norāda uz to, ka DPRA var palīdzēt identificēt ādas sensibilizācijas apdraudējumus.

Terminu “testējamā ķīmikālija” šajā testēšanas metodē izmanto, lai apzīmētu to, kas tiek testēts, un tas nav saistīts ar DPRA pielietojamību vielu un/vai maisījumu testēšanā. Šī testēšanas metode nav pielietojama metāla savienojumu testēšanā, jo, kā zināms, tie ar proteīniem reaģē ar citiem mehānismiem, nevis kovalentajām saitēm. Testējamai ķīmikālijai jāšķīst piemērotā šķīdinātājā ar galīgo koncentrāciju 100 mM (sk. 18. punktu). Tomēr testējamās ķīmikālijas, kuras pie šādas koncentrācijas nešķīst, drīkst testēt arī pie mazākām šķīdības koncentrācijām. Tādā gadījumā pozitīvu rezultātu joprojām varētu izmantot, lai pamatotu testa ķīmikālijas atzīšanu par ādas sensibilizatoru, taču negatīva rezultāta gadījumā nedrīkstētu stingri secināt, ka tā nav reaģētspējīga. Patlaban ir pieejama ierobežota informācija par DPRA izmantojamību maisījumiem, kuru sastāvs ir zināms (18) (19). Tomēr DPRA tiek uzskatīts par tehniski izmantojamu daudzkomponentu vielu un maisījumu ar zināmu sastāvu testēšanai (sk. 18. punktu). Pirms šīs testēšanas metodes izmantošanas maisījumam, lai iegūtu datus kādam normatīvajam mērķim, jāapsver, vai un kādēļ tā varētu sniegt minētajam mērķim piemērotus rezultātus. Ja pastāv normatīva prasība maisījumu testēt, tāda apsvēršana nav vajadzīga. Pašreizējo prognozes modeli nevar izmantot kompleksiem maisījumiem ar nezināmu sastāvu vai nezināma vai mainīga sastāva vielām, kompleksiem reakcijas produktiem vai bioloģiskiem materiāliem (t. i., UVCB vielām), jo testējamai ķīmikālijai un peptīdam ir noteikta molārā attiecība. Šim nolūkam būs jāizstrādā jauns, uz gravimetrisko pieeju balstīts prognozes modelis. Gadījumos, kad ir pierādījumi par testēšanas metodes neizmantojamību citām konkrētu kategoriju ķīmikālijām, šo testēšanas metodi minētajām konkrētajām ķīmikāliju kategorijām neizmanto.

Šī testēšanas metode ir *in chemico* metode, kas neietver metabolisku sistēmu. Ar šo testēšanas metodi nevar detektēt ķīmikālijas, kas savu ādas sensibilizācijas potenciālu sasniedz tikai ar fermentatīvo bioaktivāciju (t. i., prohaptēni). Ir ziņots, ka dažos gadījumos ar šo testēšanas metodi tiek pareizi detektētas ķīmikālijas, kuras kļūst par sensibilizatoriem pēc abiotiskas transformācijas (t. i., prehaptēni) (18). Ņemot vērā iepriekš minēto, ar šo testēšanas metodi iegūtie negatīvie rezultāti jāinterpretē noteikto ierobežojumu kontekstā un kopā ar citiem informācijas avotiem saskaņā ar IATA. Testējamās ķīmikālijas, kas neveido kovalentas saites ar peptīdu, taču sekmē tā oksidēšanos (t. i., cisteīna dimerizēšanos), varētu veicināt peptīdu samazinājuma pārvērtēšanu, kā rezultātā varētu rasties pseidopozitīvas prognozes un/vai ķīmikālija varētu tikt klasificēta augstākā reaģētspējas klasē (sk. 29. un 30. punktu).

Kā norādīts, DPRA palīdz ādas sensibilizatorus nošķirt no ādas nesensibilizatoriem. Integrētā pieejā, piem., IATA, tas var palīdzēt novērtēt arī sensibilizācijas potenci. Tomēr, lai noteiktu, kā DPRA rezultāti varētu ļaut spriest par potences novērtējumu, jāveic turpmākas darbības, vēlamas, pamatojoties uz datiem par cilvēkiem.

TESTA PRINCIPS

DPRA ir *in chemico* metode, ar ko skaitliski izsaka cisteīnu vai lizīnu saturošu peptīdu atlikušo koncentrāciju pēc 24 stundu inkubācijas ar testējamo ķīmikāliju $25 \pm 2,5$ °C temperatūrā. Sintētiskie peptīdi satur fenilalanīnu, kas atvieglo detektēšanu. Peptīdu relatīvo koncentrāciju mēra, izmantojot augstas izšķirtspējas šķidrumhromatogrāfiju (HPLC) ar gradienta eluēšanu un UV detektēšanu pie 220 nm. Pēc tam aprēķina cisteīna un lizīna peptīdu procentuālā samazinājuma vērtības un tās izmanto prognozes modeli (sk. 29. punktu), kas testējamo ķīmikāliju ļauj klasificēt vienā no četrām reaģētspējas klasēm, ko izmanto, lai ādas sensibilizatorus nošķirtu no ādas nesensibilizatoriem.

Pirms šajā testēšanas metodē aprakstītās metodes regulāras izmantošanas laboratorijām uzskatāmi jāapliecina sava tehniskā kompetence, izmantojot 2. papildinājumā uzskaitītās desmit standartvielas.

PROCEDŪRA

Šī testēšanas metode ir balstīta uz *DPRA DB-ALM* protokolu Nr. 154 (20), kas ir *EUROL ECVAM* koordinētajā validācijas pētījumā izmantotais protokols. Šo metodi īstenojot un izmantojot laboratorijā, ieteicams lietot šo protokolu. Turpmāk sniegts galveno *DPRA* komponentu un procedūru apraksts. Izmantojot alternatīvu *HPLC* sistēmu, jāpierāda tās līdzvērtība *DB-ALM* protokolā aprakstītajai validētajai sistēmai (piem., testējot 2. papildinājumā norādītās standartvielas).

Cisteīnu vai lizīnu saturošo peptīdu sagatavošana

Tieši pirms inkubācijas ar testējamo ķīmikāliju jāpagatavo svaigi cisteīnu (*Ac-RFAACAA-COOH*) un lizīnu (*Ac-RFAAKAA-COOH*) saturoši sintētisko peptīdu izejšķidumi ar tīrību, kas pārsniedz 85 % un, vēlams, ir diapazonā 90–95 %. Cisteīna peptīda galīgajai koncentrācijai pH 7,5 fosfāta buferšķīdumā jābūt 0,667 mM, savukārt lizīna peptīda galīgajai koncentrācijai pH 10,2 amonija acetāta buferšķīdumā jābūt 0,667 mM. Jāizveido *HPLC* testēšanas sērija, lai *HPLC* analīzes laiks nesasniegtu 30 stundas. Attiecībā uz validācijas pētījumā un šajā testēšanas metodē aprakstīto *HPLC* sistēmu vienā *HPLC* testēšanas reizē iespējams izmantot līdz 26 analīzes paraugus (kas ietver testējamo ķīmikāliju, pozitīvo kontroli un attiecīgu šķīdinātāja kontroļu skaitu atkarībā no testā izmantoto atsevišķo šķīdinātāju skaita, katru testējot triplikātā). Visiem vienā testēšanas reizē analizētajiem replikātiem jāizmanto identiski cisteīna un lizīna peptīdu izejšķidumi. Pirms katras peptīdu partijas izmantošanas ieteicams pierādīt, ka tie pienācīgi šķīst.

Testējamās ķīmikālijas sagatavošana

Testējamās ķīmikālijas šķīdība attiecīgajā šķīdinātājā jānovērtē pirms testa veikšanas, ievērojot *DPRA DB-ALM* protokolā aprakstīto solubilizācijas procedūru (20). Atbilstošs šķīdinātājs testējamo ķīmikāliju izšķīdinās pilnīgi. Tā kā *DPRA* testējamo ķīmikāliju pārmērīgi lielā daudzumā inkubē ar cisteīna vai lizīna peptīdiem, iegūtā dzidrā šķidrums vizuāla inspicēšana tiek uzskatīta par pietiekamu, lai pārliecinātos, ka testējamā ķīmikālija (un visi tās komponenti, ja testēšanu veic ar daudzkomponentu vielu vai maisījumu) ir izšķīdusi. Piemēroti šķīdinātāji ir acetons, ūdens, ūdens un acetona 1:1 maisījums, izopropanols, acetons vai acetona un acetona 1:1 maisījums. Iespējams izmantot citus šķīdinātājus, ja vien tie neietekmē peptīda stabilitāti, ko uzrauga, izmantojot referenckontroles C (t. i., paraugus, kas sastāv vienīgi no peptīda, kurš izšķīdināts atbilstošajā šķīdinātājā; sk. 3. papildinājumu). Ja citas iespējas nav un testējamā ķīmikālija nešķīst nevienā no šiem šķīdinātājiem, jācenšas to izšķīdināt 300 µL *DMSO* un iegūto šķīdumu atšķaidīt ar 2 700 µL acetona un, ja testējamā ķīmikālija šajā maisījumā nešķīst, jācenšas tādu pašu testējamās ķīmikālijas daudzumu izšķīdināt 1 500 µL *DMSO* un iegūto šķīdumu atšķaidīt ar 1 500 µL acetona. Testējamā ķīmikālija pirms apstrādes jānosver stikla stobriņos un tieši pirms testēšanas jāizšķīdina piemērotā šķīdinātājā, lai sagatavotu 100 mM šķīdumu. Maisījumiem un daudzkomponentu vielām ar zināmu sastāvu kopējo tīrību nosaka, sasummējot tā komponentu (izņemot ūdeni) daļas, un kopējo šķīdāmo molekulu masu nosaka, ņemot vērā katra maisījuma komponenta (izņemot ūdeni) individuālo molekulu masu un īpatnību. Rezultātā iegūtā tīrība un šķīdāmo molekulu masa jāizmanto, lai aprēķinātu 100 nM šķīduma sagatavošanai nepieciešamo testējamās ķīmikālijas masu. Attiecībā uz polimēriem, kuriem nav iespējams noteikt dominējošo molekulu masu, sagatavojot 100 nM šķīdumu, var ņemt vērā monomēra molekulu masu (vai dažādo polimēra saturēto monomēru šķīdāmo molekulu masu). Tomēr, testējot maisījumus, daudzkomponentu vielas vai polimērus ar zināmu sastāvu, jāapsver arī iespēja testēt neatšķaidītu testējamo ķīmikāliju. Šķīdams neatšķaidītās ķīmikālijas jātēstē bez jebkādas iepriekšējas atšķaidīšanas, tās inkubējot molārajā attiecībā 1:10 un 1:50 attiecīgi ar cisteīna un lizīna peptīdiem. Cietas testējamās ķīmikālijas jāizšķīdina līdz maksimālajai šķīstībai koncentrācijai tajā pašā šķīdinātājā, kas izmantots, lai sagatavotu šķīdāmo 100 mM šķīdumu. Pēc tam to testē, neveicot nekādu papildu atšķaidīšanu, to inkubējot attiecībā 1:10 un 1:50 attiecīgi ar cisteīna un lizīna peptīdiem. Ja rezultāti (reaģētspējīgs vai reaģētspējīgs), kas iegūti ar šķīdāmo 100 mM šķīdumu un neatšķaidīto ķīmikāliju, sakrīt, tiem vajadzētu ļaut izdarīt skaidru secinājumu.

Pozitīvās kontroles, referenckontroļu un koelūcijas kontroļu sagatavošana

Par pozitīvo kontroli jāizmanto kanēļskābes aldehīds (CAS Nr. 104-55-2; ≥ 95 % pārtikas tīrība) koncentrācijā 100 mM acetnitrilā. Ja ir pieejami vēsturiskie dati, no kuriem var iegūt salīdzināmus testēšanas pieņemamības kritērijus, var izmantot citas piemērotas pozitīvās kontroles, vēlams, tādas, kam raksturīgas vidējas samazinājuma vērtības. Turklāt HPLC testēšanas sekvencē jāiekļauj arī referenckontroles (t. i., paraugi, kuri satur vienīgi atbilstošajā šķīdinātājā izšķīdinātu peptīdu), un tās izmanto, lai pirms analīzes verificētu HPLC sistēmas piemērotību (referenckontroles A), referenckontroļu stabilitāti laika griezumā (referenckontroles B) un to, ka testējamās ķīmikālijas izšķīdināšanai izmantotais šķīdinātājs neietekmē peptīdu procentuālo samazinājumu (referenckontroles C) (sk. 3. papildinājumu). Katrai ķīmikālijai izmanto atbilstošu referenckontroli, lai aprēķinātu attiecīgās ķīmikālijas peptīdu procentuālo samazinājumu (sk. 26. punktu). Turklāt par katru analizēto testējamo ķīmikāliju testēšanas sekvencē jāiekļauj koelūcijas kontrole, kas sastāv vienīgi no testējamās ķīmikālijas, lai detektētu testējamās ķīmikālijas iespējamu koelūciju ar lizīna vai cisteīna peptīdu.

Testējamās ķīmikālijas inkubācija ar cisteīna un lizīna peptīdu šķīdumiem

Cisteīna un lizīna peptīdu šķīdumi jāinkubē stikla autosamplera stobriņos ar testējamo ķīmikāliju attiecīgi attiecībā 1:10 un 1:50. Ja tūlīt pēc testējamās ķīmikālijas šķīduma pievienošanas peptīdu šķīdumam ir novērojamas nogulsnes, jo testējamā ķīmikālija slikti šķīst ūdenī, nav iespējams droši zināt, cik liels testējamās ķīmikālijas daudzums ir palicis šķīdumā reaģēšanai ar peptīdu. Tāpēc tādā gadījumā joprojām iespējams izmantot pozitīvu rezultātu, taču negatīvais rezultāts nav skaidrs un jāinterpretē piesardzīgi (sk. arī 11. punkta noteikumus par tādu ķīmikāliju testēšanu, kuras nešķīst līdz koncentrācijai 100 mM). Reakcijas šķīdumu pirms HPLC analīzes atstāj tumšā $25 \pm 2,5^\circ\text{C}$ temperatūrā uz 24 ± 2 stundām. Katra testējamā ķīmikālija attiecībā uz abiem peptīdiem jāanalizē triplikātā. Pirms HPLC analīzes paraugus vizuāli pārbauda. Ja novērojamas nogulsnes vai fāzu atdalīšanās, paraugus var nelielā ātrumā centrifugēt (100–400 xg), lai nogulsnes piesardzības nolūkos nospiestu stobriņa apakšdaļā, jo lieli nogulšņu daudzumi var aizsprostot HPLC caurulītes vai kolonnas. Ja nogulsnes vai fāzu atdalīšanās ir novērojamas pēc inkubācijas perioda, peptīdu samazinājums var tikt novērtēts pārāk zemu un rezultātā var nebūt iespējams pietiekami pārliecinoši konstatēt reaģētspēju negatīva rezultāta gadījumā.

HPLC standarta kalibrācijas līknes sagatavošana

Gan cisteīna, gan lizīna peptīdiem jāizveido standarta kalibrācijas līkne. Peptīda standartvielas jāgatavo 20 % vai 25 % acetnitrila/buferšķīduma šķīdumā, cisteīna peptīdam izmantojot fosfāta buferšķīdumu (pH 7,5), bet lizīna peptīdam — amonija acetāta buferšķīdumu (pH 10,2). Izmantojot peptīda izejšķīduma sērijveida atšķaidīšanu (0,667 mM), jāgatavo 6 kalibrēšanas šķīdumi, lai aptvertu diapazonu no 0,534 līdz 0,0167 mM. Standarta kalibrācijas līknē jāietver arī atšķaidīšanas buferšķīduma tukšais paraugs. Pienācīgām kalibrācijas līknēm $r^2 > 0,99$.

HPLC sagatavošana un analīze

Pirms analīzes veikšanas jāpārbauda HPLC sistēmas piemērotība. Peptīdu samazinājumu monitorē, izmantojot HPLC un UV detektoru (fotodiožu matricas detektoru vai fiksētu viļņa garuma absorbcijas detektoru ar 220 nm signālu). HPLC sistēmā uzstāda pienācīgu kolonnu. Validētajā protokolā aprakstītajā HPLC sistēmā kā vēlamo kolonnu izmanto Zorbax SB-C-18 2,1 mm x 100 mm x 3,5 mikroni. Ar šo apgrieztās fāzes HPLC kolonnu vismaz 2 stundas pirms testa veikšanas visa sistēma jāildzsvaro 30°C ar 50 % fāzi A (0,1 % (tilp./tilp.) trifluoretiķskābes ūdenī) un ar 50 % fāzi B (0,085 % (tilp./tilp.) trifluoretiķskābes acetnitrilā). HPLC analīze jāveic 10 minūtes pie

caurplūduma 0,35 ml/min un ar lineāro gradientu 10 % līdz 25 % acetnitrila, kam seko straujš palielinājums līdz 90 % acetnitrila pārējo materiālu noņemšanai. Jāinžektē vienāds tilpums katras standartvielas, parauga un kontroles. Kolonna 7 minūtes starp inžekcijām atkārtoti jālīdzsvaro. Ja tiek izmantota atšķirīga apgrieztās fāzes HPLC kolonna, var būt nepieciešams koriģēt iepriekš aprakstītos sistēmas parametrus, lai nodrošinātu cisteīna un lizīna peptīdu pienācīgu eluēšanu un integrāciju, tostarp inžekcijas tilpumu, kas var atšķirties atkarībā no izmantotās sistēmas (parasti 3–10 µl diapazonā). Ja izmanto alternatīvu HPLC sistēmu, ir svarīgi pierādīt tās līdzvērtību iepriekš aprakstītajai validētajai sistēmai (piem., testējot 2. papildinājumā norādītās standartvielas). Absorbciju monitorē pie 220 nm. Izmantojot fotodiožu matricas detektoru, jāreģistrē arī absorbcija pie 258 nm. Jāpiebilst, ka dažreiz apstrāde ar acetnitrilu var negatīvi ietekmēt peptīdu stabilitāti, un, izmantojot jaunu acetnitrila partiju, tas jānovērtē. 220 nm smailes laukuma un 258 nm smailes laukuma attiecību var izmantot par koelūcijas rādītāju. Attiecībā uz katru paraugu attiecība diapazonā no 90 % līdz 100 % no kontrolparaugu laukumu attiecības vidējās vērtības ⁽¹⁾ būtu labs indikators, ka koelūcija nav notikusi.

Var būt tādas testējamās ķīmikālijas, kuras varētu sekmēt cisteīna peptīda oksidēšanos. Dimerizēta cisteīna peptīda smaili var monitorēt vizuāli. Ja ir novērojama dimerizācija, tā jāpiefiksē, jo tā var novest pie peptīda procentuālā samazinājuma pārvērtēšanas, kā rezultātā var rasties pseidopozitīvas prognozes un/vai ķīmikālija var tikt klasificēta augstākā reaģētspējas klasē (sk. 29. un 30. punktu).

HPLC analīzi cisteīna un lizīna peptīdiem var veikt līdztekus (ja ir pieejamas divas HPLC sistēmas) vai atsevišķās dienās. Ja analīzi veic atsevišķās dienās, visus testējamās ķīmikālijas šķīdumus katrā no dienām abiem testiem sagatavo no jauna. Analīzē jāveic laika uzskaitē, lai nodrošinātu, ka pirmā parauga inžektēšana sākas 22 līdz 26 stundas pēc testējamās ķīmikālijas sajaukšanas ar peptīda šķīdumu. Jāizveido HPLC testēšanas sekvenca, lai HPLC analīzes laiks nesasniedtu 30 stundas. Validācijas pētījumā un šajā testēšanas metodē aprakstītajā HPLC sistēmā vienā HPLC izpildes reizē var iekļaut līdz pat 26 analīzes paraugus (sk. arī 17. punktu). HPLC analīzes sekvences piemērs ir sniegts 3. papildinājumā.

DATI UN PĀRSKATA SNIEGŠANA

Datu izvērtēšana

Cisteīna vai lizīna peptīda koncentrāciju nosaka fotometriski pie 220 nm katrā paraugā, izmērot attiecīgo smailes laukumu (laukumu zem līknes, AUC) un aprēķinot peptīda koncentrāciju, izmantojot lineārās kalibrācijas līkni, kas iegūta no standartvielām.

Peptīda procentuālo samazinājumu katrā paraugā nosaka, izmērot smailes laukumu un to izdalot ar attiecīgo referenckontroli C vidējo smailes laukumu (sk. 3. papildinājumu) saskaņā ar turpmāk norādīto formulu.

$$\text{Percent peptide depletion} = \left[1 - \left(\frac{\text{Peptide peak area in replicate injection}}{\text{Mean peptide peak area in reference controls C}} \right) \right] \times 100$$

Pieņemšanas kritēriji

Lai testa izpildi varētu uzskatīt par derīgu, tai jāatbilst šādiem kritērijiem:

- standarta kalibrācijas līknei jābūt $r^2 > 0,99$;

⁽¹⁾ Ar "vidējo vērtību" visā dokumentā apzīmē vidējo aritmētisko.

- b) attiecībā uz pozitīvas kontroles kanēlskābes aldehīdu trīs replikātu peptīdu procentuālā samazinājuma vidējai vērtībai jābūt 60,8 %–100 % robežās cisteīna peptīdam un 40,2 %–69,0 % robežās lizīna peptīdam, un pozitīvās kontroles replikātu maksimālajai standartnovirzei (SN) jābūt <14,9 % cisteīna procentuālajam samazinājumam un <11,6 % lizīna procentuālajam samazinājumam; un
- c) referenckontroļu A peptīda vidējai koncentrācijai jābūt 0,50±0,05 mM un deviņu referenckontroļu B un C peptīdu smaiļu smailes laukumu variācijas koeficientam (VK) acetonitrilā jābūt <15,0 %.

Ja viens vai vairāki no šiem kritērijiem nav izpildīti, tests jāatkārto.

Lai attiecībā uz testējamo ķīmikāliju iegūtos rezultātus varētu uzskatīt par derīgiem, tiem jāatbilst šādiem kritērijiem:

- a) testējamās ķīmikālijas replikātu maksimālajai standartnovirzei jābūt <14,9 % cisteīna procentuālajam samazinājumam un <11,6 % lizīna procentuālajam samazinājumam;
- b) trīs referenckontroļu C vidējai peptīdu koncentrācijai atbilstošajā šķīdinātājā jābūt 0,50±0,05 mM. Ja šie kritēriji nav izpildīti, dati jāatzīst par nederīgiem un konkrētās testējamās ķīmikālijas tests jāatkārto.

Proгноzes modelis

Aprēķina katras testējamās ķīmikālijas cisteīna un lizīna vidējo procentuālo samazinājumu. Vidējās vērtības aprēķinos negatīvu samazinājumu uzskata par "0". Izmantojot 1. tabulā norādīto cisteīna 1:10 / lizīna 1:50 prognozes modeli, ādas sensibilizatoru nošķiršanā no ādas nesensibilizatoriem saskaņā ar IATA jāizmanto vidējā peptīdu samazinājuma sliekšņvērtība 6,38 %. Prognozes modeļa pielietošana testējamās ķīmikālijas klasificēšanai reaģētspējas klasē (t. i., zema, vidēja vai augsta reaģētspēja), iespējams, varētu izrādīties noderīga potences novērtēšanai saskaņā ar IATA.

1. tabula

Cisteīna 1:10 / lizīna 1:50 prognozes modelis ⁽¹⁾

Cisteīna un lizīna vidējais samazinājums (%)	Reaģētspējas klase	DPRA prognoze ⁽²⁾
0 % ≤ vidējais procentuālais samazinājums ≤ 6,38 %	Nekāda vai minimāla reaģētspēja	Negatīva
6,38 % < vidējais procentuālais samazinājums ≤ 22,62 %	Zema reaģētspēja	Pozitīva
22,62 % < vidējais procentuālais samazinājums ≤ 42,47 %	Vidēja reaģētspēja	
42,47 % < vidējais procentuālais samazinājums ≤ 100 %	Augsta reaģētspēja	

⁽¹⁾ Šie skaitļi norāda uz statistiski ģenerētām sliekšņvērtībām un nav saistīti ar mērījuma precizitāti.

⁽²⁾ DPRA prognoze jāskata IATA kontekstā un atbilstīgi 9. un 12. punkta noteikumiem.

Ir iespējami gadījumi, kad testējamā ķīmikālija (viela vai viens vai vairāki daudzkomponentu vielas vai maisījuma komponenti) pie 220 nm uzrāda ievērojamu absorbciju un ir ar tādu pašu aizturlaiku kā peptīds (koelūcija). Koelūciju iespējams novērst, nedaudz pielāgojot HPLC sistēmu nolūkā vairāk atdalīt testējamās ķīmikālijas un peptīda eluēšanas laiku. Ja, cenšoties novērst koelūciju, izmanto alternatīvu HPLC sistēmu, jāpierāda tās līdzvērtība validētajai sistēmai (piem., testējot 2. papildinājumā norādītās standartvielas). Ja rodas koelūcija, peptīda smaili nevar integrēt un nav iespējams aprēķināt peptīda procentuālo samazinājumu. Ja šādas testējamās ķīmikālijas koelūcija rodas gan ar cisteīna, gan ar lizīna peptīdiem, analīzes rezultāts jānorāda kā “neskaidrs”. Gadījumos, kad koelūcija rodas tikai ar lizīna peptīdu, var izmantot 2. tabulā norādīto cisteīna 1:10 prognozes modeli.

2. tabula

Cisteīna 1:10 prognozes modelis ⁽¹⁾

Cisteīna (Cys) samazinājums (%)	Reaģētspējas klase	DPRA prognoze ⁽²⁾
0 % ≤ Cys procentuālais samazinājums ≤ 13,89 %	Nekāda vai minimāla reaģētspēja	Negatīva
13,89 % < Cys procentuālais samazinājums ≤ 23,09 %	Zema reaģētspēja	Pozitīva
23,09 % < Cys procentuālais samazinājums ≤ 98,24 %	Vidēja reaģētspēja	
98,24 % < Cys procentuālais samazinājums ≤ 100 %	Augsta reaģētspēja	

⁽¹⁾ Šie skaitļi norāda uz statistiski ģenerētām sliekšņvērtībām un nav saistīti ar mērījuma precizitāti.

⁽²⁾ DPRA prognoze jāskata IATA kontekstā un atbilstīgi 9. un 12. punkta noteikumiem.

Var būt citi gadījumi, kad testējamās ķīmikālijas un kāda no peptīdiem aizturlaika pārklāšanās ir nepietiekama. Tādos gadījumos peptīda procentuālā samazinājuma vērtības var aplēst un izmantot cisteīna 1:10 / lizīna 1:50 prognozes modeli, taču testējamo ķīmikāliju nevar precīzi klasificēt reaģētspējas klasē.

Ja rezultāts ir nepārprotams, testējamai ķīmikālijai vajadzētu pietikt ar vienu HPLC analīzi attiecībā gan uz cisteīna, gan lizīna peptīdu. Tomēr gadījumos, kad rezultāti ir tuvu sliekšņvērtībai, ko izmanto, lai izšķirtu starp pozitīviem un negatīviem rezultātiem (t. i., rezultāti ir neskaidri), var būt nepieciešams veikt papildu testēšanu. Ja situācijās, kad vidējais procentuālais samazinājums cisteīna 1:10 / lizīna 1:50 prognozes modeli ir 3 % līdz 10 % diapazonā vai cisteīna procentuālais samazinājums cisteīna 1:10 prognozes modeli ir 9 % līdz 17 % diapazonā, jāapsver testa izpildīšana otru reizi, kā arī trešo reizi, ja pirmajās divās reizēs iegūti nesakritīgi rezultāti.

Testēšanas pārskats

Testēšanas pārskatā jāiekļauj tālāk norādītā informācija.

Testējamā ķīmikālija

— Vienkomponenta viela:

— ķīmiskās identifikācijas dati, piem., IUPAC vai CAS nosaukums(-i), CAS numurs(-i), SMILES vai InChI kods, struktūrformula un/vai citi identifikācijas dati,

- fiziskais izskats, šķīdība ūdenī, molekulmasa un citas relevantas fizikālķīmiskās īpašības, ciktāl šī informācija ir pieejama,
 - tīrība, attiecīgā gadījumā, ja tas ir praktiski iespējams, piemaisījumu ķīmiskā identitāte u. c.,
 - apstrāde pirms testēšanas, ja tāda veikta (piem., sildīšana, smalcināšana),
 - testētā(-s) koncentrācija(-s),
 - uzglabāšanas nosacījumi un stabilitāte, ciktāl šī informācija ir pieejama.
- Daudzkomponentu vielas, UVCB un maisījumi:
- ciktāl iespējams, raksturoti ar, piem., sastāvdaļu ķīmisko identitāti (sk. iepriekš), tīrību, kvantitatīvo saturu un relevantajām fizikālķīmiskajām īpašībām.
 - fiziskais izskats, šķīdība ūdenī un citas relevantas fizikālķīmiskās īpašības, ciktāl šī informācija ir pieejama,
 - molekulmasa vai šķietamā molekulmasa maisījumiem/polimēriem ar zināmu sastāvu vai cita pētījuma norisei relevanta informācija,
 - apstrāde pirms testēšanas, ja tāda veikta (piem., sildīšana, smalcināšana),
 - testētā(-s) koncentrācija(-s),
 - uzglabāšanas nosacījumi un stabilitāte, ciktāl šī informācija ir pieejama.

Kontroles

- Pozitīvā kontrole:
- ķīmiskās identifikācijas dati, piem., IUPAC vai CAS nosaukums(-i), CAS numurs(-i), SMILES vai InChI kods, struktūrformula un/vai citi identifikācijas dati,
 - fiziskais izskats, šķīdība ūdenī, molekulmasa un citas relevantas fizikālķīmiskās īpašības, ciktāl šī informācija ir pieejama,
 - tīrība, attiecīgā gadījumā, ja tas ir praktiski iespējams, piemaisījumu ķīmiskā identitāte u. c.,
 - apstrāde pirms testēšanas, ja tāda veikta (piem., sildīšana, smalcināšana),
 - testētā(-s) koncentrācija(-s),
 - uzglabāšanas nosacījumi un stabilitāte, ciktāl šī informācija ir pieejama,
 - norāde uz vēsturiskajiem pozitīvo kontroļu rezultātiem, kas apliecina atbilstību testa izpildes pieņemamības kritērijiem (attiecīgā gadījumā).
- Šķīdinātājs/nesējs:
- izmantotais šķīdinātājs/nesējs un tā sastāvdaļu attiecība (attiecīgā gadījumā),
 - ķīmiskās identifikācijas dati, piem., IUPAC vai CAS nosaukums(-i), CAS numurs(-i) un/vai citi identifikācijas dati,
 - tīrība, attiecīgā gadījumā, ja tas ir praktiski iespējams, piemaisījumu ķīmiskā identitāte u. c.,
 - ja tiek izmantoti citi, testēšanas metodē neminēti šķīdinātāji/nesēji — fiziskais izskats, molekulmasa un citas relevantas fizikālķīmiskās īpašības, ciktāl šī informācija ir pieejama,
 - uzglabāšanas nosacījumi un stabilitāte, ciktāl šī informācija ir pieejama,

- katrai testējamai ķīmikālijai izraudzītā šķīdinātāja pamatojums,
- acetonitrilam — rezultāti testam par ietekmi uz peptīdu stabilitāti.

Peptīdu, pozitīvās kontroles un testējamās ķīmikālijas sagatavošana:

- peptīdu šķīdumu raksturojums (piegādātājs, sērijas numurs, precīzs peptīda svars, izejšķīdumam pievienotais tilpums),
- pozitīvās kontroles šķīduma raksturojums (precīzs pozitīvās kontroles vielas svars, testa šķīdumam pievienotais tilpums),
- testējamās ķīmikālijas šķīdumu raksturojums (precīzs testējamās ķīmikālijas svars, testa šķīdumam pievienotais tilpums).

HPLC instrumenta iestatījumi un analīze

- HPLC instrumenta, HPLC un aizsargkolonnu, detektora, autosamplera tips,
- HPLC analīzei relevantie parametri, piem., kolonnu temperatūra, inžekcijas tilpumi, caurplūdums un gradients.

Sistēmas piemērotība:

- katra standartvielas un referenckontroles A replikāta peptīda smailes laukums pie 220 nm,
- grafiski attēlota lineārā kalibrācijas likne un norādīts r^2 ,
- katra referenckontroles A replikāta peptīdu koncentrācija,
- vidējā peptīdu koncentrācija (mM) trīs referenckontrolēs A, standartnovirze (SN) un variācijas koeficients (VK),
- peptīda koncentrācija referenckontrolēs A un C.

Analīzes sekvence

- Referenckontrolēm:
 - peptīda smailes laukums pie 220 nm katram B un C replikātam,
 - peptīda vidējais smailes laukums pie 220 nm deviņām referenckontrolēm B un C acetonitrilā, SN un VK (attiecībā uz referenckontroļu stabilitāti analīzes laikā),
 - katram izmantotajam šķīdinātājam — peptīda vidējais smailes laukums pie 220 nm trim atbilstošajām referenckontrolēm C (peptīda procentuālā samazinājuma aprēķināšanai),
 - katram izmantotajam šķīdinātājam — peptīda koncentrācija (mM) trim atbilstošajām referenckontrolēm C,
 - katram izmantotajam šķīdinātājam — peptīda vidējā koncentrācija (mM) trim atbilstošajām referenckontrolēm C, SN un VK,
- Pozitīvajām kontrolēm:
 - peptīda smailes laukums pie 220 nm katram replikātam,
 - peptīda procentuālais samazinājums katram replikātam,
 - trīs replikātu peptīda vidējais procentuālais samazinājums, SN un VK.
- Katrai testējamai ķīmikālijai:
 - nogulšņu, ja tādas novērojamas, izskats reakcijas maisījumā inkubācijas perioda beigās; vai nogulsnes tika atkārtoti šķīdinātas vai centrifugētas,

- koelūcijas esība,
- jebkādu citu relevantu novērojumu apraksts (attiecīgā gadījumā),
- peptīda smailes laukums pie 220 nm katram replikātam,
- peptīda procentuālais samazinājums katram replikātam,
- peptīda vidējais procentuālais samazinājums trīs replikātiem, SN un VK,
- cisteīna procentuālā un lizīna procentuālā samazinājuma vidējās vērtības,
- izmantotais prognozes modelis un DPRA prognoze.

Kompetences testēšana

- Attiecīgā gadījumā procedūra, kas izmantota, lai pierādītu laboratorijas kompetenci šīs testēšanas metodes izpildē (piem., standartvielu testēšana) vai pierādītu testēšanas metodes rezultātu reproducējamību laika griezumā.

Rezultātu iztirzājums

- ar DPRA testēšanas metodi iegūto rezultātu iztirzājums,
- ar testēšanas metodi iegūto rezultātu iztirzājums IATA kontekstā, ja pieejama cita relevanta informācija.

Secinājumi

LITERATŪRAS SARAKSTS

- (1) United Nations (UN) (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Fifth revised edition, UN New York and Geneva, 2013. Pieejams: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html
- (2) OECD (2012). The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Scientific Evidence. Series on Testing and Assessment No. 168, OECD, Paris.
- (3) Šā pielikuma B.6. nodaļa "Ādas sensibilizācija".
- (4) Šā pielikuma B.42. nodaļa "Limfmezglu lokālās stimulācijas tests".
- (5) Šā pielikuma B.50. nodaļa "Ādas sensibilizācija: limfmezglu lokālās stimulācijas tests: DA".
- (6) Šā pielikuma B.51. nodaļa "Ādas sensibilizācija: limfmezglu lokālās stimulācijas tests: BrdU-ELISA".
- (7) Adler *et al.* (2011). Alternative (non-animal) methods for cosmetics testing: current status and future prospects-2010. Archives of Toxicology 85:367-485.
- (8) Gerberick *et al.* (2004). Development of a peptide reactivity assay for screening contact allergens. Toxicological Sciences 81:332-343.
- (9) Gerberick *et al.* (2007). Quantification of chemical peptide reactivity for screening contact allergens: A classification tree model approach. Toxicological Sciences 97:417-427.
- (10) EC EURL-ECVAM (2013). Recommendation on the Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA) for skin sensitisation testing. Pieejams: <https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/eurl-ecvam-recommendations/eurl-ecvam-recommendation-on-the-direct-peptide-reactivity-assay-dpra>
- (11) Jaworska *et al.* (2013). Bayesian integrated testing strategy to assess skin sensitization potency: from theory to practice. Journal of Applied Toxicology, published online, 14 May 2013, DOI: 10.1002/jat.2869.

-
- (12) Bauch *et al.* (2012). Putting the parts together: combining *in vitro* methods to test for skin sensitizing potential. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 63: 489-504.
- (13) Nukada *et al.* (2013). Data integration of non-animal tests for the development of a test battery to predict the skin sensitizing potential and potency of chemicals. *Toxicology in vitro* 27:609 618.
- (14) Ball *et al.* (2011). Evaluating the sensitization potential of surfactants: integrating data from the local lymph node assay, guinea pig maximization test, and *in vitro* methods in a weight-of-evidence approach. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 60:389-400.
- (15) Landsteiner and Jacobs (1936). Studies on the sensitization of animals with simple chemical compounds. *Journal of Experimental Medicine* 64:625-639.
- (16) Dupuis and Benezra (1982). Allergic contact dermatitis to simple chemicals: a molecular approach. New York & Basel: Marcel Dekker Inc.
- (17) Lepoittevin *et al.* (1998). Allergic contact dermatitis: the molecular basis. Springer, Berlin.
- (18) EC EURL ECVAM (2012). Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA) Validation Study Report 74pp. Pieejams: http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/eurl-ecvam/eurl-ecvam-recommendations/eurl-ecvam-recommendation-on-the-direct-peptide-reactivity-assay-dpra
- (19) Natsch *et al.* (2013). A dataset on 145 chemicals tested in alternative assays for skin sensitization undergoing prevalidation. *Journal of Applied Toxicology*, published online, 9 April 2013, DOI:10.1002/jat.2868.
- (20) DB-ALM (INVITTOX) Protocol 154: Direct Peptide Reactivity assay (DPRA) for skin sensitisation testing 17pp. Pieejams: <http://ecvam-dbal.m.jrc.ec.europa.eu/>
- (21) OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. OECD Series on Testing and Assessment, No. 34. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris, France.
- (22) FDA (Food and Drug Administration (2001). Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation 22pp. Pieejams: www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidance/ucm070107.pdf – 138
- (23) ECETOC (2003). Contact sensitization: Classification according to potency. European Centre for Ecotoxicology & Toxicology of Chemicals (Technical Report No. 87).
-

1. papildinājums

DEFINĪCIJAS

Pareizība: pakāpe, kādā ar testēšanas metodi iegūto mērījumu rezultāti sakrīt ar pieņemtajām atsaucēs vērtībām. Tas ir testēšanas metodes veikspējas raksturlielums un viens no tās “relevantuma” aspektiem. Šo terminu bieži izmanto ar nozīmi “konkordantums”, ar to domājot testēšanas metodes pareizo rezultātu īpatsvaru (21).

AOP (nelabvēlīga iznākuma ceļš): no mērķķīmikālijas vai līdzīgu ķīmikāliju grupas ķīmiskās struktūras izrietoša notikumu sekvenca no molekulārā iniciācijas notikuma līdz interesējošajam *in vivo* rezultātam (2).

Kalibrēšanas līkne: sakarība starp zināmas vielas eksperimentā noteikto atbildreakcijas vērtību un analītisko koncentrāciju (saukta arī par *standartlīkni*).

Ķīmikālija: viela vai maisījums.

Variācijas koeficients: mainības mērs, ko aprēķina replikātu datu grupai, standartnovirzi izdalot ar vidējo vērtību. Lai to izteiktu procentos, to reizina ar 100.

Bīstamība: īpašība, kas raksturo tādu aģentu vai situāciju, kurai piemīt potenciāls atstāt nelabvēlīgu ietekmi uz šim aģentam eksponētu organismu, sistēmu vai (apakš)populāciju.

IATA (integrētā testēšanas un novērtēšanas pieeja): strukturēta pieeja, ko izmanto ķīmikālijas vai ķīmikāliju grupas bīstamības identificēšanai (potenciāls), bīstamības raksturošanai (potence) un/vai drošuma novērtēšanai (potenciāls/potence un ekspozīcija) un kas stratēģiskā veidā integrē un izsver visus relevantos datus, lai varētu pieņemt normatīvu lēmumu par potenciālo bīstamību un/vai risku, un/vai nepieciešamību veikt turpmāku konkrētu un līdz ar to minimālu testēšanu.

Molekulārais iniciācijas notikums: ķīmikālijas inducēta bioloģiskās sistēmas perturbācija molekulārā līmenī, kas identificēta kā nelabvēlīga iznākuma ceļa sākumnotikums.

Maisījums: maisījums vai šķīdums, kas sastāv no divām vai vairāk vielām, kuras tajā savstarpēji nereaģē (1).

Vienkomponenta viela: viela, definēta ar tās kvantitatīvo sastāvu, kurā viena galvenā sastāvdaļa veido vismaz 80 % (masas).

Daudzkomponentu viela: viela, definēta ar tās kvantitatīvo sastāvu, kurā vairāk nekā viena no galvenajām sastāvdaļām ir koncentrācijā ≥ 10 % (masas) un < 80 % (masas). Daudzkomponentu vielas tiek saražotas. Atšķirība starp maisījumu un daudzkomponentu vielu ir tāda, ka maisījumu iegūst, divas vai vairākas vielas sajaucot bez ķīmiskas reakcijas. Daudzkomponentu vielas rodas ķīmiskās reakcijās.

Pozitīvā kontrole: replikāts, kurā ir visi testa sistēmas komponenti un kurš apstrādāts ar vielu, par ko ir zināms, ka tā izraisa pozitīvu atbildreakciju. Lai būtu iespēja novērtēt pozitīvās kontroles atbildreakcijas mainību laikā, pozitīvās atbildreakcijas intensitāte nedrīkstētu būt pārlieku liela.

Referenckontrole: neapstrādāts paraugs, kurā ir visi testa sistēmas komponenti, tostarp šķīdinātājs vai nesējs, ko izmanto ar testējamo ķīmikāliju apstrādātajos paraugos un citos kontrolparaugos, un kuru izmanto, lai noteiktu bāzlinijas atbildreakciju paraugiem, kas apstrādāti ar attiecīgajā šķīdinātājā vai nesējā izšķīdinātu testējamo ķīmikāliju. Ja testā izmanto arī paralēlu negatīvo kontroli, šis paraugs parāda arī to, vai šķīdinātājs vai nesējs mijiedarbojas ar testa sistēmu.

Relevantums: parametrs, kas raksturo testa attiecināmību uz interesējošo ietekmi un to, vai testu lietot konkrētam nolūkam ir jēgpilni un noderīgi. Pakāpe, kādā ar testu var pareizi izmērīt vai prognozēt interesējošo bioloģisko ietekmi. Relevantums ietver arī testēšanas metodes pareizības (konkordantuma) aspektu (21).

Ticamība: parametrs, kas izsaka, kādā pakāpē tajā pašā vai citā laboratorijā ilgākā laikā, izmantojot to pašu protokolu, var iegūt reproducējamus rezultātus. To novērtē, aprēķinot metodes reproducējamību dažādās laboratorijās un atkārtojamību tajā pašā laboratorijā (21).

Reproducējamība: tādu rezultātu savstarpējā atbilstība, kas iegūti, ar vienu un to pašu testa protokolu testējot vienu to pašu ķīmikāliju (sk. "Ticamība") (21).

Jutība: tas, cik liela daļa no visām pozitīvajām/aktīvajām ķīmikālijām ar testēšanas metodi tiek klasificētas pareizi. Tas ir tādas testēšanas metodes pareizības mērs, ar kuru iegūst kategoriālus rezultātus, un svarīgs faktors testēšanas metodes relevantuma izvērtēšanā (21).

Specifiskums: tas, cik liela daļa no visām negatīvajām/neaktīvajām ķīmikālijām ar testēšanas metodi tiek klasificētas pareizi. Tas ir tādas testēšanas metodes pareizības mērs, ar kuru iegūst kategoriālus rezultātus, un svarīgs faktors testēšanas metodes relevantuma izvērtēšanā (21).

Vielā: dabiski radušies vai ražošanas procesā iegūti ķīmiskie elementi un to savienojumi, ieskaitot produkta stabilizācijai vajadzīgās piedevas, kā arī izmantotajos procesos radušos piejaukumus, bet izņemot šķīdinātājus, kurus var atdalīt, neietekmējot vielas stabilitāti un neizmainot tās sastāvu (1).

Sistēmas piemērotība: instrumenta veikspējas (piem., jutības) noteikšana, analizējot references standartvielu pirms analītiskās partijas izmantošanas (22).

Testējamā ķīmikālija: terminu "testējamā ķīmikālija" izmanto, lai apzīmētu to, kas tiek testēts.

Apvienoto Nāciju Organizācijas Ķīmikāliju klasificēšanas un marķēšanas globāli harmonizētā sistēma (ANO GHS): sistēma, kurā ķīmikālijas (vielas un maisījumus) klasificē pēc standartizētiem fizisko apdraudējumu, veselības apdraudējumu un vidisko apdraudējumu tipiem un līmeņiem un kura paredz atbilstošus saziņas elementus, piem., piktogrammas, signālvārdus, bīstamības apzīmējumus, drošības prasību apzīmējumus un drošības datu lapas, ar mērķi sniegt informāciju par ķīmikāliju nelabvēlīgo ietekmi, lai aizsargātu cilvēkus (tostarp darba devējus, darba ņēmējus, transporta darbiniekus, patērētājus un avārijas dienestu darbiniekus) un vidi (1).

UVCB: viela, kuras sastāvs nav zināms vai ir mainīgs, kura ir kompleksi reakcijas produkti vai bioloģiski materiāli.

Derīga testēšanas metode: testēšanas metode, kas tiek uzskatīta par pietiekami relevantu un ticamu konkrētam nolūkam un kas ir balstīta uz zinātniskiem principiem. Testēšanas metode nekad nav derīga absolūtā izteiksmē; tā vienmēr ir derīga tikai kādam konkrētam nolūkam (21).

2. papildinājums

STANDARTVIELAS

In chemico ādas sensibilizācija: tiešais peptīdreagētspējas tests

Pirms šīs testēšanas metodes regulāras izmantošanas laboratorijām jāpierāda sava tehniskā kompetence, pareizi nosakot gaidāmo DPRA prognozi 1. tabulā ieteiktajām 10 standartvielām un iegūstot cisteīna un lizīna samazinājuma vērtības, kuras ietilpst attiecīgajā references diapazonā attiecībā uz 8 no 10 standartvielām katram peptīdam. Šīs standartvielas ir atlasītas tā, lai tās reprezentētu visu ādas sensibilizācijas apdraudējumu izraisīto atbildreakciju diapazonu. Citi atlasē kritēriji bija vielu pieejamība tirgū, kvalitatīvu *in vivo* atsaucē datu pieejamība un kvalitatīvu ar DPRA metodi iegūtu *in vitro* datu pieejamība un to izmantotība EURL ECVAM koordinētā validācijas pētījumā, lai pierādītu šīs testēšanas metodes sekmīgu īstenošanu laboratorijās, kuras piedalās pētījumā.

1. tabula

Standartvielas, kuras ieteicams izmantot, lai pierādītu tehnisko kompetenci izmantot tiešo peptīdreagētspējas testu

Standartvielas	CAS Nr.	Fizikālais stāvoklis	<i>In vivo</i> prognoze ⁽¹⁾	DPRA prognoze ⁽²⁾	Cisteīna peptīda procentuālā samazinājuma diapazons ⁽³⁾	Lizīna peptīda procentuālā samazinājuma diapazons ⁽³⁾
2,4-dinitrochlorbenzols	97-00-7	Ciets	Sensibilizators (ļoti spēcīgs)	Pozitīvs	90-100	15-45
Oksazolons	15646-46-5	Ciets	Sensibilizators (ļoti spēcīgs)	Pozitīvs	60-80	10-55
Formaldehīds	50-00-0	Šķidr	Sensibilizators (spēcīgs)	Pozitīvs	30-60	0-24
Benzilidēnacetons	122-57-6	Ciets	Sensibilizators (vidējs)	Pozitīvs	80-100	0-7
Farnezāls	19317-11-4	Šķidr	Sensibilizators (vājš)	Pozitīvs	15-55	0-25
2,3-Butāndions	431-03-8	Šķidr	Sensibilizators (vājš)	Pozitīvs	60-100	10-45
1-Butanols	71-36-3	Šķidr	Nav sensibilizators	Negatīvs	0-7	0-5,5
6-Metilkumarīns	92-48-8	Ciets	Nav sensibilizators	Negatīvs	0-7	0-5,5

Standartvielas	CAS Nr.	Fizikālais stāvoklis	<i>In vivo</i> prognoze ⁽¹⁾	DPRA prognoze ⁽²⁾	Cisteīna peptīda procentuālā samazinājuma diapazons ⁽³⁾	Lizīna peptīda procentuālā samazinājuma diapazons ⁽³⁾
Pienskābe	50-21-5	Šķidr	Nav sensibilizators	Negatīvs	0-7	0-5,5
4-Metoksiacetofenons	100-06-1	Ciets	Nav sensibilizators	Negatīvs	0-7	0-5,5

⁽¹⁾ *In vivo* bīstamības (un potences) prognozes ir balstītas uz LLNA datiem (19). *In vivo* potence ir noteikta, izmantojot ECETOC ierosinātos kritērijus (23).

⁽²⁾ DPRA prognoze jāskata IATA kontekstā un atbilstīgi 9. un 11. punkta noteikumiem.

⁽³⁾ Diapazoni noteikti, pamatojoties uz vismaz 10 samazinājumu vērtībām, kas iegūtas 6 neatkarīgās laboratorijās.

3. papildinājums

ANALĪZES SEKVENCES PIEMĒRI

Kalibrācijas standarti un referenckontroles	STD1 STD2 STD3 STD4 STD5 STD6 Atšķaidīšanas bufersķīdums Referenckontrole A, replikāts 1 Referenckontrole A, replikāts 2 Referenckontrole A, replikāts 3
Koelūcijas kontroles	Koelūcijas kontrole 1 testējamai ķimikālijai 1 Koelūcijas kontrole 2 testējamai ķimikālijai 2
Standartvielu kontroles	Referenckontrole B, replikāts 1 Referenckontrole B, replikāts 2 Referenckontrole B, replikāts 3
Pirmais replikātu kopums	Referenckontrole C, replikāts 1 Kanēlskābes aldehīds, replikāts 1 Paraugs 1, replikāts 1 Paraugs 2, replikāts 1
Otrais replikātu kopums	Referenckontrole C, replikāts 2 Kanēlskābes aldehīds, replikāts 2 Paraugs 1, replikāts 2 Paraugs 2, replikāts 2
Trešais replikātu kopums	Referenckontrole C, replikāts 3 Kanēlskābes aldehīds, replikāts 3 Paraugs 1, replikāts 3 Paraugs 2, replikāts 3
Referenckontroles	Referenckontrole B, replikāts 4 Referenckontrole B, replikāts 5 Referenckontrole B, replikāts 6

Analīzes sekvencē jāiekļauj trīs referenckontroļu kopumi (t. i., paraugi, kuru sastāvā ir vienīgi pienācīgajā šķīdinātājā izšķīdināts peptīds):

Referenckontroli A izmanto, lai verificētu *HPLC* sistēmas piemērotību.

Referenckontroli B iekļauj analīzes sākumā un beigās, lai verificētu referenckontroļu stabilitāti analīzes veikšanas laikā.

Referenckontroli C analīzes sekvencē iekļauj tāpēc, lai apstiprinātu, ka testa ķimikālijas atšķaidīšanai izmantotais šķīdinātājs neietekmē peptīdu procentuālo samazinājumu.

B.60. *In vitro* ādas sensibilizācija: ARE-Nrf2 luciferāzes testēšanas metode

IEVADS

Šī testēšanas metode (TM) ir ekvivalenta ESAO testēšanas vadlīnijai (TG) Nr. 442D (2015). Ādas sensibilizators ir viela, kas, nonākot saskarē ar ādu, izraisa alerģisku atbildreakciju, atbilstoši definīcijai, kas dota Apvienoto Nāciju Organizācijas (ANO) Ķīmikāliju klasificēšanas un marķēšanas globāli harmonizētajā sistēmā (GHS) (1) un Regulā (EK) Nr. 1272/2008 par vielu un maisījumu klasificēšanu, marķēšanu un iepakojšanu (CLP regula) ⁽¹⁾. Šī testēšanas metode piedāvā *in vitro* procedūru (ARE-Nrf2 luciferāzes analīzi), kas izmantojama, lai saskaņā ar ANO GHS (1) un CLP regulu ādas sensibilizatorus nošķirtu no ādas nesensibilizatoriem.

Pastāv vispārēja vienprātība par galvenajiem bioloģiskajiem notikumiem, kas ir ādas sensibilizācijas pamatā. Esošās zināšanas par ķīmiskajiem un bioloģiskajiem mehānismiem, kas saistīti ar ādas sensibilizāciju, ir apkopotas, izveidojot nelabvēlīga iznākuma ceļu (*Adverse Outcome Pathway*, AOP) (2) — no molekulārā iniciācijas notikuma un starpposma notikumiem līdz nelabvēlīgai ietekmei uz veselību, proti, alerģiskam kontaktdermatītam cilvēkos vai kontakthipersensibilizācijai grauzējos (2) (3). Molekulārais iniciācijas notikums ir elektrofilu vielu kovalenta saistīšanās ar nukleofilajiem centriem ādas proteīnos. Otrais būtiskais notikums šajā AOP notiek keratinocītos un ietver iekaisuma atbildreakcijas, kā arī gēnu ekspresiju, kas saistīta ar konkrētiem šūnu signālceļiem, piem., no antioksidanta/elektrofila atbildreakcijas elementa (ARE) atkarīgiem ceļiem. Trešais būtiskais notikums ir dendrītisko šūnu aktivācija, ko parasti novērtē pēc ekspresētajiem specifiskajiem šūnu virsmas marķieriem, hemokīniem un citokīniem. Ceturtais būtiskais notikums ir T šūnu savairošanās, ko peļu limfmezglu lokālās stimulācijas testā novērtē netieši (4).

Līdz šim ādas sensibilizācijas novērtēšanai parasti izmantoti laboratorijas dzīvnieki. Ar klasiskām metodēm, kurās izmanto jūrascūciņas, — Magnusona–Kligmana maksimizācijas testu jūrascūciņām [*Magnusson Kligman Guinea Pig Maximisation Test*, GMPT] un Bīlera [*Buehler*] testu (TM B.6 (5)) — tiek pētīta gan ādas sensibilizācijas indukcijas fāze, gan tās izpausmes fāze. Atzinīgi novērtēts ir arī tests ar pelēm, proti, limfmezglu lokālās stimulācijas tests [*Local Lymph Node Assay*, LLNA] (TM B.42 (4)) un abas šīs metodes modifikācijas, kurās nav radioaktīvo komponentu, proti, LLNA: DA (TM B.50 (6)) un LLNA:BrdU-ELISA (TM B.51 (7)), kurās visās novērtē vienīgi indukcijas reakciju, jo visas šīs metodes dzīvnieku labturības un objektīva ādas sensibilizācijas indukcijas fāzes mērījuma ziņā ir pārākas par testēšanas metodēm ar jūrascūciņām.

Pēdējā laikā mehānistiskās *in chemico* un *in vitro* testēšanas metodes tiek uzskatītas par zinātniski derīgām metodēm ķīmikāliju radīto ādas sensibilizācijas apdraudējumu izvērtēšanai. Tomēr, lai būtu iespējams pilnīgi aizstāt pašreizējos testus ar dzīvniekiem, integrētās testēšanas un novērtēšanas pieejās (*Integrated Approaches to Testing and Assessment*, IATA) jākombinē vairākas metodes (*in silico*, *in chemico*, *in vitro*), kurās dzīvniekus neizmanto, ņemot vērā, ka katrai pašreiz pieejamajai bezdzīvnieku metodei ir ierobežots mehānistiskais AOP tvērums (2) (3).

Šī testēšanas metode (ARE-Nrf2 luciferāzes tests) ieteicama 2. punktā minētā otrā būtiskā notikuma izskatīšanai. Ir ziņots, ka ādas sensibilizatori inducē gēnus, kurus regulē antioksidanta atbildreakcijas elements (ARE) (8) (9). Tādas nelielas elektrofilas vielas kā ādas sensibilizatori var iedarboties uz sensoro proteīnu *Keap1* (*Kelch* tipa ar ECH asociētais proteīns 1), piemēram, kovalenti modificējot tā cisteīna atliekas, kā rezultātā tas disociējas no transkripcijas faktora *Nrf2* (*nuclear factor-erythroid 2-related factor 2*). Pēc tam disociētais *Nrf2* var aktivizēt no ARE atkarīgos gēnus, piemēram, tādus, kuri kodē II fāzes detoksificējošus fermentus (8) (10) (11).

Patlaban vienīgais *in vitro* ARE-Nrf2 luciferāzes tests, ko aptver šī testēšanas metode, ir *KeratinSens*TM tests, par kuru ir pabeigti validācijas pētījumi (9) (12) (13), kam sekoja neatkarīga profesionālvērtēšana, kuru veica Eiropas Savienības references laboratorija dzīvnieku testēšanai alternatīvu metožu jomā (EURL ECVAM) (14). *KeratinSens*TM tests tika uzskatīts par zinātniski derīgu izmantošanai IATA ietvaros nolūkā nošķirt ādas sensibilizatorus no ādas nesensibilizatoriem ar mērķi klasificēt un marķēt apdraudējumu (14). Laboratorijas, kuras vēlas izmantot šo testēšanas metodi, var iegūt *KeratinSens*TM testā izmantoto rekombinanto šūnu līniju, noslēdzot licences līgumu ar šīs testēšanas metodes izstrādātāju (15).

⁽¹⁾ Eiropas Parlamenta un Padomes 2008. gada 16. decembra Regula (EK) Nr. 1272/2008 par vielu un maisījumu klasificēšanu, marķēšanu un iepakojšanu un ar ko groza un atceļ Direktīvas 67/548/EEK un 1999/45/EK un groza Regulu (EK) Nr. 1907/2006 (OV L 353, 31.12.2008., 1. lpp.).

Definīcijas ir sniegtas 1. papildinājumā.

SĀKOTNĒJIE APSVĒRUMI, PIEMĒROJAMĪBA UN IEROBEŽOJUMI

Tā kā *Keap1-Nrf2-ARE* ceļa aktivācija apskata vienīgi otro būtisko ādas sensibilizācijas AOP notikumu, uz šā ceļa aktivāciju balstītu testēšanas metožu sniegtā informācija, visticamāk, viena pati nebūs pietiekama, lai izdarītu secinājumu par ķīmikāliju radīto ādas sensibilizācijas potenciālu. Tādēļ ar šo testēšanas metodi iegūtie dati jāskata integrētas pieejas, piem., IATA, satvarā un jāapvieno ar citu papildinformāciju, piem., tādu, kas iegūta *in vitro* testos, kuros apskatīti citi būtiski ādas sensibilizācijas AOP notikumi, kā arī ar metodēm, kuras neietver testēšanu un kurās pēc analogijas principa ("aplūkot līdzīgu") tiek izmantota informācija par ķīmiskajiem analogiem. Piemēri *ARE-Nrf2* luciferāzes testēšanas metodes izmantošanai kopā ar citu informāciju ir sniegti literatūrā (13) (16) (17) (18) (19).

Šo testēšanas metodi var izmantot tam, lai saskaņā ar IATA būtu vieglāk ādas sensibilizatorus (t. i., ANO *GHS/CLP* 1. kategorija) nošķirt no ādas nesensibilizatoriem. Šo testēšanas metodi nevar izmantot vienu pašu ne ādas sensibilizatoru klasificēšanai apakškategorijās 1.A un 1.B saskaņā ar ANO *GHS/CLP*, ne potences prognozēšanai drošuma novērtējuma lēmumiem. Tomēr atkarībā no tiesiskā regulējuma pozitīvu rezultātu var vienu pašu izmantot ķīmikālijas klasificēšanai ANO *GHS/CLP* 1. kategorijā.

Pamatojoties uz validācijas pētījuma datu kopu un iekšējo testēšanu testēšanas metodes neatkarīgajai profesionālizvērtēšanai, ir pierādīts, ka *KeratinoSens*TM tests ir izmantojams laboratorijās, kurām ir pieredze darbā ar šūnu kultūru. Prognožu reproducējamības līmenis, kas sagaidāms no šīs testēšanas metodes, ir aptuveni 85 % gan tajā pašā laboratorijā, gan citās laboratorijās (14). *KeratinoSens*TM testa pareizība (77 % — 155/201), jutība (78 % — 71/91) un specifiskums (76 % — 84/110) ādas sensibilizatoru (t. i., ANO *GHS/CLP* 1. kat.) nošķiršanā no ādas nesensibilizatoriem salīdzinājumā ar *LNNA* rezultātiem, tika aprēķināti, ņemot vērā visus *EURL ECVAM* datus, kas tika iesniegti testēšanas metodes izvērtēšanai un profesionālizvērtēšanai (14). Šie skaitļi ir līdzīgi tiem, kas nesen publicēti, pamatojoties uz aptuveni 145 vielu iekšējo testēšanu (77 % pareizība, 79 % jutība, 72 % specifiskums) (13). Visticamāk, *KeratinoSens*TM testā pārāk zemu tiks novērtētas tās ķīmikālijas, kurām novērojama zema līdzvieda ādas sensibilizācijas potence (t. i., ANO *GHS/CLP* 1.B apakškategorija), nevis tās ķīmikālijas, kurām novērojama augsta ādas sensibilizācijas potence (t. i., ANO *GHS/CLP* 1.A apakškategorija) (13) (14). Visa šī informācija kopā norāda uz to, ka *KeratinoSens*TM tests var palīdzēt identificēt ādas sensibilizācijas apdraudējumus. Tomēr pareizības vērtības, kas šeit sniegtas attiecībā uz *KeratinoSens*TM testu kā atsevišķu testēšanas metodi, ir tikai orientējošas, jo šī testēšanas metode jāskata kombinācijā ar citiem informācijas avotiem saskaņā ar IATA un atbilstīgi 9. punkta noteikumiem. Turklāt, izvērtējot ādas sensibilizācijas novērtēšanas metodes, kurās neizmanto dzīvniekus, jāņem vērā, ka *LLNA* tests, kā arī citi testi ar dzīvniekiem var nepilnīgi atspoguļot situāciju interesējošajā sugā, t. i., cilvēkos.

Terminu "testējamā ķīmikālija" šajā testēšanas metodē izmanto, lai apzīmētu to, kas tiek testēts, un tas nav saistīts ar *ARE-Nrf2* luciferāzes testēšanas metodes pielietojamību vielu un/vai maisījumu testēšanā. Pamatojoties uz patlaban pieejamajiem datiem, ir pierādīts, ka *KeratinoSens*TM testu var izmantot testējamām ķīmikālijām, kas aptver dažādas organiskās funkcionālās grupas, atbildreakciju mehānismus, ādas sensibilizācijas potenci (kā noteikts *in vivo* pētījumos) un fizikālķīmiskās īpašības (9) (12) (13) (14). Galvenokārt tika testētas vienkomponeņu vielas, kaut arī ir pieejams neliels daudzums datu arī par maisījumu testēšanu (20). Tomēr šī testēšanas metode ir tehniski piemērojama daudzkomponentu vielu un maisījumu testēšanai. Tomēr pirms šīs testēšanas metodes izmantošanas maisījumam, lai iegūtu datus kādam normatīvajam mērķim, jāapsver, vai un kādēļ tā varētu sniegt minētajam mērķim piemērotus rezultātus. Ja pastāv normatīva prasība maisījumu testēt, tāda apsvēršana nav vajadzīga. Turklāt, testējot daudzkomponentu vielas vai maisījumus, jāapsver iespējamā ietekme, ko citotoksiskie komponenti varētu atstāt uz novērotajām atbildreakcijām. Šī testēšanas metode ir izmantojama testējamajām ķīmikālijām, kuras šķīst vai stabili disperģējas (t. i., koloīds vai suspensija, kurā testējamā ķīmikālija nenosēžas vai neatdalās no

šķīdinātāja dažādās fāzēs) ūdenī vai DMSO (tostarp visi testējamās ķīmikālijas komponenti, ja testēšana notiek ar daudzkomponentu vielu vai maisījumu). Testējamās ķīmikālijas, kuras pie augstākās nepieciešamās galīgās koncentrācijas 2 000 µM (sk. 22. punktu) šiem nosacījumiem neatbilst, joprojām ir iespējams testēt pie zemākām koncentrācijām. Tādā gadījumā rezultātus, kuri atbilst 39. punktā aprakstītajiem pozitīvuma kritērijiem, joprojām varētu izmantot, lai testējamo ķīmikāliju identificētu kā ādas sensibilizatoru, turpretī negatīvs rezultāts, kas iegūts pie koncentrācijas < 1 000 µM, jāuzskata par neskaidru (sk. prognozes modeli 39. punktā). Kopumā vielas, kuru LogP nepārsniedz 5, ir veiksmīgi testētas, turpretī stipri hidroforas vielas, kuru LogP pārsniedz 7, atrodas ārpus testēšanas metodes zināmās izmantojamības (14). Par vielām, kuru LogP atrodas 5–7 robežās, ir pieejama vienīgi ierobežota informācija.

Negatīvi rezultāti jāinterpretē piesardzīgi, jo vielas, kas reaģē tikai ar lizīna atliekām, ar šo testēšanas metodi var detektēt kā negatīvas. Turklāt izmantotās šūnu līnijas ierobežotās metaboliskās kapacitātes (21) un eksperimentālo apstākļu dēļ negatīvus rezultātus var iegūt arī ar prohaptēniem (t. i., ķīmikālijām, kurām nepieciešama fermentatīva aktivācija, piem., ar P450 fermentiem) un prehaptēniem (t. i., ķīmikālijām, kuras aktivizē ar autooksidēšanos), jo īpaši tad, ja oksidācija norit lēni. No otras puses, testējamās ķīmikālijas, kuras neiedarbojas kā sensibilizators, bet tik un tā ir ķīmiski stresori, var radīt pseidopozitīvus rezultātus (14). Turklāt ne vienmēr ir iespējams ticami novērtēt ārkārtīgi citotoksiskas testējamās ķīmikālijas. Visbeidzot, testējamās ķīmikālijas, kuras ietekmē luciferāzes fermentu, var radīt maldīgu priekšstatu par luciferāzes aktivitāti uz šūnām balstītās analizēs, izraisot vai nu šķietamu inhibēšanos, vai pastiprinātu luminiscenci (22). Piem., ir ziņots, ka fitoestrogēna koncentrācijas, kas lielākas par 1 µM, citos uz luciferāzi balstītos ziņotājgēnu testos radījušas luminiscences signālu traucējumus luciferāzes ziņotājgēna pārmērīgas aktivācijas dēļ (23). Tāpēc piesardzīgi jāizmeklē luciferāzes ekspresija, kas iegūta pie augstām fitoestrogēnu koncentrācijām vai tādu līdzīgu ķīmikāliju koncentrācijām, par kurām ir aizdomas, ka tās rada fitoestrogēnam līdzīgu pārmērīgu luciferāzes ziņotājgēna aktivāciju (23). Gadījumos, kad ir iespējams pierādīt, ka testēšanas metode nav pielietojama citām konkrētām testējamo ķīmikāliju kategorijām, šo testēšanas metodi minētajām konkrētajām kategorijām neizmanto.

Papildus tam, ka *KeratinoSens*TM tests palīdz nošķirt ādas sensibilizatorus no ādas nesensibilizatoriem, tas arī sniedz informāciju par koncentrāciju-atbildreakciju, kas var palīdzēt novērtēt sensibilizatora potenci, ja to izmanto integrētās pieejas, piem., IATA (19). Tomēr jāveic turpmāks darbs, ko vēlams balstīt uz uzticamiem datiem par cilvēkiem, lai noteiktu, kā *KeratinoSens*TM testa rezultāti var palīdzēt novērtēt potenci (24) un sensibilizatorus klasificēt apakškategorijās saskaņā ar ANO *GHS/CLP*.

TESTA PRINCIPS

ARE-Nrf2 luciferāzes testēšanas metodē tiek izmantota imortalizēta adherento šūnu līnija, kas iegūta no *HaCaT* cilvēka keratinocītiem, kuri stabili transfektēti ar selektējamu plazmīdu. Šī šūnu līnija satur luciferāzes gēnu, ko transkriptīvi kontrolē konstitutīvs promotors, kurš ir savienojies ar ARE elementu no gēna, par ko ir zināms, ka kontaktsensibilizators palielina tā ekspresiju (25) (26). Luciferāzes signāls atspoguļo to, ka sensibilizatori aktivējuši no endogēnā Nrf2 atkarīgos gēnus, un ir pierādīta luciferāzes signāla atkarība no Nrf2 rekombinantajā šūnu līnijā (27). Tas ļauj kvantitatīvi (ar luminiscences detekciju) izmērīt luciferāzes gēna indukciju, izmantojot labi zināmus gaismu radošus luciferāzes substrātus, kas kalpo par Nrf2 transkripcijas faktora aktivitātes rādītāju šūnās pēc to ekspozīcijas elektrofīlām vielām.

Testējamās ķīmikālijas *KeratinoSens*TM testā tiek uzskatītas par pozitīvām, ja tās izraisa statistiski nozīmīgu luciferāzes aktivitātes indukciju, kas pārsniedz doto sliekšņvērtību (t. i., > 1,5-kārtīgs jeb 50 % pieaugums), zem noteiktas koncentrācijas, kam nav būtiskas ietekmes uz šūnu dzīvotspēju (t. i., zem 1 000 µM, un pie koncentrācijas, kurā šūnu dzīvotspēja pārsniedz 70 % (9) (12)). Šim nolūkam tiek noteikta luciferāzes aktivitātes maksimālā indukcija kārtās attiecībā pret šķīdinātāja (negatīvo) kontroli (I_{max}). Turklāt, tā kā šūnas tiek eksponētas testējamās ķīmikālijas koncentrāciju sērijai, no devas-atbildreakcijas līknes jāinterpolē, pie kādas koncentrācijas luciferāzes aktivitāte tiek inducēta statistiski nozīmīgi virs sliekšņvērtības (t. i., $EC_{1,5}$ vērtība) (aprēķinus sk. 32. punktā). Visbeidzot, līdztekus jāveic citotoksiskātes mērījumi, lai novērtētu, vai luciferāzes aktivitātes indukcijas līmeņi ir novērojami pie subcitotoksiskām koncentrācijām.

Pirms šai testēšanas metodei atbilstoša *ARE-Nrf2* luciferāzes testa regulāras izmantošanas laboratorijām jāpierāda sava tehniskā kompetence, izmantojot 2. papildinājumā uzskaitītās desmit standartvielas.

Lai būtu vieglāk validēt jaunas vai grozītas *in vitro ARE-Nrf2* luciferāzes testēšanas metodes, kas līdzinās *KeratinoSensTM* testam, un lai šo testēšanas metodi būtu iespējams savlaicīgi grozīt ar mērķi tajā iekļaut šīs metodes, ir pieejami veikspējas standarti (VS) (28) Attiecībā uz testēšanas metodēm, kuras validētas saskaņā ar VS, datu savstarpējā atzīšana (*Mutual Acceptance of Data, MAD*) saskaņā ar ESAO nolīgumu būs garantēta tikai tad, ja ESAO šīs testēšanas metodes būs izskatījusi un iekļāvusi attiecīgajā testēšanas vadlīnijā.

PROCEDŪRA

Patlaban vienīgā metode, ko aptver šī testēšanas metode, ir zinātniski derīgais *KeratinoSensTM* tests (9) (12) (13) (14). *KeratinoSensTM* testam ir pieejamas standartprocedūras, kas jāizmanto, šo testēšanas metodi ieviešot un izmantojot laboratorijā (15). Laboratorijas, kuras vēlas šo testēšanas metodi ieviest, var iegūt *KeratinoSensTM* testā izmantoto rekombinanto šūnu līniju, noslēdzot licences līgumu ar šīs testēšanas metodes izstrādātāju. Turpmākajos punktos sniegts *ARE Nrf2* luciferāzes testēšanas metodes galveno komponentu un procedūru apraksts.

Keratinocītu kultūru sagatavošana

Jāizmanto transgēnu šūnu līnija, kam ir stabila luciferāzes ziņotāģēna insercija, ko kontrolē *ARE* elements (piem., *KeratinoSensTM* šūnu līnija). Saņemot šūnas, tās pavairo (piem., 2–4 pasāžas) un uzglabā sasaldētas kā viendabīgu krājumu. Šūnas no šā sākotnējā krājuma var pavairot līdz maksimālajam pasāžu skaitam (t. i., 25 pasāžas *KeratinoSensTM* gadījumā), un ar tām veic parasto testēšanu, kurā izmanto atbilstošu uzturēšanas barotni (*KeratinoSensTM* testam tā ir serumu un genetiķu saturoša *DMEM*).

Veicot testēšanu, šūnu konfluenci jābūt 80–90 % robežās, un jā rūpējas, lai šūnas nekad nesasniegtu pilnīgu konfluenci. Dienu pirms testēšanas šūnas ievāc un sadala pa 96 iedobju platēm (10 000 šūnas uz vienu plati *KeratinoSensTM* gadījumā). Jāpievērš uzmanība, lai šūnu uzsēšanas laikā novērstu to sedimentāciju, tādējādi nodrošinot šūnu skaita vienmērīgu sadalījumu pa iedobēm. Ja to nedara, šajā solī starp iedobēm var rasties lielas atšķirības. Luciferāzes aktivitātes mērījumu nolūkā katram atkārtojumam izmanto trīs replikātus; vienu paralēlu replikātu izmanto šūnu dzīvotspējas testam.

Testējamās ķīmikālijas un kontroles vielu sagatavošana

Testējamo ķīmikāliju un kontroles vielas sagatavo testēšanas dienā. *KeratinoSensTM* testa nolūkam testējamās ķīmikālijas līdz vēlamajai galakonzentrācijai (piem., 200 nM) izšķīdina dimetilsulfoksīdā (*DMSO*). *DMSO* šķīdumus var uzskatīt par pašsterilizējošiem, līdz ar to nav jāveic sterilizējošā filtrēšana jeb sterilfiltrēšana. *DMSO* nešķīstošu testējamo ķīmikāliju izšķīdina sterilā ūdenī vai barotnē un šķīdumus sterilizē, piem., ar filtrēšanu. Ja testējamajai ķīmikālijai nav noteiktas molekulas, izejšķīdumu sagatavo līdz noklusējuma koncentrācijai (*KeratinoSensTM* testā 40 mg/mL vai 4 % (masas)). Ja tiek izmantoti citi šķīdinātāji, nevis *DMSO*, ūdens vai barotne, jāsniedz pietiekams zinātniskais pamatojums.

Par pamatu ņemot testējamās ķimikālijas DMSO izejšķidumus, ar DMSO sagatavo sērijveida atšķaidījumus, lai iegūtu 12 testējamās ķimikālijas galvenās koncentrācijas (no 0,098 līdz 200 mM *KeratinoSens*TM testā). Ja testējamā ķimikālija DMSO nešķīst, atšķaidījumus galveno koncentrāciju iegūšanai sagatavo, izmantojot sterilu ūdeni vai sterilu barotni. Neatkarīgi no izmantotā šķīdinātāja pēc tam galvenās koncentrācijas 25-kārtīgi izšķīdina serumu saturošā barotnē un visbeidzot izmanto apstrādei ar papildu četrkārtīgu atšķaidījuma koeficientu, lai testētās ķimikālijas galīgās koncentrācijas *KeratinoSens*TM testā būtu diapazonā no 0,98 līdz 2 000 µM. Pienācīgi pamatojot, drīkst izmantot citas koncentrācijas (piem., citotoksicitātes vai vājas šķīdības gadījumā).

*KeratinoSens*TM testā izmantotā negatīvā (šķīdinātāja) kontrole ir DMSO (CAS Nr. 67-68-5, tīrība $\geq 99\%$), kurai izmanto sešas iedobes uz plati. Tam veic tādu pašu atšķaidīšanu, kā aprakstīts 22. punktā attiecībā uz galvenajām koncentrācijām, lai galīgā negatīvās (šķīdinātāja) kontroles koncentrācija būtu 1 %, par kuru ir zināms, ka tā neietekmē šūnu dzīvotspēju un atbilst tai pašai DMSO koncentrācijai, kāda ir testētajā ķimikālijā un pozitīvajā kontrolē. Ja testējamā ķimikālija DMSO nešķīst un tās atšķaidījumi tika sagatavoti, izmantojot ūdeni, galīgā testa šķīduma DMSO līmenis visās iedobēs jākorrigē uz 1 %, tāpat kā pārējām testējamām ķimikālijām un kontroles vielām.

*KeratinoSens*TM testā izmantotā pozitīvā kontrole ir kanēļskābes aldehīds (CAS Nr. 14371-10-9, tīrība $\geq 98\%$), kurai sagatavo 5 galveno koncentrāciju sēriju DMSO ar diapazonu no 0,4 līdz 6,4 mM (no 6,4 mM izejšķīduma) un atšķaida tā, kā aprakstīts 22. punktā attiecībā uz galvenajām koncentrācijām, lai galīgā pozitīvās kontroles koncentrācija būtu diapazonā no 4 līdz 64 µM. Citas piemērotas pozitīvās kontroles, kurām būtu jāsniedz $EC_{1,5}$ diapazona vidējās vērtības, var izmantot, ja ir pieejami vēsturiskie dati, no kuriem var iegūt salīdzināmus izpildes pieņemamības kritērijus.

Testējamās ķimikālijas un kontroles vielu aplicēšana

Lai iegūtu prognozi (pozitīvu vai negatīvu), katrai testējamai ķimikālijai un pozitīvās kontroles vielai ir nepieciešams viens eksperiments, kas sastāv no vismaz diviem neatkarīgiem atkārtojumiem, kuri katrs satur trīs replikātus (t. i., $n = 6$). Ja divos neatkarīgos atkārtojumos iegūti nesakritīgi rezultāti, jāveic trešais atkārtojums, kurā izmanto trīs replikātus (t. i., $n = 9$). Katru neatkarīgo atkārtojumu veic citā dienā ar svaigu testējamo ķimikāliju izejšķidumu un atsevišķi ievāktām šūnām. Tomēr šūnas var būt no vienas un tās pašas pasāžas.

Pēc uzsēšanas, kā aprakstīts 20. punktā, šūnas 24 stundas audzē 96 iedobju mikrotitrēšanas platēs. Pēc tam barotni novāc un aizstāj ar svaigu barotni (*KeratinoSens*TM gadījumā 150 µl barotni, kurā ir serums, bet nav genētiskā), kam pievieno 50 µl 25-kārtīgi atšķaidītas testējamās ķimikālijas un kontroles vielu. Katrā platē vismaz vienu iedobi atstāj tukšu (bez šūnām un bez apstrādes), lai iegūtu fona vērtības.

Pēc tam *KeratinoSens*TM testā sagatavotās plates aptuveni 48 stundas inkubē $37 \pm 1^\circ\text{C}$ temperatūrā, klātesot 5 % CO_2 . Jāizvairās no gaistošu testējamo ķimikāliju iztvaikošanas un testējamo ķimikāliju starpiedobju kontaminācijas, piem., pirms inkubēšanas ar testējamajām ķimikālijām plates pārklājot ar foliju.

Luciferāzes aktivitātes mērījumi

Lai nodrošinātu pienācīgus luminiscences rādījumus, būtiski ir trīs faktori:

- jutīga luminometra izvēle,
- pietiekami augstas plates izmantošana, lai novērstu šķērskontamināciju ar gaismu, un
- tāda luciferāzes substrāta izmantošana, kam ir pietiekama gaismas atdeve, lai nodrošinātu pietiekamu jutību un zemu mainīgumu.

Pirms testēšanas jāizpilda 3. papildinājumā aprakstītais kontroleksperiments, lai nodrošinātu, ka šie trīs punkti tiek izpildīti.

Pēc 48 stundu ekspozīcijas testējamajai ķimikālijai un kontroles vielām *KeratinoSens*TM testā šūnas nomazgā ar fosfātu buferšķīdumu un katrai iedobei uz 20 minūtēm istabas temperatūrā pievieno attiecīgo līzes buferšķīdumu, lai iegūtu luminiscences nolasījumus.

Pēc tam plates ar šūnu lizātu nolasījumu veikšanai ievieto luminometrā, kas *KeratinoSens*TM testā ir ieprogrammēts: (i) katrai iedobei pievienot luciferāzes substrātu (t. i., 50 µl), (ii) pagaidīt 1 sekundi, un (iii) 2 sekundes integrēt luciferāzes aktivitāti. Ja izmanto alternatīvus iestatījumus, piem., atkarībā no izmantotā luminometra modeļa, tie jāpamato. Turklāt, ja tiek sekmīgi izpildīts 3. papildinājumā paredzētais kvalitātes kontroles eksperiments, var izmantot arī spīdošu substrātu.

Citotoksicitātes novērtējums

Veicot *KeratinoSens*TM šūnu dzīvotspējas testu, 48 stundas pēc ekspozīcijas barotni aizstāj ar svaigu barotni, kas satur *MTT* (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolija bromīdu, tiazolilzilo tetrazolija bromīdu, CAS Nr. 298-93-1), un šūnas 4 stundas inkubē 37 °C temperatūrā pie 5 % CO₂. Pēc tam *MTT* barotni novāc un šūnas lizē (piem., katrai iedobei pievienojot 10 % SDS šķīdumu) līdz nākamajai dienai. Pēc sakratīšanas ar fotometru mēra absorbciju, t. i., pie 600 nm.

DATI UN PĀRSKATA SNIEGŠANA

Datu izvērtēšana

*KeratinoSens*TM testā aprēķina šādus parametrus:

- luciferāzes aktivitātes indukcijas ($I_{\max}$) maksimālo vidējo vērtību kārtās, kas novērota pie testējamās vielas un pozitīvās kontroles jebkuras koncentrācijas;
- $EC_{1,5}$ vērtību, kas apzīmē koncentrāciju, pie kuras iegūtā luciferāzes aktivitātes indukcija pārsniedz 1,5 kārtas sliekšņvērtību (t. i., par 50 % lielāka luciferāzes aktivitāte); un
- IC_{50} un IC_{30} koncentrācijas vērtības šūnu dzīvotspējas samazinājumam par 50 % un 30 %.
- Luciferāzes aktivitātes indukciju kārtās aprēķina, izmantojot 1. vienādojumu, savukārt vispārējo maksimālo indukciju kārtās ($I_{\max}$) aprēķina kā vidējo vērtību no individuālajiem atkārtojumiem.

1. vienādojums:

$$\text{Fold induction} = \frac{(L_{\text{sample}} - L_{\text{blank}})}{(L_{\text{solvent}} - L_{\text{blank}})}$$

kur:

L_{sample} ir luminiscences nolasījums testējamās ķimikālijas iedobē.

L_{blank} ir luminiscences nolasījums tukšajā iedobē, kurā nav šūnu un kura nav apstrādāta.

L_{solvent} ir vidējais luminiscences nolasījums iedobēs, kuras satur šūnas un šķīdinātāja (negatīvo) kontroli.

$EC_{1,5}$ aprēķina, veicot lineāro interpolāciju saskaņā ar 2. vienādojumu, savukārt vispārējo $EC_{1,5}$ aprēķina kā individuālo atkārtojumu ģeometrisku vidējo.

2. vienādojums:

$$EC_{1,5} = (C_b - C_a) \times \left(\frac{1,5 - I_a}{I_b - I_a} \right) + C_a$$

kur:

C_a ir zemākā koncentrācija μM ar $> 1,5$ -kārtīgu indukciju.

C_b ir augstākā koncentrācija μM ar $< 1,5$ -kārtīgu indukciju.

I_a ir indukcija kārtās, mērīta pie zemākās koncentrācijas ar $> 1,5$ -kārtīgu indukciju (trīs replikātu iedobju vidējais).

I_b ir indukcija kārtās, mērīta pie augstākās koncentrācijas ar $< 1,5$ -kārtīgu indukciju (trīs replikātu iedobju vidējais).

Dzīvotspēju aprēķina, izmantojot 3. vienādojumu:

3. vienādojums:

$$Viability = \frac{(V_{sample} - V_{blank})}{V_{solvent} - V_{blank}} \times 100$$

kur:

V_{sample} ir MTT absorbcijas nolasījums testējamās ķīmikālijas iedobē.

V_{blank} ir MTT absorbcijas nolasījums tukšajā iedobē, kurā nav šūnu un kura nav apstrādāta.

$V_{solvent}$ ir vidējais MTT absorbcijas nolasījums iedobēs, kuras satur šūnas un šķīdinātāja (negatīvo) kontroli.

IC_{50} un IC_{30} aprēķina, veicot lineāro interpolāciju saskaņā ar 4. vienādojumu, savukārt vispārējo IC_{50} un IC_{30} aprēķina kā individuālo atkārtojumu ģeometrisku vidējo.

4. vienādojums:

$$IC_x = (C_b - C_a) \times \left(\frac{(100 - x) - V_a}{V_b - V_a} \right) + C_a$$

kur:

X ir procentuālais samazinājums pie aprēķināmās koncentrācijas (50 un 30 attiecīgi IC_{50} un IC_{30}).

C_a ir zemākā koncentrācija μM ar $> x$ % dzīvotspējas samazinājumu.

C_b ir augstākā koncentrācija μM ar $< x$ % dzīvotspējas samazinājumu.

V_a ir dzīvotspēja (%) pie zemākās koncentrācijas ar $> x$ % dzīvotspējas samazinājumu.

V_b ir dzīvotspēja (%) pie augstākās koncentrācijas ar $< x$ % dzīvotspējas samazinājumu.

Katrai koncentrācijai, kas uzrāda $> 1,5$ -kārtīgu luciferāzes aktivitātes indukciju, aprēķina statistisko nozīmīgumu (piem., izmantojot divpusēju Stjudenta t-testu), trīs replikātu paraugu luminiscences vērtības salīdzinot ar šķīdinātāja (negatīvās) kontroles iedobju luminiscences vērtībām, lai noteiktu, vai luciferāzes aktivitātes indukcija ir statistiski nozīmīga ($p < 0,05$). Zemākā koncentrācija ar $> 1,5$ -kārtīgu luciferāzes aktivitātes indukciju ir vērtība, kas nosaka $EC_{1,5}$ vērtību. Pārbauda, vai katrā gadījumā šī vērtība ir zemāka par IC_{30} vērtību, kas norāda, ka pie $EC_{1,5}$ noteicošās koncentrācijas šūnu dzīvotspēja ir samazinājusies par mazāk nekā 30 %.

Datus ieteicams vizuāli pārbaudīt ar diagrammu palīdzību. Ja nav novērojama skaidra devas–atbildreakcijas līkne vai iegūtā devas–atbildreakcijas līkne ir divfāzu (t. i., 1,5 sliekšņvērtību pārsniedz divreiz), eksperiments jāatkārto, lai noskaidrotu, vai to izraisījusi testējamās ķimikālijas specifika vai eksperimentāls artefakts. Ja neatkarīgā eksperimentā divfāzu atbildreakcija ir reproducējama, jāpaziņo zemākā $EC_{1,5}$ vērtība (koncentrācija, pie kuras sliekšņvērtība 1,5 tiek pārsniegta pirmo reizi).

Retajos gadījumos, kad tiek novērota statistiski nenozīmīga indukcija, kas pārsniedz 1,5 kārtas, kam seko statistiski nozīmīga indukcija pie augstākas koncentrācijas, rezultātus no šā atkārtojuma uzskata par derīgiem un pozitīviem vienīgi tad, ja statistiski nozīmīgā indukcija, kas pārsniedz sliekšņvērtību 1,5, iegūta pie koncentrācijas, kas nav citotoksiska.

Visbeidzot, testējamajām ķimikālijām, kuras jau pie zemākās testējamās koncentrācijas 0,98 μM rada 1,5-kārtīgu vai lielāku indukciju, $EC_{1,5}$ vērtību < 0,98 nosaka, balstoties uz devas–atbildreakcijas līknes vizuālu inspicēšanu.

Pieņemšanas kritēriji

Izmantojot *KeratinSens*TM testu, jābūt izpildītiem turpmāk norādītajiem pieņemšanas kritērijiem. Pirmkārt, ar pozitīvo kontroli, kanēļskābes aldehīdu, iegūtajai luciferāzes aktivitātes indukcijai vismaz vienā no testētajām koncentrācijām (no 4 līdz 64 μM) jābūt statistiski nozīmīgai, proti, jāpārsniedz sliekšņvērtība 1,5 (piem., izmantojot T-testu).

Otrkārt, $EC_{1,5}$ vērtībai jābūt divu standartnoviržu robežās no testējošās iestādes vēsturiskā vidējā (piem., no 7 μM līdz 30 μM , pamatojoties uz validācijas datu kopu), kas regulāri jāatjaunina. Turklāt trīs kanēļskābes aldehīda replikātos pie 64 μM vidējai indukcijai jābūt no 2 līdz 8. Ja pēdējais kritērijs nav izpildīts, atbildreakcija uz kanēļskābes aldehīda devu rūpīgi jāpārbauda un testus var akceptēt vienīgi tad, ja pozitīvajai kontrolei pie pieaugošas koncentrācijas viennozīmīgi novērojama atbildreakcija uz devu ar pieaugošu luciferāzes aktivitātes indukciju.

Visbeidzot, negatīvās (šķīdinātāja) kontroles DMSO vidējam luminiscences nolasījuma variācijas koeficientam katrā atkārtojumā, kas sastāv no 6 triplikātā testētām iedobēm, jābūt zem 20 %. Ja variācija ir lielāka, rezultāti nav derīgi.

Rezultātu interpretēšana un prognozes modelis

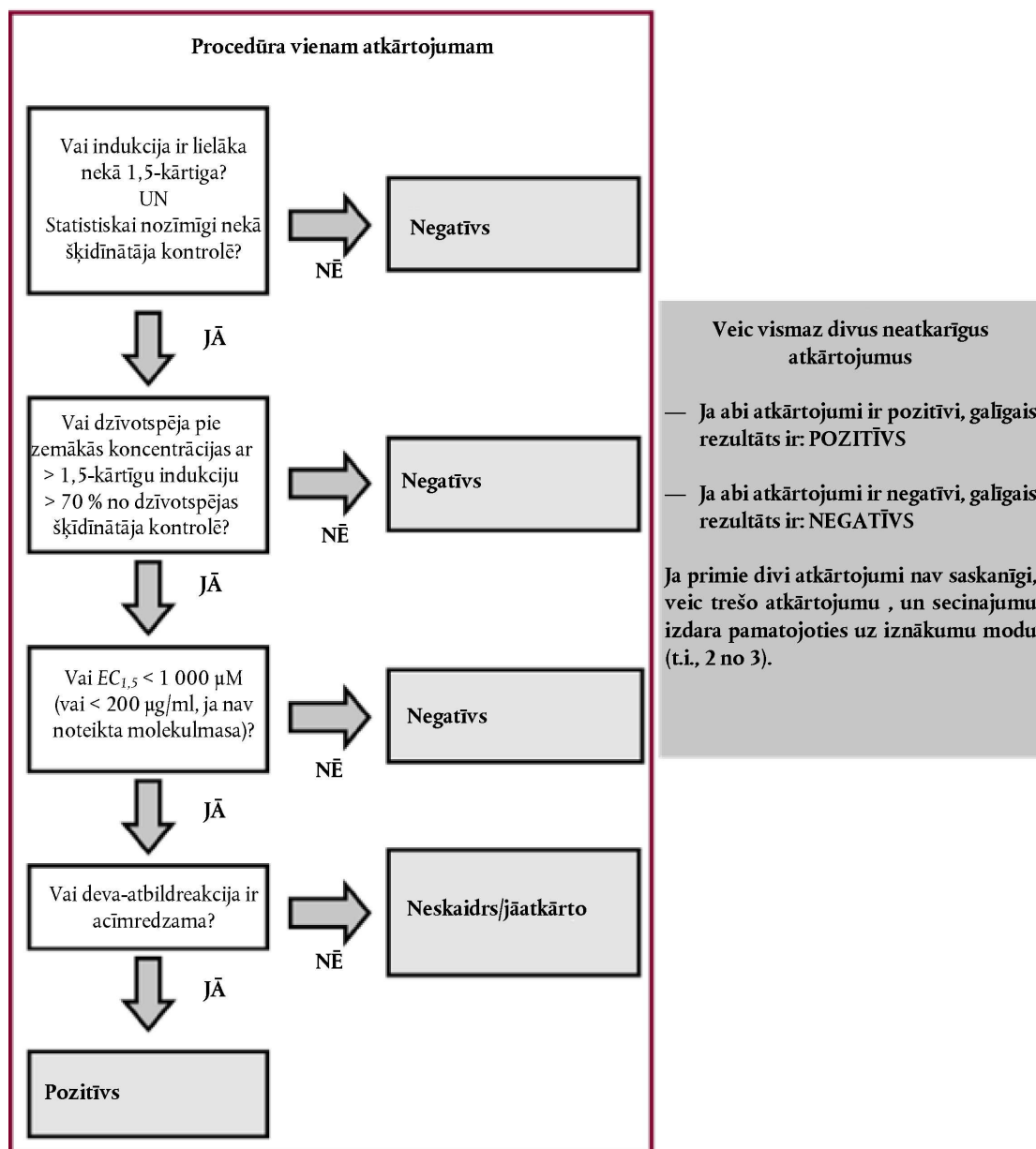
*KeratinSens*TM prognozi uzskata par pozitīvu, ja 2 no 2 atkārtojumiem vai 2 no 3 atkārtojumiem ir izpildīti visi tālāk norādītie 4 nosacījumi; pretējā gadījumā *KeratinSens*TM prognozi uzskata par negatīvu (1. attēls):

1. I_{max} ir lielāks par (>) 1,5-kārtīgs un statistiskā nozīmīgumi atšķiras no atbilstošā rādītāja, kas iegūts šķīduma (negatīvajā) kontrolē (to nosaka ar divpusēju nesapārotu Stjudenta t-testu);
2. šūnu dzīvotspēja pie zemākās koncentrācijas un ar vairāk nekā 1,5-kārtīgu luciferāzes aktivitātes indukciju (t. i., pie $EC_{1,5}$ noteicošās koncentrācijas) ir lielāka nekā (>) 70 %;
3. $EC_{1,5}$ vērtība ir zemāka par (<) 1 000 μM (vai < 200 $\mu\text{g/mL}$ testējamajām ķimikālijām, kam nav noteiktas molekulmasas);
4. luciferāzes indukcijai ir acīmredzama vispārēja atbildreakcija uz devu (vai divfāzu atbildreakcija, kas minēta 33. punktā).

Ja konkrētā atkārtojumā ir izpildīti visi trīs pirmie nosacījumi, taču luciferāzes indukcijai nav novērojama viennozīmīga atbildreakcija uz devu, attiecīgā atkārtojuma rezultāti jāuzskata par neskaidriem un var būt jāveic papildu testēšana (1. attēls). Turklāt arī negatīvs rezultāts, kas iegūts ar koncentrācijām < 1 000 μM (vai < 200 $\mu\text{g/mL}$ testējamajām ķimikālijām, kam nav noteiktas molekulmasas), jāuzskata par neskaidru (sk. 11. punktu).

1. attēls

KeratinSens™ testā izmantotais prognozes modelis. KeratinSens™ prognoze jāskata IATA kontekstā un atbilstīgi 9. un 11. punkta noteikumiem.



Retos gadījumos testējamās ķīmikālijas, kuras luciferāzes aktivitāti inducē ļoti tuvu citotoksiskajiem līmeņiem, dažos atkārtojumos var būt pozitīvas tādos līmeņos, kas nav toksiski (t. i., $EC_{1,5}$ noteicošā koncentrācija mazāka par ($<$) IC_{30}), bet citos atkārtojumos — vienīgi citotoksiskos līmeņos (t. i., $EC_{1,5}$ noteicošā koncentrācija pārsniedz ($>$) IC_{30}). Tādas testējamās ķīmikālijas jātestē atkārtoti, veicot vēl rūpīgāku devas-atbildreakcijas analīzi ar mazāku atšķaidījuma koeficientu (piem., 1,33 vai $\bar{O}2$ (= 1,41) atšķaidījuma koeficients starp iedobēm), lai noteiktu, vai indukcija ir vai nav radusies citotoksiskos līmeņos (9).

Testēšanas pārskats

Testēšanas pārskatā jāiekļauj tālāk norādītā informācija.

Testējamā ķīmikālija

— Vienkomponenta viela:

- ķīmiskās identifikācijas dati, piem., IUPAC vai CAS nosaukums(-i), CAS numurs(-i), SMILES vai InChI kods, struktūrformula un/vai citi identifikācijas dati,

- fiziskais izskats, šķīdība ūdenī, šķīdība *DMSO*, molekulmasa un citas relevantas fizikālķīmiskās īpašības, ciktāl šī informācija ir pieejama,
 - tīrība, attiecīgā gadījumā, ja tas ir praktiski iespējams, piemaisījumu ķīmiskā identitāte u. c.,
 - apstrāde pirms testēšanas, ja tāda veikta (piem., sildīšana, smalcināšana),
 - testētā(-s) koncentrācija(-s),
 - uzglabāšanas nosacījumi un stabilitāte, ciktāl šī informācija ir pieejama.
- Daudzkomponentu vielas, *UVCB* un maisījumi:
- ciktāl iespējams, raksturoti ar, piem., sastāvdaļu ķīmisko identitāti (sk. iepriekš), tīrību, kvantitatīvo saturu un relevantajām fizikālķīmiskajām īpašībām,
 - fiziskais izskats, šķīdība ūdenī, šķīdība *DMSO* un citas relevantas fizikālķīmiskās īpašības, ciktāl šī informācija ir pieejama,
 - molekulmasa vai šķietamā molekulmasa maisījumiem/polimēriem ar zināmu sastāvu vai cita pētījuma norisei relevanta informācija,
 - apstrāde pirms testēšanas, ja tāda veikta (piem., sildīšana, smalcināšana),
 - testētā(-s) koncentrācija(-s),
 - uzglabāšanas nosacījumi un stabilitāte, ciktāl šī informācija ir pieejama.

Kontroles

- Pozitīvā kontrole:
- ķīmiskās identifikācijas dati, piem., *IUPAC* vai *CAS* nosaukums(-i), *CAS* numurs(-i), *SMILES* vai *InChI* kods, struktūrformula un/vai citi identifikācijas dati,
 - fiziskais izskats, šķīdība ūdenī, šķīdība *DMSO*, molekulmasa un citas relevantas fizikālķīmiskās īpašības, ciktāl šī informācija ir pieejama (un attiecīgā gadījumā),
 - tīrība, attiecīgā gadījumā, ja tas ir praktiski iespējams, piemaisījumu ķīmiskā identitāte u. c.,
 - apstrāde pirms testēšanas, ja tāda veikta (piem., sildīšana, smalcināšana),
 - testētā(-s) koncentrācija(-s),
 - uzglabāšanas nosacījumi un stabilitāte, ciktāl šī informācija ir pieejama,
 - norāde uz vēsturiskajiem pozitīvo kontroļu rezultātiem, kas apliecina atbilstību testa izpildes pieņemamības kritērijiem (attiecīgā gadījumā).
- Negatīvā (nesēja) kontrole:
- ķīmiskās identifikācijas dati, piem., *IUPAC* vai *CAS* nosaukums(-i), *CAS* numurs(-i) un/vai citi identifikācijas dati,
 - tīrība, attiecīgā gadījumā, ja tas ir praktiski iespējams, piemaisījumu ķīmiskā identitāte u. c.,
 - fiziskais izskats, molekulmasa un citas relevantas fizikālķīmiskās īpašības gadījumā, ja tiek veiktas citas negatīvās kontroles/izmantoji citi testēšanas metodē neminēti nesēji, ciktāl šī informācija ir pieejama,
 - uzglabāšanas nosacījumi un stabilitāte, ciktāl šī informācija ir pieejama,
 - katrai testējamai ķimikālijai izraudzītā šķīdinātāja pamatojums.

Testēšanas metodes izmantošanas apstākļi

- sponsora, testējošās iestādes, pētījuma vadītāja vārds/nosaukums un adrese;
- izmantotās testēšanas metodes apraksts;
- izmantotā šūnu līnija, tās uzglabāšanas apstākļi un avots (piem., iestāde, kur tās ņemtas);
- testēšanā izmantoto šūnu pasāžu skaits un konfluences līmenis;
- šūnu skaitīšanas metode, kas izmantota uzsēšanai pirms testēšanas, un pasākumi, kas veikti, lai nodrošinātu šūnu skaita viendabīgu sadali (sk. 20. punktu);
- izmantotais luminometrs (piem., modelis), tostarp instrumentu iestatījumi, izmantotais luciferāzes substrāts un pienācīgu luminiscences mērījumu pierādīšana ar 3. papildinājumā aprakstīto kontroltestu;
- procedūra, ar kuru pierādīta laboratorijas kompetence izmantot šo testēšanas metodi (piem., testējot standartvielas) vai apliecināta testēšanas metodes veikspējas reproducējamība ilgākā laikā.

Testa procedūra

- izmantoto atkārtojumu un replikātu skaits;
- izmantotās testējamās ķīmikālijas koncentrācijas, aplikēšanas procedūras un ekspozīcijas laiks (ja atšķiras no rekomendētajiem);
- izmantoto izvērtēšanas un lēmuma pieņemšanas kritēriju apraksts;
- izmantoto pētījuma pieņemamības kritēriju apraksts;
- testa procedūras modifikāciju apraksts, ja tādas bijušas.

Rezultāti

- tabulā apkopotas $I_{\max}$, $EC_{1,5}$ un dzīvotspējas vērtības (piem., IC_{50} , IC_{30}), kas iegūtas katrā testējamās ķīmikālijas un pozitīvās kontroles atkārtojumā, kā arī vidējās vērtības ($I_{\max}$: vidējā; $EC_{1,5}$ un dzīvotspējas vērtības: vidējais ģeometriskais) un SN, kas aprēķināta, izmantojot datus no visiem individuālajiem atkārtojumiem, un norāde uz testējamās ķīmikālijas novērtējumu saskaņā ar prognozes modeli;
- variācijas koeficients, kas ar luminiscences nolasījumiem iegūts par katra eksperimenta negatīvo kontroli;
- grafiks, kurā attēlotas devas–atbildreakcijas līknes attiecībā uz luciferāzes aktivitātes indukciju un dzīvotspēju;
- jebkādu citu relevantu novērojumu apraksts (attiecīgā gadījumā).

Rezultātu iztirzājums

- ar *KeratinoSens*TM testu iegūto rezultātu iztirzājums,
- ar testēšanas metodi iegūto rezultātu iztirzājums IATA kontekstā, ja pieejama cita relevanta informācija.

Secinājumi

LITERATŪRAS SARAKSTS

- (1) United Nations (UN) (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Fifth revised edition, UN New York and Geneva, 2013. Pieejams: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html.
- (2) OECD (2012). The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Scientific Evidence. OECD Environment, Health and Safety publications, Series on Testing and Assessment No. 168. OECD, Paris.

- (3) Adler S., Basketter D., Creton S., Pelkonen O., van Benthem J., Zuang V., Andersen K.E., Angers-Loustau A., Aptula A., Bal-Price A., Benfenati E., Bernauer U., Bessems J., Bois F.Y., Boobis A., Brandon E., Bremer S., Broschard T., Casati S., Coecke S., Corvi R., Cronin M., Daston G., Dekant W., Felter S., Grignard E., Gundert-Remy U., Heinonen T., Kimber I., Kleinjans J., Komulainen H., Kreiling R., Kreysa J., Leite S.B., Loizou G., Maxwell G., Mazzatorta P., Munn S., Pfuhler S., Phrakonkham P., Piersma A., Poth A., Prieto P., Repetto G., Rogiers V., Schoeters G., Schwarz M., Serafimova R., Tähti H., Testai E., van Delft J., van Loveren H., Vinken M., Worth A., Zaldivar J.M. (2011). Alternative (non-animal) methods for cosmetics testing: current status and future prospects-2010. *Archives of Toxicology* 85, 367-485.
- (4) Šā pielikuma B.42. nodaļa "Ādas sensibilizācija: limfmezglu lokālās stimulācijas tests".
- (5) Šā pielikuma B.6. nodaļa "Ādas sensibilizācija".
- (6) Šā pielikuma B.50. nodaļa "Ādas sensibilizācija: limfmezglu lokālās stimulācijas tests: DA".
- (7) Šā pielikuma B.51. nodaļa "Ādas sensibilizācija: limfmezglu lokālās stimulācijas tests: BrdU-ELISA".
- (8) Natsch A. (2010). The Nrf2-Keap1-ARE Toxicity Pathway as a Cellular Sensor for Skin Sensitizers-Functional Relevance and Hypothesis on Innate Reactions to Skin Sensitizers. *Toxicological Sciences* 113, 284-292.
- (9) Emter R., Ellis G., Natsch A. (2010). Performance of a novel keratinocyte-based reporter cell line to screen skin sensitizers *in vitro*. *Toxicology and Applied Pharmacology* 245, 281-290.
- (10) Dinkova-Kostova A.T., Holtzclaw W.D., Kensler T.W. (2005). The role of Keap1 in cellular protective responses. *Chem. Res. Toxicol.* 18, 1779-1791.
- (11) Kansanen E., Kuosmanen S.M., Leinonen H., Levonen A.L. (2013). The Keap1-Nrf2 pathway: Mechanisms of activation and dysregulation in cancer. *Redox Biol.* 1(1), 45-49.
- (12) Natsch A., Bauch C., Foertsch L., Gerberick F., Normann K., Hilberer A., Inglis H., Landsiedel R., Onken S., Reuter H., Schepky A., Emter R. (2011). The intra- and inter-laboratory reproducibility and predictivity of the KeratinoSens assay to predict skin sensitizers *in vitro*: results of a ring-study in five laboratories. *Toxicol. In Vitro* 25, 733-744.
- (13) Natsch A., Ryan C.A., Foertsch L., Emter R., Jaworska J., Gerberick G.F., Kern P. (2013). A dataset on 145 chemicals tested in alternative assays for skin sensitization undergoing prevalidation. *Journal of Applied Toxicology*, 33, 1337-1352.
- (14) EURL-ECVAM (2014). Recommendation on the KeratinoSens™ assay for skin sensitisation testing, 42 pp. Pieejams: http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/eurl-ecvam/eurl-ecvam-recommendations/recommendation-keratinosens-skin-sensitisation.
- (15) DB-ALM (INVITTOX) (2013) Protocol 155: KeratinoSens™, 17 pp. Pieejams: <http://ecvam-dbal.m.jrc.ec.europa.eu/beta/index.cfm/methodsAndProtocols/index>
- (16) Natsch A., Emter R., Ellis G. (2009). Filling the concept with data: integrating data from different *in vitro* and *in silico* assays on skin sensitizers to explore the battery approach for animal-free skin sensitization testing. *Toxicol. Sci.* 107, 106-121.
- (17) Ball N., Cagen S., Carrillo J.C., Certa H., Eigler D., Emter R., Faulhammer F., Garcia C., Graham C., Haux C., Kolle S.N., Kreiling R., Natsch A., Mehling A. (2011). Evaluating the sensitization potential of surfactants: integrating data from the local lymph node assay, guinea pig maximization test, and *in vitro* methods in a weight-of-evidence approach. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 60, 389-400.
- (18) Bauch C., Kolle S.N., Ramirez T., Eltze T., Fabian E., Mehling A., Teubner W., van Ravenzwaay B., Landsiedel R. (2012). Putting the parts together: combining *in vitro* methods to test for skin sensitizing potentials. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 63, 489-504.

- (19) Jaworska J., Dancik Y., Kern P., Gerberick F., Natsch A. (2013). Bayesian integrated testing strategy to assess skin sensitization potency: from theory to practice. *J Appl Toxicol.* 33, 1353-1364.
- (20) Andres E., Sa-Rocha V.M., Barrichello C., Haupt T., Ellis G., Natsch A. (2013). The sensitivity of the KeratinoSens™ assay to evaluate plant extracts: A pilot study. *Toxicology In Vitro* 27, 1220-1225.
- (21) Fabian E., Vogel D., Blatz V., Ramirez T., Kolle S., Eltze T., van Ravenzwaay B., Oesch F., Landsiedel R. (2013). Xenobiotic metabolizing enzyme activities in cells used for testing skin sensitization *in vitro*. *Arch. Toxicol.* 87, 1683-1699.
- (22) Thorne N., Inglese J., Auld D.S. (2010). Illuminating Insights into Firefly Luciferase and Other Bioluminescent Reporters Used in Chemical Biology. *Chemistry and Biology* 17, 646-657.
- (23) OECD (2012). BG1Luc Estrogen Receptor Transactivation Test Method for Identifying Estrogen Receptor Agonists and Antagonists. OECD Guidelines for Chemical Testing No. 457. OECD, Paris.
- (24) ECETOC (2003). Contact sensitization: Classification according to potency. European Centre for Ecotoxicology & Toxicology of Chemicals (Technical Report No. 87).
- (25) Gildea L.A., Ryan C.A., Foertsch L.M., Kennedy J.M., Dearman R.J., Kimber I., Gerberick G.F. (2006). Identification of gene expression changes induced by chemical allergens in dendritic cells: opportunities for skin sensitization testing. *J. Invest. Dermatol.*, 126, 1813-1822.
- (26) Ryan C.A., Gildea L.A., Hulette B.C., Dearman R.J., Kimber I., Gerberick G.F. (2004). Gene expressing changes in peripheral blood-derived dendritic cells following exposure to a contact allergen. *Toxicol. Lett.* 150, 301-316.
- (27) Emter R., van der Veen J.W., Adamson G., Ezendam J., van Loveren H., Natsch A. (2013). Gene expression changes induced by skin sensitizers in the KeratinoSens™ cell line: Discriminating Nrf2-dependent and Nrf2-independent events. *Toxicol. in vitro* 27, 2225-2232.
- (28) OECD (2015). Performance Standards for assessment of proposed similar or modified *in vitro* skin sensitisation ARE-Nrf2 luciferase test methods. OECD Environment, Health and Safety publications, Series on Testing and Assessment N0 213, OECD, Paris.
- (29) OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. OECD Environment, Health and Safety publications, Series on Testing and Assessment No.34. OECD, Paris, France.
- (30) NAFTA (North American Free Trade Agreement) (2012). Technical Working Group on Pesticides – (Quantitative) Structure Activity Relationship ((Q)SAR) Guidance Document. 186 pp. <http://www.epa.gov/oppfead1/international/naftatwg/guidance/qsar-guidance.pdf>
-

1. papildinājums

DEFINĪCIJAS

Pareizība: pakāpe, kādā ar testēšanas metodi iegūto mērījumu rezultāti sakrīt ar pieņemtajām atsaucēs vērtībām. Tas ir testēšanas metodes veiktspējas raksturlielums un viens no tās "relevantuma" aspektiem. Šo terminu bieži izmanto ar nozīmi "konkordantums", ar to domājot testēšanas metodes pareizo rezultātu īpatsvaru (29).

AOP (nelabvēlīga iznākuma ceļš): no mērķķīmikālijas vai līdzīgu ķīmikāliju grupas ķīmiskās struktūras izrietoša notikumu sekvenca no molekulārā iniciācijas notikuma līdz interesējošajam *in vivo* rezultātam (2).

ARE: antioksidanta atbildreakcijas elements (saukts arī par *EpRE* jeb elektrofila atbildreakcijas elementu) ir daudzos citoprotektīvu un II fāzes gēnu augšupējos promoteru reģionos atrodams atbildreakcijas elements. Kad tas tiek aktivizēts ar *Nrf2*, tas darbojas kā starpnieks šo gēnu transkripcionālajā indukcijā.

Ķīmikālija: viela vai maisījums.

Variācijas koeficients: mainības mērs, ko aprēķina replikātu datu grupai, standartnovirzi izdalot ar vidējo vērtību. Lai to izteiktu procentos, to reizina ar 100.

EC_{1,5}: interpolēta koncentrācija 1,5-kārtīgai luciferāzes indukcijai.

IC₃₀: koncentrācija, pie kuras šūnu dzīvotspēja samazinās par 30 %.

IC₅₀: koncentrācija, pie kuras šūnu dzīvotspēja samazinās par 50 %.

Bīstamība: īpašība, kas raksturo tādu aģentu vai situāciju, kurai piemīt potenciāls atstāt nelabvēlīgu ietekmi uz šim aģentam eksponētu organismu, sistēmu vai (apakš)populāciju.

IATA (integrētā testēšanas un novērtēšanas pieeja): strukturēta pieeja, ko izmanto ķīmikālijas vai ķīmikāliju grupas bīstamības identificēšanai (potenciāls), bīstamības raksturošanai (potence) un/vai drošuma novērtēšanai (potenciāls/potence un ekspozīcija) un kas stratēģiskā veidā integrē un izsver visus relevantos datus, lai varētu pieņemt normatīvu lēmumu par potenciālo bīstamību un/vai risku, un/vai nepieciešamību veikt turpmāku konkrētu un līdz ar to minimālu testēšanu.

I_{max}: maksimālais luciferāzes aktivitātes indukcijas koeficients pie jebkuras testējamās ķīmikālijas koncentrācijas salīdzinājumā ar šķīdinātāja (negatīvo) kontroli.

Keap1: *Kelch* tipa ar *ECH* asociētais proteīns 1 ir sensorais proteīns, kas var regulēt *Nrf2* aktivitāti. Neinducētos apstākļos sensorais proteīns *Keap1* iedarbojas uz *Nrf2* transkripcijas faktoru, to ubikvitinējot un proteolītiski degradējot proteosomā. *Keap1* reaktīvo cisteīna atlieku kovalenta modificēšana ar nelielām molekulām var izraisīt *Nrf2* disociāciju no *Keap1* (8) (10) (11).

Maisījums: maisījums vai šķīdums, kas sastāv no divām vai vairāk vielām, kuras tajā savstarpēji nereaģē (1).

Vienkomponenta viela: viela, definēta ar tās kvantitatīvo sastāvu, kurā viena galvenā sastāvdaļa veido vismaz 80 % (masas).

Daudzkomponentu viela: viela, definēta ar tās kvantitatīvo sastāvu, kurā vairāk nekā viena no galvenajām sastāvdaļām ir koncentrācijā ≥ 10 % (masas) un < 80 % (masas). Daudzkomponentu vielas tiek saražotas. Atšķirība starp maisījumu un daudzkomponentu vielu ir tāda, ka maisījumu iegūst, divas vai vairākas vielas sajaucot bez ķīmiskas reakcijas. Daudzkomponentu vielas rodas ķīmiskās reakcijās.

Nrf2: *nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2* ir antioksidanta atbildreakcijas ceļā iesaistīts transkripcijas faktors. Ja Nrf2 netiek ubikvitinēts, tas uzkrājas citoplazmā un translocējas uz kodolu, kur tas daudzu citoprotektīvu gēnu augšējā promotera reģionā kombinējas ar ARE, iniciējot to transkripciju (8) (10) (11).

Pozitīvā kontrole: replikāts, kurā ir visi testa sistēmas komponenti un kurš apstrādāts ar vielu, par ko ir zināms, ka tā izraisa pozitīvu atbildreakciju. Lai būtu iespēja novērtēt pozitīvās kontroles atbildreakcijas mainību laikā, pozitīvās atbildreakcijas intensitāte nedrīkstētu būt pārlieku liela.

Relevantums: parametrs, kas raksturo testa attiecināmību uz interesējošo ietekmi un to, vai testu lietot konkrētam nolūkam ir jēgpilni un noderīgi. Pakāpe, kādā ar testu var pareizi izmērīt vai prognozēt interesējošo bioloģisko ietekmi. Relevantums ietver arī testēšanas metodes pareizības (konkordantuma) aspektu (29).

Ticamība: parametrs, kas izsaka, kādā pakāpē tajā pašā vai citā laboratorijā ilgākā laikā, izmantojot to pašu protokolu, var iegūt reproducējamus rezultātus. To novērtē, aprēķinot metodes reproducējamību dažādās laboratorijās un atkārtotamību tajā pašā laboratorijā (29).

Reproducējamība: tādu rezultātu savstarpējā atbilstība, kas iegūti, ar vienu un to pašu testa protokolu testējot vienu to pašu ķīmikāliju (sk. "Ticamība") (29).

Jūtība: tas, cik liela daļa no visām pozitīvajām/aktīvajām ķīmikālijām ar testēšanas metodi tiek klasificētas pareizi. Tas ir tādas testēšanas metodes pareizības mērs, ar kuru iegūst kategoriālus rezultātus, un svarīgs faktors testēšanas metodes relevantuma izvērtēšanā (29).

Šķīdinātāja/nesēja kontrole: replikāts, kurā ir visi testa sistēmas komponenti, izņemot testējamo ķīmikāliju, bet ieskaitot izmantoto šķīdinātāju. To izmanto, lai noteiktu bāzlinijas atbildreakciju paraugiem, kas apstrādāti ar attiecīgajā šķīdinātājā izšķīdinātu testējamo ķīmikāliju.

Specifiskums: tas, cik liela daļa no visām negatīvajām/neaktīvajām ķīmikālijām ar testēšanas metodi tiek klasificētas pareizi. Tas ir tādas testēšanas metodes pareizības mērs, ar kuru iegūst kategoriālus rezultātus, un svarīgs faktors testēšanas metodes relevantuma izvērtēšanā (29).

Vielā: dabiski radušies vai ražošanas procesā iegūti ķīmiskie elementi un to savienojumi, ieskaitot produkta stabilizācijai vajadzīgās piedevas, kā arī izmantotajos procesos radušos piejaukumus, bet izņemot šķīdinātājus, kurus var atdalīt, neietekmējot vielas stabilitāti un neizmainot tās sastāvu (1).

Testējamā ķīmikālija: terminu "testējamā ķīmikālija" izmanto, lai apzīmētu to, kas tiek testēts.

Apvienoto Nāciju Organizācijas Ķīmikāliju klasificēšanas un marķēšanas globāli harmonizētā sistēma (ANO GHS): sistēma, kurā ķīmikālijas (vielas un maisījumus) klasificē pēc standartizētiem fizisko apdraudējumu, veselības apdraudējumu un vidisko apdraudējumu tipiem un līmeņiem un kura paredz atbilstošus saziņas elementus, piem., piktogrammas, signālvārdus, bīstamības apzīmējumus, drošības prasību apzīmējumus un drošības datu lapas, ar mērķi sniegt informāciju par ķīmikāliju nelabvēlīgo ietekmi, lai aizsargātu cilvēkus (tostarp darba devējus, darba ņēmējus, transporta darbiniekus, patērētājus un avārijas dienestu darbiniekus) un vidi (1).

UVCB: viela, kuras sastāvs nav zināms vai ir mainīgs, kura ir kompleksi reakcijas produkti vai bioloģiski materiāli.

Derīga testēšanas metode: testēšanas metode, kas tiek uzskatīta par pietiekami relevantu un ticamu konkrētam nolūkam un kas ir balstīta uz zinātniskiem principiem. Testēšanas metode nekad nav derīga absolūtā izteiksmē; tā vienmēr ir derīga tikai kādam konkrētam nolūkam (29).

2. papildinājums

STANDARTVIELAS

In vitro ādas sensibilizācija: ARE-Nrf2 luciferāzes testēšanas metode

Pirms šīs testēšanas metodes regulāras izmantošanas laboratorijām jāapliecina sava tehniskā kompetence, pareizi iegūstot *KeratinoSens*TM prognozi 1. tabulā ieteiktajām 10 standartvielām un vismaz 8 no 10 standartvielām iegūstot EC_{1,5} un IC₅₀ vērtības, kuras ietilpst attiecīgajā references diapazonā. Šīs standartvielas ir atlasītas tā, lai tās reprezentētu visu ādas sensibilizācijas apdraudējumu izraisīto atbildreakciju diapazonu. Citi atlasē kritēriji bija vielu pieejamība tirgū, kvalitatīvu *in vivo* atsaucē datu pieejamība un kvalitatīvu ar *KeratinoSens*TM testu iegūtu datu pieejamība.

1. tabula

Vielas, kuras ieteicams izmantot, lai pierādītu tehnisko kompetenci izmantot *KeratinoSens*TM testu

Standartvielas	CAS Nr.	Agregātstāvoklis	<i>In vivo</i> prognoze ⁽¹⁾	<i>KeratinoSens</i> TM Prognoze ⁽²⁾	EC _{1,5} (µM) atsaucē diapazons ⁽³⁾	IC ₅₀ (µM) atsaucē diapazons ⁽³⁾
Izopropanols	67-63-0	Šķidra viela	Nav sensibilizators	Negatīva	> 1 000	> 1 000
Salicilskābe	69-72-7	Cieta viela	Nav sensibilizators	Negatīva	> 1 000	> 1 000
Pienskābe	50-21-5	Šķidra viela	Nav sensibilizators	Negatīva	> 1 000	> 1 000
Glicerīns	56-81-5	Šķidra viela	Nav sensibilizators	Negatīva	> 1 000	> 1 000
Cinamilspirts	104-54-1	Cieta viela	Sensibilizators (vājš)	Pozitīva	25–175	> 1 000
Etilēnglikola dimetakrilāts	97-90-5	Šķidra viela	Sensibilizators (vājš)	Pozitīva	5–125	> 500
2-Merkaptobenzo-tiazols	149-30-4	Cieta viela	Sensibilizators (vidējs)	Pozitīva	25–250	> 500
Metildibromglutaronitrils	35691-65-7	Cieta viela	Sensibilizators (stiprs)	Pozitīva	< 20	20–100
4-metilamino-fenola sulfāts	55-55-0	Cieta viela	Sensibilizators (stiprs)	Pozitīva	< 12,5	20–200
2,4-dinitrochlor-benzols	97-00-7	Cieta viela	Sensibilizators (ļoti stiprs)	Pozitīva	< 12,5	5–20

⁽¹⁾ *In vivo* bīstamības (un potences) prognozes ir balstītas uz LLNA datiem (13). *In vivo* potence ir noteikta, izmantojot ECETOC ierosinātos kritērijus (24).

⁽²⁾ *KeratinoSens*TM prognoze jāskata IATA kontekstā un atbilstīgi šīs testēšanas metodes 9. un 11. punkta noteikumiem.

⁽³⁾ Pamatojoties uz vēsturiskajiem novērojumu datiem (12).

3. papildinājums

LUMINISCENCES MĒRĪJUMU KVALITĀTES KONTROLE

Pamateksperiments optimālu luminiscences mērījumu nodrošināšanai *KeratinoSens™* testā

Lai ar luminometru iegūtu ticamus rezultātus, būtiski ir šādi trīs parametri:

- pietiekama jutība, kas kontroliedobēs ļauj iegūt stabilus fona rādītājus;
- platē nav gradienta ilga nolasīšanas laika dēļ; un
- iedobes, kuras atrodas blakus ļoti aktīvām iedobēm, nav kontaminētas ar gaismu.

Pirms testēšanas ieteicams pārliecināties, ka luminiscences mērījumi ir pienācīgi, testējot kontrolplati, kas sagatavota šādi (analīze triplikātā).

Plates sagatavošana pirmajam treniņeksperimentam

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
B	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
C	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
D	EGDM-A 0,98	EGDM-A 1,95	EGDM-A 3,9	EGDM-A 7,8	EGDM-A 15,6	EGDM-A 31,25	EGDM-A 62,5	EGDM-A 125	EGDM-A 250	EGDM-A 500	EGDM-A 1000	EGDMA 2000
E	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
F	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
G	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
H	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	CA 4	CA 8	CA 16	CA 32	CA 64	Tukša

EGDMA = etilēnglikola dimetakrilāts (CAS Nr. 97-90-5), spēcīga inducētājķimikālija.

CA = kanēļskābes aldehīds, pozitīvā standartviela (CAS Nr. 104-55-2).

Kvalitātes kontroles analīzei jāuzrāda:

- skaidra atbildreakcija uz devu D rindā, ar $I_{\max}$ > 20-kārtīgi virs fona vērtībām (vairumā gadījumu tiek sasniegtas $I_{\max}$ vērtības no 100 līdz 300);

- nekāda atbildreakcija uz devu C un E rindā (indukcijas vērtība nepārsniedz 1,5 (ideālā gadījumā — nepārsniedz 1,3), ko būtu radījusi iespējama kontaminācija ar gaismu no ļoti aktīvajām iedobēm EGDMA rindā;
 - starp rindām A, B, C, E, F un G nav statistiski nozīmīgas atšķirības (t. i., platē nav gradienta); un
 - mainībai rindās A, B, C, E, F un G un DMSO iedobēs rindā H jābūt zem 20 % (t. i., stabils fons).
-

B.61. Fluoresceīna caurplūdes testēšanas metode acu korozijas vai nopietna kairinājuma izraisītāju identificēšanai

IEVADS

Šī testēšanas metode (TM) ir ekvivalenta ESAO testēšanas vadlīnijai (TG) Nr. 460 (2012). Fluoresceīna caurplūdes (FL) testēšanas metode ir *in vitro* testēšanas metode, kas konkrētos apstākļos un ar konkrētiem ierobežojumiem izmantojama tādu ķīmikāliju (vielu un maisījumu) klasificēšanai, kuras izraisa acu koroziju un nopietnu kairinājumu, atbilstoši definīcijai, kas dota Apvienoto Nāciju Organizācijas (ANO) Ķīmikāliju klasificēšanas un marķēšanas globālā harmonizētajā sistēmā (GHS) (1. kategorija), Regulā (EK) Nr. 1272/2008 par vielu un maisījumu klasificēšanu, marķēšanu un iepakojšanu (CLP regula) ⁽¹⁾ (1. kategorija) un saskaņā ar ASV Vides aizsardzības aģentūru (EPA) (I kategorija) (1) (2). Šajā testēšanas metodē nopietna acu kairinājuma izraisītāji ir ķīmikālijas, kuras pēc ievadišanas izraisa tādus acs audu bojājumus, kas 21 dienas laikā nav atgriezeniski vai izraisa nopietnu fizisku redzes pasliktināšanos, savukārt acu korozijas izraisītāji ir ķīmikālijas, kas rada neatgriezeniskus acs audu bojājumus. Šīs ķīmikālijas klasificē ANO GHS 1. kategorijā, ES CLP 1. kategorijā vai ASV EPA I kategorijā.

Kaut arī FL testēšanas metodi neuzskata par derīgu kā trušu acu *in vivo* testa pilnīgu aizstājēju, to ieteicams izmantot kā daļu no daudzpakāpju testēšanas stratēģijas klasificēšanas un marķēšanas normatīvajiem mērķiem. Līdz ar to FL ieteicams izmantot par sākotnējo soli lejupeņā pieejā, lai identificētu acu korozijas / nopietna kairinājuma izraisītājus, testējot konkrētu veidu ķīmikālijas (t. i., ūdenī šķīstošas vielas un maisījumus) (3) (4).

Sobrīd ir vispārpieņemts, ka tuvākajā nākotnē neviens atsevišķs *in vitro* acu kairinājuma tests nevarēs aizstāt *in vivo* acu testu (TM B.5 (5)) un prognozēt visus kairinājuma veidus dažādām ķīmikāliju klasēm. Tomēr *in vivo* acu testu varētu būt iespējams aizstāt, (pakāpjveida) testēšanas stratēģijā stratēģiski apvienojot vairākas alternatīvas testēšanas metodes (4). Lejupeņā pieeja (4) ir izstrādāta izmantošanai gadījumos, kad, pamatojoties uz esošo informāciju, ķīmikālijai ir paredzams augsts kairinājuma izraisīšanas potenciāls.

Pamatojoties uz 35. punktā izklāstīto prognozes modeli, ar FL testēšanas metodi ierobežotas pielietojamības jomā, neveicot tālāku testēšanu, iespējams identificēt ķīmikālijas, kas ir acu korozijas vai nopietna kairinājuma izraisītājas (ANO GHS 1. kategorija, ES CLP 1. kategorija vai ASV EPA I kategorija). To pašu pieņem attiecībā uz maisījumiem, kaut arī maisījumi validācijā netika izmantoti. Tāpēc FL testēšanas metodi var izmantot, lai noteiktu ķīmikāliju spēju izraisīt acu kairinājumu/koroziju, izmantojot tālāko TM B.5. secīgās testēšanas stratēģiju (5). Tomēr ķīmikālija, kas ar FL testēšanas metodi nav prognozēta kā acu korozijas vai nopietna kairinājuma izraisītāja, jātestē ar vienu vai vairākām papildu testēšanas metodēm (*in vitro* un/vai *in vivo*), ar kurām ir iespējams precīzi identificēt i) ķīmikālijas, kuras FL testēšanas metodē ir *in vitro* pseidonegatīvas acu koroziju / nopietnu kairinājumu izraisītājas vielas (ANO GHS 1. kategorija, ES CLP 1. kategorija, ASV EPA I kategorija); ii) ķīmikālijas, kuras nav klasificētas kā acu korozijas/kairinājuma izraisītājas (ANO GHS nekategorizētas ķīmikālijas, ES CLP nekategorizētas ķīmikālijas, ASV EPA IV kategorija), un/vai iii) ķīmikālijas, kuras ir vidēji/viegli kairinošas acīm (ANO GHS 2.A un 2.B kategorija, ES CLP 2. kategorija, ASV EPA II un III kategorija).

Šīs testēšanas metodes mērķis ir aprakstīt procedūras, ko izmanto, lai izvērtētu testējamās ķīmikālijas potenciālu izraisīt acu koroziju vai nopietnu kairinājumu, ko mēra ar tās spēju radīt bojājumus necaurlaidīgā konfluentā epitēlija monoslānī. Pienācīga transepiteliālā caurlaidība ir būtiska epitēlija — arī konjunktīvas un radzenes epitēlija — funkcija. Transepiteliālo caurlaidību kontrolē dažādi blīvie savienojumi. Ir pierādīts, ka, palielinoties acs kairinājumam, radzenes epitēlija *in vivo* caurlaidības palielinājums korelē ar novēroto iekaisuma un virsmas bojājuma pakāpi.

FL testēšanas metodē toksisko ietekmi pēc īslaicīgas ekspozīcijas testējamai ķīmikālijai mēra pēc epitēlija monoslāņa nātrija fluoresceīna caurlaidības palielināšanās Madīna-Dārbija suņu nieru (*Madin-Darby Canine Kidney*, MDCK) šūnās, kas kultivētas uz caurlaidīgiem insertiem. Fluoresceīna caurplūdes apjoms ir proporcionāls bojājumiem, kas ķīmiski inducēti blīvajos savienojumos, desmosomālajos savienojumos un šūnu membrānās, un to var izmantot, lai aplēstu testējamās ķīmikālijas potenciālu atstāt toksisku ietekmi uz aci. 1. papildinājumā sniegta diagramma, kurā attēlotas MDCK šūnas, ko FL testēšanas metodes vajadzībām audzē uz inserta membrānas.

⁽¹⁾ Eiropas Parlamenta un Padomes 2008. gada 16. decembra Regula (EK) Nr. 1272/2008 par vielu un maisījumu klasificēšanu, marķēšanu un iepakojšanu un ar ko groza un atceļ Direktīvas 67/548/EEK un 1999/45/EK un groza Regulu (EK) Nr. 1907/2006 (OV L 353, 31.12.2008., 1. lpp.).

Definīcijas ir sniegtas 2. papildinājumā.

SĀKOTNĒJIE APSVĒRUMI UN IEROBEŽOJUMI

Šī testēšanas metode ir balstīta uz INVITTOX protokolu Nr. 71 (6), ko starptautiskā validācijas pētījumā izvērtējis Eiropas Alternatīvo metožu validēšanas centrs (ECVAM) sadarbībā ar ASV Alternatīvo metožu validēšanas starptautisku koordinācijas komiteju (ICCVAM) un Japānas Alternatīvo metožu validēšanas centru (JaCVAM).

FL testēšanas metodi ieteicams izmantot tādu ķīmikāliju identificēšanai, kuras klasificējamās kā viegli/vidēji kairinātāji, vai ķīmikālijām, kuras nav klasificējamās kā acu kairinātāji (vielas un maisījumi) (t. i., GHS 2.A/2.B kat., nekategorizētas ķīmikālijas; ES CLP 2. kat., nekategorizētas ķīmikālijas; ASV EPA II/III/IV kat.), kā konstatēts validācijas pētījumā (3) (7).

Šī testēšanas metode izmantojama vienīgi ūdenī šķīstošām ķīmikālijām (vielām un maisījumiem). Ar FL testēšanas metodi parasti precīzi prognozē tādu ķīmikāliju potenciālu izraisīt spēcīgu acu kairinājumu, kuras šķīst ūdenī un kuru toksisko ietekmi atšķaidīšana neietekmē (7). Lai ķīmikāliju kategorizētu kā ūdenī šķīstošu, eksperimenta apstākļos tai jāšķīst sterilā kalciju saturošā (pie koncentrācijas 1,0–1,8 mM), fenolsarkano nesaturošā Henksa līdzsvarotajā sāļu šķīdumā (HBSS) pie koncentrācijas ≥ 250 mg/ml (viena deva virs 100 mg/ml robežas). Tomēr, ja testējamā ķīmikālija šķīst pie koncentrācijas, kas ir zemāka par 100 mg/ml, un pie minētās koncentrācijas jau izraisa FL 20 % indukciju (proti, $FL_{20} < 100$ mg/ml), to tik un tā var klasificēt GHS 1. kategorijā vai EPA I kategorijā.

Šai testēšanas metodei konstatētie ierobežojumi no tās pielietojamības jomas izslēdz spēcīgas skābes un bāzes, šūnu fiksatorus un ļoti gaistošas ķīmikālijas. Šīm ķīmikālijām ir raksturīgi mehānismi, kurus ar FL testēšanas metodi nemēra, piem., ekstensīva koagulācija, pārziepošanās vai specifiskas ķīmiskās reakcijas. Citi šai metodei konstatētie ierobežojumi ir balstīti uz spēju izdarīt prognozes par iekrāsotām un viskozām testējamajām ķīmikālijām (7). Pieejamā informācija liecina, ka abu veidu ķīmikālijas pēc īsā ekspozīcijas perioda ir grūti noņemt no monoslāņa un ka šīs testēšanas metodes prognozētspēju varētu uzlabot, ja tiktu izmantots lielāks skaits skalošanas posmu. Šķīdumā suspendētām cietām ķīmikālijām ir tendence izgulsnēties, un var būt grūti noteikt to galīgo koncentrāciju šūnās. Ja no datubāzes izslēdz ķīmikālijas, kas ietilpst šajās ķīmisko un fizikālo īpašību klasēs, FL pareizība ES, EPA un GHS klasifikācijas sistēmās ievērojami uzlabojas (7).

Nemot vērā šīs testēšanas metodes mērķi (t. i., identificēt vienīgi acu korozijas vai nopietna kairinājuma izraisītājus), pseidonegatīvo rezultātu īpatsvaram (sk. 13. punktu) nav būtiskas nozīmes, jo, izmantojot pierādījumu izsvēršanu secīgas testēšanas stratēģijā, visas šādas ķīmikālijas pēc tam tiktu testētas ar citiem pienācīgi validētu(-iem) *in vitro* testu(-iem) vai ar trušiem — atkarībā no normatīvajām prasībām (5) (sk. arī 3. un 4. punktu).

Citi konstatētie FL testēšanas metodes ierobežojumi ir balstīti uz pseidonegatīvo un pseidopozitīvo rezultātu īpatsvaru. Kad to izmantoja par sākotnējo soli lejupējā pieejā, lai identificētu ūdenī šķīstošas acu korozijas / nopietna kairinājuma izraisītājas vielas un maisījumus (ANO GHS 1. kategorija; ES CLP 1. kategorija; ASV EPA I kategorija), FL testēšanas metodes pseidopozitīvo rezultātu īpatsvars svārstījās diapazonā no 7 % (7/103; ANO GHS un ES CLP) līdz 9 % (9/99; ASV EPA) un pseidonegatīvo rezultātu īpatsvars svārstījās diapazonā no 54 % (15/28; ASV EPA) līdz 56 % (27/48; ANO GHS un ES CLP), salīdzinot ar *in vivo* rezultātiem. Šajā dokumentā nav noteikts, kādas ķīmikāliju grupas FL testēšanas metodē uzrāda pseidopozitīvus un/vai pseidonegatīvus rezultātus.

Uz MDCK šūnu kultūru attiecas īpaši tehniskie ierobežojumi. Blīvie savienojumi, kas bloķē fluoresceīna sāls krāsvielas izsūkšanos cauri monoslānim, pieaugot šūnu pasāžu skaitam, funkcionē aizvien sliktāk. Nepilnīga blīvo savienojumu izveidošanās neapstrādātajā kontrolē palielina FL. Tādēļ ir svarīgi noteikt pieļaujamo maksimālo caurplūdi neapstrādātajās kontrolēs (sk. 38. punktu par 0 % caurplūdi). Tāpat kā visos *in vitro* testos, šūnas laika gaitā var transformēties, tāpēc ir būtiski testiem noteikt pasāžu skaita diapazonus.

Dažos gadījumos pašreizējo pielietojamības jomu var paplašināt, taču tikai pēc tam, kad izanalizēta pētīto testējamo ķīmikāliju paplašināta datu kopa, vēlams, iegūta testēšanā (3). Šo testēšanas metodi pienācīgi atjaunina, ņemot vērā jaunu informāciju un datus.

Laboratorijām, kas sāk lietot šo testēšanas metodi, jāizmanto 3. papildinājumā norādītās standartķīmikālijas. Laboratorija šīs ķīmikālijas var izmantot *FL* testēšanas metodes izmantošanas tehniskās kompetences demonstrēšanai pirms *FL* testēšanas rezultātu datu iesniegšanas izmantošanai normatīvajos aktos reglamentētajai bīstamības klasifikācijai.

TESTA PRINCIPS

FL testēšanas metode ir uz citotoksicitāti un šūnu funkciju balstīts *in vitro* tests, ko veic ar *MDCK CB997* kanāliņu epitēlija šūnu konfluentu monoslāni, audzētu uz puscaurlaidīgiem insertiem, un kas modelē *in vivo* radzenes epitēlija fāzi, kurā šūnas nevairojas. *MDCK* šūnu līnija ir labi zināma un veido blīvos un desmosomālos savienojumus, kas līdzinās tiem, kuri atrodas konjunktīvas un radzenes apikālajā pusē. Blīvie un desmosomālie *in vivo* savienojumi neļauj radzenes epitēlijā iespieties šķīdinātajām ķīmikālijām un svešiem materiāliem. Blīvo un desmosomālo savienojumu bojājumu izraisīts transepitēliālās necaurlaidības zudums ir viens no agrīnajiem notikumiem ķīmiski inducētā acu kairinājumā.

Testējamo ķīmikāliju aplicē uz inserta apikālajā pusē audzētu šūnu konfluentā slānī. Regulāri izmanto īsu — 1 min — ekspozīcijas laiku, lai atspoguļotu normālo klirensa ātrumu cilvēka ekspozīcijas gadījumā. Īsā ekspozīcijas laikā priekšrocība ir tāda, ka vielas un maisījumus uz ūdens bāzes var testēt neatšķaidītus, ja tos pēc ekspozīcijas perioda var viegli noņemt. Tas ļauj rezultātus tiešāk salīdzināt ar ķīmisko ietekmi uz cilvēkiem. Pēc tam testējamo ķīmikāliju novāc un uz 30 minūtēm monoslāņa apikālajai pusei pievieno netoksisku, ļoti fluorescējošu nātrija fluoresceīna krāsvielu. Bojājumus, ko testējamā ķīmikālija radījusi blīvajiem savienojumiem, nosaka pēc fluoresceīna daudzuma, kas noteiktā laika periodā izplūst cauri šūnu slānim.

Nātrija fluoresceīna krāsvielas daudzumu, kas izplūst cauri monoslānim un inserta membrānai un ieplūst iedobē esošajā noteiktajā šķīduma daudzumā (kurā ieplūst nātrija fluoresceīna krāsviela), nosaka, iedobē spektrofotometriski izmērot fluoresceīna koncentrāciju. Fluoresceīna caurplūdes (*FL*) daudzumu aprēķina, ņemot vērā fluorescences intensitātes (*FI*) nolasījumus no divām kontrolēm: tukšās kontroles un maksimālās caurplūdes kontroles. Pie katras no testējamajām ķīmikālijām noteiktajām koncentrācijām izsaka caurplūdes procentuālo daudzumu un līdz ar to blīvajos savienojumu bojājumu apjomu attiecībā pret šīm kontrolēm. Aprēķina FL_{20} (t. i., koncentrāciju, kas izraisa 20 % *FL*, salīdzinājumā ar vērtību, kas reģistrēta neapstrādātam konfluentam monoslānim un insertiem, kuros nav šūnu). Prognozes modelī, ar ko identificē acu korozijas un nopietna kairinājuma izraisītājus, izmanto FL_{20} (mg/ml) vērtību (sk. 35. punktu).

Svarīga testējamās ķīmikālijas toksicitātes profila daļa, ko novērtē arī acu kairinājuma *in vivo* testā, ir rekuperācija. Sākotnējo analīzi dati liecina, ka dati par rekuperāciju (līdz 72 h pēc eksponētības ķīmikālijai), iespējams, varētu palielināt *INVITOX* protokola Nr. 71 prognoztspēju, bet ir nepieciešama turpmāka izvērtēšana un papildu dati, vēlams, no papildu testiem (6). Šo testēšanas metodi pienācīgi atjaunina, ņemot vērā jaunu informāciju un datus.

PROCEDŪRA

Šūnu monoslāņa sagatavošana

MDCK CB997 šūnu monoslāni sagatavo, izmantojot subkonfluentas šūnas, ko audzē šūnu kultivēšanas kolbās *DMEM*/uzturvielu maisījumā *F12* (1x koncentrāts ar L-glutamīnu, 15 mM *HEPES*, kalciju (koncentrācijā 1,0–1,8 mM) un 10 % termiski aktivētu *FCS/FBS*). Svarīgi: visām *FL* testā izmantotajām barotnēm/šķīdumiem jāsaturs kalcijs koncentrācijā no 1,8 nM (200 mg/l) līdz 1,0 mM (111 mg/l), lai nodrošinātu blīvā savienojuma veidošanos un integritāti. Lai nodrošinātu vienādu un reproducējamu blīvo savienojumu veidošanos, jākontrolē šūnu pasāžu skaita diapazons. Vēlamais šūnu pasāžu diapazons pēc atkausēšanas ir 3–30, jo šūnām šajā pasāžu diapazonā ir līdzīga funkcionētspēja, un tas palīdz iegūt reproducējamus testa rezultātus.

Pirms *FL* testēšanas metodes izpildes šūnas atdala no kolbas tripsinizējot, centrifugē un pienācīgā daudzumā uzšēj 24 iedobju plates insertos (sk. 1. papildinājumu). Šūnu uzšēšanai izmanto 12 mm diametra insertus ar jauktu celulozes esteru membrānu ar biezumu 80–150 µm un poru lielumu 0,45 µm. Validācijas pētījumā tika izmantoti *Millicell-HA* 12 mm inserti. Svarīgas ir inserta un membrānas tipa īpašības, jo tās var ietekmēt šūnu augšanu un ķīmisko saistīšanos. Atsevišķu tipu ķīmikālijas var saistīties ar *Millicell-HA* inserta membrānu, kas var ietekmēt rezultātu interpretāciju. Ja tiek izmantotas citas membrānas, to līdzvērtīgums jādemonstrē ar standartķīmikālijām (sk. 3. papildinājumu).

Ķīmiskā saistīšanās ar inserta membrānu ir izplatītāka katjoniskām ķīmikālijām, piem., benzalkonija hlorīdam, ko piesaista pozitīvi uzlādētā membrāna (7). Ķīmiskā saistīšanās ar inserta membrānu var palielināt ķīmikālijas ekspozīcijas laiku, kā rezultātā ķīmikālijas toksiskuma potenciāls var tikt novērtēts pārāk augstu, bet var arī fiziski samazināt fluoresceīna caurplūdi caur insertu, krāsvielai saistoties ar katjonisko ķīmikāliju, kas saistījies ar inserta membrānu, kā rezultātā ķīmikālijas toksiskuma potenciāls var tikt novērtēts pārāk zemu. To iespējams viegli uzraudzīt, atsevišķu membrānu eksponējot testējamās ķīmikālijas maksimālajai koncentrācijai un pēc tam uz standarta laiku (bez šūnu kontroles) pievienojot nātrija fluoresceīna krāsvielu normālā koncentrācijā. Ja novērojama nātrija fluoresceīna krāsvielas saistīšanās, inserta membrāna pēc testējamā materiāla noskalošanas izskatās dzeltena. Tāpēc, lai būtu iespējams interpretēt ķīmikālijas ietekmi uz šūnām, ir būtiski zināt testējamās ķīmikālijas saistīšanās īpašības.

Pēc šūnu uzšēšanas uz insertiem ķīmikālijas ekspozīcijas laikā jābūt konfluentam monoslānim. Katrai iedobei jāpievieno $1,6 \times 10^5$ šūnas (400 µl šūnu suspensijas ar blīvumu 4×10^5 šūnu/ml). Šādos apstākļos konfluentu monoslāni parasti iegūst pēc 96 stundām kultūrā. Inserti pirms izsēšanas vizuāli jāanalizē, lai nodrošinātu, ka jebkādi bojājumi, ko reģistrē 30. punktā aprakstītajā vizuālajā kontrolē, radušies manipulāciju dēļ.

MDCK šūnu kultūras jāglabā inkubatoros mitrinātā atmosfērā pie $5\% \pm 1\% \text{ CO}_2$ un $37 \pm 1^\circ\text{C}$. Šūnas nedrīkst būt kontaminētas ar baktērijām, vīrusiem, mikoplazmu vai sēnītēm.

Testējamo un kontroles ķīmikāliju aplicēšana

Katrā eksperimenta reizē jāgatavo svaigs testējamās ķīmikālijas izejšķīdums, kas jāizmanto 30 minūšu laikā pēc sagatavošanas. Testējamās ķīmikālijas jāgatavo kalciju saturošā (1,0–1,8 mM koncentrācijā), fenolsarkano nesaturošā HBSS, lai novērstu seruma proteīnu saistīšanos. Pirms testēšanas jānovērtē ķīmikālijas šķīdība 250 mg/ml HBSS. Ja ķīmikālija šajā koncentrācijā 30 minūtes veido stabilu suspensiju vai emulsiju (t. i., saglabā viendabīgumu un nenosēžas vai nesadalās vairākās fāzēs), HBSS var izmantot par šķīdinātāju. Taču, ja tiek konstatēts, ka ķīmikālija pie šīs koncentrācijas HBSS nešķīst, jāapsver iespēja izmantot citu testēšanas metodi, nevis *FL*. Iespēju gadījumos, kad tiek konstatēts, ka ķīmikālija nešķīst HBSS, par šķīdinātāju izmantot vieglu minerāleļļu, jāapsver piesardzīgi, jo nav pieejami pietiekami dati, lai izdarītu secinājumus par *FL* veikspēju tādos apstākļos.

Visas testējamās ķīmikālijas sagatavo no izejšķīduma sterīlā, kalciju saturošā (1,0–1,8 mM koncentrācijā), fenolsarkano nesaturošā HBSS piecās fiksētās koncentrācijās, kas atšķaidītas pēc masas daļas: 1, 25, 100, 250 mg/ml un neatšķaidīts vai piesātināts šķīdums. Testējot cietu ķīmikāliju, jāiekļauj ļoti liela koncentrācija — 750 mg/ml. Šīs koncentrācijas ķīmikālija šūnām var būt jāaplicē, izmantojot pozitīvās izspiedes pipeti. Ja konstatētais toksiskums ir 25–100 mg/ml robežās, divreiz jātestē šādas papildu koncentrācijas: 1, 25, 50, 75, 100 mg/ml. No šīm koncentrācijām aprēķina FL_{20} vērtību, ar noteikumu, ka ir izpildīti pieņemamības kritēriji.

Testējamās ķīmikālijas aplicē konfluentajiem šūnu monoslāņiem pēc šūnu barotnes novākšanas un divreizējas noskalošanas ar sterilu, siltu (37 °C), kalciju saturošu (1,0–1,8 mM koncentrācijā), fenolsarkano nesaturošu HBSS. Pirms tam filtrus vizuāli pārbaudīta uz jebkādiem iepriekšējiem bojājumiem, ko varētu kļūdaini piedēvēt potenciālam nesaderīgumam ar testējamām ķīmikālijām. Katrai testējamās ķīmikālijas koncentrācijai un kontrolēm katrā izpildē jāizmanto vismaz trīs replikāti. Pēc 1 min ekspozīcijas istabas temperatūrā testējamā ķīmikālija piesardzīgi jānoņem ar atsūkšanas metodi, monoslānis divreiz jānoskalo ar sterilu, siltu (37 °C), kalciju saturošu (1,0–1,8 mM koncentrācijā), fenolsarkano nesaturošu HBSS un nekavējoties jāizmēra fluoresceīna caurplūde.

Katrā testēšanas reizē jāizmanto paralēlas negatīvās kontroles (NK) un pozitīvās kontroles (PK), lai uzskatāmi parādītu, ka monoslāņa integritāte (NK) un šūnu jutība (PK) ir iepriekš noteiktajā vēsturiskajā pieņemamības diapazonā. Ieteicamā PK ķīmikālija ir Brij 35 (CAS Nr. 9002-92-0) pie 100 mg/ml. Pie šādas koncentrācijas būtu jārodas aptuveni 30 % fluoresceīna caurplūdes (pieņemamais fluoresceīna caurplūdes, t. i., šūnu slāņa bojājumu, diapazons ir 20–40 %). Ieteicamā NK ķīmikālija ir kalciju saturošs (1,0–1,8 mM koncentrācijā), fenolsarkano nesaturošs HBSS (neapstrādāta, tukša kontrole). Katrā testēšanas reizē jāiekļauj arī maksimālās caurplūdes kontrole, lai būtu iespējams aprēķināt FL_{20} vērtības. Maksimālo caurplūdi nosaka, izmantojot kontroles insertu, kurā nav šūnu.

Fluoresceīna caurlaidības noteikšana

Tūlīt pēc testējamo un kontroles ķīmikāliju novākšanas insertiem (piem., *Millicell-HA*) pievieno 400 µl 0,1 mg/ml nātrija fluoresceīna šķīduma (0,01 % (masas) kalciju saturošs [1,0–1,8 mM koncentrācijā], fenolsarkano nesaturošs HBSS). Kultūras 30 minūtes tur istabas temperatūrā. Pēc inkubēšanas ar fluoresceīnu insertus no katras iedobes piesardzīgi izņem. Katru filtru vizuāli pārbauda un reģistrē visus bojājumus, kas radušies manipulāciju laikā.

Caur monoslāni un insertu caurplūdušā fluoresceīna daudzumu šķīdumā, kas palicis iedobēs pēc insertu izņemšanas, izsaka skaitliski. Spektrofluorimetrā veic mērījumus ar ierosas un emisijas viļņa garumiem, attiecīgi 485 nm un 530 nm. Spektrofluorimetra jutībai jābūt noregulētai tā, lai panāktu vislielāko skaitlisko atšķirību starp maksimālo *FL* (inserts bez šūnām) un minimālo *FL* (inserts ar konfluento monoslāni, kas apstrādāts ar NK). Tā kā izmantotie spektrofluorimetri atšķiras, ieteicams izmantot jutību, kas pie maksimālās fluoresceīna caurplūdes kontroles sniedz fluorescences intensitāti > 4 000. Maksimālā *FL* vērtība nedrīkst pārsniegt 9999. Maksimālās fluorescences caurplūdes intensitātei jāietilpst izmantotā spektrofluorimetra lineārajā diapazonā.

Rezultātu interpretēšana un prognozes modelis

FL daudzums ir proporcionāls ķīmikālijas inducētajiem blīvo savienojumu bojājumiem. Katras ķīmikālijas testētās koncentrācijas *FL* procentuālo daudzumu aprēķina no *FL* vērtībām, kas iegūtas par testējamo ķīmikāliju, ņemot vērā *FL* vērtības no NK (nolasījums no šūnu konfluentā monoslāņa, kas apstrādāts ar NK) un maksimālās caurplūdes kontroli (*FL* apjoma nolasījums cauri insertam, kurā nav šūnu).

Maksimālās caurplūdes fluorescences vidējā intensitāte = x .

0 % caurplūdes fluorescences vidējā intensitāte (NK) = y .

Vidējo 100 % caurplūdi iegūst, no vidējās maksimālās caurplūdes atņemot vidējo 0 % caurplūdi,

t. i., $x - y = z$.

Caurplūdes procentuālo daudzumu pie katras fiksētās devas iegūst, no trīs replikātu nolasījumu fluorescences vidējās intensitātes (m) atņemot 0 % caurplūdi un šo vērtību izdalot ar 100 % noplūdi, t. i., % FL = $[(m-y) / z] \times 100$ %, kur:

m = trīs replikātu mērījumu fluorescences vidējā intensitāte izmantotajai koncentrācijai;

% FL = šūnu slānim caurplūdušā fluoresceīna procentuālais daudzums.

Lai aprēķinātu, kāda ķīmikālijas koncentrācija izraisa 20 % FL, jāizmanto šāds vienādojums:

$$FL_D = [(A-B) / (C-B)] \times (M_C - M_B) + M_B$$

kur:

D = inhibēšana (%)

A = bojājums (%) (20 % fluoresceīna caurplūde)

B = fluoresceīna caurplūde (%) < A

C = fluoresceīna caurplūde (%) > A

M_C = C koncentrācija (mg/ml)

M_B = B koncentrācija (mg/ml)

Tālāk sniegta FL_{20} robežvērtība prognozēm, ka ķīmikālija izraisa acu koroziju / nopietnu kairinājumu:

FL_{20} (mg/ml)	K&M saskaņā ar ANO GHS	K&M saskaņā ar ES CLP	K&M saskaņā ar ASV EPA
≤ 100	1. kategorija	1. kategorija	I kategorija

K&M: klasificēšana un marķēšana

FL testēšanas metodi ieteicams izmantot tikai ūdenī šķīstošu acu korozijas un nopietnu kairinājumu izraisītāju identificēšanai (ANO GHS 1. kategorija, ES CLP 1. kategorija, ASV EPA I kategorija) (sk. 1. un 10. punktu).

Lai ūdenī šķīstošas ķīmikālijas (vielas un maisījumus) (3) (6) (7) identificētu kā “nopietnus acu bojājumus izraisītājus” (ANO GHS/ES CLP 1. kategorija) vai kā “acu korozijas vai nopietna kairinājuma izraisītājus” (ASV EPA I kategorija), testējamajai ķīmikālijai jāinducē FL_{20} vērtība, kas ir ≤ 100 mg/ml.

Rezultātu pieņemamība

Maksimālās fluoresceīna caurplūdes vidējai vērtībai (x) jābūt lielākai par 4 000 (sk. 31. punktu), vidējai 0 % caurplūdei (y) jābūt vienāgai ar vai zemākai par 300, un vidējai 100 % caurplūdei (z) jābūt no 3 700 līdz 6 000.

Testu uzskata par pieņemamu, ja pozitīvā kontrole šūnu slānim ir radījusi 20 %–40 % bojājumu (ko mēra kā fluoresceīna procentuālo caurplūdi).

DATI UN PĀRSKATA SNIEGŠANA

Dati

Par katru testēšanas reizi tabulas veidā jāattēlo dati par atsevišķām replikātu iedobēm (piem., fluorescences intensitātes vērtības un dati par katrai testējamajai ķīmikālijai aprēķināto procentuālo FL, ieskaitot klasifikāciju). Turklāt jānorāda arī katra atsevišķā replikāta mērījumu vidējās vērtības $\pm$ SN katrā testēšanas reizē.

Testēšanas pārskats

Testēšanas pārskatā jāiekļauj tālāk norādītā informācija.

Testējamās un kontroles ķīmikālijas:

- ķīmiskais(-ie) nosaukums(-i), piem., *Chemical Abstracts Service (CAS)* izmantotais nosaukums un citi nosaukumi, ja tādi ir zināmi;
- ķīmikālijas CAS numurs, ja tāds ir zināms;
- vielas vai maisījuma tīrība un sastāvs (masas procentos), ciktāl šī informācija ir pieejama;
- fizikālķīmiskās īpašības, kas attiecas uz testa norisi (piem., fizikālais stāvoklis, gaistamība, pH, stabilitāte, šķīdība ūdenī, ķīmiskā klase);
- testējamo/kontroles ķīmikāliju sagatavošana pirms testēšanas, ja tāda veikta (piem., sildīšana, smalcināšana),
- uzglabāšanas apstākļi.

Izmantotās testēšanas metodes un protokola pamatojums

- Jāiekļauj apsvērumi par testēšanas metodes pielietojamības jomu un ierobežojumiem.

Testēšanas apstākļi:

- izmantotās šūnu sistēmas apraksts, tostarp autentiskuma sertifikāts un šūnu līnijas mikoplazmas statuss;
- sīkas ziņas par izmantoto testēšanas procedūru;
- izmantotā(-s) testējamās ķīmikālijas koncentrācija(-s),
- cik ilga bijusi ekspozīcija testējamajai ķīmikālijai;
- inkubācijas ar fluoresceīnu ilgums;
- testēšanas procedūras modifikāciju apraksts, ja tādas bijušas;
- izmantoto izvērtēšanas kritēriju apraksts;
- atsauce uz modeļa vēsturiskajiem datiem (piem., negatīvās un pozitīvās kontroles, attiecīgā gadījumā etalonķīmikālijas);
- informācija par laboratorijas pierādīto tehnisko kompetenci.

Rezultāti:

- tabulas veidā apkopoti dati par individuālām testējamām ķīmikālijām un kontrolēm par katru testēšanas reizi un katru replikāta mērījumu (tostarp individuāli rezultāti, vidējās vērtības un SN);
- iegūtā(-s) klasifikācija(-s) ar norādi uz izmantoto prognozes modeli un/vai lēmuma pieņemšanas kritēriju;
- jebkādas citas novērotās ietekmes apraksts.

Rezultātu iztirzājums

- Jāiekļauj apsvērumi par nepārliciecināmu rezultātu (35. punkts: $FL_{20} > 100$ mg/ml) un turpmāku testēšanu.

Secinājumi

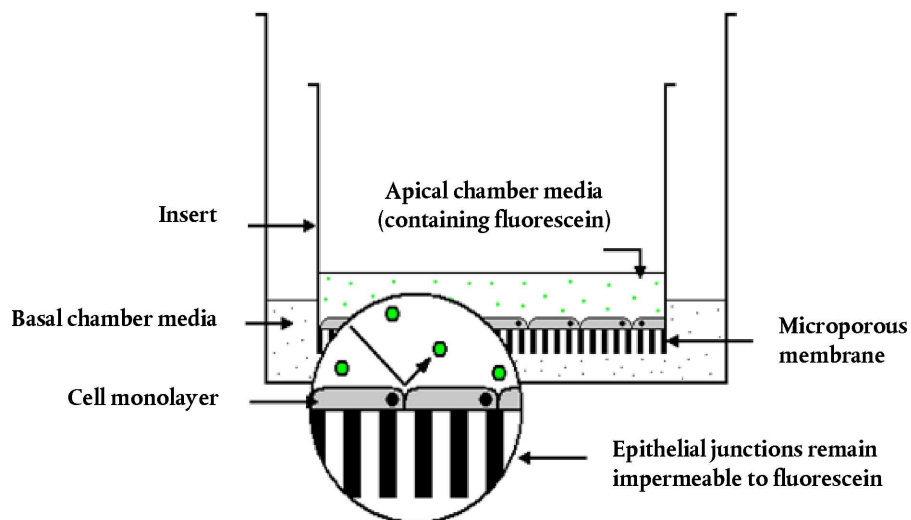
LITERATŪRAS SARAKSTS

- (1) UN (2009), United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Third revised edition, New York & Geneva: United Nations Publications. ISBN: 978-92-1-117006-1. Pieejams: [http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev03/03files_e.html]
 - (2) U.S. EPA (1996), Label Review Manual: 2nd Edition, EPA737-B-96-001, Washington DC: U.S. Environmental Protection Agency.
 - (3) EC-ECVAM (2009), Statement on the scientific validity of cytotoxicity/cell-function based *in vitro* assays for eye irritation testing.
 - (4) Scott, L. *et al.* (2010), A proposed eye irritation testing strategy to reduce and replace *in vivo* studies using Bottom-Up and Top-Down approaches, *Toxicol. In Vitro* 24, 1-9
 - (5) Šā pielikuma B.5. nodaļa "Akūts acu kairinājums/korozija".
 - (6) EC-ECVAM (1999), INVITOX Protocol 71: Fluorescein Leakage Test, Ispra, Italy: European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM). Pieejams: [<http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu>]
 - (7) EC-ECVAM (2008), Fluorescein Leakage Assay Background Review Document as an Alternative Method for Eye Irritation Testing.
 - (8) OECD (2005), *Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment*, OECD Series on Testing and Assessment No. 34. OECD, Paris.
-

1. papildinājums

DIAGRAMMA: MDCK ŠŪNAS, KO AUDZĒ UZ INSERTA MEMBRĀNAS FL TESTĒŠANAS METODES VAJADZĪBĀM

MDCK šūnu konfluento slāni audzē uz inserta puscaurlaidīgās membrānas. Insertus ievieto 24 iedobju plašu iedobēs.



Attēla avots: Wilkinson, P.J. (2006), Development of an *in vitro* model to investigate repeat ocular exposure, Ph.D. Thesis, University of Nottingham, UK.

2. papildinājums

DEFINĪCIJAS

Pareizība: pakāpe, kādā ar testēšanas metodi iegūto mērījumu rezultāti sakrīt ar pieņemtajām atsaucēs vērtībām. Tas ir testēšanas metodes veiktspējas raksturlielums un viens no tās “relevantuma” aspektiem. Šo terminu bieži izmanto ar nozīmi “konkordantums”, ar to domājot testēšanas metodes pareizo rezultātu īpatsvaru.

Ķimikālija: viela vai maisījums.

EPA 1. kategorija: ķimikālijas, kuras rada korozīvu ietekmi (acs audu neatgriezenisku noārdīšanos), radzenes bojājumus vai kairinājumu, kas saglabājas ilgāk par 21 dienu (2).

ES CLP (Regula (EK) Nr. 1272/2008 par vielu un maisījumu klasificēšanu, marķēšanu un iepakojšanu): Eiropas Savienībā (ES) īsteno ANO GHS sistēmu ķimikāliju (vielu un maisījumu) klasificēšanai.

Pseudonegatīvu rezultātu īpatsvars: tas, cik liela daļa no visām pozitīvajām ķimikālijām ar testēšanas metodi aplami iznāk negatīvas. Tas ir viens no testēšanas metodes veiktspējas raksturlielumiem.

Pseudopozitīvu rezultātu īpatsvars: tas, cik liela daļa no visām negatīvajām ķimikālijām ar testēšanas metodi aplami iznāk pozitīvas. Tas ir viens no testēšanas metodes veiktspējas raksturlielumiem.

FL₂₀: šo parametru iespējams aplēst, nosakot koncentrāciju, pie kuras testējamā ķimikālija izraisa 20 % fluoresceīna caurplūdi cauri šūnu slānim.

Fluoresceīna caurplūde: ar spektrofлуорimetru izmērīts fluoresceīna daudzums, kas izplūst cauri šūnu slānim.

GHS (Apvienoto Nāciju Organizācijas (ANO) ķimikāliju klasificēšanas un marķēšanas vispārēji saskaņotā sistēma): sistēma, kurā ķimikālijas (vielas un maisījumus) klasificē pēc standartizētiem fizisko apdraudējumu, veselības apdraudējumu un vidisko apdraudējumu tipiem un līmeņiem un kura paredz atbilstošus saziņas elementus, piem., piktogrammas, signālvārdus, bīstamības apzīmējumus, drošības prasību apzīmējumus un drošības datu lapas, ar mērķi sniegt informāciju par ķimikāliju nelabvēlīgo ietekmi, lai aizsargātu cilvēkus (tostarp darba devējus, darba ņēmējus, transporta darbiniekus, patērētājus un avārijas dienestu darbiniekus) un vidi.

GHS 1. kategorija: acs audu bojājumi vai nopietna fiziska redzes pasliktināšanās, kas rodas pēc testējamās ķimikālijas aplicēšanas uz acs priekšējās virsmas un kas 21 dienas laikā pēc aplicēšanas nav pilnīgi atgriezeniska.

Bīstamība: īpašība, kas raksturo tādu agentu vai situāciju, kurai piemīt potenciāls atstāt nelabvēlīgu ietekmi uz šim agentam eksponētu organismu, sistēmu vai (apakš)populāciju.

Maisījums: ANO GHS kontekstā — maisījums vai šķīdums, kas sastāv no divām vai vairāk vielām, kurā tās nereaģē.

Negatīvā kontrole: neapstrādāts replikāts, kurā ir visi testa sistēmas komponenti. Ar šo paraugu rīkojas tāpat, kā ar paraugiem, kas apstrādāti ar testējamo ķimikāliju, un citiem kontrolparaugiem, lai noteiktu, vai šķīdinātājs mijiedarbojas ar testa sistēmu.

Neklasificētas ķimikālijas: ķimikālijas, kuras nav klasificētas ANO GHS 1., 2.A vai 2.B kategorijā, ES CLP 1. vai 2. kategorijā vai ASV EPA I, II vai III acu kairinājuma izraisītāju kategorijā.

Acu korozijas izraisītājs: a) ķimikālija, kas rada neatgriezeniskus acs audu bojājumus; b) ķimikālijas, kuras ir klasificētas kā ANO GHS 1. kategorijas, ES CLP 1. kategorijas vai ASV EPA I kategorijas acu korozijas izraisītājas.

Acu kairinājuma izraisītājs: a) ķimikālija, kas pēc aplicēšanas uz acābola priekšējās virsmas acī rada atgriezeniskas pārmaiņas; b) ķimikālijas, kas ir klasificētas kā ANO GHS 2.A vai 2.B kategorijas, ES CLP 2. kategorijas vai ASV EPA II vai II kategorijas acu kairinājuma izraisītāji.

Nopietna acu kairinājuma izraisītājs: a) ķimikālija, kas pēc aplicēšanas uz acs priekšējās virsmas izraisa acs audu bojājumus, kuri 21 dienas laikā pēc aplicēšanas nav atgriezeniski, vai kas izraisa nopietnu fizisku redzes pasliktināšanos; b) ķimikālijas, kuras ir klasificētas kā ANO GHS 1. kategorijas, ES CLP 1. kategorijas vai ASV EPA I kategorijas acu kairinājuma izraisītājas.

Pozitīvā kontrole: replikāts, kurā ir visi testa sistēmas komponenti un kurš apstrādāts ar ķimikāliju, par ko ir zināms, ka tā izraisa pozitīvu atbildreakciju. Lai būtu iespēja novērtēt pozitīvās kontroles atbildreakcijas mainību laikā, pozitīvās atbildreakcijas intensitāte nedrīkstētu būt pārlietu liela.

Standartķimikālijas: standartķimikāliju saraksta apakšgrupa, ar ko nepieredzējusī laboratorija var pierādīt savu kompetenci izmantot validēto atsauces testēšanas metodi.

Relevantums: parametrs, kas raksturo testa attiecināmību uz interesējošo ietekmi un to, vai testu lietot konkrētam nolūkam ir jēgpilni un noderīgi. Pakāpe, kādā ar testu var pareizi izmērīt vai prognozēt interesējošo bioloģisko ietekmi. Relevantums ietver arī testēšanas metodes pareizības (konkordantuma) aspektu (8).

Ticamība: parametrs, kas izsaka, kādā pakāpē tajā pašā vai citā laboratorijā ilgākā laikā, izmantojot to pašu protokolu, var iegūt reproducējamus rezultātus. To novērtē, aprēķinot metodes reproducējamību dažādās laboratorijās un atkārtojamību tajā pašā laboratorijā.

Aizstājējtests: ikdienā lietota testa aizstāšanai paredzēts tests, kuru pieņemts izmantot bīstamības identificēšanai un/vai riska novērtēšanai, ar pierādītu spēju ekvivalentā vai labākā veidā, salīdzinot ar pieņemto testu, nodrošināt (pēc vajadzības) cilvēka un dzīvnieku veselības vai vides aizsardzību visās iespējamās testēšanas situācijās un ar visām iespējamām ķimikālijām.

Jutība: tas, cik liela daļa no visām pozitīvajām/aktīvajām ķimikālijām ar testu tiek klasificētas pareizi. Tas ir tādas testēšanas metodes pareizības mērs, ar kuru iegūst kategoriālus rezultātus, un svarīgs faktors testēšanas metodes relevantuma izvērtēšanā (8).

Nopietni acu bojājumi: acs audu bojājumi vai nopietna fiziska redzes pasliktināšanās, kas rodas pēc testējamās ķimikālijas aplicēšanas uz acs priekšējās virsmas un kas 21 dienas laikā pēc aplicēšanas nav pilnīgi atgriezeniska.

Šķīdinātāja/nesēja kontrole: neapstrādāts paraugs, kurā ir visi testa sistēmas komponenti, tostarp šķīdinātājs vai nesējs, ko izmanto ar testējamo ķimikāliju apstrādātajos paraugos un citos kontrolparaugos, un kuru izmanto, lai noteiktu bāzlinijas atbildreakciju paraugiem, kas apstrādāti ar attiecīgajā šķīdinātājā vai nesējā izšķīdinātu testējamo ķimikāliju. Ja testā izmanto arī paralēlu negatīvo kontroli, šis paraugs parāda arī to, vai šķīdinātājs vai nesējs mijiedarbojas ar testa sistēmu.

Specifiskums: tas, cik liela daļa no visām negatīvajām/neaktīvajām ķimikālijām ar testu tiek klasificētas pareizi. Tas ir tādas testēšanas metodes pareizības mērs, ar kuru iegūst kategoriālus rezultātus, un svarīgs faktors testēšanas metodes relevantuma izvērtēšanā.

Vielā: ANO GHS kontekstā tie ir dabiski radušies vai ražošanas procesā iegūti ķīmiskie elementi un to savienojumi, ieskaitot produkta stabilizācijai vajadzīgās piedevas, kā arī izmantotajos procesos radušos piejaukumus, bet izņemot šķīdinātājus, kurus var atdalīt, neietekmējot vielas stabilitāti un neizmainot tās sastāvu.

Testējamā ķimikālija: jebkura viela vai maisījums, ko testē ar šo testēšanas metodi.

Daudzpakāpju testēšanas stratēģija: pakāpeniskas testēšanas stratēģija, kurā noteiktā secībā pārskata visu esošo informāciju par testējamo ķīmikāliju, katrā pakāpē izmantojot pierādījumu izsvēršanu, lai pirms pārejas uz nākamo pakāpi noteiktu, vai ir pieejams pietiekami daudz informācijas, lai pieņemtu lēmumu par bīstamības klasifikāciju. Ja testējamās ķīmikālijas kairinājuma izraisīšanas potenciālu var noteikt, pamatojoties uz esošo informāciju, papildu testēšana nav jāveic. Ja, pamatojoties uz esošo informāciju, testējamās ķīmikālijas kairinājuma izraisīšanas potenciālu noteikt nevar, ievēro pakāpenisku secīgu procedūru testēšanai ar dzīvniekiem, līdz var viennozīmīgi pieņemt lēmumu par klasifikāciju.

Validēta testēšanas metode: testēšanas metode, kuras relevantums (ieskaitot pareizību) un ticamība attiecībā uz lietošanu konkrētā nolūkā ir pārbaudīta validācijas pētījumos. Jāievēro, ka validētas testēšanas metodes veikspēja pareizības un ticamības ziņā var nebūt pietiekama, lai to izmantotu paredzētajam nolūkam (8).

Pierādījumu izsvēršana: process, kurā izsver dažādu informācijas elementu stiprās un vājās puses, cenšoties izdarīt un pamatot secinājumu par testējamās ķīmikālijas bīstamības potenciālu.

3. papildinājums

FL TESTĒŠANAS METODES STANDARTĶIMIKĀLIJAS

Pirms šīs testēšanas metodes regulāras izmantošanas laboratorijām vajadzētu pierādīt savu tehnisko kompetenci to izmantot, no acu korozijs viedokļa pareizi klasificējot 1. tabulā ieteiktās 8 ķīmikālijas. Šīs ķīmikālijas ir atlasītas tā, lai tās reprezentētu vietēja acu kairinājuma/korozijs atbildreakciju diapazonu, kura pamatā ir *in vivo* tests ar truša acīm (TG 405, TM B.5 (5)) (t. i., ANO GHS un ES CLP 1., 2.A, 2.B kategorija vai neklasificētas ķīmikālijas). Tomēr, ņemot vērā FL testa validēto lietderīgumu (t. i., acu korozijs / nopietna kairinājuma izraisītāju identificēšanā), lai apliecinātu kompetenci, izmantojami tikai divi klasificēšanas nolūkiem izmantojami testa rezultāti (korozijs/ nopietns kairinājums vai korozijs / nopietna kairinājuma neesība). Citi atlases kritēriji bija ķīmikāliju pieejamība tirgū, kvalitatīvu *in vivo* atsaucē datu pieejamība un kvalitatīvu ar FL testēšanas metodi iegūtu datu pieejamība. Šā iemesla dēļ standartķīmikālijas tika izraudzītas no dokumenta "Fluorescein Leakage Assay Background Review Document as an Alternative Method for Eye Irritation Testing" (8), kas tika izmantots FL testēšanas metodes retrospektīvajā validācijā.

1. tabula

Ķīmikālijas, kuras ieteicams izmantot, lai pierādītu tehnisko kompetenci izmantot FL testēšanas metodi

Ķīmikālija	CAS Nr.	Ķīmiskā klase ⁽¹⁾	Aggregātvoklis	<i>In vivo</i> klasifikācija ⁽²⁾	<i>In vitro</i> klasifikācija ⁽³⁾
Benzalkonija hlorīds (5 %)	8001-54-5	Onijsavienojums	Šķidr	1. kategorija	Korozijs / nopietna kairinājuma izraisītājs
Prometazīna hidrohlors	58-33-3	Amīns/amidīns, heterocikliskais savienojums, organiskais sēra savienojums	Ciets	1. kategorija	Korozijs / nopietna kairinājuma izraisītājs
Nātrija hidroksīds (10 %)	1310-73-2	Sārms	Šķidr	1. kategorija	Korozijs / nopietna kairinājuma izraisītājs
Nātrija laurilsulfāts (15 %)	151-21-3	Karbonskābe (sāls)	Šķidr	1. kategorija	Korozijs / nopietna kairinājuma izraisītājs
4-karboksi-benzaldehīds	619-66-9	Karbonskābe, aldehīds	Ciets	2(A) kategorija	Nav korozijs/nav stipri kairinošs
Amonija nitrāts	6484-52-2	Neorganiskais sāls	Ciets	2(A) kategorija	Nav korozijs/nav stipri kairinošs
Etil-2-metilacetāts	609-14-3	Ketons, esteris	Šķidr	2(B) kategorija	Nav korozijs/nav stipri kairinošs
Glicerīns	56-81-5	Spirts	Šķidr	Nekategorizēta	Nav korozijs/nav stipri kairinošs

Saīsinājumi: CAS Nr. = Chemical Abstracts Service reģistra numurs

⁽¹⁾ Ķīmiskās klases katrai testējamai ķīmikālijai piešķirtas, izmantojot standarta klasifikācijas shēmu, kuras pamatā ir National Library of Medicine Medical Subject Headings (MeSH) klasifikācijas sistēma (pieejama <http://www.nlm.nih.gov/mesh>).

⁽²⁾ Pamatojoties uz truša acu *in vivo* testa rezultātiem (ESAO TG 405, TM B.5) un izmantojot ANO GHS un ES CLP sistēmu.

⁽³⁾ Pamatojoties uz rezultātiem, kas iegūti ar FL (INVITOX protokols Nr. 71(6)).

B.6.2. Zīdītāju “Komētas” In Vivo Tests Sārmajā Vidē**IEVADS**

Šī testēšanas metode (TM) ir ekvivalenta ESAO testēšanas vadlīnijai (TG) Nr. 489 (2016). Sārmajā vidē veiktu “komētas” (atsevišķu šūnu gēla elektroforēzes) *in vivo* testu (*comet assay*) (turpmāk tekstā vienkārši “komētas tests”) izmanto DNS kēdes pārrāvumu detektēšanai šūnās vai kodolos, kas izolēti no dažādiem dzīvnieku, parasti graužēju, audiem, kuri eksponēti potenciāli genotoksiskam(-iem) materiālam(-iem). Komētas tests ir pārskatīts, un dažādas ekspertu grupas ir publicējušas ieteikumus (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9) (10). Šī testēšanas metode ir daļa no ģenētiskās toksikoloģijas testēšanas metožu klāsta. Ir izstrādāts ESAO dokuments, kas īsi informē par testēšanu ģenētiskajā toksikoloģijā un sniedz pārskatu par nesieniem šīs vadlīnijas grozījumiem.

Komētas testa mērķis ir identificēt ķīmikālijas, kas izraisa DNS bojājumus. Sārmajā vidē (> pH 13) ar komētas testu var detektēt vienas kēdes vai dubultkēdes pārrāvumus, kas radušies, piem., no tiešas mijiedarbības ar DNS, sārmilabilām vietām vai sakarā ar pārejošiem DNS kēdes pārrāvumiem, kuri rodas DNS reparācijā ar izgriešanu (ekscīziju). Šie kēdes pārrāvumi var tikt reparēti, neradot paliekošu ietekmi, būt šūnai nāvējoši vai nostabilizēties par mutāciju, kas rada pastāvīgas dzīvotspējīgas izmaiņas. Tie var arī radīt hromosomālus bojājumus, ko arī asociē ar daudzām cilvēku slimībām, tostarp vēzi.

2006.–2012. gadā tika veikts oficiāls graužēju *in vivo* komētas testa validācijas izmēģinājums, ko koordinēja Japānas Alternatīvo metožu validēšanas centrs (JaCVAM) kopā ar Eiropas Alternatīvo metožu validēšanas centru (ECVAM), Alternatīvo metožu validēšanas starpaģentūru koordinācijas komiteju (ICCVAM) un NTP Starpaģentūru alternatīvo toksikoloģisko metožu izvērtēšanas centru (NICEATM) (12). Šī testēšanas metode ietver komētas testa ieteicamo izmantojumu un ierobežojumus, un tās pamatā ir validācijas izmēģinājumā izmantotais galīgais protokols (12) un citi relevanti publicēti un nepublicēti (laboratoriju pašu dati — *proprietary data*) papildu dati.

Galveno terminu definīcijas sniegtas 1. papildinājumā. Jāpiebilst, ka šajā testā var izmantot daudz dažādu platformu (mikroskopu priekšmetstikliņus, gēla punktus, 96 iedobju plates u. c.). Ērtības labad turpmāk dokumentā tiek izmantots termins “priekšmetstikliņš”, taču ar to apzīmē visas pārējās platformas.

SĀKOTNĒJIE APSVĒRUMI UN IEROBEŽOJUMI

Komētas tests ir metode, ar ko eikariotiskās šūnās mēra DNS kēdes pārrāvumus. Atsevišķas šūnas/kodolus, kas ievietoti agarozē uz priekšmetstikliņa, lizē ar detergentu un augstā sāls koncentrācijā. Šajā lizēšanas posmā tiek saēstas šūnas un kodolu membrānas, kas ļauj atbrīvoties savītām DNS cilpām, ko parasti sauc par nukleoīdiem, un DNS fragmentiem. Elektroforēzē pie augsta pH rodas komētveidīgas struktūras, ko, izmantojot piemērotas fluorescences krāsvielas, var novērot fluorescences mikroskopā; DNS fragmenti atkarībā no izmēra migrē no komētas “galvas” uz “asti”, un komētas astes intensitāte attiecībā pret kopējo intensitāti (galva plus aste) atspoguļo DNS pārrāvumu daudzumu (13) (14) (15).

Komētas *in vivo* tests, ko veic sārmajā vidē, ir īpaši relevantu genotoksiskās bīstamības novērtēšanā, jo šajā testā atbildreakcijas ir atkarīgas no *in vivo* ADME (absorbēšana, izplatīšanās, metabolisms un izdalīšanās) un arī no DNS reparācijas procesiem. Atkarībā no šūnām, audiem un DNS bojājumu veida tie var būt atšķirīgi.

Lai izpildītu dzīvnieku labturības prasības, jo īpaši — samazinātu izmantoto dzīvnieku skaitu (tā saucamie 3R principi — aizstāšana, samazināšana, pilnveide [*Replacement, Reduction, Refinement*]), šo testu var arī integrēt citos toksikoloģiskos pētījumos, piem., atkārtotas devas toksiskuma pētījumos (10) (16) (17), vai tā beigupunktu var apvienot ar citiem genotoksiskās bīstamības beigupunktiem, piem., no zīdītāju eritrocītu mikrokodolu *in vivo* testa (18) (19) (20). Komētas testu visbiežāk veic ar graužējiem, kaut arī tas ir izmantots arī citām zīdītāju sugām un sugām, kas nav zīdītāji. Katrā atsevišķā gadījumā zinātniski un ētiski jāpamato tādu sugu izmantošana, kas nav graužēji, un īpaši ieteicams komētas testu ar sugām, kas nav graužēji, veikt vienīgi kā daļu no cita toksiskās bīstamības pētījuma, nevis kā atsevišķu testu.

Ekspozīcijas ceļš un pētāmie audi jāizvēlas, pamatojoties uz visām pieejamajām/esošajām zināšanām par testējamām ķīmikālijām, piem., plānoto/paredzamo cilvēka eksponētības ceļu, metabolismu un izplatīšanos, potenciālu ietekmēt saskares vietu, strukturāliem brīdinājumiem, citiem genotoksicitātes vai toksiskuma datiem un pētījuma mērķi. Tādējādi attiecīgā gadījumā mērķaudos var analizēt testējamo ķīmikāliju genotoksisko potenciālu attiecībā uz to kancerogēnu un/vai cita veida toksisku ietekmi. Uzskata, ka ar šo testu var arī sīkāk izpētīt *in vitro* sistēmā detektētu genotoksicitāti. Ir lietderīgi veikt interesējošu audu komētas *in vivo* testu, ja ir pamats gaidīt, ka interesējošie audi tiks pienācīgi eksponēti.

Šis tests starplaboratoriju salīdzinošajā testēšanā visplašāk ir validēts attiecībā uz žurku tēviņu somatiskajiem audiem, piem., *JaCVAM* izmēģinājumā (12) un *Rothfuss et al.*, 2010 (10). *JaCVAM* starptautiskajā validācijas izmēģinājumā tika izmantotas aknas un kuņģis. Aknas tika izmantotas tāpēc, ka tas ir visaktīvākais orgāns ķīmikāliju metabolisma jomā un bieži vien arī kancerogenitātes mērķorgāns. Kuņģis tika izmantots tāpēc, ka ķīmikālijām tā pēc orālas ekspozīcijas parasti ir pirmā saskares vieta, kaut arī par saskares audiem jāuzskata arī citas kuņģa un zarnu trakta vietas, piem., divpadsmitpirkstu zarna un tukšā zarna, ko varētu uzskatīt par cilvēkiem relevantāku nekā grauzēju kuņģa dziedzerdaļu. Jārūpējas, lai tādi audi netiktu eksponēti pārlietu augstām testējamās ķīmikālijas koncentrācijām (21). Šis paņēmieni principā ir izmantojams jebkuriem audiem, no kuriem iespējams iegūt analizējamās atsevišķu šūnu/kodolu suspensijas. Vairāku laboratoriju pašu dati apliecina tā sekmīgu izmantošanu daudziem dažādiem audiem, un ir daudz publikāciju, kas apliecina šā paņēmiena pielietojamību orgāniem vai audiem, kas nav aknas un kuņģis, piem., tukšajai zarnai (22), nierēm (23) (24), ādai (25) (26) vai urīnpūslim (27) (28), plaušām un bronhoalveolārās lavāžas šūnām (kas ir relevanti pētījumiem par ielopotām ķīmikālijām) (29) (30), un ar vairākiem orgāniem ir arī veikti testi (31) (32).

Kaut arī var pastāvēt interese par genotoksisko ietekmi uz gonocītiem, jāņem vērā, ka sārmainā vidē veikts komētas standarta tests, kā aprakstīts šajā testēšanas metodē, netiek uzskatīts par piemērotu DNS ķēdes pārrāvumu mērīšanai nobriedušos gonocītos. Tā kā literatūras pārskatā par komētas testa izmantošanu attiecībā uz genotoksicitāti gonocītiem (33) tika ziņoti augsti un mainīgi fona līmeņi, tiek uzskatīts, ka jāveic protokola grozījumi un jāuzlabo standartizācijas un validācijas pētījumi, pirms testēšanas metodē var iekļaut komētas testu attiecībā uz nobriedušiem gonocītiem (piem., spermatozoīdiem). Turklāt šajā testēšanas metodē aprakstītais ieteicamais ekspozīcijas režīms nav optimāls, un, lai veiktu pilnvērtīgu analīzi par DNS ķēdes pārrāvumiem nobriedušos spermatozoīdos, būtu nepieciešami garāki ekspozīcijas vai paraugošanas laiki. Ar komētas testu izmērītā genotoksiskā ietekme sēklinieku šūnās dažādos diferenciācijas posmos ir aprakstīta literatūrā (34) (35). Tomēr jāpiebilst, ka gonādas satur gan somatiskās šūnas, gan gonocītus. Šā iemesla dēļ pozitīvi rezultāti veselā gonādā (sēkliniekos) ne vienmēr atspoguļo gonocītu bojājumus; tomēr tie norāda, ka testētā(-s) ķīmikālija(-s) un/vai tās metabolīti ir gonādu sasnieguši.

Komētas testa standarta eksperimentālajos apstākļos nav iespējams ticami detektēt šķērssaites. Noteiktos modificētos eksperimenta apstākļos iespējams detektēt DNS–DNS un DNS–proteīna šķērssaites un citas bāzu modifikācijas, piem., oksidētas bāzes (23) (36) (37) (38) (39). Taču būtu jāveic papildu darbs, lai pienācīgi raksturotu, kā jāgroza protokols. Līdz ar to šeit aprakstītā testa primārais mērķis nav šķērssaišu agentu detekcija. Šis tests, pat ar modifikācijām, nav piemērots aneigēnu noteikšanai.

Ņemot vērā pašreizējās zināšanas, ar komētas *in vivo* testam ir vairāki papildu ierobežojumi (sk. 3. papildinājumu). Paredzams, ka šī testēšanas metode nākotnē tiks pārskatīta un nepieciešamības gadījumā pārstrādāta, ņemot vērā gūto pieredzi.

Pirms šīs testēšanas metodes izmantošanas maisījumam, lai iegūtu datus kādam normatīvajam mērķim, jāapsver, vai un kādēļ tā varētu sniegt minētajam mērķim piemērotus rezultātus. Ja pastāv normatīva prasība maisījumu testēt, tāda apsvērsana nav vajadzīga.

METODES PRINCIPS

Dzīvniekus piemērotā ceļā eksponē testējamajai ķīmikālijai. Devu došanas un paraugošanas sīks apraksts ir sniegts 36.–40. punktā. Izvēlētajā(-os) paraugošanas laikā(-os) interesējošos audus izpreparē un sagatavo atsevišķu šūnu/kodolu suspensijas (ja tas šķiet lietderīgi, var veikt *in situ* perfūziju, piem., aknās), ko ievieto mīkstā agarā, lai tās imobilizētu uz priekšmetstikliņiem. Šūnas/kodolus apstrādā ar līzes buferšķīdumu, lai noņemtu šūnas un/vai kodola membrānu, un eksponē spēcīgam sārmam, piem., $\text{pH} \geq 13$, lai ļautu DNS atraisīties un atbrīvotu atvijušās DNS cilpas un fragmentus. Pēc tam agarā veic kodola DNS elektroforēzi. Normālas, nefragmentētas DNS molekulas agarā paliek savā vietā, kurā atradās kodola DNS, savukārt DNS fragmenti un atvijušās DNS cilpas migrē uz anoda pusi. Pēc elektroforēzes DNS vizualizē, izmantojot pienācīgu fluorescējošu krāsvielu. Preparātus analizē ar mikroskopu un ar pilnībā vai daļēji automatiskām attēlu analizēšanas sistēmām. DNS migrācijas apmērs un attālums elektroforēzes laikā atspoguļo DNS fragmentu daudzumu un izmēru. Komētas testam ir vairāki beigupunkti. DNS bojājumu novērtēšanā ieteikts izmantot DNS daudzumu astē (DNS procentuālo daudzumu astē vai procentuālo astes intensitāti) (12) (40) (41) (42). Pēc pietiekama kodolu skaita analīzes datus analizē ar attiecīgajām metodēm, lai izvērtētu testa rezultātus.

Jāpiebilst, ka ir konstatēts, ka dažādu šīs metodoloģijas aspektu grozīšana, tostarp paraugu sagatavošana, elektroforēzes apstākļi, vizuālās analīzes parametri (piem., krāsvielas intensitāte, mikroskopa spuldzes gaismas intensitāte un mikroskopa filtru un kameras dinamiskas izmantošana) un vides apstākļi (piem., fona apgaismojums), var ietekmēt DNS migrāciju (43) (44) (45) (46).

LABORATORIJAS KVALIFIKĀCIJAS VERIFICĒŠANA

Katrai laboratorijai jāpierāda eksperimenta veikšanas kompetence attiecībā uz komētas testu, pierādot spēju iegūt pietiekami kvalitatīvas katras izmantotās sugas katra mērķaudu veida atsevišķu šūnu vai kodolu suspensijas. Preparātu kvalitāti vispirms izvērtē pēc DNS procentuālā daudzuma astē ar nesēju apstrādātu dzīvnieku šūnās, kam jābūt reproducējamā zemā diapazonā. Pašreizējie dati liecina, ka grupas vidējai procentuālajai DNS astē (pamatojoties uz mediānu vidējām vērtībām — sīkāku informāciju par šiem terminiem sk. 57. punktā) žurku aknās nebūtu vēlams pārsniegt 6 %, kas atbilstu JaCVAM validācijas pētījumā (12) un citos publicētajos un pašu datus reģistrētajām vērtībām. Patlaban nav pietiekami daudz datu, lai sniegtu ieteikumus par citu audu optimālajiem vai pieņemamajiem diapazoniem. Tas neliedz izmantot citus audus, ja tas ir pamatoti. Testēšanas pārskatā jāsniedz pienācīgs pārskats par komētas testa veikspēju šajos audos, atsaucoties uz publicēto literatūru vai pašu datiem. Pirmkārt, kontrolēs ir vēlams panākt zemu diapazonu procentuālajai DNS daļai astē, lai nodrošinātu pietiekami dinamisku diapazonu pozitīvas ietekmes detektēšanai. Otrkārt, katrai laboratorijai ar dažādiem paņēmieniem, kas ierosināti 1. tabulā (29. punkts), jāspēj reproducēt paredzētās tiešo mutagēnu un promutagēnu atbildreakcijas.

Pozitīvās vielas var izvēlēties, piemēram, no JaCVAM validācijas izmēģinājuma (12) vai citiem publicētajiem datiem (sk. 9. punktu), attiecīgā gadījumā sniedzot pamatojumu, un izvēlas tādas, kuras interesējošos audos rada viennozīmīgi pozitīvu atbildreakciju. Jāparāda arī spēja detektēt zināmu mutagēnu, piem., EMS, vāju ietekmi pie zemām devām, piem., nosakot devas-atbildreakcijas sakarības ar atbilstošu devu skaitu un atstatumiem. Sākotnēji centieni jākoncentrē uz kompetences apliecināšanu darbā ar visplašāk izmantotajiem audiem, piem., žurku aknām, ja ir iespējams rezultātus salīdzināt ar esošajiem datiem un gūt paredzētos rezultātus (12). Vienlaikus var apkopot datus par citiem audiem, piem., kuņģi / divpadsmitpirkstu zarnu / tukšo zarnu, asinīm u. c. Laboratorijai jāpierāda kompetence darbā ar katriem katras sugas audiem, ko tā plāno pētīt, un jāpierāda, ka tā ar zināmu mutagēnu (piemēram, EMS) minētajos audus var izsaukt pieņemamu pozitīvu atbildreakciju.

Nesēja/negatīvās kontroles dati jāapkopo, lai pierādītu negatīvo datu atbildreakciju reproducējamību un nodrošinātu, ka šī testa tehniskie aspekti tikuši pienācīgi kontrolēti, vai konstatētu, ka nepieciešams atkārtoti noteikt vēsturisko kontroļu diapazonus (sk. 22. punktu).

Jāpiebilst, ka, kaut arī dažādus audus iespējams iegūt autopsijā un apstrādāt komētas testa vajadzībām, laboratorijai jābūt kvalificētai dažādu audu ieguvē no viena dzīvnieka, tādējādi nodrošinot, ka netiek zaudēts neviens iespējamais DNS bojājums un komētas tests netiek ietekmēts negatīvi. Izšķirošs var būt laiks no eitanāzijas līdz apstrādei paredzēto audu noņemšanai (sk. 44. punktu).

Attīstot šā testa veikšanai nepieciešamo kompetenci, jāņem vērā dzīvnieku labturība, tādēļ attīstot kompetenci dažādajos šā testa aspektos, var izmantot citos testos izmantoto dzīvnieku audus. Turklāt jaunas testēšanas metodes ieviešanas laikā laboratorijā nav obligāti jāveic pilns pētījums un vajadzīgo prasmju uzlabošanai var izmantot mazāk dzīvnieku vai testa koncentrāciju.

Dati par vēsturiskajām kontrolēm

Kompetences noskaidrošanas gaitā laboratorijai jāizveido vēsturisko datu bāze, lai noteiktu attiecīgo audu un sugu pozitīvo un negatīvo kontroļu diapazonus un sadalījumus. Ieteikumi par vēsturisko datu apkopošanu un izmantošanu (t. i., kritēriji datu iekļaušanai vēsturiskajos datos un izslēgšanai no tiem un konkrēta eksperimenta pieņemamības kritēriji) atrodami literatūrā (47). Dažādi audi un dažādas sugas, kā arī dažādi nesēji un ievadišanas ceļi var dot dažādas negatīvo kontroļu vērtības procentuālajai DNS daļai astē. Tāpēc ir svarīgi katriem audiem un katrai sugai noteikt negatīvo kontroļu diapazonus. Lai noteiktu laboratorijas datu variabilitāti un parādītu, ka laboratorijā šī metodoloģija “tiek kontrolēta”, laboratorijām jāizmanto kvalitātes kontroles metodes, piem., kontrol-diagrammas (piem., C diagrammas vai X joslu diagrammas (48)). Var būt nepieciešams arī piemērotu pozitīvās kontroles vielu, devu diapazonu un eksperimentālo apstākļu (piem., elektroforēzes apstākļu) izvēli optimizēt tā, lai detektētu vāju ietekmi (sk. 17. punktu).

Jebkādas izmaiņas eksperimenta protokolā jāapsver, ņemot vērā to atbilstību laboratorijas esošajām vēsturisko kontroļu datubāzēm. Jebkādu būtisku neatbilstību gadījumā jāveido jauna vēsturisko kontroļu datubāze.

METODES APRAKSTS

Sagatavošanās

Dzīvnieku sugas izvēle

Jāizmanto veseli, jauni pieauguši tipisku laboratorijas celmu grauzēji (apstrādes sākumā 6–10 nedēļas veci, bet ir pieņemami arī mazliet vecāki dzīvnieki). Grauzēju sugas izvēles pamatā jābūt tam, i) kādas sugas izmantotas citos toksiskuma pētījumos (lai būtu iespējams korelēt datus un varētu pētījumus integrēt), ii) kādām sugām kancerogēnitātes pētījumā radušies audzēji (kancerogēniskā mehānisma pētīšanā) vai iii) kuras sugas metabolisms ir visrelevantākais cilvēka metabolismam, ja tas ir zināms. Šim testam parasti izmanto žurkas. Tomēr var izmantot citas sugas, ja tas ir ētiski un zinātniski pamatoti.

Dzīvnieku turēšanas un barošanas apstākļi

Telpā, kurā tur eksperimenta dzīvniekus, ideālā gadījumā jābūt 22°C ($\pm$ 3°C) temperatūrai. Ideālā gadījumā relatīvajam mitrumam jābūt 50–60 % robežās, bet katrā ziņā vismaz 30 % un, vēlams, ne augstākam par 70 %, izņemot telpu uzkopšanas laiku. Dzīvniekus 12 stundas diennaktī tur mākslīgā apgaismojumā, bet 12 stundas — tumsā. Var izmantot parasto laboratorijas barību ar neierobežotu piekļuvi dzeramajam ūdenim. Barības izvēli var ietekmēt vajadzība tai piemaisīt testējamo ķīmikāliju, ja ķīmikāliju ievada šādā ceļā. Ja nav gaidāma agresīva uzvedība, grauzēji jātur nelielās (parasti ne vairāk par pieciem vienkopus) viena dzimuma dzīvnieku grupās. Vienīgi tad, ja tas ir zinātniski pamatoti, dzīvniekus var turēt atsevišķi. Pēc iespējas jāizmanto cietas grīdas, jo režģa grīdas var radīt nopietnus ievainojumus (49). Jānodrošina pienācīgs vides bagātinājums.

Dzīvnieku sagatavošana

Dzīvniekus kontroles un apstrādes grupās iedala nejauši. Dzīvniekus unikālā veidā identificē un vismaz piecas dienas pirms apstrādes sākšanas aklimatizē laboratorijas apstākļiem. Jāizmanto vismazāk invazīvā dzīvnieku unikālās identificēšanas metode. Piemērotas metodes ir, piem., apgredzenošana, krotālijas, mikroshēmas ievietošana un biometriskā identificēšana. Ausu vai pirkstu apgriešana šajos testos nav zinātniski pamatota. Būrus izvieto tā, lai iespējami mazinātu būru novietojuma varbūtējo ietekmi. Pētījuma sākumā dzīvnieku svara atšķirībām jābūt minimālām un tās nedrīkst pārsniegt $\pm 20\%$.

Devu sagatavošana

Pirms dzīvniekiem dot devas, cietas testējamās ķīmikālijas jāizšķīdina vai jāsuspendē piemērotos nesējos vai jāpiejauca barībai vai dzeramajam ūdenim. Šķidrās testējamās ķīmikālijas var dot tādas pašas vai pirms došanas atšķaidīt. Atkarībā no testējamās ķīmikālijas fizikālķīmiskajām īpašībām inhalatīvā ekspozīcija var notikt ar gāzi, tvaiku vai cietu/šķidru daļiņu aerosolu (50) (51).

Ja vien dati par testējamās ķīmikālijas preparātu stabilitāti nelielina, ka tos var uzglabāt, un neparedz pienācīgus uzglabāšanas apstākļus, jāizmanto svaigi pagatavoti preparāti.

Testēšanas apstākļi

Nesējs

Lietotajās devās nesējam nedrīkst būt toksiskas ietekmes un tas nedrīkst būt spējīgs reaģēt ar testējamo ķīmikāliju. Ja tiek izmantoti citi, mazāk izpētīti nesēji, to ietveršana jāpamato ar atsaucies datiem par to saderību ar testa dzīvnieku, ievadīšanas ceļu un beigupunktu. Kad vien iespējams, vispirms jāapsver, vai neizmantojot šķīdinātāju vai nesēju uz ūdens bāzes. Jāņem vērā, ka daži nesēji (jo īpaši viskozi nesēji) saskares vietā var izraisīt iekaisumu un palielināt DNS ķēdes pārrāvumu fona līmeņus, jo īpaši, ja ievadīšanu veic vairākkārt.

Kontroles

Pozitīvās kontroles

Šobrīd katrā testā parasti jāizmanto grupa ar vismaz 3 analizējamiem viena dzimuma dzīvniekiem vai, ja izmanto abus dzimumus, abu dzimumu dzīvniekiem (sk. 32. punktu), ko apstrādā ar pozitīvās kontroles vielu. Nākotnē varbūt būs iespējams pierādīt pienācīgu kompetenci un vajadzību pēc pozitīvām kontrolēm tā samazināt. Ja tiek izmantoti vairāki paraugosanas laiki (piem., ar vienas ievadīšanas protokolu), pozitīvās kontroles jāiekļauj tikai vienā paraugosanas laikā, bet jānodrošina līdzsvarots plāns (sk. 48. punktu). Paralēlās pozitīvās kontroles vielas nav jāievada tādā pašā ceļā kā testējamā ķīmikālija, taču ir svarīgi to pašu ceļu izmantot, mērot ietekmi saskares vietā. Jābūt pierādītam, ka pozitīvās kontroles vielas visos attiecībā uz testējamo ķīmikāliju interesējošajos audos inducē DNS ķēdes pārrāvumus, un ļoti iespējams, ka par pozitīvo kontroli tiks izraudzīta EMS, jo tā ir izraisījusi DNS ķēdes pārrāvumus visos pētītajos audos. Pozitīvās kontroles vielu devas jāizvēlas tā, lai radītu vidēju ietekmi, kas dotu iespēju kritiski novērtēt testa veiktspēju un jutību, un to izvēlē var balstīties uz laboratorijas kompetences apliecināšanas laikā izstrādātajām devas-atbildreakcijas līknēm. Procentuālajai DNS daļai astē paralēlās pozitīvās kontroles dzīvniekos jāsakrīt ar diapazonu, kas laboratorijā iepriekšnoteikts attiecīgajiem audiem un attiecīgās sugas paraugosanas laikam (sk. 16. punktu). Pozitīvās kontroles vielu un dažu to mērķaudu (grauzējiem) piemēri sniegti 1. tabulā. Vielas, kuras nav norādītas 1. tabulā, var izvēlēties, ja tas ir zinātniski pamatoti.

1. tabula

Pozitīvās kontroles vielu un dažu to mērķaudu piemēri

Vielas un CAS Nr.
Etilmetānsulfonāts (CAS Nr. 62-50-0) jebkuriem audiem
Etilnitrozourīnviela (CAS Nr. 759-73-9) aknām un kuņģim, divpadsmitpirkstu zarnai vai tukšajai zarnai
Metilmetānsulfonāts (CAS Nr. 66-27-3) aknām, kuņģim, divpadsmitpirkstu zarnai vai tukšajai zarnai, plaušu un bronhoalveolārās lavāžas (BAL) šūnām, nierēm, urīnpūslim, plaušām, sēkliniekiem un kaulu smadzenēm/asinīm
N-metil-N'-nitro-N-nitrozoguanidīns (CAS Nr. 70-25-7) kuņģim, divpadsmitpirkstu zarnai vai tukšajai zarnai
1,2-dimetilhidrazīns 2HCl (CAS Nr. 306-37-6) aknām un zarnām
N-metil-N-nitrozourīnviela (CAS Nr. 684-93-5) aknām, kaulu smadzenēm, asinīm, nierēm, kuņģim, tukšajai zarnai un smadzenēm.

Negatīvās kontroles

Negatīvās kontroles dzīvnieku grupa, kas apstrādāta tikai ar nesēju, bet citādi apstrādāta tāpat kā apstrādes grupas, katrā testā jāiekļauj par katru paraugošanas reizi un audiem. DNS procentuālajai daļai astē negatīvās kontroles dzīvniekos jāietilpst fona diapazonā, kas laboratorijā iepriekšnoteikts katriem audiem un attiecīgās sugas paraugošanas laikam (sk. 16. punktu). Ja nav vēsturisku vai publicētu kontroles datu, kas parāda, ka izvēlētais nesējs, ievadīšanas reīžu skaits vai ievadīšanas ceļš neinducē kaitīgu vai genotoksisku ietekmi, pirms pilna pētījuma veikšanas jāveic sākotnēji pētījumi, lai noteiktu nesēja kontroles pieņemamību.

PROCEDŪRA

Dzīvnieku skaits un dzimums

Kaut arī par mātītēm ir pārāk maz datu, lai varētu abus dzimumus salīdzināt komētas testa izpildes kontekstā, citas *in vivo* genotoksicitātes atbildreakcijas kopumā tēviņos un mātītēs ir līdzīgas, tāpēc lielāko daļu pētījumu var veikt ar jebkura dzimuma dzīvniekiem. Dati, kas liecinātu par relevantām atšķirībām starp tēviņiem un mātītēm (piem., atšķirībām, kas saistītas ar sistēmisko toksicitāti, metabolismu, biopieejamību u. c., piem., diapazona noteikšanas pētījumā), mudinātu izmantot abus dzimumus. Tādā gadījumā var būt lietderīgi veikt pētījumu ar abu dzimumu dzīvniekiem, piem., atkārtotas devas toksicitātes pētījuma ietvaros. Izmantojot abu dzimumu dzīvniekus, var būt lietderīgi izmantot faktoriālo plānu. Sīkāka informācija par to, kā analizēt datus, izmantojot šo plānu, ir sniegta 2. papildinājumā.

Sākot pētījumu (un kompetences pierādīšanas laikā), jāizveido tādas grupas, lai katrā grupā būtu vismaz 5 analizējami viena dzimuma dzīvnieki vai, ja tiek izmantoti abi dzimumi, katra dzimuma dzīvnieki (paralēlajā pozitīvajā kontrolgrupā mazāk — sk. 29. punktu). Gadījumos, kad cilvēka organisma eksponētība ķīmikālijām var būt atšķirīga atkarībā no dzimuma, kā ir, piemēram, ar dažiem farmaceitiskajiem preparātiem, testu veic ar attiecīgā dzimuma dzīvniekiem. Ar piemēru ilustrējot maksimālā tipiskā dzīvnieku skaita prasības — atbilstīgi 33. punktā paredzētajiem parametriem pētījumā ar trim devu grupām un paralēlām negatīvajām un pozitīvajām kontrolēm (pieci viena dzimuma dzīvnieki katrā grupā) būtu nepieciešami 25–35 dzīvnieki.

APSTRĀDES KĀRTĪBA

Dzīvnieki 2 vai vairāk dienas ik dienas jāapstrādā (t. i., divas vai vairāk apstrādes ar apmēram 24 stundu intervālu), un paraugošana jāveic vienu reizi 2–6 stundas (vai $T_{\max}$) pēc pēdējās apstrādes (12). Ir pieņemami paraugi no garākiem devu došanas režīmiem (piem., devu došana katru dienu 28 dienas pēc kārtas). Ir pierādīts, ka komētas tests un eritrocītu mikrokodolu testi ir veiksmīgi apvienojami (10) (19). Tomēr rūpīgi jāņem vērā loģistika, kas saistīta ar audu paraugošanu komētas testa vajadzībām, līdzās audu paraugošanas prasībām citu veidu toksikoloģiskajiem novērtējumiem. Vairumā gadījumu nav pieņemami veikt ievākšanu 24 stundas pēc pēdējās devas došanas, kas ir raksturīgi vispārējiem toksiskuma pētījumiem (sk. 40. punktu par paraugošanas laiku). Citu apstrādes un paraugošanas grafiku izmantošana jāpamato (sk. 3. papildinājumu). Piemēram, var izmantot vienu apstrādi ar vairākkārtēju paraugošanu, taču jāņem vērā, ka pētījumā, kurā paredzēta viena ievadīšana, būs nepieciešams vairāk dzīvnieku, jo būs jāveic vairākas paraugošanas, bet atsevišķos gadījumos tas var būt vēlami, piemēram, kad testējamā ķīmikālija pēc atkārtotas ievadīšanas inducē pārmērīgu toksiskumu.

Neatkarīgi no tā, kā tests tiek veikts, tas ir pieņemami, ja vien testējamā ķīmikālija rada pozitīvu atbildreakciju vai — negatīva pētījuma gadījumā — ir iegūti tieši vai netieši pierādījumi, ka mērķaudi ir eksponēti vai uz tiem atstāta toksiska ietekme, vai sasniegta robeždeva (sk. 36. punktu).

Testējamās ķīmikālijas devu var dot arī dalīti, t. i., divreiz vienā un tajā pašā dienā ar ne vairāk kā 2–3 stundu starpību, kas var būt vajadzīgs gadījumos, kad jāievada liels tilpums. Šādos apstākļos paraugošanas laiks jāplāno, pamatojoties uz pēdējās devas ievadīšanas laiku (skatīt 40. punktu).

Devu līmeņi

Ja tiek veikts iepriekšējs diapazona noteikšanas pētījums, jo no citiem relevantiem pētījumiem nav pieejami piemēroti dati, kas palīdzētu izvēlēties devu, tas jāveic tajā pašā laboratorijā, izmantojot to pašu sugu, celmu, dzimumu un apstrādes režīmu, kas tiks izmantots galvenajā pētījumā, saskaņā ar pašreizējām pieejām devu diapazona noteikšanas pētījumu veikšanā. Pētījums jāveic ar mērķi identificēt maksimālo panesamo devu (MTD), kas ir deva, kura pētījuma ilgumam atbilstošā laikā izraisa nelielu toksisku ietekmi (piem., tādas skaidras klīniskās pazīmes kā anormāla uzvedība vai reakcijas, neliela ķermeņa svara samazināšanās vai citotoksicitāte mērķaudos), bet neizraisa nāvi vai tādas sāpju, ciešanu vai diskomforta pazīmes, kā dēļ būtu jāveic eitanāzija. Attiecībā uz testējamo ķīmikāliju, kas nav toksiska un kuras ievadīšanas periods ir 14 vai vairāk dienas, maksimālā (robež)deva ir 1 000 mg/kg ķermeņa svara dienā. Attiecībā uz 14 dienu vai īsāku ievadīšanas periodu maksimālā (robež)deva ir 2 000 mg/kg ķermeņa svara dienā. Atsevišķiem testējamo ķīmikāliju veidiem (piem., cilvēku zālēm), uz kuriem attiecas konkrētas prasības, šīs robežas var atšķirties.

Ķīmikālijas, pie kurām novērojams toksikokinētisko procesu piesātinājums vai kuras inducē detoksifikācijas procesus, kas pēc ilgtermiņa ievadīšanas var radīt eksponētības samazinājumu, var būt devu noteikšanas kritēriju izņēmumi, un katrs gadījums jāizvērtē atsevišķi.

Attiecībā uz akūtām un subakūtām komētas testa versijām, lai parādītu ar devu saistītas atbildreakcijas, papildus maksimālajai devai (MTD, maksimālajai praktiskajai devai, maksimālajai eksponētībai vai robeždevai) katram paraugošanas laikam jāizvēlas lejupēja sekvenca ar vismaz diviem papildu devu līmeņiem pienācīgā atstatumā (vēlams, lai atstatums nepārsniegtu 10). Tomēr izmantotajiem devu līmeņiem būtu arī jāaptver diapazons, kas aptver gan maksimālo devu, gan devu, kas ir maztoksiska vai netoksiska. Ja pie visiem testētajiem devu līmeņiem tiek novērota toksiska ietekme uz mērķaudiem, ieteicams veikt vēl vienu pētījumu ar netoksiskām devām (sk. 54.–55. punktu). Pētījumos, kuros plānots pilnīgāk izmeklēt devas–atbildreakcijas līknes formu, var būt nepieciešams izmantot papildu devu grupu(-as).

Devu ievadišana

Testa plānošanā jāņem vērā, kāds varētu būt cilvēka ekspozīcijas ceļš. Ja vien tas ir pamatoti, var izvēlēties dažādus ekspozīcijas ceļus, piem., uzņemšanu ar barību, dzeramo ūdeni, ievadīšanu zemādas audos, intravenozu ievadīšanu, uzņemšanu orālā ceļā (ar gavāžu), inhalāciju, uzņemšanu intratraheāli vai implantācijas ceļā. Jebkurā gadījumā ceļš jāizvēlas tā, lai nodrošinātu mērķaudu pienācīgu ekspozīciju. Parasti nav ieteicama intraperitoneāla injekcija, jo cilvēkam šāds ekspozīcijas ceļš nav raksturīgs, un tā jāizmanto tikai ar konkrētu zinātnisko pamatojumu (piem., dažām pozitīvās kontroles vielām, pētnieciskiem nolūkiem vai dažiem medikamentiem, kurus ievada intraperitoneāli). Maksimālais šķidrums tilpums, ko vienā paņēmienā var ievadīt ar gavāžu vai injekciju, ir atkarīgs no testa dzīvnieka lieluma. Tilpums nedrīkst pārsniegt 1 ml/100 g ķermeņa svara, izņemot ūdens šķīdumu gadījumā, kad var lietot 2 ml uz 100 g ķermeņa svara. Lielāka tilpuma izmantošana (ja to atļauj dzīvnieku labturības tiesību akti) jāpamato. Kad vien iespējams, dažādi devu līmeņi jāiegūst, koriģējot devas preparāta koncentrāciju, lai visos devu līmeņos tilpuma attiecība pret ķermeņa svaru saglabātos vienāda.

Paraugošanas laiks

Paraugošanas laiks ir izšķirīgi svarīgs parametrs, jo tas ir atkarīgs no perioda, kāds nepieciešams, lai testējamās ķīmikālijas mērķaudos sasniegtu maksimālo koncentrāciju un tiktu inducēti DNS ķēdes pārrāvumi, bet nenotiktu šo pārrāvumu izžušana, reparācija vai neiestātos šūnas nāve. Daži bojājumi, kas izraisa DNS ķēdes pārrāvumus, kurus detektē ar komētas testu, vismaz dažām *in vitro* testētām ķīmikālijām var būt ļoti īslaicīgi (52) (53). Attiecīgi, ja ir aizdomas par tādiem pārejošiem DNS bojājumiem, jāveic pasākumi to zuduma mazināšanai, nodrošinot, ka audi tiek paraugoti pietiekami ātri, iespējams, pat ātrāk nekā tālāk norādītajos noklusējuma laikos. Optimālais(-ie) paraugošanas laiks(-i) var būt specifisks(-i) ķīmikālijai vai ievadīšanas ceļam, kas nozīmē, piemēram, audu strauju ekspozīciju intravenozas ievadīšanas vai inhalatīvās ekspozīcijas gadījumā. Attiecīgi, ja tas ir iespējams, paraugošanas laiki jānosaka, ņemot vērā kinētiskos datus (piem., laiku (T_{max}), kurā tiek panākta maksimālā koncentrācija plazmā vai audos (C_{max}), vai, ja tiek veiktas vairākas ievadīšanas, stabilo stāvokli). Ja kinētiskie dati nav pieejami, piemērots genotoksitātes mērīšanas kompromiss ir paraugošana 2–6 stundas pēc pēdējās apstrādes, ja veic divas vai vairāk apstrādes, vai gan 2–6, gan 16–26 stundas pēc vienas ievadīšanas, kaut arī jā rūpējas, lai visu dzīvnieku autopsija tiktu veikta vienā laikā pēc pēdējās (vai vienīgās) devas ievadīšanas. Lai izvēlētos pienācīgus paraugošanas laikus, drīkst izmantot arī informāciju par toksiskās ietekmes izpausmēm mērķorgānos (ja tāda ir pieejama).

Novērojumi

Vispārēji testa dzīvnieku veselības klīniskie novērojumi jāveic un jāreģistrē vismaz reizi dienā, vēlams, katru dienu vienā(-os) laikā(-os), ņemot vērā gaidāmo ietekmju maksimumlaiku pēc devas ievadīšanas (54). Vismaz divreiz dienā visus dzīvniekus novēro attiecībā uz morbiditāti un mirstību. Ilgākos pētījumos dzīvnieki vismaz reizi nedēļā un testa perioda beigās jānosver. Pārtikas patēriņš jāmēra katru reizi, kad pārtika tiek mainīta, un vismaz reizi nedēļā. Ja testējamo ķīmikāliju ievada ar dzeramo ūdeni, ūdens patēriņš jāmēra katru reizi, kad ūdens tiek mainīts, un vismaz reizi nedēļā. Dzīvniekus, kam novērojamas pārlielas toksicitātes neletālas pazīmes, pirms testa perioda beigām eitanizē un komētas testa analizē parasti neizmanto.

Audu ievākšana

Tā kā pētīt DNS ķēdes pārrāvumu ("komētu") inducēšanos var ar praktiski jebkuriem audiem, skaidri jāpamato nemamo audu izvēle, un tās pamatā jābūt pētījuma veikšanas iemeslam kopā ar esošajiem ADME, genotoksitātes, kancerogenitātes datiem vai citiem datiem par izmeklēto testējamo ķīmikāliju toksiskumu, ja tādi ir. Jāapsver arī tādi svarīgi faktori kā ievadīšanas ceļš (pamatojoties uz domājamo(-ajiem) cilvēka eksponētības ceļu(-iem)), prognozētā izplatīšanās audos un absorbcija, metabolisma loma un iespējamais testējamo ķīmikāliju iedarbības mehānisms. Visbiežāk pētie audi, par kuriem ir visvairāk datu, ir aknas. Tāpēc, ja nav pieejama nekāda fona informācija un netiek identificēti nekādi konkrēti interesējošie audi, būtu pamatoti paraugot aknas, jo tā ir

ksenobiotiskā metabolisma galvenā vieta un bieži vien ir būtiski eksponēta gan sākotnējai(-ām) vielai(-ām), gan metabolītam(-iem). Dažos gadījumos vispiemērotāk ir analizēt tiešās saskares vietu (piem., orāli ievadītām ķīmikālijām tā ir kuņģa dziedzerdaļa vai divpadsmitpirkstu zarna / tukšā zarna, savukārt ieelpotām ķīmikālijām — plaušas). Papildu vai alternatīvus audus izvēlas, pamatojoties uz konkrētajiem testa veikšanas iemesliem, bet var būt lietderīgi analizēt vairākus viena dzīvnieka audus, ja vien laboratorija ir apliecinājusi savu kompetenci darbā ar šiem audiem un kompetenci vairāku audu vienlaicīgā apstrādāšanā.

Paraugu sagatavošana

Attiecībā uz turpmākajos punktos (44.–49.) aprakstītajiem procesiem ir svarīgi visus šķīdumus vai stabilās suspensijas izlietot pirms to derīguma termiņa beigām vai, ja nepieciešams, tos sagatavot no jauna. Vēl turpmākajos punktos par izšķirīgi svarīgiem mainīgajiem (sk. definīcijas 1. papildinājumā) tiek uzskatīts laiks, kas nepieciešams, lai i) pēc autopsijas noņemtu audus, ii) audus iestrādātu šūnu/kodolu suspensijās un iii) suspensiju apstrādātu un sagatavotu priekšmetstikliņus; tam, cik ilgs var būt katrs posms, jau jābūt noteiktam šīs metodes ieviešanas un kompetences pierādīšanas laikā.

Dzīvniekus eitanazē atbilstīgi spēkā esošajiem dzīvnieku labturības tiesību aktiem un 3R principiem un pienācīgā (-os) laikposmā(-os) pēc pēdējās apstrādes ar testējamo ķīmikāliju. Izraudzītos audus izņem, izpreparē un daļu savāc komētas testa mērķim, bet vienlaicīgi daļa no tiem pašiem audiem jānogriež un jāievieto formaldehīda šķīdumā vai pienācīgā fiksējošajā šķīdumā iespējamai patoloģiskās histoloģijas analīzei (sk. 55. punktu) saskaņā ar standarta metodēm (12). Komētas testam paredzētos audus ievieto smalcināšanas buferšķīdumā, noskalo ar pietiekamu daudzumu auksta smalcināšanas buferšķīduma, lai novāktu asins paliekas, un līdz pārstrādei uzglabā ledusaukstā smalcināšanas buferšķīdumā. Var veikt arī *in situ* perfūziju, piem., aknām, nierēm.

Attiecībā uz šūnu/kodolu izolēšanu ir daudz publicētu metožu. Tās ietver tādu audu kā aknu un nieru smalcināšanu, gļotādas virsmu nokasīšanu kuņģa-zarnu trakta gadījumā, homogenizāciju un fermentatīvo noārdīšanu. Ja CVAM validācijas izmēģinājumā tika pētītas vienīgi izolētas šūnas, tadēļ attiecībā uz metodes ieviešanu un iespēju kompetences apliecināšanai izmantot Ja CVAM izmēģinājuma datus vēlams izmantot izolētas šūnas. Tomēr ir pierādīts, ka nav būtiskas atšķirības starp to testu rezultātiem, kuros tika izmantotas izolētas šūnas, un to testu rezultātiem, kuros tika izmantoti izolēti kodoli (8). Salīdzināmus rezultātus sniedza arī dažādas šūnu/kodolu izolēšanas metodes (piem., homogenizācija, smalcināšana, fermentatīvā noārdīšana un filtrēšana caur sietu) (55). Līdz ar to iespējams izmantot izolētas šūnas vai izolētus kodolus. Laboratorijā rūpīgi jāizvērtē un jāvalidē audiem specifiskas atsevišķu šūnu/kodolu izolēšanas metodes. Kā iztirzāts 40. punktā, dažu tādu bojājumu noturība, kuri rada komētas testā detektējamus DNS ķēdes pārrāvumus, var būt ļoti īslaicīga (52) (53). Tāpēc neatkarīgi no atsevišķu šūnu/kodolu suspensiju sagatavošanā izmantotās metodes ir svarīgi audus apstrādāt iespējami drīz pēc dzīvnieku eitanāzijas un turēt tādos apstākļos, kas samazina bojājumu izžušanu (piem., turot audus zemā temperatūrā). Šūnu suspensijas līdz to izmantošanai jāuzglabā ledusaukstas, lai būtu iespējams uzrādīt minimālu variāciju starp paraugiem un pienācīgas pozitīvās un negatīvās kontroles atbildreakcijas.

PRIEKŠMETSTIKLIŅU SAGATAVOŠANA

Priekšmetstikliņi jāgatavo iespējami drīz (ideālā gadījumā — vienas stundas laikā) pēc atsevišķu šūnu/kodolu sagatavošanas, bet laboratorijas apstākļos stingri jākontrolē un jāvalidē temperatūra un laiks no dzīvnieka nāves līdz priekšmetstikliņu sagatavošanai. Priekšmetstikliņu sagatavošanai izmantotais šūnu suspensijas tilpums, kas pievienots zema kušanas punkta agarozai (parasti 0,5–1,0 %), nedrīkst samazināt zema kušanas punkta agarozes procentuālo daudzumu līdz tādām, kas ir mazāks par 0,45 %. Optimālo šūnu blīvumu nosaka ar attēlu analīzes sistēmu, ko izmanto "komētu" novērtēšanā.

Lizēšana

Arī lizēšanas apstākļi ir izšķirīgi svarīgs mainīgais un var ietekmēt ķēdes pārrāvumus, ko izraisa konkrētu veidu DNS modifikācijas (noteiktas DNS alkilācijas un bāzu adukti). Tādēļ eksperimenta laikā lizēšanas apstākļus visiem priekšmetstikliņiem ieteicams saglabāt iespējami nemainīgus. Līdzko priekšmetstikliņi ir sagatavoti, tie vismaz uz stundu (vai uz nakti) jāiegremdē atdzesētā lizēšanas šķīdumā apmēram 2–8 °C temperatūrā pie vāja apgaismojuma, piem., dzeltenas gaismas (vai bezgaismas vidē), lai novērstu eksponētību baltajai gaismai, kas var saturēt UV komponentus. Pēc šā inkubācijas perioda priekšmetstikliņi jānoskalo, lai pirms sāmatraisisšanas posmaņemtu deterģenta atliekas un sāļus. Tam var izmantot attīrītu ūdeni, neutralizēšanas buferšķīdumu vai fosfāta buferšķīdumu. Var izmantot arī elektroforēzes buferšķīdumu. Tādējādi elektroforēzes kamerā tiktu saglabāta sārmaina vide.

Atraisisšanās un elektroforēze

Priekšmetstikliņus nejausināti novieto uz zemūdenei līdzīgas elektroforēzes ierīces platformas, kas satur pietiekami daudz elektroforēzes šķīduma, tā, lai priekšmetstikliņu virsmas ar to būtu pilnīgi pārklātas (arī pārklājuma dziļumam katrā testēšanas reizē jābūt nemainīgam). Citās komētas testa elektroforēzes ierīcēs ar aktīvu dzesēšanu, cirkulāciju un lielu elektroapgādes jaudu, lielāks šķīduma pārklājums radīs lielāku elektrisko strāvu, spriegumam saglabājoties nemainīgam. Lai elektroforēzes tvertnē ievietotu priekšmetstikliņus, jāizmanto līdzsvarota pieeja, kas tvertnē mazinātu jebkādas tendences vai malas efektu un līdz minimumam samazinātu mainību starp partijām, t. i., katrā elektroforēzes reizē jābūt vienādam priekšmetstikliņu skaitam no katra pētījumā izmantotā dzīvnieka un jāiekļauj paraugi no dažādajām devu grupām, negatīvajām un pozitīvajām kontrolēm. Lai DNS varētu atrasties, priekšmetstikliņi jāatstāj uz vismaz 20 minūtēm un pēc tam kontrolētos apstākļos tiem jāveic elektroforēze, kas līdz maksimumam palielina testa jutības un dinamikas diapazonu (t. i., negatīvām un pozitīvām kontrolēm rada pieņemamus procentuālos DNS līmeņus astē, kas palielina jutību). DNS migrācijas līmenis ir lineāri saistīts ar elektroforēzes ilgumu un arī ar potenciālu (V/cm). Balstoties uz *JaCVAM* pētījumu, tas varētu būt 0,7 V/cm uz vismaz 20 minūtēm. Elektroforēzes ilgums tiek uzskatīts par izšķirīgi svarīgu mainīgo, un elektroforēzes laiks jānosaka tā, lai optimizētu dinamisko diapazonu. Garāki elektroforēzes laiki (piem., 30 vai 40 minūtes, lai līdz maksimumam palielinātu jutību) parasti rada spēcīgākas pozitīvās atbildreakcijas uz zināmiem mutagēniem. Tomēr garāki elektroforēzes laiki var arī radīt pārmērīgu migrāciju kontrolparaugos. Katrā eksperimentā spriegums jā saglabā nemainīgs un citu parametru mainībai jāietilpst šaurā un konkrētā diapazonā, piem., *JaCVAM* izmēģinājumā pie 0,7 V/cm sākotnējā strāva bija 300 mA. Buferšķīduma dziļums jāpielāgo tā, lai panāktu nepieciešamos apstākļus, un tas jā saglabā visu eksperimenta laiku. Elektroforēzes sākumā un beigās jāreģistrē strāva. Tāpēc optimālie apstākļi katriem pētījumiem audiem jānosaka sākotnējā attiecīgās laboratorijas kompetences pierādīšanā. Elektroforēzes šķīduma temperatūra atraisisšanās un elektroforēzes laikā jā saglabā zemā līmenī, parasti 2–10 °C (10). Elektroforēzes šķīduma temperatūra jāreģistrē atraisisšanās sākumā, elektroforēzes sākumā un elektroforēzes beigās.

Pēc elektroforēzes pabeigšanas priekšmetstikliņi uz vismaz 5 minūtēm jāiegremdē/jānoskalo neutralizācijas buferšķīdumā. Gēlus var iekrāsot un novērtēt "svaigus" (piem., 1–2 dienu laikā) vai dehidrēt vēlākai novērtēšanai (piem., 1–2 nedēļu laikā pēc iekrāsošanas) (56). Tomēr šie apstākļi jāvalidē kompetences pierādīšanas laikā, un par katru no šiem apstākļiem atsevišķi jāiegūst un jā saglabā vēsturiskie dati. Pēdējā gadījumā priekšmetstikliņi jādehidrē, tos uz vismaz 5 minūtēm iegremdējot absolūtā etanolā, tiem jāļauj nožūt un tie līdz novērtēšanai jā saglabā istabas temperatūrā vai traukā ledusskapī.

Mērīšanas metodes

Komētas jāuzskaita kvantitatīvi, izmantojot automātisku vai daļēji automātisku attēlu analīzes sistēmu. Priekšmetstikliņus iekrāso ar pienācīgu fluorescējošu krāsvielu, piem., *SYBR Gold*, *Green I*, propīdija jodīdu vai etīdija bromīdu, un mēra, izmantojot ar epifluorescenci un pienācīgiem detektoriem vai digitālu (piem., CCD) kameru aprīkotu mikroskopu, atbilstošā palielinājumā (piem., 200x).

Šūnas var klasificēt trīs kategorijās, kas aprakstītas komētu attēlu atlantā (57), proti, novērtējamas, nenovērtējamas un *Hedgehog* šūnas (sīkāku izklāstu sk. 56. punktā). Lai izvairītos no artefaktiem, attiecībā uz procentuālo DNS daļu astē jāvērtē tikai novērtējamas šūnas (skaidri saredzama galva un aste bez apkārtējo šūnu radītiem traucējumiem). Nav nepieciešams ziņot par nenovērtējamo šūnu biežumu. *Hedgehog* šūnu biežums jānosaka, pamatojoties uz vizuālo novērtēšanu (tā kā tām nav skaidri saredzama galva, tās nav viegli detektēt attēlu analīzē) ar vismaz 150 šūnām uz vienu paraugu (sīkāku izklāstu sk. 56. punktā), un atsevišķi jādokumentē.

Visi analizējamie priekšmetstikliņi, tostarp no pozitīvajām un negatīvajām kontrolēm, neatkarīgi jākodē un jāvērtē aklināti, lai vērtētājam nebūtu zināms, vai un kā tie apstrādāti. No katra parauga (katra dzīvnieka katra veida audiem) jāanalizē vismaz 150 šūnas (izņemot *Hedgehog* šūnas — sk. 56. punktu). Ja vismaz 5 dzīvniekos uz vienu devu katrā dzīvniekā tiek novērtētas 150 šūnas (paralēlajā pozitīvajā kontrolē mazāk — sk. 29. punktu), saskaņā ar *Smith et al.* 2008. gada analīzi tiek panākta pietiekama statistiskā jauda (5). Ja izmanto priekšmetstikliņus, to var panākt, uzskaitot 2 vai 3 katra parauga priekšmetstikliņus, ja katrā grupā tiek izmantoti pieci dzīvnieki. Jāaplūko vairākas priekšmetstikliņa vietas, kur blīvums ir tāds, ka noteikti nenotiek astu pārklāšanās. Jāvairās vērtēt vietas pie priekšmetstikliņu malām.

DNS ķēdes pārrāvumus komētas testā var izmērīt ar neatkarīgiem beigupunktiem, piem., procentuālo DNS daļu astē, astes garumu un astes momentu [*tail moment*]. Visus trīs mērījumus var veikt, ja tiek izmantota atbilstoša attēlu analizatora programmatūras sistēma. Tomēr rezultātu izvērtēšanai un interpretēšanai ieteicams izmantot procentuālo DNS daļu astē (sauktu arī par “astes procentuālo intensitāti”) (12) (40) (41) (42), kas ir DNS fragmentu intensitāte astē, izteikta kā šūnas kopējās intensitātes procentuālā daļa (13).

Audu bojājumi un citotoksicitāte

Pozitīvi konstatējumi komētas testā ne vienmēr tiek izdarīti tikai genotoksicitātes dēļ; DNS migrācijas pieaugumu var izraisīt arī toksiskums mērķaudiem (12) (41). Savukārt zema vai vidēja citotoksicitāte bieži vien novērojama pie zināmiem genotoksīniem (12), kas liecina, ka komētas testā vien nav iespējams genotoksicitātes izraisītu DNS migrāciju nošķirt no citotoksicitātes izraisītas DNS migrācijas. Tomēr, ja tiek novērots DNS migrācijas pieaugums, ir ieteicams noskaidrot vienu vai vairākus citotoksicitātes indikatorus, jo tas var palīdzēt interpretēt konstatējumus. Ja ir skaidri pierādījumi par citotoksicitāti, DNS migrācijas pieaugums jāinterpretē piesardzīgi.

Ir izvirzīti daudzi citotoksicitātes rādītāji, un no tiem par relevantu rādītāju, kas liecina par toksiskumu audiem, uzskata histopatoloģiskās izmaiņas. Ar DNS migrācijas pieaugumu ir saistīti tādi novērojumi kā iekaisums, šūnu infiltrācija, apoptotiskas vai nekrotiskas izmaiņas, taču, kā redzams *JaCVAM* validācijas izmēģinājumā (12), nav pieejams galīgs to histopatoloģisko izmaiņu saraksts, kas vienmēr ir saistītas ar paaugstinātu DNS migrāciju. Arī klīniskās ķīmijas rādītāju (piem., *AST*, *ALT*) izmaiņas var sniegt lietderīgu informāciju par audu bojājumiem, un var apsvērt iespēju izmantot arī papildu indikatorus, piemēram, kaspāzes aktivāciju, krāsvielu *TUNEL*, krāsvielu *Annexin V* u. c. Tomēr nav daudz publicētu datu, kuros pēdējais ticis izmantots *in vivo* pētījumiem, un daži var nebūt tik ticami kā citi.

Hedgehog šūnas (jeb mākoņšūnas, rēģšūnas) ir šūnas, kuru mikroskopiskajā attēlā novērojama neliela vai neesoša galva un lielas difūzas astes un kuras tiek uzskatītas par smagi bojātām šūnām, kaut arī nav skaidrības par *Hedgehog* šūnu etioloģiju (sk. 3. papildinājumu). To izskata dēļ procentuālās DNS daļas astē mērījumi ar attēlu analīzi nav ticami, tāpēc *Hedgehog* šūnas jāizvērtē atsevišķi. *Hedgehog* šūnu sastopamība jāatzīmē un jāziņo, un jebkādi attiecīgi pieaugumi, ko varētu būt izraisījusi testējamā ķimikālija, jāizmeklē un jāinterpretē uzmanīgi. To izvērtēt var palīdzēt zināšanas par testējamo ķimikāliju iespējamo iedarbības veidu var palīdzēt.

DATI UN PĀRSKATA SNIEGŠANA

Rezultātu apstrāde

Eksperimenta vienība ir dzīvnieks, tāpēc tabulas veidā jāapkopo gan dati par katru dzīvnieku, gan rezultātu kopsavilkums. Datu hierarhisko īpatnību dēļ ieteicams noteikt katra priekšmetstiklīņa medianālo procentuālo DNS daļu astē un aprēķināt katra dzīvnieka mediānu vidējo (12). Pēc tam, lai iegūtu grupas vidējo vērtību, nosaka atsevišķu dzīvnieku vidējo vērtību vidējos. Visas šīs vērtības jāiekļauj pārskatā. Ja tas ir zinātniski un statistiski pamatoti, drīkst izmantot alternatīvas pieejas (sk. 53. punktu). Statistisko analīzi iespējams veikt, izmantojot dažādas pieejas (58) (59) (60) (61). Izvēloties izmantojamās statistikas metodes, kā aprakstīts iepriekš atsaucēs norādītajos darbos, jāapsver nepieciešamība datus transformēt (piem., ar logaritmu vai kvadrātsakni) un/vai pieskaitīt nelielu skaitli (piem., 0,001) visām vērtībām (pat tām, kas nav nulle), lai mazinātu šādu nulles vērtību ietekmi. Sīkāka informācija par apstrādes/dzimuma mijiedarbības analīzi, ja izmanto abu dzimumu dzīvniekus, un tai sekojošo datu analīzi, kad tikušas un kad nav tikušas konstatētas atšķirības, ir sniegta 2. papildinājumā. Jāziņo arī par toksiskumu un klīniskajām pazīmēm.

Pieņemamības kritēriji

Testa pieņemamības pamatā ir šādi kritēriji:

- paralēlā negatīvā kontrole tiek uzskatīta par pieņemamu iekļaušanai laboratorijas vēsturisko negatīvo kontroļu datubāzē, kā aprakstīts 16. punktā,
- paralēlās pozitīvās kontroles (sk. 29. punktu) inducē atbildreakcijas, kas atbilst tām, kuras ģenerētas vēsturisko pozitīvo kontroļu datubāzē iekļautajās kontrolēs, un izsaka statistiski ievērojamu pieaugumu salīdzinājumā ar paralēlo negatīvo kontroli,
- analizējams ir bijis pietiekams skaits šūnu un devu (52. punkts un 36.–38. punkts),
- lielākās devas izvēles kritēriji atbilst 36. punktā aprakstītajiem kritērijiem.

Rezultātu izvērtēšana un interpretēšana

Ja ir izpildīti visi pieņemamības kritēriji, testējamo ķīmikāliju uzskata par viennozīmīgi pozitīvu, ja:

- vismaz vienai no testa devām salīdzinājumā ar paralēlo negatīvo kontroli novērojams statistiski nozīmīgs palielinājums,
- minēto palielinājumu izvērtējot ar atbilstošu trenda testu, konstatējams, ka tas saistīts ar devu,
- kāds no rezultātiem konkrētai sugai, nesējam, ceļam, audiem un ievadīšanas reižu skaitam atrodas ārpus vēsturisko negatīvo kontroļu datu sadalījuma.

Ja visi šie kritēriji ir izpildīti, testējamo ķīmikāliju uzskata par spējīgu šajā testa sistēmā pētītajos audos inducēt DNS kēdes pārrāvumus. Ja ir izpildīti tikai divi no šiem kritērijiem, sk. 62. punktu.

Ja ir izpildīti visi pieņemamības kritēriji, testējamo ķīmikāliju uzskata par viennozīmīgi negatīvu, ja:

- nevienai no testa koncentrācijām salīdzinājumā ar paralēlo negatīvo kontroli nav novērojams statistiski nozīmīgs palielinājums,
- ar atbilstošu trenda testu nav konstatējams ar koncentrāciju saistīts palielinājums,
- visi rezultāti konkrētai sugai, nesējam, ceļam, audiem un ievadīšanas reižu skaitam ir vēsturisko negatīvo kontroļu datu sadalījuma robežās,
- iegūti tieši vai netieši pierādījumi, kas apliecina ka notikusi mērķaudu ekspozīcija vai uz mērķaudiem atstāta toksiska ietekme.

Tādā gadījumā testējamo ķīmikāliju uzskata par nespējīgu šajā testa sistēmā inducēt DNS ķēdes pārrāvumus pētītajos audos.

Nav prasības viennozīmīgi pozitīvu vai negatīvu atbildreakciju verificēt.

Ja atbildreakcija nav ne viennozīmīgi negatīva, ne viennozīmīgi pozitīva (t. i., ne visi 59. vai 60. punktā uzskaitītie kritēriji ir izpildīti) un lai palīdzētu noteikt rezultāta bioloģisko relevantumu, šie dati jānovērtē ekspertam un/vai jāveic sīkāka izskatīšana, ja tas ir zinātniski pamatoti. Var būt lietderīgi novērtēt papildu šūnas (attiecīgā gadījumā) vai veikt atkārtotu eksperimentu, iespējams, izmantojot optimizētus eksperimenta apstākļus (piem., atstatumus starp devām, citus ievadīšanas ceļus, citus paraugošanas laikus vai citus audus).

Retos gadījumos pat pēc sīkākas izskatīšanas datu kopums neļauj secināt, ka testējamā ķīmikālija rada pozitīvus vai negatīvus rezultātus, un tad uzskata, tas ir neskaidrs.

Lai novērtētu pozitīva vai neskaidra rezultāta bioloģisko relevantumu, nepieciešams iegūt informāciju par citotoksicitāti mērķaudos (sk. 54.–55. punktu). Ja pozitīvi vai neskaidri konstatējumi tiktu novēroti vienīgi gadījumos, kad ir skaidri pierādījumi par citotoksicitāti, šis pētījums tiktu pabeigts kā neskaidrs attiecībā uz genotoksicitāti, ja vien nebūtu pieejama pietiekama informācija, kas dotu pamatu izdarīt galīgu secinājumu. Ja pētījumā ar negatīvu rezultātu toksiskuma pazīmes ir pie visām testētajām devām, var būt ieteicams veikt turpmāku pētījumu ar devām, kas nav toksiskas.

Testēšanas pārskats

Testēšanas pārskatā jāiekļauj tālāk norādītā informācija.

Testējamā ķīmikālija:

- avots, sērijas numurs, ja zināms,
- testējamās ķīmikālijas stabilitāte, izmantošanas termiņš vai atkārtotas analīzes datums, ja tas ir zināms.

Vienkomponenta viela:

- fiziskais izskats, šķīdība ūdenī un citas relevantas fizikālķīmiskās īpašības,
- ķīmiskās identifikācijas dati, piem., IUPAC vai CAS nosaukums, CAS numurs, SMILES vai InChI kods, struktūrformula, tīrība, attiecīgā gadījumā, ja tas ir praktiski iespējams, piemaisījumu ķīmiskā identitāte u. c.

Daudzkomponentu vielas, UVCB un maisījumi:

- ciktāl tas iespējams, raksturoti ar sastāvdaļu ķīmisko identitāti (sk. iepriekš), kvantitatīvo saturu un relevantajām fizikālķīmiskajām īpašībām.

Šķīdinātājs/nesējs:

- šķīdinātāja/nesēja izvēles pamatojums,
- testējamās vielas šķīdība un stabilitāte šķīdinātājā/nesējā, ja tā zināma,
- preparātu sagatavošana,
- analītiskie secinājumi par preparātiem (piem., stabilitāte, homogenitāte, nominālās koncentrācijas).

Testa dzīvnieki:

- izmantotā suga/celms un izvēles zinātniskais un ētiskais pamatojums,
- dzīvnieku skaits, vecums un dzimums,

- izcelsme, turēšanas apstākļi, barošana, bagātinājums u. c.;
- katra dzīvnieka svars testa sākumā un beigās, arī katras grupas dzīvnieku ķermeņa svara diapazons, vidējā vērtība un standartnovirze.

Testēšanas apstākļi:

- pozitīvās un negatīvās (nesēja/šķīdinātāja) kontroles dati,
- diapazona noteikšanas testa rezultāti (ja tas veikts),
- devu līmeņa izvēles pamatojums,
- sīka informācija par testējamās ķimikālijas sagatavošanu,
- sīka informācija par testējamās ķimikālijas ievadišanu,
- ievadišanas ceļa izvēles pamatojums,
- injekcijas vieta (ja ceļš ir injicēšana zemādas audos vai intravenoza inficēšana),
- paraugu sagatavošanas metodes, ja pieejamas, histopatoloģiskās analīzes, jo īpaši ķimikālijai, kas rada pozitīvu komētas atbildreakciju,
- audu izvēles pamatojums,
- ja rezultāti ir negatīvi, metodes, kā verificēts, ka testējamā ķimikālija nonākusi mērķaudos vai vispārējā asinsritē,
- faktiskā deva (mg uz vienu kg ķermeņa svara dienā), kas aprēķināta pēc testējamās ķimikālijas koncentrācijas (ppm) barībā / dzeramajā ūdenī un pēc uzņemtā daudzuma (attiecīgā gadījumā),
- sīka informācija par barības un ūdens kvalitāti,
- detalizēts apstrādes un paraugošanas grafiku apraksts un izvēles pamatojums (piem., toksikokinētiskie dati, ja pieejami),
- atsāpināšanas, analgēzijas metode,
- eitanāzijas metode,
- audu izolēšanas un saglabāšanas procedūras,
- atsevišķu šūnu/kodolu suspensijas sagatavošanas metodes,
- visu reaģentu avots un sērijas numurs (ja pieejams),
- citotoksicitātes izvērtēšanas metodes,
- elektroforēzes apstākļi,
- izmantotās iekrāsošanas metodes un
- “komētu” uzskaitīšanas un mērīšanas metodes.

Rezultāti:

- vispārēji klīniskie novērojumi, ja tādi veikti, katram dzīvniekam pirms testa perioda un visā tā laikā,
- pierādījumi par citotoksicitāti (attiecīgā gadījumā),
- pētījumiem, kuri pārsniedz nedēļu: katra dzīvnieka svars testa sākumā un beigās, arī katras grupas dzīvnieku ķermeņa svara diapazons, vidējā vērtība un standartnovirze; pārtikas patēriņš;

- ja novērojama, devas-atbildreakcijas sakarība,
- par katrām audiem/dzīvnieku — procentuālā DNS daļa astē (vai citi rādītāji, ja tādi izraudzīti) un katra priekšmetstiklīņa mediāna, katra dzīvnieka vidējā vērtība un katras grupas vidējās vērtības;
- katram no izvērtētajiem audu veidiem — paralēlo un vēsturisko negatīvo kontroļu dati ar diapazoniem, vidējām vērtībām / mediānām un standartnovirzēm,
- paralēlo un vēsturisko pozitīvo kontroļu dati,
- ja audi nav aknas — devas-atbildreakcijas līkne, izmantojot pozitīvo kontroli. To var iegūt no datiem, kas iegūti kompetences pierādīšanas laikā (sk. 16.–17. punktu), un tai, atsaucoties uz esošo literatūru, jāpievieno pamatojums, ka attiecīgo audu kontrolēs ir pienācīga atbildreakciju intensitāte un izkliede,
- izmantotās statistiskās analīzes un metodes, un kritēriji, pēc kuriem atbildreakciju uzskata par pozitīvu, negatīvu vai neskaidru,
- Hedgehog šūnu biežums katrā grupā un katram dzīvniekam.

Rezultātu iztirzājums

Secinājumi

Atsauces

LITERATŪRAS SARAKSTS

- (1) Kirkland, D., G. Speit (2008), Evaluation of the ability of a battery of three *in vitro* genotoxicity tests to discriminate rodent carcinogens and non-carcinogens III. Appropriate follow-up testing *in vivo*, *Mutation Research*, Vol. 654/2, pp. 114-32.
- (2) Brendler-Schwaab, S. *et al.* (2005), The *in vivo* Comet assay: use and status in genotoxicity testing, *Mutagenesis*, Vol. 20/4, pp. 245-54.
- (3) Burlinson, B. *et al.* (2007), Fourth International Workgroup on Genotoxicity Testing: result of the *in vivo* Comet assay workgroup, *Mutation Research*, Vol. 627/1, pp. 31-5.
- (4) Burlinson, B. (2012), The *in vitro* and *in vivo* Comet assays, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 817, pp. 143-63.
- (5) Smith, C.C. *et al.* (2008), Recommendations for design of the rat Comet assay, *Mutagenesis*, Vol. 23/3, pp. 233-40.
- (6) Hartmann, A. *et al.* (2003), Recommendations for conducting the *in vivo* alkaline Comet assay, *Mutagenesis*, Vol. 18/1, pp. 45-51.
- (7) McKelvey-Martin, V.J. *et al.* (1993), The single cell gel electrophoresis assay (Comet assay): a European review, *Mutation Research*, Vol. 288/1, pp. 47-63.
- (8) Tice, R.R. *et al.* (2000), Single cell gel/Comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 35/3, pp. 206-21.
- (9) Singh, N.P. *et al.* (1988), A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells, *Experimental Cell Research*, Vol. 175/1, pp. 184-91.
- (10) Rothfuss, A. *et al.* (2010), Collaborative study on fifteen compounds in the rat-liver Comet assay integrated into 2- and 4-week repeat-dose studies, *Mutation Research*, Vol. 702/1, pp. 40-69.
- (11) OECD (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, No. 234, OECD, Paris.

- (12) OECD (2014), *Reports of the JaCVAM initiative international pre-validation and validation studies of the in vivo rodent alkaline comet assay for the detection of genotoxic carcinogens*, Series on Testing and Assessment, Nos. 195 and 196, OECD Publishing, Paris.
- (13) Olive, P.L., J.P. Banath, R.E. Durand (1990), Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells using the "Comet" assay, *Radiation Research*, Vol. 122/1, pp. 86-94.
- (14) Tice, R.R., G.H. Strauss (1995), The single cell gel electrophoresis/Comet assay: a potential tool for detecting radiation-induced DNA damage in humans, *Stem Cells*, Vol. 13/1, pp. 207-14.
- (15) Collins, A.R (2004), The Comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations, *Molecular Biotechnology*, Vol. 26/3, pp. 249-61.
- (16) Rothfuss, A. *et al.* (2011), Improvement of *in vivo* genotoxicity assessment: combination of acute tests and integration into standard toxicity testing, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 723/2, pp. 108-20.
- (17) Kushwaha, S. *et al.* (2010), Evaluation of multi-organ DNA damage by Comet assay from 28 days repeated dose oral toxicity test in mice: A practical approach for test integration in regulatory toxicity testing, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, Vol. 58/1, pp. 145-54.
- (18) Vasquez, M.Z. (2010), Combining the *in vivo* Comet and micronucleus assays: a practical approach to genotoxicity testing and data interpretation, *Mutagenesis*, Vol. 25/2, pp. 187-99.
- (19) Bowen, D.E. (2011), Evaluation of a multi-endpoint assay in rats, combining the bone-marrow micronucleus test, the Comet assay and the flow-cytometric peripheral blood micronucleus test, *Mutation Research*, Vol. 722/1, pp. 7-19.
- (20) Recio, L. *et al.* (2010), Dose-response assessment of four genotoxic chemicals in a combined mouse and rat micronucleus (MN) and Comet assay protocol, *The Journal of Toxicological Science*, Vol. 35/2, pp. 149-62.
- (21) O'Donovan, M., B. Burlinson (2013), Maximum dose levels for the rodent comet assay to examine damage at the site of contact or to the gastrointestinal tract, *Mutagenesis*, Vol. 28/6, pp. 621-3.
- (22) Hartmann, A. (2004), **Use of the alkaline *in vivo* Comet assay for mechanistic genotoxicity investigations**, *Mutagenesis*, Vol. 19/1, pp. 51-9.
- (23) Nessler, F. (2007), *In vivo* Comet assay on isolated kidney cells to distinguish genotoxic carcinogens from epigenetic carcinogens or cytotoxic compounds, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 630/1, pp. 28-41.
- (24) Brendler-Schwaab, S.Y., B.A. Herbold (1997), A new method for the enrichment of single renal proximal tubular cells and their first use in the Comet assay, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 393/1-2, pp. 175-8.
- (25) Toyozumi, T. *et al.* (2011), Use of the *in vivo* skin Comet assay to evaluate the DNA-damaging potential of chemicals applied to the skin, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 726/2, pp. 175-80.
- (26) Struwe, M. *et al.* (2008), Detection of photogenotoxicity in skin and eye in rat with the photo Comet assay, *Photochemical and Photobiological Sciences*, Vol. 7/2, pp. 240-9.
- (27) Wada, K. *et al.* (2012), A comparison of cell-collecting methods for the Comet assay in urinary bladders of rats, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 742/1-2, pp. 26-30.
- (28) Wang, A. *et al.* (2007), Measurement of DNA damage in rat urinary bladder transitional cells: improved selective harvest of transitional cells and detailed Comet assay protocols, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 634/ 1-2, pp. 51-9.

- (29) Burlinson, B. *et al.* (2007), *In Vivo Comet Assay Workgroup*, part of the Fourth International Workgroup on Genotoxicity Testing. Fourth International Workgroup on Genotoxicity testing: results of the *in vivo* Comet assay workgroup, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 627/1, pp. 31-5.
- (30) Jackson, P. *et al.* (2012), Pulmonary exposure to carbon black by inhalation or instillation in pregnant mice: effects on liver DNA strand breaks in dams and offspring, *Nanotoxicology*, Vol. 6/5, pp. 486-500.
- (31) Sasaki, Y.F. *et al.* (2000), The comet assay with multiple mouse organs: comparison of Comet assay results and carcinogenicity with 208 chemicals selected from the IARC monographs and U.S. NTP Carcinogenicity Database, *Critical Reviews in Toxicology*, Vol. 30/6, pp. 629-799.
- (32) Sekihashi, K. *et al.* (2002), Comparative investigations of multiple organs of mice and rats in the Comet assay, *Mutation Research*, Vol. 517/1-2, pp. 53-74.
- (33) Speit, G, M. Vasquez, A. Hartmann (2009), **The comet assay as an indicator test for germ cell genotoxicity**, *Mutation Research*, Vol. 681/1, pp. 3-12.
- (34) Zheng, H., P.L. Olive (1997), Influence of oxygen on radiation-induced DNA damage in testicular cells of C3H mice, *International Journal of Radiation Biology*, Vol. 71/3, pp. 275-282.
- (35) Cordelli, E. *et al.* (2003), Evaluation of DNA damage in different stages of mouse spermatogenesis after testicular X irradiation, *Journal of Radiation Research*, Vol. 160/4, pp. 443-451.
- (36) Merk, O., G. Speit (1999), Detection of crosslinks with the Comet assay in relationship to genotoxicity and cytotoxicity, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 33/2, pp. 167-72.
- (37) Pfuhler, S., H.U. Wolf (1996), Detection of DNA-crosslinking agents with the alkaline Comet assay, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 27/3, pp. 196-201.
- (38) Wu, J.H., N.J. Jones (2012), Assessment of DNA interstrand crosslinks using the modified alkaline Comet assay, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 817, pp. 165-81.
- (39) Spanswick, V.J., J.M. Hartley, J.A. Hartley (2010), **Measurement of DNA interstrand crosslinking in individual cells using the Single Cell Gel Electrophoresis (Comet) assay**, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 613, pp. 267-282.
- (40) Kumaravel, T.S., A.N. Jha (2006), Reliable Comet assay measurements for detecting DNA damage induced by ionizing radiation and chemicals, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 605 (1-2), pp. 7-16.
- (41) Burlinson, B. *et al.* (2007), Fourth International Workgroup on Genotoxicity Testing: result of the *in vivo* Comet assay workgroup, *Mutation Research*, Vol.627/1, pp. 31-5.
- (42) Kumaravel, T.S. *et al.* (2009), Comet Assay measurements: a perspective, *Cell Biology and Toxicology*, Vol. 25/1, pp. 53-64.
- (43) Ersson, C., L. Möller (2011), The effects on DNA migration of altering parameters in the Comet assay protocol such as agarose density, electrophoresis conditions and durations of the enzyme or the alkaline treatments, *Mutagenesis*, Vol. 26/6, pp. 689-95.
- (44) Möller, P. *et al.* (2010), Assessment and reduction of Comet assay variation in relation to DNA damage: studies from the European Comet Assay Validation Group, *Mutagenesis*, Vol. 25/2, pp. 109-11.
- (45) Forchhammer, L. *et al.* (2010), Variation in the measurement of DNA damage by Comet assay measured by the ECVAG inter-laboratory validation trial, *Mutagenesis*, Vol. 25/2, pp. 113-23.
- (46) Azqueta, A. *et al.* (2011), Towards a more reliable comet assay: Optimising agarose concentration, unwinding time and electrophoresis conditions, *Mutation Research*, Vol. 724/1-2, pp. 41-45.

- (47) Hayashi, M. *et al.* (2011), Compilation and use of genetic toxicity historical control data, *Mutation Research*, Vol. 723/2, pp. 87-90.
- (48) Ryan, T. P. (2000), *Statistical Methods for Quality Improvement*, John Wiley and Sons, New York 2nd ed.
- (49) Appendix A of the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes (ETS No. 123)
- (50) Šā pielikuma B.8. nodaļa "Subakūtais inhalācijas toksiskums: 28 dienu pētījums"
- (51) Šā pielikuma B.29. nodaļa "Subhroniskais inhalācijas toksiskums: 90 dienu pētījums"
- (52) Blakey, D.H., G.R. Douglas (1984), Transient DNA lesions induced by benzo[a]pyrene in Chinese hamster ovary cells, *Mutation Research*, Vol. 140/2-3, pp. 141-45.
- (53) Blakey, D.H., G.R. Douglas (1990), The role of excision repair in the removal of transient benzo[a]pyrene-induced DNA lesions in Chinese hamster ovary cells, *Mutation Research*, Vol. 236/1, pp. 35-41.
- (54) OECD (2002), "Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation", OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, No. 19, OECD Publishing, Paris.
- (55) Nakajima, M. (2012), Tissue sample preparation for *in vivo* rodent alkaline Comet assay, *Genes and Environment*, Vol. 34/1, pp. 50-4.
- (56) Hartmann, A. *et al.* (2003), Recommendations for conducting the *in vivo* alkaline Comet assay, *Mutagenesis*, Vol.18/1, pp.45-51.
- (57) Atlas of Comet Assay Images, Scientist Press Co., Ltd., Tokyo, Japan.
- (58) Lovell, D.P., G. Thomas, R. Dubow (1999), Issues related to the experimental design and subsequent statistical analysis of *in vivo* and *in vitro* Comet studies, *Teratogenesis Carcinogenesis Mutagenesis*, Vol. 19/2, pp. 109-19.
- (59) Wiklund, S.J., E. Agurell (2003), Aspects of design and statistical analysis in the Comet assay, *Mutagenesis*, Vol. 18/2, pp. 167-75.
- (60) Bright, J. *et al.* (2011), Recommendations on the statistical analysis of the Comet assay, *Pharmaceutical Statistics*, Vol. 10/6, pp. 485-93.
- (61) Lovell, D.P., T. Omori (2008), Statistical issues in the use of the Comet assay, *Mutagenesis*, Vol. 23/3, pp. 171-82.
-

1. papildinājums

DEFINĪCIJAS

Atsevišķu šūnu gēla elektroforēze sārmainā vidē: jutīgs paņēmieni primāro DNS bojājumu noteikšanai atsevišķas šūnas/kodola līmenī.

Ķimikālija: viela vai maisījums.

“Komēta”: veidols, ko nukleoīdi ieņem pēc ievietošanas vienā elektroforēzes laukā un kas līdzinās komētai — galva ir kodols, bet asti veido DNS, kas elektriskajā laukā migrē prom no kodola.

Izšķirīgi svarīgs mainīgais/parametrs: protokola mainīgais, kura nelielas izmaiņas var atstāt lielu ietekmi uz testa iznākumu. Izšķirīgi svarīgi mainīgie var būt audiem specifiski. Izšķirīgi svarīgus mainīgos nedrīkst mainīt, jo īpaši testa laikā, neapsverot to, kā šīs izmaiņas mainīs testa atbildreakciju, par ko liecina, piemēram, intensitāte un mainība pozitīvajās un negatīvajās kontrolēs. Testēšanas pārskatā jāuzskaita izšķirīgi svarīgu mainīgo izmaiņas, kas izdarītas testēšanas laikā vai salīdzinājumā ar laboratorijas standartprotokolu, un katra izmaiņa jāpamato.

Astes intensitāte jeb procentuālā DNS daļa astē: komētas astes intensitāte attiecībā pret kopējo intensitāti (galva plus aste). Tā atspoguļo DNS pārrāvumu apmēru, kas izteikts procentos.

Testējamā ķimikālija: jebkura viela vai maisījums, ko testē ar šo testēšanas metodi.

UVCB: vielas, kuru sastāvs nav zināms vai ir mainīgs, kura ir kompleksi reakcijas produkti vai bioloģiski materiāli.

2. papildinājums

FAKTORIĀLAIS PLĀNS DZIMUMATŠĶIRĪBU IDENTIFICĒŠANAI KOMĒTAS IN VIVO TESTĀ

Faktoriālais plāns un tā analīze

Saskaņā ar šo plānu pie katra koncentrācijas līmeņa testē vismaz 5 tēviņus un 5 mātītes, tātad plānā tiek izmantoti vismaz 40 dzīvnieki (20 tēviņi un 20 mātītes un attiecīgās pozitīvās kontroles).

Šis plāns ir viens no vienkāršajiem faktoriālajiem plāniem un ir līdzvērtīgs dispersijas divfaktoru analīzei, kur galvenie aplūkoto efekti ir dzimuma un koncentrācijas līmeņa efekti. Šos datus var analizēt, izmantojot daudzas statistikas programmatūras standartpaketes, piem., *SPSS*, *SAS*, *STATA*, *Genstat*, kā arī izmantojot *R*.

Šajā analīzē datu kopas dispersiju sadala dispersijā, kas saistīta ar dzimumu, dispersijā, kas saistīta ar koncentrāciju, un dispersijā, kas saistīta ar dzimumu un koncentrāciju mijiedarbību. Katru no šiem locekļiem salīdzina ar aplēsto dispersiju starp replikātdzīvniekiem viena dzimuma dzīvnieku grupās pie vienas un tās pašas koncentrācijas. Pilnīga informācija par pamatā esošo metodoloģiju pieejama daudzās standarta statistikas mācību grāmatās (sk. atsaucis) un statistiskajās paketēs pieejamajos palīgriķos.

Analīzi turpina, ANOVA tabulā⁽¹⁾ apskatot mijiedarbības locekli "dzimums x koncentrācija". Ja mijiedarbības loceklis nav nozīmīgs, visu dzimumu vai visu koncentrācijas līmeņu apkopotās vērtības ļauj veikt derīgus starplīmeņu statistikas testus, pamatojoties uz ANOVA grupā apkopotās dispersijas locekli.

Analīzi turpina, dažādām koncentrācijām aplēsto dispersiju sadalot kontrastos, tādējādi iegūstot lineārus un kvadrātiskus atbildreakciju kontrastos visiem koncentrācijas līmeņiem. Ja mijiedarbības loceklis "dzimums x koncentrācija" ir nozīmīgs, arī šo locekli var sadalīt mijiedarbības kontrastos "lineārais loceklis x dzimums" un "kvadrātloceklis x dzimums". Šie locekļi ļauj pārbaudīt, vai koncentrāciju atbildreakcijas abiem dzimumiem ir paralēlas vai katram dzimumam ir atšķirīga atbildreakcija.

Grupā apkopotās dispersijas aplēsi var izmantot, lai pārveida testos testētu vidējo vērtību starpību. Šos salīdzinājumus var veikt starp abu dzimumu vidējām vērtībām un starp dažādu koncentrācijas līmeņu vidējām vērtībām, piem., salīdzinājumiem ar negatīvās kontroles līmeņiem. Nozīmīgas mijiedarbības gadījumos iespējams veikt salīdzinājumus starp dažādu koncentrāciju vidējām vērtībām viena dzimuma ietvaros vai abu dzimumu vidējām vērtībām pie vienādas koncentrācijas.

Atsauces

Ir daudz statistikas mācību grāmatu, kurās apspriesta faktoriālo plānu teorija, struktūra, metodoloģija, analīze un interpretācija diapazonā no vienkāršākajām divfaktoru analīzēm un līdz sarežģītākām formām, ko izmanto eksperimentu plānošanas metodoloģijā. Tālāk sniegtais saraksts nav izsmelošs. Dažās grāmatās sniegti izstrādāti salīdzināmu plānu piemēri, un dažos gadījumos norādīts kods analīžu veikšanai ar dažādām programmatūras paketēm.

- (1) Box, G.E.P, Hunter, W.G. and Hunter, J.S. (1978). *Statistics for Experimenters. An Introduction to Design, Data Analysis, and Model Building*. New York: John Wiley & Sons.
- (2) Box G.E.P. & Draper, N.R. (1987) *Empirical model-building and response surfaces*. John Wiley & Sons Inc.
- (3) Doncaster, C.P. & Davey, A.J.H. (2007) *Analysis of Variance and Covariance: How to choose and Construct Models for the Life Sciences*. Cambridge University Press.

⁽¹⁾ Statistiķi, kuri izmanto modelēšanas pieeju, piemēram, *General Linear Models (GLM)*, var veikt analīzi citādā, bet salīdzināmā veidā, taču ne vienmēr sastādīs ierasto ANOVA tabulu, kuru sāka izmantot, kad vēl pirmsdatorizācijas laikmetā statistiskajiem aprēķiniem izmantoja algoritmiskas pieejas.

-
- (4) Mead, R. (1990) The Design of Experiments. Statistical principles for practical application. Cambridge University Press.
 - (5) Montgomery D.C. (1997) Design and Analysis of Experiments. John Wiley & Sons Inc.
 - (6) Winer, B.J. (1971) Statistical Principles in Experimental Design. McGraw Hill.
 - (7) Wu, C.F.J & Hamada, M.S. (2009) Experiments: Planning, Analysis and Optimization. John Wiley & Sons Inc.
-

3. papildinājums

PAŠREIZĒJIE TESTA IEROBEŽOJUMI

Nemot vērā pašreizējās zināšanas, ar komētas *in vivo* testu ir saistīti vairāki ierobežojumi. Paredzams, ka šie ierobežojumi tiks samazināti vai precizēti, augot pieredzei ar testa izmantošanu tam, lai sniegtu atbildes uz jautājumiem par drošumu normatīvā kontekstā.

1. Daži DNS bojājumu veidi var būt īslaicīgi, t. i., reparācija var notikt pārāk ātri, lai 24 stundas vai ilgāk pēc pēdējās devas tos varētu novērot. Nav ne konkrēta saraksta ar īslaicīgu bojājumu veidiem, ne saraksta ar ķīmikālijām, kuras ticami varētu izraisīt šāda veida bojājumu, un nav arī zināms, cik ilgi šāda veida bojājumus iespējams detektēt. Optimālais(-ie) paraugošanas laiks(-i) var būt specifiski arī ķīmikālijai vai ievadīšanas ceļam, un paraugošanas laiki jānosaka, ņemot vērā kinētiskos datus (piem., laiku T_{max} , kad tiek sasniegta maksimālā koncentrācija plazmā vai audos), ja tādi dati ir pieejami. Lielākā daļa validācijas pētījumu, uz kurām balstās šī testēšanas metode, norādīja uz autopsiju 2 vai 3 stundas pēc galīgās devas ievadīšanas. Publicētajā literatūrā vairums pētījumu norāda uz galīgās devas ievadīšanu 2–6 stundas pirms nonāvēšanas. Tāpēc šīs pieredzes tika izmantotas kā pamats testēšanas metodē iekļautajam ieteikumam galīgo devu ievadīt konkrētā laikapunktā 2–6 stundas pirms autopsijas, ja vien nav datu, kas liecinātu par citu ieteicamo laiku.
2. Nav konstatēti pētījumu dati, kas izvērtētu testa jutību attiecībā uz īslaicīgu DNS bojājumu detektēšanu pēc ievadīšanas ar barību vai dzeramo ūdeni salīdzinājumā ar ievadīšanu ar gavāžu. DNS bojājumi ir detektēti pēc ievadīšanas ar barību un dzeramo ūdeni, bet tādu ziņojumu ir salīdzinoši maz salīdzinājumā ar daudz plašāko pieredzi gavāžas un intraperitoneālas ievadīšanas jomā. Līdz ar to testa jutība var būt mazāka attiecībā uz ķīmikālijām, kuras inducē īslaicīgus bojājumus un kuras ievadītas ar barību vai dzeramo ūdeni.
3. Nav veikti starplaboratoriju pētījumi ar audiem, kas nav aknas un kuņģis, tāpēc nav nekādu ieteikumu par to, kā panākt jutīgu un reproducējamu atbildreakciju audos, kas nav aknas, piem., paredzamos pozitīvo un negatīvo kontroļu diapazonus. Attiecībā uz aknām nebija iespējams panākt vienošanos par zemākas robežas noteikšanu negatīvās kontroles vērtībai.
4. Kaut arī vairākas publikācijas apliecina citotoksicitātes *in vitro* maldinošo ietekmi, ir publicēts ļoti maz datu par *in vivo* pētījumiem, tāpēc nav iespējams ieteikt nevienu atsevišķu citotoksicitātes pasākumu. Ar DNS migrācijas pieaugumu ir saistītas tādas histopatoloģiskās izmaiņas kā iekaisums, šūnu infiltrācija, apoptotiskas vai nekrotiskas izmaiņas, taču, kā redzams JaCVAM validācijas izmēģinājumā (ESAO, 2014), šīs izmaiņas ne vienmēr noved pie pozitīviem konstatējumiem komētas testā, līdz ar to nav pieejams galīgs tādu histopatoloģisko izmaiņu saraksts, kas vienmēr būtu saistītas ar paaugstinātu DNS migrāciju. Par citotoksicitātes rādītāju iepriekš ierosināts izmantot *Hedgehog* šūnas (jeb mākoņšūnas, rēģšūnas), taču nav skaidrības par *Hedgehog* šūnu etioloģiju. Pastāv dati, kas liecina, ka tās var izraisīt ar ķīmikāliju saistīta citotoksicitāte, mehāniski / fermenta inducēti bojājumi, kas iniciēti parauga sagatavošanas laikā (Guerard *et al.*, 2014), un/vai spēcīgāka testējamās ķīmikālijas genotoksiskā ietekme. Citi dati norāda, ka tās rodas ekstensīvu bet, iespējams, reparējamu DNS bojājumu dēļ (Lorenzo *et al.*, 2013).
5. Audi vai šūnu kodoli ir tikuši sekmīgi sasaldēti vēlākai analizēšanai. Parasti tas rada izmērāmu ietekmi uz nesēja un pozitīvās kontroles atbildreakciju (Recio *et al.*, 2010; Recio *et al.*, 2012; Jackson *et al.*, 2013). Ja to izmanto, laboratorijai jādemonstrē kompetence sasaldēšanas metodoloģijās un jāpārlicinās par pieņemami zemiem procentuālās DNS daļas astē diapazoniem to dzīvnieku mērķaudos, kas apstrādāti ar nesēju, un jāpārlicinās, ka joprojām iespējams detektēt pozitīvas atbildreakcijas. Literatūrā ir aprakstītas dažādas audu sasaldēšanas metodes. Tomēr patlaban nav vienprātības par to, kā audus sasaldēt un atkausēt vislabāk un kā novērtēt, vai iespējami mainīta atbildreakcija var ietekmēt testa jutību.
6. Nesenie darbi liecina, ka izšķirīgi svarīgi mainīgo saraksts arī turpmāk varētu sarukt un ka izšķirīgi svarīgi mainīgo parametri tiks precizēti (Guerard *et al.*, 2014).

Atsauces

- (1) Guerard, M., C. Marchand, U. Plappert-Helbig (2014), Influence of Experimental Conditions on Data Variability in the Liver Comet Assay, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 55/2, pp. 114-21.
- (2) Jackson, P. *et al.* (2013), Validation of use of frozen tissues in high-throughput comet assay with fully-automatic scoring, *Mutagenesis*, Vol. 28/6, pp. 699-707.
- (3) Lorenzo, Y. *et al.* (2013), The comet assay, DNA damage, DNA repair and cytotoxicity: hedgehogs are not always dead, *Mutagenesis*, Vol. 28/4, pp. 427-32.
- (4) OECD (2014), *Reports of the JaCVAM initiative international pre-validation and validation studies of the in vivo rodent alkaline comet assay for the detection of genotoxic carcinogens*, Series on Testing and Assessment, Nos. 195 and 196, OECD Publishing, Paris.
- (5) Recio L, Hobbs C, Caspary W, Witt KL, (2010), Dose-response assessment of four genotoxic chemicals in a combined mouse and rat micronucleus (MN) and Comet assay protocol, *J. Toxicol. Sci.* 35:149-62.
- (6) Recio, L. *et al.* (2012), Comparison of Comet assay dose-response for ethyl methanesulfonate using freshly prepared versus cryopreserved tissues, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 53/2, pp. 101-13."

(16) pielikuma C daļā C.13. nodaļu aizstāj ar šādu:

"C.13. Bioakumulācija zivju organismā: ūdensekspozīcija un uzturekspozīcija

IEVADS

Šī testēšanas metode (TM) ir ekvivalenta ESAO testēšanas vadlīnijai (TG) Nr. 305 (2012). Šai testēšanas metodes pārskatīšanai ir divējāds galvenais mērķis. Pirmkārt, tajā paredzēts iekļaut uzturiskās bioakumulācijas ⁽¹⁾ testu, kas ir piemērots tam, lai noteiktu ūdenī ļoti slikti šķīstošu vielu bioakumulācijas potenciālu. Otrkārt, ar to paredzēts izveidot testēšanas metodi, kurā attiecīgā gadījumā dzīvnieku labturības iemeslu dēļ izmanto mazāk zivju un kura izmaksu ziņā ir lietderīgāka.

Gados, kopš pieņemta konsolidētā testēšanas metodes C.13. (1), ir pārbaudīts daudz vielu un gan laboratorijas, gan regulatīvās iestādes ir ieguvušas vērtīgu pieredzi. Tas ir radījis pārlicību, ka, izpildot specifiskus kritērijus (sal. ar 88. punktu) šo testu var padarīt nesarežģītāku un ka ir iespējama daudzpakāpju pieeja. Pieredze arī liecina, ka rezultātus var stipri ietekmēt tādi bioloģiski faktori kā augšana un zivju organisma lipīdsturs, un tie var būt ņemami vērā. Turklāt ir atzīts, ka var nebūt tehniski iespējams testēt ūdenī ļoti slikti šķīstošas vielas. Turklāt attiecībā uz vielām, kuras ūdensvidē ļoti slikti šķīst ūdenī, ūdensiekļaušana var nebūt tik svarīga kā uzturiekļaušana. Rezultātā ir izstrādāta testēšanas metode, kurā zivis tiek eksponētas ar uzturu (sal. ar 7.– 14. punktu, 97. punktu un turpmākiem punktiem). Uzturiekļaušanas tests tika validēts (starplaboratoriju salīdzināšana) 2010. gadā (51).

Galvenās pārmaiņas ir šādas.

— Ja ir varbūtīgi, ka bioloģiskās koncentrēšanās faktors (BCF) nav atkarīgs no testējamās koncentrācijas, var uzskatīt, ka pietiek ar vienas testējamās koncentrācijas testēšanu.

— Plāns minimizēt ūdensiekļaušanas testam, kurā, izpildot specifiskus kritērijus, iespējams izmantot mazāku paraugu šķērsgriezumu skaitu.

⁽¹⁾ Definīcijas un mērvienības skatīt 1. papildinājumā.

- Jāmēra zivju lipīdsaturs, lai BCF varētu izteikt uz lipīdsatura 5 % bāzes.
- Papildus stacionārās fāzes BCF aplēsei lielāka nozīme piešķirta kinētiskā BCF aplēsei (ja tā iespējama).
- Ja salīdzinājumā ar ūdenssekspozīcijas testu par piemērotāku uzskata uzturekspozīcijas testu, tas tiks ierosināts atsevišķām vielu grupām.
- Zivju svars jānosaka tā, lai BCF_k būtu iespējams koriģēt ar augšanas izraisītu atšķaidījumu.

Pirms veikt jebkādu bioakumulācijas testu, par testējamo ķīmikāliju jābūt noskaidrotai šāda informācijai:

- (a) analītiskā paņēmiena jutība gan attiecībā uz testējamās vielas, gan tās varbūtējo metabolītu koncentrācijas mērīšanu audos un ūdenī vai barībā (sal. ar 65. punktu);
- (b) šķīdība ūdenī [TM A.6.; (2)]; lai iegūtu ticamu vērtību, tā jānosaka saskaņā ar metodi, kas atbilst šķīdības (aplēstajam) diapazonam. Hidrofobām vielām tā parasti būs kolonnu eluēšanas metode;
- (c) n-oktanol-ūdens sadalījuma koeficients K_{ow} ⁽¹⁾ [TM A.8. (4), A.24. (5), A.23. (6)]; vai cita piemērota informācija par sadalīšanās uzvedību (piemēram, sorbcija lipīdos, K_{oc}); lai iegūtu ticamu vērtību, koeficients jānosaka saskaņā ar K_{ow} (aplēstajam) diapazonam atbilstošu metodi. Hidrofobām vielām tā parasti būs lēnās maisīšanas metode [TM A.23. (6)];
- (d) vielas stabilitāte ūdenī (hidrolīze [TM C.7. (7)]);
- (e) vielas stabilitāte pārtikā (īpaši ja izraugās uzturekspozīcijas testa pieeju);
- (f) informācija par testa starojuma apstākļiem relevantu fototransformāciju (8);
- (g) virsmas spraigums (t. i., vielām, kurām nevar noteikt $\log K_{ow}$) [TM A.5. (9)];
- (h) tvaika spiediens [TM A.4. (10)];
- (i) jebkāda informācija par biotisku vai abiotisku noārdīšanos ūdenī, piemēram (bet ne tikai), attiecīgā gadījumā pilnā bionoārdāmība [TM C.4., I–VII daļa (11), C.29. (12)];
- (j) informācija par metabolītiem: struktūra, $\log K_{ow}$, attiecīgā gadījumā veidošanās un noārdīšanās;
- (k) skābes disociācijas konstante (pK_a) vielām, kuras var jonizēties. Ja nepieciešams, testējamā ūdens pH jākorrigē, lai gadījumā, ja attiecībā uz zivju sugu tā var rīkoties, nodrošinātu, ka viela testā ir nejonizētā veidā.

Neatkarīgi no izvēlētās ekspozīcijas metodes vai paraugošanas shēmas šī testēšanas metode apraksta procedūru, kā raksturotu vielas potenciālu bioakumulācijai zivju organismā. Kaut arī vēlams izmantot caurplūdes testa režīmus, ja ir izpildīti validitātes kritēriji, pieļaujami ir semistatiski režīmi (sal. ar 24. un 113. punktu). Izmantojot uzturekspozīcijas sistēmu, caurplūdes sistēma nav nepieciešama tam, lai saglabātu testētās vielas koncentrāciju ūdenī, bet palīdzēs uzturēt pietiekamas izšķīdušā skābekļa koncentrācijas, nodrošināt ūdens tīrību un likvidēs ietekmi, ko rada, piemēram, izdalīšanās produkti.

⁽¹⁾ Dažreiz norāda ar P_{ow} ; nosaka ar kolbu kratīšanas metodi saskaņā ar TM A.8. (4), HPLC metodi saskaņā ar TM A.24. (5) un lēnās maisīšanas metodi saskaņā ar TM A.23. (6). Lai noteiktu $\log K_{ow}$ atsevišķos gadījumos izmanto ģeneratora-kolonnas paņēmieni. Ir pieejami daži pētījumi, kur izmantots šis paņmiens, lielākoties polihlorbifeniliem un dibenzodioksīniem (piemēram, Li and Doucette, 1993. gads) (3). Vielām, kuras var jonizēties, $\log K_{ow}$ jānorāda attiecībā uz nejonizēto formu.

Neatkarīgi no tā, kuru testēšanas metodi izraugās, šī testēšanas metode pietiekami detalizēti informē par šā testa veikšanu, vienlaicīgi atvēlot pietiekamu brīvību eksperimenta struktūru pielāgot konkrētu laboratoriju apstākļiem un mainīgajām testējamo vielu īpašībām. Ūdensekspozīcijas testu vislabāk izmantot stabilām organiskām vielām, kuru $\log K_{ow}$ vērtības ir no 1,5 līdz 6,0 (13), bet to var izmantot arī ļoti hidroforām vielām ($\log K_{ow} > 6,0$), ja iespējams pierādīt, ka testējamās ķīmikālijas koncentrācija ūdenī ir stabila un ka ķīmikālija pilnīgi izšķīdusi. Ja nav iespējams pierādīt, ka testējamās ķīmikālijas koncentrācija ūdenī ir stabila, ūdensekspozīcijas pētījums nav piemērots un tāpēc vielas testēšanai ar zivīm būtu jāizmanto uzturpieeja (kaut arī uzturtesta rezultātu interpretācija un izmantošana var būt atkarīga no tiesiskā regulējuma). Iepriekšējās aplēses par biokoncentrēšanās koeficientu (BCF, ko dažreiz apzīmē ar K_b) organiskām vielām, kuru $\log K_{ow}$ vērtības ir līdz pat 9,0, var iegūt, izmantojot Bintein *et al.* vienādojumu (14). Tādām stipri hidroforām vielām biokoncentrēšanās koeficienta (BCF_{ss}) vērtību, kuru paredzēts iegūt laboratorijas eksperimentos, jo īpaši tad, ja priekšaplēsei izmantots lineārs modelis. Bioakumulācijas potenciālu raksturo tādi parametri kā uzņemšanas ātruma konstante (k_1), zuduma ātruma konstantes, arī izvadīšanas ātruma konstante (k_2), stacionārās fāzes biokoncentrēšanās koeficients (BCF_{ss}), kinētiskais biokoncentrēšanās koeficients (BCF_k) un uzturiskais biomagnifikācijas koeficients (BMF) (¹).

Radioaktīvi iezīmētās testējamās vielas var atvieglot ūdens, pārtikas un zivju paraugu analīzi, un tās var izmantot, lai noteiktu, vai būs jāidentificē un kvantitatīvi jānosaka metabolīti. Ja mēra tikai radioaktīvo atlieku kopējo daudzumu (piemēram, sadedzinot vai šķīdinot audus), BCF vai BMF ir uz pamatvielas, visu nesadalījušos metabolītu un asimilētā oglekļa kopējās bāzes. Līdz ar to uz radioaktīvo atlieku kopdaudzumu balstītas BCF un BMF vērtības nevar tieši salīdzināt ar BCF un BMS, kas iegūti, specifiski analizējot tikai pamatvielu. Lai konstatētu BCF vai BMF uz pamatvielas bāzes, pētījumos ar radioaktīvu iezīmēšanu pirms analīzes var izmantot atdalīšanas (separācijas) procedūras, piemēram, TLC, HPLC vai GC (²). Ja BCF vai BMF bāzei jābūt nevis radioaktīvi iezīmētajam kopējam atlikumam, bet gan pamatvielas koncentrācijai zivs organismā, ar atdalīšanas paņēmieniem jāidentificē pamatviela un attiecīgie metabolīti un tie kvantitatīvi jānovērtē (³) (sal. ar 65. punktu). Vēl ir iespējams, analizējot un identificējot atliekas audos, ar bioakumulācijas pētījumu apvienot zivju metabolisma vai *in vivo* sadalījuma pētījumu. Ar attiecīgiem instrumentiem var prognozēt metabolizēšanās iespējamību (piemēram, ESAO QSAR instrumentu kopumu (15) un aizsargātajām QSAR programmām).

Lēmums par to, vai veikt ūdensekspozīcijas vai uzturekspozīcijas testu un kāda būs tā struktūra, jābalsta uz 3. punktā minētajiem faktoriem, kas ņemti vērā kopā ar attiecīgo tiesisko regulējumu. Piemēram, attiecībā uz vielām, kurām ir liels $\log K_{ow}$, bet kurām attiecībā uz pieejamo analītisko paņēmieni jutību joprojām vērojama vēra ņemama šķīdība ūdenī, vispirms jāapsver, vai neveikt ūdensekspozīcijas testu. Tomēr pastāv iespēja, ka informācija par šo hidroforu vielu šķīdību ūdenī nav galīga, tādēļ, pirms lemj, kuru testēšanas metodi izmantot, jāizpēta iespēja sagatavot ūdensekspozīcijas pētījumā izmantojamās stabilas, mērāmas koncentrācijas ūdens šķīdumā (stabilas emulsijas nav atļautas) (16). Spriežot pēc tādiem kritērijiem kā šķīdība ūdenī un oktanola-ūdens sadalījuma koeficienta "robeža", konkrētus preskriptīvas norādījumus par izmantojamo metodi sniegt nav iespējams, jo iepriekš norādīto iemeslu dēļ metodes izmantojamību var būtiski ietekmēt citi faktori (analītiskie paņēmieni, noārdīšanās, adsorbēcija, u. c.). Tomēr par 5 augstāks $\log K_{ow}$ un šķīdība ūdenī, kas mazāka par ~0,01 – 0,1 mg/l, iezīmē tādu vielu diapazonu, kuras testēt ar ūdensekspozīciju var būt arvien grūtāk.

Jāapsver, kādi citi faktori, varētu ietekmēt testa izvēli, arī vielas potenciāls adsorbēties testēšanas tvertnēs un aparātā, tās stabilitāte ūdens šķīdumā attiecībā pret tās stabilitāti zivju barībā (17) (18) utt.

(¹) Definīcijas un mērvienības skatīt 1. papildinājumā.

(²) TLC: plānslāņa hromatogrāfija; HPLC: augstspiediena šķīduma hromatogrāfija; GC: gāzu hromatogrāfija.

(³) Dažos tiesiskajos regulējumos metabolītu analīze var būt obligāta, ja tiek ievēroti konkrēti nosacījumi (sal. 65. punkts).

Informācija par šādiem praktiskiem aspektiem var būt pieejama no citiem pabeigtiem ūdensekspozīcijas pētījumiem. Papildu informācija par to, kā vērtēt aspektus, kas saistās ar bioakumulācijas pētījumu veikšanu, ir pieejama literatūrā (piemēram, (19)).

Vielām, kurām ir tāda šķīdība vai attiecībā uz kurām ir tāda iespēja uzturēt koncentrāciju ūdenī un šo koncentrāciju tā analizēt, ka ir iespējams realizēt ūdensekspozīcijas metodi, biokoncentrēšanās potenciālu ieteicams noteikt ar to. Jebkurā gadījumā jāpārlicinās, ka izmantojamā(-s) ūdensekspozīcijas koncentrācija(-s) ir testa vides ūdens šķīdības diapazonā. Lai uzturētu izšķīdinātās testējamās vielas koncentrācijas stabilitāti, ir iespējams izmantot dažādas metodes, piemēram, izejšķīdumus vai pasīvās dozēšanas sistēmas (piemēram, kolonnu eluēšanas metodes) izmantošana, ja vien ir iespējams pierādīt, ka ir iespējams uzturēt stabilas koncentrācijas un ka testa vide salīdzinājumā ar 27. punktā ieteikto nemainās.

Attiecībā uz stipri hidroforām vielām ($\log K_{ow} > 5$ un ar šķīdību zem $\sim 0,01-0,1$ mg/l) ūdensekspozīcijas testus veikt var būt arvien grūtāk. Ierobežojumus var radīt tas, ka ūdens koncentrāciju (piemēram, ekspozīcijas tvertnu stikla sorbcijas dēļ vai tāpēc, ka notiek strauja uzņemšana zivju organismā) nav iespējams uzturēt līmenī, ko uzskata par pietiekami nemainīgu, vai ka jāizmanto tik zemas koncentrācijas ūdenī, ka tās atrodas kvantitatīvās noteikšanas analītiskās robežas diapazonā vai zem tā ⁽¹⁾. Šīm stipri hidroforajām vielām ieteicams veikt barības ekspozīcijas testu, ja vien tas tests sader ar attiecīgo tiesisko regulējumu un riska novērtējuma vajadzībām.

Attiecībā uz virsmaktīvām vielām, ņemot vērā to īpašības, jāapsver, vai tām neizmantojot ūdens biokoncentrēšanās testu, pretējā gadījumā piemērotāks varētu būt uzturpētījums. Virsmaktīvas vielas ir virsmaktīvi aģenti, kas mazina spraigumu starp diviem šķīdumiem. Sava amfifiliskā rakstura dēļ (t. i., tie satur gan hidrofilisku, gan hidroforisku daļu) tās akumulējas tādās saskāres šķirtnēs kā ūdens un gaiss, ūdens un pārtika un stikla sienas, un tāpēc ir grūtāk noteikt to koncentrāciju ūdenī.

Ar uzturtestu iespējams apiet dažus jautājumus, kas saistīti ar tādu sarežģītu maisījumu ekspozīciju, kuru sastāvdaļām atšķiras robeža šķīdībai ūdenī, tādējādi ka salīdzināma eksponētība visiem maisījuma komponentiem ar to ir varbūtīgāka nekā ar ūdensekspozīcijas metodi (sal. (20)).

Jāpiebilst, ka uzturpieejā tiek iegūts uzturisks biomagnifikācijas koeficients (BMF), nevis biokoncentrēšanās faktors (BCF) ⁽²⁾. Ir pieejas, kā no uzturpētījumā iegūtiem datiem aplēst kinētisko biokoncentrēšanās koeficientu (BCF_k) (kā aprakstīts 8. papildinājumā), taču šīs pieejas jāizmanto piesardzīgi. Kopumā šajās pieejās pastāv pieņēmums par pirmās pakāpes kinētiku un tās var izmantot vienīgi noteiktām savienojumu grupām. Tās izmantot virsmaktīvām vielām ir mazvarbūtīgi (sk. 12. punktu).

Minimizēta ūdensekspozīcijas testa izkārtojums, kurā paredzēts mazāk paraugošanas punktu un kuram ir mērķis samazināt dzīvnieku skaitu un/vai resursu apjomu (sal. ar 83. punktu un turpmākiem punktiem), jāizmanto tikai vielām, attiecībā uz kurām ir iemesls paredzēt, ka uzņemšana un izvadīšana aptuveni atbilst pirmās pakāpes kinētikai (t. i., kopumā nejonizētas organiskās vielas, sal. ar 88. punktu).

⁽¹⁾ Kopumā ūdenī izmēritajām koncentrācijām uzņemšanas fāzē vismaz par vienu lieluma kārtu jāpārsniedz kvantitatīvās noteikšanas robeža, lai pētījuma izvadīšanas fāzē attiecībā uz organismā esošajām vielām būtu iespējams izmērīt vairāk nekā vienu pussabrukšanas periodu.

⁽²⁾ Definīcijas un mērvienības skatīt 1. papildinājumā.

C.13. – I: Zivju ūdensekspozīcijas biokoncentrēšanās tests**TESTA PRINCIPS**

Šim testam ir divas fāzes: ekspozīcijas fāze (uzņemšana) un pēcekspozīcijas fāze (izvadīšana). Uzņemšanas fāzes laikā vienas sugas zivju grupu eksponē testējamai vielai pie vienas vai vairākām koncentrācijām, kas izraudzītas atkarībā no testējamās vielas īpašībām (sal. ar 49. punktu). Pēc tam zivis izvadīšanas fāzē pārvieto vidi, kas nesatur testējamo vielu. Izvadīšanas fāze vajadzīga vienmēr, ja vien uzņemšanas fāzē uzņemtais vielas daudzums nav maznozīmīgs. Abās testa fāzēs kontrolē testējamās vielas koncentrāciju zivju organismā/uz tā virsmas (vai specifiskos organisma audos). Papildus divām eksponētajām grupām identiskos apstākļos, izņemot to, ka nav pievienota testējamā viela, tur zivju kontrolgrupu, lai ar attiecīgo kontrolgrupu varētu salīdzināt biokoncentrēšanas testā novērojamās varbūtējās negatīvās ietekmes un iegūt testējamās vielas fona koncentrācijas ⁽¹⁾.

Ūdensekspozīcijas testā uzņemšanas fāze parasti ilgst 28 dienas. Tās ilgumu nepieciešamības gadījumā var paildzināt (sal. ar 18. punktu) vai saīsināt, ja tiek pierādīts, ka stacionārā fāze ir sasniegta agrāk (definīcijas un mērvienības sk. 1. papildinājumā). Uzņemšanas fāzes ilgumu un laiku līdz stacionārai fāzei var prognozēt, izmantojot 5. papildinājumā sniegtos vienādojumus. Izvadīšanas fāzi sāk tad, kad zivis vairs nav eksponētas testējamajai vielai, pārvietojot zivis uz tādu pašu vidi, taču bez testējamās vielas klātbūtnes tīrā traukā. Ja iespējams, biokoncentrēšanās koeficientu vēlams aprēķināt gan kā koncentrēšanās koeficientu zivju organismā (C_p), gan ūdenī (C_w) stacionārajā fāzē (BCF_{ss} ; definīciju sk. 1. papildinājumā), gan arī kā kinētisku biokoncentrēšanās koeficientu (BCF_k ; definīcijas un mērvienības sk. 1. papildinājumā), kas tiek aplēsts kā uzņemšanas ātruma konstantes (k_1) un izvadīšanas ātruma konstantes (k_2) attiecība, pieņemot, ka būs pirmās pakāpes kinētika ⁽²⁾.

Ja 28 dienu laikā stacionāro fāzi nesasniedz, aprēķina BCF , izmantojot kinētisko pieeju, (sal. ar 38. punktu) vai arī uzņemšanas fāzi var paildzināt. Ja tāpēc, lai tiktu sasniegta stacionārā fāze, uzņemšanas fāze nepraktiski ieilgst (sal. ar 5. papildinājuma 37. un 38. punktu), vēlams izmantot kinētisko pieeju. Pārmaiņus attiecībā uz stipri hidroforām vielām jāapsver, vai neveikt uztura pētījumu ⁽³⁾, ja vien uztura tests atbilst attiecīgajam tiesiskajam regulējumam.

Uzņemšanas ātruma konstanti, izvadīšanas (zuduma) ātruma konstanti (vai konstantes, ja izmanto sarežģītākus modeļus), biokoncentrēšanās koeficientu (stacionāro un/vai kinētisko) un, ja iespējams, ticamības robežas katram no šiem parametriem aprēķina, izmantojot modeli, kas vislabāk apraksta izmērītās testējamās vielas koncentrācijas zivju organismā un ūdenī (sal. ar 5. papildinājumu).

Zivs masas pieaugums testa laikā samazinās testējamās vielas koncentrāciju augošās zivīs (tā saucamais “augšanas izraisīts atšķaidījums”), tāpēc kinētiskais BCF atbilstoši augšanai jākorrigē, jo pretējā gadījumā tas tiks novērtēts par zemu (sal. ar 72. un 73. punktu).

BCF ir balstīts uz kopējo koncentrāciju zivju organismā (t. i., uz zivs kopējo slapjsvaru). Tomēr, ja zivis ir pietiekami lielas vai arī ja tās var sadalīt ēdamajā daļā (fileja) un neēdamajā daļā (iekšējie orgāni), īpašiem mērķiem var izmantot specifiskus audus vai orgānus (piemēram, muskuļus, aknas). Tā kā daudzām organismām vielām ir skaidri izteikta sakarība starp biokoncentrēšanas potenciālu un hidrofobitāti, attiecīga sakarība pastāv arī starp tauku saturu testa zivju organismā un šādu vielu novēroto biokoncentrēšanos. Tādējādi, lai testa rezultātos vielām ar augstu lipofilitāti (t. i., $\log K_{ow} > 3$) šādas mainības avotu samazinātu, biokoncentrēšanās zivju organismā papildus tieši pētījumā iegūtajam rādītājam jāizsaka kā normalizēta zivij, kuras organismā lipīdsaturs ir 5 % (uz visa ķermeņa slapjsvara bāzes). Tas vajadzīgs, lai būtu bāze, ko var izmantot, lai savstarpēji salīdzinātu par dažādām vielām un/vai testa sugām iegūtus rezultātus. Lipīdsaturu 5 % izmanto ļoti plaši, jo tas raksturo vidējo lipīdsaturu šajā testēšanas metodē izmantot zivju [sugu] organismā (21).

⁽¹⁾ Lielākajai daļai testējamo vielu ideālā gadījumā nevajadzētu būt detektējamām kontroles ūdenī. Fona koncentrācijām būtu jāattiecas tikai uz dabiskas izcelsmes materiāliem, (piemēram, dažiem metāliem) un vielām, kuras vidē ir plaši pieejamas.

⁽²⁾ Ja acīmredzami netiek novērota pirmās pakāpes kinētika, jāizmanto sarežģītāki modeļi (sk. izmantoto literatūru 5. papildinājumā) un jālūdz biostatistikas speciālista padoms.

⁽³⁾ Ja biokoncentrēšanās testā novērojama slikta šķīdība ūdenī, mazas ekspozīcijas koncentrācijas var mazināt uzņemšanu, turpretī ar barības testu iespējams panākt daudz lielākas ekspozīcijas koncentrācijas.

INFORMĀCIJA PAR TESTĒJAMO VIELU

Papildus leivādā (3. punkts) norādītajām testējamās vielas īpašībām nepieciešama arī tāda informācija kā toksiskums testā izmantojamajai zivju sugai, vēlams, asimptomiskā LC_{50} (t. i., no laika neatkarīga), un/vai no ilglaicīgos testos ar zivīm aplēstais toksiskums (piemēram, TM C.47. (22), C.15. (23) un C.14. (24)).

Lai kvantitatīvi noteiktu vielu testējamās šķīdumos un bioloģiskajā materiālā, jābūt pieejamai piemērotai analītiskai metodei ar zināmu pareizību, precizitāti un jutību, kā arī informācijai par paraugu sagatavošanu un glabāšanu. Jābūt zināmai arī testējamās vielas analītiskās kvantitatīvās noteikšanas robežai gan ūdenī, gan zivju audos. Ja izmanto radioaktīvi iezīmētu testējamo vielu, tai jābūt ar augstāko tīrību (piemēram, vēlams > 98 %) un jābūt zināmai ar piemaisījumiem saistītajai radioaktivitātes procentuālajai daļai.

TESTA VALIDITĀTE

Lai tests būtu valids, piemēro šādus nosacījumus:

Ūdens temperatūras mainība ir mazāka par $\pm 2^{\circ}\text{C}$, jo lielas novirzes var ietekmēt uzņemšanai un izvadīšanai būtiskus bioloģiskus parametrus, kā arī dzīvniekiem izraisīt stresu.

Izšķīdusā skābekļa koncentrācija nav mazāka par 60 % piesātinājuma.

Testējamās vielas koncentrāciju kamerās uztur ± 20 % robežās no uzņemšanas fāzes laikā izmērītās vidējās vērtības.

Testējamās vielas koncentrācija nesasniedz tās ūdensšķīdības robežu, ierēķinot to, kā faktisko šķīdību var ietekmēt testa ūdens ⁽¹⁾.

Testa beigās mirstība vai citas negatīvas ietekmes/slimības ne kontroles, ne apstrādātajām zivīm nepārsniedz 10 %; ja tests ilgst vairākas nedēļas vai mēnešus, nāve vai cita veida negatīva ietekme abās zivju kopās nedrīkst pārsniegt 5 % mēnesī un kopumā nedrīkst pārsniegt 30 %. Ja testgrupās un kontrolgrupās paraugoto zivju vidējais augšanas ātrums būtiski atšķiras, tas var liecināt par toksisku testējamās vielas ietekmi.

STANDARTVIELAS

Ja vajag pārbaudīt eksperimenta procedūru (piemēram, ja laboratorijai nav iepriekšējas pieredzes testa veikšanā vai ir mainīti eksperimenta apstākļi), var būt lietderīgi izmantot standartvielas ar zināmu biokoncentrēšanās potenciālu un zemu metabolizēšanos.

METODES APRAKSTS

Aprīkojums

Jācenšas nevienā aprīkojuma daļā neizmantot materiālus, kas var šķīst, sorbēties vai izskāties un kas var nelabvēlīgi ietekmēt zivis. Var izmantot no ķīmiski inerta materiāla izgatavotas taisnstūrveida vai cilindriskas standartvertnes, kurām ir pietiekama, noslogojumam (sal. ar 43. punktu) atbilstoša ietilpība. Mīksta plastmasa caurulītes jāizmanto minimāli. Jāizmanto politetrafluoretilēna, nerūsošā tērauda un/vai stikla caurulītes. Pieredze rāda, ka tādām testējamām vielām ar augstu adsorbcijas koeficientu kā sintētiskie piretroīdi var būt jāizmanto kvarca stikls. Tādās situācijās aprīkojums pēc izmantošanas jālikvidē. Ja pirms testa organismu iesaistīšanas prasīts pierādīt, ka tiek saglabātas stabilas ekspozīcijas koncentrācijas, testa sistēmas vēlams tik ilgi, cik vajadzīgs, eksponēt tādām testējamām vielas koncentrācijām, kas tiks izmantotas pētījumā.

⁽¹⁾ Lai noteiktu attiecīgās ekspozīcijas koncentrācijas, vairākkomponentu vielām, UVCB un maisījumiem jāņem vērā katra attiecīgā komponenta šķīdība ūdenī.

Ūdens

Testos parasti lieto dabisko ūdeni, un tā ieguves avotam jābūt nepiesārņotam un nemainīgas kvalitātes. Tomēr, lai nodrošinātu nemainīgu kvalitāti, piemērotāks var būt rekonstituēts ūdens (t. i., demineralizēts ūdens, kam zināmos daudzumos pievienoti konkrēti mikroelementi). Atšķaidīšanas ūdenim, kas ir pirms ievietošanas testa traukā ar testējamo vielu sajaukts ūdens (sal. ar 30. punktu), jābūt tādas kvalitātes, lai izraudzītās zivju sugas visa aklimatizācijas un testēšanas perioda laikā varētu izdzīvot, neuzrādot nekādas anormālas izskata vai uzvedības pazīmes. Ideālā gadījumā jāpierāda, ka testā izmantotās sugas atšķaidīšanas ūdenī var dzīvot, augt un vairoties (piemēram, laboratorijas kultūras vai dzīvnieciskuma testā). Atšķaidīšanas ūdens jāraksturo vismaz ar pH, cietību, kopējo cieto vielu saturu, kopējo organisko oglekli (TOC ⁽¹⁾) un, vēlams, arī ar amoniju, nitrātiem un sārmainību un — jūras dzīvniekiem — sāļumu. Parametri, kas ir svarīgi optimāliem zivju eksistences apstākļiem, nav pilnībā zināmi, bet 2. papildinājumā ir sniegtas ieteicamās maksimālās koncentrācijas attiecībā uz vairākiem testos lietojamā saldūdens un jūras ūdens parametriem.

Testa laikā jābūt nemainīgai atšķaidīšanas ūdens kvalitātei. Testa sākumā pH vērtībai jābūt no 6,0 līdz 8,5, bet viena testa laikā $\pm 0,5$ pH vienību robežās. Lai nodrošinātu, ka atšķaidīšanas ūdens neiziet testējamā rezultātā (piemēram, veidojot kompleksus ar testējamo vielu) vai negatīvi neietekmē zivju krājuma rādītājus, laiku pa laikam, vismaz testa sākumā un testa beigās, jāņem paraugi analīzei. Ja ir zināms, ka atšķaidīšanas ūdens kvalitāte ir relatīvi nemainīga, smago metālu (piemēram, Cu, Pb, Zn, Hg, Cd un Ni), galveno anjonu un katjonu (piemēram, Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , K^+ , Cl^- un SO_4^{2-}), pesticīdu (piemēram, kopējo fosfororganisko pesticīdu un kopējo hlororganisko pesticīdu), kopējā organiskā oglekļa un suspendēto cieto vielu noteikšana jāveic, piemēram, reizi trijos mēnešos. Ja ir pierādīts, ka vismaz viena gada laikā atšķaidīšanas ūdens kvalitāte nemainās, noteikšanu var veikt retāk un intervāli var būt garāki (piemēram, reizi sešos mēnešos).

Atšķaidīšanas ūdens dabīgajam daļiņu saturam un kopējam organiskajam ogleklim jābūt iespējami zēmam, lai nepieļautu, ka testējamās vielas adsorbēšanās uz organiska materiāla samazina vielas biopieejamību, kā dēļ BCF tiktu novērtēts par zemu. Maksimāli pieļaujamā vērtība attiecībā uz suspendētām vielām (sausnu, kas neiziet caur 0,45 μm filtru) ir 5 mg/l, bet attiecībā uz kopējo organisko oglekli — 2 mg/l (sal. ar 2. papildinājumu). Ja vajag, atšķaidīšanas ūdens pirms lietošanas jāfiltrē. Organiskā oglekļa saturam, kas testa ūdenī nonācis no testa zivīm (ekskrēta) un barības pārpalikumiem, ūdenī jābūt iespējami mazam (sal. ar 46. punktu).

Testējamie šķīdumi

Sagatavo testējamās vielas izejšķīdumu ar attiecīgu koncentrāciju. Izejšķīdumu vislabāk pagatavot, testējamo vielu vienkārši iemaisot vai kratot atšķaidīšanas ūdenī. Dažos gadījumos piemērota alternatīva ir cietās fāzes desorbcijas dozēšanas sistēmas izmantošana. Šķīdinātājus un izkliedētājus (šķīdināšanas līdzekļus) izmantot parasti nav ieteicams (sal. (25)), taču šos materiālus izmantot var būt pieņemami, lai iegūtu vajadzīgās koncentrācijas izejšķīdumu, taču jāpieliek visas pūles, lai šādus materiālus izmantotu minimāli un (attiecīgā gadījumā) nepārsniegtu kritisko koncentrāciju, pie kuras veidojas micellas. Var izmantot tādus šķīdumus kā acetons, etanols, metanols, dimetilformamīds un trietilēnglikols; izmantotie izkliedētāji ir Tween 80, metilceluloze 0,01 % un HCO-40. Šķīdinātāja koncentrācijai galīgajā testa vidē visās apstrādēs jābūt vienādai (t. i., neatkarīgi no testējamās vielas koncentrācijas) un tā nedrīkst pārsniegt attiecīgās toksicitātes sliekšņvērtības, kas šķīdinātājam noteiktas testa apstākļos. Maksimālais koncentrācijas līmenis ir 100 mg/l (vai 0,1 ml/l). Maz ticams, ka šķīdinātāja koncentrācija 100 mg/l būtiski mainīs maksimālo izšķīdināto testējamās vielas koncentrāciju, ko vidē iespējams panākt (25). Būtu jāzina, cik daudz no kopējā organiskā oglekļa satura testa ūdenī ir no šķīdinātāja (kopā ar testējamo vielu). Visa testa laikā kopējā organiskā oglekļa koncentrācija testa traukā nedrīkst pārsniegt par vairāk nekā 10 mg/l (± 20 %) pārsniegt to organiskā oglekļa koncentrāciju, kas rodas no testējamās vielas un šķīdinātāja vai šķīdināšanas līdzekļa ⁽²⁾, ja tādu

⁽¹⁾ TOC sastāv no daļiņu organiskā oglekļa un no izšķīdināta organiskā oglekļa, t. i. $\text{TOC} = \text{POC} + \text{DOC}$.

⁽²⁾ Šādi rīkoties parasti nav ieteicams, tomēr, ja izmanto šķīdinātāju vai šķīdināšanas līdzekli, organiskā oglekļa koncentrāciju testa traukos vērtē, testējamās vielas organiskajam ogleklim pieskaitot šā līdzekļa organisko oglekli.

izmanto. Ar zivīm veiktos caurplūdes testos organisko vielu saturs var būtiski ietekmēt brīvi izšķīdušās testējamās vielas daudzumu, jo īpaši ļoti lipofilām vielām. Svarīgu informāciju par attiecību starp sasaistītiem un brīvi izšķīdušiem savienojumiem, no kuriem pēdējo uzskata par biopieejamās frakcijas rādītāju, var sniegt cietās fāzes mikroekstrakcija (sal. ar 60. punktu). Testējamās vielas koncentrācijai jābūt zemākai par testējamās vielas šķīdības robežu, kāda tā testa vidē ir pat ar šķīdinātāja vai šķīdināšanas līdzekļa izmantošanu. Tūlītēji bionoārdāmi šķīdinātāji jālieto piesardzīgi, jo caurplūdes testos tie var radīt ar baktēriju augšanu saistītas problēmas. Ja, nelietojot šķīdināšanas līdzekli, izejšķīdumu sagatavot nav iespējams, jāapsver, vai nav lietderīgi izmantot nevis pētījumu par barībaspozīciju, bet gan ūdensekspozīcijas pētījumu.

Lai testēšanas kamerām piegādātu testējamās koncentrācijas, caurplūdes testiem ir vajadzīga sistēma, kas nepārtraukti padod un atšķaida testējamās vielas izejšķīdumu (piemēram, dozējošs sūknis, proporcionāls atšķaidītājs, piesātinātāja sistēma), vai cietās fāzes desorbcijas dozēšanas sistēma. Vēlams paredzēt, ka katrā testēšanas kamerā tilpums nomainās vismaz piecas reizes dienā. Priekšroka tiek dota caurplūdes režīmam, bet, ja tas nav iespējams (piemēram, ja tas negatīvi ietekmē testa organismus), izpildot derīguma kritērijus, var izmantot pusstatistisku paņēmieni (sal. ar 24. punktu). Izejšķīdumu un atšķaidīšanas ūdens caurplūdums jākontrolē 48 stundas pirms testa sākšanas un pēc tam testa laikā vismaz katru dienu. Šajā kontrolpārbaudē katrā testēšanas kamerā nosaka caurplūdumu un raugās, lai nevienā kamerā tas nemainītos vairāk par 20 % un arī starp kamerām neatšķirtos par lielāku vērtību.

Sugu izraudzīšanās

Izraugoties sugas, svarīgi kritēriji ir, lai tās būtu viegli pieejamas, lai varētu iegūt piemērota lieluma to īpatņus un tos apmierinoši turēt laboratorijā. Pie citiem kritērijiem, pēc kuriem izraugās zivju sugas, pieder to rekreatīvā, komerciālā, un ekoloģiskā nozīme, kā arī salīdzināmā jutība, agrākas izmantošanas sekmīgums utt. Testiem ieteicamās sugas ir norādītas 3. papildinājumā. Var izmantot citas sugas, bet tām var būt nepieciešams pielāgot testa procedūru, lai būtu nodrošināti piemēroti testēšanas apstākļi. Tādā gadījumā sugas izraudzīšanās pamatojums un eksperimenta metode jānorāda pārskatā. Vispār, izmantojot sugas ar mazāka izmēra zivīm, samazināsies stacionārās fāzes sasniegšanai vajadzīgais laiks, bet var būt vajadzīgs vairāk zivju (paraugu), lai varētu pietiekami analizēt lipīdsaturu un testējamās vielas koncentrāciju zivju organismā. Turklāt iespējams, ka rezultātu salīdzināšanu starp dažādiem testiem un testa sugām apgrūtinā jaunu un vecāku zivju atšķirības attiecībā uz skābekļa uzņemšanas rādītāju un metabolismu. Jāņem vērā, ka datu interpretēšana var sarežģīties ar zivju sugām, ko testē (agrīnā) attīstības stadijā, kad notiek strauja augšana.

Zivju turēšana (attiecas uz ūdensekspozīciju un barībaspozīciju)

Zivju pamatpopulācija vismaz divas nedēļas jāaklimatizē testa temperatūras ūdenī (sal. ar 28. punktu) un visu laiku jānodrošina ar pietiekamu uzturu (sal. ar 45. punktu). Gan ūdenim, gan uzturam jābūt tādām pašām kā tam, ko izmantos testa laikā.

Pēc 48 stundu sākumposma reģistrē mirstību un piemēro šādus kritērijus:

- ja mirstība septiņās dienās pārsniedz 10 % no populācijas, visu partiju izbrāķē;
- ja mirstība septiņās dienās ir 5–10 % no populācijas, aklimatizāciju veic septiņas papildu dienas, un, ja nākamajās septiņās dienās mirstība pārsniedz 5 %, visu partiju izbrāķē;
- ja mirstība septiņās dienās nesasniedz 5 % no populācijas, partija ir pieņemama.

Testiem izmantojamām zivīm nedrīkst būt redzamu slimību vai anormālijas pazīmju. Neizmanto nevienu slimu zivi. Zivis nevajadzētu ārstēt no slimībām divu nedēļu laikā pirms testa vai testa laikā.

TESTA VEIKŠANA

Priekštestēšana

Lai testēšanas apstākļus optimizētu galīgajam testam, piemēram, izraudzītos testējamās vielas koncentrāciju(-as), noteiktu uzņemšanas fāzes un izvadīšanas fāzes ilgumu vai noskaidrotu, vai nepieciešams veikt pilnu testu, var noderēt priekšeksperimenti. Priekštestēšanas plānam jābūt tādām, lai būtu iespējams iegūt nepieciešamo informāciju. Var apsvērt, vai BCF atvasināšanai nepietiks ar minimizētu testu vai tomēr ir jāveic pilns pētījums (par minimizēto testu sal. ar 83.–95. punktu).

Ekspozīcijas apstākļi*Uzņemšanas fāzes ilgums*

Uzņemšanas fāzes ilgumu var prognozēt, balstoties uz praktisko pieredzi (piemēram, iepriekšēju pētījumu vai strukturāli radniecīgas vielas akumulācijas pētījuma) vai noteiktām empīriskām sakarībām, kur izmantotas zināšanas vai nu par testējamās vielas šķīdību ūdenī, vai par tās oktanola/ūdens sadalījuma koeficientu (ja uzņemšanas fāze atbilst pirmās pakāpes kinētikai, sal. ar 5. papildinājumu).

Uzņemšanas fāzei jāilgst 28 dienas, ja vien nav iespējams pierādīt, ka stacionārā fāze ir sasniegta agrāk (sk. 1. papildinājumu "Definīcijas un mērvienības"). Grafiskajā attēlojumā ar testējamo vielu zivs organismā stacionārā fāze (C_f) attiecībā pret laiku ir sasniegta tad, kad līkne kļūst paralēla laika asij un trim pēc kārtas veiktām C_f analīzēm ar paraugiem, kas ņemti ar vismaz divu dienu starplaikiem, savstarpējā sakritība ir $\pm 20\%$ robežās, un laikā starp pirmo un pēdējo secīgo analīzi nav novērojams būtisks C_f pieaugums. Analizējot apvienotus paraugus, ir vajadzīgas vismaz četras secīgas analīzes. Testējamām vielām, ko organisms uzņem lēni, piemērotāki intervāli ir septiņas dienas. Ja stacionārā fāze 28 dienu laikā nav sasniegta, BCF aprēķina, izmantojot vienīgi kinētisko pieeju, kas nepaļaujas uz stacionārās fāzes sasniegšanu, vai uzņemšanas fāzi var pagarināt, līdz tiek sasniegta stacionārā fāze vai līdz 60 dienām, atkarībā no tā, kas iestājas drīzāk. Vēl uzņemšanas fāzes beigās ar testējamās vielas koncentrāciju zivs organismā jāpietiek, lai varētu izdarīt ticamu aplēsi par k_2 no izvadīšanas fāzes. Ja pēc 28 dienām nav novērojama būtiska uzņemšana, testu var apturēt.

Izvadīšanas fāzes ilgums

Vielām, attiecībā uz kurām novērojama pirmās pakāpes kinētika, parasti pietiek ar pusi no uzņemšanas fāzes ilguma, lai iegūtu attiecīgu organismā esošās vielas samazinājumu (piemēram, 95 %) (sal. ar 5. papildinājumu par aplēses izskaidrojumu). Ja laiks 95 % sasniegšanai ir nerealizējami ilgs, piemēram, ja tas divreiz pārsniedz parasto uzņemšanas fāzes ilgumu (t. i., vairāk nekā 56 dienas), var izmantot īsāku laiku (piemēram, līdz brīdim, kad testējamās vielas koncentrācija ir mazāka par 10 % no stacionārās fāzes koncentrācijas). Tomēr vielām, kam ir sarežģītāki uzņemšanas un izvadīšanas modeļi nekā viena zivju nodalījuma modeļi, kurā vērojama pirmās pakāpes kinētika, var būt nepieciešamas garākas izvadīšanas fāzes. Ja tiek novēroti un/vai paredzēti tādi sarežģīti modeļi, ir ieteicams lūgt padomu biostatistikas un/vai farmakokinētikas speciālistam, lai nodrošinātu pienācīgu testa struktūru. Ja izvadīšanas periodu paildzina, paraugojamo zivju skaits var kļūt ierobežojošs un rezultātus var ietekmēt zivju augšanas atšķirības. Šis periods būs arī atkarīgs no perioda, kura laikā testējamās vielas koncentrācija zivju organismā saglabājas virs kvantitatīvās noteikšanas analītiskās robežas.

Testa zivju skaits

Zivju skaitu uz katru testējamo koncentrāciju izraugās tādu, lai katrā paraugošanas punktā būtu pieejamas vismaz četras zivis. Zivis jāapvieno tikai tad, ja vienu zivi analizēt praktiski nav iespējams. Ja tiek plānots izveidot precīzāku līkni (un atvasinātos parametrus) vai ja prasīts pētīt metabolizēšanos (piemēram, lai, izmantojot radioaktīvi iezīmētas testējamās vielas, atšķirtu metabolītus un pamatvielu), uz vienu paraugošanas punktu vajadzēs vairāk zivju. Lipīdsaturs jānosaka tam pašam bioloģiskajam materiālam, ko izmanto testējamās vielas koncentrācijas noteikšanai. Ja tas nav iespējams, var būt vajadzīgas papildu zivis (sal. ar 56. un 57. punktu).

Ja izmanto pieaugušas (t. i., dzimumnobriedušas) zivis, tās pirms testa vai tā laikā nedrīkst būt nārstošanas stadijā vai nesen laidušas ikrus (t. i., jau nārstojušas). Jānorāda, vai eksperimentā izmantotas vīrišķā, sievišķā vai abu dzimumu zivis. Ja izmanto abus dzimumus, augšanas un lipīda satura atšķirībām starp dzimumiem pirms ekspozīcijas sākuma jābūt dokumentētām kā nebūtiskām, jo īpaši, ja tiek paredzēts, ka vīrišķā un sievišķā dzimuma zivis būs jāapvieno, lai nodrošinātu detektējamas vielas koncentrācijas un/vai lipīdsaturu.

Ikvienā atsevišķā testā izraugās zivis ar līdzīgu svaru tā, lai mazākā nebūtu vieglāka par divām trešdaļām no lielākās svāra. Visām jābūt vienas vecuma grupas un iegūtām no viena avota. Tā kā zivju svārs un vecums var būtiski ietekmēt BCF vērtības (12), šī informācija precīzi jāreģistrē. Ieteicams neilgi pirms testa sākuma nosvērt zivju parauga apakšparaugu, lai noteiktu vidējo svaru (sal. ar 61. punktu).

Noslogojums

Lai līdz minimumam samazinātu testējamā savienojuma koncentrācijas samazināšanos ūdenī, ko rada zivju ievietošana testa sākumā, un arī lai nesamazinātos izšķīdušā skābekļa koncentrācija, izmanto augstu ūdens/zivju attiecību. Svarīgi, lai noslogojums būtu testā izmantotajām zivju sugām piemērots. Katrā ziņā parastais ieteicamais zivju/ūdens noslogojums ir 0,1-1,0 g zivs (slapjšvars) uz litru ūdens dienā. Augstākus zivju/ūdens noslogojumus var izmantot tad, ja ir pierādīts, ka testējamās vielas koncentrāciju var uzturēt ± 20 % robežās un ka izšķīdušā skābekļa koncentrācija nesamazinās zem 60 % piesātinājuma (sal. ar 24. punktu).

Izraugoties piemērotu noslogojuma režīmu, jāņem vērā zivju sugu ierastā dabiskā vide. Piemēram, zivīm, kuras dzīvo ūdens tilpnes dibenā, uz to pašu ūdens tilpumu var vajadzēt lielāku akvārija dibena laukumu nekā tuvu ūdens virsmai dzīvojošām zivju sugām.

Barošana

Aklimatizācijas un testa laikā zivis baro ar attiecīgu barību, kurai ir zināms lipīdu un kopējo olbaltumvielu saturs, pietiekamā daudzumā, lai tās uzturētu veselas un saglabātu ķermeņa svaru (ir pieļaujama neliela augšana). Aklimatizācijas un testa laikā zivis baro noteiktā līmenī atkarībā no izmantotās sugas, eksperimenta apstākļiem un barības enerģētiskās vērtības (piemēram, varavīksnes forelei — katru dienu aptuveni 1–2 % no ķermeņa svāra). Barošanas intensitāti izraugās tādu, lai nenotiktu ātra augšana un liels lipīdsatura pieaugums. Lai barošanas intensitāti saglabātu nemainīgu, barības daudzumu attiecīgi pārrēķina, piemēram, reizi nedēļā. Šim aprēķinam zivju svaru katrā testa kamerā var novērtēt pēc zivs, kas šajā kamerā visnesenāk paņemta paraugam. Kamerā palikušās zivis nesver.

Neapēsto barību un izkārnījumus katru dienu īsi pēc barošanas (no 30 minūtēm līdz vienai stundai) no testa kamerām jāatsūc ar sifonu. Testa laikā kameras jātur iespējami tīras, lai organiskā materiāla koncentrācija būtu iespējami zemāka (sal. ar 29. punktu), jo organiskā oglekļa klātbūtne var ierobežot testējamās vielas biopieejamību (12).

Tā kā daudzu veidu zivju barība tiek iegūti no zivju miltiem, jābūt drošībai, ka šī barība neietekmēs testa rezultātus vai neradīs nelabvēlīgu ietekmi, piemēram, ja tā satur pesticīdus (to elementus), smagos metālus un/vai pašu testējamo vielu.

Gaisma un temperatūra

Ieteicams 12–16 stundu fotoperiods, un temperatūra ($\pm 2^{\circ}\text{C}$) jāpielāgo testa sugai (sal. ar 3. papildinājumu). Jābūt zināmam apgaismojuma veidam un tā īpatnībām. Jāuzmanās, lai pētījuma starojuma apstākļos nebūtu varbūtīgas testējamās vielas fotopārvērtības. Jāizmanto piemērots apgaismojums, lai zivis netiktu eksponētas nedabīgu fotoproduktu iedarbībai. Dažos gadījumos var būt lietderīgi izmantot filtru, kas ekranētu UV starojumu ar viļņa garumu zem 290 nm.

Testējamās koncentrācijas

Sākotnēji šis tests bija paredzēts nepolārām organiskām vielām. Paredzams, ka attiecībā uz šāda veida vielu pietiks, ka zivi eksponēs vienai koncentrācijai, jo nekāda koncentrācijas ietekme nav sagaidāma, kaut arī saskaņā ar attiecīgo tiesisko regulējumu var būt nepieciešamas divas koncentrācijas. Ja testē cita veida vielas vai ir zināmi citi rādītāji par iespējamu atkarību no koncentrācijas, tests jāveic ar vēl divām vai vairākām koncentrācijām. Ja testē tikai vienu koncentrāciju, vienas koncentrācijas izmantošana jāpamato (sal. ar 79. punktu). Testējamai koncentrācijai jābūt tik zelai, cik praktiski vai tehniski iespējams (t. i., nedrīkst būt tuvu šķīdības robežai).

Dažos gadījumos (piemēram, attiecībā uz metāliem, kuru uzņemšanu zivju organismā var vismaz daļēji regulēt) ir sagaidāms, ka vielas biokoncentrēšanās ir atkarīga no tās koncentrācijas ūdenī. Tādos gadījumos jātestē vismaz divas, bet vēlams vairākas vides apstākļiem nozīmīgas koncentrācijas (sal. ar 49. punktu). Arī vielām, kuru testētajām koncentrācijām praktisku iemeslu dēļ jābūt tuvu šķīdības robežai, ieteicams testēt vismaz divas koncentrācijas, jo tas var sniegt ieskatu ekspozīcijas koncentrāciju ticamībā. Izraugoties testējamās koncentrācijas, jāiekļauj vidē sastopama koncentrācija, kā arī konkrētā novērtējuma mērķim atbilstoša koncentrācija.

Testējamās vielas koncentrācija(-s) jāizraugās zemāka(-s) par tās hroniskās ietekmes līmeni vai 1 % no tās akūtā asimptotiskā LC_{50} , videi atbilstošā diapazonā un vismaz ar tādu lieluma kārtu, kas ar izmantoto analītisko metodi pārsniedz tās kvantitatīvās noteikšanas robežu ūdenī. Augstāko pieļaujamo testējamo koncentrāciju arī iespējams noteikt, akūto 96 h LC_{50} dalot ar attiecīgo akūto/hronisko koeficientu (piemēram, dažām vielām piemērots koeficients ir apmēram trīs, bet nedaudzi pārsniedz 100). Ja izmanto otru koncentrāciju, tai desmitkārtīgi jāatšķiras no iepriekš norādītās. Ja toksiskuma kritērija dēļ (kas ierobežo augstāko testējamo koncentrāciju) un analītiskās robežas dēļ (kas ierobežo zemāko testējamo koncentrāciju) tas nav iespējams, var izmantot koeficientu, kas ir mazāks par desmit, un jāapsver, vai neizmantojot radioaktīvi iezīmētu testējamo vielu (ar visaugstāko tīrības pakāpi, piemēram, vēlams > 98 %). Jāgādā, lai neviena izmantotā koncentrācija nepārsniedz robežu, kas raksturo testējamās vielas šķīdību testa vidē.

Kontroles

Papildus testa sērijām jāizmanto viena atšķaidīšanas ūdens kontrole (sal. ar 30. un 31. punktu) vai attiecīgā gadījumā viena kontrole ar šķīdinātāju.

Ūdens kvalitātes mērījumu biežums

Testa laikā visos testa un kontroles traukos jāmēra izšķīdušais skābeklis, TOC, pH un temperatūra. Kontroles(-)u traukā un vēl vienā traukā jāmēra kopējā cietība un sāļums (attiecīgā gadījumā). Ja testē divas vai vairāk koncentrācijas, šos parametrus mēra pie augstākās (vai visaugstākās) koncentrācijas. Izšķīdušais skābeklis un sāļums (attiecīgā gadījumā) jāmēra vismaz trīs reizes — uzņemšanas perioda sākumā, apmēram vidū un uzņemšanas perioda beigās — un reizi nedēļā izvadīšanas perioda laikā. TOC jāmēra testa sākumā (24 un 48 stundas pirms uzņemšanas fāzes sākšanas) pirms zivju ielaišanas un vismaz reizi nedēļā uzņemšanas un izvadīšanas fāzes laikā. Temperatūra jāmēra un jāreģistrē katru dienu, pH — katra posma sākumā un beigās, un cietība — vienreiz katrā testā. Temperatūru vismaz vienā traukā vēlams pārraudzīt visu laiku.

Zivju un ūdens paraugu ņemšana un analīze

Zivju un ūdens paraugu ņemšanas grafiks

Ūdeni no testa kamerām testējamās vielas koncentrācijas noteikšanai ņem pirms zivju ielaišanas un gan uzņemšanas, gan arī izvadīšanas fāzes laikā. Ūdeni paraugu ņem pirms barošanas, vienlaikus ar zivju paraugu ņemšanu. Biežāk paraugot var būt lietderīgi, lai būtu drošība, ka pēc zivju ievietošanas koncentrācijas ir stabilas. Uzņemšanas fāzē nosaka testējamās vielas koncentrāciju, lai pārbaudītu atbilstību derīguma kritērijiem (24. punkts). Ja izvadīšanas fāzes sākuma ūdens paraugu analīzes liecina, ka testējamā viela nav detektēta, ar to var pamatot, ka izvadīšanas fāzes atlikušajā laikā testa un kontroles ūdeni attiecībā uz testējamo vielu nemēra.

Zivis vismaz piecas reizes paraugu ņem testējamās vielas uzņemšanas fāzes laikā un vismaz četras reizes izvadīšanas fāzes laikā. Tā kā dažos gadījumos ir grūti, pamatojoties uz šo paraugu skaitu, ar pieņemamu precizitāti izrēķināt aptuveno BCF vērtību, (jo īpaši, ja ir liecības, ka uzņemšanas un izvadīšanas kinētika nav vienkārša pirmās pakāpes kinētika), var būt ieteicams paraugus abās fāzēs ņemt biežāk (sal. ar 4. papildinājumu).

Vismaz uzņemšanas fāzes sākumā un beigās un izvadīšanas fāzes beigās tam pašam bioloģiskajam materiālam, ko izmanto testējamās vielas koncentrācijas noteikšanai, jānosaka lipīdsaturs. Ja tas nav iespējams, jāparaugu vismaz trīs neatkarīgas zivis, lai tajos pašos trīs laikpunktos noteiktu lipīdsaturu. Eksperimenta sākumā attiecīgi jāpielāgo zivju skaits katrā tvertnē⁽¹⁾. Ja kontroles zivs organismā (t. i., pamatgrupas zivī) netiek detektēts būtisks daudzums testējamās vielas, testā izmantoto kontroles zivi var analizēt vienīgi attiecībā uz lipīdsaturu un testējamās vielas analīzi testgrupā(-s) (un attiecīgo uzņemšanas ātruma konstanti, izvadīšanas ātruma konstanti un BCF vērtības) var koriģēt, lai būtu ņemtas vērā testa laikā notikušas pārmaiņas kontrolgrupas lipīdsaturā⁽²⁾.

Attiecībā uz testējamo vielu vai lipīdu koncentrāciju nedrīkst analizēt mirušas vai slimas zivis.

Pieņemama paraugu ņemšanas grafika piemērs ir sniegts 4. papildinājumā. Citus grafikus iespējams viegli aprēķināt, izmantojot citas pieņemtās vērtības K_{OW} , lai aprēķinātu eksponēcijas laiku uzņemšanai 95 % (aprēķinus sk. 5. papildinājumā).

Paraugu ņemšana uzņemšanas fāzē jāturpina tik ilgi, līdz sasniegta stacionāra fāze (sk. 1. papildinājumu "Definīcijas un mērvienības"), pretējā gadījumā uzņemšanas fāzi izbeidz (pēc 28 vai 60 dienām, sal. ar 37. un 38. punktu). Pirms izvadīšanas fāzes sākšanas zivis jāpārvielo uz tīriem traukiem.

Paraugu ņemšana un paraugu sagatavošana

Ūdens paraugus analīzei iegūst, piemēram, sifonējot caur inerta materiāla cauruli no testa kameras viduspunkta. Liekas, ka nedz ar filtrāciju, nedz ar centrifugēšanu testējamai vielai no bioloģiski pieejamās frakcijas ne vienmēr var separēt bioloģiski nepieejamo frakciju. Ņemot vērā grūtības ar bioloģisko pieejamību, ja izmanto separācijas paņēmieni, tas testēšanas pārskatā vienmēr jāpamato vai jāvalidē (25). Paraugus tā nevajadzētu apstrādāt jo īpaši attiecībā uz stipri hidroforām vielām (t. i., vielām ar $\log K_{OW} > 5$) (12) (26), kas var adsorbēties filtra matricā vai centrifugēšanas tvertnēs. Tā vietā tvertnes jācenšas saglabāt iespējami tīras (sal. ar 46. punktu) un gan uzņemšanas, gan izvadīšanas fāzē jāmonitorē kopējā organiskā oglekļa saturs (sal. ar 53. punktu). Lai izvairītos no iespējamām samazinātās biopieejamības problēmām, slikti šķīstošām un stipri hidroforām vielām var izmantot paraugu ņemšanu ar cietās fāzes mikroekstrakcijas paņēmieniem.

⁽¹⁾ Ja lipīdsaturu neanalizē tai pašai zivij, kurai analizēja testējamo vielu, zivij jābūt vismaz ar tādu pašu svaru un (attiecīgā gadījumā) tāda paša dzimuma.

⁽²⁾ Šī alternatīva der tikai tad, ja zivis visās testgrupās tur tāda paša lieluma grupās, izņem saskaņā ar tādu pašu sistēmu un baro tādā pašā veidā. Tas visās testgrupās nodrošina līdzīgu zivju augšanu, ja testētā koncentrācija ir zemāka par toksisko diapazonu. Ja augšana ir līdzīga, paredzams, ka līdzīgs būs arī lipīdsaturs. Atšķirīga augšana kontrolē liecinātu par vielas ietekmi un pētījumu darītu nederīgu.

Paraugotās zivis nekavējoties eitanazē, izmantojot vispiemērotāko un humānāko metodi (veselas zivs mērīšanai nedara neko citu kā tikai zivi skalo ar ūdeni (sal. ar 28. punktu) un nosusina). Nosver un izmēra kopējo garumu⁽¹⁾. Katras atsevišķās zivs izmērīto svaru un garumu saista ar analizēto vielas koncentrāciju (un attiecīgā gadījumā lipīdsaturu), piemēram, katrai paraugotajai zivij izmantojot unikālu identifikācijas kodu.

Zivis un ūdeni visvēlamāk analizēt tūlīt pēc paraugošanas, lai, kamēr tests turpinās, nepieļautu sadalīšanos un citus zudumus un izrēķinātu aptuvenās uzņemšanas un izvadīšanas ātruma konstantes. Tūlītēja analīze arī palīdz nenokavēt, nosakot laiku, kad ir sasniegts līknes plato (stacionārā fāze).

Ja analīzi neizdara tūlīt, paraugi jāglabā saskaņā ar piemērotu metodi. Pirms pētījuma sākuma jāiegūst informācija par konkrētajai testējamai vielai atbilstošu glabāšanas metodi, piemēram, sasaldēšana, glabāšana 4°C temperatūrā, ekstrakcija utt. Glabāšanas ilgums jāizraugās tāds, lai būtu drošība, ka viela glabāšanas laikā nenoārdās.

Analītiskās metodes kvalitāte

Tā kā visu procedūru pēc būtības nosaka testējamajai vielai izmantojamās analītiskās metodes pareizība, precizitāte un jutība, eksperimentāli jāpārbauda, vai ar konkrēto metodi apmierinoša ir vielas analīzes pareizība, precizitāte un reproducējamība, kā arī testējamās vielas atgūstamība gan no ūdens, gan no zivīm. Tai jābūt daļai no priekštestēšanas. Pārbauda arī, vai testējamā viela nav detektējama atšķaidīšanas ūdenī. Ja nepieciešams, testā iegūtās testējamās vielas koncentrācijas vērtības ūdenī un zivju organismā koriģē attiecībā uz atgūstamību un kontroļu fona vērtībām. Zivju un ūdens paraugi visu laiku jāapstrādā tā, lai līdz minimumam samazinātu piesārņojumu un zudumus (piemēram, tos, kas rodas no adsorbcijas uz paraugošanas ierīces).

Zivju paraugu analīze

Ja testā izmanto radioaktīvi iezīmētus materiālus, iespējams analītiski noteikt kopējo radioaktīvo iezīmi (t. i., izejas savienojumam kopā ar metabolītiem) vai arī paraugi ir tā jātīra, lai pamatvielu varētu analizēt atsevišķi. Ja BCF paredzēts balstīt uz pamatvielu, vismaz uzņemšanas fāzes beigās jāraksturo galvenie metabolīti (sal. ar 6. punktu). Galvenie metabolīti ir tie, kas veido ≥ 10 % no kopējā vielu atlikuma zivju audos, tie, kas divos secīgos paraugošanas punktos veido ≥ 5 %, tie, kam visā uzņemšanas fāzes laikā vērojami pieaugoši līmeņi, un tie, par kuru toksiskumu ir zināmas bažas. Ja BCF veselai zivij kopējo radioaktīvi iezīmēto atlikumu ziņā ir ≥ 500 , var būt ieteicams, un atsevišķām vielu kategorijām, piemēram, pesticīdiem, ir stingri ieteicams, identificēt un kvantitatīvi noteikt galvenos metabolītus. Tādu metabolītu kvantitatīvu noteikšanu var pieprasīt dažas regulatīvās iestādes. Ja noārdīšanās produkti, kas veido ≥ 10 % no kopējā radioaktīvi iezīmētā vielu atlikuma zivju audos, ir identificēti un kvantitatīvi noteikti, ir arī ieteicams identificēt un kvantitatīvi noteikt noārdīšanās produktus testa ūdenī. Ja tas nav iespējams, tas jāizskaidro testēšanas pārskatā.

Testējamās vielas koncentrācija parasti jānosaka katrai nosvērtai atsevišķai zivij. Ja tas nav iespējams, katrā paraugošanas reizē paraugus var apvienot, bet apvienošana neierobežo statistiskās procedūras, kuras var piemērot datiem, lai testā iekļautu tādu skaitu zivju, ar ko pietiktu, lai būtu iespējama vēlamā apvienošana, statistiskā procedūra un jauda. Par ievadu attiecīgajām apvienošanas procedūrām var izmantot atsauces (27) un (28).

⁽¹⁾ Papildus svaram jānorāda kopējais garums, jo garuma pieauguma salīdzinājums testa laikā ir labs rādītājs tam, vai ir radusies pretēja ietekme.

BCF jāizsaka kā normalizēts zivij ar lipīdsaturu 5 % (uz slapjsvara bāzes) papildus tam, kas iegūts tieši no pētījuma (sal. ar 21. punktu), ja vien nevar argumentēt, ka lipīdi nav primārā testējamās vielas uzkrāšanās vieta. Lipīdsaturs zivī jānosaka, ja iespējams, katrā paraugošanas reizē, vēlams, tam pašam ekstraktam, kas tika sagatavots testējamās vielas analizēšanai, jo bieži vien pirms ekstrakta hromatogrāfiskas analizēšanas lipīdi no tā jāizņem. Tomēr testējamo vielu analizēšanai bieži ir vajadzīgas specifiskas ekstrakcijas procedūras, kas var būt pretrunā ar lipīdu noteikšanas testēšanas metodēm. Tādā gadījumā (līdz būs pieejamas piemērotas nedestruktīvas instrumentālās metodes) lipīdsatura noteikšanai zivīs ieteicams izmantot citādāku stratēģiju (sal. ar 56. punktu). Lipīdsatura noteikšanai jāizmanto piemērotas metodes (20). Kā standartmetodi (3) var ieteikt hloroforma/metanola ekstrakcijas paņēmieni (29), bet kā alternatīvu paņēmieni — *Smedes* metodi (31). Pēdējai minētajai metodei ir raksturīga salīdzināma ekstrakcijas efektivitāte, augsta precizitāte, ne tik toksisku organisko šķīdinātāju izmantošana un viegla izpilde. Var izmantot citas metodes, kuru precizitāte sekmīgi salīdzināma ar ieteicamām metodēm, ja tās tiek pienācīgi pamatotas. Ir svarīgi norādīt detalizētu informāciju par izmantoto metodi.

Zivs augšanas mērījums

Testa sākumā atsevišķi jānosver piecas līdz desmit pamatgrupas zivis un jāizmēra to kopējais garums. Var izmantot tās pašas zivis, kuras izmanto lipīdu analīzei (sal. ar 56. punktu). Pirms ķīmiskās analīzes vai lipīdu analīzes jānosaka katrā paraugošanas reizē gan no testgrupām, gan kontrolgrupām izmantoto zivju svars un garums. Šo paraugoto zivju mērījumus var izmantot, lai skaitliski novērtētu testvertnēs un kontrolvertnēs palikušo zivju svaru un garumu (sal. ar 45. punktu).

DATI UN PĀRSKATA SNIEGŠANA

Rezultātu apstrāde

Testējamās vielas uzņemšanas līkni iegūst, uzņemšanas fāzē aritmētiskā skalā pret laiku atliekot vielas koncentrāciju zivju organismā/uz zivīm (vai konkrētos audos). Ja līkne ir sasniegusi plato, tas ir, līkne ir apmēram asimptotiska laika asij, stacionāra stāvokļa BCF (BCF_{ss}) aprēķina šādi:

$$\frac{C_f \text{stacionārais} - \text{tālvoklis(vidējais)}}{C_w \text{stacionārais} - \text{stālvoklis(vidējais)}}$$

C_f dinamiku var ietekmēt zivs augšana (sal. ar 72. un 73. punktu). Variācija laika gaitā ietekmē vidējo eksponēcijas koncentrāciju (C_w). Paredzams, ka bioakumulācijas pētījumiem būtiskāka un precīzāka ir laikā svērtā vidējā koncentrācija, pat ja variācija ir attiecīgajā derīguma diapazonā (sal. ar 24. punktu). Laika svērto vidējo (TWA) ūdens koncentrāciju var aprēķināt saskaņā ar 5. papildinājuma 1. iedaļu.

Kinētiskais biokoncentrēšanās koeficients (BCF_k) jānosaka kā attiecība k_1/k_2 , divu pirmo pakāpju kinētikas ātruma konstantes. Ātruma konstantes k_1 un k_2 un BCF_k iespējams iegūt, vienlaicīgi pielāgojot gan uzņemšanas, gan izvadīšanas fāzi. Alternatīvā gadījumā k_1 un k_2 iespējams noteikt secīgi (šo metožu aprakstu un salīdzinājumu sk. 5. papildinājumā). Izvadīšanas ātruma konstanti (k_2) var būt nepieciešams koriģēt attiecībā uz augšanas izraisītu atšķaidījumu (sal. ar 72. un 73. punktu). Ja uzņemšanas un izvadīšanas līkne acīmredzami nav pirmās pakāpes līkne, jāizmanto sarežģītāki modeļi (sk. izmantoto literatūru 5. papildinājumā) un jālūdz biostatistikas un/vai farmakokinētikas speciālista padoms.

Zivs svara/garuma dati

Atsevišķu zivju slapjsvaru un kopējo garumu visiem paraugošanas intervāliem norāda tabulas veidā atsevišķi testgrupām un kontrolgrupām uzņemšanas (arī pamatgrupai uzņemšanas sākumā) un izvadīšanas fāžu laikā. Katras atsevišķās zivs izmērīto svaru un garumu saista ar analizēto ķīmikālijas koncentrāciju, piemēram, katrai paraugotajai zivij izmantojot unikālu identifikācijas kodu. Vēlamais augšanas mērījums, uz ko attiecībā uz augšanas izraisītu atšķaidījumu koriģēt kinētiskā BCF vērtību, ir svars (metodi, kas izmantota, lai koriģētu augšanas izraisīta atšķaidījuma datus, sk. 73. punktā un 5. papildinājumā).

Augšanas izraisīta atšķaidījuma korigēšana un lipīdu normalizācija

Zivju augšana izvadīšanas fāzē var samazināt mērāmās ķīmikālijas koncentrācijas zivs organismā, kā dēļ vispārējā izvadīšanas ātruma konstante (k_2) ir augstāka, nekā tā būtu vien izvadprocesi (piemēram, elpošana, metabolisms, defekācija) rezultātā. Kinētiskie biokoncentrēšanās koeficienti jākorrigē, ierēķinot augšanas izraisīto atšķaidījumu. Augšana ietekmēs arī BCF_{ss} , bet saskaņota procedūra, kā korigēt augšanas BCF_{ss} , nav pieejama. Ja notiek vēra ņemama augšana, jāiegūst arī atbilstoši augšanai korigēts BCF_K (BCF_{K_g}), jo attiecībā uz biokoncentrēšanās koeficientu tas var būt nozīmīgāks mērījums. Lipīdsaturs (ko bieži vien saista ar hidroforu vielu bioakumulēšanos) testa zivju organismā praksē var pietiekami variēt, lai varētu iegūtu jēgpilnus kinētiskos un stacionārā stāvokļa biokoncentrēšanās koeficientus, ja vien nevar argumentēt, ka testējamās vielas akumulēšanās lipīdos nav primāri nozīmīga (piemēram, dažas perfluorētas vielas var saistīties ar olbaltumvielām), jāizdara normalizācija līdz noteiktam lipīdsaturam zivs organismā (5 % masas). Šo aprēķinu vienādojumi un piemēri atrodami 5. papildinājumā.

Lai kinētisko BCF korigētu, ierēķinot augšanas izraisīto atšķaidījumu, izvadīšanas ātruma konstante jākorrigē atbilstoši augšanai. Šo ar augšanu korigēto izvadīšanas ātruma konstanti (k_{2g}) aprēķina, no vispārējās izvadīšanas ātruma konstantes (k_2) atņemot augšanas ātruma konstanti (k_g , kas iegūta no mērītā svara datiem). Pēc tam ar augšanu korigēto kinētisko biokoncentrēšanās koeficientu aprēķina, uzņemšanas ātruma konstanti (k_1) dalot ar pēc augšanas korigētu izvadīšanas ātruma konstanti (k_{2g}) (sal. ar 5. papildinājumu). Dažos gadījumos šī pieeja tiek negatīvi ietekmēta. Piemēram, attiecībā uz vielām, kuras tiek izvadītas ļoti lēni un kuras testē ātri augošās zivīs, iegūtais k_{2g} var būt ļoti neliels, līdz ar to kļūda abās ātruma konstantēs, ko izmanto tās iegūšanai, kļūst izšķiroši svarīga, un dažos gadījumos skaitliski novērtētais k_g var pārsniegt k_2 . Alternatīvā pieejā, kas apiet nepieciešamību veikt korekciju, ierēķinot augšanas izraisīto atšķaidījumu, izmanto izvadīšanas datus par testējamās vielas masu uz vienu zivi (par bāzi izmantojot veselu zivi), nevis ierastos datus par testējamās vielas masu uz zivs vienības masu (koncentrācija). To var viegli izdarīt, jo saskaņā ar šo TM testos reģistrētā koncentrācija audos jāsaista ar atsevišķu zivju masu. Vienkāršā procedūra šim uzdevumam ir aprakstīta 5. papildinājumā. Jāņem vērā, ka pat ja izmanto šo alternatīvo pieeju, pārskatā jāprojām jānorāda k_2 .

Pārskatā jānorāda arī kinētiskie un līdzsvara biokoncentrēšanās koeficienti attiecībā pret zivju organisma lipīdu noklusējumsaturu 5 % (masas), ja vien nav iespējams pierādīt, ka lipīdi nav primārā testējamās vielas uzkrāšanās vieta. Dati par koncentrāciju zivīs jeb BCF ir normalizēti saskaņā ar attiecību starp 5 % un faktisko (individuālo) vidējo lipīdsaturu (norāda slapjsvara procentos) (sal. ar 5. papildinājumu).

Ja ķīmikālijas un lipīdu analīzes ir veiktas vienai un tai pašai zivij, ar lipīdiem normalizētais BCF jāaprēķina, izmantojot normalizētos datus par atsevišķas zivs lipīdsaturu. Alternatīvā gadījumā, ja kontroles zivīm un eksponētajām zivīm augšana bijusi vienāda, lipīdkorigēšanai var izmantot tikai kontroles zivju lipīdsaturu (sal. ar 56. punktu). Pēc lipīdiem normalizēta BCF aprēķināšanas metode ir aprakstīta 5. papildinājumā.

Rezultātu interpretācija

Ja izmērītās testējamo šķīdumu koncentrācijas atrodas tuvu analītiskās metodes noteikšanas robežai, rezultāti jāinterpretē piesardzīgi.

Izslēgtu toksisku ietekmi, vidējā augšana testgrupās un kontrolgrupās būtībā nedrīkst būtiski atšķirties. Attiecīgā procedūrā jāsalīdzina abu grupu augšanas ātruma konstantes jeb augšanas līknes ⁽¹⁾).

⁽¹⁾ Augšanas ātruma konstantēm var veikt *t*-testu, lai pārbaudītu, vai kontrolgrupās un testgrupās augšana atšķiras, vai dispersijas analīzes gadījumā var veikt *F*-testu. Ja nepieciešams, attiecīgu augšanas modeli var izraudzīties ar *F*-testu vai patīcamības attiecības testa palīdzību (OECD monograph 54, (32)).

Skaidras uzņemšanas un izvadīšanas līknes liecina par kvalitatīviem biokonzentrēšanās datiem. Attiecībā uz ātruma konstantēm jābūt vērojamai labai χ^2 piemērotības testa atbilstībai (t. i., lai ātruma konstantes varētu uzskatīt par uzticamām (sal. ar 5. papildinājumu) attiecībā uz bioakumulācijas modeli procentuālajai mērījumu kļūdai jābūt nelielai (32)). Ja izmanto vairāk nekā vienu testa koncentrāciju, uzņemšanas/izvadīšanas konstanšu mainībai starp testa koncentrācijām jābūt mazākai nekā 20 % (¹). Ja tā nenotiek, tas var liecināt par koncentrācijas atkarību. Jebkādas novērotas nozīmīgas uzņemšanas/izvadīšanas ātruma konstanšu atšķirības starp divām pielietotām testa koncentrācijām jānorāda un iespējami jāizskaidro pārskatā. Sekmīgi plānotu pētījumu BCF 95 % ticamības līmenis parasti ir tuvu ± 20 % no iegūtā BCF.

Ja testē divas koncentrācijas vai vairāk, abu vai visu koncentrāciju rezultātus izmanto, lai izvērtētu, vai rezultāti ir konsekventi, un lai parādītu, vai pastāv atkarība no koncentrācijas. Ja testē tikai vienu koncentrāciju ar mērķi samazināt izmantoto dzīvnieku skaitu un/vai resursus, vienas koncentrācijas izmantošana jāpamato.

Ja BCF_K nozīmīgi pārsniedz BCF_{SS} , iegūtais BCF_{SS} ir apšaubāms, jo var liecināt, ka nav sasniegta stacionārā fāze vai nav ierēķināti augšanas izraisītais atšķaidījums un noārdīšanās procesi. Gadījumos, kad BCF_{SS} stipri pārsniedz BCF_K , iegūtās uzņemšanas un izvadīšanas ātruma konstantes jāpārbauda attiecībā uz kļūdām un jāizvērtē atkārtoti. Citādāka pielāgošanas procedūra var uzlabot BCF_K aplēses (sal. ar 5. papildinājumu).

Testēšanas pārskats

Papildus 3. punktā norādītajai informācijai par testējamo vielu testēšanas pārskatā iekļauj šādu informāciju:

Testējamā viela:

fizikālās un attiecīgā gadījumā fizikālķīmiskās īpašības;

- ķīmiskās identifikācijas dati, piemēram, IUPAC vai CAS nosaukums, CAS numurs, SMILES vai InChI kods, struktūrformula, tīrība, attiecīgā gadījumā, ja tas ir praktiski iespējams, piemaisījumu ķīmiskā identitāte u. c. (tostarp attiecīgā gadījumā organiskā oglekļa saturs);
- daudzkomponentu vielu un UVCB (vielas, kuru sastāvs nav zināms vai ir mainīgs, kuras ir kompleksi reakcijas produkti vai bioloģiski materiāli) atsevišķo komponentu ķīmiskās identitātes apraksts, ciktāl tas iespējams, un katra komponenta procentuālais īpatsvar kopējā vielas masā. Jāsniedz kopsavilkums par to, kā testā izmantotā analīzes metode atspoguļo vielas koncentrācijas mēru; jāapraksta visas analītiskās procedūras, arī metodes pareizība, metodes noteikšanas robeža un kvantitatīvās noteikšanas robeža;
- radioaktīvi iezīmētām vielām iezīmētā(-o) atoma(-u) precīzs stāvoklis un ar piemaisījumiem saistītās radioaktivitātes īpatsvars;
- informācija par testējamās vielas toksiskumu zivīm (ideālā gadījumā — testa sugai). Toksiskums jānorāda kā akūts 96-h LC_{50} un NOAEC & LOAEC no hroniskā toksiskuma pētījuma (t. i., agrīnās attīstības stadijas tests vai pilna dzīvescikla tests, ja tāds pieejams);
- testējamās ķīmikālijas vai testējamās vielas glabāšanas apstākļi un testējamās ķīmikālijas vai testējamās vielas stabilitāte glabāšanas apstākļos, ja tās pirms lietošanas uzglabā.

Testa sugas:

zinātniskais nosaukums, celms, avots, priekšapstrāde (ja tāda veikta), aklimatizācija, vecums, dzimums (attiecīgā gadījumā), izmēru diapazons (svars un garums) utt.

(¹) Attiecībā uz šiem procentiem tiek pieņemts, ka analītiskās metodes ir ticamas un pussabrukšanas periods ilgst < 14 dienas. Ja analītiskās metodes nav tik ticamas vai pussabrukšanas periodu (stipri) palielina, šie skaitļi palielināsies.

Testēšanas nosacījumi:

- izmantotā testēšanas procedūra (piemēram, caurplūdes vai pusstatiska); regulārs pētījums vai minimizēts plāns (tostarp iemesls un pamatojums);
- izmantotā apgaismojuma veids un raksturlielumi, kā arī periods(-i);
- testēšanas plāns (piemēram, testa kameru skaits un lielums, ūdens tilpuma nomaiņas ātrums, noslogojums, replikātu skaits, zivju skaits uz replikātu, testējamo koncentrāciju skaits, uzņemšanas un izvadīšanas fāžu ilgums, paraugošanas biežums zivju un ūdens paraugiem);
- izejšķidumu sagatavošanas metode un atjaunošanas biežums (attiecīgā gadījumā jānorāda šķīdinātājs, tā koncentrācija un radītais organiskā oglekļa daudzums testa ūdenī) vai alternatīvas dozēšanas sistēmas apraksts;
- nominālā testējamā koncentrācija, izmērīto vērtību vidējie lielumi un to standartnovirzes testa traukos, un metode un biežums, ar kādu tie iegūti;
- atšķaidīšanas ūdens avots, priekšapstrādes apraksts (ja tāda veikta), rezultāti jebkādiem pierādījumiem par testa zivs spēju dzīvot šajā ūdenī, un ūdens īpašības: pH, cietība, temperatūra, izšķīdinātā skābekļa koncentrācija, atlikušā hlora līmenis (ja mērīts), kopējais organiskais ogleklis, suspendētās daļiņas, testa vides sāļums (attiecīgā gadījumā) un citi izdarītie mērījumi;
- ūdens kvalitāte testa traukos, pH, cietība, TOC, temperatūra un izšķīdušā skābekļa koncentrācija, izmantotās metodes un mērījumu biežums;
- detalizēta informācija par barošanu, piemēram, barības veids(-i), avots, sastāvs (ja iespējams, vismaz lipīdsaturs un olbaltumvielsaturs), izraudzītā barošanas intensitāte, izēdinātais daudzums un barošanas biežums;
- informācija par zivju un ūdens paraugu apstrādi, arī detalizēta informācija par testējamās vielas un lipīdsatura sagatavošanu, glabāšanu, ekstrakciju un ar to veiktajām analītiskajām procedūrām (un precizitāti);
- apstrādes randomizēšanai un zivju sadalīšanai pa testa traukiem izmantotās metodes;
- datums, kad testa organismi ievietoti testa šķīdumos, un testa ilgums;
- diapazona noteikšanas testa apraksts un rezultāti, ja tādi ir.

Rezultāti:

- jebkāda priekšpētījuma rezultāti;
- kontrolgrupas zivju mirstība un zivju mirstība katrā ekspozīcijas kamerā, un jebkura novērota anormāla uzvedība;
- informācija par jebkuru citu novērotu iedarbību;
- visu iesaistīto ķīmiskās analīzes procedūru pilnīgs apraksts, tostarp detektēšanas un kvantitatīvās noteikšanas robežas, mainība un atlabšana;
- zivju organisma lipīdsaturs, tostarp izmantotā metode, un, ja tas iegūts, lipīdiskais normalizācijas koeficients (L_n , koeficients, ar kura palīdzību rezultātus izteikt attiecībā pret zivju lipīdsaturu 5 %);
- tabulā sakārtoti dati par zivju svaru (un garumu), kas piesaistīti ķīmiskajām koncentrācijām (un attiecīgā gadījumā ar lipīdsaturu) individuālo zivju organismā gan kontrolgrupās, gan eksponētajās grupās (piemēram, katrai paraugotajai zivij izmantojot unikālus identifikatorus), un aprēķini par iegūto(-ām) augšanas ātruma konstanti(-ēm);
- tabulā sakārtoti dati par testējamās vielas koncentrāciju zivju organismā (C_p , kas piesaistīts individuālām zivīm) un ūdenī (C_w) (vidējās vērtības testgrupai un kontrolgrupai, standartnovirze un attiecīgā gadījumā diapazons) visiem paraugošanas laikiem (C_p , kas izteikts mg uz kg visa ķermeņa slapjsvara vai konkrētu tā audu, piemēram, lipīdu svara, un C_w mg/l); kontrolesērijas C_w vērtības (pārskatā jānorāda arī fona lielumi);

- līknes (tostarp visi mērītie dati), kas atspoguļo turpmāk norādīto (attiecīgā gadījumā koncentrācijas var izteikt attiecībā pret visu ķermeni un attiecībā pret lipīdsaturu, kas dzīvnieka organismam vai specifiskiem tā audiem normalizēts līdz 5 %);
- augšana, t. i., zivs svārs pret laiku vai naturāllogaritmā transformētais svārs pret laiku (tostarp atvasinātā augšanas ātruma konstante k_g);
- testējamās vielas uzņemšana zivs organismā un izvadīšana no tā (vienā grafikā);
- stacionārās fāzes panākšanai nepieciešamais laiks (ja to panāk);
- naturāllogaritmā transformēta koncentrācija pret uzņemšanas laiku (arī atvasinātā uzņemšanas ātruma konstante k_1);
- naturāllogaritmā transformēta koncentrācija (koncentrācija $\ln$) pret izvadīšanas laiku (arī atvasinātā izvadīšanas ātruma konstante k_1);
- uzņemšanas un izvadīšanas fāzes līknes, kas atspoguļo gan datus, gan pielāgoto modeli;
- ja grafiskā attēlojuma vizuālajā pārbaudē ir acīmredzamas izlecošās vērtības, maldīgus datu punktus likvidēt, kā arī to trūkumu dokumentēti pamatot var ar statistiski derīgu izlecošo vērtību testu;
- līdzsvara biokoncentrēšanās koeficients (BCF_{ss}), ja stacionārā fāze (gandrīz) sasniegta;
- kinētiskais biokoncentrēšanās koeficients (BCF_k) un atvasinātās uzņemšanas un izvadīšanas fāzes konstantes k_1 un k_2 , un, ja izmanto secīgo pielāgošanu, kopā ar k_2 dispersijām (līknes stāvums un vienādojuma brīvais loceklis);
- ticamības robežas, standartnovirzes (ja pieejamas) un katrai testējamās vielas koncentrācijai katra izmantotā parametra aprēķināšanas/datu analīzes metodes:
 - jebkāda informācija par radioaktīvi iezīmētas testējamās vielas metabolītiem un to uzkrāšanos;
 - augšanas ātruma konstante(-s) (arī 95 % ticamības intervāls(-i)) un aprēķinātā ar augšanu koriģētā izvadīšanas ātruma konstante (k_{2g}), pussabrukšanas perioda un BCF (BCF_{kg}) vērtības;
 - viss neierastais attiecībā uz testu, visas novirzes no šīm procedūrām un jebkāda cita būtiska informācija;
 - tālāk sniegtā kopsavilkuma tabula ar būtiskajiem izmērītajiem un aprēķinātajiem datiem.

Vielas uzņemšanas un izvadīšanas ātruma konstantes un biokoncentrēšanās koeficienti (BCF)	
k_g (augšanas ātruma konstante; diena ⁻¹):	Ievietot vērtību (95 % TI) ⁽¹⁾
k_1 (vispārējā uzņemšanas ātruma konstante; l kg ⁻¹ diena ⁻¹):	Ievietot vērtību (95 % TI) ⁽¹⁾
k_2 (vispārējā izvadīšanas ātruma konstante; diena ⁻¹):	Ievietot vērtību (95 % TI) ⁽¹⁾
k_2 (ar augšanu koriģēta izvadīšanas ātruma konstante; diena ⁻¹):	Ievietot vērtību (95 % TI) ⁽¹⁾
C_f (ķīmikālijas koncentrācija zivju organismā stacionārajā fāzē; mg kg ⁻¹):	Ievietot vērtību $\pm$ SN ⁽²⁾
C_w (ķīmikālijas koncentrācija ūdenī; mg l ⁻¹):	Ievietot vērtību $\pm$ SN ⁽²⁾
L_n (lipīdu normalizācijas koeficients):	Ievietot vērtību ⁽³⁾

Vielas uzņemšanas un izvadīšanas ātruma konstantes un biokoncentrēšanās koeficienti (BCF)	
BCF_{ss} (līdzsvara BCF; $l\ kg^{-1}$)	Ievietot vērtību $\pm SN$ ⁽²⁾
BCF_{SSL} (ar lipīdiem normalizēts līdzsvara BCF; $l\ kg^{-1}$):	Ievietot vērtību ⁽³⁾ $\pm SD$ ⁽²⁾
BCF_k (kinētiskais BCF; $l\ kg^{-1}$)	Ievietot vērtību (95 % TI) ⁽¹⁾
BCF_k (ar augšanu koriģēts kinētiskais BCF; $l\ kg^{-1}$)	Ievietot vērtību (95 % TI) ⁽¹⁾
$t_{1/2g}$ (ar augšanu koriģēts pussabrukšanas periods; diena):	Ievietot vērtību (95 % TI) ⁽¹⁾
BCF_{KL} (ar lipīdiem normalizēts kinētiskais BCF; $l\ kg^{-1}$):	Ievietot vērtību
BCF_{KLG} (ar lipīdiem normalizēts un ar augšanu koriģēts kinētiskais BCF; $l\ kg^{-1}$):	Ievietot vērtību
⁽¹⁾ TI: ticamības intervāls (ja iespējams skaitliski novērtēt) ⁽²⁾ SN: standartnovirze (ja iespējams skaitliski novērtēt)	

Jāizvairās no rezultātiem, kas priekštestēšanas metodes izstrādē un eksperimenta plānā norādīti kā “nenoteikti vai kvantitatīvi noteikti uz detekcijas vai kvantitatīvās noteikšanas robežas”, jo tādus ātruma konstantes aprēķiniem izmantot nav iespējams.

C.13. – II: Minimizēts zivju ūdensekspozīcijas tests

IEVADS

Arvien lielākā pieredze, ko laboratorijas un regulatīvās iestādes guvušas ar pilnā testa veikšanu un interpretēšanu, liecina, ka, izņemot dažus gadījumus, uzņemšanas un izvadīšanas ātruma konstantes aplēšanā ir izmantojama pirmās pakāpes kinētika. Tādējādi uzņemšanas un izvadīšanas ātruma konstantes iespējams aplēst ar minimālu paraugšanas punktu skaitu, rezultātā atvasinot kinētisko BCF.

Alternatīvu BCF pētījumu plānu izvērtēšanas sākotnējais mērķis bija izstrādāt nelielu testu, ko izmantot starpposma testēšanā, lai atspēkotu vai apstiprinātu BCF aplēses, pamatojoties uz K_{ow} un QSAR, attiecībā uz daudzām vielām likvidētu nepieciešamību veikt pilnu pētījumu un līdz minimumam samazinātu izmaksas un dzīvnieku izmantošanu, izmantojot mazāk paraugšanu un analītisko sekvenču skaitu. Ievērojot iepriekšējās testēšanas metodes pamatstruktūru, lai testa rezultātus būtu iespējams integrēt ar esošajiem BCF datiem un testēt, kā arī interpretēt datus būtu vieglāk, mērķis bija iegūt pietiekami pareizas un precīzas BCF aplēses attiecībā uz riska novērtējumu lēmumu pieņemšanu. Daudzi no šajā testā izmantotajiem apsvērumiem, piemēram, derīguma kritēriji (sal. ar 24. punktu) un testa apturēšana, ja uzņemšanas fāzes beigās tiek novērota niecīga uzņemšana (sal. ar 16. un 38. punktu), ir tie paši kā pilnajā testā.

Vielām, kurām var atļaut izmantot minimizēto testa plānu, jāpieder pie vispārīgās grupas, kam šī testēšanas metode izstrādāta, t. i., nepolārām organiskajām vielām (sal. ar 49. punktu). Ja ir liecības par to, ka testējamā viela var izturēties citādi (piemēram, acīmredzama novirze no pirmās pakāpes kinētikas), normatīviem nolūkiem jāveic pilns tests.

Minimizētā testa periods parasti nav īsāks par BCF standarttestu, taču tajā zivju paraugošana paredzēta mazākā apjomā (pamatojumu sk. 6. papildinājumā). Tomēr strauji izvadītām vielām izvadīšanas periodu var saīsināt, lai nepieļautu, ka koncentrācijas zivju organismā jau pirms testa beigām samazinās zem noteikšanas/kvantitatīvās noteikšanas robežas. Zivju ekspozīcijas minimizētu testu ar vienu koncentrāciju var izmantot, lai noskaidrotu, vai jāveic pilns tests, un, ja iegūtie dati, no kuriem aprēķina ātruma konstantes un BCF, ir robusti (sal. ar 93. punktu) un rezultātā iegūtais BCF ir tālu no attiecīgajām normatīvajām vērtībām, pilnu testu var neveikt.

Dažos gadījumos var būt lietderīgi minimizētā testa plānu īstenot ar vairāk nekā vienu testējamo koncentrāciju kā priekštestēšanu, lai noteiktu, vai BCF aplēses vielai ir atkarīgas no koncentrācijas. Ja minimizētajā testā iegūtās BCF aplēses liecina par atkarību no koncentrācijas, būs jāveic pilns tests. Ja, pamatojoties uz tādu minimizēto testu, BCF aplēses nav atkarīgas no koncentrācijas, bet rezultāti netiek uzskatīti par galīgiem, jebkādu secīgu pilnu testu var izdarīt ar vienu koncentrāciju, tādējādi salīdzinājumā ar pilnu testu, ko izdara ar divām (vai vairāk) koncentrācijām, samazinot izmantoto dzīvnieku skaitu.

Vielām, uz kurām var atļaut attiecināt minimizēto testu, jābūt šādām īpašībām:

- jābūt varbūtīgi, ka tām būs aptuvena pirmās pakāpes uzņemšanas un izvadīšanas kinētika, piemēram, spriežot pēc analogijas ar līdzīgām vielām;
- $\log K_{ow} < 6$, ja vien nav paredzēts strauja metabolizēšanās⁽¹⁾;
- attiecībā uz analītisko paņēmieni pietiekamai šķīdībai ūdenī (sal. ar 24. punktu);
- gan zivs organismā, gan ūdenī jābūt viennozīmīgi kvantitatīvi nosakāmai (t. i., koncentrācijām jābūt vismaz par vienu lieluma kārtu virs kvantitatīvās noteikšanas robežas), ieteicama radioaktīva iezīmēšana (sal. ar 23. punktu); un
- izvadīšanas periodam jāpārsniedz prognozētais pussabrukšanas periods (sal. ar 5. papildinājumu par aprēķiniem) vai attiecīgi jāpielāgo izvadīšanas fāzes ilgums (sal. ar 91. punktu). Šim noteikumam ir pieļaujams izņēmums, ja paredzams, ka viela ātri metabolizēsies.

PARAUGOŠANAS GRAFIKS PĒTĪJUMIEM SASKAŅĀ AR MINIMIZĒTU PLĀNU

Zivju paraugošana

Zivju paraugošanu samazina līdz četriem paraugošanas punktiem:

- uzņemšanas fāzes vidū un beigās (pēdējais ir arī izvadīšanas fāzes sākums), piemēram, pēc 14 un 28 dienām (33);
- izvadīšanas fāzes vidū un pētījuma beigu brīdī (kad vielas koncentrācija ir < 10 % no maksimālās koncentrācijas vai vismaz noteikti beidzies viens vielas pussabrukšanas periods), piemēram, pēc 7 un 14 izvadīšanas dienām (33); ja sagaidāma vai novērojama strauja izvadīšana, izvadīšanas periods var būt jāsaīsina, lai nepieļautu, ka koncentrācijas zivs organismā pazeminās zem kvantitatīvās noteikšanas robežas;
- lipīdu mērīšana kā pilnā pētījumā;
- koriģēšana ar augšanu kā pilnā pētījumā;
- BCF aprēķina kā kinētisko BCF.

Ūdens paraugošana

Saskaņā ar minimizēto plānu ūdeni paraugo tāpat kā pilnā pētījumā (sal. ar 54. punktu) vai vismaz uzņemšanas fāzē piecas vienmērīgi sadalītas reizes un izvadīšanas fāzē ik nedēļu.

⁽¹⁾ Minimizēto testu patiesībā var izmantot, lai pierādītu strauju metabolizēšanos, kad ir zināms, ka ir iespējama strauja metabolizēšanās.

Plāna grozījumi

Nemot vērā testējamās vielas īpašības, derīgas QSAR prognozes un pētījuma specifisko mērķi, var apsvērt, vai pētījuma plānā neieviest dažus grozījumus.

- Ja nepieciešama lielāka precizitāte, paraugošanas nolūkam uzņemšanas fāzes beigās izmanto vairāk zivju (6 vai 8, nevis 4).
- Ja pēc 14 dienām (vai prognozētajām izvadīšanas perioda beigām) izvadīšana nav notikusi pietiekami (t. i. > 50 %), izmanto "papildu" zivju grupu. Ja prognozētā izvadīšanas fāze ir īsāka vai garāka par 14 dienām, paraugošanas grafiku pielāgo (t. i., viena zivju grupa prognozētajās izvadīšanas fāzes beigās, otra — kad pagājusi puse no minētā laika).
- Lai izpētītu iespējamu atkarību no koncentrācijas, izmanto divas testējamās koncentrācijas. Ja ar divām koncentrācijām izdarīta minimizētā testa rezultāti liecina, ka BCF no koncentrācijas nav atkarīgs (t. i., atšķirība ir mazāka par 20 %), var uzskatīt, ka pilnā testā (ja tādu veic) pietiek ar vienu testējamo koncentrāciju.
- Lai būtu vieglāk plānot uzņemšanas un izvadīšanas fāžu ilguma plānošanu, var izmantot bioakumulācijas procesu modeļus, piemēram, *Arnot et al.* (35) ierosinātos (sk. arī 5. papildinājumu).

Aprēķini

Šīs pieejas pamatojums ir tāds, ka biokoncentrēšanās koeficientu pilnā testā var noteikt vai nu kā stacionārās fāzes biokoncentrēšanās koeficientu (BCF_{ss}), aprēķinot testējamās vielas koncentrācijas zivs audos attiecību pret testējamās vielas koncentrāciju ūdenī, vai kā kinētisko biokoncentrēšanās koeficientu (BCF_k), aprēķinot uzņemšanas ātruma konstantes k_1 attiecību pret izvadīšanas ātruma konstanti k_2 . Ja vien uzņemšana un izvadīšana notiek apmēram saskaņā ar pirmās pakāpes kinētiskajiem procesiem, BCF_k ir derīgs pat tad, ja uzņemšanas laikā vielas stacionārās fāzes koncentrācija nav panākta. Lai aplēstu uzņemšanas un izvadīšanas ātruma konstantes, kā absolūts minimums ir nepieciešami divi datu punkti — viens uzņemšanas fāzes beigās (t. i., izvadīšanas fāzes sākumā) un otrs — izvadīšanas fāzes beigās (vai pēc tās būtiskas daļas). Lai pārbaudītu uzņemšanas un izvadīšanas kinētiku ⁽¹⁾, ieteicams starpposma paraugošanas punkts. Aprēķinus sk. 5. un 6. papildinājumā.

Rezultātu interpretācija

Lai novērtētu testa derīgumu un tā informatīvo vērtību, jāpārlicinās, ka izvadīšanas periods pārsniedz vienu pussabrukšanas periodu. Turklāt BCF_{km} (minimizētā testā atvasināts kinētiskais BCF) jāsalīdzina ar samazināto BCF_{ss} vērtību (BCF_{ss} , kas uzņemšanas fāzes beigās aprēķināts ar pieņēmumu, ka ir sasniegta stacionārā fāze. To var tikai pieņemt, jo ar paraugošanas punktu skaitu nepietiek, lai to pierādītu). Ja $BCF_{km} < \text{samazinātais } BCF_{ss}$, priekšroka jādod samazinātā BCF_{ss} vērtībai. Ja BCF_{km} ir mazāks par 70 % no samazinātā BCF_{ss} , rezultāti nav derīgi, un jāveic pilns tests.

Ja minimizētajā testā iegūtā BCF_{km} ir tādas vērtības robežās, kas no regulatīvā viedokļa ir interesējoša, jāveic pilns tests. Ja rezultāti ir tālu no regulatīvi interesējošas vērtības (pārāk lieli vai pārāk mazi), pilnu testu var neveikt, vai var veikt pilnu testu ar vienu koncentrāciju, ja to pieprasa attiecīgais tiesiskais regulējums.

Ja tiek konstatēts, ka pēc minimizētā testa ar vienu koncentrāciju jāveic pilns tests, to var veikt ar otru koncentrāciju. Ja rezultāti ir konsekventi, pilnu testu ar vēl citu koncentrāciju var neveikt, jo tiek uzskatīts, ka vielas biokoncentrēšanās nebūs atkarīga no koncentrācijas. Ja minimizētie testi ir izdarīti ar divām koncentrācijām un rezultāti par atkarību no koncentrācijas neliecina, pilnu testu var izdarīt ar tikai vienu koncentrāciju (sal. ar 87. punktu).

⁽¹⁾ Ja mēra tikai divus datu punktus, var veikt BCF_{km} ticamības robežu aplēses, izmantojot paškorrelācijas metodes. Ja ir pieejami arī starpposma datu punkti, BCF_{km} ticamības robežas var aprēķināt tāpat, kā pilnā testā.

Testēšanas pārskats

Minimizētā testa pārskatā jānorāda visa attiecībā uz pilnu testu prasītā informācija (sal. ar 81. punktu), izņemot datus, ko nav iespējams precizēt (t. i., līkne, kas raksturo stacionārās fāzes sasniegšanai nepieciešamo laiku, un stacionārās fāzes biokoncentrēšanās koeficients; pēdējā vietā jānorāda samazināts BCF_{ss}). Turklāt minimizētā testa izmantošana un rezultātā iegūtais BCF_{Km} jāpamato.

C.13. – III: Zivju barībekspozīcijas bioakumulācijas tests

IEVADS

Šajā iedaļā aprakstītā metode jāizmanto vielām, kurām nav izmantojama ūdenssekspozīcijas metodoloģija (piemēram, tādēļ, ka nav iespējams uzturēt stabilas, mērāmas ūdens koncentrācijas, vai 60 ekspozīcijas dienu laikā nav iespējams panākt pietiekamu vielas uzņemšanu organismā; sk. iepriekšējās iedaļas par ūdenssekspozīcijas metodi). Tomēr ir jāsaprot, ka šā testa beigupunkts būs uzturiskais biomagnifikācijas koeficients (BMF), nevis biokoncentrēšanās koeficients (BCF) ⁽¹⁾.

SETAC Europe konferencē 2011. gada maijā Madridē tika prezentēta jauna metode ūdenī slikti šķīstošu organisko vielu bioakumulācijas testēšanai (36). Šis darbs bija balstīts uz dažādiem literatūrā aprakstītiem bioakumulācijas pētījumiem, kuros izmantota metode ar dozēšanu un papildinātu barību (piemēram, (37)). Eiropas Savienības PBT darba grupai 2004. gada sākumā kopā ar pamatojošu konteksta dokumentu (39) tika iesniegts projekts protokolam (38), kas bija izstrādāts, lai mēritu tādu ūdenī slikti šķīstošu organisko vielu bioakumulācijas potenciālu, attiecībā uz kurām nav iespējams izmantot standarta ūdenssekspozīcijas biokoncentrēšanās metodi. Vēl viens šai metodei norādītais pamatojums bija tāds, ka iespējamā videsekspozīcija šādām slikti šķīstošām vielām (t. i., ar $\log K_{ow} > 5$) galvenokārt var notikt ar barību (sal. ar (40) (41) (42) (43) (44)). Šā iemesla dēļ dažos publicētajos noteikumos par ķīmikālijām ⁽²⁾ ir norādīti barībekspozīcijas testi. Tomēr jāsaprot, ka šeit aprakstītajā metodē no ūdenssekspozīcijas rūpīgi izvairās, tāpēc ar šo testēšanas metodi iegūto BMF vērtību nav iespējams tieši salīdzināt ar lauka pētījumā iegūto BMF vērtību (kurā var kombinēties gan ūdenssekspozīcija, gan barībekspozīcija).

Šī pašreizējās testēšanas metodes iedaļa balstās uz minēto protokolu (38) un ir jauna metode, kas iepriekšējā TM C.13. versijā nebija norādīta. Šis alternatīvais tests dod iespēju kontrolētos laboratorijas apstākļos nepastarpināti izmeklēt barībekspozīcijas taku.

Ar to, kā izlemt, kad ūdenssekspozīcijas testa vietā vēlams izmantot barībekspozīcijas testu, potenciālajiem pētniekiem jāiepazīstas šīs testēšanas metodes 1.–14. punktā. Tur atrodama informācija par dažādiem ar vielu saistītiem apsvērumiem, un tā jāņem vērā pirms testa veikšanas.

To, vai neizmantot radioaktīvi iezīmētas testējamās vielas, var apsvērt, ņemot vērā līdzīgus ūdenssekspozīcijas metodē minētus apsvērumus (sal. ar 6. un 65. punktu).

Uzturmetodi var izmantot, lai vienā testā testētu vairāk nekā vienu vielu, ja vien tiek izpildīti konkrēti kritēriji; tie detalizētāk izklāstīti 112. punktā. Vienkāršības labad šajā metodoloģijā aprakstīts tests, kurā izmantota tikai viena testējamā viela.

Uzturtests daudzos aspektos ir līdzīgs ūdenssekspozīcijas metodei, acīmredzams izņēmums ir ekspozīcijas ceļš. Līdz ar to daudzi šeit aprakstītie metodes aspekti pārklājas ar iepriekšējā iedaļā aprakstīto ūdenssekspozīcijas metodi. Cik iespējams, ir sniegtas krusteniskas norādes uz attiecīgajiem iepriekšējās iedaļas punktiem, bet skaidrības un saprotamības labad ir bijusi jāpieļauj pārklāšanās.

⁽¹⁾ Definīcijas un mērvienības sk. 1. papildinājumā.

⁽²⁾ Regulas (EK) Nr. 1907/2006, kas attiecas uz ķīmikāliju reģistrēšanu, vērtēšanu, licencēšanu un ierobežošanu (REACH) (OV L 396, 30.12.2006., 1. lpp.), vajadzībām šis jautājums ir apskatīts dokumentā "Guidance on Information Requirements and Chemical Safety Assessment", nodaļas R.7c, R.7.10.3.1; R.7.10.4.1; un attēls R7.10-2.

TESTĒŠANAS PRINCIPS

Var izmantot caurplūdes vai pusstatiskus nosacījumus (sal. ar 4. punktu); caurplūdes nosacījumus ieteicams izmantot, lai ierobežotu tādu potenciālu eksponētību testējamajai vielai ūdenī, kas radusies, tai jebkādi desorbējoties no papildinātas barības vai izkārnījumiem. Testam ir divas fāzes: uzņemšana (barība ir papildināta ar testējamo vielu) un izvadīšana (tīra, neapstrādāta barība) (sal. ar 16. punktu). Uzņemšanas fāzē zivju "testa" grupu katru dienu baro ar noteiktu barību, kas ir ar testējamo vielu papildināta zināma sastāva komerciāla zivju barība. Ideālā gadījumā zivīm jāapēd visa dotā barība (sal. ar 141. punktu). Pēc tam izvadīšanas fāzes laikā zivis baro ar zivīm paredzētu tīru, neapstrādātu komerciālu barību. Līdzīgi kā ūdensekspozīcijas metodē, nepieciešamības gadījumā var izmantot vairāk nekā vienu testgrupu ar dažādām papildinātām testējamās vielas koncentrācijām, bet stipri hidrofofām organiskām testējamām vielām lielākoties pietiek ar vienu testgrupu (sal. ar 49. un 107. punktu). Ja tiek izmantot pusstatiski nosacījumi, zivis uzņemšanas fāzes beigās jāpārvieto uz jaunu vidi un/vai jaunu testa kameru (gadījumam, ja uzņemšanas fāzē izmantotā vide un/vai aprīkojums noplūdes rezultātā ir kontaminēti ar testējamo vielu). Abās testa fāzēs mēra testējamās vielas koncentrāciju zivju organismā. Papildus to zivju grupai, kuras baro ar papildināto barību (testgrupa), identiskos apstākļos tur zivju kontrolgrupu, ko baro identiski, vienīgi komerciālo zivju barību nepapildinot ar testējamo vielu. Šī kontrolgrupa dod iespēju kvantitatīvi noteikt testējamās vielas fona līmeņus neekspozētu zivju organismā, un to izmanto salīdzināšanai ar jebkādam testgrupā(-s) pamanītām ar apstrādi saistītām nelabvēlīgām ietekmēm⁽¹⁾. Tā arī dod iespēju salīdzināt abu grupu augšanas ātruma konstantes kā kontrolmekānismus tam, vai piedāvātā barība tiek patērēta vienādā daudzumā (skaidrojot atšķirīgas augšanas ātruma konstantes, jāņem vērā arī iespējamās barības garšas atšķirības; sal. ar 138. punktu). Gan uzņemšanas, gan izvadīšanas fāzē ir svarīgi testgrupām un kontrolgrupām dot enerģētiskās vērtības ziņā līdzvērtīgu barību.

Pamatojoties uz šīs metodes izstrādātāju pieredzi, parasti pietiek ar 7–14 dienas ilgu uzņemšanas fāzi (38) (39). Šādam diapazonam ar testa veikšanu saistītās izmaksas jāsamazina līdz minimumam, tomēr attiecībā uz lielāko daļu vielu nodrošinot pietiekamu ekspozīciju. Tomēr dažos gadījumos uzņemšanas fāzi var pagarināt (sal. ar 127. punktu). Uzņemšanas fāzes laikā vielas koncentrācija zivs organismā stacionāro fāzi var nesasniegt, tāpēc ar šo metodi iegūto datu apstrāde un rezultāti parasti balstās uz audos esošo atlieku kinētisko analīzi. (Piezīme: laiku līdz stacionārajai fāzei šajā metodē var aprēķināt ar tām pašām metodēm kā ūdensekspozīcijas testā; sk. 5. papildinājumu). Izvadīšanas fāze sākas tad, kad zivi pirmo reizi baro ar nepapildinātu barību, un parasti ilgst līdz pat 28 dienām vai līdz brīdim, kad testējamo vielu veselā zivī vairs nav iespējams kvantitatīvi noteikt, atkarībā no tā, kas ir drīzāk. Atkarībā no laika gaitā notikušajām izmaiņām mērītajās ķīmikālijas koncentrācijās un no zivs izmēra izvadīšanas fāze var būt īsāka vai garāka par 28 dienām.

Šī metode dod iespēju zivju organismā noteikt testējamās vielas īpatnējo pussabrukšanas periodu ($t_{1/2}$ no izvadīšanas ātruma konstantes k_z), asimilācijas efektivitāti (absorbējamā zarnās; a), kinētisko uzturisko biomagnifikācijas koeficientu (BMF_k), ar augšanu koriģētu kinētisko uzturisko biomagnifikācijas koeficientu (BMF_{kg}) un ar lipīdiem koriģētu⁽²⁾ kinētisko uzturisko biomagnifikācijas koeficientu (BMF_{kl}) (un/vai attiecībā uz augšanu un lipīdiem koriģētu kinētisko uzturisko biomagnifikācijas koeficientu BMF_{kgl}). Ūdensekspozīcijas metodē masas pieaugums testa laikā augošs zivs organismā izraisīs testējamās vielas atšķaidīšanos un tādējādi (kinētiskais) BMF tiks novērtēts pārāk zemu, ja to nekorrigēs ar augšanu (sal. ar 162. un 163. punktu). Turklāt, ja tiek lēsts, ka uzņemšanas fāzē sasniegta stacionārā fāze, var aprēķināt indikatīvu stacionārās fāzes BMF. Ir pieejas, ar kurām iespējams no barības pētījumā iegūtajiem datiem aplēst kinētisko biokoncentrēšanās koeficientu (BCF_k) (piemēram, (44) (45) (46) (47) (48)). Tādu pieeju priekšrocības un trūkumi ir iztirzāti 8. papildinājumā.

Šis tests galvenokārt izstrādāts slikti šķīstošām nopolārām organiskajām vielām, attiecībā uz kurām zivīm vērojama aptuveni pirmās pakāpes uzņemšanas un izvadīšanas kinētika. Ja tiek testēta viela, kas neatbilst aptuveni pirmās pakāpes uzņemšanas un izvadīšanas kinētikai, jāizmanto sarežģītāki modeļi (sk. izmantoto literatūru 5. papildinājumā) un jālūdz biostatistikas un/vai farmakokinētikas speciālista padoms.

⁽¹⁾ Vairumam testējamo vielu kontroles ūdenī ideālā gadījumā nevajadzētu būt detekcijām. Fona koncentrācijām jābūt saistošām vienīgi dabiskas izcelsmes materiālos (piemēram, dažos metālos) un vielās, kuras vidē ir plaši pieejamas.

⁽²⁾ BMF ir definēts kā vielas koncentrācijas koeficients organismā attiecībā pret organisma barību stacionārā fāzē, tāpēc, datus par organismu un barību koriģējot ar lipīdsaturu, ierēķina lipīdus, un tādējādi to sauc par "korekciju". Šī pieeja atšķiras no ūdensekspozīcijas biokoncentrēšanās testā veiktās "normalizācijas", kur izmanto noteiktu lipīdsaturu organismā.

BMF parasti nosaka, analizējot testējamo vielu veselā zivī (uz slapjsvara bāzes). Ja pētījuma mērķiem tas būtiski, zivi sadalot ēdamajā un neēdamajā daļā (sal. ar 21. punktu), var paraugot konkrētus audus (piemēram, muskuļus, aknas). Turklāt kuņģa un zarnu traktu var izņemt un analizēt atsevišķi, lai noteiktu tā devumu koncentrācijās, kas visā zivs organismā konstatētas paraugošanas punktos uzņemšanas fāzes beigās un tuvu izvadīšanas fāzes sākumam, vai arī lai to izmantotu masas bilances pieejā.

Paraugotas veselās zivs lipīdsaturs jāmēra tā, lai ar lipīdiem varētu koriģēt koncentrācijas, ņemot vērā gan barības, gan zivs lipīdsaturu (sal. ar 56. un 57. punktu un 7. papildinājumu).

Lai aprēķinātu testa laikā iespējamo augšanu, jāmēra un jāreģistrē individuālu paraugotu zivju svars, to sasaistot ar attiecīgajai zivij analizēto ķīmikālijas koncentrāciju (piemēram, jānorāda pārskatā, katrai paraugotajai zivij izmantojot unikālu identifikācijas kodu). Ja iespējams, jāmēra arī zivs kopējais garums⁽¹⁾. Dati par svaru ir arī vajadzīgi, lai aplēstu BCF, izmantojot uzturtestā iegūtos izvadīšanas datus.

INFORMĀCIJA PAR TESTĒJAMO VIELU

Jābūt pieejamai 3. un 22. punktā aprakstītajai informācijai par testējamo vielu. Ne vienmēr jānorāda analītiskā metode attiecībā uz testējamās vielas koncentrāciju ūdenī; lai mēritu koncentrācijas zivju un zivju audos, ir nepieciešamas metodes ar attiecīgu jutību.

Šo metodi var izmantot, lai vienā testā testētu vairāk nekā vienu vielu. Tomēr testējamām vielām jābūt savstarpēji saderīgām, lai, ar tām papildinot zivju barību, tās savstarpēji neiedarbotos vai lai nemainītos to ķīmiskā identitāte. Mērķis ir panākt, ka par katru kopā testēto vielu mērītie rezultāti būtiski neatšķiras no rezultātiem, kas tiktu iegūti, ja testi katrai testējamajai vielai tiktu veikti atsevišķi. Iepriekšējās analītiskās darbībās jākonstatē, ka katru vielu no vairākkārtēji papildinātās barības un no zivs audu parauga iespējams atgūt ar, pirmkārt, augstu atgūstamību (piemēram, ar > 85 % nominālu) un, otrkārt, testēšanai vajadzīgo jutību. Kopā testēto vielu kopējai devai jābūt zem kombinētās koncentrācijas, kas var izraisīt toksisku ietekmi (sal. ar 51. punktu). Turklāt eksperimenta plānā jāņem vērā ar vairāku vielu vienlaicīgu testēšanu saistīta iespējama nelabvēlīga ietekme uz zivīm un potenciāla mijiedarbīga ietekme (piemēram, metaboliska ietekme). Jāvairās vienlaicīgi testēt jonizējamās vielas. Runājot par ekspozīciju, šī metode ir arī piemērota sarežģītiem maisījumiem (sal. ar 13. punktu, kaut arī tiek izmantoti tādi paši analīzes ierobežojumi kā jebkurai citai metodei).

TESTA DERĪGUMS

Lai tests būtu derīgs, attiecina šādus nosacījumus (sal. ar 24. punktu):

- ūdens temperatūras atšķirība apstrādeggrupās vai kontrolgrupās nesasniedz $\pm 2^{\circ}\text{C}$;
- izšķīdušā skābekļa koncentrācija nav mazāka par 60 % no gaisa piesātinājuma vērtības;
- testējamās vielas koncentrācija zivju barībā pirms uzņemšanas fāzes un tās beigās ir ± 20 % diapazonā (pamatojoties uz vismaz trīs paraugiem abos laikpunktos);
- iepriekšējās analītiskās darbībās ar papildināto uzturu ir jāpierāda, ka viela barībā ir ļoti viendabīga; vismaz trīs testa sākumā paņemti vielas koncentrācijas paraugi nedrīkst atšķirties par vairāk nekā ± 15 % no vidējā lieluma;

⁽¹⁾ Kopējais garums jāreģistrē arī testa laikā, jo tas ir labs rādītājs par to, vai ir radusies negatīva ietekme.

- nepapildinātā barībā vai ar apstrādātajiem paraugiem saistīto kontroles zivju audos testējamās vielas koncentrācijas nav detektētas vai ir konstatētas vienīgi parastā mikroelementu līmenī;
- testa beigās mirstībai un citām nelabvēlīgām ietekmēm vai slimībām gan kontrolgrupas, gan testgrupas zivīm jābūt ≤ 10 %; ja kāda iemesla dēļ testu paildzina, nelabvēlīgajai ietekmei abās grupās jābūt ≤ 5 % mēnesī un ≤ 30 % kopumā. Būtiskas atšķirības starp testgrupās un kontrolgrupās paraugoto zivju vidējo augšanas ātrumu varētu liecināt par testējamās vielas toksisko ietekmi.

STANDARTVIELAS

Ja laboratorija šādu testu iepriekš nav veikusi vai ja ir notikušas būtiskas pārmaiņas (piemēram, mainīts zivju celms vai piegādātājs, izmanto citu zivju sugu, ir būtiski mainījušies zivju izmēri, zivju barība vai papildināšanas metode utt.), ieteicams izdarīt tehniskās kompetences pētījumu, izmantojot kādu standartvielu. Standartvielu galvenokārt izmanto, lai noteiktu, vai barības papildināšanas paņēmieni pietiekami nodrošina testējamo vielu maksimālu viendabību un biopieejamību. Viens piemērs, kas izmantots nepolārām hidroforām vielām, ir heksahlorbenzols (HCB), bet sakarā ar HCB bīstamību⁽¹⁾ jāapsver, vai neizmantojot citas vielas ar esošiem ticamiem datiem par uzņemšanu un biomagnifikāciju. Ja izmanto standartvielu, testēšanas pārskatā par to jānorāda tāda pati pamatinformācija kā par testējamām vielām, arī tās nosaukums, tīrība, CAS numurs, struktūra, toksiskuma dati (ja pieejami) (sal. ar 3. un 22. punktu).

METODES APRAKSTS

Aprīkojums

Materiāli un aprīkojums jāizmanto tāpat, kā aprakstīts ūdensekspozīcijas metodē (sal. ar 26. punktu). Jāizmanto caurplūdes vai statiskās atjaunošanas testa sistēmas, kas testa tvertnēm nodrošina pietiekamu daudzumu atšķaidīšanas ūdens. Jāreģistrē plūsmas ātrumi.

Ūdens

Testa ūdens jāizmanto tāpat, kā aprakstīts ūdensekspozīcijas metodē (sal. ar 27.-29. punktu). Testa vide jāraksturo saskaņā ar aprakstu, un tās kvalitātei visā testa laikā jābūt nemainīgai. Dabīgajam daļiņu saturam un kopējam organiskajam ogleklim (TOC) pirms testa sākuma jābūt iespējami zēmam (≤ 5 mg/l suspendētās vielas; ≤ 2 mg/l kopējā organiskā oglekļa). TOC jāmēra vienīgi pirms testa tā ūdens raksturojuma ietvaros (sal. ar 53. punktu).

Uzturs

Ieteicams izmantot zivīm paredzētu komerciālu barību (peldošu un/vai lēni grimstošu granulu veidā), kam norādīts vismaz olbaltumvielu un tauku saturs. Lai efektīvizētu barības ekspozīciju, barības granulām pēc izmēra jābūt vienādām, t. i., zivīm jāēd vairāk pārtikas, nevis lielāki tās gabali, ignorējot mazākus. Granulu izmēram jābūt piemērotam zivju izmēram testa sākumā (piemēram, zivij ar kopējo garumu 3-7 cm var izmantot granulas, kuru aptuvenais diametrs ir 0,6-0,85 mm, bet zivīm ar kopējo garumu 6-12 cm var izmantot granulas, kuru diametrs ir 0,85-1,2 mm). Izvadišanas fāzes sākumā granulu lielumu var koriģēt pēc zivju lieluma. Piemērota komerciāli pieejamas barības sastāva paraugs ir sniegts 7. papildinājumā. Šīs metodes izstrādē parasti izmantota testa barība ar kopējo lipīdsaturu 15-20 % (masas). Zivju barība ar tik augstu lipīdu koncentrāciju dažos reģionos var nebūt pieejama. Tādā gadījumā pētījumus var veikt ar zemāku lipīdu koncentrāciju barībā un nepieciešamības gadījumā attiecīgi pielāgot barošanas intensitāti, lai saglabātu zivju veselību (pamatojoties uz priekštestēšanu). Pirms testa sākuma un uzņemšanas fāzes beigās jāizmēra un jāreģistrē testgrupas un kontrolgrupas barības kopējais lipīdsaturs. Pētījuma pārskatā jānorāda komerciālās barības piegādātāja sniegtā detalizētā informācija par uzturvielu analīzi, mitrumu, šķiedrām un pelniem, un, ja iespējams, minerālvielām un pesticīdu atliekām (piemēram, "standarta" prioritārajiem piesārņotājiem).

⁽¹⁾ HCB ir iekļauta Stokholmas Konvencijas A un C pielikumā un Regulas (EK) Nr. 850/2004 par noturīgajiem organiskajiem piesārņotājiem I un III pielikumā (OV L 158, 30.4.2004., 7. lpp.).

Papildinot barību ar testējamo vielu, pēc iespējas jācenšas nodrošināt visas barības viendabību. Testējamās vielas koncentrācija testgrupas barībā jāizraugās, ņemot vērā analītiskā paņēmiena jutību, testējamās vielas toksiskumu (NOEC, ja ir zināma) un attiecīgos fizikālķīmiskos datus. Ja izmanto standartvielu, to atkarībā no analīzes jutīguma vēlams iestrādāt aptuveni 10 % apmērā no testējamās vielas koncentrācijas (vai jebkurā gadījumā — iespējami zemā koncentrācijā) (piemēram, par pieņemamu heksahlorbenzola koncentrāciju barībā tiek uzskatīti 1-100 µg/g; lai gūtu detalizētāku informāciju par HCB asimilācijas efektivitāti sal. ar (47)).

Zivju barību ar testējamo vielu atkarībā no tās fizikālajām īpašībām un šķīdības (sīkāku informāciju par papildināšanas metodēm sk. 7. papildinājumā) var papildināt vairākos veidos:

- ja viela šķīst un ir stabila triglicerīdos, tā pirms sajaukšanas ar zivju barību jāizšķīdina nelielā daudzumā zivju eļļas vai pārtikas augu eļļas. Šajā posmā jāraugās, lai neiegūtu barību, kurā, ņemot vērā papildinātās barības dabīgo lipīdsaturu, lipīdsaturs ir pārāk augsts, un eļļa jāpievieno minimālajā zināmajā daudzumā, kas nepieciešams, lai panāktu testējamās vielas sadalījumu un viendabību barībā; vai
- barība jāpapildina, izmantojot piemērotu organisko šķīdinātāju tā, lai nepazeminātu viendabību un biopieejamību (sakarā ar šķīdinātāja izgarošanu barībā var veidoties testējamās vielas (mikro)kristāli, un nav viegli pierādīt, ka tas nav noticis; sal. ar (49)); vai
- neviskozi šķidrums jāpievieno tieši zivju barībai, bet tie kārtīgi jā sajauc, lai panāktu viendabīgumu un veicinātu labu asimilāciju. Maisīšanas paņēmienam jānodrošina, ka papildinātā barība ir viendabīga.

Dažos gadījumos, piemēram, ar mazāk hidroforām testējamām vielām, kam ir varbūtīgāk desorbēties no barības, sagatavotās barības granulas var būt jāpārklāj ar nelielu daudzumu kukurūzas/zivju eļļas (sk. 142. punktu). Tādos gadījumos kontroles barība jāapstrādā līdzīgi un galīgā sagatavotā barība jāizmanto lipīdu mērīšanā.

Ja izmanto standartvielas, to rezultātiem jābūt salīdzināmiem ar literatūrā norādītajiem datiem par pētījumiem, kas veikti tādos pašos apstākļos ar salīdzināmu barošanas intensitāti (sal. ar 45. punktu), un standartvielas specifiskajiem parametriem jāatbilst attiecīgajiem 113. punkta kritērijiem (3., 4. un 5. daļa).

Ja par testējamās vielas nesēju izmanto eļļu vai nesēja šķīdinātāju, līdzvērtīgs daudzums tā paša nesēja (atšķīdinot testējamo vielu) jā sajauc ar kontroles barību, lai saglabātu līdzvērtību ar papildināto barību. Gan uzņemšanas, gan izvadīšanas fāzē ir svarīgi testgrupām un kontrolgrupām dot enerģētiskās vērtības ziņā līdzvērtīgu barību.

Papildinātā barība jāglabā apstākļos, kas nemaina testējamās vielas stabilitāti barības maisījumā (piemēram, dzesēšana), un šie apstākļi jānorāda.

Zivju sugu izraudzīšanās

Var izmantot ūdensekspozīcijas metodē norādītās zivju sugas (sal. ar 32. punktu un 3. papildinājumu). Uzturiskos bioakumulācijas pētījumos ar organiskām vielām pirms šīs TM publicēšanas parasti izmantota varavīksnes forele (*Oncorhynchus mykiss*), karpas (*Cyprinus carpio*) un melngalvas mailīte (*Pimephales promelas*). Testa sugām attiecībā uz barošanas jāizturas noteiktā veidā, lai dotā barības deva tiktu ātri patērēta un tādējādi līdz minimumam samazinātos jebkāds faktors, kas ietekmē testējamās vielas koncentrāciju barībā (piemēram, izskalošanās ūdenī un ūdensekspozīcijas varbūtība). Jāizmanto ieteiktā izmēra/svara diapazona zivis (sal. ar 3. papildinājumu). Zivis nedrīkst būt tik mazas, ka tās grūti analizēt individuāli. Sugas, kas testētas straujas augšanas attīstības stadijā, var sarežģīt datu interpretāciju, un strauja augšana var ietekmēt asimilācijas efektivitātes aprēķinus⁽¹⁾.

⁽¹⁾ Attiecībā uz strauju augšanu uzņemšanas fāzes laikā patiesā barošanas intensitāte samazināsies zem ekspozīcijas sākumā noteiktās.

Zivju turēšana

Pieņemšanas kritēriji attiecībā uz aklimatizāciju, mirstību un slimībām ir tādi paši kā ūdenssekspozīcijas metodei pirms testa veikšanas (sal. ar 33.–35. punktu).

TESTA VEIKŠANA

Darbības pirms pētījuma veikšanas un diapazona noteikšanas tests

Lai pierādītu vielas atgūstamību no papildinātas barības / papildinātiem zivs audiem, ir vajadzīgs pirmspētījuma analītiskais darbs. Lai izraudzītos piemērotu barības koncentrāciju, ne vienmēr vajadzīgs diapazona noteikšanas tests. Lai parādītu, ka nelabvēlīga ietekme nav novērojama, un izvērtētu papildinātas barības garšu, analītiskās metodes jutību attiecībā uz zivjus audiem un barību, barošanas intensitātes piemērotību un izraudzītos paraugšanas intervālus izvadīšanas fāzes laikā utt., var veikt sākotnējus barošanas eksperimentus, bet tie nav obligāti. Sākotnējs pētījums var būt lietderīgs tam, lai aplēstu paraugšanai nepieciešamo zivju skaitu izvadīšanas fāzes laikā. Rezultātā var būtiski samazināties izmantoto zivju skaits, jo īpaši attiecībā uz testējamām vielām, kuras ir īpaši uzņēmīgas pret metabolizēšanos.

Ekspozīcijas nosacījumiem

Uzņemšanas fāzes ilgums

Uzņemšanas fāzē parasti pietiek ar 7–14 dienām, kuru laikā katru dienu vienu zivju grupu baro ar kontroles barību, bet otru — ar noteiktu testa barības devu, kas ir atkarīga no testētajām sugām un eksperimenta apstākļiem, piemēram, varavīksnes forelei tie būtu 1–2 % no ķermeņa svara (slapjsvara). Barošanas intensitāti izraugās tādu, lai nenotiktu ātra augšana un liels lipīdsatura pieaugums. Ja vajadzīgs, uzņemšanas fāzi var paildzināt, pamatojoties uz praktisko pieredzi no iepriekšējiem pētījumiem vai zināšanām par testējamās vielas (vai analoga) uzņemšanu zivju organismā vai izvadīšanu no tā. Par testa sākumu nosaka reizi, kad notiek pirmā barošana ar papildināto barību. Eksperimenta diena ir no barošanas laika līdz brīdim īsi pirms (piem., viena stunda) nākamā barošanas laika. Tādējādi pirmā uzņemšanas eksperimenta diena sākas no pirmās barošanas reizes ar papildināto barību un beidzas neilgi pirms otrās barošanas reizes ar papildināto barību. Praksē uzņemšanas fāze beidzas neilgi (piemēram, vienu stundu) pirms pirmās barošanas ar nepapildināto testējamo vielu, jo turpmākās 24 stundas zivs turpinās sagremot papildināto barību un absorbēs testējamo vielu. Ir svarīgi nodrošināt tik augstu (netoksisku) testējamās vielas uzņemšanu organismā, lai analītiskajā metodē ar to pietiktu tam, ka izvadīšanas fāzē iespējams konstatēt samazinājumu vismaz par vienu lieluma kārtu. Īpašos gadījumos, lai gūtu priekšstatu par uzņemšanas kinētiku, uzņemšanas fāzi var pagarināt (līdz 28 dienām) ar papildu paraugšanu. Uzņemšanas laikā koncentrācija zivju organismā stacionāru fāzi var nesasniegt. Tāpat kā ūdenssekspozīcijas testā, arī šeit stacionārās fāzes sasniegšanai vajadzīgo laiku var aprēķināt ar vienādojumiem, tādējādi gūstot norādi par visvarbūtīgāko laiku, kas vajadzīgs, lai zivju organismā panāktu novērtējamās koncentrācijas (sal. ar 5. papildinājumu).

Dažos gadījumos var būt zināms, ka slikta analītiskā jutība vai zemas asimilācijas efektivitātes dēļ ar 7–14 dienas ilgu vielas uzņemšanu zivs organismā nepietiks, lai ar izmantoto koncentrāciju barībā panāktu tik augstu koncentrāciju zivs organismā, ar ko pietiktu, lai izvadīšanas laikā varētu analizēt samazinājumu vismaz par vienu lieluma kārtu. Tādos gadījumos var būt lietderīgi sākotnējo barošanas fāzi pagarināt, pārsniedzot 14 dienas, vai, jo īpaši attiecībā uz ļoti metabolizējamām vielām, jāapsver, vai nepaaugstināt koncentrāciju barībā. Tomēr jāgādā, ka uzņemšanas laikā slogs organismam zivs audos saglabājas zem (skaitliski novērtētās) hroniskās nenovērojamas ietekmes koncentrācijas (NOEC) (sal. ar 138. punktu).

Izvadīšanas fāzes ilgums

Izvadīšana parasti ilgst līdz 28 dienām, un sākas brīdī, kad testgrupas zivis pēc uzņemšanas fāzes sāk barot ar tīru, neapstrādātu barību. Izvadīšana sākas ar pirmo “nepapildinātas” barības došanu, nevis uzreiz pēc pēdējās “papildinātas” barības došanas, jo, kā norādīts 126. punktā, turpmākās 24 stundas zivis joprojām sagremos barību un absorbēs testējamo vielu. Tādēļ pirmo paraugšanu izvadīšanas fāzē veic neilgi pirms otrās reizes, kad notiek barošana ar nepapildinātu barību. Šis izvadīšanas periods ir veidots tā, lai tiktu konstatētas vielas, kam pussabrukšanas periods potenciāli ir 14 dienas, kas atbilst bioakumulatīvu vielu ⁽¹⁾ pussabrukšanas periodam, līdz ar to 28 dienās ietilpst divi tādi vielu pussabrukšanas periodi. Gadījumos, kad vielām ir ļoti liela bioakumulācija, var būt lietderīgi pagarināt izvadīšanas fāzi (ja priekštestēšana par to liecina).

Ja viela tiek izvadīta ļoti lēni, un tāpēc izvadīšanas fāzē precīzu pussabrukšanas periodu noteikt nav iespējams, novērtēšanas vajadzībām ar šo informāciju joprojām var pietikt, lai liecinātu par augstu bioakumulācijas līmeni. Un otrādi, ja viela tiek izvadīta tik ātri, ka nav iespējams iegūt ticamu nulles laika koncentrāciju (koncentrāciju uzņemšanas beigās/izvadīšanas sākumā $C_{0,d}$) un k_2 atvasināt nav iespējams, par k_2 var izdarīt piesardzīgu aplēsi (sal. ar 7. papildinājumu).

Ja agrākos intervālos (piemēram, 7 vai 14 dienās) zivīm veiktas analīzes liecina, ka viela zem kvantitatīvās noteikšanas līmeņiem izvadīta, pirms pagājis pilns 28 dienu periods, tālāku paraugšanu var pārtraukt un testu izbeigt.

Dažos gadījumos uzņemšanas perioda beigās (vai otrajā uzņemšanas paraugā) izmērāma testējamās vielas uzņemšanu var nebūt notikusi. Ja iespējams pierādīt, ka: (i) ir izpildīti 113. punktā norādītie derīguma kritēriji; un (ii) tas, ka viela nav uzņemta, nav noticis kāda cita testā vērojama trūkuma dēļ (piemēram, uzņemšanas fāze nav pietiekami ilga, barības papildināšanas paņēmiena nepilnība, kuras dēļ vielai ir slikta biopieejamība, analītiskajai metodei trūkst jutības, zivis neapēd barību utt.); pētījumu drīkst pārtraukt bez nepieciešamības to atkārtot ar garāku uzņemšanas periodu. Ja priekšdarbi liecina, ka tā varētu būt, var ieteikt izmantot “masas bilances” pieeju un analizēt feces attiecībā uz nesagremotu testējamo vielu.

Testa zivju skaits

Līdzīgi kā ūdenssekspozīcijas testā jāizraugās līdzīga svara un garuma zivis, mazākajai zivij jābūt ne vieglākai kā divām trešdaļām no lielākās zivs svara (sal. ar 40.-42. punktu).

Kopējais zivju skaits pētījumam jāizraugās, pamatojoties uz paraugšanas grafiku (vismaz viens paraugs uzņemšanas fāzes beigās un četri līdz seši paraugi izvadīšanas fāzes laikā, bet atkarībā no šo fāžu ilguma), ņemot vērā analītiskā paņēmiena jutību, koncentrāciju, kas varētu tikt panākta uzņemšanas fāzes beigās (pamatojoties uz iepriekšējām zināšanām), un izvadīšanas ilgumu (ja iepriekšējas zināšanas dod iespēju izdarīt skaitlisku novērtēšanu). Katrā reizē jāparaugo piecas līdz desmit zivis, kuru augšanas parametrus (svars un kopējais garums) mēra pirms ķīmiskās analīzes vai līpīdu analīzes.

Tā kā zivīm ir raksturīgs mainīgs izmērs, augšanas ātrums un fizioloģija, un katras zivs patērētajā barības daudzumā ir varbūtīgas atšķirības, lai pienācīgi noteiktu vidējo koncentrāciju un tās mainību, katrā intervālā jāparaugo vismaz piecas zivis no testgrupas un piecas zivis no kontrolgrupas. Ir varbūtīgāk, ka vispārējo nekontrolēto mainību testā vairāk ietekmēs izmantoto zivju mainība, nevis izmantotajām analītiskajām metodēm piemītošā mainība, un tādējādi dažos gadījumos ir attaisnoti vienā paraugšanas punktā izmantot līdz pat desmit zivīm. Tomēr, ja izvadīšanas sākumā testējamās vielas fona koncentrācijas kontroles zivju organismā nav izmērāmas, var pietikt ar divu līdz trīs kontroles zivju ķīmisko analīzi galaparaugšanas intervālā, ar nosacījumu, ka atlikušās kontroles zivis visos paraugšanas punktos joprojām paraugo attiecībā uz svaru un kopējo garumu (lai attiecībā uz augšanu no testgrupām un kontrolgrupām būtu paraugots vienāds skaits). Zivis jātur un jāsver atsevišķi (pat ja izrādās, ka vēlāk paraugšanas rezultāti būs jākombinē) un jāmēra to kopējais garums.

⁽¹⁾ Ūdenssekspozīcijas pētījumā 14 dienu pussabrukšanas periods atbilstu BCF apm. 10 000 L/kg, izmantojot 1 g smagu zivi, kurai attiecīgais uzņemšanas ātrums ir apmēram 500 L/kg/d (saskaņā ar *Sijm et al* (46) vienādojumu).

Tas nozīmē, ka standarttestā ar, piemēram, 28 dienu ilgu izvadīšanu un pieciem izvadīšanas paraugiem pavisam tiks izmantotas 59–120 zivis no testgrupas un 50–110 zivis no kontrolgrupas, pieņemot, ka vielas analīzes paņēmieni dod iespēju lipīdsaturu analizēt tām pašām zivīm. Ja tām pašām zivīm, kurām veikta ķīmiskā analīze, lipīdu analīzi veikt nav iespējams un arī praktiski nav iespējams lipīdu analīzei izmantot tikai kontroles zivis (sal. ar 56. punktu), būtu nepieciešamas papildu 15 zivis (trīs no pamatgrupas testa sākumā, pa trim no kontrolgrupām un testgrupām izvadīšanas sākumā un pa trim no kontrolgrupām un testgrupām eksperimenta beigās). Paraugošanas grafika piemērs ar zivju skaitu atrodams 4. papildinājumā.

Noslogojums

Jāizmanto tikpat augsts ūdens/zivju noslogojums kā ūdensekspozīcijas metodē (sal. ar 43. un 44. punktu) Kaut arī šajā testā zivju/ūdens noslogojums ekspozīcijas koncentrācijas neietekmē, ieteicamais noslogojums ir 0,1–1,0 g (slapjsvars) zivju uz litru ūdens dienā, lai izšķīdinātā skābekļa koncentrācijas uzturētu pietiekamā līmenī un līdz minimumam samazinātu spriedzi testa organismiem.

Testa barība un barošana

Aklimatizācijas periodā zivis jābaro ar attiecīgu barību, kā aprakstīts iepriekš (117. punkts). Ja testu veic caurplūdes apstākļos, zivju barošanas laikā plūsma jāaptur.

Testa laikā attiecībā uz testgrupas uzturu jāievēro iepriekš aprakstītie nosacījumi (116.–121. punkts). Papildus tam, ka tiek ņemti vērā vielai specifiski faktori, analītiskā jutība, sagaidāmā koncentrācija barībā vides apstākļos un hroniskā toksiskuma līmeņi/slodze organismam, izraugoties galīgo papildinājuma koncentrāciju, vēl jāņem vērā barības garša (lai zivs nevairītos to ēst). Pārskatā jānorāda testējamās vielas nominālā papildinājuma koncentrācija. Balstoties uz pieredzi, papildinājuma koncentrācijas 1–1 000 µg/g diapazonā ir praktisks darbības diapazons attiecībā uz testējamām vielām, kam nav novērojams specifisks toksiskuma mehānisms. Vielām, kurām ir nespecifisks iedarbības mehānisms, atlieku līmeņi audos nedrīkst pārsniegt 5 µmol uz g lipīdu, jo ir varbūtīgi, ka atliekas, kas pārsniedz šo līmeni, rada hronisku ietekmi (19) (48) (50) ⁽¹⁾. Attiecībā uz citām vielām jāraugās, lai nelabvēlīgu ietekmi neradītu akumulētā ekspozīcija (sal. ar 127. punktu). Tas jo īpaši novērojams tad, ja vienlaicīgi testē vairāk nekā vienu vielu (sal. ar 112. punktu).

Ar attiecīgu testējamās vielas daudzumu zivju barību var papildināt vienā no trim veidiem, kā aprakstīts 119. punktā un 7. papildinājumā. Barības papildināšanas metodes un procedūras jādokumentē pārskatā. Kontroles zivīm dod neapstrādātu barību, kura satur tikpat daudz nepapildināta eļļas nesēja, kā izmantots uzņemšanas fāzei paredzētajā papildinātajā barībā (ja tāds izmantots), vai kura apstrādāta ar "tīru" šķīdinātāju, ja testgrupas barības sagatavošanā izmantots šķīdinātāja nesējs. Apstrādātajai un neapstrādātajai barībai vismaz trīs reizes analītiski jāmēra testējamās vielas koncentrācija pirms uzņemšanas fāzes sākuma un tās beigās. Pēc apstrādātās barības eksponēšanas (uzņemšanas fāze) zivīm (abām grupām) dod neapstrādātu barību (izvadīšanas fāze).

Zivis baro ar fiksētu devu (atkarībā no sugas, piemēram, varavīksnes forelei — aptuveni 1–2 % no ķermeņa slapjsvara dienā). Barošanas intensitāti izraugās tādu, lai nenotiktu ātra augšana un liels lipīdsatura pieaugums. Jāreģistrē konkrēta barošanas intensitāte, kas noteikta eksperimenta laikam. Sākotnējā barošana jābalsta uz pamatgrupas svara mērījumiem, kas ielānoti tieši pirms testa sākuma. Pamatojoties uz paraugoto zivju slapjsvaru katrā paraugošanas reizē, barības daudzumu pielāgo, lai būtu ņemta vērā augšana eksperimenta laikā. Zivju svaru un garumu testa un kontroles tvertnēs var aplēst no katrā paraugošanas reizē izmantoto zivju svara un kopējā garuma; nedrīkst svērt vai mērit testa un kontroles tvertnēs palikušās zivis. Ir svarīgi visa eksperimenta laikā saglabāt nemainīgu barošanas intensitāti.

⁽¹⁾ Tā kā faktiskās iekšējās koncentrācijas ir iespējams noteikt vienīgi pēc testa veikšanas, ir jāaplēš paredzamā iekšējā koncentrācija (piemēram, pamatojoties uz paredzamo BMF un koncentrāciju barībā; sal. vienādojums A5.8. 5. papildinājumā).

Barošana jānovēro, lai nodrošinātu, ka zivis redzami apēd visu doto barību, un garantētu, ka aprēķinos izmanto pareizu uzņemšanas ātrumu. Izraugoties barošanas intensitāti, kas nodrošina, ka visa reizi dienā dotā barība tiek apēsta, jāņem vērā iepriekšēji barošanas eksperimenti vai iepriekšējā pieredze. Gadījumā, ja barība konsekventi netiek apēsta, var būt ieteicams katrā eksperimenta dienā sadalīt devu pa papildu barošanas periodiem (piemēram, barošanu reizi dienā aizstāt ar divreiz mazākas devas došanu divas reizes dienā). Ja nepieciešams, otra barošana jāveic noteiktā laikā un tās laiks jānosaka tā, lai pirms zivju paraugošanas pāiet maksimāli ilgs laiks (piemēram, otrās barošanas laiku nosaka eksperimenta dienas pirmajā pusē).

Kaut arī zivis parasti barību apēd ātri, ir svarīgi nodrošināt, ka viela joprojām adsorbējas uz barības. Jācenšas izvairīties, ka testējamā viela no barības disperģējas ūdenī, tādējādi zivis papildus uzturceļam eksponējot testējamās vielas koncentrācijām ūdenī. To var panākt, visu neapēsto barību (un izkārnījumus) no testa un kontroles tvertnēm izņemot vienas stundas (vēlams 30 min) laikā pēc barošanas. Turklāt var izmantot sistēmu, kurā ūdeni pastāvīgi tīra ar aktīvās ogles filtru, lai absorbētu jebkādu "izšķīdušu" kontaminantu. Caurplūdes sistēmas var palīdzēt ātri aizskaloņ barības daļiņas un izšķīdušās vielas⁽¹⁾. Dažos gadījumos šo problēmu var palīdzēt atrisināt mazliet mainīts papildinātās barības sagatavošanas paņēmieni (sk. 119. punktu).

Gaisma un temperatūra

Attiecībā uz ūdenssekspozīcijas metodi (sal. ar 48. punktu) ieteicams 12–16 stundu fotoperiods un izmantotajai testa sugai atbilstoša temperatūra (± 2 °C) (sal. ar 3. papildinājumu). Jābūt zināmam un dokumentētam apgaismojuma veidam un īpatnībām.

Kontroles

Jāizmanto viena kontrolgrupa, kurā zivīm dod tādu pašu uzturu kā testgrupā, bet bez testējamās vielas barībā. Ja testgrupas barības papildināšanā izmantots eļļas vai šķīdinātāja nesējs, kontrolgrupas barība jāapstrādā tieši tāpat, bet bez testējamās vielas, lai testgrupas un kontrolgrupas uzturs būtu vienāds (sal. ar 121. un 139. punktu).

Ūdens kvalitātes mērījumu biežums

Spēkā ir ūdenssekspozīcijas metodē aprakstītie nosacījumi, izņemot attiecībā uz TOC, kas jāmēra tikai pirms testa tā ūdens raksturojuma vajadzībām (sal. ar 53. punktu).

Zivju un uztura paraugošana un analīze

Uztura paraugu analīze

Testa un kontroles uztura paraugi attiecībā uz testējamo vielu un lipīdsaturu jāanalizē vismaz trīs replikātos un vismaz pirms uzņemšanas fāzes sākuma un tās beigās. Pārskatā jānorāda barības analizēšanas metodes un viendabības nodrošināšanas procedūras.

⁽¹⁾ Sakarā ar zivju izkārnījumiem vai tādēļ, ka testējamā viela izskalojas no barības, pilnībā likvidēt testējamās vielas klātbūtni testa vidē var nebūt iespējams. Tādēļ viens risinājums ir mērīt vielas koncentrāciju ūdenī uzņemšanas perioda beigās, jo īpaši, ja tiek izmantota pusstatistiska struktūra, kas palīdzēs noteikt, vai ir radusies ūdenssekspozīcija.

Testējamās vielas paraugi jāanalizē ar izveidoto un validēto metodi. Pirmspētījuma darbā jānosaka paredzētās parauga matricas kvantitatīvās noteikšanas robeža, procentuālo atgūstamība, traucējumi un analītiskā mainība. Ja testē radioaktīvi iezīmētu materiālu, jāņem vērā tie paši apsvērumi kā ūdensekspozīcijas metodē, ūdens analīzi aizstājot ar barības analīzi (sal. ar 65. punktu).

Zivju analīze

Katrā zivju paraugošanas reizē no ekspozīcijas un kontroles apstrādēm paraugo 5–10 indivīdus (dažos gadījumos kontroles zivju skaitu var samazināt; sal. ar 134. punktu).

Paraugošanas reizēm katrā eksperimenta dienā jānotiek vienā un tajā pašā laikā (relatīvi pret barošanas laiku), un to laiks jāplāno tā, lai līdz minimumam samazinātu iespējamību, ka barība uzņemšanas fāzes laikā un izvadīšanas fāzes agrīnā posmā paliek zarnās un stihiski palielina testējamās vielas kopējās koncentrācijas (t. i., paraugotās zivis eksperimenta dienas beigās jāaizvāc, paturot prātā, ka eksperimenta diena sākas barošanas laikā un beidzas nākamās barošanas laikā, apmēram pēc 24 stundām. Izvadīšana sākas, kad pirmo reizi tiek dota nepapildināta barība; sal. ar 128. punktu). Pirmajam izvadīšanas fāzes paraugam (kas ņemts neilgi pirms otrās barošanas ar nepapildinātu barību) ir svarīga nozīme, jo ekstrapolācija uz vienu dienu pirms šī mērījuma tiek izmantota, lai aplēstu nulles laika koncentrāciju ($C_{0,d}$, koncentrācija zivs organismā uzņemšanas beigās/izvadīšanas sākumā). Pēc vēlēšanās uzņemšanas beigās un 1. un 3. izvadīšanas dienā zivīm var izņemt kuņģa un zarna traktu un analizēt atsevišķi.

Katrā paraugošanas reizē zivis izņem no abiem testa traukiem un apstrādā tāpat, kā aprakstīts ūdensekspozīcijas metodē (sal. ar 61.–63. punktu).

Testējamās vielas koncentrācijas veselā zivī (slapjsvars) gan kontrolgrupās, gan testgrupās mēra vismaz uzņemšanas fāzes beigās un izvadīšanas fāzes laikā. Izvadīšanas fāzes laikā ieteicami četri līdz seši paraugošanas punkti (piemēram, 1., 3., 7., 14. un 28. diena). Pēc vēlēšanās pēc 1–3 dienu ilgas uzņemšanas var noteikt papildu paraugošanas punktu, lai joprojām tuvu ekspozīcijas perioda sākumam, izmantojot uzņemšanas lineāro fāzi zivju organismā, aplēstu asimilācijas efektivitāti. Pastāv divas galvenās novirzes no grafika: (i) ja izmanto paildzinātu uzņemšanas fāzi, lai izmeklētu uzņemšanas kinētiku: tādā gadījumā uzņemšanas fāzē būs papildu paraugošanas punkti un līdz ar to būs jāiekļauj papildu zivis (sal. ar 126. punktu); (ii) ja pētījumu beidz uzņemšanas fāzes beigās sakarā ar to, ka nekāda izmērāma uzņemšana nav notikusi (sal. ar 131. punktu). Atsevišķās paraugotās zivis jānosver (un jāizmēra to kopējais garums), lai varētu noteikt augšanas ātruma konstantes. Vielās koncentrācijas konkrētos zivs audos (ēdamās vai neēdamās daļas) var mērīt arī uzņemšanas beigās un izraudzītajos izvadīšanas laikos. Ja testē radioaktīvi iezīmētu materiālu, jāņem vērā tie paši apsvērumi kā attiecībā uz ūdensekspozīcijas metodi, ūdens analīzi aizstājot ar barības analīzi (sal. ar 65. punktu).

Attiecībā uz periodisku standartvielas izmantošanu (sal. ar 25. punktu) testgrupas koncentrācijas vēlams mērīt uzņemšanas beigās un visās izvadīšanas reizēs, kas konkrēti noteiktas testējamai vielai (veselai zivij); kontrolgrupas koncentrācijas jāanalizē vienīgi uzņemšanas beigās (veselai zivij). Dažos gadījumos (piemēram, ja testējamās vielas un standartvielas analīzes paņēmieni nav savietojami un tāpēc, lai varētu ievērot paraugošanas grafiku, ir nepieciešamas papildu zivis) var izmantot citu pieeju, lai papildu zivju skaita nepieciešamību samazinātu līdz minimumam. Standartvielas koncentrācijas izvadīšanas laikā mēra vienīgi 1. un 3. dienā un divos nākamajos paraugošanas punktos, kas izraudzīti tā, lai standartvielai varētu noteikt ticamu nulles laika koncentrācijas ($C_{0,d}$) un k_2 aplēsi.

Ja iespējams, katrā paraugošanas reizē vai vismaz uzņemšanas fāzes sākumā un beigās un izvadīšanas fāzes beigās jānosaka lipīdsaturs atsevišķās zivs organismā (sal. ar 56. un 67. punktu). Atkarībā no analītiskās metodes (sk. 67. punktu un 4. papildinājumu) gan lipīdsatura, gan testējamās vielas koncentrācijas noteikšanai var būt iespējams izmantot vienu un to pašu zivi. To vēlams darīt, lai zivju skaitu samazinātu līdz minimumam. Taču, ja tas nav iespējams, var izmantot ūdensekspozīcijas metodē aprakstīto pieeju (alternatīvos lipīdu mērīšanas variantus sk. 56. punktā). Pārskatā jādokumentē lipīdsatura kvantitatīvajā noteikšanā izmantotā metode.

Analītiskās metodes kvalitāte

Lai nodrošinātu vielai specifiskā analītiskā paņēmiena specifiskumu, pareizību, precizitāti un reproducējamību, kā arī testējamās vielas atgūstamību no barības un no zivs, jāveic eksperimentālas pārbaudes.

Zivs augšanas mērījums

Testa sākumā jānosver pamatgrupas zivju paraugs (un jāizmēra to kopējais garums). Šis zivis jāparaugo neilgi (piemēram, vienu stundu) pirms pirmās papildinātās barošanas, un eksperimenta dienu apzīmē ar "0". Zivju skaitam šajā paraugā jābūt vismaz tādām pašām kā paraugiem testa laikā. Daži no tiem var būt tā pati zivs, kas pirms uzņemšanas fāzes sākuma izmantota lipīdu analīzē (sal. ar 153. punktu). Katrā paraugošanas intervālā zivis vispirms nosver un izmēra to garumu. Katras atsevišķās zivs izmērītais svars (un garums) jāsaista ar analizēto ķīmikālijas koncentrāciju (un attiecīgā gadījumā lipīdsaturu), piemēram, katrai paraugotajai zivij izmantojot unikālu identifikācijas kodu. Šo paraugoto zivju mērījumus var izmantot, lai aplēstu testa un kontroles tvertnēs palikušo zivju svaru (un garumu).

Eksperimentāla izvērtēšana

Katru dienu jāveic un jāreģistrē novērojumi par mirstību. Jāveic un jāreģistrē papildu novērojumi par nelabvēlīgu ietekmi, piemēram, par anormālu uzvedību vai pigmentāciju. Zivis uzskata par mirušām, ja tām nav novērojamas elpošanas kustības un ja tās nereaģē uz nelielu mehānisku stimulāciju. Aizvāc visas mirušās un acīmredzami mirstošās zivis.

DATI UN PĀRSKATA SNIEGŠANA

Rezultātu apstrāde

Testa rezultātus izmanto, lai kā zivs kopējā slapjsvara funkciju atvasinātu izvadīšanas ātruma konstanti (k_2). Uz zivs svara vidējo pieaugumu balstītu augšanas ātruma konstanti k_s aprēķina un izmanto, lai attiecīgā gadījumā iegūtu ar augšanu koriģētu izvadīšanas ātruma konstanti k_{2g} . Turklāt jānorāda asimilācijas efektivitāte (a ; absorbcija no zarnām), kinētiskais biomagnifikācijas koeficients (BMF_K) (ja nepieciešams, koriģēts ar augšanu $BMF_{K_{gr}}$), ar lipīdiem koriģētā vērtība (BMF_{KL} vai $BMF_{K_{gl}}$, ja koriģēts ar augšanas izraisīto atšķaidījumu) un barošanas intensitāte. Vēl, ja iespējams iegūt aplēsi par stacionārās fāzes sasniegšanai uzņemšanas fāzē nepieciešamo laiku (piemēram, 95 % no stacionārās fāzes jeb $t_{95} = 3,0/k_2$) un ja t_{95} vērtība liecina, ka stacionārā fāze var būt tikusi sasniegta, var iekļaut aplēsi par stacionārās fāzes BMF (BMF_{ss}) (sal. ar 105. un 106. punktu un 5. papildinājumu). Lai iegūtu ar lipīdiem koriģētu vērtību BMF_{SSL} (jāņem vērā, ka saskaņota procedūra stacionārās fāzes BMF koriģēšanai attiecībā uz augšanas izraisīto atšķaidījumu nav pieejama), šo BMF_{ss} koriģē ar lipīdiem tāpat kā iegūto kinētisko BMF (BMF_K). Formulas un aprēķinu piemēri sniegti 7. papildinājumā. Pastāv pieejas, ar kurām iespējams no uzturpētījumā iegūtajiem datiem aplēst kinētisko biokoncentrēšanās koeficientu (BCF_K). Tas ir aplūkots 8. papildinājumā.

Zivs svara/garuma dati

Tabulā testgrupai un kontrolgrupai atsevišķi norāda individuālo zivju slapjsvaru un garumu par visiem periodiem, iekļaujot visas paraugošanas dienas uzņemšanas fāzes laikā (pamatgrupa uzņemšanas sākumā; kontrolgrupa un testgrupa uzņemšanas beigās un, ja to veic, agrīnā fāzē (piemēram uzņemšanas 1.–3. dienā) un izvadīšanas fāzē (piemēram, kontrolgrupai un testgrupai 1., 2., 4., 7., 14. un 28. diena). Augšanas izraisīta atšķaidījuma koriģēšanai vēlāmais augšanas mērs ir svars. Augšanas izraisīta atšķaidījuma datu koriģēšanai izmantoto(-ās) metodi(-es) sk. turpmāk (162. un 163. punkts) un 5. papildinājumā.

Dati par testējamās vielas koncentrāciju zivju organismā

Individuālām zivīm veiktus testējamās vielas atlieku mērījumus (vai apkopotus zivju paraugus, ja individuālas zivis izmērīt nav iespējams), kas izteikti kā slāpjsvara koncentrācija (masas procentos), testa un kontroles zivīm norāda tabulas veidā ar individuālajiem paraugšanas laikiem. Ja katrai paraugotajai zivij ir veikta lipīdu analīze, attiecībā uz lipīdu koncentrāciju var iegūt un tabulā norādīt individuālās ar lipīdiem koriģētās koncentrācijas (lipīdi masas procentos).

- Atsevišķām zivīm veiktus testējamās vielas atlieku mērījumus (vai, ja zivis individuāli izmērīt nav iespējams, apkopotus zivju paraugus, sal. ar 66. punktu) attiecībā uz izvadīšanas periodu konvertē kā to naturāllogaritmus un attēlo grafiski attiecībā pret laiku (dienu). Ja grafiskā attēlojuma vizuālajā pārbaudē ir acīmredzamas izlecošās vērtības, maldīgus datu punktus likvidēt, kā arī to trūkumu dokumentēti pamatot var ar statistiski derīgu izlecošo vērtību testu.
- Lineāro mazāko kvadrātu korelāciju aprēķina attiecībā uz $\ln(\text{koncentrācija})$ pret izvadīšanas (diena) datiem. Līknes stāvumu un vienādojuma brīvo locekli norāda kā kopējo izvadīšanas ātruma konstanti (k_2) un iegūtās nulles laika koncentrācijas ($C_{0,d}$) naturāllogaritmu (lai iegūtu detalizētāku informāciju, sal. ar 5. un 7. papildinājumu). Ja tas nav iespējams tādēļ, ka otrās izvadīšanas reizes parauga koncentrācijas samazinās zem kvantitatīvās noteikšanas robežas, var sniegt piesardzīgu k_2 aplēsi (sal. ar 7. papildinājumu).
- Līknes stāvumu un vienādojuma brīvā locekļa dispersijas aprēķina, izmantojot statistiskas standartprocedūras un ap šiem rezultātiem izvērtē un norāda 90 % (vai 95 %) ticamības intervālus.
- Aprēķina arī tādu vidējo koncentrāciju zivs organismā, kas mērīta pēdējā uzņemšanas dienā (mērītā nulles laika koncentrācija $C_{0,m}$), un salīdzina ar atvasināto vērtību $C_{0,d}$. Ja atvasinātā vērtība ir zemāka par mērīto vērtību, šī atšķirība var liecināt, ka zarnās atrodas nesagremota papildinātā barība. Ja atvasinātā vērtība ir daudz augstāka par mērīto vērtību, tas var liecināt, ka no izvadīšanas datu lineārās regresijas atvasinātās vērtības ir kļūdainas un ka jāveic atkārtots novērtējums (sk. 7. papildinājumu).

Izvadīšanas ātrums un biomagnifikācijas koeficients

Lai no datiem aprēķinātu biomagnifikācijas koeficientu, vispirms jāiegūst asimilācijas efektivitāte (testējamās vielas absorbcija zarnās a). Lai to paveiktu, jāizmanto 7. papildinājumā norādītais vienādojums A7.1., un tam jāzinā nulles laika izvadīšanas fāzē ($C_{0,d}$) iegūtā koncentrācija zivs organismā, (kopējā) izvadīšanas ātruma konstante (k_2), koncentrācija barībā (C_{food}), barības sagremošanas ātruma konstante (l) un uzņemšanas periods (t). Līknes stāvumu un vienādojuma brīvo locekli lineārajai sakarībai starp $\ln(\text{koncentrācija})$ un izvadīšanas laiku, kā norādīts iepriekš, norāda kā kopējo izvadīšanas ātruma konstanti ($k_2 =$ līknes stāvums) un nulles laika koncentrāciju ($C_{0,d} = e^{\text{intercept}}$). Jāpārbauda atvasināto vērtību bioloģiskā ticamība (piemēram, asimilācijas efektivitāte kā vienādojums nepārsniedz 1). (l) aprēķina, barības masu dalot ar ik dienu barotas zivs masu (ja baro pie 2 % no ķermeņa svara, (l) būs 0,02). Tomēr aprēķinā izmantoto barošanas intensitāti var būt vajadzīgs koriģēt ar zivs augšanu (to var izdarīt, izmantojot zināmo augšanas ātruma konstanti, lai katrā uzņemšanas fāzes laikpunktā aplēstu zivs svaru; sal. ar 7. papildinājumu). Gadījumos, kur k_2 un $C_{0,d}$ atvasināt nav iespējams, jo, piemēram, otrajam izvadīšanas paraugam koncentrācijas atrodas zem detekcijas robežas, var piesardzīgi aplēst k_2 un "augšējās robežas" BMF_k (sal. ar 7. papildinājumu).

Līdzko tiek iegūta asimilācijas efektivitāte (a), var aprēķināt biomagnifikācijas koeficientu, a reizinot ar uzņemšanas ātruma konstanti (l) un dalot ar (kopējo) izvadīšanas ātruma konstanti (k_2). Ar augšanu koriģēto biomagnifikācijas koeficientu aprēķina tāpat, bet izmantojot ar augšanu koriģētu izvadīšanas ātruma konstanti (k_{2g} ; sal. ar 162. un 163. punktu). Ja zivs audi analizēti uzņemšanas fāzes agrīnajā lineārajā posmā, ir iespējams iegūt alternatīvu asimilācijas efektivitātes aplēsi; sal. ar 151. punktu un 7. papildinājumu. Šī vērtība atspoguļo asimilācijas efektivitātes neatkarīgu aplēsi faktiski neeksponētam organismam (t. i., zivis atrodas tuvu uzņemšanas fāzes sākumam). No izvadīšanas datiem aplēsto asimilācijas efektivitāti parasti izmanto, lai atvasinātu BMF .

Koriģēšana ar lipīdiem un koriģēšana ar augšanas izraisītu atšķaidījumu

Zivju augšana izvadīšanas fāzes laikā var samazināt mērāmās ķīmikālijas koncentrācijas zivju organismā, un tādēļ vispārējā izvadīšanas ātruma konstante k_2 pārsniedz konstanti, kas rastos tikai izvadprocesi (piemēram, metabolisma, defekācijas) rezultātā (sal. ar 72. punktu). Praksē lipīdsaturs testa zivīs (kas ir cieši saistīts ar hidroforu vielu bioakumulāciju) un lipīdsaturs barībā var būt pietiekami atšķirīgs, lai tie būtu jākoriģē, lai biomagnifikācijas koeficienti tiktu iegūti jēgpilnā veidā. Biomagnifikācijas koeficients jākoriģē ar augšanas izraisītu atšķaidījumu (tāpat kā kinētiskais BCF ūdenssekspozīcijas metodē) un jākoriģē ar konkrētās zivs barības lipīdsaturu (lipīdu korekcijas koeficients). Šo aprēķinu vienādojumi un piemēri atrodami attiecīgi 5. un 7. papildinājumā.

Lai koriģētu augšanas izraisītu atšķaidījumu, jāaprēķina ar augšanu koriģētā izvadīšanas ātruma konstante (k_{2g}) (vienādojumus sk. 5. papildinājumā). Pēc tam šo ar augšanu koriģēto izvadīšanas ātruma konstanti (k_{2g}) izmanto, lai aprēķinātu ar augšanu koriģēto biomagnifikācijas koeficientu, kā norādīts 73. punktā. Dažos gadījumos šo pieeju nav iespējams izmantot. Alternatīva pieeja, kas apiet nepieciešamību koriģēt ar augšanas izraisītu atšķaidījumu, ir saistīta ar to, ka izmanto izvadīšanas datus par testējamās vielas masu uz vienu zivi (bāze ir vesela zivs), nevis ierastos datus par testējamās vielas masu uz zivs vienības masu (koncentrācija). To var viegli panākt, jo testos saskaņā ar šo metodi reģistrētās audu koncentrācijas jāsaista ar individuālo zivju svaru. Vienkāršā procedūra ir aprakstīta 5. papildinājumā. Jāņem vērā, ka joprojām skaitliski jānovērtē un jāreģistrē k_2 , pat ja tiek izmantota šī alternatīvā pieeja.

Lai izdarītu korekcijas ar lipīdsaturu barībā un zivju organismā, kur lipīdu analīze visām paraugotajām zivīm nav veikta, iegūst vidējās lipīdu frakcijas zivs organismā (masas procentos) un vidējās lipīdu frakcijas barībā (⁽¹⁾). Pēc tam aprēķina lipīdu korekcijas koeficientu (L_z), zivs vidējo lipīdu frakcijas lielumu dalot ar barības lipīdu frakcijas vidējo lielumu. Lai aprēķinātu ar lipīdiem koriģētas biomagnifikācijas koeficientu, biomagnifikācijas koeficientu — vai tas attiecīgā gadījumā būtu vai nebūtu koriģēts — daļa ar lipīdu korekcijas koeficientu.

Ja vienai un tai pašai zivij katrā paraugošanas punktā izdarītas ķīmikālijas un lipīdu analīzes, ar lipīdiem koriģētus datus par šīs zivs audiem var izmantot, lai tieši aprēķinātu ar lipīdiem koriģētu BMF (sal. ar (37)). Ar lipīdiem koriģētas koncentrācijas datu grafiskā attēlojumā, pamatojoties uz lipīdiem un k_2 , iegūst $C_{0,d}$. Pēc tam, izmantojot tos pašus 7. papildinājumā norādītos vienādojumus, var veikt matemātisko analīzi, bet asimilācijas efektivitāti (a) aprēķina, izmantojot ar lipīdiem normalizētu barības uzņemšanas ātruma konstanti (I_{lipid}) un uz lipīdiem balstītu uzturkoncentrāciju ($C_{food-lipid}$). Pēc tam ar lipīdiem koriģētus parametrus līdzīgā veidā izmanto BMF aprēķināšanai (jāņem vērā, ka, lai aprēķinātu ar lipīdiem koriģēto un ar augšanu koriģēto BMF_{kgL} , arī augšanas ātruma konstantes korekcija jāattiecinā uz lipīdu frakciju, nevis uz zivs slāpjsvaru).

Rezultātu interpretācija

Lai izslēgtu toksisku ietekmi, vidējā augšana testgrupās un kontrolgrupās būtībā nedrīkst būtiski atšķirties. Attiecīgā procedūrā jāsalīdzina abu grupu augšanas ātruma konstantes jeb augšanas līknes (⁽²⁾).

Testēšanas pārskats

Pēc pētījuma beigām sagatavo galapārskatu, kurā iekļauj informāciju par *testējamo vielu*, *testa sugām* un *testa nosacījumiem*, kā norādīts 81. punktā (tāpat kā attiecībā uz ūdenssekspozīcijas metodi). Turklāt jānorāda šāda informācija:

(¹) Šī pieeja ir specifiska ar barību saistītā pētījumā un atšķiras no ūdenssekspozīcijas metodē ievērotās procedūras, tādēļ, lai neradītu neskaidrību, tiek izmantots vārds "korekcija", nevis "normalizācija" — sk. arī zemsvītras piezīmi 106. punktā.

(²) Augšanas ātruma konstantēm var veikt *t*-testu, lai pārbaudītu, vai kontrolgrupās un testgrupās augšana atšķiras un vai dispersijas analīzes gadījumā var veikt *F*-testu. Ja nepieciešams, *F*-testu vai iespējamības attiecības testu var izmantot, lai vieglāk izraudzītos attiecīgu augšanas modeli (OECD monograph 54, (32)).

Testējamā viela:

- jebkāda informācija par testējamās vielas stabilitāti sagatavotajā barībā.

Testēšanas nosacījumi:

- vielas nominālā koncentrācija barībā, papildināšanas paņēmieni, barības papildināšanā izmantotā (lipīdu) nesēja daudzums (ja izmanto), testējamās vielas koncentrācijas mērījumi papildinātajā barībā katrai analīzei (vismaz trīs reizes pirms pētījuma sākšanas un uzņemšanas beigās) un vidējās vērtības;
- ja tādus izmanto, barības papildināšanai izmantotā nesēja eļļas vai šķīdinātāja (tīrība, piegādātājs utt.) veids un kvalitāte;
- izmantotais barības veids (proksimāta analīze ⁽¹⁾, tīrība vai kvalitāte, piegādātājs utt.), barošanas intensitāte uzņemšanas fāzes laikā, dotās barības daudzums un biežums (tostarp korekcijas uz paraugoto zivju svara bāzes);
- laiks, kad zivis katrā paraugošanas punktā (piemēram, vienu stundu pirms nākamās barošanas reizes dienā) savāktas un eitanizētas ķīmiskās analīzes nolūkam.

Rezultāti:

- jebkādu iepriekš veiktu pētniecisko darbību rezultāti;
- informācija par jebkādu novērotu negatīvu ietekmi;
- pilnīgs apraksts par visām izmantotajām ķīmiskās analīzes procedūrām, tostarp detektēšanas un kvantitatīvās noteikšanas robežas, mainība un atgūstamība;
- izmērītās lipīdu koncentrācijas barībā (papildinātajā un kontroles barībā), individuālās vērtības, vidējās vērtības un standartnovirzes;
- tabulā norādīti dati par zivs svaru (un garumu), kas saistīti ar atsevišķu zivi, gan kontroles, gan eksponētajās grupās (piemēram, katrai zivij izmantojot unikālus identifikatorus), un aprēķini par iegūto(-ām) augšanas ātruma konstanti(-ēm) un 95 % ticamības intervālu(-iem);
- tabulā norādīti dati par testējamās vielas koncentrāciju zivju organismā, izmērītā vidējā koncentrācija uzņemšanas beigās ($C_{0,m}$) un iegūtā (kopējā) izvadīšanas ātruma konstante (k_2), un koncentrācija zivs organismā izvadīšanas fāzes sākumā ($C_{0,d}$) kopā ar šo vērtību dispersijām (liknes stāvums un vienādojuma brīvais loceklis);
- tabulā norādīti dati par zivju lipīdsaturu (attiecīgā gadījumā attiecībā pret specifisku vielas koncentrāciju), testgrupu un kontrolgrupu vidējās vērtības testa sākumā, uzņemšanas beigās un izvadīšanas beigās;
- liknes (tostarp visi mērītie dati), kas atspoguļo turpmāk norādīto (attiecīgā gadījumā koncentrācijas var izteikt visam dzīvnieka ķermenim vai konkrētiem tā audiem):
 - augšana (t. i., zivs svars (un garums) pret laiku) vai naturāllogaritmā transformēts svars pret laiku;
 - testējamās vielas izvadīšana no zivs organisma; un
 - naturāllogaritmā transformētā koncentrācija ($\ln$ koncentrācija) pret izvadīšanas laiku (arī iegūtā izvadīšanas ātruma konstante k_2 un no naturāllogaritma iegūtā koncentrācija zivs organismā izvadīšanas fāzes sākumā $C_{0,d}$);
- ja grafiskā attēlojuma vizuālajā pārbaudē ir acīmredzamas izlecošās vērtības, maldīgus datu punktus likvidēt, kā arī to trūkumu dokumentēti pamatot var ar statistiski derīgu izlecošo vērtību testu;

⁽¹⁾ Pārtikas produktu analīzes paņēmieni olbaltumvielu, lipīdu, jēlšķiedras un pelnu satura noteikšanai; šī informācija parasti ir pieejama no barības piegādātāja.

- aprēķinātā ar augšanu koriģētā izvadīšanas ātruma konstante un ar augšanu koriģētais pussabrukšanas periods;
- aprēķinātā asimilācijas efektivitāte (α);
- “neapstrādāts” uztura BMF, ar lipīdiem koriģēts un ar augšanas izraisītu atšķaidījumu koriģēts kinētiskais BMF (“neapstrādāts” un ar lipīdiem koriģēts, uz veselās zivs slapjsvara bāzes), attiecīgā gadījumā audiem specifisks BMF;
- jebkāda informācija par radioaktīvi iezīmētas testējamās vielas metabolītiem un to uzkrāšanos;
- viss neierastais attiecībā uz testu, visas novirzes no šīm procedūrām un jebkāda cita būtiska informācija;
- tālāk sniegtā kopsavilkuma tabula ar būtiskajiem izmērītajiem un aprēķinātajiem datiem.

Vielas izvadīšanas ātruma konstantes un biomagnifikācijas koeficienti (BMF_K)	
k_g (augšanas ātruma konstante; diena ⁻¹):	Ievietot vērtību (95 % TI) ⁽¹⁾
k_2 (kopējā izvadīšanas ātruma konstante; diena ⁻¹):	Ievietot vērtību (95 % TI)
k_2 (ar augšanu koriģēta izvadīšanas ātruma konstante; diena ⁻¹):	Ievietot vērtību (95 % TI) ⁽¹⁾
$C_{0,m}$ (izmērītā nulles laika koncentrācija, koncentrācija zivs organismā uzņemšanas fāzes beigās (μg/g):	Ievietot vērtību ± SN ⁽²⁾
$C_{0,d}$ (iegūtā izvadīšanas fāzes nulles laika koncentrācija; μg/g):	Ievietot vērtību ± SN ⁽²⁾
I (noteiktais barības uzņemšanas ātrums; g barības uz g zivju dienā):	Ievietot vērtību
I_g (spēkā esošā barošanas intensitāte, kas koriģēta ar augšanu; g barības uz g zivju dienā) ⁽²⁾ :	Ievietot vērtību ± SN ⁽²⁾
C_{food} (ķīmikālijas koncentrācija barībā; μg/g):	Ievietot vērtību ± SN ⁽²⁾
α (vielas asimilācijas efektivitāte):	Ievietot vērtību ± SN ⁽²⁾
BMF_K (kinētiskais barības BMF):	Ievietot vērtību (95 % TI) ⁽¹⁾
BMF_{Kg} (ar augšanu koriģēts kinētiskais barības BMF):	Ievietot vērtību (95 % TI) ⁽¹⁾
$t_{1/2g}$ (ar augšanu koriģēts pussabrukšanas periods dienās):	Ievietot vērtību ± SN ⁽²⁾
L_c (lipīdu korekcijas koeficients):	Ievietot vērtību
BMF_{Kgl} (ar lipīdiem un ar augšanu koriģēts kinētiskais BMF):	Ievietot vērtību
BMF_{SS-L} (indikātors ar lipīdiem koriģēts stacionārās fāzes BMF) ⁽²⁾ :	Ievietot vērtību ± SN ⁽²⁾

⁽¹⁾ TI: ticamības intervāls (ja iespējams novērtēt).

⁽²⁾ SN: standartnovirze (ja iespējams novērtēt).

LITERATŪRAS SARAKSTS

- (1) Chapter C.13 of this Annex, *Bioconcentration: Flow-through Fish Test*.
- (2) Chapter A.6 of this Annex, *Water Solubility*
- (3) Li A, Doucette W.J. (1993), The effect of cosolutes on the aqueous solubilities and octanol/water partition coefficients of selected polychlorinated biphenyl congeners. *Environ Toxicol Chem* 12: 2031-2035
- (4) Chapter A.8 of this Annex, Partition Coefficient (n-octanol/water): Shake Flask Method.
- (5) Chapter A.24 of this Annex, Partition Coefficient (n-octanol/water), HPLC Method.
- (6) Chapter A.23 of this Annex, Partition Coefficient (1-Octanol/Water): Slow-Stirring Method.
- (7) Chapter C.7 of this Annex, Hydrolysis as a Function of pH.
- (8) (OECD (1997), OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment Number 7: Guidance Document on Direct Phototransformation of Chemicals in Water OCDE/GD(97)21. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), Paris, France.
- (9) Chapter A.5 of this Annex, Surface Tension of Aqueous Solutions.
- (10) Chapter A.4 of this Annex, Vapour Pressure.
- (11) Chapter C.4 of this Annex, Ready Biodegradability.
- (12) Chapter C.29 of this Annex, Ready Biodegradability – CO₂ in sealed vessels
- (13) Connell D.W. (1988), Bioaccumulation behaviour of persistent chemicals with aquatic organisms. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 102: 117-156.
- (14) Bintein S., Devillers J. and Karcher W. (1993), Nonlinear dependence of fish bioconcentration on *n*-octanol/water partition coefficient. *SAR QSAR Environ. Res.* 1: 29-39.
- (15) OECD (2011), QSAR Toolbox 2.1. February 2011. Available from: http://www.oecd.org/document/54/0,3746,en_2649_34379_42923638_1_1_1_1,00.html.
- (16) Brown R.S., Akhtar P., Åkerman J., Hampel L., Kozin I.S., Villerius L.A. and Klammer H.J.C. (2001), Partition controlled delivery of hydrophobic substances in toxicity tests using poly(dimethylsiloxane) (PDMS) films. *Environ. Sci. Technol.* 35: 4097-4102.
- (17) Fernandez J.D., Denny J.S. and Tietge J.E. (1998), A simple apparatus for administering 2,3,7,8-tetrachloro-dibenzo-*p*-dioxin to commercially available pelleted fish food. *Environ. Toxicol. Chem.* 17: 2058-2062.
- (18) Nichols J.W., Fitzsimmons P.N., Whiteman F.W. and Dawson T.D. (2004), A physiologically based toxicokinetic model for dietary uptake of hydrophobic organic compounds by fish: I. Feeding studies with 2,2', 5,5'-tetrachlorobiphenyl. *Toxicol. Sci.* 77: 206-218.
- (19) Parkerton T.F., Arnot J.A., Weisbrod A.V., Russom C., Hoke R.A., Woodburn K., Traas T., Bonnell M., Burkhard L.P. and Lampi M.A. (2008), Guidance for evaluating *in vivo* fish bioaccumulation data. *Integr. Environ. Assess. Manag.* 4: 139-155.
- (20) Verbruggen E.M.J., Beek M., Pijnenburg J. and Traas T.P. (2008). Ecotoxicological environmental risk limits for total petroleum hydrocarbons on the basis of internal lipid concentrations. *Environ. Toxicol. Chem.* 27: 2436-2448.
- (21) Schlechtriem C., Flieger A. and Schäfers C. (2012), Determination of lipid content in fish samples from bioaccumulation studies: Contributions to the revision of OECD Test Guideline 305. *Environmental Sciences Europe* 2012, 24:13. published: 3 April 2012.

- (22) Chapter C.47 of this Annex, Fish, Early-Life Stage Toxicity Test.
- (23) Chapter C.15 of this Annex, Fish, Short-term Toxicity Test on Embryo and Sac-Fry Stages
- (24) Chapter C.14 of this Annex, Fish, Juvenile Growth Test.
- (25) OECD (2000), OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 23: Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures ENV/JM/MONO(2000)6. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), Paris, France.
- (26) US-EPA (1994), Great Lake water quality initiative technical support document for the procedure to determine bioaccumulation factors 822-R-94-002. US EPA, Office of Water, Office of Science and Technology, Washington, DC, USA.
- (27) US-FDA (1999), Pesticide analytical manual (PAM). Vol.1. US Food and Drug Administration, Rockville, MD, USA.
- (28) US-EPA (1974), Section 5, A (1) Analysis of Human or Animal Adipose Tissue, in Analysis of Pesticide Residues in Human and Environmental Samples, Thompson, J.F., Editor. US-EPA, Research Triangle Park, NC, USA
- (29) Bligh E.G. and Dyer W.J. (1959), A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37: 911-917.
- (30) Gardner W.S., Frez W.A., Cichocki E.A. and Parrish C.C. (1985), Micromethod for lipids in aquatic invertebrates. *Limnol. Oceanogr.* 30: 1099-1105.
- (31) Smedes F. (1999), Determination of total lipid using non-chlorinated solvents. *Analyst.* 124: 1711-1718.
- (32) OECD (2006), OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 54: Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: a guidance to application. ENV/JM/MONO(2006)18. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), Paris, France.
- (33) Springer T.A., Guiney P.D., Krueger H.O. and Jaber M.J. (2008), Assessment of an approach to estimating aquatic bioconcentration factors using reduced sampling. *Environ. Toxicol. Chem.* 27: 2271-2280.
- (34) Springer T.A. (2009), Statistical Research Related to Update of OECD Guideline 305. Wildlife International, Ltd, Easton, MD, USA.
- (35) Arnot J.A., Meylan W., Tunkel J., Howard P.H., Mackay D., Bonnell M. and Boethling R.S. (2009), A quantitative structure-activity relationship for predicting metabolic biotransformation rates for organic chemicals in fish. *Environ. Toxicol. Chem.* 28: 1168-1177.
- (36) Parkerton T., Letinski D., Febbo E., Davi R., Dzambia C., Connelly M., Christensen K. and Peterson D. (2001), A practical testing approach for assessing bioaccumulation potential of poorly water soluble organic chemicals (presentation). in SETAC Europe 12th Annual Meeting: Madrid, Spain.
- (37) Fisk A.T., Cymbalisky C.D., Bergman Å. and Muir D.C.G. (1996), Dietary accumulation of C₁₂- and C₁₆-chlorinated alkanes by juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Environ. Toxicol. Chem.* 15: 1775-1782.
- (38) Anonymous (2004), Fish, dietary bioaccumulation study – Basic protocol, document submitted to the TC-NES WG on PBT.
- (39) Anonymous (2004), Background document to the fish dietary study protocol, document submitted to the TC-NES WG on PBT.
- (40) Bruggeman W.A., Opperhuizen A., Wijnnga A. and Hutzinger O. (1984), Bioaccumulation of super-lipophilic chemicals in fish, *Toxicol. Environ. Chem.* 7: 173-189.
- (41) Muir D.C.G., Marshall W.K. and Webster G.R.B. (1985), Bioconcentration of PCDDs by fish: effects of molecular structure and water chemistry. *Chemosphere.* 14: 829-833.

- (42) Thomann R.V. (1989), Bioaccumulation model of organic chemical distribution in aquatic food chains. Environ. Sci. Technol. 23: 699-707.
- (43) Nichols J.W., Fitzsimmons P.N. and Whiteman F.W. (2004), A physiologically based toxicokinetic model for dietary uptake of hydrophobic organic compounds by fish: II. Stimulation of chronic exposure scenarios. Toxicol. Sci. 77: 219-229.
- (44) Gobas F.A.P.C., de Wolf W., Burkhard L.P., Verbruggen E. and Plotzke K. (2009), Revisiting bioaccumulation criteria for POPs and PBT assessments. Integr. Environ. Assess. Manag. 5: 624-637.
- (45) Sijm D.T.H.M. and van der Linde A. (1995), Size-dependent bioconcentration kinetics of hydrophobic organic chemicals in fish based on diffusive mass transfer and allometric relationships. Environ. Sci. Technol. 29: 2769-2777.
- (46) Sijm D.T.H.M., Verberne M.E., de Jonge W.J., Pärt P. and Opperhuizen A. (1995), Allometry in the uptake of hydrophobic chemicals determined *in vivo* and in isolated perfused gills. Toxicol. Appl. Pharmacol. 131: 130-135.
- (47) Fisk A.T., Norstrom R.J., Cymbalisty C.D. and Muir D.G.G. (1998), Dietary accumulation and depuration of hydrophobic organochlorines: Bioaccumulation parameters and their relationship with the octanol/water partition coefficient. Environ. Toxicol. Chem. 17: 951-961.
- (48) McGrath J.A., Parkerton T.F. and Di Toro D.M. (2004), Application of the narcosis target lipid model to algal toxicity and deriving predicted-no-effect concentrations. Environ. Toxicol. Chem. 23: 2503-2517.
- (49) Poppendieck D.G. (2002), Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Desorption Mechanisms from Manufactured Gas Plant Site Samples. Dissertation. Department of Civil, Architectural and Environmental Engineering, University of Texas, Austin, TX, USA.
- (50) McCarty L.S. and Mackay D. (1993), Enhancing ecotoxicological modelling and assessment: body residues and modes of toxic action. Environ. Sci. Technol. 27: 1718-1728.
- (51) OECD (2012), OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 175: Part I – Validation Report of a ring test for the OECD TG 305 dietary exposure bioaccumulation fish test. Part II – Additional Report including comparative analysis of trout and carp results ENV/JM/MONO (2012)20. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), Paris, France.
-

1. papildinājums

DEFINĪCIJAS UN MĒRVIENTĪBAS

Asimilācijas efektivitāte (α) ir tā relatīvā vielas apjoma mērs, kas no zarnām uzsūcas organismā (α nav mērvienību, bet to bieži izsaka procentos, nevis kā daļu).

Bioakumulācija parasti apzīmē procesu, kurā vielas koncentrācija organismā sasniedz tādu līmeni, kas pārsniedz līmeni elpošanas vidē (piemēram, ūdens zivij vai gaisā zīdītājam), barībā vai abos (1).

Biokoncentrēšanās ir testējamās vielas koncentrācijas pieaugums organismā vai uz tā virsmas (vai konkrētos tā audos) attiecībā pret testējamās vielas koncentrāciju apkārtējā vidē.

Biokoncentrēšanās koeficients (BCF jeb K_p) jebkurā laikā šā akumulācijas testa uzņemšanas fāzē ir testējamās vielas koncentrācija zivs organismā, uz tā virsmas, vai noteiktos tās audos (C_f kā mg/kg), dalīta ar vielas koncentrāciju apkārtējā vidē (C_w kā mg/l). BCF izsaka $\text{l}\cdot\text{kg}^{-1}$. Jāņem vērā, ka korekcijas attiecībā uz augšanu un/vai standarta lipīdsaturu nav ierēķinātas.

Biomagnifikācija ir testējamās vielas koncentrācijas pieaugums organismā vai uz tā virsmas (vai konkrētos tā audos) attiecībā pret testējamās vielas koncentrāciju barībā.

Biomagnifikācijas koeficients (BMF) ir vielas koncentrācija plēsīga dzīvnieka organismā attiecībā pret tās koncentrāciju plēsīga dzīvnieka laupījumā (vai barībā) stacionārā fāzē. Šajā testēšanas metodē aprakstītā metode no ūdensekspozīcijas fāzes rūpīgi izvairās, tāpēc ar šo testēšanas metodi iegūtu BMF vērtību nav iespējams tieši salīdzināt ar lauka pētījumā iegūtu BMF vērtību (kurā var būt apvienota gan ūdensekspozīcija, gan barībekspozīcija).

Uzturiskais biomagnifikācijas koeficients (uzturiskais BMF) ir termins, ko šajā testēšanas metodē izmanto, lai apzīmētu rezultātu, kas gūts uzturekspozīcijas testā, kurā notiek piesardzīga izvairīšanās no ūdensekspozīcijas fāzes, tāpēc ar šo testēšanas metodi iegūtu uzturiskā BMF vērtību nav iespējams tieši salīdzināt ar lauka pētījumā iegūtu BMF vērtību (kurā var būt apvienota gan ūdensekspozīcija, gan barībekspozīcija).

Izvadīšanas jeb pēcekspozīcijas (zuduma) fāze ir laiks pēc testa zivju pārvietošanas no vides, kas satur testējamo vielu, vidē, kas šo vielu nesatur; šajā laikā tiek pētīta vielas izvadīšana (jeb neto zudums) no testa zivīm (vai konkrētiem to audiem).

Izvadīšanas (zuduma) ātruma konstante (k_2) ir skaitliska vērtība, kas raksturo testējamās vielas koncentrācijas samazināšanos testa zivīs (vai konkrētos to audos) pēc testa zivju pārvietošanas no testējamo vielu saturošas vides uz šo vielu nesaturošu vidi (k_2 izsaka dienā^{-1}).

Izšķīdušais organiskais ogleklis (DOC) ir oglekļa koncentrācijas mērs, kura izcelsme ir testa vidē izšķīduši bioloģiskie avoti.

Ekspozīcijas jeb uzņemšanas fāze ir laiks, kurā zivis ir eksponētas testējamajai vielai.

Barības uzņemšanas ātrums (I) ir vidējais barības daudzums, ko katra zivs apēd katru dienu, attiecībā pret aplēsto zivs vidējo ķermeņa masu (kas izteikta kā g barības uz g zivs masas dienā).

Kinētiskais biokoncentrēšanās koeficients (BCF_k) ir uzņemšanas ātruma konstantes k_1 attiecība pret izvadīšanas ātruma konstanti k_2 (t. i., k_1/k_2 – attiecīgās definīcijas sk. šajā papildinājumā). Šai vērtībai būtībā jābūt salīdzināmai ar BCF_{ss} (definīciju sk. iepriekš), taču var rasties novirzes, ja stacionārā fāze nav noteikta vai ja kinētiskais BCF ir koriģēts ar augšanu.

Ar lipīdiem normalizēts kinētiskais biokoncentrēšanās koeficients (BCF_{kl}) ir normalizēts zivij ar lipīdsaturu 5 %.

Ar lipīdiem normalizēts un ar augšanu koriģēts kinētiskais biokoncentrēšanās koeficients (BCF_{kgl}) ir normalizēts zivij ar lipīdsaturu 5 % un koriģēts ar augšanu pētījuma perioda laikā, kā aprakstīts 5. papildinājumā.

Ar lipīdiem normalizēts stacionārās fāzes biokoncentrēšanās koeficients (BCF_{ssl}) ir normalizēts zivij ar lipīdsaturu 5 %.

REACH regulas nolūkam daudzkomponentu viela ir definēta kā viela, kam ir vairāk nekā viena galvenā sastāvdaļa ar koncentrāciju no 10 % līdz 80 % (masas).

Oktanola-ūdens sadalījuma koeficients (K_{ow}) ir attiecība, kas raksturo vielas šķīdību *n*-oktanolā pret tās šķīdību ūdenī stacionārā fāzē (metodes A.8. (2), A.24. (3), A.23. (4)), izteic arī ar P_{ow} . K_{ow} logaritmu izmanto kā rādītāju, kas raksturo potenciālo vielas biokoncentrāciju ūdens organismos.

Organiskā oglekļa daļiņas (POC) ir koncentrācijas mērs ogleklim, kas testa vidē radies no suspendētiem organiskiem avotiem.

Cietās fāzes mikroekstrakcija (SPME) ir atšķaidīšanas sistēmām izstrādāts analītiskais paņēmieni bez šķīdinātājiem. Šajā metodē ar polimēru pārklātu šķiedru eksponē gāzes vai šķidrā fāzei, kas satur interesējošo analizējamo vielu. Parasti izmanto minimālu analīzes laiku, lai starp cietajām un šķidrām fāzēm panāktu stacionāro fāzi, ņemot vērā mērīto sugu. Pēc tam interesējošās analizējamās vielas koncentrāciju var noteikt tieši no šķiedras vai pēc tās ekstrakcijas no šķiedras šķīdinātājā atkarībā no noteikšanas paņēmiena.

Testējamās vielas zivs organismā grafiskajā attēlojumā stacionārā fāze (C_f) attiecībā pret laiku ir sasniegta tad, kad līkne kļūst paralēla laika asij un trim pēc kārtas veiktām C_f analīzēm ar paraugiem, kas ņemti ar vismaz divu dienu starplaikiem, savstarpējā sakritība ir ± 20 % robežās, un laikā starp pirmo un pēdējo secīgo analīzi nav novērojams būtisks C_f pieaugums. Analizējot apvienotus paraugus, ir vajadzīgas vismaz četras sekojošas analīzes. Testējamām vielām, ko uzņem lēni, piemērotāki intervāli ir septiņas dienas.

Līdzsvara biokoncentrēšanās koeficients (BCF_{ss}) ilgākā laikā būtiski nemainās, ja testējamās vielas koncentrācija apkārtējā vidē šajā laikā ir konstanta (sal. ar "stacionārās fāzes" definīciju).

Kopējā organiskā oglekļa saturs (TOC) ir koncentrācijas mērs ogleklim, kas testa vidē radies no visiem organiskajiem avotiem, tostarp daļiņu avotiem un izšķīdušiem avotiem.

Uzņemšanas ātruma konstante (k_1) ir skaitliska vērtība, kas nosaka testējamās vielas koncentrācijas pieauguma ātrumu testa zivju organismā vai uz to virsmas (vai konkrētos to audos), ja zivis ir eksponētas šai vielai (k_1 izsaka l kg⁻¹ dienā⁻¹).

Vielas, kuru sastāvs nav zināms vai ir mainīgs, kuras ir kompleksi reakcijas produkti vai bioloģiski materiāli, sauc par UVCB.

Ķimikālija ir viela vai maisījums.

Testējamā ķimikālija ir jebkura viela vai maisījums, ko testē ar šo testēšanas metodi.

LITERATŪRAS SARAKSTS

- (1) Gobas F.A.P.C., de Wolf W., Burkhard L.P., Verbruggen E. and Plotzke K. (2009), Revisiting bioaccumulation criteria for POPs and PBT assessments. Integr. Environ. Assess. Manag. 5: 624-637.

- (2) Šā pielikuma A.8. nodaļa “Sadalījuma koeficients (oktanola–ūdens):” kolbu kratīšanas “metode”.
 - (3) Šā pielikuma A.24. nodaļa “Sadalījuma koeficients (oktanola–ūdens): HPLC metode”.
 - (4) Šā pielikuma A.23. nodaļa “Sadalījuma koeficients (1-oktanola–ūdens): lēnās maisīšanas metode”.
-

2. papildinājums

TESTA NOSACĪJUMI, ILGUMS UN IZDZĪVOTĪBAS KRITĒRIJI IETEICAMAJĀM SUGĀM

Komponents	Robežkoncentrācija
Suspendētās daļiņas	5 mg/l
Kopējais organiskais ogleklis	2 mg/l
Nejonizētais amonjaks	1 µg/l
Hlora atlikumi	10 µg/l
Kopējie fosfororganiskie pesticīdi	50 ng/l
Kopējie hlororganiskie pesticīdi un polihlorbifenili	50 ng/l
Kopējais organiskais hlors	25 ng/l
Alumīnijs	1 µg/l
Arsēns	1 µg/l
Hroms	1 µg/l
Kobalts	1 µg/l
Varš	1 µg/l
Dzelzs	1 µg/l
Svins	1 µg/l
Niķelis	1 µg/l
Cinks	1 µg/l
Kadmija	100 ng/l
Dzīvsudrabs	100 ng/l
Sudrabs	100 ng/l

3. papildinājums

TESTĒŠANAI IETEICAMĀS ZIVJU SUGAS

Ieteicamās sugas	Ieteicamais testēšanas temperatūras diapazons (°C)	Ieteicamais kopējais testa dzīvnieku garums (cm) ⁽²⁾
<i>Danio rerio</i> ⁽¹⁾ (Teleostei, Cyprinidae) (Hamilton-Buchanan) Zebrzivis	20 – 25	3,0 ± 0,5
<i>Pimephales promelas</i> (Teleostei, Cyprinidae) (Rafinesque) Melngalvas mailīte	20 – 25	5,0 ± 2,0
<i>Cyprinus carpio</i> (Teleostei, Cyprinidae) (Linnaeus) Parastā karpa	20 – 25	8,0 ± 4,0 ⁽³⁾
<i>Oryzias latipes</i> (Teleostei, Poeciliidae) (Temminck un Schlegel) Rīsu zivs	20 – 25	4,0 ± 1,0
<i>Poecilia reticulata</i> (Teleostei, Poeciliidae) (Peters) Gupija	20 – 25	3,0 ± 1,0
<i>Lepomis macrochirus</i> (Teleostei, Centrarchidae) (Rafinesque) Zilais saulesasaris	20 – 25	5,0 ± 2,0
<i>Oncorhynchus mykiss</i> (Teleostei, Salmonidae) (Walbaum) Varavīksnes forele	13 – 17	8,0 ± 4,0
<i>Gasterosteus aculeatus</i> (Teleostei, (Gasterosteidae) (Linnaeus) Trīsdatu stagars	18 – 20	3,0 ± 1,0

⁽¹⁾ Meyer et al. (1)

⁽²⁾ Jāpiebilst, ka pašā testā vēlamais mērs iegūtajām izmēra un augšanas ātruma konstantēm ir svars. Tomēr tiek atzīts, ka garumu izmantot ir praktiskāk, ja eksperimenta sākumā zivs jāizraugās vizuāli (t. i., no pamatgrupas).

⁽³⁾ Šis garuma diapazons ir norādīts dokumentā "Testing Methods for New Chemical Substances" utt., pamatojoties uz Japānas likumu par ķīmisko vielu kontroli (CSCL).

Mazāk plaši izmantotas dažādas upju grīvu un jūras zivju sugas, piemēram:

Punktotā bungzivis	(<i>Leiostomus xanthurus</i>)
Lāsumainais jūrasgrundulis	(<i>Cyprinodon variegatus</i>)
Saldūdens menīdija	(<i>Menidia beryllina</i>)
Zeltais jūrasasaris	(<i>Cymatogaster aggregata</i>)
Kalifornijas jūrasmele	(<i>Parophrys vetulus</i>)
Ziemeļatlantijas ragainā bulļzivis	(<i>Leptocottus armatus</i>)
Trīsdatu stagars	(<i>Gasterosteus aculeatus</i>)
Jūras asaris	(<i>Dicentrarchus labrax</i>)
Vīķe	(<i>Alburnus alburnus</i>)

Tabulā norādītās saldūdens zivis ir viegli audzējamas un/vai viegli pieejamas visu gadu, savukārt jūras un upju grīvu zivis daļēji ir iegūstamas attiecīgajās valstīs. Tās var audzēt un kultivēt vai nu zivjaudzētavās, vai laboratorijā slimību un parazītu kontroles apstākļos, tā, lai testa dzīvnieki būtu veseli un ar zināmu izcelsmi. Šīs zivis ir pieejamas daudzviet pasaulē.

LITERATŪRAS SARAKSTS

- (1) Meyer A., Biermann C.H. and Orti G. (1993), The phylogenetic position of the zebrafish (*Danio rerio*), a model system in developmental biology: An invitation to the comparative method *Proc. R. Soc. Lond. B.* 252: 231-236.
-

4. papildinājums

PARAUGOŠANAS GRAFIKI ŪDENSEKSPOZĪCIJAS UN BARĪBEKSPOZĪCIJAS TESTIEM

1. Teorētisks piemērs paraugošanas grafikam pilnā ūdensekspozīcijas biokoncentrēšanās testā vielai ar $\log K_{ow} = 4$.

Zivju paraugošana	Paraugošanas laika grafiks		Ūdens paraugu skaits ⁽¹⁾	Zivju skaits paraugā ⁽¹⁾
	Minimālais vajadzīgais biežums (dienas) ⁽²⁾	Papildu paraugošana (dienas) ⁽²⁾		
Uzņemšanas fāze				
1	-1		2 ⁽³⁾	4 ⁽⁴⁾
	0		(2)	(3 ⁽⁴⁾)
2	0,3		2	4
		0,4	(2)	(4)
3	0,6		2	4
		0,9	(2)	(4)
4	1,2		2	4
		1,7	(2)	(4)
5	2,4		2	4
		3,3	(2)	(4)
6	4,7		2	4 – 8 ⁽⁵⁾
				(3 ⁽⁵⁾)
Izvadīšanas fāze				Zivis pārvieto ūdenī, kas nesatur testējamo vielu
7	5,0		2	4
		5,3		(4)
8	5,9		2	4
		7,0		(4)
9	9,3		2	4
		11,2		(4)

Zivju paraugošana	Paraugošanas laika grafiks		Ūdens paraugu skaits ⁽¹⁾	Zivju skaits paraugā ⁽¹⁾
	Minimālais vajadzīgais biežums (dienas) ⁽²⁾	Papildu paraugošana (dienas) ⁽²⁾		
Uzņemšanas fāze				
10	14,0		2	4 – 8 ⁽⁵⁾
		17,5		(4 + 3 ⁽⁶⁾)
KOPĀ				40 – 72 (48 – 80) ⁽⁵⁾

⁽¹⁾ Skaitļi iekavās ir paraugu skaits (ūdenim, zivīm), kas jāņem, ja tiek veikta papildu paraugošana.

⁽²⁾ Pirmspārbaudes skaitliski novērtētais k_2 pie $\log K_{ow}$ lieluma 4,0 ir 0,652 dienas⁻¹. Kopējais eksperimenta ilgums ir noteikts $3 \times t_{ss} = 3 \times 4,6$ dienas, t. i., 14 dienas. " t_{ss} " aplēses noteikšanu sk. 5. papildinājumā.

⁽³⁾ Ūdens paraugu ņem pēc tam, kad pievadīti vismaz 3 "kameru tilpumi" ūdens.

⁽⁴⁾ Šis zivis paraugo no pamatgrupas.

⁽⁵⁾ Ja nepieciešama lielāka precizitāte vai metabolisma pētījumi, kuros nepieciešams vairāk zivju, tās jāparaugo tieši uzņemšanas un izvadīšanas fāžu beigās (sal. ar 40. punktu).

⁽⁶⁾ Ja nav iespējams izmantot to pašu zivi, kas vielu koncentrāciju noteikšanai paraugota testa sākumā, uzņemšanas fāzes beigās un izvadīšanas fāzes beigās, lipīdsatura analīzei var būt nepieciešamas vismaz 3 papildu zivis. Jāņem vērā, ka daudzos gadījumos iespējams izmantot vienīgi 3 kontroles zivis (sal. ar 56. punktu).

2. Teorētisks piemērs uzturiska bioakumulācijas testa paraugošanas grafikam pēc 10 dienu ilgas vielas uzņemšanas un 42 dienu ilgas izvadīšanas fāzes.

Paraugošanas notikums	Paraugošanas laika grafiks		Barības paraugu skaits	Zivju skaits paraugā	
	Fāzes diena	Vai jāizmanto papildu zivju paraugi?		Testgrupa	Kontrolgrupa
Uzņemšanas fāze					
1	0	Iespējams ⁽⁴⁾ ⁽²⁾	3 – testgrupa	0	5 – 10
			3 – kontrolgrupa ⁽¹⁾		(8 – 13) ⁽²⁾
1A ⁽³⁾	1-3			5 – 10	5 – 10
2	10	Jā ⁽⁴⁾	3 – testgrupa	10 – 15 ⁽⁴⁾	5 – 10
			3 – kontrolgrupa ⁽¹⁾	(13 – 18) ⁽⁵⁾	(8 – 13) ⁽⁵⁾
Izvadīšanas fāze					
3	1	Jā ⁽⁴⁾		10 – 15 ⁽⁴⁾	5 – 10
4	2			5 – 10	5 – 10
5	4			5 – 10	5 – 10

Paraugošanas notikums	Paraugošanas laika grafiks		Barības paraugu skaits	Zivju skaits paraugā	
	Fāzes diena	Vai jāizmanto papildu zivju paraugi?		Testgrupa	Kontrolgrupa
Uzņemšanas fāze					
6	7	Jā ⁽⁴⁾		10 – 15 ⁽⁴⁾	5 – 10
7	14			5 – 10	5 – 10
8	28			5 – 10	5 – 10
9	42	Jā ⁽⁴⁾		10 – 15 ⁽⁴⁾ (13 – 18) ⁽⁴⁾	5 – 10 (8 – 13) ⁽⁵⁾
KOPĀ				59 – 120 (63 – 126) ⁽⁴⁾ ⁽⁵⁾	50 – 110 (56 – 116) ⁽⁴⁾ ⁽⁵⁾

⁽¹⁾ Gan no kontrolgrupas, gan testgrupas 3 barības paraugi, kas analizēti attiecībā uz testējamās vielas koncentrācijām un lipīdsaturu.

⁽²⁾ Zivis paraugo no pamatgrupas iespējami tuvu pētījuma sākumam; testa sākumā attiecībā uz lipīdsaturu jāparaugo vismaz 3 zivis no pamatgrupas.

⁽³⁾ (Pēc izvēles veikta) paraugošana uzņemšanas fāzes agrīnā posmā nodrošina datus, no kuriem aprēķināt tādu testējamās vielas uzturasimilāciju, ko var salīdzināt ar asimilācijas efektivitāti, kas aprēķināta no izvadīšanas fāzes datiem.

⁽⁴⁾ Papildu 5 zivis var paraugot, lai veiktu audiem specifisku analīzi.

⁽⁵⁾ Ja nav iespējams izmantot to pašu zivi, kas vielu koncentrāciju noteikšanai paraugota testa sākumā, uzņemšanas fāzes beigās un izvadīšanas fāzes beigās, lipīdsatura analīzei var būt nepieciešamas vismaz 3 papildu zivis. Jāņem vērā, ka daudzos gadījumos ir iespējams izmantot tikai 3 kontroles zivis (sal. ar 56. un 153. punktu).

Piebilde par fāžu un paraugošanas laikiem. Uzņemšanas fāze sākas ar pirmo papildinātās barības došanas reizi. Eksperimenta diena sākas ar pirmo barošanas reizi un beidzas pēc 24 stundām, neilgi pirms nākamās barošanas reizes. Pirmā paraugošana (tabulā apzīmēta ar 1) jāveic neilgi (piemēram, vienu stundu) pirms pirmās barošanas reizes. Ideālā gadījumā paraugošana pētījuma laikā jāveic neilgi pirms nākamajā dienā paredzētās barošanas (t. i., apmēram 23 stundas pēc barošanas paraugošanas dienā). Uzņemšanas fāze beidzas neilgi pirms pirmās reizes, kad dod nepapildinātu barību, un tad sākas izvadīšanas fāze (nākamās 24 stundas pēc pēdējās barošanas ar papildināto barību testgrupas zivis, visticamāk, vēl sagremos papildināto barību). Tas nozīmē, ka izvadīšanas beigu paraugs jāņem neilgi pirms pirmās barošanas ar papildināto barību un pirmās izvadīšanas fāzes paraugs jāņem apmēram 23 stundas pēc pirmās barošanas ar papildināto barību.

5. papildinājums

VISPĀRĪGI APRĒĶINI

1. Ievads
2. Prognozes par uzņemšanas fāzes ilgumu
3. Prognozes par izvadīšanas fāzes ilgumu
4. Secīgā metode: izvadīšanas (zuduma) ātruma konstantes k_2 noteikšana
5. Secīgā metode: uzņemšanas ātruma konstantes k_1 noteikšana (vienīgi ūdensekspozīcijas metodei)
6. Vienlaicīgā metode uzņemšanas un izvadīšanas (zuduma) ātruma konstanšu aprēķināšanai (vienīgi ūdensekspozīcijas metodei)
7. Augšanas izraisīta atšķaidījuma koriģēšana kinētiskajam BCF un BMF
8. Lipīdu normalizācija līdz lipīdsaturam 5 % (vienīgi ūdensekspozīcijas metodei)

1. IEVADS

Vispārīgo zivju ūdens bioakumulācijas modeli var aprakstīt kā uzņemšanas un zuduma procesus, neņemot vērā uzņemšanu ar barību. Diferenciālais vienādojums (dC_f/dt), kas raksturo ātrumu, ar kādu mainās koncentrācija zivs organismā ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{dienā}^{-1}$), ir sniegts turpmāk (1):

$$\frac{dC_f}{dt} = k_1 \times C_w - (k_2 + k_g + k_m + k_e) \times C_f \quad [\text{Vienādojums A5.1.}]$$

Kur

k_1 = pirmās pakāpes ātruma konstante attiecībā uz uzņemšanu zivs organismā ($\text{l} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{dienā}^{-1}$).

k_2 = pirmās pakāpes ātruma konstante attiecībā uz izvadīšanu no zivs organisma (dienā^{-1}).

k_g = pirmās pakāpes ātruma konstante attiecībā uz zivs augšanu ("augšanas izraisīts atšķaidījums") (dienā^{-1}).

k_m = pirmās pakāpes konstante attiecībā uz metabolisko transformāciju (dienā^{-1}).

k_e = pirmās pakāpes konstante attiecībā uz izkārnījumu defekāciju (dienā^{-1}).

C_w = koncentrācija ūdenī ($\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$).

C_f = koncentrācija zivs organismā ($\text{mg} \cdot \text{uz kg}^{-1}$ slapjsvara).

Var paredzēt, ka vielām, kas bioakumulējas, visbūtiskākā ekspozīcijas koncentrācija ūdenī (C_w) pieļaujamā svārstību diapazonā ir laikā svērtā vidējā vērtība (TWA) (sal. ar 24. punktu). TWA koncentrāciju ūdenī ieteicams aprēķināt saskaņā ar TM C.20. 6. papildinājumā norādīto procedūru (2). Jāpiebilst, ka ūdens koncentrācijas $\ln$ transformācija ir piemērota, kur starp atjaunošanās periodiem sagaidāmi eksponenciāli traucējumi, piemēram, pusstatiskā testa plānā. Caurplūdes sistēmā ekspozīcijas koncentrāciju $\ln$ transformācija var nebūt vajadzīga. Ja tiek atvasinātas TWA koncentrācijas ūdenī, tās jānorāda pārskatā un jāizmanto turpmākajos aprēķinos.

Standarta zivs BCF testā uzņemšanu un izvadīšanu var raksturot kā divus pirmās pakāpes kinētiskos procesus.

$$\text{Uzņemšanas ātrums} = k_1 \times C_w \quad [\text{Vienādojums A5.2.}]$$

$$\text{Kopējais izvadīšanas ātrums} = (k_2 + k_g + k_m + k_e) \times C_f \quad [\text{Vienādojums A5.3.}]$$

Stacionārā fāzē, pieņemot, ka augšana un metabolisms ir niecīgi (t. i., ka k_g un k_m vērtības nav iespējams atšķirt no nulles), uzņemšanas ātrums ir vienāds ar izvadīšanas ātrumu, un līdz ar to vienādojuma A5.2. un vienādojuma A5.3. kombinēšana dod šādu sakarību:

$$BCF = \frac{C_f - ss}{C_w - ss} = \frac{k_1}{k_2} \quad [\text{Vienādojums A5.4.}]$$

Kur

C_{f-ss} = koncentrācija zivs organismā stacionārajā fāzē (mg uz kg^{-1} slapjsvara).

C_{w-ss} = koncentrācija ūdenī stacionārajā fāzē (mg l^{-1}).

Koeficients k_1/k_2 ir pazīstams kā kinētiskais BCF (BCF_K), un tam jābūt vienādam ar stacionārās fāzes BCF (BCF_{ss}), kas iegūts no stacionārās fāzes koncentrācijas zivs organismā attiecībā pret koncentrāciju ūdenī, bet, ja stacionārā fāze nav skaidra vai ja kinētiskais BCF ir koriģēts ar augšanu, var rasties novirzes. Tomēr, tā kā k_1 un k_2 ir konstantes, BCF_K var atvasināt, stacionāro fāzi nesasniedzot.

Pamatojoties uz šiem pirmās pakāpes vienādojumiem, šajā 5. papildinājumā ir iekļauti vispārīgie aprēķini, kas vajadzīgi gan ūdensekspozīcijas, gan uzturekspozīcijas bioakumulācijas metodēm. Tomēr 5., 6. un 8. iedaļa ir būtiskas tikai ūdensekspozīcijas metodei, bet šeit ir iekļautas kā "vispārīgi" paņēmieni. Secīgā (4. un 5. iedaļa) un vienlaicīgā (6. iedaļa) metode dod iespēju aprēķināt uzņemšanas un izvadīšanas konstantes, kuras izmanto, lai iegūtu kinētisko BCF. Secīgā metode k_2 noteikšanai (4. iedaļa) ir svarīga attiecībā uz uzturmetodi, jo tā vajadzīga gan asimilācijas efektivitātes, gan BMF aprēķināšanai. 7. papildinājumā ir izklāstīti uzturmetodei specifiski aprēķini.

2. PROGNOZES PAR UZŅĒMŠANAS FĀZES ILGUMU

Pirms veikt testu, no empīriskām sakarībām starp k_2 un n -oktanola-ūdens sadalījuma koeficientu (K_{ow}) vai starp k_1 un BCF var aplēst k_2 , un attiecīgi aptuvenu procentuālu daļu no laika, kas vajadzīgs stacionārās fāzes sasniegšanai. Tomēr jāsaprot, ka šajā iedaļā norādītie vienādojumi ir izmantojami tikai tad, ja uzņemšanā un izvadīšanā ievērota pirmās pakāpes kinētika. Ja tā noteikti nav un ja vēlams iegūt prognozes par uzņemšanas fāzi, ieteicams lūgt biostatistikas un/vai farmakokinētikas speciālista padomu.

Aplēsi par k_2 (dienā^{-1}) var iegūt ar vairākām metodēm. Piemēram, pirmkārt, var izmantot šādas empīriskās sakarības ⁽¹⁾

$$\log k_2 = 1,47 - 0,414 \log K_{ow} \quad (r^2 = 0,95) [(3); \text{vienādojums A5.5.}]$$

vai

$$k_2 = \frac{k_1}{BCF} \quad [\text{Vienādojums A5.6.}]$$

$$\text{Kur } k_1 = 520 \times W^{-0,32} \text{ (vielām ar } \log K_{ow} > 3) \quad (r^2 = 0,5) [(4); \text{Vienādojums A5.7.}]$$

$$\text{Un } BCF = 10^{(0,910 \cdot \log K_{ow} - 1,975 \cdot \log(6,8 \cdot 10^{-7} K_{ow} + 1) - 0,786)} \quad (r^2 = 0,90) [(5); \text{Vienādojums A5.8.}]$$

⁽¹⁾ Tāpat kā ar jebkuru empīrisku sakarību, jāpārbauda, vai testējamā viela ietilpst šīs sakarības izmantojamības jomā.

W = vidējais apstrādātais zivs svars (grami slapjsvara) uzņemšanas beigās/izvadišanas sākumā ⁽¹⁾

Citas saistītās sakarības sk. (6). Var būt lietderīgi k_2 aplēsēs iesaistīt sarežģītākus modeļus, ja, piemēram, sagaidāms, ka būs ātra metabolizēšanās (7) (8). Tomēr, modelim kļūstot sarežģītākam, vairāk jā rūpējas par prognožu interpretāciju. Piemēram, nitrogrupu klātbūtne var norādīt uz ātru metabolizēšanos, bet tā nav vienmēr. Tādēļ, plānojot pētījumu, lietotājam jāizvērtē prognozes metodes rezultāti attiecībā pret ķīmikālijas struktūru un cita saistoša informācija (piemēram, iepriekšēji pētījumi).

Laiku, kas nepieciešams, lai sasniegtu noteiktu procentuālo daļu no stacionārās fāzes, var iegūt, izmantojot k_2 aplēsi no vispārīgā kinētiskā vienādojuma, kas raksturo uzņemšanu un izvadišanu (pirmās pakāpes kinētika), pieņemot, ka augšana un metabolisms ir niecīgi. Ja pētījuma laikā novērojama būtiska augšana, turpmāk aprakstītās aplēses nebūs ticamas. Tādos gadījumos labāk izmantot tālāk tekstā aprakstīto ar augšanu koriģētu k_{2g} (sk. šā papildinājuma 7. iedaļu):

$$\frac{dC_f}{dt} = k_1 C_w - k_2 C_f \quad [\text{Vienādojums A5.9.}]$$

vai, ja C_w ir nemainīgs:

$$C_f = \frac{k_1}{k_2} \cdot C_w (1 - e^{-k_2 t}) \quad [\text{Vienādojums A5.10.}]$$

Tuvojoties stacionārajai fāzei ($t \rightarrow \infty$), vienādojumu A5.10. var reducēt šādi (sal. ar (9) (10)):

$$C_f = \frac{k_1}{k_2} \cdot C_w \quad [\text{Vienādojums A5.11.}]$$

vai

$$\frac{C_f}{C_w} = \frac{k_1}{k_2} = BCF \quad [\text{Vienādojums A5.12.}]$$

Tad $BCF \times C_w$ ir aptuvināta koncentrācija zivju organismā stacionārajā fāzē ($C_{f,ss}$). [Piezīme: tādu pašu pieeju var izmantot, aplēšot stacionārās fāzes BMF uzturtestā. Šajā gadījumā iepriekš norādītajos vienādojumos BCF aizstāj ar BMF un C_w ar C_{food} , koncentrāciju barībā]

Vienādojumu A5.10. var pierakstīt šādi:

$$C_f = C_{f-ss} (1 - e^{-k_2 t}) \quad [\text{Vienādojums A5.13.}]$$

vai

$$\frac{C_f}{C_{f-ss}} = 1 - e^{-k_2 t} \quad [\text{Vienādojums A5.14.}]$$

Piemērojot vienādojumu A5.14., stacionārās fāzes noteiktas procentuālās daļas sasniegšanai nepieciešamo laiku var prognozēt, ja k_2 ir iepriekš noteikts, izmantojot vienādojumu A5.5. vai vienādojumu A5.6.

Orientieris attiecībā uz statistiski optimālu uzņemšanas fāzes ilgumu statistiski pieņemamu datu (BCF_k) iegūšanai ir laiks, kas vajadzīgs, lai logaritmiskā līkne, kas atlikta pret lineāro laiku un raksturo testējamās vielas koncentrāciju zivju organismā sasniegtu vismaz 50 % no stacionārās fāzes (t. i., $0,69/k_2$), bet ne vairāk par 95 % no stacionārās fāzes (t. i., $3,0/k_2(11)$). Ja akumulācija pārsniedz 95 % stacionārās fāzes, ir iespējams aprēķināt BCF_{ss} .

⁽¹⁾ Zivs svaru uzņemšanas fāzes beigās var aplēst no iepriekšēju pētījumu datiem vai zināšanām par testējamo sugu izmēra iespējamo pieaugumu no tipiskā testa sākuma svara attiecībā pret tipisku uzņemšanas ilgumu (piemēram, 28 dienas).

Laiks, kas nepieciešams 80 % stacionārās fāzes sasniegšanai (izmantojot vienādojumu A5.14.), ir:

$$0,80 = 1 - e^{-k_2 t} \quad [\text{Vienādojums A5.15.}]$$

vai

$$t_{80} = \frac{-\ln(0,20)}{k_2} = \frac{1,6}{k_2} \quad [\text{Vienādojums A5.16.}]$$

Līdzīgi laiks, kurā sasniedz 95 % stacionārās fāzes, ir:

$$t_{95} = \frac{-\ln(0,05)}{k_2} = \frac{3,0}{k_2} \quad [\text{Vienādojums A5.17.}]$$

Piemēram, uzņemšanas fāzes ilgums (t. i., laiks, lai sasniegtu noteiktu stacionārās fāzes procentuālo daļu, piemēram t_{80} vai t_{95}) testējamai vielai ar $\log K_{OW} = 4$ būtu (izmantojot vienādojumu A5.5., vienādojumu A5.16. un vienādojumu A5.17.):

$$\log k_2 = 1,47 - 0,414 \cdot 4$$

$$k_2 = 0,652 \text{ dienā}^{-1}$$

$$t_{80} = \frac{1,6}{0,652} = 2,45 \text{ dienas (59 stundas)}$$

$$\text{vai } t_{95} = \frac{3,0}{0,652} = 4,60 \text{ dienas (110 stundas)}$$

Alternatīvā gadījumā vienādojumu

$$t_{ess} = 6,54 \cdot 10^{-3} \cdot K_{OW} + 55,31 \text{ (stundas)} \quad [\text{Vienādojums A5.18.}]$$

var izmantot, lai aprēķinātu laiku, kas vajadzīgs faktiskas stacionārās fāzes (t_{ess}) sasniegšanai (12). Līdz ar to testējamai vielai ar $\log K_{OW} = 4$ rezultāts būs šāds:

$$t_{ess} = 6,54 \cdot 10^{-3} \cdot 10^4 + 55,31 = 121 \text{ stundas}$$

3. PROGNOZES PAR IZVADĪŠANAS FĀZES ILGUMU

Prognozi par laiku, kas nepieciešams, lai slogu organismā samazinātu līdz noteiktai sākotnējās koncentrācijas daļai, var iegūt no vispārīgā vienādojuma, kas apraksta uzņemšanu un izvadīšanu (pieņemot pirmās pakāpes kinētiku, sal. ar vienādojumu A5.9. (1) (13).

Izvadīšanas fāzei pieņem, ka C_w (vai uzturtestam C_{food}) ir nulle. Vienādojumu var reducēts līdz:

$$\frac{dC_f}{dt} = k_2 C_f \quad [\text{Vienādojums A5.19.}]$$

vai

$$C_f = C_{f,0} \cdot e^{-k_2 t} \quad [\text{Vienādojums A5.20.}]$$

Kur $C_{f,0}$ ir koncentrācija izvadīšanas perioda sākumā.

50 % izvadīšanu sasniedz laikā (t_{50}):

$$\frac{C_f}{C_{f,0}} = \frac{1}{2} = e^{-k_2 t_{50}}$$

vai

$$t_{50} = \frac{-\ln(0,50)}{k_2} = \frac{0,693}{k_2}$$

Līdzīgi 95 % izvadīšanu sasniedz laikā:

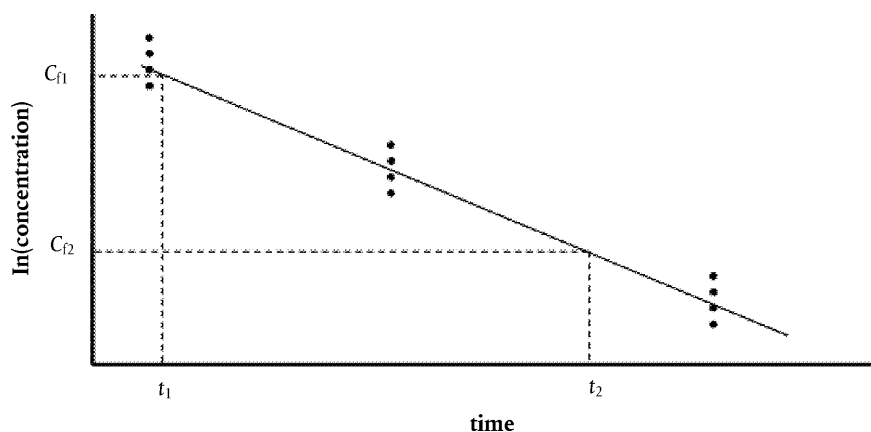
$$t_{95} = \frac{-\ln(0,05)}{k_2} = \frac{3,0}{k_2}$$

Ja pirmajam posmam tiek izmantota uzņemšana 80 % ($1,6/k_2$) un izvadīšanas fāzē zudums 95 % ($3,0/k_2$), izvadīšanas fāze ir aptuveni divreiz ilgāka par uzņemšanas fāzi.

Jāpiebilst, ka šīs aplēses ir balstītas uz pieņēmumu, ka uzņemšanas un izvadīšanas modeļi atbilst pirmās pakāpes kinētikai. Ja tie acīmredzami neatbilst pirmās pakāpes kinētikai, šīs aplēses nav derīgas.

4. SECĪGĀ METODE: IZVADĪŠANAS (ZUDUMA) ĀTRUMA KONSTANTES k_2 NOTEIKŠANA

Tiek uzskatīts, ka lielāko daļu biokoncentrēšanās datu “pietiekami labi” apraksta vienkāršs divu nodalījumu/divu parametru modelis, ko atspoguļo rektilineārā līkne, kas izvadīšanas fāzē aptuvināta punktiem, kuri atbilst koncentrācijām zivju organismā (ln skalā).



Jāņem vērā, ka novirzes no taisnas līnijas var liecināt par sarežģītāku izvadīšanas sistēmu, nevis pirmās pakāpes kinētiku. Lai iegūtu atrisinājumu par izvadīšanas veidiem, kas neatbilst pirmās pakāpes kinētikai, var izmantot grafisko metodi.

Lai vairākiem laika (paraugošanas) punktiem aprēķinātu k_2 , jāizdara ln(koncentrācija) lineāra regresija attiecībā pret laiku. Regresijas līnijas stāvums ir izvadīšanas ātruma konstantes k_2 aplēse ⁽¹⁾. No vienādojuma brīvā locekļa viegli iespējams aprēķināt (arī kļūdu robežas) vidējo koncentrāciju zivs organismā izvadīšanas fāzes sākumā ($C_{0,d}$; kas ir vienāda ar vidējo koncentrāciju zivs organismā uzņemšanas fāzes beigās) ⁽¹⁾:

$$C_{0,d} = e^{\text{intercept}}$$

[Vienādojums A5.21.]

⁽¹⁾ Vairumā programmu, kas pieļauj lineāras regresijas, aplēsēm ir sniegtas arī standartkļūdas un ticamības intervāli (TI), piemēram, *Microsoft Excel* formātā, izmantojot *Data Analysis* instrumentu paku.

Lai aprēķinātu k_2 , kad ir pieejami tikai divi laika (paraugošanas) punkti (kā tas ir minimizētajā plānā), abas vidējās koncentrācijas aizstāj ar šādu vienādojumu:

$$k_2 = \frac{\ln(C_{f1}) - \ln(C_{f2})}{t_2 - t_1} \quad [\text{Vienādojums A5.22.}]$$

kur $\ln(C_{f1})$ un $\ln(C_{f2})$ ir koncentrāciju naturālogaritmi attiecīgi laikā t_1 un t_2 , un t_2 un t_1 ir abu paraugu ievākšanas laiks attiecībā pret izvadīšanas sākumu ⁽¹⁾.

5. SECĪGĀ METODE: UZŅĒMŠANAS ĀTRUMA KONSTANTES K_1 NOTEIKŠANA (TIKAI ŪDENSEKSPOZĪCIJAS METODEI)

Lai, ņemot vērā secīgā laika koncentrācijas datu kopumu uzņemšanas fāzē, iegūtu vērtību k_1 , jāizmanto datorprogramma, lai pielāgotos šādam modelim:

$$C_f(t) = C_w(t) \cdot \frac{k_1}{k_2} \cdot (1 - e^{-k_2 t}) \quad [\text{Vienādojums A5.23.}]$$

kur k_2 ir iegūts no iepriekšējā aprēķina, $C_f(t)$ un $C_w(t)$ ir koncentrācijas zivju organismā un ūdenī, proti, laikā t .

Lai aprēķinātu k_1 , kad ir pieejami tikai divi laika (paraugošanas) punkti (kā tas ir minimizētajā plānā), jāizmanto šāda formula:

$$k_1 = \frac{C_f \cdot k_2}{C_w(1 - e^{-k_2 t})} \quad [\text{Vienādojums A5.24.}]$$

Šajā formulā k_2 ir iegūts no iepriekšējā aprēķina, C_f ir koncentrācija zivs organismā izvadīšanas fāzes sākumā, bet C_w ir vidējā koncentrācija ūdenī uzņemšanas fāzes laikā ⁽²⁾.

Lai noteiktu, cik laba bijusi pielāgošana, var izmantot grafiski attēloto k_1 un k_2 līkņu stāvuma vizuālo pārbaudi attiecībā pret izmērīto parauga punktu. Ja secina, ka ar secīgo metodi iegūtās k_1 aplēses nav pilnīgas, k_1 un k_2 aprēķināšanā jāizmanto vienlaicīgā pieeja (sk. tālāk 6. iedaļu). Rezultātā iegūtais līkņu stāvums vēlreiz jāsalīdzina ar grafiski attēlotajiem izmērītajiem datiem, lai vizuālajā pārbaudē noteiktu pielāgotību. Ja pielāgotība joprojām nav pilnīga, tas var liecināt, ka pirmās pakāpes kinētika nav izmantojama un ka jāizmanto citi sarežģītāki modeļi.

6. VIENLAICĪGĀ METODE UZŅĒMŠANAS UN IZVADĪŠANAS (ZUDUMA) ĀTRUMA KONSTANŠU APRĒĶINĀŠANAI (TIKAI ŪDENSEKSPOZĪCIJAS METODEI)

Izmantojot secīgā laika koncentrācijas datu kopumu un modeli, ar datorprogrammu palīdzību var iegūt k_1 un k_2 vērtības:

$$C_f = C_w \cdot \frac{k_1}{k_2} \cdot (1 - e^{-k_2 t}) \quad 0 < t < t_c \quad [\text{Vienādojums A5.25.}]$$

$$C_f = C_w \cdot \frac{k_1}{k_2} \cdot (e^{-k_2(t-t_c)} - e^{-k_2 t}) \quad t > t_c \quad [\text{Vienādojums A5.26.}]$$

kur

t_c = laiks uzņemšanas fāzes beigās.

⁽¹⁾ Pretēji lineārās regresijas metodei šīs formulas izmantošana attiecībā uz k_2 neradīs standartklūdu.

⁽²⁾ Pretēji lineārās pielāgošanas procedūrai šī metode parasti neradīs standartklūdu vai ticamības intervālu aplēstajam k_1 .

Šī pieeja tiešā veidā nodrošina standartklūdas k_1 un k_2 aplēsēm. Vienādojumā A5.25. un vienādojumā A5.26. k_1/k_2 aizstājot ar BCF (sal. ar vienādojumu A5.4.), iespējams aplēst arī standartklūdu un BCF 95 % TI. Tas ir īpaši lietderīgi, salīdzinot datu transformācijas rezultātā iegūtas dažādas aplēses. Atkarīgo mainīgo (koncentrāciju zivs organismā) var pielāgot ar vai bez $\ln$ transformācijas, un var izvērtēt iegūtā BCF nenoteiktību.

Tā kā, ja aplēses tiek veiktas vienlaicīgi, abi parametri k_1 un k_2 spēcīgi korelē, var būt ieteicams vispirms aprēķināt k_2 vienīgi no izvadīšanas datiem (sk. iepriekš); k_2 lielākajā daļā gadījumu var salīdzinoši precīzi aplēst no izvadīšanas līknes. Pēc tam k_1 var aprēķināt no uzņemšanas datiem, izmantojot nelineāru regresiju ⁽¹⁾. Secīgi pielāgošanai ieteicams izmantot tādu pašu datu transformāciju.

Pielāgotību var noteikt, rezultātā iegūto grafiski attēloto līkņu stāvumu vizuāli pārbaudot attiecībā pret izmērīto parauga punktu. Ja tiek secināts, ka ar šo metodi iegūtā k_1 aplēse nav pilnīga, k_1 un k_2 aprēķināšanā var izmantot vienlaicīgo pieeju. Pielāgotais modelis vēlreiz jāsalīdzina pret grafiski attēlotajiem mērītajiem datiem, lai vizuāli pārbaudītu pielāgotību, un jāsalīdzina dažāda veida pielāgojumos iegūtās k_1 , k_2 un BCF parametru aplēses, to standartklūdas un/vai ticamības intervāli.

Ja pielāgotība nav pilnīga, tas var liecināt, ka pirmās pakāpes kinētika nav izmantojama un jāiesaista citi sarežģītāki modeļi. Viena no visizplatītākajām problēmām ir zivju augšana testa laikā.

7. KINĒTISKĀ BCF UN BMF KORIĢĒŠANA AR AUGŠANAS IZRAISĪTU ATŠĶAIDĪJUMU

Šajā iedaļā aprakstīta standartmetode korekcijai, kas jāveic sakarā ar zivju augšanu testa laikā (tā saucamais "augšanas izraisīts atšķaidījums") un ir derīga vienīgi tad, ja novērojama pirmās pakāpes kinētika. Ja ir liecības, ka pirmās pakāpes kinētika nav izmantojama, par augšanas izraisīta atšķaidījuma pienācīgu koriģēšanu ieteicams lūgt biostatistikas speciālista padomu vai izmantot turpmāk aprakstīto uz masu balstīto pieeju.

Dažos gadījumos šī augšanas izraisīta atšķaidījuma koriģēšanai paredzētā metode nav precīza vai nedarbojas (piemēram, ļoti lēni izvadītām vielām, kuras testē ātri augošās zivīs, iegūtā izvadīšanas ātruma konstante k_{2g} , kas koriģēta atbilstīgi augšanas izraisītajam atšķaidījumam, var būt ļoti maza un līdz ar to izšķiroši svarīga kļūst klūda abās ātruma konstantēs, kas izmantotas tās iegūšanai, un dažos gadījumos k_g aplēses var pārsniegt k_2). Tādos gadījumos var izmantot alternatīvu pieeju (t. i., masas pieeju), kura darbojas arī tad, kad pirmās pakāpes kinētika nav novērojama, un kuras gadījumā nav jāveic korekcija. Šī pieeja ir izklāstīta šīs iedaļas beigās.

Augšanas ātruma konstantes subtrakcijas metode koriģēšanai ar augšanu

Standartmetodei visus individuālos datus par svaru un garumu konvertē naturāllogaritmā un atsevišķi apstrādā grupām un kontrolgrupām $\ln(\text{svars})$ vai $\ln(1/\text{svars})$ grafiski attēlo pret laiku (diena). Vienu un to pašu procesu atsevišķi veic ar uzņemšanas un izvadīšanas fāžu datiem. Koriģēšanā ar augšanas izraisītu atšķaidījumu, lai iegūtu augšanas ātruma konstanti (k_g), parasti vislabāk izmantot visa pētījuma datus par svaru, bet statistiski būtiskas atšķirības starp uzņemšanas fāzi un izvadīšanas fāzi atvasinātajām augšanas ātruma konstantēm var liecināt, ka jāizmanto izvadīšanas fāzes ātruma konstante. Jebkādu ar apstrādi saistītu ietekmi var pārbaudīt, izmantojot ūdenskspozīcijas pētījumu testgrupu un kontrolgrupu kopējos augšanas ātrumus.

⁽¹⁾ Jāsaprot, ka k_2 aplēses mainīgums bioakumulācijas modelī netiek pienācīgi izmantots, ja tā tiek būtībā uzskatīta par nemainīgu, veicot k_1 pielāgošanu secīgās piemērotības metodē. Līdz ar to vienlaicīgās un secīgās piemērotības metodēs iegūtais BCF mainīgums būs atšķirīgs.

Katrai grupai (testgrupa(-s) un kontrolgrupas, atsevišķi dati, vidējās vērtības, kas netiek iegūtas katru dienu) lineāro mazāko kvadrātu korelāciju $\ln(\text{zivs svars})$ attiecībā pret dienu (un $\ln(1/\text{svars})$ attiecībā pret dienu) visam pētījumam, uzņemšanas un izvadīšanas fāzēm, aprēķina, izmantojot statistiskas standartprocedūras. Līniju stāvuma dispersijas aprēķina un izmanto, lai izvērtētu stāvuma atšķirību (augšanas ātruma konstantes) statistisko nozīmību ($p = 0,05$), izmantojot Stjudenta t -testu (vai, ja testē vairāk nekā vienu koncentrāciju, ANOVA). Lai izdarītu korekciju ar augšanu, parasti vislabāk izmantot datus par svaru. Tāpat apstrādāti dati par garumu var noderēt, lai attiecībā uz apstrādes radīto ietekmi salīdzinātu kontrolgrupas un testgrupas. Ja svara datu analīzē statistiski nozīmīgas atšķirības nav vērojamas, testa un kontroles datus var apkopot un pētījuma kopējo zivs augšanas ātruma konstanti (k_g) var aprēķināt kā kopējo lineārās korelācijas stāvumu. Ja tiek novērotas statistiski nozīmīgas atšķirības, augšanas ātruma konstantes katrai zivju grupai un/vai pētījuma fāzei norāda atsevišķi. Pēc tam ātruma konstanti no katras apstrādātās grupas izmanto, lai attiecīgajā grupā veiktu korekciju ar augšanas izraisītu atšķaidījumu. Ja starp uzņemšanas un izvadīšanas fāžu ātruma konstantēm tiek pamanītas statistiskas atšķirības, jāizmanto no izvadīšanas fāzes iegūtās ātruma konstantes.

Aprēķināto augšanas ātruma konstanti (k_g , izteikta kā diena^{-1}) var atņemt no kopējās izvadīšanas ātruma konstantes (k_2), lai iegūtu izvadīšanas ātruma konstanti k_{2g} .

$$k_{2g} = k_2 - k_g$$

[Vienādojums A5.27.]

Uzņemšanas ātruma konstanti daļa ar augšanas koriģētu izvadīšanas ātruma konstanti, lai iegūtu ar augšanu koriģētu kinētisko BCF, ko apzīmē kā BCF_{k_g} (vai BMF_{k_g}).

$$BCF_{k_g} = \frac{k_1}{k_{2g}}$$

[Vienādojums A5.28.]

Ar barību saistītam pētījumam iegūtu augšanas ātruma konstanti izmanto vienādojumā A7.5., lai aprēķinātu ar augšanu koriģētu BMF_{k_g} (sal. ar 7. papildinājumu).

Uz masu balstīta augšanas koriģēšanas metode

Iepriekš norādītās “augšanas ātruma konstantes subtrakcijas metodes” alternatīvu, saskaņā ar kuru nav jākoriģē augšanas ātrums, var izmantot, kā norādīts turpmāk. Tās princips ir izmantot uz masu balstītus izvadīšanas datus no veselas zivs, nevis pamatojoties uz koncentrāciju.

Izvadīšanas fāzes audu koncentrācijas (testējamās vielas masa/zivs vienības masa) konvertē testējamās vielas/zivs masā: tabulas veidā (piemēram, izmantojot izklājlapu datorā) saskaņo koncentrācijas un individuālos zivju svarus un katru koncentrāciju sareizina ar kopējo zivju svaru, lai mērījumā visiem izvadīšanas fāzes paraugiem tiktu iegūts testējamās vielas/zivs masas kopums.

Grafiski attēlo rezultātā iegūto vielas masas datu naturāllogaritmu attiecībā pret eksperimenta laiku (izvadīšanas fāze), kā tas parasti tiktu darīts.

Attiecībā uz ūdenssekspozīcijas metodi regulāri iegūst uzņemšanas ātruma konstanti (sk. 4. un 6. sadaļu), jāņem vērā, ka līknes pielāgošanas vienādojumos jāizmanto “normāla” k_2 vērtība attiecībā uz k_1) un no iepriekš norādītajiem datiem iegūst izvadīšanas ātruma konstanti. Tā kā rezultātā iegūto izvadīšanas ātruma konstantes vērtību augšana neietekmē, jo tā tika iegūta, pamatojoties uz veselas zivs masu, tā jānorāda kā k_{2g} , nevis k_2 .

8. LIPĪDU NORMALIZĀCIJA LĪDZ LIPĪDSATURAM 5 % (VIENĪGI ŪDENSEKSPOZĪCIJAS METODEI)

No ūdenseskspozīcijas testiem iegūti BCF (kinētiski un līdzsvara) arī jānorāda pārskatā attiecībā uz noklusēto zivs lipīdsaturu no 5 % slapjsvara, ja vien nav iespējams apliecināt, ka testējamā viela neakumulējas primāri lipīdos (piemēram, dažas perfluorētas vielas var saistīties ar olbaltumvielām). Dati par koncentrāciju zivju organismā jeb BCF jākonvertē, pamatojoties uz slapjsvara lipīdsaturu 5 %. Ja vielas koncentrāciju un lipīdsatura mērīšanai visos paraugšanas punktos tika izmantotas vienas un tās pašas zivis, tad katra individuāli izmērītā koncentrācija zivs organismā jākorrigē pēc attiecīgās zivs lipīdsatura.

$$C_{fL} = \frac{0,05}{L} \cdot C_f \quad [\text{Vienādojums A5.29.}]$$

kur

C_{fL} = ar lipīdiem normalizēta koncentrācija zivī (mg kg^{-1} slapjsvara)

L = lipīdu frakcija (uz slapjsvara bāzes)

C_f = testējamās vielas koncentrācija zivī (mg kg^{-1} slapjsvara)

Ja lipīdu analīze netika veikta visām paraugotajām zivīm, vidējo lipīdu vērtību izmanto, lai normalizētu BCF. Attiecībā uz līdzsvara BCF jāizmanto vidējā vērtība, kas apstrādgrupā reģistrēta uzņemšanas fāzes beigās. Lai normalizētu kinētisko BCF, var būt gadījumi, kad ir pieļaujama citāda pieeja, piemēram, ja uzņemšanas vai izvadīšanas fāzē ievērojami mainījies lipīdsaturs. Tomēr jebkurā gadījumā regulāri jāizmanto tāda barošanas intensitāte, kas samazina krasās lipīdsatura pārmaiņas.

$$BCF_{KL} = \frac{0,05}{L_n} \cdot BCF_K \quad [\text{Vienādojums A5.30.}]$$

kur

BCF_{KL} = ar lipīdiem normalizēts kinētiskais BCF (L kg^{-1})

L_n = vidējā lipīdu frakcija (pamatojoties uz slapjsvaru)

BCF_K = kinētiskais BCF (L kg^{-1})

LITERATŪRAS SARAKSTS

- (1) Arnot J.A. and Gobas F.A.P.C. (2004), A food web bioaccumulation model for organic chemicals in aquatic ecosystems, *Environ. Toxicol. Chem.* 23: 2343–2355.
- (2) Chapter C.20 of this Annex, *Daphnia magna* Reproduction Test.
- (3) Spacie A. and Hamelink J.L. (1982), Alternative models for describing the bioconcentration of organics in fish. *Environ. Toxicol. Chem.* 1: 309-320.
- (4) Sijm D.T.H.M., Verberne M.E., de Jonge W.J., Pärt P. and Opperhuizen A. (1995), Allometry in the uptake of hydrophobic chemicals determined *in vivo* and in isolated perfused gills. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 131: 130-135.
- (5) Bintein S., Devillers J. and Karcher W. (1993), Nonlinear dependence of fish bioconcentration on *n*-octanol/water partition coefficient. *SAR QSAR Environ. Res.* 1: 29-39.

-
- (6) Kristensen P. (1991), Bioconcentration in fish: comparison of BCF's derived from OECD and ASTM testing methods; influence of particulate matter to the bioavailability of chemicals. Danish Water Quality Institute, Hørsholm, Denmark.
- (7) Arnot J.A., Meylan W., Tunkel J., Howard P.H., Mackay D., Bonnell M. and Boethling R.S. (2009), A quantitative structure-activity relationship for predicting metabolic biotransformation rates for organic chemicals in fish. *Environ. Toxicol. Chem.* 28: 1168-1177.
- (8) OECD (2011), QSAR Toolbox 2.1. February 2011. Available from: http://www.oecd.org/document/54/0,3746,en_2649_34379_42923638_1_1_1_1,00.html.
- (9) Branson D.R., Blau G.E., Alexander H.C. and Neely W.B. (1975). Bioconcentration of 2,2',4,4' tetrachlorobiphenyl in rainbow trout as measured by an accelerated test. *T. Am. Fish. Soc.* 104: 785-792.
- (10) Ernst W. (1985), Accumulation in aquatic organisms, in *Appraisal of tests to predict the environmental behaviour of chemicals*, Sheeman, P., *et al.*, Editors. John Wiley & Sons Ltd, New York, NY, USA: 243-255.
- (11) Reilly P.M., Bajramovic R., Blau G.E., Branson D.R. and Sauerhoff M.W. (1977), Guidelines for the optimal design of experiments to estimate parameters in first order kinetic models. *Can. J. Chem. Eng.* 55: 614-622.
- (12) Hawker D.W. and Connell D.W. (1988), Influence of partition coefficient of lipophilic compounds on bioconcentration kinetics with fish. *Wat. Res.* 22: 701-707.
- (13) Konemann H. and van Leeuwen K. (1980), Toxicokinetics in fish: Accumulation and elimination of six chlorobenzenes by guppies. *Chemosphere.* 9: 3-19.
-

6. papildinājums

ŪDENSEKSPOZĪCIJAS TESTA VIENĀDOJUMI: MINIMIZĒTS TESTA PLĀNS

Šis pieejas pamatojums ir tāds, ka biokoncentrēšanās koeficientu pilnā testā var noteikt kā līdzsvara biokoncentrēšanās koeficientu (BCF_{ss}), aprēķinot testējamās vielas koncentrācijas koeficienta attiecību zivs audos pret testējamās vielas koncentrāciju ūdenī vai aprēķinot kinētisko biokoncentrēšanās koeficientu (BCF_k) kā uzņemšanas ātruma konstantes k_1 attiecību pret izvadīšanas ātruma konstanti k_2 . BCF_k ir derīgs pat tad, ja uzņemšanas laikā nav panākta vielas stacionārās fāzes koncentrācija, ja uzņemšana un izvadīšana nenotiek apmēram saskaņā ar pirmās pakāpes kinētiskajiem procesiem.

Ja vielas koncentrāciju audos (C_f) mēra, kad ekspozīcija beigusies (t_1), un koncentrāciju audos (C_f) vēlreiz mēra pēc tam, kad ir beidzies laika periods (t_2), izvadīšanas ātruma konstanti (k_2) var aplēst, izmantojot 5. papildinājumā norādīto vienādojumu A5.22.

Pēc tam var algebriski noteikt uzņemšanas ātruma konstanti k_1 , izmantojot 5. papildinājumā norādīto vienādojumu A5.23. (kur C_f ir vienāds ar C_{f1} un t ir vienāds ar t_1) (1). Līdz ar to kinētiskās biokoncentrēšanās koeficients minimizētajā plānā (apzīmē ar BCF_{km} , lai to atšķirtu no kinētiskajiem biokoncentrēšanās koeficientiem, kas noteikti, izmantojot citas metodes) ir šāds:

$$BCF_{km} = \frac{k_1}{k_2} \quad [\text{Vienādojums A6.1.}]$$

Koncentrācijas vai rezultāti jākorrigē saskaņā ar augšanas izraisītu atšķaidījumu un, kā aprakstīts 5. papildinājumā, jānormalizē pēc zivs lipīdsatura 5 %.

Minimizētais BCF_{ss} ir uzņemšanas fāzes beigās aprēķinātais BCF , pieņemot, ka ir sasniegta stacionārā fāze. Par to var izdarīt vienīgi pieņēmumu, jo ar paraugošanas punktu skaitu nepietiek, lai to pierādītu.

$$\text{minimizētais } BCF_{ss} = \frac{C_{f - \text{minSS}}}{C_{w - \text{minSS}}} \quad [\text{Vienādojums A6.2.}]$$

Kur

$C_{f - \text{minSS}}$ = koncentrācija zivs organismā pie pieņemtās stacionārās fāzes uzņemšanas beigās (mg kg^{-1} slapjsvara).

$C_{w - \text{minSS}}$ = koncentrācija ūdenī pie pieņemtās stacionārās fāzes uzņemšanas beigās (mg l^{-1}).

LITERATŪRAS SARAKSTS

- (1) Springer T.A., Guiney P.D., Krueger H.O. and Jaber M.J. (2008), Assessment of an approach to estimating aquatic bioconcentration factors using reduced sampling. Environ. Toxicol. Chem. 27: 2271-2280.

7. papildinājums

VIENĀDOJUMI BARĪBEKSPŌZĪCIJAS TESTAM

1. Piemērotas komerciālās zivju barības sastāvdaļu daudzuma
2. Barības papildināšanas paņēmieni piemēri
3. Asimilācijas efektivitātes un biomagnifikācijas koeficienta aprēķināšana
4. Lipīdu korekcija
5. Atšķirību izvērtējums starp mērīto nulles laika koncentrāciju (C0,m) un iegūto nulles laika koncentrāciju (C0,d)
6. Norādījumi attiecībā uz ļoti strauji izvadītām testējamām vielām

1. PIEMĒROTAS KOMERCIĀLĀS ZIVJU BARĪBAS SASTĀVDAĻU DAUDZUMA PIEMĒRS

Galvenā sastāvdaļa	zivju milti
Kopproteīns	≤ 55,0 %
Koptauki	≤ 15,0 % ⁽¹⁾
Jēlšķiedra	≥ 2,0 %
Mitrums	≥ 12 %
Pelni	≥ 8 %

⁽¹⁾ Dažos reģionos var būt iespējams iegūt vienīgi zivju barību ar lipīdu koncentrāciju, kas ir pārāk zema salīdzinājumā ar šo augšējo robežu. Tādos gadījumos pētījumi jāveic ar zemāko lipīdu koncentrāciju piegādātajā barībā un attiecīgi jāpielāgo barošanas intensitāte, lai saglabātu zivju veselību. Lipīdus barībā nedrīkst mākslīgi pavairot, pievienojot papildu eļļu.

2. BARĪBAS PAPILDINĀŠANAS PAŅĒMIENU PIEMĒRI

Vispārīga informācija

Kontrolēm paredzētā barība jāgatavo tieši tādā pašā veidā kā papildinātā barība, bet nepievienojot testējamo vielu.

Lai pārbaudītu apstrādātās barības koncentrāciju, ar piemērotu ekstrahēšanas metodi jāekstrahē trīs dozētās barības paraugi un ekstraktos jāizmēra testējamās vielas koncentrācija vai radioaktivitāte. Jāpierāda augsta analītiskā atgūstamība (> 85 %) ar zemu mainību starp paraugiem (testa sākumā ņemtajai vielai trīs paraugu koncentrācijas nedrīkst mainīties par vairāk nekā ± 15 % no vidējā lieluma).

Ar barību saistīta testa laikā 0. dienā un uzņemšanas fāzes beigās jāsavāc trīs barības paraugi, lai noteiktu testējamās vielas saturu barībā.

Zivju barības sagatavošana ar šķidru testējamo materiālu (neatšķaidītā veidā)

Apstrādātajai zivju barībai nosaka nominālu testējamo mērķkoncentrāciju, piemēram, 500 µg testējamās vielas/g pārtikas. Atbilstošo neatšķaidītas testējamās vielas daudzumu (ar molmasu vai īpatnējo radioaktivitāti) pievieno zināmajai zivju barības masai stikla burkā vai rotācijas ietvaicētāja apaļkolbā. Zivju barības masai visā uzņemšanas fāzē jābūt pietiekamai (ņemot vērā nepieciešamību zivju augšanas dēļ katrā barošanas reizē palielināt apjomus). Zivs barība/testējamā viela jājauc visu nakti, lēni maisot (piemēram, izmantojot *roto-rack* tipa maisītāju vai rotāciju, ja tiek izmantota rotācijas ietvaicētāja apaļkolba). Papildinātā barība jāglabā apstākļos, kas nemaina testējamās vielas stabilitāti barības maisījumā (piemēram, dzesēšana) līdz tās izmantošanai.

Zivju barības sagatavošana, izmantojot kukurūzas vai zivju eļļas nesēju

Cietās testējamās vielas piestā jāsasmalcina smalkā pulverī. Šķidrās testējamās vielas var tieši pievienot kukurūzai vai zivju eļļai. Testējamās vielas izšķīdina zināmā daudzumā kukurūzas vai zivju eļļas (piemēram, 5-15 ml). Dozēto eļļu kvantitatīvā veidā pārvieto atbilstošā izmēra rotācijas ietvaicētāja apaļkolbā. Dozētās eļļas sagatavošanai izmantotā kolba jāizskalo ar diviem nelieliem eļļas alikvotiem, un tos pievieno apaļkolbai, lai pārliecinātos, ka ir pārvietota visa izšķīdinātā testējamā viela. Lai nodrošinātu eļļas pilnīgu izšķīšanu/disperģēšanu (vai ja pētījumā izmanto vairāk nekā vienu testējamo vielu), pievieno mikromaisītāju, kolbu aizkorķē un maisījumu strauji maisa visu nakti. Testēšanas nolūkam apaļkolbā pievieno pienācīgu daudzumu zivju barības (parasti granulu veidā), un apaļkolbas saturu viendabīgi samaisa, nepārtraukti grozot stikla kolbu vismaz 30 minūtes, bet vēlams visu nakti. Pēc tam papildināto pārtiku attiecīgi glabā (piemēram, dzesētavā), lai barībā nodrošinātu testējamās vielas stabilitāti līdz tās izmantošanai.

Zivju barības sagatavošana, izmantojot organisku šķīdinātāju

Pienācīgu daudzumu testējamās vielas (ar molmasu vai specifisku radioaktivitāti), ar ko pietiek, lai iegūtu mērķdevu, izšķīdina atbilstošā organiskajā šķīdinātājā (piemēram, cikloheksānā vai acetona; 10-40 ml, bet vajadzības gadījumā lielākā tilpumā, atkarībā no papildināmās barības daudzuma). Alikvotu vai visu (attiecībā uz pievienoto devu) šo šķīdumu sajauc ar atbilstošu masu zivju barības, ar ko pietiek, lai testā panāktu vēlamu nominālo devas līmeni. Barību/testējamo vielu var sajaukt nerūsošā tērauda jaukšanas blodā, un svaigi sagatavoto zivju barību uz divām dienām atstāj blodā laboratorijas skapī (reizēm apmaisot), lai ļautu iztvaikot liekajam šķīdinātājam, vai samaisa rotācijas ietvaicētāja apaļkolbā, nodrošinot nepārtrauktu rotāciju. Lieko šķīdinātāju var "nopūst" ar gaisa strūklu vai slāpekli, ja nepieciešams. Jārūpējas par to, lai nodrošinātu, ka testējamā viela pēc šķīdinātāja novākšanas nekristalizējas. Papildinātā barība jāglabā apstākļos (piemēram, dzesētavā), kas nemaina testējamās vielas stabilitāti barības maisījumā līdz tā izmantošanai.

3. ASIMILĀCIJAS EFEKTIVITĀTES UN BIOMAGNIFIKĀCIJAS KOEFICIENTA APRĒĶINĀŠANA

Lai aprēķinātu asimilācijas efektivitāti, vispirms saskaņā ar 5. papildinājuma 4. iedaļu (izmantojot "secīgo metodi", t. i., standarta lineāro regresiju) jāaplēš kopējā izvadīšanas ātruma konstante, izmantojot izvadīšanas fāzes parauga vidējās koncentrācijas. Barošanas ātruma konstante I un uzņemšanas ilgums t ir zināmie pētījuma parametri. Vidējā mērītā testējamās vielas koncentrācija barībā C_{food} šajā pētījumā ir mērītais mainīgais lielums. Testējamās vielas koncentrācija zivī $C_{0,d}$ uzņemšanas fāzes beigās parasti tiek iegūta no grafiski attēlota vienādojuma brīvā locekļa $\ln(\text{koncentrācija})$ pret izvadīšanas dienu.

Vielas asimilācijas efektivitāti (α , testējamās vielas absorbciju zarnās) aprēķina šādi:

$$\alpha = \frac{C_{0,d} \cdot k_2}{I \cdot C_{\text{barība}}} \cdot \frac{1}{1 - e^{-k_2 t}} \quad [\text{Vienādojums A7.1.}]$$

kur:

$C_{0,d}$ = izvadīšanas fāzes nulles laikā iegūtā koncentrācija zivī (mg kg^{-1});

k_2 = kopējā (ar augšanu nekoriģētā) izvadīšanas ātruma konstante (dienā^{-1}), kas aprēķināta saskaņā ar 5. papildinājuma 3. iedaļā norādītajiem vienādojumiem;

I = barības uzņemšanas ātruma konstante (g barības g^{-1} zivs dienā^{-1});

$C_{\text{barība}}$ = koncentrācija barībā (mg kg^{-1} barība);

t = barošanas perioda ilgums (diena).

Tomēr šajā aprēķinā izmantotā barošanas intensitāte I var būt jāpielāgo zivs augšanai, lai sniegtu pareizu asimilācijas efektivitāti α . Testā, kura uzņemšanas fāzē zivis aug ātri (kurā nav veikta barības daudzuma korekcija, lai saglabātu noteikto barošanas intensitāti), iegūtā barošanas intensitāte, uzņemšanas fāzei progresējot, būs zemāka par noteikto, kā rezultātā tiks iegūta augstāka "patiesā" asimilācijas efektivitāte. (Piebilde: tas ir svarīgi attiecībā uz kopējā BMF aprēķināšanu, jo I nosacījumi rezultātā atceļ vienādojumu A7.1. un vienādojumu A7.4.). Vidējo barošanas intensitāti I_g , kas koriģēta saskaņā ar augšanas izraisītu atšķaidījumu, var iegūt vairākos veidos, bet vienkāršs un precīzs paņēmieni ir izmantot zināmu augšanas ātruma konstanti (k_g), lai uzņemšanas fāzes laikpunktos aplēstu testa zivju svaru, t . i.:

$$W_f(t) = W_{f,0} \times e^{k_g t} \quad [\text{Vienādojums A7.2.}]$$

kur

$W_f(t)$ = vidējais zivs svars uzņemšanas dienā t

$W_{f,0}$ = vidējais zivs svars eksperimenta dienā

Tādā veidā (vismaz) var aplēst vidējo zivs svaru pēdējā ekspozīcijas dienā ($W_{f,\text{end-of-uptake}}$). Tā kā barošanas intensitāte bija balstīta uz $W_{f,0}$, rezultātā iegūto barošanas intensitāti katrai uzņemšanas dienai var aprēķināt, izmantojot šīs divas svara vērtības. Ar augšanu koriģēto barošanas intensitāti I_g (g barības g^{-1} zivju dienā^{-1}), ko straujas augšanas gadījumos uzņemšanas fāzes laikā var izmantot I vietā, var aprēķināt šādi:

$$I_g = \frac{I \times W_{f,0}}{W_{f,\text{uzņemšanas fāzes beigās}}} \quad [\text{Vienādojums A7.3.}]$$

Līdzko ir iegūta asimilācijas efektivitāte, BMF var aprēķināt, to sareizinot ar barošanas intensitātes konstanti I (vai I_g , ja to izmanto, lai aprēķinātu α) un produktu sadalot ar kopējo izvadīšanas ātruma konstanti k_2 :

$$\text{BMF} = \frac{I \times \alpha}{k_2} \quad [\text{Vienādojums A7.4.}]$$

Tādā pašā veidā jāaprēķina arī ar augšanu koriģētais biomagnifikācijas koeficients, izmantojot ar augšanu koriģēto izvadīšanas ātruma konstanti (kas iegūta saskaņā ar 5. papildinājuma 7. iedaļu). Vēlreiz — ja I_g tika izmantots, lai aprēķinātu α , tas būtu arī jāizmanto šeit, nevis I :

$$\text{BMF} = \frac{I \times \alpha}{k_{2g}} \quad [\text{Vienādojums A7.5.}]$$

kur:

α = asimilācijas efektivitāte (testējamās vielas absorbcija zarnās);

k_2 = kopējā (ar augšanu nekoriģētā) izvadīšanas ātruma konstante (dienā⁻¹), kas aprēķināta saskaņā ar 5. papildinājuma 3. iedaļā norādītajiem vienādojumiem;

k_{2g} = ar augšanu koriģētā izvadīšanas ātruma konstante (dienā⁻¹);

I = barības uzņemšanas ātruma konstante (g barības g⁻¹ zivs dienā⁻¹);

Ar augšanu koriģētu pussabrukšanas periodu ($t_{1/2}$) aprēķina šādi.

$$t_{1/2} = \frac{0,693}{k_{2g}} \quad [\text{Vienādojums A7.6.}]$$

Vielas asimilācijas efektivitāti barībā var aprēķināt, ja uzņemšanas fāzes lineārajā posmā (starp 1. un 3. dienu) ir konstatētas audu atliekas. Tādā gadījumā vielas asimilācijas efektivitāti (α) var noteikt šādi:

$$\alpha = \frac{C_{\text{zivīm}}(t)}{I \times C_{\text{barībai}} \times t} \quad [\text{Vienādojums A7.7.}]$$

Kur

$C_{\text{zivīm}}(t)$ = testējamās vielas koncentrācija zivs organismā laikā t (mg kg⁻¹ slapjsvara).

4. KOREKCIJA AR LIPĪDIEM

Ja visos paraugšanas intervālos lipīdsaturs mērīts tai pašai zivij, kurai izdarīta ķīmiskā analīze, lai iegūtu $C_{0,d}$ un k_2 individuālās koncentrācijas jākoriģē uz lipīdu bāzes un ar grafiski attēlotu $\ln$ (ar lipīdiem koriģēta koncentrācija) attiecībā pret izvadīšanu (dienu). Pēc tam var aprēķināt asimilācijas efektivitāti (vienādojums A7.1.), pamatojoties uz lipīdu bāzi, izmantojot $C_{\text{barībai}}$ uz lipīdu bāzi (*t. i.*, $C_{\text{barībai}}$ sareizina ar vidējo barības lipīdu frakciju). Ar turpmāku aprēķinu, izmantojot vienādojumu A7.4. un vienādojumu A7.5., tiešā veidā iegūst ar lipīdiem koriģētu (un atbilstīgi augšanas izraisītam atšķaidījumam koriģētu) BMF.

Pretējā gadījumā vidējo lipīdu frakciju (masas) zivs organismā un barībā iegūst gan no apstrādgrupas, gan kontrolgrupām (barībai un kontrolgrupas zivīm — parasti no datiem, kas mērīti ekspozīcijas sākumā un beigās; apstrādgrupas zivīm — parasti no datiem, kas mērīti tikai ekspozīcijas beigās). Dažos pētījumos zivju lipīdsaturs var ievērojami palielināties; tādus gadījumos ir pienācīgi izmantot testa zivju lipīdu vidējo koncentrāciju, kas aprēķināta no ekspozīcijas beigās un izvadīšanas beigās izmērītajām vērtībām. Parasti dati no apstrādgrupas jāizmanto vienīgi tam, lai iegūtu abas lipīdu frakcijas.

Lipīdu korekcijas koeficientu (L_c) aprēķina šādi:

$$L_c = \frac{L_{\text{zivī}}}{L_{\text{barībā}}} \quad [\text{Vienādojums A7.8.}]$$

kur $L_{\text{zivī}}$ un $L_{\text{barībā}}$ ir attiecīgi vidējās lipīdu frakcijas zivī un barībā.

Lipīdu korekcijas koeficientu izmanto, lai aprēķinātu ar lipīdiem koriģētu biomagnifikācijas koeficientu (BMF_L):

$$BMF_L = \frac{BMF}{L_c} \quad [\text{Vienādojums A7.9.}]$$

5. ATŠKIRĪBU IZVĒRTĒJUMS STARP MĒRĪTO NULLES LAIKA KONCENTRĀCIJU ($C_{0,m}$) UN IEGŪTO NULLES LAIKA KONCENTRĀCIJU ($C_{0,d}$)

Mērītā nulles laika koncentrācija ($C_{0,m}$) jāsalīdzina ar iegūto nulles laika koncentrāciju ($C_{0,d}$). Ja tās ir ļoti līdzīgas, tiek pamatots izvadīšanas parametru iegūšanai izmantotais pirmās pakāpes modelis.

Dažos pētījumos var būt ievērojama atšķirība starp iegūto nulles laika vērtību $C_{0,d}$ un mērīto nulles laika vidējo koncentrāciju $C_{0,m}$ (sk. šīs testēšanas metodes 159. punkta pēdējo ievilkumu). Ja $C_{0,d}$ ir daudz mazāks par $C_{0,m}$ ($C_{0,d} \ll C_{0,m}$), šī atšķirība var norādīt, ka zarnās atrodas nesagremota papildinātā barība. Ja uzņemšanas fāzes beigās ir ņemti un glabāti papildu (veselas zivs) paraugi, to var pārbaudīt eksperimentā, atsevišķi analizējot izgrieztās zarnas. Pretējā gadījumā, ja izvadīšanas fāzes lineārajai regresijai piemērotais statistiski derīgais izlēcošās vērtības tests norāda, ka pirmais izvadīšanas parauga punkts ir kļūdaini palielināts, var būt lietderīgi veikt lineāro regresiju, lai iegūtu k_2 , bet izlaižot pirmo koncentrācijas izvadīšanas punktu. Tādos gadījumos, ja neskaidrība lineārajā regresijā tiek ievērojami samazināta un ir skaidrs, ka tika ievērota apmēram pirmās pakāpes izvadīšanas kinētika, asimilācijas efektivitātes aprēķināšanā var būt atbilstoši izmantot rezultātā iegūtās $C_{0,d}$ un k_2 vērtības. Tas pilnībā jāpamato pārskatā. Vēl ir iespējams, ka izvadīšanas fāzē darbojas kinētika, kas nav pirmās pakāpes kinētika. Ja tas ir iespējams (t. i., novērojams, ka naturāllogaritma transformētie dati salīdzinājumā ar taisnas līnijas lineārās regresijas grafiku drīzāk atbilst liknei), k_2 un $C_{0,d}$ aprēķini, visticamāk, nebūs derīgi un jālūdz biostatistikas speciālista padoms.

Ja $C_{0,d}$ ir daudz lielāks par izmērīto vērtību ($C_{0,d} \gg C_{0,m}$), tas var liecināt par sekojošo: viela ļoti ātri tika izvadīta (t. i., paraugošanas punkti izvadīšanas fāzē ļoti ātri sasniedza analītiskās metodes kvantitatīvās noteikšanas robežu; sal. tālāk ar 6. iedaļu); bija novirze no pirmās pakāpes izvadīšanas kinētikas; lineārajai regresijai, ar ko iegūst k_2 un $C_{0,d}$, piemīt trūkumi; vai pētījumā dažos paraugošanas punktos radās problēma ar mērītajām koncentrācijām. Tādos gadījumos rūpīgi jāizpēta lineārās regresijas grafiks attiecībā uz pierādījumiem par paraugiem, kuri atrodas uz kvantitatīvās noteikšanas robežas vai tuvu tai, attiecībā uz izlecošajām vērtībām un acīmredzamu izliekumu (kas liecina par kinētiku, kas nav pirmās pakāpes kinētika), un tas jānorāda pārskatā. Jāapraksta un jāpamato visi nākamie vērtību uzlabošanai veiktie lineārās regresijas atkārtotie izvērtējumi. Ja tiek novērota būtiska novirze no pirmās pakāpes kinētikas, k_2 un $C_{0,d}$ aprēķini, visticamāk, nebūs derīgi, un jālūdz biostatistikas speciālista padoms.

6. NORĀDĪJUMI ATTIECĪBĀ UZ ĻOTI STRAUJI IZVADĪTĀM TESTĒJAMĀM VIELĀM

Kā apsvērts testēšanas metodes 129. punktā, dažas vielas var tikt izvadītas tik ātri, ka nav iespējams iegūt ticamu nulles laika koncentrāciju $C_{0,d}$ un k_2 , jo paraugos ļoti agrīnā izvadīšanas fāzē (t. i., no otrās izvadīšanas parauga un turpmāk) viela vairs netiek mērīta (kvantitatīvās noteikšanas robežās ziņotas koncentrācijas). Šāda situācija tika novērota, veicot starplaboratoriju salīdzināšanu šīs metodes pamatošanai attiecībā uz benzo[a]pirēnu, un tā tika dokumentēta metodes validācijas pārskatā. Tādos gadījumos nav iespējams veikt ticamu lineāro regresiju un, visticamāk, tiks sniegta nereāli augsta $C_{0,d}$ aplēse, rezultātā radot acīmredzamu asimilācijas efektivitāti, kas ir daudz lielāka par 1. Šādos gadījumos ir iespējams aprēķināt konservatīvu k_2 aplēsi un "augstāko pieļaujamo" BMF .

Izmantojot šos izvadīšanas fāzes datu punktus, kuros tika mērīta koncentrācija, līdz pat un ietverot pirmo “nedetektēto” koncentrāciju (uz kvantitatīvās noteikšanas robežas noteiktā koncentrācija), lineārā regresijā (izmantojot naturāllogaritma transformētus koncentrācijas datus attiecībā pret laiku) tiks iegūta k_2 aplēse. Šādos gadījumos tas varētu iesaistīt vienīgi divus datu punktus (piemēram, izvadīšanas fāzes 1. un 2. paraugšanas dienā), un pēc tam k_2 var aprēķināt, izmantojot 5. papildinājumā norādīto vienādojumu A5.22. Šo k_2 aplēsi var izmantot, lai aplēstu asimilācijas efektivitāti saskaņā ar vienādojumu A7.1., vērtību $C_{0,d}$ vienādojumā aizstājot ar izmērīto nulles laika koncentrāciju ($C_{0,m}$) gadījumos, kad aplēstais $C_{0,d}$ ir viennozīmīgi daudz lielāks par to, ko varētu sasniegt šajā testā. Ja $C_{0,m}$ nebija izmērāms, zivs audiem jāizmanto noteikšanas robeža. Ja dažos gadījumos iegūtā vērtība ir $\alpha > 1$, pieņem, ka asimilācijas efektivitāte “sliktākajā gadījumā” ir 1.

Pēc tam var aplēst maksimālo BMF_K , izmantojot vienādojumu A7.4., un tas jānorāda kā “daudz mazāks par” ($<<$) vērtību. Piemēram, pētījumā, kas tiek veikts ar 3 % barošanas intensitāti un kur izvadīšanas pussabrukšanas periods nepārsniedz 3 dienas, un “sliktākajā gadījumā” α ir 1, BMF_K , visticamāk, būs zemāks par apmēram 0,13. Ņemot vērā šīs aplēses nolūku un faktu, ka vērtības būs konservatīvas, tās jākoriģē ar augšanas izraisītu atšķaidījumu vai zivs un barības lipīdsaturu.

8. papildinājums

PIEEJAS ORIENTĒJOŠU BCF APLĒŠANAI NO DATIEM, KAS IEGŪTI BARĪBEKSPOZĪCIJAS PĒTĪJUMĀ

Ar barību saistītā metode šajā testēšanas metodē iekļauta attiecībā uz tādu vielu bioakumulācijas testēšanu, kuras praksē nav iespējams testēt, izmantojot ūdensekspozīcijas metodi. Ar ūdensekspozīcijas metodi iegūstams biokoncentrēšanās koeficients, savukārt ar barības metodi tieši iegūstama informācija par barošanās biomagnifikācijas potenciālu. Daudzos ķīmikālijas drošuma režīmos jāiekļauj informācija par ūdenisko bioloģisko koncentrēšanos (piemēram, riska novērtējumā un klasificēšanas vispārēji saskaņotajā sistēmā). Tādēļ ir vajadzība, izmantojot ar barību saistītajā pētījumā iegūtos datus, aplēst tādu biokoncentrēšanās koeficientu, kas ir salīdzināms ar koeficientu, ko iegūtu testos, kuri veikti saskaņā ar ūdensekspozīcijas metodi ⁽¹⁾. Šajā iedaļā aplūkots, ar kādām pieejām to var panākt, vienlaicīgi apzinoties šīm aplēsēm raksturīgos trūkumus.

Uzturpētījumā mēra izvadišanu, lai iegūtu izvadišanas ātruma konstanti k_z . Ja no datiem, kas pieejami par situāciju, kur zivs testējamai vielai eksponēta ar ūdeni, iespējams aplēst uzņemšanas ātruma konstanti, ir iespējams aplēst kinētisko BCF.

Aplēse, kurā noskaidro uzņemšanas ātruma konstanti gadījumos, kad organisms testējamajai vielai tiek eksponēts ūdens ceļā, balstās uz daudziem pieņēmumiem, kas visi vairo ar aplēsi saistīto nenoteiktību. Turklāt šādā BCF aplēšanas pieejā tiek pieņemts, ka kopējais izvadišanas ātrums (tostarp tādi sekmējoši faktori kā sadalījums organismā un atsevišķi izvadišanas procesi) ir atkarīgs no tā, ar kādu ekspozīcijas paņēmieni panākta testējamās vielas uzņemšana organismā.

Aplēšanas pieejai raksturīgos galvenos pieņēmumus var apkopot, kā norādīts turpmāk.

Izvadišana, kas notiek pēc uzņemšanas caur barību, ir tāda pati kā izvadišana pēc ūdensekspozīcijas attiecīgajai vielai.

Uzņemšana no ūdens norit saskaņā ar pirmās pakāpes kinētiku.

Atkarībā no uzņemšanas aplēšanai izmantotās metodes:

- uzņemšana var korelēt ar zivs svaru vien,
- uzņemšana var korelēt ar vielas oktanola-ūdens sadalījuma koeficientu vien,
- uzņemšana var korelēt, apvienojot zivs svaru un vielas oktanola-ūdens sadalījuma koeficientu,
- faktoriem, kas var praktiski ietekmēt uzņemšanu ūdensekspozīcijas pētījumā, piemēram, vielas bioloģiskajai pieejamībai, adsorbcijai uz aprīkojuma, molekulārajam izmēram utt. ietekme ir maza
- un svarīgi, lai

uzņemšanas aplēšanas metodes izstrādē izmantotā datu bāze ("apmācības kopa") ir attiecīgajai vielai pienācīgi reprezentatīva.

Pieejamajā literatūrā vairākās publikācijās norādīti vienādojumi, kas uzņemšanu zivī no ūdens caur žaunām izsaka pēc oktanola-ūdens sadalījuma koeficienta, zivs svara (1) (2) (3) (4), tilpuma un/vai lipīdsatura, izsūkšanās/difūzijas caur membrānu (5) (6), zivs ventilācijas tilpuma (7) un uz gaistamības/masas bilances pieejas (8) (9) (10). Šajā sakarā tādas metodes detalizēti novērtē Crookes & Brooke (11). Barber (12) savā publikācijā modelē bioakumulāciju, kurā uzņemšana notiek ar barību, un tā ir lietderīga arī šajā sakarībā, jo ietver informāciju no uzņemšanas ātruma modeļiem, kuros uzņemšana notiek caur žaunām. Šim aspektam bija veltīta arī iedaļa 2004. gada ar barību saistītā protokola pamatojuma dokumentā (13).

⁽¹⁾ Dabā ceļš, kurš ūdensvidē radīs vislielāko eksponētību stipri hidroforām vielām, visticamāk, ir uzņemšana ar barību, līdz ar to BCF aplēse ne vienmēr atspoguļo tādas vielas bioakumulācijas potenciālu.

Vairums šo modeļu, liekas, ir izstrādāti, izmantojot ierobežotas datu bāzes. Liekas, ka gadījumos, kad pieejama informācija par modeļa izveidē izmantoto datu bāzi, bieži vien izmantotas struktūras vai klases ziņā līdzīgas vielas (funkcionalitātes ziņā, piemēram, hlororganiski savienojumi). Tas palielina nenoteiktību, kas saistīta ar modeļa izmantošanu, lai prognozētu uzņemšanas ātruma konstanti cita veida vielai, papildus testam specifiskiem apsvērumiem, piemēram, sugai, temperatūrai utt.

Pieejamo paņēmieni pārskatā (11) tiek uzsvērts, ka neviena atsevišķa metode nav “pareizāka” par citām. Tādēļ modeļa izraudzīšanās skaidri jāpamato. Ja ir pieejamas vairākas metodes, kuru izmantošana ir pamatojama, var būt vēlami sniegt vairākas k_1 (un līdz ar to — BCF) aplēses vai k_1 vērtību (un BCF) diapazonus, kas iegūti ar vairākām uzņemšanas aplēšanas metodēm. Tomēr, ņemot vērā atšķirības starp modeļu veidiem un to izstrādē izmantotajām datu kopām, ņemt vidējo vērtību no dažādos veidos iegūtām aplēsēm nebūtu lietderīgi.

Daži pētnieki ir postulējuši, ka, lai šo aplēsi pieskaņotu ūdensekspozīcijas pētījumu rezultātiem, šāda veida BCF aplēsēm jākorrigē biopieejamība tā, lai būtu ņemtu vērā vielas adsorbēšanās uz izšķīdušā organiskā oglekļa (DOC) ūdensekspozīcijas apstākļos (piemēram, (13) (14)). Taču šī korekcija var nebūt piemērota, ņemot vērā, cik zems DOC līmenis nepieciešams, lai ūdensekspozīcijas pētījumā aplēstu “sliktāko gadījumu” (t. i., bioloģiski pieejamas vielas attiecību pret šķīdumā mērīto vielu). Stipri hidrofobām vielām uzņemšanu caur žaunām var ierobežot pasīvās difūzijas ātrums pie žaunas virsmas; šajā gadījumā ir iespējams, ka korekcija varētu ņemt vērā šo efektu, nevis to, kam tā paredzēta.

Ja vielu testē saskaņā ar šeit aprakstīto barības pētījumu (t. i. log K_{ow} , zivs svars), ieteicams koncentrēties uz metodēm, kurām nepieciešama tāda informācija, kurai vajadzīgie dati attiecībā uz testētajām vielām jau ir pieejami. Var izmantot citas metodes, kurām nepieciešama sarežģītāka informācija, bet tad testā var būt jāveic papildu mērījumi vai var būt nepieciešamas sīkas zināšanas par testējamo vielu vai zivs sugu, kas var nebūt plaši pieejamas. Turklāt modeļa izraudzīšanos var ietekmēt validācijas līmenis un pielietojamības joma (pārskatu par dažādām metodēm un to salīdzinājumu sk. (11)).

Jāpatur prātā, ka iegūtajai k_1 aplēsei un BCF aplēsei piemīt liela nenoteiktība un ka, lai iegūtu vispārēju priekšstatu par vielas bioakumulācijas potenciālu, tās kopā ar iegūtajiem BMF un vielas parametriem (piemēram, molekulāro izmēru) var būt nepieciešams izvērtēt saskaņā ar pierādījumu nozīmīguma pieeju. Šo parametru interpretēšana un izmantošana var būt atkarīga no tiesiskā regulējuma.

LITERATŪRAS SARAKSTS

- (1) Sijm D.T.H.M., Pärt P. and Opperhuizen A. (1993), The influence of temperature on the uptake rate constants of hydrophobic compounds determined by the isolated perfused gills of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquat. Toxicol.* 25: 1-14.
- (2) Sijm D.T.H.M., Verberne M.E., Part P. and Opperhuizen A. (1994), Experimentally determined blood and water flow limitations for uptake of hydrophobic compounds using perfused gills of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Allometric applications. *Aquat. Toxicol.* 30: 325-341.
- (3) Sijm D.T.H.M., Verberne M.E., de Jonge W.J., Pärt P. and Opperhuizen A. (1995), Allometry in the uptake of hydrophobic chemicals determined *in vivo* and in isolated perfused gills. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 131: 130-135.
- (4) Barber M.C. (2003), A review and comparison of models for predicting dynamic chemical bioconcentration in fish. *Environ. Toxicol. Chem.* 22: 1963-1992.
- (5) Opperhuizen A. (1986), Bioconcentration of hydrophobic chemicals in fish, in *Aquatic Toxicology and Environmental Fate*, STP 921, Poston, T.M. and Purdy, R., Editors. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA, USA: 304-315.

- (6) Arnot J.A. and Gobas F.A.P.C. (2004), A food web bioaccumulation model for organic chemicals in aquatic ecosystems. *Environ. Toxicol. Chem.* 23: 2343-2355.
- (7) Thomann R.V. (1989), Bioaccumulation model of organic chemical distribution in aquatic food chains. *Environ. Sci. Technol.* 23: 699-707.
- (8) Hendriks A.J., van der Linde A., Cornelissen G. and Sijm D.T.H.M. (2001). The power of size. 1. Rate constants and equilibrium ratios for accumulation of organic substances related to octanol-water partition ratio and species weight. *Environ. Toxicol. Chem.* 20: 1399-1420.
- (9) Campfens J. and Mackay D. (1997), Fugacity-based model of PCB bioaccumulation in complex aquatic food webs. *Environ. Sci. Technol.* 31: 577-583.
- (10) Arnot J.A. and Gobas F.A.P.C. (2003), A generic QSAR for assessing the bioaccumulation potential of organic chemicals in aquatic food webs. *QSAR Comb. Sci.* 22: 337-345.
- (11) Crookes M. and Brooke D. (2010), Estimation of fish bioconcentration factor (BCF) from depuration data. Draft Report. Environmental Agency, Bristol, UK.
- (12) Barber M.C. (2008), Dietary uptake models used for modelling the bioaccumulation of organic contaminants in fish. *Environ. Toxicol. Chem.* 27: 755-777
- (13) Anonymous (2004), Background document to the fish dietary study protocol, document submitted to the TC-NES WG on PBT.
- (14) Gobas F. and Morrison H. (2000), Bioconcentration and biomagnification in the aquatic environment, in *Handbook of property estimation methods for chemicals*, Boethling, R.S. and Mackay, D., Editors. Lewis Publishers, Boca Raton, FL, USA: 189-231."

(17) pielikuma C daļā C.20. nodaļu aizstāj ar šādu:

"C.20. *Daphnia magna* vairošanās tests

IEVADS

Šī testēšanas metode (TM) ir ekvivalenta ESAO testēšanas vadlīnijai (TG) Nr. 211 (2012). ESAO testēšanas vadlīnijas tiek periodiski pārskatītas, ņemot vērā zinātnes attīstību. Vairošanās teta testēšanas vadlīnija Nr. 211 ir no Testēšanas vadlīnijas Nr. 202 II daļas "*Daphnia* sp. reproduction test" (1984). Ir vispāratzīts, ka dati no testiem, kas veikti saskaņā ar TG 202, var būt mainīgi. Rezultātā lielas pūles tika veltītas tam, lai identificētu šā mainīguma iemeslus ar mērķi izstrādāt labāku testēšanas metodi. Testēšanas vadlīnija Nr. 211 balstās uz šo pētniecisko darbību un 1992. gadā (1), 1994. gadā (2) un 2008. gadā (3) veiktu starplaboratoriju salīdzināšanas un validācijas pētījumu rezultātiem.

Galvenās atšķirības starp vairošanās testa testēšanas vadlīnijas sākotnējo versiju (TG 202, 1984) un otro versiju (TG 211, 1998) ir šādas:

— ieteicamā izmantojamā suga ir *Daphnia magna*;

— testa ilgums ir 21 diena;

— pusstatiskos testos katrā testējamajā koncentrācijā izmantojamo dzīvnieku skaits ir samazināts no vismaz 40 dzīvniekiem, kuri, vēlams, sadalīti četrās grupās pa 10 dzīvniekiem katrā grupā, līdz vismaz 10 dzīvniekiem, kas tiek turēti atsevišķi (kaut arī caurplūdes testos var izmantot dažādus plānus);

- ir izveidoti konkrētāki ieteikumi attiecībā uz testa barotni un barošanas apstākļiem.
- Galvenās atšķirības starp vairošanās testa testēšanas vadlīnijas otro versiju (TG 211, 1998) un šo versiju ir šādas:
- ir pievienots 7. papildinājums, lai vajadzības gadījumam izskaidrotu jaundzimušo dzimuma identificēšanas procedūru. Iepriekšējām šīs testēšanas metodes versijām dzimumu attiecība ir fakultatīvs beigupunkts;
- testa kritērijs attiecībā uz radīto dzīvo pēcnācēju skaitu uz vienu dzīvu vecāku ir papildināts ar papildu testa kritēriju attiecībā uz *Daphnia* vairošanos, t. i., testa beigās radīto dzīvo pēcnācēju kopējo skaitu uz vienu *Daphnia* vecāku testa sākumā, no analīzes izslēdzot vecāku nejausu un/vai netīšu mirstību. Pievienotā testa kritērija mērķis ir šo testa kritēriju pielīdzināt citām bezmugurkaulnieku vairošanās testēšanas metodēm. Turklāt attiecībā uz šo testa kritēriju šajā testēšanas metodē ir iespējams likvidēt kļūdas avotu, proti, ietekmi, ko rada vecāku nejausa un/vai netīša mirstība, ja tā radusies ekspozīcijas perioda laikā;
- gan ECx (piemēram, EC10 vai EC50), gan NOEC/LOEC pieejā ir iekļauti papildu statistiskie norādījumi attiecībā uz testa plānu un rezultātu apstrādi;
- ir ieviests robežtests.

Izmantotās definīcijas ir sniegtas 1. papildinājumā.

TESTA PRINCIPS

Testa galvenais mērķis ir novērtēt ķīmikāliju ietekmi uz *Daphnia magna* vairošanās iznākumu. Šajā sakarībā jaunas *Daphnia* mātes (vecākus), kas testa sākumā ir jaunākas par 24 stundām, eksponē testējamai ķīmikālijai, kas pievienota ūdenim koncentrāciju diapazonā. Testa ilgums ir 21 diena. Testa beigās novērtē radīto dzīvo pēcnācēju kopējo skaitu. Vecāku vairošanās iznākumu var izteikt citādi (piemēram, kā dzīvo pēcnācēju skaitu, kas radušies uz vienu dzīvnieku dienā, sākot no pirmās dienas, kad ir novērots, ka radies pēcnācējs), bet tie būtu pārskatā jāatspoguļo papildus testa beigās radušos dzīvo pēcteču kopskaitam. Tā kā pusstatistikajam testam, salīdzinot ar citām bezmugurkaulnieku vairošanās testēšanas metodēm, ir īpaša struktūra, ir arī iespējams noteikt dzīvo pēcnācēju skaitu, ko radījis katrs no vecākiem atsevišķi. Atšķirībā no citām bezmugurkaulnieku vairošanās testēšanas metodēm šī metode dod iespēju no datu novērtējuma izslēgt radītos pēcnācējus, ja to vecāki testa laikā nejausi un/vai netīši nomirst. Tādējādi, ja eksponētajos replikātos novērojama vecāku mirstība, jāapsver, vai mirstība atbilst devas-atbildreakcijas modelim, piemēram, ja novērojama būtiska atbildreakcijas regresija attiecībā pret testējamās ķīmikālijas koncentrāciju ar pozitīvu līknes slīpumu (šim nolūkam var izmantot statistikas testu, piemēram, Kohrāna-Armitāža trenda testu). Ja mirstība devas-atbildreakcijas modelim neatbilst, replikāti, kuriem novērojama vecāku mirstība, no testa rezultātiem jāizslēdz. Ja mirstība atbilst devas-atbildreakcijas modelim, vecāku mirstība jānorāda pārskatā kā testējamās ķīmikālijas ietekme un replikāti no analīzes nav jāizslēdz. Ja vecāks mirst testēšanas laikā, t. i., nejausi nepareizas apiešanās vai negadījuma dēļ vai netīši ar testējamās ķīmikālijas ietekmi nesaistīta neizskaidrojama notikuma dēļ, vai, izrādās par vīrišķā dzimuma dzīvnieku, replikātu no analīzes izslēdz (vairāk sk. 51. punktu). Testējamās ķīmikālijas toksisko iedarbību uz vairošanos apzīmē ar ECx, ar nelineārās regresijas palīdzību datus pielāgojot attiecīgam modelim, lai noteiktu koncentrāciju, kas attiecīgi varētu izraisīt x % reproduktīvā iznākuma samazinājumu, vai alternatīvi to apzīmē kā NOEC/LOEC vērtību (4). *Vēlams, lai testējamās koncentrācijas ietver zemāko izmantoto ietekmes koncentrāciju (piemēram, EC₁₀), kas nozīmē, ka šo vērtību aprēķina ar interpolāciju, nevis ekstrapolāciju.*

Ir jānorāda arī izdzīvojušie vecāki un pirmo pēcnācēju rašanās laiks. Var izmeklēt arī ķīmikālijas radītu citu veidu ietekmi uz tādiem parametriem kā augšana (piemēram, garums) un iespējamais populācijas pieauguma patiesais ātrums (sk. 44. punktu).

INFORMĀCIJA PAR TESTĒJAMO ĶIMIKĀLIJU

Rezultāti no akūtā toksiskuma testa (sk. šā pielikuma C.2. nodaļu *Daphnia sp.* akūtais imobilizācijas tests), ko veic ar *Daphnia magna*, var būt lietderīgi, vairošanās testos izraugoties piemērotu testējamo koncentrāciju diapazonu. Jāzina testējamās ķīmikālijas šķīdība ūdenī un tvaika spiediens, un jābūt pieejamai uzticamai analītiskajai metodei ķīmikālijas daudzuma kvantitatīvai noteikšanai testa šķīdumos ar zināmu atgūstamības koeficientu un noteikšanas robežu.

Informācija par testējamo ķīmikāliju, kas var būt lietderīga, nosakot testēšanas apstākļus, ietver struktūrformulu, ķīmikālijas tīrību, stabilitāti gaismā, stabilitāti testa apstākļos, pKa, P_{ow} un testa rezultātus attiecībā uz tūlītējo bionoārdāmību (sk. šā pielikuma C.4. nodaļu (tūlītējas bionoārdāmības noteikšana) un C.29. nodaļu (tūlītēja bionoārdāmība – CO₂ hermētiski noslēgtos traukos)).

TESTA DERĪGUMS

Lai tests būtu derīgs, kontroles mēģinājumā(-os) tam jāatbilst šādiem izpildes kritērijiem:

- vecāku (*Daphnia* mātišu) mirstība testa beigās nepārsniedz 20 %;
- testa beigās dzīvu uz vienu vecāku radušos dzīvo pēcnācēju vidējais skaits ir ≥ 60 .

Piezīme: tādu pašu derīguma kritēriju (20 %) var izmantot, lai kontrolētu vecāku nejaušu un netīšu mirstību, kā arī katrai no testējamām koncentrācijām.

METODES APRAKSTS

Aprikojums

Testa traukiem un citam aprīkojumam, kas nonāk saskarē ar testa šķīdumiem, jābūt veidotiem pilnībā no stikla vai cita ķīmiski inerta materiāla. Testa trauki parasti ir stikla vārglāzes.

Turklāt nepieciešama kāda no šīm iekārtām vai tās visas:

- oksimētrs (ar mikroelektrodu vai citu ierīci, kas piemērota izšķīdušā skābekļa mērīšanai maza tilpuma paraugos);
- piemērots temperatūras kontroles aprīkojums;
- pH metrs;
- iekārta ūdens cietības noteikšanai;
- iekārta ūdens kopējā organiskā oglekļa koncentrācijas (TOC) noteikšanai vai iekārta skābekļa ķīmiskā patēriņa (COD) noteikšanai;
- piemērota iekārta apgaismojuma režīma kontrolei un gaismas intensitātes mērīšanai.

Testa organisms

Testā izmantojamā suga ir *Daphnia magna* Straus ⁽¹⁾.

Vēlams klonu identificēt, nosakot genotipu. Pētījumā (1) ir parādīts, ka klons A (kura izcelsme ir IRCHA Francijā) (5) konsekventi atbilst derīguma kritērijiem par vidēji 60 dzīviem pēcnācējiem, rēķinot uz vienu vecāku, ja tos audzē šajā testēšanas metodē aprakstītajos apstākļos. Tomēr ir pieņemami citi kloni, ja ir parādīts, ka *Daphnia* audzēšana atbilst testa derīguma kritērijiem.

⁽¹⁾ Var izmantot citas *Daphnia* sugas, ja tās atbilst attiecīgiem derīguma kritērijiem (derīguma kritērijiem, kas attiecas uz vairošanās iznākumu kontroles testā, jābūt raksturīgam visām sugām). Ja izmanto citas *Daphnia* sugas, tās ir skaidri jānorāda un to izmantojums jāpamato.

Testu uzsākot, dzīvniekiem jābūt mazāk nekā 24 stundas veciem, un tie nedrīkst būt tiešie pēcnācēji no pirmā nārsta. To izcelsmei jābūt no veselīga bara (t. i., tiem nav novērojamas tādas stresa pazīmes kā liela mirstība, tēviņu un efipiju klātbūtne, pirmā nārsta aizkavēšanās, krāsu zaudējuši dzīvnieki utt.). Bara dzīvnieki jātur tādos audzēšanas apstākļos (gaiss, temperatūra, vide, barošana un dzīvnieku skaits tilpuma vienībā), kas ir līdzīgi testā izmantojamiem apstākļiem. Ja testā izmantotā *Daphnia* barotne atšķiras no vides, ko izmanto parastā *Daphnia* audzēšanā, laba prakse ir iekļaut pirmstesta aklimatizācijas posmu, kas parasti ilgst aptuveni trīs nedēļas (t. i., viena paaudze), lai izvairītos no vecāku stresa.

Testa barotne

Šajā testā ieteicams izmantot pilnībā definētu barotni. Tā var izvairīties no grūti raksturojamu piedevu (piemēram, jūraszāļu, augšnes ekstrakta utt.) izmantošanas un līdz ar to uzlabot standartizācijas iespējas starp laboratorijām. Šim mērķim par piemērotām tiek uzskatītas *Elenđt* M44 (6) un M7 barotnes (sk. 2. papildinājumu). Tomēr ir pieņemamas citas barotnes (piemēram, (7) (8)) ar nosacījumu, ka ir pierādīts, ka *Daphnia* audzēšana atbilst testa derīguma kritērijiem.

Ja izmanto barotni, kurā ietilpst nedefinētas piedevas, šādas piedevas skaidri jānorāda un testēšanas pārskatā jāsniedz informācija par sastāvu, jo īpaši attiecībā uz oglekļa saturu, jo tas var dot ieguldījumu paredzētajā barībā. Ir ieteicams noteikt kopējo organisko oglekli (TOC) un/vai skābekļa ķīmisko patēriņu (COD) organiskās piedevas izejas preparātā un novērtēt ieguldījumu attiecībā uz TOC/COD pagatavotajā testa barotnē. Vēl ir ieteicams, lai barotnes TOC līmeņi (t. i., pirms aļģu pievienošanas) būtu mazāki par 2 mg/l (9).

Ja testējamās ķīmikālijas satur metālus, ir svarīgi apzināties, ka testa barotnes īpašības (piemēram, cietība, helātu veidošanas spēja) var ietekmēt testējamās ķīmikālijas toksiskumu. Šā iemesla dēļ ir vēlams pilnībā definēta barotne. Tomēr pašlaik vienīgās pilnībā definētās barotnes, par kurām ir zināms, ka tās ir piemērotas *Daphnia magna* ilgtermiņa audzēšanai, ir *Elenđt* M4 un M7. Abas barotnes satur helātus veidojošo reaģentu EDTA. Pētījumā (2) ir parādīts, ka kadmija "šķietamais toksiskums" parasti ir mazāks, ja vairošanās testu veic M4 un M7 barotnē, nekā ja to veic barotnē, kas nesatur EDTA. Tādēļ M4 un M7 nav ieteicamas, lai testētu metālus saturošas ķīmikālijas, un jāizvairās arī lietot citas barotnes, kas satur zināmus helātus veidojošus reaģentus. Metālus saturošām ķīmikālijām var būt ieteicams izmantot alternatīvu barotni, piemēram, ASTM rekonstituētu cietu, svaigu ūdeni (9), kas nesatur EDTA. ASTM rekonstituēta cieta, svaiga ūdens un jūraszāļu ekstrakta apvienošana (10) ir piemērota *Daphnia magna* audzēšanai ilgtermiņā (2).

Izšķīdušā skābekļa koncentrācijai testa sākumā un tā laikā jābūt virs 3 mg/l. pH jābūt 6–9 diapazonā, un parasti tas vienā testā nedrīkst mainīties par vairāk nekā 1,5 vienībām. Cietība ir ieteicama lielāka par 140 mg/l (rēķinot uz CaCO₃). Testi šajā līmenī un virs tā ir parādījuši vairošanās spēju, kas atbilst derīguma kritērijiem (11) (12).

Testa šķīdumi

Izraudzīto koncentrāciju testa šķīdumus parasti gatavo, atšķaidot izejšķīdumu. Izejšķīdumus vēlams sagatavot, neizmantojot nekādus šķīdinātājus vai izkļiedētājus, ja tas iespējams, testējamo ķīmikāliju testa barotnē iemaisot vai iejaucot testa barotnē ar mehāniskiem līdzekļiem, piemēram, jaukšanu, kratīšanu vai apstrādi ar ultraskaņu, vai izmantojot citas piemērotas metodes. Ja ir prasīts pirms testa organismu iesaistīšanas pierādīt, ka tiek saglabātas stabilas ekspozīcijas koncentrācijas, testa sistēmas vēlams eksponēt tādām testējamās ķīmikālijas koncentrācijām, kas tiks izmantotas pētījumā. Ja testējamo ķīmikāliju ir grūti izšķīdināt ūdenī, jāizmanto ESAO Norādījumos par sarežģītu vielu apstrādi (13) aprakstītās procedūras. Jāvairās no šķīdinātāju vai izkļiedētāju izmantošanas, tomēr atsevišķos gadījumos, lai pagatavotu dozēšanai vajadzīgās koncentrācijas izejšķīdumu, tie var būt nepieciešami.

Papildus testējamām koncentrācijām jāveic arī atšķaidīšanas ūdens kontrole ar pienācīgiem replikātiem un, ja nav iespējams citādi, arī šķīdinātāja kontrole ar pienācīgiem replikātiem. Testā jāizmanto tikai tādi šķīdinātāji vai izkļiedētāji, par kuriem ir noskaidrots, ka tiem nav nekādas būtiskas vai ir tikai neliela ietekme uz testa kritērijiem. Piemērotu šķīdinātāju (piemēram, acetona, etanola, metanola, dimetilformamīda un trietilēnglikola) un izkļiedētāju (piemēram, *Cremophor* RH40, metilcelulozes 0,01 % un HCO-40) paraugi ir norādīti (13). Ja izmanto šķīdinātāju vai izkļiedētāju, tā gala koncentrācija nedrīkst pārsniegt 0,1 ml/l (13) un tā koncentrācijai jābūt vienādei visos testa traukos, izņemot atšķaidīšanas ūdens kontrolgrupu. Tomēr jāpieliek visas pūles, lai šķīdinātāja koncentrāciju saglabātu minimālajā līmenī.

PROCEDŪRA

Ekspozīcijas apstākļi

Ilgums

Testa ilgums ir 21 diena.

Ievietošana

Vecākus tur atsevišķi, pa vienam katrā testa traukā, parasti katrā traukā 50–100 ml barotnes (attiecībā uz *Daphnia magna* var izmantot mazāku tilpumu, jo īpaši mazākiem *Daphnia* sugu dzīvniekiem, piemēram, *Ceriodaphnia dubia*), ja vien testēšanā nav nepieciešama caurplūdes testa struktūra.

Lai izpildītu analītiskās procedūras prasības, ko izmanto testējamās ķīmikālijas koncentrācijas noteikšanai, dažreiz var būt vajadzīgi lielāki tilpumi, kaut arī ir pieļaujams ķīmiskās analīzes nolūkam apvienot vienādas koncentrācijas trauku saturu. Ja izmanto tilpumus, kas lielāki par 100 ml, var būt nepieciešams palielināt *Daphnia* doto barības daudzumu, lai nodrošinātu pienācīgu barības pieejamību un atbilstību derīguma kritērijiem.

Testa dzīvnieki

Pusstatiskos testos vismaz 10 dzīvniekus tur atsevišķi katrā testējamā koncentrācijā un vismaz 10 dzīvniekus tur atsevišķi kontroles sērijā.

Caurplūdes testos ir parādīts, ka ir piemēroti 40 dzīvniekus sadalīt četrās grupās pa 10 dzīvniekiem katrā testējamā koncentrācijā (1). Var izmantot mazāku testa organismu skaitu un ir ieteicams vismaz 20 dzīvnieki uz koncentrāciju, sadalot divos vai vairākos replikātos ar vienādu dzīvnieku skaitu (piemēram, četri replikāti ar piecām dafnijām katrā). Jāņem vērā, ka testos, kuros dzīvniekus tur grupās, no statistiskās analīzes nebūs iespējams izslēgt kādu no pēcnācējiem, ja rodas nejauša/netīša vecāku mirstība, kad ir sākusies vairošanās, un līdz ar to šajos gadījumos vairošanās iznākums būtu jāizsaka kā dzīvo pēcnācēju kopējais skaits, kas radušies no viena vecāka testa sākumā.

Apstrāde jāveic testa traukos, un visas turpmākās darbības ar testa traukiem jāveic randomizēti. Ja tā nedara, tas var radīt neobjektivitāti, ko varētu uzskatīt par ietekmi uz koncentrāciju. Jo īpaši, ja ar eksperimenta vienībām rīkojas apstrādes vai koncentrācijas secībā, dažas ar laiku saistītas ietekmes, piemēram, eksperimenta veicēja nogurums vai cita kļūda, lielāku ietekmi var radīt lielākās koncentrācijās. Turklāt, ja testa rezultātus varētu ietekmēt testa sākotnējie vai apkārtējie apstākļi, piemēram, novietojums laboratorijā, tad būtu jāapsver, vai testu nebloķēt.

Barošana

Pusstatiskos testos barošanu vēlams veikt reizi dienā, bet vismaz trīs reizes nedēļā (t. i. atbilstīgi vides pārmaiņām). Jāņem vērā ekspozīcijas koncentrāciju iespējamais atšķaidījums, pievienojot barību, un no tās iespējami jāizvairās ar stipras koncentrācijas aļģu suspensijām. Novirzes no tā (piemēram, caurplūdes testos) jānorāda pārskatā.

Testa laikā vecāku uzturam vēlams izmantot dzīvas vienas vai vairāku šādu sugu aļģu šūnas: *Chlorella* sp., *Pseudokirchneriella subcapitata* (agrāk *Selenastrum capricornutum*) un *Desmodesmus subspicatus* (agrāk *Scenedesmus subspicatus*). Piegādātajam uzturam jāpamatojas uz katram vecākam nodrošinātā organiskā oglekļa (C) daudzumu. Pētījumā (14) ir parādīts, ka *Daphnia magna* gadījumā ar barības limeņiem no 0,1 līdz 0,2 mg C uz *Daphnia* dienā pietiek, lai sasniegtu vajadzīgo dzīvo pēcnācēju skaitu atbilstīgi testa derīguma kritērijiem. Barību var piegādāt vai nu nemainīgā daudzumā visā testa laikā, vai, ja vēlas, sākumā var piegādāt mazāku daudzumu un pēc tam testa laikā to palielināt, lai ņemtu vērā vecāku augšanu. Šādā gadījumā barībai tomēr visu laiku jāpaliek ieteicamajā diapazonā 0,1–0,2 mg C uz *Daphnia* dienā.

Ja vajadzīgā barības daudzuma izbarošanai ir jāizmanto tādi aizvietotāji mērījumi kā aļģu šūnu skaits vai gaismas absorbcija (t. i., ērtības labad, jo oglekļa satura mērījumi ir laikietilpīgi), katrai laboratorijai ir jāizveido savas nomogrammas, kas saista aizvietotāju mērījumu ar aļģu kultūras oglekļa saturu (padomus par nomogrammu izveidi sk. 3. papildinājumā). Nomogrammas jāpārbauda vismaz reizi gadā, un tas jā dara biežāk, ja ir mainījušies aļģu kultūras apstākļi. Ir konstatēts, ka gaismas absorbcija ir labāks aizvietotājs oglekļa satura mērījumiem nekā šūnu skaits (15).

Lai līdz minimumam samazinātu aļģu kultūras vides tilpumu, ko pārnes testa traukos, *Daphnia* jāizbaro koncentrēta aļģu suspensija. Aļģu koncentrāciju var panākt ar centrifugēšanu, kam seko atkārtota suspendēšana *Daphnia* kultūras vidē.

Gaisma

16 stundas apgaismojuma, kura intensitāte nepārsniedz $15\text{--}20\ \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, mērot uz trauka ūdens virsmas. Apgaismojuma mērīšanas instrumentiem, kas ir kalibrēti luksos, ekvivalents 1 000–1 500 lux aukstās baltās gaismas intervāls ir tuvu ieteiktajai gaismas intensitātei $15\text{--}20\ \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

Temperatūra

Testa vides temperatūrai jābūt 18–22°C diapazonā. Tomēr katrā atsevišķā testā temperatūra, ja iespējams, šajās robežās nedrīkstētu mainīties vairāk kā par 2°C (piemēram, 18–20 °C, 19–21 °C vai 20–22°C) dienā. Var būt lietderīgi izmantot papildu testa trauku temperatūras uzraudzības mērķiem.

Aerācija

Testa laikā testa traukus nedrīkst piesātināt ar gaisu.

Testa plāns

Diapazona noteikšanas tests

Nepieciešamības gadījumā diapazona noteikšanas testu veic, piemēram, ar piecām testējamo ķīmikāliju koncentrācijām un diviem replikātiem katrai apstrādes un kontroles reizei. Izraugoties koncentrāciju diapazonu tā noteikšanas testam, var būt arī lietderīgi izmantot papildu informāciju no testiem ar līdzīgām ķīmikālijām vai pieejamo literatūru par *Daphnia* akūto toksiskumu un/vai citiem ūdens organismiem.

Diapazona noteikšanas tests ilgst 21 dienu vai pietiekami, lai ticami prognozētu ietekmes līmeņus. Testa beigās izvērtē *Daphnia* vairošanos. Jāreģistrē vecāku skaits un pēcnācēju sastopamība.

Galīgais tests

Parasti jābūt vismaz piecām testa koncentrācijām, kuras pielīdzina efektīvai koncentrācijai (piemēram, EC_x) un kuras jāsakārto ģeometriskā kārtībā, vēlams, lai sadalījuma koeficients nepārsniegtu 3,2. Katrai testa koncentrācijai jāizmanto atbilstošs skaits replikātu (sk. 24.-25. punktu). Ja testē mazāk nekā piecas koncentrācijas, tas ir jāpamato. Ķīmikālijas testa barotnē nedrīkst testēt virs to šķīdības robežas. Pirms eksperimenta veikšanas ieteicams apsvērt testu struktūras statistisko jaudu un izmantot atbilstošas statistiskās metodes (4). Nosakot koncentrāciju diapazonu, jāpatur prātā turpmākais:

- (i) ja novērtē EC_x ietekmi uz vairošanos, ieteicams izmantot pietiekami lielas koncentrācijas, lai ar atbilstīgu ticamības līmeni definētu EC_x . Izmantotajām testējamām koncentrācijām vēlams pielīdzināt aplēsto EC_x tā, lai EC_x tiktu iegūts ar interpolāciju, nevis ekstrapolāciju. Šīs statistiskās analīzes priekšrocība ir tāda, ka ir vairāk testējamo koncentrāciju (piemēram, 10) un mazāk katras koncentrācijas replikātu (piemēram, 5, tādējādi uzturot kopējo trauku skaitu nemainīgu) un ar 10 kontrolēm;
- (ii) aplēšot LOEC un/vai NOEC, zemākajai testējamai koncentrācijai jābūt pietiekami zelai, lai vairošanās iznākums attiecīgajā koncentrācijā nebūtu ievērojami mazāks par kontrolē iegūto. Ja tā nav, tests jāatkārto ar samazinātu mazāko koncentrāciju;
- (iii) aplēšot LOEC un/vai NOEC, augstākajai testējamai koncentrācijai jābūt pietiekami augstai, lai vairošanās iznākums attiecīgajā koncentrācijā būtu ievērojami mazāks par kontrolē iegūto. Ja tā nav, tests jāatkārto ar palielinātu augstāko koncentrāciju, ja vien maksimālā nepieciešamā testa koncentrācija hroniskas ietekmes testēšanai (t. i., 10 mg/l) sākotnējā testā netika izmantota kā augstākā testa koncentrācija.

Ja diapazona noteikšanas testā pie augstākās koncentrācijas (piemēram, pie 10 mg/l) nav novērojama ietekme vai testējamai ķīmikālijai, ļoti iespējams, būs zems toksiskums/toksiskuma nebūs, balstoties uz toksiskuma trūkumu, citiem organismiem un/vai zemu/nekādu uzņemšanu, vairošanās testu var veikt kā robežtestu, izmantojot testējamo koncentrāciju, piemēram, 10 mg/l, un kontroli. Gan apstrādggrupai, gan kontrolgrupai jāizmanto desmit replikāti. Ja robežtests jāveic caurplūdes sistēmā, būs piemērots mazāks replikātu skaits. Robežtests dos iespēju pierādīt, ka robežkoncentrācijai nav statistiski būtiskas ietekmes, bet, ja tiek reģistrēta ietekme, parasti jāveic pilns tests.

Kontroles

Jāizdara viena testa barotnes kontroles testu sērija un attiecīgā gadījumā arī viena kontroles testu sērija ar šķīdinātāju vai izkļiedātāju. Ja izmanto šķīdinātāju vai izkļiedātāju, koncentrācijai jābūt tādai pašai, kādu izmanto traukos, kuros ir testējamā ķīmikālija. Jāizmanto piemērots replikātu skaits (sk. 23.-24. punktu).

Parasti labi izdarītā testā variāciju koeficientam ap dzīvo pēcteču vidējo skaitu uz vienu vecāku kontroles testā jābūt – 25 %, un tas jānorāda testa plānos, kuros izmanto atsevišķi turētus dzīvniekus.

Testa barotnes atjaunošana

Barotnes atjaunošanas biežums ir atkarīgs no testējamās ķīmikālijas stabilitātes, bet barotne būtu jāatjauno vismaz trīs reizes nedēļā. Ja no iepriekšējiem stabilitātes testiem (sk. 7. punktu) ir zināms, ka testējamās ķīmikālijas koncentrācija nav stabila (t. i., ārpus 80–120 % diapazona no nominālās koncentrācijas vai zem 80 % no sākotnējās izmērītās koncentrācijas maksimālajā atjaunošanās laikā (t. i., trīs dienās), jāapsver, vai biežāk neatjaunot barotni vai neizmanto caurplūdes testu.

Ja barotni atjauno pusstatiskos testos, sagatavo otru testa trauku sēriju un vecākus pārvieto uz tiem, piemēram, ar piemērota diametra stikla pipeti. Vides tilpumam, kas pārņests kopā ar *Daphnia*, jābūt iespējami mazam.

Novērojumi

Testa laikā izdarīto novērojumu rezultāti jāreģistrē datu lapās (sk. piemērus 4. un 5. papildinājumā). Ja jāveic citi mērījumi (sk. 44. punktu), var būt vajadzīgi papildu novērojumi.

Pēcnācēji

Pēcnācējus, kas radušies no katra vecāka, sākot no pirmā nārsta parādīšanās, vēlams katru dienu izņemt un saskaitīt, lai tie nevarētu patērēt barību, kas paredzēta vecākam. Šīs testēšanas metodes nolūkam ir jāskaita ne vien dzīvie pēcnācēji, bet jānorāda arī nepilnīgi attīstītās oļņas un nedzīvie pēcnācēji.

Mirstība

Vecāku mirstību vēlams reģistrēt katru dienu vai vismaz tajos pašos laikos, kad skaita pēcnācējus.

Citi parametri

Kaut arī šī testēšanas metode galvenokārt ir paredzēta, lai novērtētu ietekmi uz vairošanās iznākumu, ir iespējams, ka arī citas ietekmes var novērtēt pietiekami kvantitatīvi, lai varētu izdarīt statistisko analīzi. Vairošanās iznākumu uz izdzīvojušo vecāku, t. i., dzīvo pēcnācēju skaitu testa laikā, ko radījis viens vecāks, var reģistrēt. To var salīdzināt ar galveno atkarīgo mainīgo (vairošanās iznākums uz tādu vecāku testa sākumā, kas testa laikā nav nejauši vai netīši nomiris). Ja eksponētajos replikātos novērojama vecāku mirstība, jāapsver, vai mirstība atbilst devas–atbildreakcijas modelim, piemēram, ja attiecībā pret testējamās ķīmikālijas koncentrāciju novērojama būtiska atbildreakcijas regresija ar pozitīvu liknes slīpumu (šim nolūkam var izmantot statistikas testu, piemēram, Kohrāna–Armitāža trenda testu). Ja mirstība devas–atbildreakcijas modelim neatbilst, replikāti, kuriem novērojama vecāku mirstība, no testa rezultātiem jāizslēdz. Ja mirstība atbilst devas–atbildreakcijas modelim, vecāku mirstība jānorāda kā testējamās ķīmikālijas ietekme un replikāti no testa rezultāta analīzes nav jāizslēdz. Augšanas mērījumi ir ļoti vēlama, jo tie informē par iespējamo subletālo ietekmi, kas var būt lietderīga papildus vairošanās pasākumiem vieniem pašiem; testa beigās ieteicams mērīt vecāku garumu (t. i., ķermeņa garumu, izņemot postabdomena nagu). Pie citiem mērāmiem vai aprēķināmiem parametriem pieder pirmo (un turpmāko) pēcnācēju radīšanai nepieciešamais laiks, nārstu skaits un apjoms uz vienu dzīvnieku, pārtraukto nārstu skaits, jaundzimušo vīrišķo pēcnācēju un efipiju esība (ESAO, 2008. gads) un iespējami populācijas pieauguma raksturīgais ātrums (definīciju sk. 1. papildinājumā, bet par jaundzimušo dzimuma identificēšanu sk. 7. papildinājumu).

Analītiskās noteikšanas un mērījumu biežums

Skābekļa koncentrācija, temperatūra, ūdens cietība un pH vērtības jāmēra vismaz ik nedēļu svaigā un vecā barotnē, kontroles testos un lielākajā testējamās ķīmikālijas koncentrācijā.

Testa laikā testējamās ķīmikālijas koncentrācijas nosaka regulāros intervālos.

Pusstatiskos testos, ja ir sagaidāms, ka testējamās ķīmikālijas koncentrācija saglabāsies ± 20 % robežās no nominālā lieluma (t. i., 80–120 % diapazonā — sk. 6., 7. un 39. punktu), ieteicams vismaz lielākās un mazākās testa koncentrācijas analizēt svaigi pagatavotas un atjaunošanas laikā vienu reizi testa pirmās nedēļas laikā (t. i., analīzes jāizdara paraugam no tā paša šķīduma — svaigi pagatavotam un pie atjaunošanas). Šīs noteikšanas pēc tam būtu jāatkārto vismaz ik nedēļu.

Ja testā ir sagaidāms, ka testējamās ķīmikālijas koncentrācija nesaglabāsies $\pm 20\%$ robežās no nominālā lieluma, jāanalizē visas testējamās koncentrācijas — svaigi pagatavotas un pie atjaunošanas. Tomēr tādos testos, kuros testējamās ķīmikālijas izmērītā sākotnējā koncentrācija nav $\pm 20\%$ no nominālā lieluma, bet pietiekami pierādījumi liecina, ka sākotnējās koncentrācijas ir atkārtojamas un stabilas (t. i., 80–120 % diapazonā no sākotnējām koncentrācijām), ķīmiskās noteikšanas var veikt tikai pie pašām lielākajām un mazākajām testējamajām koncentrācijām testa 2. un 3. nedēļā. Visos gadījumos testējamās ķīmikālijas koncentrāciju noteikšana veicama pirms svaiga šķīduma pievienošanas vienā replikāta traukā katrai testējamajai koncentrācijai.

Ja izmanto caurplūdes testu, paraugus ņem līdzīgā režīmā, kā aprakstīts pusstatistikās metodes gadījumā (bet šajā gadījumā nav piemērojama “veco” šķīdumu mērīšana). Tomēr var būt ieteicams pirmajā nedēļā palielināt paraugošanas reižu skaitu (piemēram, trīs mērījumu komplekti), lai nodrošinātu, ka testējamās koncentrācijas paliek stabilas. Šāda veida testos šķīdinātāja un testējamās ķīmikālijas plūsmas ātrums jāpārbauda katru dienu.

Ja ir pierādījumi, ka testējamās ķīmikālijas koncentrācija visā testa laikā ir apmierinoši uzturēta $\pm 20\%$ robežās no nominālās vai izmērītās sākotnējās koncentrācijas, tad rezultātu pamatā var būt nominālās vai izmērītās sākotnējās vērtības. Ja novirze no nominālās vai izmērītās sākotnējās koncentrācijas ir lielāka par $\pm 20\%$, rezultāti jāizsaka kā laikā svērtais vidējais lielums (norādes par aprēķiniem sk. 6. papildinājumā).

DATI UN PĀRSKATA SNIEGŠANA

Rezultātu apstrāde

Šā testa mērķis ir noteikt testējamās ķīmikālijas ietekmi uz vairošanās iznākumu. Katram testa traukam (t. i., replikātam) jāaprēķina dzīvu pēcnācēju kopējais skaits uz vienu vecāku. Turklāt vairošanos var aprēķināt, pamatojoties uz izdzīvojuša vecāka organisma radītu dzīvu pēcnācēju. Tomēr ekoloģiskajā ziņā visatbilstošākais testa kritērijs ir dzīvu pēcnācēju kopējais skaits, ko radījis katrs vecāks, kurš nav nejauši ⁽¹⁾ vai netīši ⁽²⁾ nomiris testa laikā. Ja vecāks nejauši vai netīši nomirst testa laikā vai, izrādās, ir vīrišķā dzimuma dzīvnieks, replikātu no analīzes izslēdz. Analīze tādā gadījumā pamatojas uz mazāku replikātu skaitu. Ja eksponētajos replikātos novērojama vecāku mirstība, jāapsver, vai mirstība atbilst devas–atbildreakcijas modelim, piemēram, ja attiecībā pret testējamās ķīmikālijas koncentrāciju novērojama būtiska atbildreakcijas regresija ar pozitīvu līknes slīpumu (šim nolūkam var izmantot statistikas testu, piemēram, Kohrāna-Armitaža trenda testu). Ja mirstība devas–atbildreakcijas modelim neatbilst, replikāti, kuriem novērojama vecāku mirstība, jāizslēdz no testa rezultātiem. Ja mirstība atbilst devas–atbildreakcijas modelim, vecāku mirstība jānorāda kā testējamās ķīmikālijas ietekme un replikāti no testa rezultāta analīzes nav jāizslēdz.

Rezumējot, ja ietekmes atspoguļošanai izmanto *LOEC* un *NOEC* vai *EC_x*, ietekmi uz vairošanos ieteicams aprēķināt, izmantojot abus iepriekš minētos atkarīgos mainīgos, t. i.,

— dzīvu pēcnācēju kopējais skaits, ko radījis katrs vecāks, kurš nav nejauši vai netīši nomiris testa laikā; un

— viena vecāka radīto dzīvu pēcnācēju kopējais skaits;

un tad par galīgo rezultātu, kas aprēķināts, izmantojot kādu no šiem abiem atkarīgajiem mainīgajiem, izmantot zemākās *NOEC* un *LOEC* vai *EC_x* vērtības.

Pirms izmantot statistisko analīzi, piemēram, ANOVA procedūras, apstrāžu salīdzinājumu kontroles veikšanai ar Stjudenta t-testu, Daneta testu, Viljamsa testu vai descendentu Džonkhīra-Terpstra testu, ja tas vajadzīgs konkrētā statistikas testa prasību izpildei, ieteicams apsvērt, vai dati nav jātransformē. Var apsvērt, vai neizmantojot Danna vai Manna-Vitnija testus kā neparametriskas alternatīvas. Individuālo apstrāžu vidējiem rādītājiem aprēķina ticamības intervālu 95 %.

⁽¹⁾ Nejauša mirstība: nejauša notikuma (t. i., zināms iemesls) izraisīta mirstība, kas nav saistīta ar ķīmikāliju.

⁽²⁾ Netīša mirstība: mirstība, kas nav saistīta ar ķīmikāliju un kuras iemesls nav zināms.

Izdzīvojušo vecāku skaits neapstrādātajās kontrolēs ir galvenais derīguma kritērijs, un tas ir jādokumentē un jānorāda pārskatā. Galīgajā pārskatā jānorāda arī visas pārējās negatīvās ietekmes, piemēram, anormāla uzvedība un toksikoloģiski būtiski konstatējumi.

ECx

ECx vērtības, tostarp ar tām saistīto zemāko un augstāko ticamības robežu, aprēķina, izmantojot piemērotas statistikas metodes (piemēram, logistisko vai Veibula funkciju, sāsināto Spīrmena-Kārbera metodi vai vienkāršu interpolāciju). Lai aprēķinātu EC10, EC₅₀ vai jebkuru citu ECx, visai datu kopai jāveic regresijas analīze.

NOEC/LOEC

Ja ar statistisko analīzi paredzēts noteikt NOEC/LOEC, jāizmanto piemērotas statistikas metodes saskaņā ar ESAO 54. dokumentu "Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: a Guidance to Application" (4). Parasti tiek analizēta testējamās ķimikālijas nelabvēlīgā ietekme salīdzinājumā ar kontrolgrupu, izmantojot vienaspusējās hipotēzes testu ar $p \leq 0,05$.

Normālo sadalījumu un dispersijas homogenitāti var testēt ar piemērotu statistikas testu, piemēram, attiecīgi Šapiro-Vilka testu un Lēvena testu ($p \leq 0,05$). Var izmantot vienvirziena ANOVA un turpmākus daudzfaktoru salīdzināšanas testus. Daudzfaktoru salīdzinājumus (piemēram, Daneta testu) vai descendantus trenda testus (piemēram, Viljamsa testu vai descendantu Džonkhīra-Terpstra testu) var izmantot, lai aprēķinātu, vai starp kontrolgrupām un dažādajām testējamās ķimikālijas koncentrācijām ir statistiski būtiskas atšķirības ($p \leq 0,05$) (ieteicamā testa izraudzīšanās saskaņā ar ESAO 54. dokumentu (4)). Pretējā gadījumā NOEC un LOEC noteikšanai izmantojamās neparametriskās metodes (piemēram, Bonferoni U-tests saskaņā ar Holma vai Džonkhīra-Terpstra trenda testu).

Robežtests

Ja ir veikts robežtests (kontrolgrupas un tikai vienas apstrādgrupas salīdzinājums) un ir izpildīti parametrisko testēšanas procedūru priekšnosacījumi (normalitāte, homogenitāte), metriskās atbildreakcijas var izvērtēt ar Stjūdenta testu (t-testu). Ja šīs prasības nav izpildītas, var izmantot nevienlīdzīgas dispersijas t-testu (Velča testu) vai neparametrisku testu, piemēram, Manna-Vitnija U-testu.

Lai noteiktu būtiskas atšķirības starp kontrolgrupām (kontrolgrupu un šķīdinātāja vai izkliedētāja kontrolgrupu), katras kontrolgrupas replikātus var testēt, kā aprakstīts attiecībā uz robežtestu. Ja šajos testos netiek atklātas būtiskas atšķirības, visus kontroles un šķīdinātāja kontroles replikātus var apkopot. Citādi visas apstrādgrupas jāsalīdzina ar šķīdinātāja kontrolgrupu.

Testēšanas pārskats

Testēšanas pārskatā jāiekļauj šāda informācija:

Testējamā ķimikālija:

- fizikālais stāvoklis un attiecīgās fizikālķīmiskās īpašības;
- ķīmiskās identifikācijas dati, tostarp tīrība.

Testa sugas:

- klons (vai tam ir ģenētiski noteikts tips), piegādātājs vai avots (ja tas ir zināms) un izmantotie audzēšanas apstākļi. Ja izmanto dažādas *Daphnia magna* sugas, tas jāatspoguļo un jāpamato pārskatā.

Testēšanas apstākļi:

- izmantotā testa procedūra (piemēram, pusstatiskā vai caurplūdes, tilpums, ievietoto *Daphnia* skaits uz litru);

- fotoperiods un gaismas intensitāte;
- testa plāns (piemēram, replikātu skaits, vecāku skaits uz replikātu);
- detalizēta informācija par izmantoto barotni;
- organiskā materiāla piedevas, ja tādas ir lietotas, tostarp to sastāvs, avots, sagatavošanas metode, izejas preparāts TOC/COD, testa barotnē iegūtā TOC/COD novērtējums;
- detalizēta informācija par barošanu, arī daudzums (mg C/*Daphnia* dienā) un grafiks (piemēram, barības veids(-i), attiecībā uz aļģēm iekļaujot specifisko (sugas) nosaukumu un, ja zināms, celmu un audzēšanas apstākļus);
- izejšķiduma pagatavošanas metode un atjaunošanas biežums (jānorāda šķīdinātājs vai izkļiedētājs, ja to lieto, un tā koncentrācija).

Rezultāti:

- iepriekšēju pētījumu rezultāti par testējamās ķīmikālijas stabilitāti;
- nominālās testa koncentrācijas un visu analīžu rezultāti testējamās ķīmikālijas koncentrāciju noteikšanai testa traukos (datu lapu paraugu sk. 5. papildinājumā); jānorāda arī metodes atjaunošanās efektivitāte un noteikšanas robeža;
- ūdens kvalitāte testa traukos (t. i., pH, temperatūra un izšķīdušā skābekļa koncentrācija, un TOC un/vai COD, un attiecīgā gadījumā cietība) (datu lapas paraugu sk. 4. papildinājumā);
- visi dati par testa laikā katra vecāka radītajiem dzīvajiem pēcnācējiem (datu lapas paraugu sk. 4. papildinājumā);
- vecāku nāves gadījumu skaits un diena, kad tas noticis (datu lapas paraugu sk. 4. papildinājumā);
- vairošanās iznākuma kontroles variāciju koeficients (pamatojoties uz dzīvo pēcnācēju kopējo skaitu uz vienu testa beigās dzīvu vecāku);
- grafiks ar dzīvo pēcnācēju kopējo skaitu uz vienu vecāku katrā replikātā, izņemot visus vecākus, kas nejauši vai netīši miruši testa laikā attiecībā pret testējamās ķīmikālijas koncentrāciju;
- attiecīgā gadījumā grafiks ar dzīvo pēcnācēju kopējo skaitu uz vienu testa beigās dzīvu vecāku katrā replikātā attiecībā pret testējamās ķīmikālijas koncentrāciju;
- attiecīgā gadījumā vairošanās zemākā novērojamās ietekmes koncentrācija (LOEC), tostarp izmantotās statistiskās procedūras apraksts un norāde par ietekmes apmēru, ko paredzēts konstatēt (lai to iegūtu, pirms eksperimenta sākuma var analizēt jaudu), un vairošanās nenovērojamās ietekmes koncentrācija (NOEC); informācija, kurai testa kritērijs, kas tika izmantots, lai aprēķinātu LOEC un NOEC vērtību (kā kopējais dzīvo pēcnācēju skaits uz mātīšņu organismu, kas nejauši vai netīši nav testa laikā miris, vai kā dzīvo pēcnācēju kopējais skaits uz izdzīvojušu mātīšņu organismu), attiecīgā gadījumā pārskatā jānorāda arī vecāku mirstības LOEC un NOEC;
- attiecīgā gadījumā vairošanās EC_x un ticamības intervāli (piemēram, 90 % vai 95 %) un tās aprēķināšanai pielāgotā modeļa grafiks, devas-atbildreakcijas līknes slīpums un tās standartklūda;
- citas novērotas bioloģiskas ietekmes vai mērījumi: pārskatā jānorāda jebkādas citas novērotas vai izmērītas bioloģiskas ietekmes (piemēram, vecāku augšana), tostarp tās attiecīgi jāpamato;
- paskaidrojums par atkāpēm no testēšanas metodes.

LITERATŪRAS SARAKSTS

- (1) OECD Test Guidelines Programme. Report of the Workshop on the *Daphnia magna* Pilot Ring Test, Sheffield University, U.K., 20-21 March 1993.
- (2) OECD (1997). Report of the Final Ring Test of the *Daphnia magna* Reproduction Test. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No.6. OECD, Paris.
- (3) OECD (2008). Validation report for an enhancement of OECD TG 211 *Daphnia magna* reproduction test. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, No.88. OECD, Paris.
- (4) OECD (2006). Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: a guidance to application. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment Number 54. OECD, Paris.
- (5) Baird, D.J., *et al.* (1991). A comparative study of genotype sensitivity to acute toxic stress using clones of *Daphnia magna* Straus. *Ecotox. and Environ. Safety*, 21, 257-265.
- (6) Elendt, B.-P. (1990). Selenium deficiency in Crustacea; An ultrastructural approach to antennal damage in *Daphnia magna* Straus. *Protoplasma*, 154, 25-33.
- (7) EPA (2002). Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms. Fifth Edition. EPA/821/R-02/012. U.S. Environmental Protection Agency, Office of Water, Washington, DC. www.epa.gov/waterscience/methods
- (8) Vigano, L. (1991). Suitability of commercially available spring waters as standard medium for culturing *Daphnia magna*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 47, 775-782.
- (9) ASTM. (2008) Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians. In: Annual Book of ASTM Standards; Water and Environmental Technology, vol. 11.04; ASTM E729 – 96 (2007) American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA
- (10) Baird, D.J., *et al.* (1989). The long term maintenance of *Daphnia magna* Straus for use in ecotoxicological tests; problems and prospects. In: Proceedings of the 1st European Conference on Ecotoxicology. Copenhagen 1988. (H. Løkke, H. Tyle and F. Bro-Rasmussen. Eds.) pp 144-148.
- (11) Parkhurst, B.R., J.L. Forte. And G.P. and Wright (1981) Reproducibility of a life-cycle toxicity test with *Daphnia magna*. *Bull. Environ. Contam. and Toxicol.*, 26: 1-8.
- (12) Cowgill, U.M. and Milazzo, D.P. (1990). The sensitivity of two cladocerans to water quality variables: salinity and hardness. *Arch. Hydrobiol.*, 120(2): 185-196.
- (13) OECD (2000), *Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures*, Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 23. OECD, Paris.
- (14) Sims, I.R., S. Watson. and D. Holmes (1993) Toward a standard *Daphnia* juvenile production test. *Environ. Toxicol. and Chem.*, 12, 2053-2058.
- (15) Sims, I. (1993). Measuring the growth of phytoplankton: the relationship between total organic carbon with three commonly used parameters of algal growth. *Arch. Hydrobiol.*, 128, 459-466.

1. papildinājums

DEFINĪCIJAS

Šajā testēšanas metodē ir izmantoti šādi termini:

Nejauša mirstība: nejauša notikuma (t. i., zināms iemesls) izraisīta mirstība, kas nav saistīta ar ķimikāliju.

Ķimikālija: viela vai maisījums.

EC_x: ūdenī izšķīdinātas testējamās ķimikālijas koncentrācija, kas noteiktā ekspozīcijas laikā *Daphnia magna* vairošanos samazina par x %.

Netīša mirstība: mirstība, kas nav saistīta ar ķimikāliju un kuras iemesls nav zināms.

Populācijas pieauguma raksturīgais ātrums: populācijas augšanas mērs, kurā ietilpst vairošanās iznākums un vecumam specifiskā mirstība (1) (2) (3). Nemainīgai populācijai tas ir vienāds ar nulli. Augošai populācijai tas ir pozitīvs, un populācijai, kas samazinās, tas ir negatīvs. Protams, pēdējā minētā nav noturīga un beidzot izzūd.

Noteikšanas robeža: mazākā koncentrācija, ko var atklāt, bet ne kvantitatīvi noteikt.

Kvantitatīvās noteikšanas robeža: mazākā koncentrācija, ko var kvantitatīvi izmērīt.

Zemākā novērojamās ietekmes koncentrācija (LOEC): mazākā pārbaudītā koncentrācija, ar kuru noteiktā iedarbības laikā ir novērota statistiski nozīmīga ķimikālijas ietekme uz vairošanos un vecāku mirstību (pie $p < 0,05$), salīdzinot ar kontroli. Tomēr visām testējamām koncentrācijām, kas pārsniedz LOEC, jābūt ar kaitīgu iedarbību, kura ir vienāda ar vai lielāka par to, kas novērojama pie LOEC. Ja ir neiespējami nodrošināt šos abus nosacījumus, jāsniedz izsmēlošs skaidrojums par to, kāpēc šāda LOEC (un tādējādi NOEC) izraudzīta.

Mirstība: dzīvnieku reģistrē kā mirušu, ja tas ir nekustīgs, t. i., ja tas nepeld vai ja nav novērojamas piedēkļu vai vēderiņa aizmugures daļas kustības 15 sekunžu laikā pēc testa tvertnes vieglas pakratīšanas. (Ja izmanto citu definīciju, tā jānorāda kopā ar atsauci uz to).

Nenovērojamās ietekmes koncentrācija (NOEC): testa koncentrācija, kas ir tieši zemāka par LOEC un ar kuru, salīdzinot ar kontroles mēģinājumu, noteiktā iedarbības laikā nav statistiski nozīmīgas ietekmes ($p < 0,05$).

Pēcnācējs: jaunās *Daphnia*, ko testa gaitā radījuši vecāki.

Vecāki: *Daphnia* mātītes, kuras ir, sākot testu, un kuru vairošanās iznākums ir pētījuma objekts.

Vairošanās iznākums: dzīvu pēcnācēju skaits, ko radījis vecāks testēšanas perioda laikā.

Testējamā ķimikālija: jebkura viela vai maisījums, ko testē ar šo testēšanas metodi.

Literatūras saraksts

- (1) Wilson, E.O. and Bossert, W.H. (1971). A Primer of Population Biology. Sinauer Associates Inc. Publishers.
- (2) Poole, R.W. (1974). An Introduction to quantitative Ecology. Mc Graw Hill Series in Population Biology, New York, p 532.
- (3) Meyer, J. S., Ingersoll, C. G., McDonald, L.L. and Boyce, M.S. (1986). Estimating uncertainty in population growth rates: Jackknife vs bootstrap techniques. Ecology, 67, 1156-1166.

2. papildinājums

PILNĪBĀ NOTEIKTAS ELENĐT M7 UN M4 BAROTNES SAGATAVOŠANA

Aklimatizēšana *Elendt* M7 un M4 barotnē

Dažām laboratorijām ir bijušas grūtības, *Daphnia* tieši pārnēsot M4 (1) un M7 barotnē. Tomēr zināmā mērā sekmīga var būt pakāpeniska aklimatizācija, t. i., pārnēsot no dabīgās vides vispirms 30 %, pēc tam 60 % un visbeidzot 100 % *Elendt* barotnē. Aklimatizācija var ilgt līdz pat vienam mēnesim.

Sagatavošana

Mikroelementi

Vispirms piemērotas tīrības ūdenī, t. i., dejonizētā, destilētā vai ar apgriezto osmozi iegūtā ūdenī pagatavo atsevišķu mikroelementu atsevišķus izejšķidumus (I). No šiem dažādajiem izejšķidumiem (I) pagatavo vienu izejšķidumu (II), kas satur visus mikroelementus (apvienoto šķidumu), t. i.:

Izejšķidums(i) I (atsevišķa viela)	Ūdenim pievienotais daudzums	Koncentrācija (attiecībā pret M4 barotni)	Lai pagatavotu apvienoto izejšķidumu II, ūdenim pievieno šādu daudzumu izejšķiduma I	
			ml/l	
	mg/l		M 4	M 7
H ₃ BO ₃	57 190	20 000 reižu	1,0	0,25
MnCl ₂ · 4 H ₂ O	7 210	20 000 reižu	1,0	0,25
LiCl	6 120	20 000 reižu	1,0	0,25
RbCl	1 420	20 000 reižu	1,0	0,25
SrCl ₂ · 6 H ₂ O	3 040	20 000 reižu	1,0	0,25
NaBr	320	20 000 reižu	1,0	0,25
Mo Na ₂ O ₄ · 2 H ₂ O	1 260	20 000 reižu	1,0	0,25
CuCl ₂ · 2 H ₂ O	335	20 000 reižu	1,0	0,25
ZnCl ₂	260	20 000 reižu	1,0	1,0
CoCl ₂ · 6 H ₂ O	200	20 000 reižu	1,0	1,0
KI	65	20 000 reižu	1,0	1,0
Na ₂ SeO ₃	43,8	20 000 reižu	1,0	1,0
NH ₄ VO ₃	11,5	20 000 reižu	1,0	1,0
Na ₂ EDTA · 2 H ₂ O	5 000	2 000 reižu	-	-
FeSO ₄ · 7 H ₂ O	1 991	2 000 reižu	-	-
Na ₂ EDTA un FeSO ₄ šķidumus pagatavo atsevišķi, apvieno un tūlīt ievieto autoklāvā. Tā iegūst:				
Fe-EDTA šķidumu		1 000 reižu	20,0	5,0

M4 un M7 barotne

M4 un M7 barotni sagatavo, izmantojot izejšķīdumu II, barības makroelementus un vitamīnus, šādi:

	Ūdenim pievienotais daudzums	Koncentrācija (attiecībā pret M4 barotni)	Barotnes sagatavošanai pievienotā izejšķīduma daudzums	
	mg/l		ml/l	
			M 4	M 7
Izejšķīdums II (apvienoti mikroelementi)		20 reižu	50	50
Barības makroelementu izejšķīdumi (atsevišķa viela)				
$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	293 800	1 000 reižu	1,0	1,0
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	246 600	2 000 reižu	0,5	0,5
KCl	58 000	10 000 reižu	0,1	0,1
NaHCO_3	64 800	1 000 reižu	1,0	1,0
$\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9 \text{H}_2\text{O}$	50 000	5 000 reižu	0,2	0,2
NaNO_3	2 740	10 000 reižu	0,1	0,1
KH_2PO_4	1 430	10 000 reižu	0,1	0,1
K_2HPO_4	1 840	10 000 reižu	0,1	0,1
Vitamīnu maisījuma izejšķīdums	-	10 000 reižu	0,1	0,1

Vitamīnu maisījuma izejšķīdumu sagatavo, pievienojot trīs vitamīnus 1 litrā ūdens, šādi:

	mg/l			
Tiamīna hidrohlorīds	750	10 000 reižu		
Ciānkobalamīns (B_{12})	10	10 000 reižu		
Biotīns	7,5	10 000 reižu		

Vitamīnu maisījuma izejšķīdumu glabā sasaldētu mazās alikvotās. Vitamīnus pievieno barotnei neilgi pirms lietošanas.

NB! Lai izvairītos no sāļu izgulsnēšanās, gatavojot pilnu barotni, izejšķīdumu alikvotus pievieno apmēram 500–800 mililitriem dejonizēta ūdens un pēc tam uzpilda līdz 1 litram.

NNB! Pirmā publikācija par M4 barotni atrodama: Elendt, B.P. (1990). Selenium deficiency in crustacea; an ultrastructural approach to antennal damage in *Daphnia magna* Straus. *Protoplasma*, 154, 25-33.

3. papildinājums

KOPĒJĀ ORGANISKĀ OGLEKĻA (TOC) ANALĪZE UN NOMOGRAMMAS IZVEIDE TOC SATURAM ALĢES SATUROŠĀ BARĪBĀ

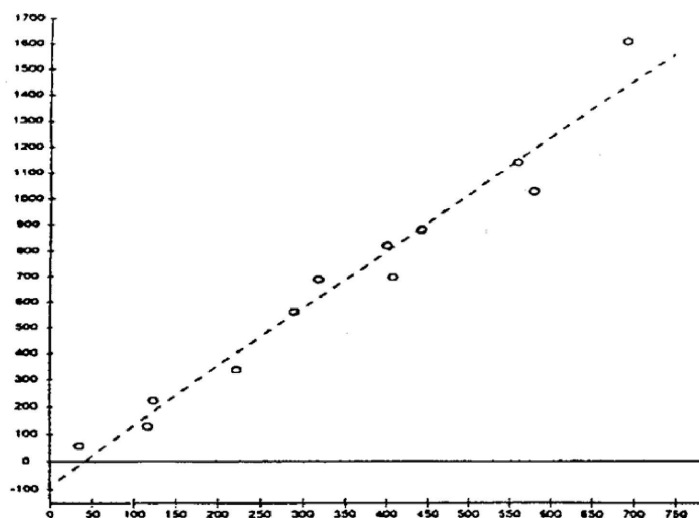
Ir atzīts, ka oglekļa saturu alģes saturošā barībā parasti nemēra tieši, bet no korelācijām (t. i., nomogrammām) ar aizstājējiem mērījumiem, piemēram, alģu šūnu skaitu vai gaismas absorbciju).

TOC jāmēra ar augstas temperatūras oksidācijas metodi, nevis ar UV vai persulfāta metodi. (Palīdzībai sk.: *The Instrumental Determination of Total Organic Carbon, Total Oxygen Demand and related Determinands* 1979, HMSO 1980; 49 High Holborn, London WC1V 6HB.)

Nomogrammas izveidošanai alģes atdala no augšanas vides centrifugējot, pēc tam vēlreiz suspendējot destilētā ūdenī. Katra parauga aizvietošanu parametru un TOC koncentrāciju mēra trijos paralēlos mērījumos. Destilēta ūdens tukšos mēģinājumus analizē un TOC koncentrāciju atņem no TOC koncentrācijas alģu paraugos.

Vajadzīgajā oglekļa koncentrāciju diapazonā nomogrammām jābūt lineārām. Piemēri ir parādīti turpmāk.

NB! Tos nedrīkst izmantot konversijām; ir vajadzīgs, lai laboratorijas sagatavotu pašas savas nomogrammas.



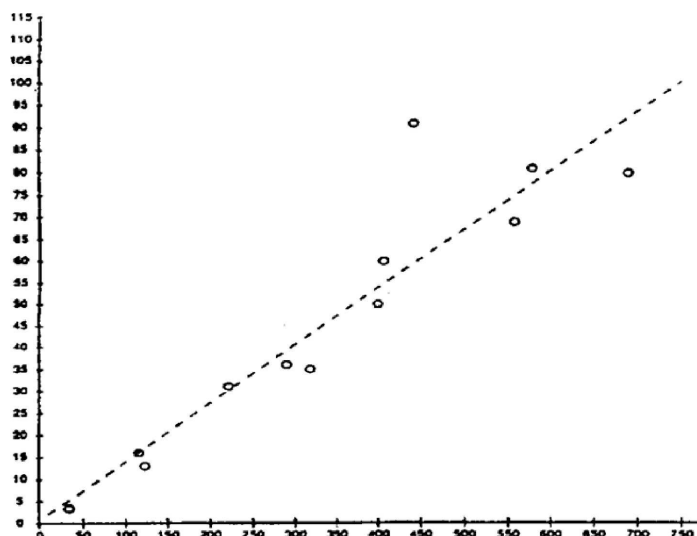
Chlorella vulgaris var. *viridis* (CCAP 211/12).

Mg/l sausā svara regresija pret mg C/l. Dati no daļēji pārtrauktu partijas kultivēto šūnu koncentrētām suspensijām, atkārtoti suspendētām destilētā ūdenī.

X ass: mg C/l koncentrētas alģes saturošas barības

Y ass: mg/l sausā svara koncentrētas alģes saturošas barības

Korekcijas koeficients -0,980



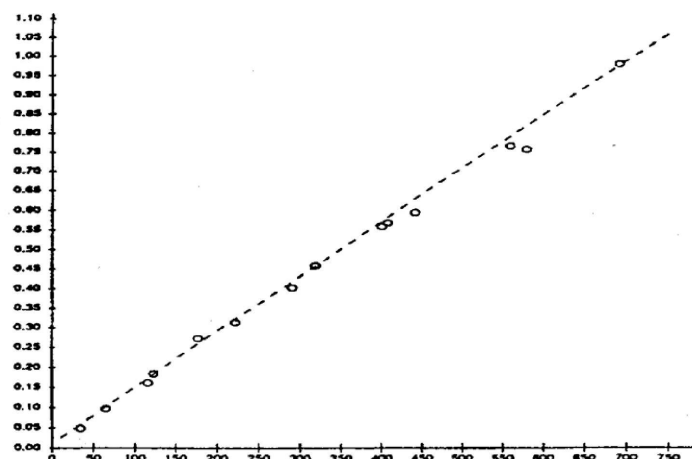
Chlorella vulgaris var. *viridis* (CCAP 211/12).

Šūnu skaita regresija pret mg C/l. Dati no daļēji pārtrauktu partijas kultivēto šūnu koncentrētām suspensijām, atkārtoti suspendētām destilētā ūdenī.

X ass: mg C/l koncentrētas aļģes saturošas barības.

Y ass: šūnu skaits/l koncentrētas aļģes saturošas barības.

Korekcijas koeficients -0,926.



Chlorella vulgaris var. *viridis* (CCAP 211/12).

Absorbcijas regresija uz mg C/l (1 cm ceļa garums). Dati no daļēji pārtrauktu partijas kultivēto šūnu koncentrētām suspensijām, atkārtoti suspendētām destilētā ūdenī.

X ass: mg C/l koncentrētas aļģes saturošas barības.

Y ass: absorbcija pie 440 nm ar 1/10 koncentrētas aļģes saturošas barības atšķaidījumu.

Korekcijas koeficients -0,998.

4. papildinājums

DATU LAPAS PARAUGS VIDES ATJAUNOŠANAS, FIZIKĀLĶĪMISKĀS MONITORĒŠANAS DATU, BAROŠANAS, DAPHNIA VAIROŠANĀS UN VECĀKU MIRSTĪBAS REĢISTRĒŠANAI

Eksperimenta Nr.:	Sākuma datums:					Klons:				Barotne:				Barības veids:				Testējamā ķīmikālija:				Nominālā koncentrācija:		
Diena	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21		
Barotnes atjaunošana (atzīmēt)																								
pH (*)																							jauna	
																							veca	
O ₂ (mg/l) (*)																							jauna	
																							veca	
Temp (°C) (*)																							jauna	
																							vecs	
Dota barība (atzīmēt)																								
Dzīvo pēcnācēju skaits (**)																								Kopā
Trauks 1																								
2																								
3																								
4																								
5																								
6																								
7																								
8																								
9																								
10																								
																							Kopā	
Kopīgā vecāku mirstība (***)																								

(*) Norādīt, kurš trauks tika izmantots eksperimentam
 (**) Apturētos nārstus attiecīgajā lodziņā norādīt kā "AB"
 (***) Jebkādu vecāku mirstību attiecīgajā lodziņā norādīt kā "M".

6. papildinājums

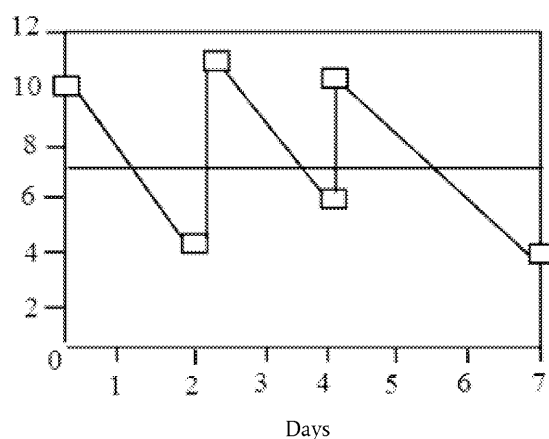
LAIKĀ SVĒRTĀ VIDĒJĀ LIELUMA APRĒĶINS

Laikā svērtais vidējais lielums

Ja laikā starp barotnes atjaunošanas reizēm testējamās ķīmikālijas koncentrācija var samazināties, jāapsver, kādu koncentrāciju izraudzīties kā tādu, kas pārstāv koncentrāciju diapazonu, kuram eksponē *Daphnia* vecākus. Izvēlei jāpamatojas uz bioloģiskiem apsvērumiem, kā arī statistikas apsvērumiem. Piemēram, ja uzskata, ka vairošanos visvairāk ietekmē *Daphnia* saskare ar maksimālo koncentrāciju, jālieto maksimālā koncentrācija. Tomēr, ja uzskata, ka svarīgāka ir toksiskās ķīmikālijas akumulētā vai hroniskā ietekme, atbilstošāka ir vidējā koncentrācija. Tādā gadījumā izmantošanai piemērots vidējais lielums ir laikā svērtā vidējā koncentrācija, jo tā ņem vērā koncentrācijas pārmaiņas laikā.

1. attēls

Laikā svērtā vidējā lieluma piemērs



1. attēlā norādīts (vienkāršota) testa piemērs, testam turpinoties septiņas dienas ar barotnes atjaunošanu 0., 2. un 4. dienā.

— Tievā zigzaglīnija attēlo koncentrāciju katrā laikpunktā. Tiek uzskatīts, ka koncentrācijas samazinājums seko eksponenciālam sagrūšanas procesam.

— 6 atliktie punkti apzīmē katra atjaunošanās perioda sākumā un beigās novērotās koncentrācijas.

— Resnā nepārtrauktā līnija rāda laikā svērtā vidējā lieluma novietojumu.

Laikā svērtais vidējais lielums ir aprēķināts tā, lai laukums zem laikā svērtā vidējā lieluma būtu vienāds ar laukumu zem koncentrācijas līknes. Iepriekš attēlotā piemēra aprēķins ir parādīts 1. tabulā.

1. tabula

Laikā svērtā vidējā lieluma aprēķins

Atjaunošanas Nr.	Dienas	Konc 0	Konc 1	Ln(Konc 0)	Ln(Konc 1)	Laukums
1	2	10,000	4,493	2,303	1,503	13,767
2	2	11,000	6,037	2,398	1,798	16,544

Atjaunošanas Nr.	Dienas	Konc 0	Konc 1	Ln(Konc 0)	Ln(Konc 1)	Laukums
3	3	10,000	4,066	2,303	1,403	19,781
Dienas kopā:		7			Kopējais laukums:	50,092
					TW vidējais lielums:	7,156

“Dienas” ir dienu skaits atjaunošanas periodā.

“Konc0” ir katra atjaunošanas perioda sākumā izmērītā koncentrācija.

“Konc1” ir katra atjaunošanas perioda beigās izmērītā koncentrācija.

“ln(Konc0)” ir Konc0 naturāllogaritms.

“ln(Konc1)” ir Konc1 naturāllogaritms.

“Laukums” ir laukums zem katra atjaunošanas perioda eksponenciālās līknes. To aprēķina šādi:

$$Laukums = \frac{Konc\ 0 - Konc\ 1}{Ln(Konc\ 0) - Ln(Konc\ 1)} \times dienas$$

Laikā svērto vidējo lielumu (“TW vidējais lielums”) iegūst, “Kopējo laukumu” dalot ar “Dienām kopā”.

Protams, *Daphnia* vairošanās testa tabula ir jāpagarina, lai tā ietvertu 21 dienu.

Ir skaidrs — ja novērojumus veic tikai katra atjaunošanas perioda sākumā un beigās, nav iespējams apstiprināt, ka koncentrācijas samazināšanās process patiešām ir eksponenciāls. Citādi liknei būtu citāds *laukuma* aprēķins. Tomēr eksponenciāls sagrūšanas process ir ļoti ticams, un eksponenciāla līkne, iespējams, ir labākā līkne izmantošanai, ja nav citas informācijas.

Tomēr ir jābūt piesardzīgam, ja ķīmiskā analīze atjaunošanas perioda beigās neuzrāda nekādu ķīmikāliju. Ja vien nav iespējams novērtēt, cik ātri ķīmikālija pazūd no šķīduma, nav iespējams iegūt īstenībai atbilstošu laukumu zem līknes un tātad ir neiespējami iegūt pamatotu laikā svērto vidējo lielumu.

7. papildinājums

NORĀDĪJUMI JAUNDZIMUŠO DZIMUMA IDENTIFICĒŠANAI

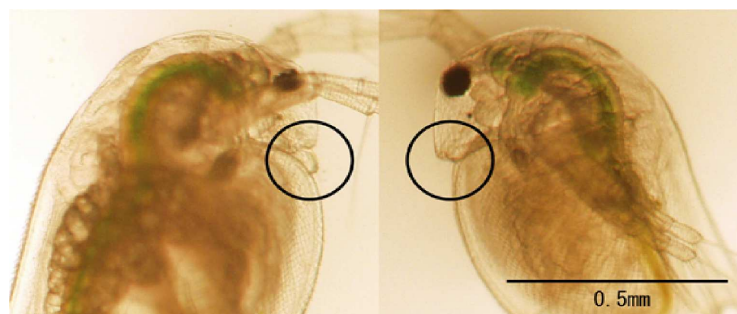
Vīrišķā dzimuma pēcnācēji var rasties, ja mainīgi ir vides apstākļi, piemēram, pie saīsināta fotoperioda, samazinātas temperatūras, samazinātas pārtikas koncentrācijas un palielināta populācijas blīvuma (Hobaek and Larson, 1990; Kleiven et al., 1992). Vīrišķā dzimuma radīšana ir arī zināma atbildreakcija uz dažiem kukaiņu augšanas regulatoriem (Oda et al., 2005). Apstākļos, kuros ķīmiskie stresori samazina partenogēnēzes mātišu reproduktīvo pēcnācēju skaitu, paredzams lielāks vīrišķo pēcnācēju skaits (ESAO, 2008). Pamatojoties uz pieejamo informāciju, nav iespējams prognozēt, kurš dzimumu attiecības vai vairošanās galapunkts būs jutīgāks; tomēr ir indikatori (1. daļā atsaucē "validācijas pārskats"), ka šis vīrišķā dzimuma skaita pieaugums var būt mazāk jutīgs nekā pēcnācēju samazinājums. Tā kā šīs testēšanas metodes galvenais mērķis ir novērtēt radīto pēcnācēju skaitu, vīrišķā dzimuma pēcnācēju sastopamība ir fakultatīvs novērojums. Ja pētījumā tiek izvērtēts šis fakultatīvais beigupunkts, jāizmanto testa derīguma papildkritērijs, proti, vīrišķā dzimuma īpatņu īpatsvars kontrolēs nedrīkst pārsniegt 5 %.

Vispraktiskākais un vieglākais veids, kā izšķirt *Daphnia* dzimumus, ir izmantot to fenotipiskās īpašības, jo vīrišķā un sievišķā dzimuma īpatņi ir ģenētiski identiski un dzimums ir atkarīgs no vides apstākļiem. Vīrišķā un sievišķā dzimuma īpatņi atšķiras ar pirmā taustekli, kas vīrišķā dzimuma īpatņiem ir garāks nekā sievišķajam dzimumam, un morfoloģiski (1. attēls). Taustekļa garuma atšķirība ir atpazīstama uzreiz pēc piedzimšanas, kaut arī attīstoties izveidojas citas sekundāras dzimum īpatnības (piemēram, sk. 2. attēlu, Olmstead and LeBlanc, 2000).

Lai novērotu morfoloģisko dzimumu, jaundzimušie īpatņi, ko katrs testa dzīvnieks radījis, ar pipeti jāpārnes un jāievieto Petri platē ar testa barotni. Barotnē nodrošina minimālus apstākļus, lai ierobežotu dzīvnieku kustības. Pirmā taustekļa novērošanu var veikt stereomikroskopā ($\times 10-60$).

1. attēls.

24 stundas vecs vīrišķā (pa kreisi) un sievišķā (pa labi) dzimuma *D. magna*. Vīrišķo dzimumu var atšķirt no sievišķā pēc garuma un taustekļu morfoloģijas, kā attēlā norādīts ar apliem (Tatarazako et al., 2004. gads).



ATSAUCES

Hobaek A and Larson P. 1990. Sex determination in *Daphnia magna*. Ecology 71: 2255-2268.

Kleiven O.T., Larsson P., Hobaek A. 1992. Sexual reproduction in *Daphnia magna* requires three stimuli. Oikos 65, 197-206.

Oda S., Tatarazako N., Watanabe H., Morita M., and Iguchi T. 2005. Production of male neonates in *Daphnia magna* (Cladocera, Crustacea) exposed to juvenile hormones and their analogs. Chemosphere 61:1168-1174.

OECD, 2008. Validation report for an enhancement of OECD TG 211 *Daphnia magna* reproduction test. OECD Series on Testing and Assessment, Number 88. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.

Olmstead, A.W., LeBlanc, G.A., 2000. Effects of endocrine-active chemicals on the development characteristics of *Daphnia magna*. Environmental Toxicology and Chemistry 19:2107-2113.

Tatarazako, N., Oda, S., Abe, R., Morita M. and Iguchi T., 2004. Development of a screening method for endocrine disruptors in crustaceans using *Daphnia magna* (Cladocera, Crustacea). Environmental Science 17, 439-449."

(18) pielikuma C daļā C.29. nodaļas 66. punktu aizstāj ar šādu:

"66. Testu uzskata par derīgu, ja:

- a) vidējais noārdīšanās īpatsvars traukos F_C , kas satur standartķīmikāliju, 14. inkubācijas dienā ir $> 60 \%$; un
- b) vidējais TIC daudzums tukšajās kontrolēs F_B testēšanas beigās ir $> 3 \text{ mg C/l}$.

Ja šie ierobežojumi netiek izpildīti, tests ir jāatkārto ar sējmateriālu no cita avota un/vai ir jāpārskata procedūras. Piemēram, ja problēmu rada liela daudzuma tukša IC veidošanās, jāievēro 27.–32. punktā aprakstītā procedūra."

19) C daļai pievieno šādas nodaļas:

"C.47 Zivju agrīno attīstības stadiju toksiskuma tests

IEVADS

1. Šī testēšanas metode ir līdzvērtīga ESAO testēšanas norādījumiem 210 (2013. gads). Testi, ko veic zivju agrīnās attīstības stadijās, ir paredzēti, lai noteiktu ķīmikāliju letālu un subletālu ietekmi uz testētajām stadijām un sugām. Tie sniedz vērtīgu informāciju, kā aplēst ķīmikāliju hronisku letālu un subletālu ietekmi uz citām zivju sugām.
2. Testēšanas norādījumu 210 pamatā ir Apvienotās Karalistes priekšlikums, kas tika apspriests ESAO ekspertu sanāksmē Medmenhamā (Apvienotā Karaliste) 1988. gada novembrī un atjaunināts 2013. gadā, lai atspoguļotu pieredzi, kas gūta, izmantojot testēšanu, un ieteikumus no ESAO 2010. gada septembra semināra par zivju toksiskuma testēšanu (1).

TESTĒŠANAS PRINCIPS

3. Zivis agrīnās attīstības stadijās tiek eksponētas dažādām ūdenī izšķīdinātās testējamās ķīmikālijas koncentrācijām. Priekšroka dodama caurplūdes apstākļiem, tomēr, ja tas nav iespējams, pieļaujami arī pusstatiski apstākļi. Sīkākai informācijai jāizmanto ESAO norāžu dokuments par grūti testējamu vielu un maisījumu ūdenstoksiskuma testēšanu (2). Testu sāk, apauglotus ikrus novietojot testa kamerās, un atkarībā no sugas turpina tik ilgi, cik nepieciešams, lai kontroles zivis sasniegtu zivju mazuļu attīstības stadiju. Letālo un subletālo ietekmi novērtē un salīdzina ar kontroles vērtībām, lai noteiktu zemāko novērojamās ietekmes koncentrāciju (LOEC) nolūkā noteikt i) nenovērojamās ietekmes koncentrāciju (NOEC) un/vai ii) EC_x (piemēram, EC_{10} , EC_{20}), izmantojot regresijas modeli, ar ko aplēš koncentrāciju, kas izraisītu $x \%$ pārmaiņas mērītajā ietekmē. Ziņošana par attiecīgajām ietekmes koncentrācijām un parametriem var būt atkarīga no tiesiskā regulējuma. EC_x jābūt testējamo koncentrāciju diapazonā, lai EC_x tiktu iegūts no interpolācijas, nevis no ekstrapolācijas (definīcijas sk. 1. papildinājumā).

INFORMĀCIJA PAR TESTĒJAMO ĶĪMIKĀLIJU

4. Testējamā ķīmikālija ir tā, kas tiek testēta. Jāzina testējamās ķīmikālijas šķīdība ūdenī (sk. šī pielikuma A.6 nodaļu) un tvaika spiediens (sk. šī pielikuma A.4 nodaļu), un jābūt pieejamai tādai ticamai analītiskai metodei ķīmikālijas daudzuma kvantitatīvai noteikšanai testa šķīdumos, kuras precizitāte un kvantitatīvās noteikšanas robeža ir zināma un norādīta ziņojumā. Lai gan testu veikt nav nepieciešams, akūtā toksiskuma testa rezultāti (sk. šī pielikuma C.1 vai C.49. nodaļu), vēlams tādi, kas veikti ar šim testam izvēlētajām sugām, var sniegt derīgu informāciju.

5. Ja ar šo testēšanas metodi testē maisījumu, pēc iespējas jāraksturo tā sastāvs, piemēram, norādot tā sastāvdaļu ķīmisko identitāti, to kvantitatīvo daudzumu un būtiskās īpašības (kā iepriekš minētās). Pirms testa metodi izmantot maisījuma obligātajai testēšanai, jāapsver, vai tā sniegs paredzētajam regulatīvajam nolūkam pieņemamus rezultātus.
6. Noderīga informācija ir struktūrformula, vielas tīrības pakāpe, šķīdība ūdenī, stabilitāte ūdens un gaismas iedarbībā, pK_a , P_{ow} un tūlītējas bionoārdāmības testa rezultāti (piemēram, šī pielikuma C.4. vai C.29. nodaļa).

TESTA PAMATOTĪBA

7. Lai tests būtu pamatots, piemēro šādus nosacījumus:
 - izšķīdušā skābekļa koncentrācijai visā testa laikā jābūt > 60 % no gaisa piesātinājuma vērtības;
 - ūdens temperatūra starp testa kamerām vai starp secīgām dienām testa laikā nevienā brīdī nedrīkst atšķirties vairāk par $\pm 1,5^{\circ}\text{C}$, un tai jābūt temperatūru intervālā, kas norādīts attiecīgajai testa sugai (2. papildinājums);
 - testējamā koncentrācija obligāti jāizmēra analītiski;
 - apaugļoto ikru kopējai izdzīvotībai un izšķīlšanās rezultātiem kontrolgrupā un attiecīgā gadījumā šķīdinātāju kontrolgrupā ir jābūt lielākai par 2. papildinājumā norādītajiem robežlielumiem vai vienādi ar tiem.
8. Novērojot minimālas novirzes no pamatotības kritērijiem, sekas jāaplūko kopsakarā ar testa datu uzticamību, un šie apsvērumi jāatspoguļo ziņojumā. Ziņojumā jāatspoguļo ietekme uz izdzīvotību, izšķīlšanos vai augšanu šķīdinātāja kontrolgrupā, tās salīdzinot ar negatīvajiem kontroles datiem, un tā jāapspriež kopsakarā ar testa datu uzticamību.

METODES APRAKSTS

Testa kameras

9. Var izmantot jebkādu stikla, nerūsējoša tērauda vai cita ķīmiski inerta materiāla traukus. Tā kā ir zināms, ka silikonam piemīt augsta lipofilisko vielu absorbēšanas spēja, iespējami jāvairās izmantot silikona caurulītes caurplūdes pētījumos un silikona blīvījumus, kas ir saskarē ar ūdeni; jāizmanto, piemēram, monobloku stikla akvāriji. Traukiem jābūt pietiekami lieliem, lai tajos varētu notikt pienācīga kontrolēta augšana un tiktu uzturēta izšķīdušā skābekļa koncentrācija (piemēram, mazām zivju sugām pietiktu ar 7 l tvertni), kā arī atbilstība 19. punktā norādītajiem noslogojuma kritērijiem. Testa kameras testa izpildes vietā vēlams izvietot randomizēti. Tāds randomizēti izvietotu bloku plāns, kur katrā blokā ir pārstāvēta katra veida apstrāde, ir vēlamāks par pilnīgi randomizētu izvietojuma plānu. Testa kameras jāaizsargā no nevēlamiem traucējumiem. Testa sistēmai ir vēlams sagatavošanās posms, kurā pirms testa organismu ielaišanas tiek pierādīts, ka testējamās ķīmikālijas koncentrācijas ir stabilas ekspozīcijas koncentrācijas.

Sugu izvēle

10. Ieteicamās zivju sugas ir norādītas 1. tabulā. Tas neizslēdz citu sugu izmantošanu, bet tādā gadījumā iespējams, ka testa procedūra jāpielāgo, lai būtu nodrošināti piemēroti testa apstākļi. Tādā gadījumā sugas izvēles pamatojums un eksperimenta metode jāatspoguļo ziņojumā.

Vaislas zivju turēšana

11. Dati par vaislas zivju turēšanu piemērotos apstākļos ir atrodami 3. papildinājumā un minētajās atsaucēs (3),(4), (5).

Rīkošanās ar apaugļotiem ikrus, embrijus un kāpurus

12. No sākuma apaugļotus ikrus, embrijus un kāpurus galvenajā traukā var eksponēt mazākos stikla vai nerūsējoša tērauda traukos, kas aprīkoti ar sieta sānu vai galu, darot iespējamu, ka caur tiem plūst testa šķīdums. Neturbulentu plūsmu caur šiem mazajiem traukiem var radīt, tos piekarot turētājam, kas tos kustina augšup un lejup tā, lai organismi visu laiku būtu iegremdēti. Lašu dzimtas zivju apaugļotus ikrus var balstīt uz paliktņiem vai sietiem ar pietiekami lielām atverēm, lai kāpuri pēc izšķilšanās varētu tām izkrist cauri.
13. Ja galvenajā testa traukā ikrus turēšanai izmanto ikrus konteinerus, paliktņus vai sietus, pēc kāpuru izšķilšanās tie atbilstoši 3. papildinājuma norādēm jāizņem un jāatstāj tikai sieti, kas novērš kāpuru izklūšanu no traukiem. Ja kāpurus pārvietot nav vajadzības, tos neeksponē gaisam un kāpuru izlaišanai no ikrus konteineriem tiklu neizmanto. Šādas pārvietošanas laiks ir atkarīgs no sugas un jādokumentē ziņojumā. Tomēr pārvietošana nav vienmēr nepieciešama.

Ūdens

14. Par testa ūdeni var izmantot jebkādu ūdeni, kurā testa sugas uzrāda pietiekamu ilgtermiņa izdzīvotību un augšanu (sk. 4. papildinājumu). Tā kvalitātei testa laikā jābūt nemainīgai. Lai nodrošinātu, ka atšķaidīšanas ūdens pārāk neietekmē testa rezultātu (piemēram, veidojot kompleksveida savienojumus ar testējamo ķīmikāliju) vai negatīvi neietekmē vaislas zivju rādītājus, noteiktos starplaikos jāņem paraugi analīzei. Ja zināms, ka ūdens kvalitāte ir relatīvi nemainīga, tad, piemēram, reizi sešos mēnešos būtu jāveic smago metālu (piemēram, Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni), biežāk sastopamo anjonu un katjonu (piemēram, Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , K^+ , Cl^- , SO_4^{2-}), amonjaka, kopējo hlororganisko pesticīdu, kopējā organiskā oglekļa un suspendēto daļiņu mērījumi. Ja zināms, ka ūdens kvalitāte ir mainīga, mērījumi jāveic biežāk; biežums atkarīgs no kvalitātes mainīguma. Daži pieņemama atšķaidīšanas ūdens ķīmiskie parametri ir norādīti sarakstā 4. papildinājumā.

Testa šķīdumi

15. Lai testa kamerām piegādātu koncentrāciju sēriju, caurplūdes testos ir vajadzīga sistēma, kas nepārtraukti piegādā un atšķaida testējamās ķīmikālijas vielas izejšķīdumu (piemēram, dozējošais sūkņi, proporcionālas atšķaidīšanas ierīce, piesātinātāja sistēma). Izejšķīdumu un atšķaidīšanas ūdens caurplūdums testa laikā jāpārbauda noteiktos starplaikos, un šie testa laikā nedrīkst mainīties vairāk kā par 10 %. Par piemērotu atzīst caurplūdumu, kas līdzvērtīgs vismaz pieciem testa kameras tilpumiem 24 stundās (3). Tomēr, ja ievēro 19. punktā specificēto noslogojumu, lai barība netiktu ātri aizskalota, ir iespējams izmantot zemāku caurplūdumu, piem., 2–3 testa kameras tilpumi.
16. Izraudzītās koncentrācijas testēšanas šķīdumus parasti gatavo, atšķaidot izejšķīdumu. Izejšķīdumu vēlams pagatavot, testējamo ķīmikāliju atšķaidīšanas ūdenī gluži vienkārši iemaisot vai tajā iejaucot ar mehāniskiem līdzekļiem (piemēram, kratīšana un/vai apstrāde ar ultraskaņu). Piemērotas koncentrācijas izejšķīduma iegūšanai var izmantot piesātināšanas kolonnas (šķīdības kolonnas) vai pasīvas dozēšanas metodes (6). Šķīdinātāju par nesējvielu izmantot nav ieteicams. Tomēr, ja jāizmanto šķīdinātājs, paralēli jāveic šķīdinātāja kontrole, izmantojot tādu pašu šķīdinātāja koncentrāciju kā ķīmiskajā apstrādē, t. i., šķīdinātāja līmenim visās koncentrācijās, kā arī šķīdinātāja kontrolgrupā vēlams būt vienādam. Dažām atšķaidīšanas sistēmām tas var būt tehniski grūti izdarāms; tādā gadījumā šķīdinātāja koncentrācijai šķīdinātāja kontrolgrupā jābūt vienādai ar augstāko šķīdinātāja koncentrāciju apstrādes grupā. Grūti testējamām vielām jāizmanto ESAO norāžu dokuments Nr. 23 par grūti testējamu vielu un maisījumu ūdenstoksiskuma testēšanu (2). Ja izmanto šķīdinātāju, to izraugās atkarībā no vielas ķīmiskajām īpašībām. ESAO norāžu dokumentā Nr. 23 ir ieteikta maksimālā koncentrācija 100 µl/l. Lai izvairītos no šķīdinātāja iespējamās ietekmes uz mērītajiem beigupunktiem (7), šķīdinātāja koncentrāciju ieteicams saglabāt iespējami zemu.
17. Pusstatiskajā testā var izmantot divas atšķirīgas atjaunošanas procedūras. Vai nu jaunu testa šķīdumu sagatavo tīros traukos un izdzīvojušos ikrus un kāpurus uzmanīgi pārvieto uz jaunajiem traukiem, vai arī testa organismus atstāj testa traukos, nomainot daļu (vismaz divas trešdaļas) testa šķīduma / kontroles tilpuma.

PROCEDŪRA

Ekspozīcijas apstākļi*Ilgums*

18. Testu sāk uzreiz pēc ikrų apaugļošanas, un vēlams tos testa šķīdumā iemērkāt pirms blastodiska dalīšanās sākuma vai iespējami tuvu šai stadijai. Testa ilgums būs atkarīgs no izmantotās sugas. Daži ieteicamie ilgumi norādīti 2. papildinājumā.

Noslogojums

19. Ar apaugloto ikrų skaitu testa sākumā jāprietiek, lai nodrošinātu atbilstību statistiskā testa nosacījumiem. Tos vienmērīgi izklaidē pa apstrādes grupām, un uz koncentrāciju izmanto vismaz 80 ikrus, ko sadala vienādi pa vismaz četrām replikātu testa kamerām. Noslogojumam (biomasai uz testa šķīduma tilpumu) jābūt pietiekami mazam, lai ikrų un kāpuru stadijā, neizmantojot aerāciju, izšķīdušā skābekļa koncentrāciju varētu uzturēt vismaz 60 % apmērā no gaisa piesātinājuma vērtības. Caurplūdes testiem ir ieteikts noslogojums, kas nepārsniedz 0,5 g uz l mitrā svara 24 stundās un nevienā laikā nepārsniedz 5 g uz l šķīduma (3).

Gaisma un temperatūra

20. Fotoperiods un ūdens temperatūra jāpielāgo testa sugai (sk. 2. papildinājumu).

Barošana

21. Barībai un barošanai ir būtiska nozīme, un ir svarīgi, lai katrā attīstības stadijā no piemērota brīža tiktu piegādāta pareiza barība tādā daudzumā, ar ko pietiek normālai augšanai. Barošanai visos replikātos jābūt aptuveni vienādai, ja vien to nekorrigē atbilstoši mirstībai. Barības pārpalikumi un fēces jāizņem, lai neuzkrātos atkritumi. Detalizēti barošanas režīmi izklāstīti 3. papildinājumā, bet atbilstoši pieredzei barības un barošanas režīmi tiek nepārtraukti atjaunināti, lai paaugstinātu izdzīvotību un optimizētu augšanu. Dzīva barība bagātina vidi, tādēļ to izmanto papildus sausajai vai saldētajai barībai vai tās vietā, ja tas atbilst sugai un attīstības stadijai.

Testēšanas koncentrācijas

22. Parasti nepieciešamas piecas testējamās ķīmikālijas koncentrācijas ar vismaz četriem replikātiem katrai koncentrācijai, ko citu no citas šķir konstants koeficients, kurš nepārsniedz 2,2. Izraugoties testējamo koncentrāciju diapazonu, ja pieejama, jāņem vērā informācija par akūto testēšanu, vēlams ar tās pašas sugas zivīm, un/vai par iedarbības diapazona noteikšanas testiem (1). Tomēr, izraugoties testējamās koncentrācijas diapazonu, jāņem vērā visi informācijas avoti, arī tādi avoti kā analogija un dati par akūto toksiskumu zivju embrijiem. Ja ir jānosaka tikai empīriskās NOEC, kā galīgais tests ir pieļaujams robežtests vai paplašinātais robežtests ar mazāk nekā piecām koncentrācijām. Ja testē mazāk nekā piecas koncentrācijas, tas jāpamato. Nav jātestē testējamās ķīmikālijas koncentrācijas, kas pārsniedz 96 stundu LC_{50} vai 10 mg/l, izvēloties no abiem mazāko lielumu.

Kontrole

23. Atšķaidīšanas ūdens kontrolei un nepieciešamības gadījumā šķīdinātāja, kas satur šķīdinātāju kā nesējvielu, kontrolei jābūt tikai papildus testējamās ķīmikālijas vielas koncentrāciju sērijai (sk. 16. punktu).

Analītisko noteikšanu un mērījumu biežums

24. Pirms ekspozīcijas perioda sākuma jānodrošina pareiza ķīmikālijas piegādes sistēmas darbība visos replikātos (piemēram, mērot testējamās koncentrācijas). Jānosaka nepieciešamās analītiskās metodes, tostarp attiecīga kvantitatīvās noteikšanas robeža (LOQ), un pietiekami jāzina vielas stabilitāte testa sistēmā. Lai raksturotu ekspozīciju, testa laikā testējamās ķīmikālijas koncentrācijas nosaka regulāros intervālos. Noteikšanu veic vismaz piecas reizes. Ja izmanto caurplūdes sistēmas, testējamās ķīmikālijas analītiskos mērījumus vienā replikātā no katras koncentrācijas veic vismaz reizi nedēļā, replikātus sistemātiski mainot. Papildu analītiskās noteikšanas bieži vien pavērs iespēju uzlabot testa rezultāta kvalitāti. Paraugi var būt jāfiltrē, lai likvidētu daļiņas (piemēram, izmantojot 0,45 µm poru izmēru), vai jācentrifugē, lai nodrošinātu, ka noteikšana ķīmikālijai tiek veikta īstā šķīdumā. Lai samazinātu testējamās ķīmikālijas adsorbciju, filtri pirms lietošanas ir jāpiesūcina. Ja izmērītās koncentrācijas nav 80–120 % no nominālās koncentrācijas, ir jānosaka ietekmes koncentrācijas un tās jāizsaka salīdzinājumā ar caurplūdes testos izmērīto aritmētisko vidējo koncentrāciju (sk. testa metodes C.20 6. papildinājumu par aritmētiskā vidējā aprēķināšanu (8)), kā arī jāizsaka salīdzinājumā ar pusstatistikajos testos izmērīto koncentrāciju ģeometriskajiem vidējiem (sk. ESAO norāžu dokumenta Nr. 23 par grūti testējamu vielu un maisījumu ūdenstoksiskuma testēšanu 5. nodaļu (2)).
25. Testa laikā vismaz reizi nedēļā visos testa traukos jāmēra izšķīdušais skābeklis, pH un temperatūra, un testa sākumā un beigās — ja tas pamatoti — sāļums un cietība. Vismaz vienā testa traukā vēlams pastāvīgi uzraudzīt temperatūru.

Novērojumi

26. **Embrionālās attīstības stadijas:** embrionālā attīstības stadija brīdī, kad sākas eksponēšana testējamajai ķīmikālijai, būtu jāverificē iespējami precīzi. To var izdarīt, izmantojot pienācīgi saglabātu un notīrītu ikru reprezentatīvu paraugu.
27. **Izšķīlšanās un izdzīvotība:** novērojumi par izšķīlšanos un izdzīvotību jāizdara vismaz reizi dienā, un skaits jāprotokolē. Ja agrīnā embriju attīstības stadijā (t. i., pirmajā vai otrajā testa dienā) uz ikriem novēro pelējumu, skartos ikrus saskaita un izņem. Nedzīvie embriji, kāpuri un zivju mazuļi jāizņem, tiklīdz tie pamanīti, jo tie var strauji sadalīties vai citas zivis tos var sašķaidīt. Nedzīvos īpatņus izņemot, ļoti jāraugās fiziski netraumēt blakus esošos ikrus/kāpurus. Nāves pazīmes atšķiras atkarībā no sugas un attīstības stadijas. Piemēram:

— apauglotiem ikriem: jo īpaši agrīnās stadijās — izteikts gaismas caurlaidības zudums un krāsas maiņa, ko rada olbaltumvielu koagulācija un/vai izgulsnēšanās, kā dēļ tie kļūst balti un necaurredzami;

— embrijiem, kāpuriem un zivju mazuļiem: nekustīgums un/vai elpošanas kustību neesība, un/vai sirdsdarbības neesība, un/vai nereaģēšana uz mehānisku kairinājumu.

28. **Anormāls izskats:** anormālas ķermeņa formas kāpuru vai zivju mazuļu skaits jāprotokolē pietiekamos starplaikos atkarībā no testa ilguma un aprakstītās anomālijas. Jāņem vērā, ka anormāli kāpuri un zivju mazuļi ir sastopami dabā un ka dažām sugām to daudzums kontrolgrupā(-ās) var sasniegt vairākus procentus. Ja deformācijas un ar tām saistītā anormālā uzvedība ir uzskatāma par tik smagu, ka tas organismam rada ievērojamas ciešanas, un ir attīstījusies tik tālu, ka organisms neatkopsies, organismu no testa izņem. Šādus dzīvniekus eitanazē un turpmākā datu analizē uzskata par mirstības gadījumiem. Lielākajai daļai sugu, kuras iesaka izmantot šajā testa metodē (9), (10), (11), (12), ir dokumentēta normāla embrionālā attīstība.

29. **Anormāla izturēšanās:** anomālijas, piemēram, hiperventilācija, nekoordinēta peldēšana, netipisks mierīgums un netipiska barošanās, jāreģistrē atkarībā no testa ilguma pietiekamos starplaikos (piemēram, reizi dienā siltūdeņu sugām). Šādas novērotas ietekmes, lai gan grūti kvantificējamās, var palīdzēt interpretēt mirstības datus.

30. **Svars:** **Svars:** testa beigās, ņemot par pamatu replikātus, visas izdzīvojušās zivis sver (norādot dzīvnieku skaitu replikātā un vidējo dzīvnieka svaru): priekšroku dod mitrajam svaram (nosusinātiem dzīvniekiem), tomēr var ziņot arī datus par saussvaru (13).
31. **Garums:** testēšanas beigās mēra individuālo garumu. Ieteicams ir kopējais garums, tomēr astes spuras trūdēšanas vai spuru erozijas gadījumā var izmantot standartgarumu. Visām zivīm konkrētajā testā izmanto vienu un to pašu metodi. Individuālo garumu var izmērīt, piemēram, ar bīdmēru, digitālo fotoaparātu vai kalibrētu lēcas mikrometru. Tipiskie minimālie garumi ir definēti 2. papildinājumā.

DATI UN PĀRSKATS

Rezultātu apstrāde

32. Ja ziņojumā jāatspoguļo NOEC, ieteicams, lai eksperimenta plāns un izvēlētais statistiskais tests nodrošinātu pietiekamu jaudu (80 % vai vairāk), lai varētu noteikt bioloģiski nozīmīgas izmaiņas beigupunktos. Koncentrāciju ar nozīmīgu ietekmi un parametru ziņošanu var regulēt normatīvie akti. Ja ziņojumā jāatspoguļo EC_x , eksperimenta plānam un izvēlētajam regresijas modelim ir jānodrošina EC_x noteikšana tā, lai (i) ziņojumā atspoguļotais EC_x 95 % ticamības intervālā nebūtu nulle un lai tas nebūtu pārāk liels, (ii) paredzētās vidējās vērtības EC_x 95 % ticamības intervālā nebūtu kontroles vidējā aritmētiskā vērtība; (iii) regresijas modelis nebūtu būtiski neatbilstīgs. Neatkarīgi no tā, kuru no abām pieejām izmanto, ir jāidentificē procentuālās pārmaiņas katram beigupunktam, ko ir svarīgi noteikt vai aplēst. Eksperimenta plāns jāizstrādā tā, lai tas būtu iespējams. Ja iepriekš aprakstītie nosacījumi EC_x noteikšanai nav izpildīti, ir jāizmanto NOEC pieeja. Maz ticams, ka visiem beigupunktiem procentuālā pārmaiņa būs vienāda, nav ticams arī, ka izstrādās paveicamu eksperimentu, kurš atbilstu šiem nosacījumiem attiecībā uz visiem beigupunktiem, tāpēc, lai eksperimentu izstrādātu pareizi, galvenā uzmanība ir jāpievērš beigupunktiem, kas ir svarīgi konkrētajam eksperimentam. 5. un 6. papildinājumā attiecībā uz katru pieeju ir pieejamas tādas statistiskās plūsmas diagrammas un norādes, kas palīdz apstrādāt datus un izvēlēties lietošanai vispiemērotāko statistisko testu vai modeli. Var izmantot citas statistiskas pieejas, ja tās ir zinātniski pamatotas.
33. Variācijas būs jāanalizē katras replikātu kopas ietvaros, izmantojot dispersijas analīzi vai kontingences tabulu, un atbilstošās statistisko analīžu metodes jābalsta uz šādu analīzi. Lai individuālās koncentrācijas pa daudziem faktoriem salīdzinātu ar kontroļu rezultātiem, nepārtrauktām atbildreakcijām ir ieteicams descendents Džonkhīra-Terpstra vai Viljamsa tests, bet dihotomām reakcijām, kas atbilst monotoni reakcijai uz koncentrāciju, ja nav pierādījumu par ekstrabinominālo dispersiju (14) — descendents Kohrana-Armitāža tests. Ja ir pierādījumi par ekstrabinominālo dispersiju, ir ieteicama Kohrana-Armitāža testa Rao-Skota modifikācija (15) (16) vai Viljamsa vai Daneta (pēc arcsin-kvadrātsaknes transformācijas), vai Džonkhīra-Terpstra tests, ko piemēro replikātu daļām. Ja dati neatbilst monotoni atbildreakcijai uz koncentrāciju, nepārtrauktām atbildreakcijām var noderēt Daneta, Danna, vai Manna-Vitnija metode, bet dihotomām atbildreakcijām — Fišera precīzais tests (14) (17) (18). Izmantojot jebkuru statistisko metodi vai modeli, ir jā rūpējas, lai tiktu izpildīti šīs metodes vai modeļa nosacījumi (piemēram, aplēsta un tad eksperimenta plānā un izvēlētajā testā vai modelī vērā ņemta mainība starp dažādām kamerām). Jānovērtē, vai datiem ir normālsadalījums, un 5. papildinājumā ir izklāstīts, kā rīkoties ar ANOVA atlikumiem. 6. papildinājums aplūko papildu apsvērumus regresijas pieejai. Jāapsver, vai neizmantojot transformācijas, kas nodrošina atbilstību statistiskā testa nosacījumiem. Tomēr transformācijas, ar ko pielāgo regresijas modeli, ir jāizdara ļoti rūpīgi, jo, piemēram, 25 % pārmaiņa atbildreakcijā pirms datu transformācijas neatbilst 25 % pārmaiņai transformētajā atbildreakcijā. Analīzes vienība un eksperimenta vienība visās analīzēs ir testa kamera, nevis atsevišķas zivis, un tas ir jāatspoguļo gan hipotēžu testos, gan regresijā (3) (14) (19) (20).

Testēšanas pārskats

34. Testēšanas pārskatā jāiekļauj šāda informācija:

Testējamā ķīmikālija:

Vienas sastāvdaļas viela

- fiziskais izskats, šķīdība ūdenī un papildu būtiskas fizikālķīmiskas īpašības;
- ķīmiskā identifikācija, piemēram, IUPAC vai CAS nosaukums, CAS numurs, SMILES vai InChI kods, struktūrformula, tīrības pakāpe, attiecīgā gadījumā un cik praktiski iespējams — piemaisījumu ķīmiskā identitāte, utt. (attiecīgā gadījumā arī organiskā oglekļa saturs).

Daudzkomponentu viela, UVCB un maisījumi:

- iespējami raksturota, piemēram, norādot sastāvdaļu ķīmisko identitāti (sk. iepriekš), kvantitatīvo daudzumu un būtiskas fizikālķīmiskas īpašības.

Testa sugas:

- zinātniskais nosaukums, līnija, izcelsme un apaugļoto ikru ievākšanas metode un turpmāka rīcība ar tiem.

Testa apstākļi:

- izmantotā testa metode (piemēram, pusstatiskā vai caurplūdes, noslogojums);
- fotoperiods(-i);
- testa plāns (piemēram, testa kameru un replikātu skaits, ikru skaits replikātā, testa kameras materiāls un lielums (augstums, platums, tilpums), ūdens tilpums testa kamerā);
- izejšķiduma pagatavošanas metode un atjaunošanas biežums (ir jānorāda šķīšanu veicinošā viela, ja to lieto, un tās koncentrācija);
- testējamās ķīmikālijas dozēšanas metode (piemēram, sūkņi, atšķaidīšanas sistēmas);
- metodes atgūstamības efektivitāte un nominālās testējamās koncentrācijas, kvantitatīvās noteikšanas robeža, mērījumu vidējās vērtības un standartnovirzes testa traukos, un metode, ar ko tās iegūtas un pierādījums, ka mērījumi raksturo testējamās ķīmikālijas koncentrācijas īstā šķīdumā;
- atšķaidīšanas ūdens raksturlielumi: testa vides pH, cietība, temperatūra, izšķīdušā skābekļa koncentrācija, atlikumu hlora līmeņi (ja mērīti), kopējais organiskais ogleklis (ja mērīts), suspendētās daļiņas (ja mērītas), sāļums (ja mērīts) un citi izdarītie mērījumi;
- ūdens kvalitāte testa traukos: pH, cietība, temperatūra un izšķīdušā skābekļa koncentrācija,
- sīka informācija par barošanu (piemēram, barības veids(-i), avots, dotais daudzums un biežums).

Rezultāti, kas ziņojumā atspoguļoti atsevišķi (vai uz replikātu pamata) un kā vidējais lielums un attiecīgi variācijas koeficienti šādiem beigupunktiem:

- pierādījumi, ka kontrolgrupa atbilst testa sugas vispārējam izdzīvotības pieņemamības standartam (2. papildinājums),
- dati par mirstību katrā stadijā (embriju, kāpuru un zivju mazuļu) un kumulatīvā mirstība;
- dienas līdz izšķīšanās brīdim, katru dienu izšķīlušos kāpuru skaits un izšķīšanās beigas;
- veselu zivju skaits testa beigās;
- dati par izdzīvojušo dzīvnieku garumu (norādīt standartgarumu vai kopējo garumu) un svaru;
- morfoloģisko anomāliju biežums, apraksts un skaits, ja tādas ir,
- ietekmju uz izturēšanos biežums, apraksts un skaits, ja tādas ir,

- statistiskās analīzes pieeja (regresijas analīze vai dispersijas analīze) un datu apstrāde (statistiskais tests vai izmantotais modelis);
- katrai novērtētajai atbildreakcijai nenovērojamās ietekmes koncentrācija (NOEC);
- katrai novērtētajai atbildreakcijai zemākā novērojamās ietekmes koncentrācija (LOEC) (ar $p = 0,05$);
- attiecīgā gadījumā katrai novērtētajai atbildreakcijai EC_x un ticamības intervāli (piem., 90 % vai 95 %) un tās aprēķināšanai pielāgotā modeļa grafiks, devas – atbildreakcijas līknes slīpums, regresijas modeļa formula, lēstie modeļa parametri un to standartklūda.

Atkāpes no testa metodes.

Rezultātu izvērtējums, tostarp tas, kā testa iznākumu ietekmē jebkādas novirzes no testa metodes.

1. tabula

Testēšanai ieteicamās zivju sugas

SALDŪDENS	UPJU GRĪVU UN JŪRAS ZIVIS
<i>Oncorhynchus mykiss</i> Varavīksnes forele	<i>Cyprinodon variegatus</i> Karpzobveidīgo zivju suga
<i>Pimephales promelas</i> Melngalvas mailīte	<i>Menidia sp.</i> Saldūdens menīdija
<i>Danio rerio</i> Zebrzivs	
<i>Oryzias latipes</i> Rīsa zivs vai medaka	

LITERATŪRA

- (1) OECD (2012), Fish Toxicity Testing Framework, Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.171, OECD, Paris.
- (2) OECD (2000), Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures, Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment. No. 23, OECD Paris.
- (3) ASTM (1988), Standard Guide for Conducting Early Life-Stage Toxicity Tests with Fishes. American Society for Testing and Materials, E 1241-88. 26 pp.
- (4) Brauhn, J.L. and R.A. Schoettger (1975), Acquisition and Culture of Research Fish: Rainbow trout, Fathead minnows, Channel catfish and Bluegills, Ecological Research Series, EPA-660/3-75-011, Duluth, Minnesota.
- (5) Brungs, W.A. and B.R. Jones (1977), Temperature Criteria for Freshwater Fish: Protocol and Procedures, Ecological Research Series EPA-600/3-77-061, Duluth, Minnesota.
- (6) Adolfsson-Erici, *et al.* (2012), A flow-through passive dosing system for continuously supplying aqueous solutions of hydrophobic chemicals to bioconcentration and aquatic toxicity tests, Chemosphere 86, 593-599.
- (7) Hutchinson, T.H. *et al.* (2006), Acute and chronic effects of carrier solvents in aquatic organisms: A critical review, Aquatic Toxicology, 76, 69-92.
- (8) Chapter C.20 of this Annex, Daphnia magna Reproduction Test.

-
- (9) Hansen, D.J. and P.R. Parrish (1977), Suitability of sheepshead minnows (*Cyprindon variegatus*) for life-cycle toxicity tests, In *Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation* (edited by F.L. Mayer and J.L. Hamelink), ASTM STP 634.
- (10) Kimmel, H. B.*et al.* (1995), Stages of embryonic development of the zebrafish. *Developmental Dynamics*, 203:253–310.
- (11) Gonzalez-Doncel, M. *et al* (2005), A quick reference guide to the normal development of *Oryzias latipes* (Teleostei, Adrinichthyidae) *Journal of Applied Ichthyology*, 20:1–14.
- (12) Devlin, E.W. *et al.* (1996), Prehatching Development of the Fathead Minnow, *Pimephales promelas* Rafinesque. EPA/600/R-96/079. USEPA, Office of Research and Development, Washington, D.C..
- (13) Oris, J.T., S.C. Belanger, and A.J. Bailer, (2012), Baseline characteristics and statistical implications for the OECD 210 Fish Early Life Stage Chronic Toxicity Test, *Environmental Toxicology and Chemistry* 31; 2, 370 – 376.
- (14) OECD (2006). *Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application*, Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.54, OECD, Paris.
- (15) Rao, J.N.K. and A.J. Scott (1992), A simple method for the analysis of clustered binary data, *Biometrics* 48, 577-585.
- (16) Rao, J.N.K. and A.J. Scott (1999), A simple method for analyzing overdispersion in clustered Poisson data, *Statistics in Medicine* 18, 1373-1385.
- (17) Dunnett C. W. (1955), A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control, *Journal of American Statistical Association*, 50, 1096-1121.
- (18) Dunnett C. W. (1964), New tables for multiple comparisons with a control. *Biometrics*, 20, 482–491.
- (19) Rand, G.M. and S.R. Petrocelli (1985), *Fundamentals of Aquatic Toxicology*. Hemisphere Publication Corporation, New York.
- (20) McClave, J.T., J.H. Sullivan and J.G. Pearson (1980). *Statistical Analysis of Fish Chronic Toxicity Test Data*, Proceedings of 4th Aquatic Toxicology Symposium, ASTM, Philadelphia.
-

1. papildinājums

DEFINĪCIJAS

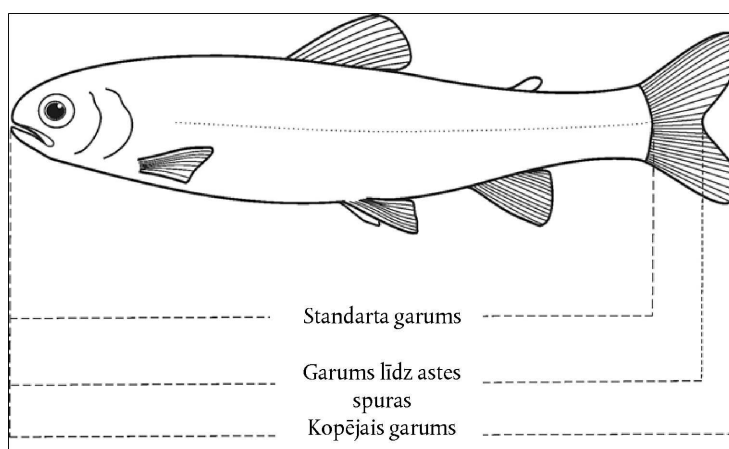
Garums līdz astes spurai: attiecas uz garumu no purna gala līdz astes spuras galam un to izmanto zivīm, kurām grūti noteikt, kur beidzas mugurkauls (www.fishbase.org)

Standartgarums: attiecas uz zivs garumu, kas nomērīts no purna gala līdz pēdējā skriemeļa mugurējam galam vai astes pamatnes sānu viduslīnijas mugurējai daļai. Vienkārši sakot, šajā mērījumā neņem vērā astes spuras garumu. (www.fishbase.org)

Kopējais garums: attiecas uz zivs garumu, kas nomērīts no purna gala līdz astes spuras tālākajam galam, un to parasti mēra, abas puses saspiežot pa viduslīniju. Tas ir taisnas līnijas mērījums, ko nemēra pa ķermeņa izliekuma līniju (www.fishbase.org)

1. attēls

Dažādu garuma lietojumu raksturojums



Ķīmikālija: viela vai maisījums.

EC_x: (ietekmes koncentrācija x % ietekmei) ir koncentrācija, kas konkrētajā ekspozīcijas periodā salīdzinājumā ar kontrolgrupu izraisa x % ietekmi uz testa organismiem. Piemēram, ES₅₀ ir aplēstā koncentrācija, kas definētajā ekspozīcijas periodā ietekmē testa beigupunktu 50 % no eksponētās populācijas.

Zemākā novērojamas ietekmes koncentrācija (LOEC) ir testējamās ķīmikālijas zemākā testētā koncentrācija, pie kuras, salīdzinot ar kontroli, ķīmikālijai ir novērota statistiski nozīmīga ietekme (pie $p < 0,05$). Tomēr visām testējamām koncentrācijām, kas pārsniedz LOEC, jāuzrāda kaitīga iedarbība, kura ir vienāda vai lielāka par to, kas novērojama pie LOEC. Ja šos abus nosacījumus nevar nodrošināt, izsmēloši jāpaskaidro, kāpēc izraudzīta šāda LOEC (un tādējādi NOEC). Norādījumi sniegti 5. un 6. papildinājumā.

Nenovērojamās ietekmes koncentrācija (NOEC) ir testējamā koncentrācija, kura ir tieši zemāka par LOEC un kurai noteiktā iedarbības periodā salīdzinājumā ar kontroli nav statistiski nozīmīgas ietekmes ($p < 0,05$).

UVCB: vielas ar nezināmu vai mainīgu sastāvu, kompleksi reakcijas produkti vai bioloģiskie materiāli.

IUPAC: Starptautiskā Teorētiskās un lietišķās ķīmijas savienība.

SMILES: Vienkāršotas molekulāro datu ievades lineāras izteiksmes sistēma

TESTA NOSACĪJUMI, ILGUMS UN IZDZĪVOTĪBAS KRITĒRIJI IETEICAMAJĀM SUGĀM

SUGA	TESTA NOSACĪJUMI			IETEICAMĀIS TESTA ILGUMS	Tipiskais minimālais vidējais kopējais kontroles zivju garums pētījuma beigās (mm) ⁽¹⁾	KONTROLGRUPAS IZDZĪVOTĪBA (minimums)	
	Temperatūra (°C)	Sāļums (‰)	Fotoperiods (stundas)			Izšķilšanās rezultāts	Pēcizšķilšanās rezultāts

Saldūdens:

<i>Oncorhynchus mykiss</i> Varavīksnes forele	10 ± 1.5 ⁽²⁾		12–16 ⁽³⁾	2 nedēļas pēc tam, kad kontrolgrupa brīvi barojas (vai 60 dienas pēc izšķilšanās)	40	75 %.	75 %.
<i>Pimephales promelas</i> Melngalvas mailīte	25 ± 1,5		16	32 dienas no testa sākuma (vai 28 dienas pēc izšķilšanās)	18	70 %.	75 %.
<i>Danio rerio</i> Zebrzivis	26 ± 1,5		12–16 ⁽⁴⁾	30 dienas pēc izšķilšanās	11	70 %.	75 %.
<i>Oryzias latipes</i> Risa zivs vai medaka	25 ± 2		12–16 ⁽⁴⁾	30 dienas pēc izšķilšanās	17	80 %.	80 %.

Upju grīvu un jūras zivis

<i>Cyprinodon variegatus</i> Karpzobveidīgo zivju suga	25 ± 1,5	15–35 ⁽⁵⁾	1216 ⁽⁴⁾	32 dienas no testa sākuma (vai 28 dienas pēc izšķilšanās)	17	75 %.	80 %.
<i>Menidia sp.</i> Saldūdens menīdija	22–25	15–35 ⁽⁵⁾	13	28 dienas	20	80 %.	60 %.

Apzīmējumi

- ⁽¹⁾ Tipiskais minimālais vidējais kopējais garums nav derīguma kritērijs, bet attiecībā uz noviržu vērtībām, kas nesasniedz attēlā norādīto vērtību, rūpīgi jāpārbauda testa jutīgums. Minimālo vidējo kopējo garumu atvasina no attiecīgajā brīdī pieejamu datu kopas.
- ⁽²⁾ Sakarā ar konkrēto izmantoto varavīksnes foreles līniju var būt nepieciešamas citas temperatūras. Vaislas zivis jātur tādā pašā temperatūrā, kā tās, ko izmanto ikriem. Saņemot ikrus no komerciāla audzētāja, tiem pēc ierašanās ir nepieciešama īslaicīga adaptēšanās (piemēram, 1–2 h) testa temperatūrā.
- ⁽³⁾ Kāpuriem līdz vienai nedēļai pēc izšķilšanās tumsa, izņemot pārbaudes brīžus, pēc tam visā testa laikā samazināts apgaismojums (12–16 stundu fotoperiods)⁽⁴⁾.
- ⁽⁴⁾ Visos testa apstākļos gaismas režīmam jābūt konstantam.
- ⁽⁵⁾ Visos testos tas jāievēro ± 2‰.

TESTĒŠANAI IETEICAMĀS ZIVJU SUGAS

SUGA	BARĪBA (*)				PĒCIZŠKILŠANĀS PĀREJAS LAIKS	LAIKS LĪDZ PIRMAJAI BAROŠANAI
	Vaislas zivis	Tikko izšķīlušies kāpuri	Mazuļi			
			Veids	Biezums		
Saldūdens:						
<i>Oncorhynchus mykiss</i> Varavīksnes forele	foreļu barība	Nepiemēro ^(a)	foreļu pirmā barība BSN	2–4 barošanas reizes dienā	14–16 dienas pēc iz- šķilšanās vai pie uzpel- dēšanas (nav būtiski)	19 dienas pēc izšķilšanās vai pie uzpeldēšanas
<i>Pimephales promelas</i> Melngalvas mailīte	BSN, pārslveida barība FBS	BSN	BSN48, pārslveida ba- rība	2–3 reizes dienā	kad izšķilšanās ir 90 %	2 dienas pēc izšķilšanās
<i>Danio rerio</i> Zezzivis	BSN, pārslveida barība	Tirdzniecībā pieejama kāpuru barība, vien- šūņi ^(b) , proteīns ^(c)	BSN48, pārslveida ba- rība,	BSN vienreiz dienā; pārslveida barība div- reiz dienā	kad izšķilšanās ir 90 %	2 dienas pēc izšķilšanās
<i>Oryzias latipes</i> Rīsa zivs vai medaka	pārslveida barība	BSN, pārslveida barība (vai vienšūņi vai virpo- tāji)	BSN48, pārslveida ba- rība (vai virpotāji)	BSN reizi dienā; pārsl- veida pārtika divreiz dienā vai pārslveida ba- rība un virpotāji vien- reiz dienā	Nav piemērojams	6–7 dienas pēc nārstoša- nas
Upju grīvu un jūras zivis:						
<i>Cyprinodon variegatus</i> Karpzobveidīgo zivju suga	BSN, pārslveida barība FBS	BSN	BSN48	2–3 barošanas reizes dienā	Nav piemērojams	1 diena pēc izšķilšanās/ uzpeldēšanas
<i>Menidia sp.</i> Saldūdens menīdija	BSN48, pārslveida ba- rība	BSN	BSN48	2–3 barošanas reizes dienā	Nav piemērojams	1 diena pēc izšķilšanās/ uzpeldēšanas

Apzīmējumi

(*) Barība jādod līdz sāta sajūtai Barības pārpalikumi un fēces jāizņem, lai izvairītos no atkritumu uzkrāšanās

FBS saldētas pieaugušas okeāna garneles, *Artemia sp*

BSN nauplija stadijas okeāna garneles; tikko izšķīlušās

BSN48 nauplija stadijas okeāna garneles; 48 stundas vecas

^(a) kāpuri dzeltenummaisā stadijā nav jābaro^(b) filtrēts no barotnes^(c) granulas no fermentēšanas procesa

4. papildinājums

DAŽAS PIEŅEMAMA ATŠĶAIDĪŠANAS ĪDENS ĶĪMISKĀS ĪPAŠĪBAS

Sastāvdaļa	Robežkoncentrācija
Daļiņas	5 mg/l
Kopējais organiskais ogleklis	2 mg/l
Nejonizēts amonjaks	1 µg/l
Atlikušais hlors	10 µg/l
Kopējie fosfororganiskie pesticīdi	50 ng/l
Kopējie hlororganiskie pesticīdi un polihlorbifenili	50 ng/l
Kopējais organiskais hlors	25 ng/l
Alumīnijs	1 µg/l
Arsēns	1 µg/l
Hroms	1 µg/l
Kobalts	1 µg/l
Varš	1 µg/l
Dzelzs	1 µg/l
Svins	1 µg/l
Niķelis	1 µg/l
Cinks	1 µg/l
Kadmija	100 ng/l
Dzīvsudrabs	100 ng/l
Sudrabs	100 ng/l

5. papildinājums

STATISTISKAS NORĀDES NOEC NOTEIKŠANAI

Vispārīgi norādījumi

Analīzes vienība ir replikāta tvertne. Tādējādi pastāvīgiem mērījumiem, piemēram, izmēram, aprēķina replikāta vidējo vērtību vai mediānu un analizējamie dati ir šīs replikātu vērtības. Jāpierāda izmantoto testu jauda, vēlams, izmantojot pietiekamus vēsturiskus datus katrai laboratorijai. Attiecībā uz katru beigupunktu kopā ar izmantojamo statistisko testu jānorāda izmēra ietekme, ko iespējams detektēt ar 75–80 % jaudu.

Datubāzēs, kas šīs testa metodes izstrādes laikā pieejamas, ir noteikts, kādu jaudu var iegūt ar ieteicamajām statistiskajām procedūrām. Katrai atsevišķai laboratorijai tās spēja šo prasību attiecībā uz jaudu izpildīt ir jāpierāda, vai nu veicot pašai savu jaudas analīzi, vai pierādot, ka nevienai atbildreakcijai variācijas koeficients (CV) nepārsniedz šīs testēšanas vadlīnijas izstrādē izmantoto CV 90. procentili. Šie variāciju koeficienti atrodami 1. tabulā. Ja pieejamas tikai replikātu vidējās vērtības vai mediānas, replikāta CV var ņemt vērā.

1. tabula

90. percentiles CV izvēlētajām saldūdens sugām

Suga	Atbildreakcija	CV_starp replikātiem	CV_replikātos
Varavīksnes forele	Garums	17,4	9,8
	Svars	10,1	28
Melngalvas mailīte	Garums	16,9	13,5
	Svars	11,7	38,7
Zebrzivs	Garums	43,7	11,7
	Svars	11,9	32,8

Gandrīz visu laboratorisko toksikoloģijas pētījumu vērtēšanai izmantoto statistisko testu uzdevums ir apstrādes grupas salīdzināt ar kontroli. Tāpēc nav pamata sagaidīt nozīmīgu ANOVA F-testa rezultātu, pirms nav lietots Daneta vai Viljamsa tests vai nozīmīgu Kruskala-Valisa testa rezultātu, pirms nav lietots Džonkhīra-Terpstra, Manna-Vitnija vai Danna tests (Hochberg and Tamhane 1987, Hsu 1996, Dunnett 1955, 1964, Williams 1971, 1972, 1975, 1977, Robertson et al. 1988, Jonckheere 1954, Dunn 1964).

Daneta testā ir iestrādāta kardinalitātes korekcija un, ja par vārtzini izmanto F-testu, tiek negatīvi ietekmēti tā pseidopozitīvie un pseidonegatīvie rezultāti. Līdzīgi, descendentā Viljamsa un Džonkhīra-Terpstra testā, kur katrā solī izmanto būtiskuma līmeni 0,05, saglabājas vispārējs pseidopozitīvu rezultātu līmenis 5 %, un šis līmenis, kā arī testu jauda tiek ietekmēta negatīvi, ja kā vārtzini lieto F-testu vai Kruskala-Valisa testu. Manna-Vitnija un Danna testi ir jākorrigē atbilstoši kardinalitātei, un ieteicams veikt Bonferoni-Holma korekciju.

Lielākā daļa ieteikumu hipotēžu pārbaudei un šo testu pamatā esošo pieņēmumu verifikācijai ir sīki izskatīti OECD materiālā (2006), kas satur arī plašu bibliogrāfiju.

Kontroļu apstrāde, ja izmanto šķīdinātāju

Ja izmanto šķīdinātāju, ir jāizmanto gan atšķaidīšanas ūdens kontrole, gan šķīdinātāja kontrole. Abas kontroles jāsalīdzina, vērtējot katru atbildreakciju, un, ja būtiska atšķirība starp kontrolēm netiek konstatēta, tās jākombinē statistiskai analīzei. Pretējā gadījumā NOEC noteikšanai vai EC_x aprēķiniem ir jāizmanto šķīdinātāja kontrole, bet ūdens kontrole nav jāizmanto. Sk. validitātes kritēriju ierobežojumu (7. punkts).

Ar T-testu vai Manna–Vitnija testu, izmantojot garumu, svaru, izšķīlušos ikru daļu un kāpuru mirstību vai anormālu kāpuru daļu, kā arī izšķilšanās vai uzpeldēšanas pirmo vai pēdējo dienu (būtiskuma līmenis 0,05) un ignorējot visas apstrādes grupas, salīdzina šķīduma ūdens kontroli un šķīdinātāja kontroli. Šo testu rezultāti jāatspoguļo ziņojumā.

Izmēru mērījumi (garums un svars)

Atsevišķu zivju garuma un svara vērtību sadalījums var būt normāls vai logaritmiski normāls. Gan vienā, gan otrā gadījumā atbilstoši centrālo robežvērtību teorēmai un saskaņā ar datiem no vairāk nekā 100 ELS pētījumiem, kas vēltīti trijām saldūdens sugām, replikātu vidējo aritmētisko vērtību sadalījums parasti būs normālsadalījums. Alternatīvi, ja dati vai vēsturiskās datubāzes liecina, ka atsevišķu zivju izmēra sadalījums ir logaritmiski normāls, var aprēķināt atsevišķo zivju vērtību replikātu vidējo logaritmu, un analizējamie dati tad var būt šo replikātu vidējo logaritmu antilogaritmi.

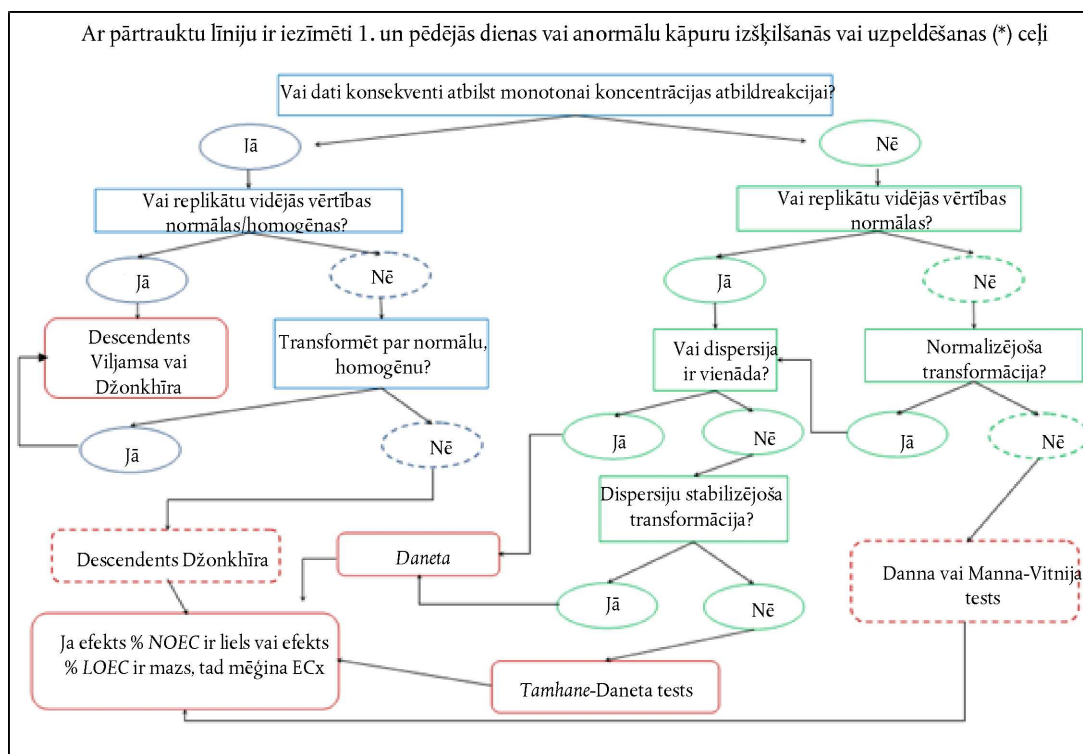
Jānovērtē datu atbilstība normālsadalījumam un dispersijas homogenitātei. Šajā nolūkā ir jāizmanto ANOVA modeļa atlikumi ar koncentrāciju kā vienīgo skaidrojošās klases mainīgo. Var veikt vizuālu noteikšanu, izmantojot izkliedes diagrammas vai histogrammas vai stumbra-lapu diagrammu. Var izmantot arī formālu testu, piemēram, Šapiro-Vilka vai Andersona-Darlinga testu. Atbilstību dispersijas homogenitātei var novērtēt, vizuāli izpētot to pašu izkliedes diagrammu vai formāli, izmantojot Lēvena testu. Normalitāte un dispersijas homogenitāte ir jānovērtē tikai parametriskiem testiem (piemēram, Viljams, Danets).

Uzmanība ir jāpievērš iespējamajām izlecošām vērtībām un to ietekmei uz analīzi. Var izmantot Tukey izlecošo vērtību pārbaudi un to pašu iepriekš aprakstīto atlikumu diagrammu vizuālu pārbaudi. Jāatceras, ka novērojumi ir par visiem replikātiem, tāpēc izlecošā vērtība no analīzes jāizslēdz tikai pēc rūpīgas apsvēšanas.

Statistiskie testi, kas izmanto eksperimenta plāna un bioloģisko prognožu īpašības, ir descendenti trenda testi, piemēram, Viljamsa un Džonkhīra-Terpstra. Šajos testos pieņem, ka koncentrācija-atbildreakcija ir monotona, un vērtē datu atbilstību šim pieņēmumam. To var izdarīt vizuāli, izmantojot replikātu vidējo aritmētisko vērtību pret testējamo koncentrāciju izkliedes diagrammu. Būs noderīgi šo izkliedes diagrammu salīdzināt ar segmentētu lineāru diagrammu, kurā ir savienotas pēc replikātu paraugu izmēra svērtās koncentrāciju vidējās aritmētiskās vērtības. Ja šī segmentētā lineārā diagramma stipri novirzās no monotonijas, tas var liecināt, ka var būt jāizmanto testi bez trenda. Var izmantot arī formālus testus. Vienkāršs formāls tests ir aprēķināt koncentrācijas vidējo aritmētisko vērtību lineāros un kvadrātiskos kontrastus. Ja kvadrātiskais kontrasts ir nozīmīgs, bet lineārais kontrasts nav nozīmīgs, tas liecina, ka monotonija, iespējams, ir problemātiska, kas ir papildus jāizvērtē, izmantojot diagrammas. Ja ir jāpārbauda normalitāte vai dispersijas homogenitāte, šos kontrastus var konstruēt, izmantojot datus, kas ir transformēti atbilstoši hierarhijai. Var izmantot alternatīvas procedūras, piemēram, Bartolomjū testu monotonijas noteikšanai, taču tas palielina komplikētību.

2. attēls

NOEC izmēru mērījumu diagramma (garums un svars)



(*) Šīs atbildreakcijas nekad neatbilst parametrisko analīžu vai modeļu pieņēmumiem

Ja vien dati atbilst šo testu nosacījumiem, NOEC nosaka, descendentu piemērojot Viljamsa vai Džonkhīra-Terpstra testu. OECD (2006) sniedz sīkāku informāciju par šīm procedūrām. Ja dati neatbilst descendentu trenda testa nosacījumiem, var izmantot Daneta testu vai Tamheina-Daneta (T3) testu, katrā no kuriem ir iestrādātas kardinalitātes korekcijas. Šajos testos ir pieņēmums par normālsadalījumu, bet Daneta gadījumā arī par dispersijas homogenitāti. Ja šie nosacījumi nav izpildīti, var izmantot Danna neparametrisko testu. OECD (2006) satur detalizētu informāciju par visiem šiem testiem. 2. attēlā ir sniegts pārskats, kā izvēlēties nepieciešamo testu.

Ikru izšķīšanās un kāpuru izdzīvošana

Dati norāda, kāda daļa ikru individuālajos replikātos izšķīlušies vai kāda daļa kāpuru tajos izdzīvojuši. Šīs daļas ir jāizvērtē attiecībā uz ekstrabinominālo dispersiju, kas šādos mērījumos ir sastopama bieži, tomēr nav universāla. Diagramma 3. attēlā ir norādes testa izvēlei; sīkāku aprakstu sk. tekstā.

Parasti izmanto divus testus. Tie ir Tarones C(α) tests (Tarone, 1979) un hī kvadrāta tests, ko katru piemēro atsevišķi katrai testējamajai koncentrācijai. Ja kaut vienā testējamajā koncentrācijā tiek konstatēta ekstrabinomināla dispersija, jāizmanto metodes tās regulēšanai.

1. formula

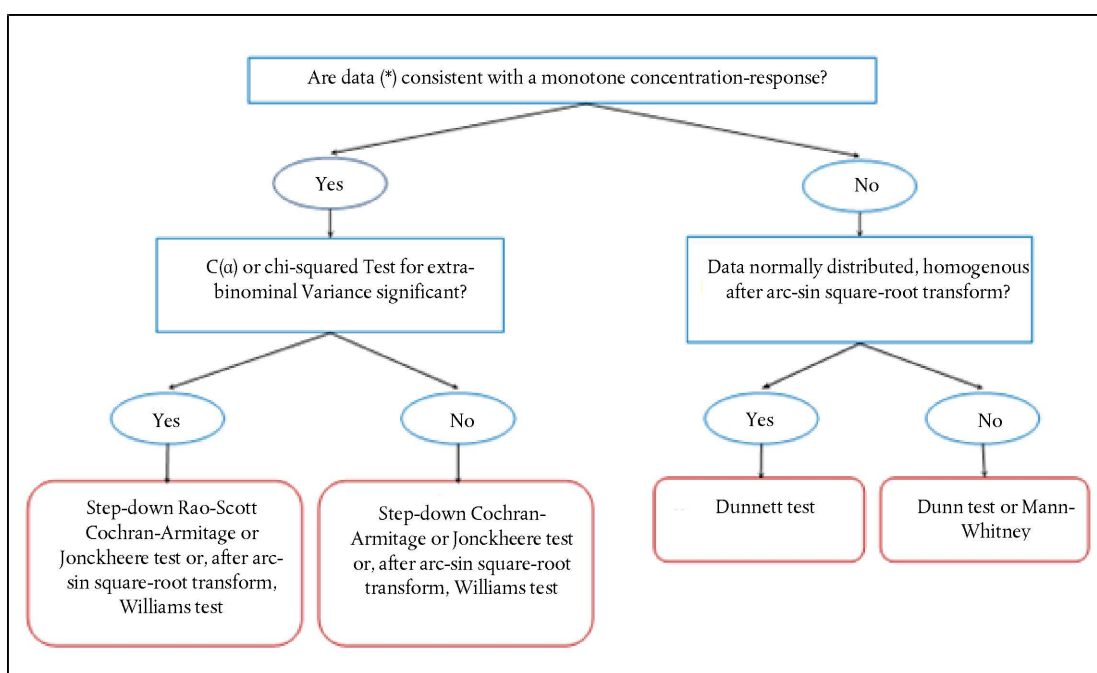
Tarones C (α) tests (Tarone 1979)

$$Z = \frac{\sum_{j=1}^m \frac{(x_j - n_j \hat{p})^2}{\hat{p}(1 - \hat{p})} - \sum_{j=1}^m n_j}{\left\{ 2 \sum_{j=1}^m n_j (n_j - 1) \right\}^{1/2}}$$

kur p ir proporcijas vidējā aritmētiskā vērtība dotajā koncentrācijā, m ir replikātu tvertņu skaits, n_j ir subjektu skaits replikātā j , un x_j ir reaģējušo, t. i. neizšķīlušos vai mirušo, subjektu skaits replikātā. Šo testu piemēro katrai koncentrācijai atsevišķi. Šo testu var uzskatīt par pielāgotu hī-kvadrāta testu, taču Tarones veiktās ierobežotas jaudas simulācijas parādīja, ka tā jauda ir lielāka nekā hī kvadrāta testam.

3. attēls

NOEC ikru šķīšanās un kāpuru mirstības diagramma.



(*) Data are replicate proportion.

Ja nav būtisku pierādījumu ekstrabinominālai dispersijai, var izmantot Kohrana-Armitāža descendenta testu. Šis tests neņem vērā replikātus, tāpēc, ja eksistē šādi pierādījumi, tiek ieteikta Kohrana-Armitāža testa (RSCA) Rao-Skota korekcija, kas ņem vērā replikātus, replikātu izmērus un ekstrabinominālo dispersiju. Alternatīvi testi ir descendentu Viljamsa un Džonkhīra-Terpstra testi un Daneta tests, kas aprakstīts attiecībā uz izmēru mērījumiem. Šie testi ir izmantojami gan gadījumos, kad ir vērojama ekstrabinomiāla mainība, gan gadījumos, kur tādas nav, taču to jauda ir mazliet zemāka (Agresti 2002, Morgan 1992, Rao and Scott 1992, 1999, Fung et al. 1994, 1996).

Pirmā vai pēdējā izšķīšanās vai uzpeldēšanas diena

Atbildreakcija ir vesels skaitlis — testa diena, kurā attiecīgajā replikāta tvertnē veikts konkrētais novērojums. Vērtību intervāls parasti ir ļoti ierobežots un bieži liela daļa vērtību ir saistītas, piemēram, visiem kontroles replikātiem un varbūt vienai vai divām zemākajām testējamajām koncentrācijām tiek novērota viena un tā pati izšķīšanās diena. Parametriski testi, piemēram, Viljamsa and Daneta šādiem datiem nav piemēroti. Izņemot gadījumus, kad eksistē pierādījumi par nopietnām monotonijas problēmām, descendants Džonkhīra-Terpstra tests ir ļoti jaudīgs testā izmantotās ķīmikālijas efektu noteikšanai. Pretējā gadījumā var izmantot Danna testu.

Kāpuru anomālijas

Atbildreakcija ir kaut kādā veidā anormālu kāpuru skaits. Šī atbildreakcija bieži vien ir reti sastopama un tai ir raksturīgas dažas tās pašas problēmas, kā, piemēram, pirmā izšķīlšanās diena, kā arī dažreiz neparasta no koncentrācijas atkarīga atbildreakcija. Ja dati vismaz aptuveni atbilst monotonai koncentrācijai, efektu noteikšanu var jaudīgi izdarīt ar descendento Džonkhīra-Terpstra testu. Pretējā gadījumā var izmantot Danna testu.

ATSAUCES

Agresti, A. (2002); *Categorical Data Analysis*, second edition, Wiley, Hoboken.

Dunnett C. W. (1955); A multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control, *J. American Statistical Association* 50, 1096-1121.

Dunn O. J. (1964); Multiple Comparisons Using Rank Sums, *Technometrics* 6, 241-252.

Dunnett C. W. (1964); New tables for multiple comparisons with a control, *Biometrics* 20, 482-491.

Fung, K.Y., D. Krewski, J.N.K. Rao, A.J. Scott (1994); Tests for Trend in Developmental Toxicity Experiments with Correlated Binary Data, *Risk Analysis* 14, 639-648.

Fung, K.Y., D. Krewski, R.T. Smythe (1996); A comparison of tests for trend with historical controls in carcinogen bioassay, *Canadian Journal of Statistics* 24, 431-454.

Hochberg, Y. and A. C. Tamhane (1987); *Multiple Comparison Procedures*, Wiley, New York.

Hsu, J.C. (1996); *Multiple Comparisons: Theory and Methods*; Chapman and Hall/CRC Press, Boca Raton.

Jonckheere A. R. (1954); A distribution-free k-sample test against ordered alternatives, *Biometrika* 41, 133.

Morgan, B.J.T. (1992); *Analysis of Quantal Response Data*, Chapman and Hall, London.

OECD (2006). Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: A guidance to application. Series on Testing and Assessment, No. 54. Organisation for Economic Co-operation and Development, OECD, Paris..

Rao J.N.K. and Scott A.J. (1992) – A simple method for the analysis of clustered binary data, *Biometrics* 48, 577-585.

Rao J.N.K. and Scott A.J. (1999) – A simple method for analyzing overdispersion in clustered Poisson data, *Statistics in Medicine* 18, 1373-1385.

Robertson, T., Wright F.T. and Dykstra R.L. (1988); *Order restricted statistical inference*, Wiley.

Tarone, R.E. (1979); Testing the goodness of fit of the Binomial distribution, *Biometrika* 66, 585-590.

Williams D.A. (1971); A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control, *Biometrics* 27, 103-117.

Williams D.A. (1972); The comparison of several dose levels with a zero dose control, *Biometrics* 28, 519-531.

Williams D. A. (1975); The Analysis of Binary Responses from Toxicological Experiments Involving Reproduction and Teratology, *Biometrics* 31, 949-952.

Williams D.A. (1977); Some inference procedures for monotonically ordered normal means, *Biometrika* 64, 9-14.

6. papildinājums

STATISTISKAS NORĀDES REGRESIJAS APLĒSĒM

Vispārīgi norādījumi

Modeļu pielāgošanai izmantotie novērojumi ir replikātu vidējās vērtības (garums un svars) vai procentuālais īpatsvars replikātā (ikru izšķīšanās un kāpuru mirstība) (ESAO 2006).

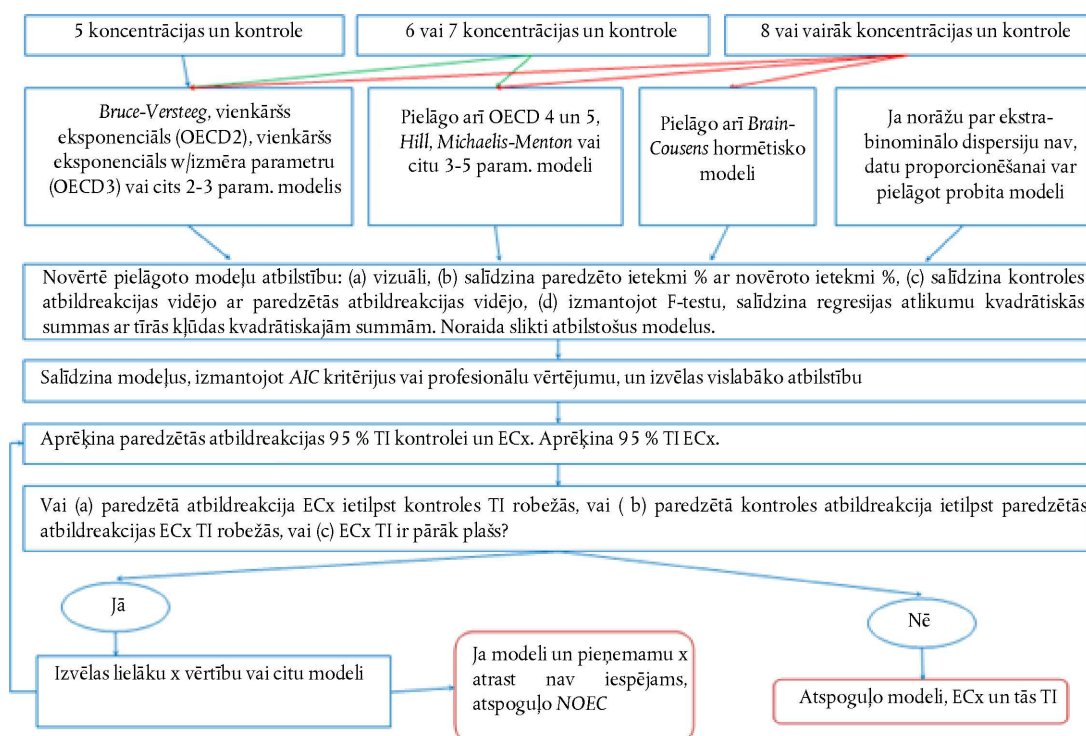
Parasti ir ieteicams izmantot svērto regresiju, par svaru izmantojot replikātu paraugu apjomu. Iespējamās citas svēruma shēmas, piemēram, svērums, kurā izmanto paredzamo reakcijas vidējo aritmētisko vērtību vai tās kombināciju ar replikātu parauga apjomu. Nav ieteicams svēršanai izmantot vienas koncentrācijas paraugu dispersijas apgriezto vērtību (Bunke *et al.* 1999, Seber and Wild, 2003, Motulsky and Christopoulos 2004, Huet *et al.* 2003).

Ja atbildreakcija pirms analīzes tiek transformēta, ir jāsaģlabā novērojumu neatkarība, bet EC_x ar ticamības intervāla robežām ir jāizsaka sākotnējās mērvienībās, nevis transformācijas vienībās. Piemēram, garuma logaritma izmaiņa par 20 % neatbilst 20 % garuma izmaiņai (Lyles *et al.* 2008, Draper and Smith 1999).

Pārskats par EC_x aplēsēm sniegts 4. attēla plūsmas diagrammā. Detaļas ir aprakstītas turpmāk tekstā.

4. attēls

Diagramma replikāta vidējā garuma, svara, izšķīlušos ikru, vai kāpuru mirstības EC_x aplēsei, sīkāku informāciju sk. tekstā.



Apsvērumi attiecībā uz ikru šķilšanos un kāpuru mirstību

Vērtējot ikru šķilšanos un kāpuru mirstību, parasti var izmantot samazināšanās modeli, ja vien netiek pielāgots turpmāk aprakstītais varbūtības modelis. T. i., jāmodelē neizšķīlušos ikru vai nobeigušos kāpuru procentuālais īpatsvars. Tas ir tāpēc, ka EC_x raksturo tādu koncentrāciju, kurā notiek pārmaiņas, kas atbilst x % no kontroles vidējās aritmētiskās atbildreakcijas. Ja kontrolgrupā neizšķīlušas 5 % ikru un tiek modelēta neizšķilšanās, tad EC_{20} attiecas uz koncentrāciju, kurā notiek pārmaiņas, kas atbilst 20 % no kontrolgrupas ar piecpusētiņu neizšķilšanos; šajā gadījumā tā ir pārmaiņa $0,2 \cdot 0,05 = 0,01$, jeb 1 procentpunkts salīdzinājumā ar neizšķilšanos 6 %. Ar pieejamajiem datiem tik nelielu pārmaiņu jēgpilnā veidā aprēķināt nav iespējams, un tā nav bioloģiski nozīmīga. Savukārt, modelējot izšķīlušos ikru procentuālo īpatsvaru, kontrolgrupas procentuālais īpatsvars šajā piemērā būtu 95 %, tātad 20 % samazinājums salīdzinājumā ar kontroli atbilstu pārmaiņai $0,95 \cdot 0,2 = 0,18$, proti, izšķilšanās samazinājums no 95 % līdz 77 % ($= 95 - 18$), tādējādi iedarbību izraisošā koncentrācija ir aplēšama un, iespējams, interesē vairāk. Šī problēma parasti neietekmē izmēru mērīšanu, lai gan nevēlama ietekme uz izmēru parasti nozīmē izmēra samazināšanos.

Izmēru modeļi (garums vai svars) un ikru šķilšanās vai kāpuru izdzīvotība

Izņemot Braina-Kūzena hormētisko modeli, visi šie modeļi ir ESAO aprakstīti un ieteikti (2006). Tā dēvētie ESAO 2–5 ekotoksiskuma eksperimentos ir aprakstīti arī *Slob* (2002). Protams, ka noderīgi var būt arī daudzi citi modeļi. *Bunke, et al.* (1999) norāda vairākus šeit neiekļautos modeļus, un ir daudz atsauču uz citiem modeļiem. Turpmāk norādītie tiek ieteikti kā īpaši piemēroti ekotoksiskuma eksperimentiem un tos plaši izmanto.

5 testējamās koncentrācijas un kontrole

- Bruce-Versteeg
- Vienkāršs eksponenciāls (ESAO 2)
- Eksponenciāls ar formas parametru (ESAO 3)
- Vienkāršs eksponenciāls ar zemāko robežu (ESAO 4)

6 vai vairāk testējamās koncentrācijas un kontrole

- Eksponenciāls ar formas parametru un zemāko robežu (ESAO 5)
- Michaelis-Menten
- Hill

Ja ir vizuālas liecības par hormēzi (maz ticams, ja izmanto ikru izšķilšanos vai kāpuru mirstību, bet dažreiz novērota izmēru novērojums)

- Brain-Cousens Hormetic; Brain and Cousens (1989)

Alternatīvi modeļi, ikru neizšķilšanās un kāpuru mirstība

- Ja nav pierādījumu par ekstrabinominālo mainību un modeļa pielāgošanā tiek aplēsta kontroles incidence, minēto atbildreakciju pieaugošos modeļus var pielāgot, izmantojot probita (vai logistiskus) modeļus. Tā nav piemērotākā metode, jo par analīzes vienību izmanto individuālu rezultātu, nevis replikātu (*Morgan* 1992, *O'Hara Hines and Lawless* 1993, *Collett* 2002, 2003).

Viena modeļa atbilstība

- Vizuāli salīdziniet katrai testējamajai koncentrācijai novēroto un paredzēto procentuālo samazinājumu (*Motulsky and Christopoulos* 2004, *Draper and Smith* 1999).

- Izmantojot F-testu, regresijas kļūdas vidējā kvadrātu salīdziniet ar tīrās kļūdas vidējā kvadrātu (*Draper and Smith* 1999).
- Pārļiecinieties, ka visi modeļa nosacījumi ir būtiski lielāki par nulli (t. i., nosakiet, vai visi modeļa nosacījumi ir svarīgi) (*Motulsky and Christopoulos* 2004).
- Regresijas atlikumu pret testējamo koncentrāciju iespējams atlikt log(konc.) skalā. Šis izkārtojums nedrīkst būt sistemātisks; punktiem ir jābūt randomizēti izkliedētiem gar horizontālo līniju nulles augstumā.
- Datu normalitāte un dispersijas viendabība ir jānovērtē tādā pašā veidā, kā minēts 5. papildinājumā
- Papildus tam ir jānovērtē regresijas modeļa atlikumu normalitāte, izmantojot tās pašas metodes, kas ir norādītas 5. papildinājumā ANOVA atlikumiem

Modeļu salīdzināšana

- Izmanto Akiake AIC_c kritērijus. Mazākas AIC_c vērtības liecina par labāku atbilstību un, ja $AIC_c(B) - AIC_c(A) \geq 10$, A modelis ir gandrīz noteikti labāks, nekā B modelis (*Motulsky and Christopoulos* (2004)).
- Salīdziniet abus modeļus vizuāli, pārbaudot, cik labi tie atbilst iepriekš minētajiem viena modeļa kritērijiem.
- Ir ieteicams pielietot taupības principu, proti, izmantot visvienkāršāko modeli, kas pietiekami atbilst datiem (*Ratkowsky* 1993, *Lyles et al.* 2008).

EC_x aplēses kvalitāte

EC_x ticamības intervāls (CI) nedrīkst būt pārāk liels. Lai lemtu, cik liels var būt ticamības intervāls, lai EC_x vēl būtu izmantojams, jāspriež statistiski. Ikru šķīšanās un izmēru datiem pielāgotu regresijas modeļu simulāciju dati rāda, ka EC_x ($x = 10, 20$ vai 30) ar ticamības intervālu apmēram 75 % neaptver vairāk kā divas testējamās koncentrācijas. Tāds ir vispārīgs norādījums par pieņemamību, kā arī praktisks norādījums par to, kāds rezultāts ir sasniedzams. Daudzi autori apgalvo, ka ziņojumā jāatspoguļo visu modeļa parametru ticamības intervāli, un ka lieli parametru ticamības intervāli liecina par modeļu nepieņemamību (*Ott and Longnecker* 2008, *Alvord and Rossio* 1993, *Motulsky and Christopoulos* 2004, *Lyles et al.* 2008, *Seber and Wild* 2003, *Bunke et al.* 1999, *Environment Canada* 2005).

EC_x ticamības intervāls (vai jebkurš cits modeļa parametrs) nedrīkst būt nulle (*Motulsky and Christopoulos* 2004). Šī regresija atbilst minimālajai būtiskajai starpībai, kas bieži tiek minētas hipotēžu pārbaudes pieejās (piemēram, *Wang et al.* 2000). Tas atbilst arī gadījumam, kur LOEC atbildreakciju vidējo aritmētisko vērtību ticamības intervālā nav kontroles vidējās vērtības. Jāapsver, vai parametra aplēses ir zinātniski iespējamas. Piemēram, ja y_0 ticamības intervāls ir ± 20 %, nav ticama neviena EC_{10} aplēse. Ja modelis koncentrācijā C paredz 20 % ietekmi un C un zemākās koncentrācijas maksimālā novērotā ietekme ir 10 %, tad EC_{20} nav ticama (*Motulsky and Christopoulos* 2004, *Wang et al.* 2000, *Environment Canada* 2005).

Lai iegūtu EC_x , vajadzētu iztikt bez ekstrapolācijas ārpus pozitīvo koncentrāciju intervāla (*Draper and Smith* 1999, *OECD* 2006). Piemēram, vispārīgos norādījumos var noteikt, ka EC_x nedrīkst būt vairāk kā par 25 % zemāka par zemāko testēto koncentrāciju vai par 25 % pārsniegt augstāko testēto koncentrāciju.

ATSAUCES

Alvord, W.G., Rossio, J.L. (1993); Determining confidence limits for drug potency in immunoassay, *Journal of Immunological Methods* 157, 155-163.

Brain P. and Cousens R. (1989); An equation to describe dose responses where there is stimulation of growth at low doses. *Weed res.* 29: 93-96.

Bunke, O., Droge, B. and Polzehl, J. (1999). Model selection, transformations and variance estimation in nonlinear regression. *Statistics* 33, 197-240.

Collett, D. (2002); *Modelling Binary Data*, second edition, Chapman and Hall, London.

Collett, D. (2003); *Modelling Survival Data in Medical Research*, second edition, Chapman and Hall, London.

Draper, N.R. and Smith, H. (1999); *Applied Regression Analysis*, third edition. New York: John Wiley & Sons.

Environment Canada (2005); *Guidance Document on Statistical Methods for Environmental Toxicity Tests*, Report EPS 1/RM/46

Huet, S., A. Bouvier, M.-A. Poursat, E. Jolivet (2003); *Statistical Tools for Nonlinear Regression: A Practical Guide with S-PLUS and R Examples*, Springer Series in Statistics, New York.

Lyles, R. H., C. Poindexter, A. Evans, M. Brown, and C.R. Cooper (2008); Nonlinear Model-Based Estimates of IC50 for Studies Involving Continuous Therapeutic Dose-Response Data, *Contemp Clin Trials*. 2008 November; 29(6): 878–886.

Morgan, B.J.T. (1992); *Analysis of Quantal Response Data*, Chapman and Hall, London.

Motulsky, H., A. Christopoulos (2004); *Fitting Models to Biological Data Using Linear and Nonlinear Regression: A Practical Guide to Curve Fitting*, Oxford University Press, USA.

O'Hara Hines, R. J. and J. F. Lawless (1993); *Modelling Overdispersion in Toxicological Mortality Data Grouped over Time*, *Biometrics* Vol. 49, pp. 107-121

OECD (2006); *Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: A guidance to application*. Series Testing and Assessment, No. 54, Organisation for Economic Co-operation and Development, OECD, Paris.

Ott, R.L., M.T. Longnecker, *An Introduction to Statistical Methods and Data Analysis*, sixth edition, 2008, Brooks-Cole, Belmont, CA

Ratkowsky, D.A. (1993); Principles of nonlinear regression, *Journal of Industrial Microbiology* 12, 195-199.

Seber, G.A.F., C.J. Wild, *Nonlinear Regression*, Wiley, 2003

Slob W. (2002); Dose-response modelling of continuous endpoints. *Toxicol. Sci.*, 66, 298-312

Wang, Q., D.L. Denton, and R. Shukla (2000); Applications and Statistical Properties Of Minimum Significant Difference-Based Criterion Testing In a Toxicity Testing Program, *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 19, pp. 113–117, 2000.

C.48. Īsaiss zivju vairošanās tests

IEVADS

1. Šī testēšanas metode ir līdzvērtīga ESAO testēšanas vadlīnijai 229 (2012). Nepieciešamība izstrādāt un validēt zivju testu, ar kuru nosaka endokrīni aktīvas ķīmikālijas, izriet no apsvērumiem, ka ķīmikāliju līmeņi vidē, šīm ķīmikālijām mijiedarbojoties ar cilvēku un savvaļas dzīvnieku endokrīno sistēmu, var šo sistēmu negatīvi ietekmēt. ESAO 1998. gadā uzsāka prioritāru rīcību, lai pārskatītu esošos norādījumus par potenciālu endokrīnās sistēmas traucējumu izraisītāju noteikšanu un testēšanu un izstrādātu jaunus. Viens no rīcības elementiem bija izstrādāt testēšanas norādījumus, kā noteikt ķīmikālijas ar aktīvu iedarbību uz zivju sugu endokrīno sistēmu. Zivju vairošanās īsaiss tests tika pārbaudīts visaptverošā validācijas programmā, kurā īstenoja starplaboratoriju salīdzinošos pētījumus ar attiecīgām ķīmikālijām, lai pierādītu, ka tests, kurā detektē ķīmikālijas, kas ietekmē zivju vairošanos ar dažādu mehānismu, tostarp endokrīnās sistēmas mehānismu, starpniecību, ir atbilstīgs un ticams. Visi ESAO testēšanas norādījumu beigupunkti ir validēti melngalvas mailītēm, un daļa beigupunktu ir validēti Japānas medakai (t. i., vitelogenīns un sekundārās dzimum pazīmes) un zebrzivij (t. i., vitelogenīns). Validācijas darbu ir zinātniski recenzējuši gan ekspertu grupa, kurus izraudzījušies ESAO Testēšanas vadlīnijas programmas (6) izstrādes nacionālie koordinatori, gan neatkarīgu ekspertu grupa, kurus šim darbam norīkojusi Amerikas Savienoto Valstu Vides aizsardzības aģentūra (29). Tests nav izstrādāts tā, lai ar to noteiktu hormonālo traucējumu specifiskos mehānismus, jo testa dzīvniekiem nav skarta hipotalāma-hipofīzes-gonādu (HPG) ass, tāpēc reaģēšana uz ķīmikālijām, kas iedarbojas uz hipotalāma-hipofīzes-gonādu asi, var notikt dažādos līmeņos.
2. Šī testēšanas metode apraksta *in vivo* skrīninga testu, kurā dzimumgatavību sasniegušus zivju tēviņus un nārstojošas mātītes tur kopā un ierobežotā dzīves cikla daļā (21 diena) eksponē kādai ķīmikālijai. Pēc 21 dienas eksponēšanas perioda mātītēm un tēviņiem mēra divus biomarkieru beigupunktus, kas ir testējamās ķīmikālijas endokrīnās iedarbības vai androgēniskās iedarbības rādītāji; šie beigupunkti ir vitelogenīns un sekundārās dzimum pazīmes. Vitelogenīnu mēra melngalvas mailītei, Japānas medakai un zebrzivij, savukārt sekundārās dzimum pazīmes mēra melngalvas mailītei un Japānas medakai. Turklāt katru dienu visa testa laikā uzrauga kvantitatīvo auglību. Gonādas saglabā un histopatoloģiju var novērtēt arī, lai izvērtētu testa dzīvnieku reproduktīvo veselību un pastiprinātu citu beigupunktu rezultātu svarīgumu.
3. Biotestu izmanto kā vairošanās *in vivo* skrīninga testu, un tā izmantošana jāskata kopā ar "OECD Conceptual Framework for the Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals" (30). Šajā konceptuālajā pamatdokumentā zivju vairošanās īsaiss tests ir ieteikts 3. līmenī kā *in vivo* tests, kas sniedz datus par izvēlēto(-ajiem) endokrīno (-ajiem) mehānismu(-iem)/ceļu(-iem).

SĀKOTNĒJIE APSVĒRUMI UN IEROBEŽOJUMI

4. Vitelogenīns (VTG) parasti veidojas oldējēju mugurkaulnieku mātišu aknās atbildreakcijā uz organismā cirkulējošo endogēno estrogēnu. Tas ir olas dzeltenuma proteīnu prekursors, kas izstrādājas aknās un pa asinsrites sistēmu nonāk olnīcās, kur to uzņem un modificē attīstošās olšūnas. Nenobriedušu zivju mātišu un tēviņu plazmā vitelogenīns gandrīz nav detektējams, jo organismā pietiekamā daudzumā nav cirkulējoša estrogēna, tomēr aknas vitelogenīnu spēj sintetēt un izdalīt, reaģējot uz eksogēnu estrogēnisku stimulāciju.
5. Vitelogenīna mērījumus izmanto, lai detektētu ķīmikālijas ar dažādiem estrogēniskās iedarbības veidiem. Estrogēniskās iedarbības ķīmikālijas var detektēt, mērot zivju tēviņu organismā inducējušos vitelogenīnu, un tas plaši dokumentēts zinātniski recenzētos izdevumos (piemēram, (7)). Vitelogenīna inducēšanās novērota arī pēc eksponēšanas aromatizējamiem androgēniem (8, 9). Zivju mātišu organismā cirkulējošā estrogēna līmeņa pazemināšanās, piemēram, inhibējot aromatāzi, kas endogēno androgēnu pārvērš dabiskā estrogēnā 17 β -estradiolā, samazina VTG līmeni, un pēc tā var noteikt aromatāzi inhibējošas ķīmikālijas (10, 11). Bioloģiskā nozīme, kas piemīt vitelogenīna atbildreakcijai uz estrogēnu vai aromatāzes inhibēšanu, ir pierādīta un plaši dokumentēta. Tomēr VTG izstrādāšanos zivju mātišu organismā var ietekmēt vispārējais toksiskums un neendokrīna veida toksiska iedarbība, piemēram, hepatotoksiskums.

6. Sekmīgi izstrādātas un standartizētas ir vairākas plaši izmantojamas mērīšanas metodes. Viens no piemēriem ir katrai sugai specifiskas imūnfermentatīvās analīzes (*ELISA*) metodes, kurās no atsevišķām zivīm ņemtos nelielos asins vai aknu paraugos imūnkīmiskā analīzē kvantitatīvi novērtē VTG izstrādāšanos (12, 13, 14, 15, 16, 17, 18). VTG mērījumiem izmanto melngalvas mailītes asinis, zebrzivs asinis vai galvas/astes homogenātu un Japānas medakas aknas. Japānas medakai konstatēta laba korelācija starp VTG mērījumiem asinīs un aknās (19). 6. papildinājumā sniegta ieteicamā paraugu ņemšanas kārtība VTG analīzei. Komplekti VTG mērījumu veikšanai ir plaši pieejami; šo komplektu pamatā jābūt validētai katrai sugai specifiskai *ELISA* metodei.
7. Atsevišķu zivju sugu tēviņu sekundārās dzimum pazīmes ir ārēji redzamas, kvantitatīvi novērtējamas un jutīgas pret organismā cirkulējošo endogēno androgēnu līmeni; tas attiecas uz melngalvas mailīti un Japānas medaku, taču neattiecas uz zebrzivi, kam kvantitatīvi novērtējamas sekundārās dzimum pazīmes nav novērojamas. Mātītēm, kas eksponētas ūdenī esošām androgēniskām ķīmikālijām, var attīstīties tēviņu sekundārās dzimum pazīmes. Zinātniskajā literatūrā ir vairāki pētījumi, kuros attiecībā uz melngalvas mailīti (20) un Japānas medaku (21) dokumentēta šāda reakcija. Interpretējot tēviņu sekundāro dzimum pazīmju izpausmju samazināšanos, sakarā ar zemo statistisko ticamību jāsaģlabā piesardzība, un jāņem vērā ekspertu viedoklis un pierādījumu svars. Zebrzivs izmantošana šajā testā ir ierobežota sakarā ar to, ka tai nav kvantitatīvi novērtējamu sekundāro dzimum pazīmju, kas reaģētu uz androgēniskas iedarbības ķīmikālijām.
8. Galvenais rādītājs, kas liecina par melngalvas mailītes eksponēšanu eksogēnam androgēnam, ir kārpīņu skaits uz zivju mātītes purna. Japānas medakai galvenais rādītājs, kas liecina par eksogēnu eksponēšanu androgēniskām ķīmikālijām, ir kārpīņveida izaugumu skaits zivju mātītēm. 5A papildinājumā un 5A papildinājumā norādītas procedūras, saskaņā ar kurām ieteicams izvērtēt attiecīgi melngalvas mailītes un Japānas medakas dzimum pazīmes.
9. Zivju 21 dienas tests ietver kvantitatīvu ikru veidošanās novērtējumu un gonādu saglabāšanu neobligātai histopatoloģiskai izpētei. Dažas pārvaldes iestādes var pieprasīt šo papildu beigupunktu, lai pilnīgāk izvērtētu testa dzīvnieku reprodiktīvo veselību, vai gadījumos, kur vitelogenīna un sekundāro dzimum pazīmju raksturojums neatbilst ķīmiskajai ekspozīcijai. Lai gan daži beigupunkti var būt stipri diagnosticējoši (piemēram, VTG inducēšanās tēviņiem un kārpīņu veidošanās mātītēm), ne visi beigupunkti (piemēram, auglība un gonādu histopatoloģija) testā paredzēti, lai viennozīmīgi identificētu specifiskus šūnu darbības mehānismus. Drīzāk beigupunktu komplekts, kopumā ņemot, ļauj izdarīt pieņēmumus attiecībā uz iespējamiem endokrīniem traucējumiem un tādējādi sniegt norādes turpmākai testēšanai. Lai gan auglība tieši neattiecas uz endokrīno sistēmu, ņemot vērā tās jutību uz zināmajām endokrīni aktīvajām ķīmikālijām (5), tā ir svarīgs iekļaujams beigupunkts, jo ja tā un citi beigupunkti netiek ietekmēti, ir skaidrs, ka savienojums visticamāk nav endokrīni aktīvs. Tomēr, ja auglība ir ietekmēta, tas nopietni ietekmēs pierādījumu svāra izvedumus. Norādes par datu interpretēšanu un testa rezultātu pieņemšanu sniegtas turpmāk šīs testa metodes aprakstā.
10. Šajā testa metodē minētās definīcijas ir minētas 1. papildinājumā.

TESTĒŠANAS PRINCIPS

11. Testēšanas laikā reprodiktīvā attīstības posmā esošus zivju tēviņus un mātītes kopā eksponē testēšanas traukos. Tā kā dzīvnieki ir pieauguši un reprodiktīvā attīstības posmā, iespējams skaidri atšķirt dzimumus un visus beigupunktus analizēt dzimuma griezumā, un tas arī garantē jutību pret eksogēnām ķīmikālijām. Dzimumu apstiprina testa nobeigumā makroskopiskā gonādu izmeklēšanā, kurā ar šķērēm atver vēdera apvidu. Pārskats par būtiskajiem biotesta nosacījumiem sniegts 2. papildinājumā. Testu parasti veic ar zivīm no nārstojošas populācijas; neizmanto dzīvniekus no novecojošām populācijām. Norādījumi par zivju vecumu un

reproduktīvo statusu sniegti iedaļā par zivju izraudzīšanos. Testu veic ar trim ķīmiskās ekspozīcijas koncentrācijām, un, ja nepieciešams, nodrošina ūdens un šķīdinātāja kontrolgrupas. Katrā zebrzivis apstrādē izmanto divus traukus jeb replikātus (katrā traukā 5 tēviņi un 5 mātītes). Katrā melngalvas mailītes apstrādē izmanto četrus traukus jeb replikātus (katrā traukā 2 tēviņi un 4 mātītes). Tas nepieciešams, lai pielāgotos melngalvas mailītes tēviņu teritoriālajai uzvedībai, vienlaikus saglabājot pietiekamu testa jaudu. Katrā medakas apstrādē izmanto četrus traukus jeb replikātus (katrā traukā 3 tēviņi un 3 mātītes). Ekspozīcijas ilgums ir 21 diena, un zivju paraugus ņem ekspozīcijas 21. dienā. Kvantitatīvo auglību uzrauga katru dienu.

12. Ņemot paraugus 21. dienā, visus dzīvniekus humāni nonāvē. Melngalvas mailītei un Japānas medakai mēra sekundārās dzimum pazīmes (sk. 5.A papildinājumu un 5.B papildinājumu); VTG noteikšanai zebrzivis un melngalvas mailītes organismā ievāc asins paraugus, lai gan VTG zebrzivis organismā var noteikt arī ar galvas/astes paraugiem (6. papildinājums); Japānas medakas VTG analīzē izmanto aknu paraugus (6. papildinājums); potenciālai histopatoloģiskai izvērtēšanai ar fiksatoru apstrādā vai nu veselas vai preparētas gonādas (22).

TESTA PIEŅEMAMĪBAS KRITĒRIJI

13. Lai testa rezultāti būtu pieņemami, jāizpilda šādi kritēriji:

- ekspozīcijas perioda beigās mirstība ūdens (vai šķīdinātāja) kontrolgrupā nepārsniedz 10 procentus;
- izšķīdušā skābekļa koncentrācijai visā ekspozīcijas periodā jābūt vismaz 60 procentiem no gaisa piesātinājuma vērtības;
- ūdens temperatūras atšķirība starp testēšanas tvertnēm nevienā ekspozīcijas perioda brīdī nepārsniedz $\pm 1,5$ °C, un testa sugām norādītajos temperatūras diapazonos (2. papildinājums) to uztur 2°C svārstību diapazonā;
- ir pieejami dati, kas liecina, ka testējamās ķīmikālijas koncentrācija šķīdumā ir uzturēta vidējo izmērīto vērtību diapazonā ± 20 %;
- ir pieejami dati, ka visos replikātos pirms to ekspozīcijas ķīmikālijai un kontroles replikātos testa laikā zivis aktīvi nārsto.

METODES APRAKSTS

Aparatūra

14. Parastais laboratorijas aprīkojums, jo īpaši:

- a. skābekļa un pH mērīšanas iekārtas;
- b. aprīkojums ūdens cietības un sārmainības noteikšanai;
- c. attiecīgs aprīkojums temperatūras regulēšanai un, vēlams, nepārtrauktai uzraudzībai;
- d. ķīmiski inerta materiāla tvertnes ar piemērotu ietilpību attiecībā uz ieteicamo noslogojumu un apdzīvotības blīvumu (sk. 2. papildinājumu);
- e. melngalvas mailītes un zebrzivis nārsta substrāts, nepieciešamā informācija sniegta 4. papildinājumā;
- f. pietiekami precīzi svari (t. i., ar precizitāti $\pm 0,5$ mg).

Ūdens

15. Par testa ūdeni var izmantot jebkādu ūdeni, kurā testa sugas uzrāda pietiekamu ilgtermiņa izdzīvotību un augšanu. Tā kvalitātei testa laikā jābūt nemainīgai. Ūdens pH jābūt diapazonā no 6,5 līdz 8,5, bet konkrētā testā tam jābūt $\pm 0,5$ pH vienību diapazonā. Lai nodrošinātu, ka atšķaidīšanas ūdens pārāk neietekmē testa rezultātu (piemēram, kompleksējoties ar testējamo ķimikāliju), paraugus tā analīzei ņem ar noteiktiem starplaikiem. Smago metālu (piemēram, Cu, Pb, Zn, Hg, Cd un Ni), galveno anjonu un katjonu (piemēram, Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , K^+ , Cl^- , un SO_4^{2-}), pesticīdu (piemēram, kopējo fosfororganisko pesticīdu un kopējo hlororganisko pesticīdu), kopējā organiskā oglekļa un suspendētu cietu vielu mērījumi, piemēram, jāizdara reizi trijos mēnešos, ja ir zināms, ka atšķaidīšanas ūdens kvalitāte ir relatīvi nemainīga. Ja ir pierādīts, ka vismaz viena gada laikā ūdens kvalitāte ir nemainīga, noteikšanu var veikt retāk un starplaiki var būt garāki (piemēram, reizi sešos mēnešos). Daži pieņemama atšķaidīšanas ūdens ķīmiskie parametri ir norādīti 3. papildinājumā.

Testa šķīdumi

16. Izraudzītās koncentrācijas testa šķīdumus parasti gatavo, atšķaidot izejšķīdumu. Izejšķīdumu vēlams pagatavot, testējamo ķimikāliju atšķaidīšanas ūdenī vienkārši iemaisot vai tajā iejaucot ar mehāniskiem līdzekļiem (piemēram, kratīšana vai apstrāde ar ultraskaņu). Piemērotas koncentrācijas izejšķīduma iegūšanai var izmantot piesātināšanas kolonnas (šķīdības kolonnas). Nav ieteicams par nesējvielu izmantot šķīdinātāju. Tomēr, ja šķīdinātājs ir nepieciešams, vienlaikus nodrošina šķīdinātāja kontrolgrupu, kurai šķīdinātāja koncentrācija ir tāda pati kā grupām, ko apstrādā ar ķimikāliju. Grūti testējamām ķimikālijām tehniski labākais risinājums var būt šķīdinātājs; sk. ESAO norādījumu dokumentu par ūdenstoksiskuma testēšanu grūti testējamām vielām un maisījumiem (23). Šķīdinātāju izraugās atkarībā no vielas vai maisījuma ķīmiskajām īpašībām. Jāievēro ESAO norādījumu dokumentā ieteiktā maksimālā koncentrācija 100 $\mu\text{l/l}$. Tomēr nesen publicētā pārskatā (24) pausti papildu apsvērumi attiecībā uz šķīdinātāju izmantošanu endokrīnās sistēmas darbības testēšanā. Tāpēc, ja nepieciešams, tehniski pamatotās situācijās šķīdinātāja koncentrāciju samazina līdz minimumam (atkarībā no testējamās ķimikālijas fizikālķīmiskajām īpašībām).
17. Testēšanā izmanto caurplūdes sistēmu. Šāda sistēma (piemēram, dozējošais sūknis, proporcionālas atšķaidīšanas ierīce, piesātinātāja sistēma) nepārtraukti piegādā un atšķaida testējamās ķimikālijas izejšķīdumu, lai testēšanas tvertnēs nodrošinātu nemainīgu koncentrāciju. Izejšķīdumu un atšķaidīšanas ūdens caurplūdums testa laikā jāpārbauda noteiktos intervālos, vēlams, katru dienu, un testa laikā tas nedrīkst mainīties vairāk kā par 10 %. Jāraugās, lai neizmantoju nekvalitatīvas plastmasas caurules vai citus materiālus, kas satur bioloģiski aktīvas ķimikālijas. Izraugoties caurplūdes sistēmas materiālu, jāņem vērā testējamās ķimikālijas iespējama adsorbēcija uz šā materiāla.

Zivju turēšana

18. Testa zivis izvēlas no laboratorijas populācijas, vēlams, no viena bara, kas vismaz divas nedēļas pirms testa ir aklimatizējies tādos pašos ūdens kvalitātes un apgaismojuma apstākļos kā testa apstākļi. Svarīgi, lai noslogojums un apdzīvotības blīvums (definīcijas sk. 1. papildinājumā) būtu izmantotajai testa sugai piemēroti (sk. 2. papildinājumu).
19. Pēc 48 stundu sākumposma reģistrē mirstību un piemēro šādus kritērijus:
- mirstība septiņās dienās pārsniedz 10 % no populācijas: grupu tālākai testēšanai neizmanto;
 - mirstība ir no 5 % līdz 10 % no populācijas: grupu aklimatizē vēl septiņas dienas; ja mirstība otru septiņu dienu laikā pārsniedz 5 %, grupu tālākai testēšanai neizmanto;
 - mirstība septiņās dienās ir mazāka par 5 % no populācijas: grupu pieņem.
20. Aklimatizācijas laikā, pirmsekspozīcijas un ekspozīcijas periodā zivis nedrīkst medikamentozi ārstēt.

Pirmsekspozīcijas periods un zivju izraudzīšanās

21. Ieteicams vienas līdz divu nedēļu pirmsekspozīcijas periods, kurā zivis tādos pašos traukos kā testēšanas trauki. Zivis visā turēšanas laikā un ekspozīcijas fāzē baro *ad libitum*. Ekspozīcijas fāzi sāk ar aktīvi nārstojošām pieaugušām zivīm, kurām ir skaidri izteiktas dzimumatšķirības un kuras izraudzītas no reproduktīvi nobriedušiem laboratorijas dzīvniekiem (piemēram, ja testē melngalvas mailīti un medaku – ar skaidri redzamām sekundārajām dzimumpazīmēm). Tikai vispārīgu norādījumu līmenī (šos norādījumus nedrīkst izvērtēt atrauti no attiecīgās zivju grupas faktiskā reproduktīvā statusa) melngalvas mailītēm jābūt aptuveni 20 (± 2) nedēļas vecām, pieņemot, ka tās visā dzīves ciklā audzētas 25 ± 2 °C temperatūrā. Japānas medakām jābūt aptuveni 16 (± 2) nedēļas vecām, pieņemot, ka tās visā dzīves ciklā audzētas 25 ± 2 °C temperatūrā. Zebrzivīm jābūt aptuveni 16 (± 2) nedēļas vecām, pieņemot, ka tās visā dzīves ciklā audzētas 26 ± 2 °C temperatūrā. Ikru nēršana pirmsekspozīcijas posmā jānovērtē katru dienu. Ieteicams, lai pirms testa ekspozīcijas posma visās replikātu tvertnēs būtu novērojama nārstošana. Šajā posmā kvantitatīvas norādes par vēlamo ikru ražošanu dienā nav iespējamas, bet relatīvi parasti novēro, ka katrai sugai vidējais iznērtais daudzums ir > 10 ikri uz vienu mātīti dienā. Sadalot replikātus dažādajiem eksperimenta līmeņiem, jāizmanto attiecībā pret ikru ražošanas rezultātiem randomizēti izvietotu bloku plāns, lai būtu nodrošināts sabalansēts replikātu sadalījums.

TESTĒŠANAS PLĀNS

22. Izmanto trīs testējamās ķīmikālijas koncentrācijas, vienu kontrolgrupu (ūdens) un, ja nepieciešams, vienu šķīdinātāja kontrolgrupu. Šos datus var analizēt, lai noteiktu, vai starp apstrādes grupu un kontrolgrupu rezultātiem ir vērojamas statistiski būtiskas atšķirības. Šo analīžu mērķis nav tās izmantot riska novērtēšanā (25), bet gan gūt informāciju par to, vai jāturpina testēt ķīmikālijas kaitīgā ietekme (t. i., attiecībā uz izdzīvotību, attīstību, augšanu un vairošanos).
23. Attiecībā uz zebrzivi eksperimenta 21. dienā no katra apstrādes līmeņa un no kontrolgrupas(-ām) paraugam ņem tēviņus un mātītes (5 tēviņus un 5 mātītes no katra no abiem replikātiem), kam mēra vitelogenīnu. Attiecībā uz medaku eksperimenta 21. dienā no katra apstrādes līmeņa un no kontrolgrupas(-ām) paraugam ņem tēviņus un mātītes (3 tēviņus un 3 mātītes no katra no četriem replikātiem), kam mēra vitelogenīnu un sekundārās dzimumpazīmes. Attiecībā uz melngalvas mailīti ekspozīcijas 21. dienā paraugam ņem tēviņus un mātītes (2 tēviņus un 4 mātītes no katra no četriem replikātiem), arī no kontrolgrupas(-ām), un tiem mēra vitelogenīnu un sekundārās dzimumpazīmes. Kvantitatīvi novērtē auglību, un potenciālai histopatoloģiskai izvērtēšanai ar fiksatoru apstrādā vai nu veselas vai preparētas gonādas.

Testējamo koncentrāciju izvēle

24. Šā testa vajadzībām augstākā testējamās ķīmikālijas koncentrācija ir vai nu diapazona noteikšanā, vai no citiem toksiskuma datiem konstatētā maksimāli pieļaujamā koncentrācija (turpmāk "MPK"), 10 mg/l, vai maksimālā šķīdība ūdenī — atkarībā no tā, kurš no šiem rādītājiem ir zemākais. MPK definē kā augstāko ķīmikālijas testējamo koncentrāciju, kuras izraisītā mirstība nesasniedz 10 %. Šīs pieejas izmantošanai ir nepieciešami jau pieejami empīriski dati par akūto toksiskumu vai citi toksiskuma dati, ar kuriem iespējams noteikt MPK. MPK aplēšana var būt neprecīza, un parasti ir nepieciešams profesionāls viedoklis.
25. Ir nepieciešamas trīs testējamās koncentrācijas, kuras šķir nemainīgs koeficients, kas nepārsniedz 10, un atšķaidīšanas ūdens kontrole (un, ja vajadzīgs, šķīdinātāja kontrole). Ieteicamie atstatuma koeficienti ir no 3,2 līdz 10.

PROCEDŪRA

Testa zivju izraudzīšanās un svēršana

26. Ir svarīgi testa sākumā līdz minimumam samazināt zivju svara atšķirības. Piemērots izmēru diapazons dažādām sugām, ko ieteicams izmantot šajā testā, ir norādīts 2. papildinājumā. Visās testēšanā izmantoto zivju grupās katra atsevišķā zivju tēviņa un mātītes svara diapazons testa sākumā, ja iespējams, nepārsniedz $\pm 20\%$ no attiecīgā dzimuma vidējā aritmētiskā svara. Ieteicams pirms testēšanas nosvērt apakšparaugu no kopējā zivju parauga, lai novērtētu vidējo svaru.

Ekspozīcijas apstākļi*Ilgums*

27. Testa ilgums ir 21 diena pēc pirmsekspozīcijas perioda. Ieteicamais pirmsekspozīcijas periods ir viena līdz divas nedēļas.

Barošana

28. Zivis *ad libitum* baro ar piemērotu barību (2. papildinājums) pietiekamā daudzumā, lai uzturētu ķermeņa stāvokli. Jāraugās, lai nepieļautu mikrobu augšanu un ūdens duļķainību. Vispārīgs ieteikums ir dienas barības devu sadalīt divās vai trīs vienādās daļās un dienā zivīm izbarot vairākās reizēs ar vismaz triju stundu starplaiku. Ir pieņemama viena lielāka dienas deva, jo īpaši nedēļas nogalēs. 12 stundas pirms paraugu ņemšanas vai autopsijas zivis nebaro.
29. Izvērtē, vai zivju barībā nav kontaminantu, piemēram, hlororganisko pesticīdu, policiklisko aromātisko ogļūdeņražu (turpmāk "PAO") un polihlorbifenilu (turpmāk "PHB"). Jāizvairās no barības ar paaugstinātu fitoestrogēnu līmeni, kas testā varētu ietekmēt atbildreakciju uz zināmu estrogēnu agonistu (piemēram, 17-betastradiolu).
30. Neapstā barība un fekālijas no testēšanas traukiem jāizņem vismaz divas reizes nedēļā, piemēram, katras tvertnes apakšdaļa rūpīgi jāiztīra, izmantojot sifonu.

Gaisma un temperatūra

31. Fotoperiods un ūdens temperatūra jāpielāgo testa sugai (sk. 2. papildinājumu).

Analītisko noteikšanu un mērījumu biežums

32. Pirms ekspozīcijas perioda sākuma jānodrošina pareiza ķīmikālijas piegādes sistēmas darbība. Jābūt apzinātām visām nepieciešamajām analītiskajām metodēm, nepieciešamas arī pietiekamas zināšanas par ķīmisko stabilitāti testa sistēmā. Testa laikā testējamās ķīmikālijas koncentrācijas nosaka šādos regulāros starplaikos: atšķaidīšanas ūdens un izejšķiduma caurplūdumu vēlams pārbaudīt katru dienu, taču ne retāk kā divas reizes nedēļā, un testa laikā tas nedrīkst mainīties vairāk kā par 10 %. Ieteicams katrā tvertnē noteikt faktisko testējamās ķīmikālijas koncentrāciju testa sākumā un reizi nedēļā pēc tam.
33. Rezultātus ieteicams balstīt uz izmērītajām koncentrācijām. Tomēr, ja visā testa laikā šķīdumā ir uzturēta apmierinoša testējamās ķīmikālijas koncentrācija $\pm 20\%$ no nominālās koncentrācijas, rezultātu var balstīt uz nominālajām vai izmērītajām vērtībām.

34. Paraugiem var būt vajadzīga filtrēšana (piemēram, ar poru lielumu $0,45\ \mu\text{m}$) vai centrifugēšana. Vajadzības gadījumā ieteicama centrifugēšana. Tomēr arī filtrēšana var būt pieņemama, ja testēšanas materiāls neadsorbējas uz filtriem.
35. Testa laikā visos testa traukos vismaz reizi nedēļā jāmēra izšķīdušais skābeklis, temperatūra un pH. Kontrolēs un vienā augstākās koncentrācijas traukā vismaz reizi nedēļā jāmēra kopējā cietība un sārmācība. Vismaz vienā testa traukā vēlams pastāvīgi uzraudzīt temperatūru.

Novērojumi

36. Testa laikā vai pēc tā beigām novērtē vairākas vispārīgas (piemēram, izdzīvotība) un bioloģiskas atbildreakcijas (piemēram, VTG līmeņi). Katru dienu kvantitatīvi jānovēro auglība. Turpmāk aprakstīta šo beigupunktu mērīšana, izvērtēšana un lietderība.

Izdzīvošana

37. Zivis testēšanas laikā katru dienu jāapskata, jāreģistrē mirstība un nedzīvās zivis iespējami drīz jāizvāc. Nedzīvās zivis neaizstāj ne ar kontrolgrupas zivīm, ne ar zivīm no cita apstrādes trauka. Gonādu makroskopiskā izmeklēšanā nosaka testēšanas laikā mirušo zivju dzimumu.

Izturēšanās un izskats

38. Jāreģistrē jebkāda anormāla izturēšanās (salīdzinājumā ar kontrolgrupām); tās var būt vispārīgas toksiskuma pazīmes, tostarp hiperventilācija, nekoordinēta peldēšana, līdzsvara zudums un netipisks mierīgums vai barošanās. Jāreģistrē arī izskata anomālijas (piemēram, asinsizplūdumi, krāsas zaudēšana). Datu interpretēšanā šādas toksiskuma pazīmes jāvērtē uzmanīgi, jo tās var liecināt par koncentrācijām, kurās nevar paļauties uz endokrīnās sistēmas biomarkšiem. Šādos novērojumos par izturēšanos var iegūt arī noderīgu kvalitatīvu informāciju, pēc kuras noteikt turpmākas iespējamās vajadzības zivju testēšanā. Piemēram, novērots, ka androgēniskām vielām eksponēti melngalvas mailītes tēviņi vai maskulinizētas mātītes izturas teritoriāli agresīvi, savukārt zebrzivīm estrogēniskas vai antiandrogēniskas ekspozīcijas rezultātā samazinās vai kavējas ierastā pārošanās un nārstošanas aktivitāte pēc rītausmas.
39. Tā kā apiešanās var noteiktos aspektos (galvenokārt krāsa) ātri mainīt izskatu, kvalitatīvos novērojumus svarīgi veikt, pirms dzīvniekus izņem no testa sistēmas. Līdzšinējā pieredze ar melngalvas mailīti liecina, ka dažas endokrīni aktīvās ķīmikālijas sākotnēji var inducēt šādas ārējas izmaiņas: ķermeņa krāsa (gaiša vai tumša), krāsojuma struktūra (vertikālu joslu parādīšanās) un ķermeņa forma (galvas un krūšu apvidus). Tāpēc zivju izskata novērojumi jāizdara visā testēšanas laikā un pētījuma beigās.

Auglība

40. Attiecībā uz replikātiem katru dienu jāreģistrē kvantitatīvi novērojumi par nārstošanu. Attiecībā uz replikātiem jāuzskaista ikru ražošana kā ikru skaits uz vienu izdzīvojušo mātīti dienā. Ikrus no testa kamerām izņem katru dienu. Lai zivis varētu nārstot normālos apstākļos, melngalvas mailītei un zebrzivij testa kamerā ievieto nārsta substrātus. 4. papildinājumā sniegta papildu informācija par zebrzivij (4.A. papildinājums) un melngalvas mailītei (4.B. papildinājums) ieteicamajiem nārsta substrātiem. Medakai nārsta substrātu nodrošināt nav nepieciešams.

Humāna zivju nonāvēšana

41. Testa 21. dienā, t. i., beidzot ekspozīciju, zivis eitanazē ar pietiekamu daudzumu trikaīna (trikaīna metāna sulfonāts, metakaīns, MS-222 (CAS 886-86-2)), 100–500 mg/l gļotādu kairinājuma mazināšanai atšķaidot ar 300 mg/l NaHCO₃ (nātrija bikarbonāts, CAS 144-55-8); pēc tam ņem asins vai audu paraugus, lai noteiktu VTG, kā paskaidrots iedaļā par vitelogenīnu.

Sekundāro dzimumpazīmju novērtēšana

42. Dažas endokrīni aktīvas ķīmikālijas var inducēt specifiskas sekundāras dzimumpazīmju izmaiņas (melngalvas mailītes tēviņu nārsta kārpiņu skaits, Japānas medakas tēviņu kārpiņveida izaugumi). Proti, ķīmikālijas ar konkrētu iedarbības veidu var izraisīt anormālu sekundāro dzimumpazīmju parādīšanos pretējā dzimuma dzīvniekiem, piemēram, tādu androgēna receptoru agonistu kā trenbolons, metiltestosterons un dihidrotestosterons ietekmē melngalvas mailīšu mātītēm var sākt veidoties izteiktas nārsta kārpiņas vai medakas mātītēm — kārpiņveida izaugumi (11, 20, 21). Ir ziņas arī par to, ka estrogēna receptoru agonisti pieaugušiem melngalvas mailīšu tēviņiem var samazināt nārsta kārpiņu skaitu un muguras skausta segmenta lielumu (26, 27). Šādu izteiktu morfoloģisko īpatnību novērojumi var sniegt arī noderīgu kvalitatīvu un kvantitatīvu informāciju, pēc kuras noteikt turpmākas iespējamās vajadzības zivju testēšanā. Melngalvas mailītes nārsta kārpiņu skaitu un lielumu un medakas kārpiņveida izaugumu skaitu kvantitatīvi noteikt var tieši vai, praktiskāk, saglabātiem paraugiem. Melngalvas mailītes un medakas sekundāro dzimumpazīmju noteikšanai ieteicamās procedūras norādītas attiecīgi 5.A un 5.B papildinājumā.

Vitelogenīns (VTG)

43. Ar heparinizētu mikrohematokrīta kapilārcaurulīti vai kardiālās punkcijas šļirci no astes artērijas/vēnas ņem asinis. Atkarībā no zivs lieluma no vienas melngalvas mailītes parasti ņem 5 līdz 60 μ l un no zebrzivs — 5 līdz 15 μ l. Plazmu no asinīm atdala centrifugējot, un līdz VTG analīžu veikšanai, pievienojot proteāzes inhibitorus, glabā -80°C temperatūrā. Par audu avotu VTG noteikšanai var izmantot arī medakas aknas un zebrzivs galvas vai astes homogenātu (6. papildinājums). VTG mērījuma pamatā jābūt validētai homologai ELISA metodei, kurā izmanto homologu VTG standartvielu un homologas antivielas. Ieteicams izmantot metodi, ar ko ir iespējams konstatēt VTG, kura daudzums ir tikai daži ng/ml plazmā (vai ng/mg audos), kas atbilst fona līmenim testēšanā neekspozētu zivs tēviņu organismā.
44. VTG analīzes kvalitātes kontrolē izmanto standartvielas, sagataves un vismaz atkārtotas analīzes. Lai noteiktu minimālo parauga atšķaidījuma koeficientu, attiecībā uz katru ELISA metodi jātestē matricas ietekme (paraugatšķaidījuma ietekme). Katrā VTG testos izmantotā ELISA testa platē jābūt šādiem kvalitātes kontroles paraugiem: vismaz 6 kalibrācijas standarti, kas atbilst paredzamo VTG koncentrāciju diapazonam, un vismaz viens nespecifisks saistīšanās testa “tukšais paraugs” (analīzē dublikātparaugu). Absorbīcijai šajos tukšajos paraugos jābūt zemākai par 5 % no absorbīcijas, kas vērojama maksimālās kalibrācijas standartam. No katra parauga atšķaidījuma analīzē vismaz divas alikvotas (dublikātieдобes). Dublikātieдобes, kas atšķiras vairāk par 20 %, jāanalīzē atkārtoti.
45. Kalibrācijas līkņu korelācijas koeficientam (R^2) jāpārsniedz 0,99. Tomēr ar augstu korelāciju nepietiek, lai garantētu pietiekamu koncentrācijas prognozēšanu visos diapazonos. Papildus tam, ka jābūt pietiekami augstai korelācijai kalibrācijas līknē, katrai standarta koncentrācijai, ko aprēķina pēc kalibrācijas līknes, jābūt 70 līdz 120 % nominālās koncentrācijas. Ja nominālajām koncentrācijām (piemēram, zemākās koncentrācijās) ir tendence attālināties no kalibrācijas regresijas līknes, kalibrācijas līkni var būt nepieciešams sadalīt zemajā un augstajā diapazonā vai izmantot nelineāru modeli, kas pietiekami derētu absorbīcijas datiem. Ja līkni sadala, abos līknes segmentos jābūt $R^2 > 0,99$.
46. Noteikšanas robeža (LOD) ir zemākā analītiskā standarta koncentrācija, bet kvantitatīvās noteikšanas robeža (LOQ) ir zemākā analītiskā standarta koncentrācija, kas reizināta ar zemāko atšķaidījuma koeficientu.
47. Katrā VTG testu dienā analīzē stiprinātu paraugu, kas gatavots, izmantojot vairākiem testiem kopīgu references standartvielu (7. papildinājums). Prognozētās koncentrācijas un izmērītās koncentrācijas attiecību testēšanas pārskatā norāda kopā ar katra attiecīgajā dienā veiktā testu kompleksa rezultātiem.

Gonādu histopatoloģijas novērtējums

48. Pārvaldes iestādes var pieprasīt veikt gonādu histopatoloģiju, lai izpētītu HPG ass mērķorgānu pēc tā eksponēšanas ķīmikālijai. Šim nolūkam ar fiksatoru apstrādā veselas vai preparētas gonādas. Ja vajadzīga histopatoloģija, gonādā tiek meklētas specifiskas ar endokrīniem saistītas atbildreakcijas, lai būtu iespējams novērtēt testējamās ķīmikālijas endokrīno aktivitāti. Būtiskās diagnostiskās atbildreakcijas ir oocīti sēkliniekos, Leidiga šūnu hiperplāzija, samazināta dzeltenuma veidošanās, palielināts spermatogonālo šūnu daudzums un perifolikulārā hiperplāzija. Pārējiem gonādu bojājumiem, piemēram, olšūnu atrēzijai, sēklinieku deģenerācijai un attīstības izmaiņām var būt dažādi cēloņi. Norāžu dokumentā par zivju gonādu histopatoloģiju ir specificētas procedūras, kas jāizmanto gonādu secēšanā, fiksācijā, sekcijā un histopatoloģiskā novērtēšanā (22).

DATI UN TESTĒŠANAS PĀRSKATS

Biomarkieru reakcijas novērtēšana ar dispersijas analīzi (turpmāk "ANOVA")

49. Lai noteiktu ķīmikālijas iespējamo aktivitāti, dažādās apstrādes grupās un kontrolgrupās iegūtā atbildreakcija jāsalīdzina, izmantojot dispersijas analīzi (ANOVA). Ja izmanto šķīdinātāja kontrolgrupu, attiecīgu statistisku testu, kurā salīdzina atšķaidīšanas ūdens kontrolgrupu un šķīdinātāja kontrolgrupu, veic attiecībā uz katru beigupunktu. Norādījumi par to, kā ar datiem par atšķaidīšanas ūdens kontrolgrupu un šķīdinātāja kontrolgrupu jārikojas turpmākajā statistiskajā analīzē, atrodami OECD, 2006c (28). Visi bioloģiskās atbildreakcijas dati jāanalizē un testēšanas pārskatā jāiekļauj par katru dzimumu atsevišķi. Ja neizpildās parametriskajām metodēm vajadzīgie pieņēmumi – dati neatbilst normālsadalījumam (piemēram, Šapiro-Vilka tests) vai ir vērojama heterogēna dispersija (Bartleta tests vai Lēvena tests), jāapsver, vai pirms ANOVA veikšanas dati nebūtu jāpārveido tā, lai dispersijas homogenizētu, vai varbūt jāveic svērtā ANOVA. Devas un atbildreakcijas nemonotonas sakarības gadījumā var izmantot Daneta (parametrisko) testu, kurā salīdzina vairākus pārus, vai Manna-Vitnija testu ar Bonferoni (neparametrisku) korekciju. Ja devas un atbildreakcijas sakarība ir aptuveni monotona, var izmantot citus statistiskos testus (piemēram, Džonkhīra-Terpstra testu vai Viljamsa testu). Lai būtu vieglāk lemt, kurš statistiskais tests būtu vispiemērotākais, 8. papildinājumā sniegta statistiska diagramma. Papildu informācija pieejama arī ESAO "Document on Current Approaches to Statistical Analysis of Ecotoxicity Data" (28).

Ziņojums par testa rezultātiem

50. Pētījuma rezultātos ietilpst:

Testēšanas laboratorija:

- atbildīgie darbinieki un viņu pienākumi pētījumā,
- katra laboratorija ir pierādījusi kvalifikāciju, izmantojot vairākas reprezentatīvas ķīmikālijas.

Testējamā ķīmikālija:

- testējamās ķīmikālijas īpašības,
- fizikālais stāvoklis un attiecīgās fizikālķīmiskās īpašības,
- testējamo koncentrāciju pagatavošanas metode un biežums;
- informācija par stabilitāti un bionoārdāmību.

Šķīdinātājs:

- šķīdinātāja raksturojums (veids, izmantotā koncentrācija);
- šķīdinātāja izraudzīšanās pamatojums (ja šķīdinātājs nav ūdens).

Testa dzīvnieki:

- sugas un līnija;
- piegādātājs un konkrētā piegādātājiestāde,
- zivju vecums testa sākumā un reproduktīvais/nārstošanas statuss;
- dati par dzīvnieku aklimatizācijas procedūru;
- zivju ķermeņa svars ekspozīcijas sākumā (zivju parauga apakšparaugs).

Testēšanas apstākļi:

- izmantotā testa metode (testa tips, noslogojums, apdzīvotības blīvums u. c.);
- izejšķidumu pagatavošanas metode un caurplūdes;
- nominālās testējamās koncentrācijas, iknedēļas izmērītās testa šķidumu koncentrācijas un izmantotā analīzes metode, mērījumu vidējās vērtības un standartnovirzes testa traukos un pierādījumi tam, ka mērījumi raksturo testējamās ķīmikālijas koncentrācijas īstā šķīdumā;
- atšķaidīšanas ūdens īpašības (tostarp pH, cietība, sārmainība, temperatūra, izšķīdušā skābekļa koncentrācija, atlikušā hlora līmenis, kopējais organiskais ogleklis, suspendētas cietās daļiņas un citi veiktie mērījumi);
- ūdens kvalitāte testa traukos: pH, cietība, temperatūra un izšķīdušā skābekļa koncentrācija,
- detalizēta informācija par barošanu (piemēram, barības(-u) veids(-i), avots, izbarotais daudzums un barošanas biežums, kā arī attiecīgo piesārņotāju (piemēram, PHB, PAO un hlororganisko pesticīdu) analīzes, ja tādas ir veiktas)

Rezultāti

- apliecinājums, ka kontrolgrupas atbildušas testa pieņemamības kritērijiem;
- dati par mirstību ar jebkuru no testējamajām koncentrācijām un kontrolgrupās;
- izmantotās statistiskās analīzes metodes, datu apstrāde un izmantoto metožu pamatojums;
- bioloģisko novērojumu dati par morfoloģiskajām pazīmēm, arī par sekundārajām dzimumpazīmēm, ikru nēršanu un VTG;
- datu analīzes rezultāti, ieteicams — tabulu un grafiku veidā;
- novērojumi par zivju neraksturīgu izturēšanos un jebkāda redzama testējamās ķīmikālijas izraisīta ietekme.

NORĀDĪJUMI PAR TESTA REZULTĀTU INTERPRETĀCIJU UN PIEŅEMAMĪBU

51. Šajā iedaļā sniegti dažī apsvērumi, kas jāņem vērā testa rezultātu interpretēšanā attiecībā uz dažādajiem mērītajiem beigupunktiem. Ja rezultāti liecina, ka testējamā ķīmikālija izraisa acīmredzamu toksiskumu vai ietekmē testa dzīvnieka vispārīgo stāvokli, tie jāinterpretē piesardzīgi.
52. Nosakot testējamās ķīmikālijas koncentrāciju diapazonu, jāraugās, lai netiktu pārsniegta maksimālā pieļaujamā koncentrācija, pie kuras iespējama jēgpilna datu interpretācija. Ir svarīgi veikt vismaz vienu apstrādi, kurā testējamās ķīmikālijas toksiskās ietekmes pazīmes nav vērojamas. Slimību un toksiskas ietekmes pazīmes rūpīgi jānovērtē un jāatspoguļo ziņojumā. Piemēram, iespējams, ka VTG producēšanos zivju mātišu organismā ietekmē arī vispārīgs toksiskums vai neendokrīna veida toksiska iedarbība, piemēram, hepatotoksiskums. Tomēr interpretāciju par ietekmi var nostiprināt, izmantojot citus apstrādes līmeņus, kuros nav vērojama sistēmiska toksiskuma maldinoša ietekme.

53. Attiecībā uz testa rezultātu pieņemamību jāņem vērā vairāki aspekti. Vispārīgs norādījums ir tāds, ka tēviņu un mātīšu organismā VTG līmeņiem kontrolgrupās attiecībā uz melngalvas mailītēm un zebrzivīm jābūt izteiktiem un jāatšķiras aptuveni par trīs lieluma kārtām un attiecībā uz Japānas medakām – aptuveni par vienu lieluma kārtu. Kontrolgrupās un apstrādes grupās novēroto vērtību diapazonu piemēri ir pieejami validācijas pārskatos (1, 2, 3, 4). Augstas VTG vērtības kontrolgrupas tēviņu organismā var ietekmēt testa reaģētspēju un tā spēju konstatēt vājus estrogēna agonistus. Zemas VTG vērtības kontrolgrupas mātīšu organismā var ietekmēt testa reaģētspēju un tā spēju konstatēt aromatāzes inhibitorus un estrogēna antagonistus. Norādījumos ir izmantoti validācijas pētījumi.
54. Ikru ražošanas kvantitatīvā noteikšana ir atkarīga no svarīgām variācijām [variācijas koeficients (CV) var variēt no 20 līdz 60 %], kas, CV tuvojoties 50 % vai augstākam procentam, ietekmē testa spēju noteikt būtisku par 70 % mazāku samazinājumu ikru ražošanā. Ja CV saglabājas zemākās robežās (apmēram 20–30 %), testam būs pieņemama jauda (80 %), un ar to varēs noteikt 40–50 % samazinājumu ikru ražošanā. Ja melngalvas mailītei izmanto testa plānu, kur katrā apstrādes līmenī ir četri replikāti, attiecībā uz auglības beigupunktu iegūst lielāku jaudu nekā ar testa plānu, kur ir tikai divi replikāti.
55. Ja laboratorija šādu testu iepriekš nav veikusi vai ja ir notikušas būtiskas pārmaiņas (piemēram, mainītas zivju līnijas vai piegādātājs), ir ieteicams veikt tehniskās kvalifikācijas pētījumu. Ieteicams izmantot ķīmikālijas ar atšķirīgu iedarbības veidu vai ietekmi uz vairākiem testa beigupunktiem. Katra laboratorija tiek aicināta apkopot vēsturiskus kontroles datus par tēviņiem un mātītēm un veikt testu ar pozitīvu kontroles ķīmikāliju, kurai ir zināma estrogēniska iedarbība (piemēram, 17β-estradiols koncentrācijā 100 ng/l vai zināms vājš agonists) un kura paaugstina VTG līmeni zivju tēviņu organismā, ar pozitīvu kontroles ķīmikāliju, kura inhibē aromatāzi (piemēram, fadrozols vai prohlorāzs koncentrācijā 300 µg/l) un kura pazemina VTG līmeni zivju mātīšu organismā, un pozitīvu kontroles ķīmikāliju, kurai ir androgēniska iedarbība (piemēram, 17β-trenbolons koncentrācijā 5 µg/l) un kura melngalvas mailītes un Japānas medakas mātītēm ierosina sekundāro dzimumpazīmju veidošanos. Lai būtu drošība par laboratorijas kvalifikāciju, šos datus var salīdzināt ar pieejamiem validācijas pētījumu datiem (1, 2, 3).
56. Kopumā VTG mērījumi jāuzskata par pozitīviem, ja salīdzinājumā ar kontrolgrupu vismaz augstākajā testēto vielu koncentrācijas līmenī ir konstatēts statistiski nozīmīgs VTG palielinājums ($p < 0,05$) tēviņu organismā vai statistiski nozīmīgs VTG samazinājums ($p < 0,05$) mātīšu organismā, un vispārīga toksiskuma pazīmes nav novērojamas. Pozitīvus rezultātus pamato, pierādot bioloģiski ticamu sakarību starp devu un atbildreakcijas līkni. Kā norādīts iepriekš, ne viss VTG samazinājums var būt endokrīnas izcelsmes, tomēr pozitīvs rezultāts kopumā jāinterpretē kā liecība par endokrīnu aktivitāti *in vivo*, un šādā gadījumā parasti ir jāveic papildu izmeklējumi, lai precizētu rezultātus.
57. Regulatori var prasīt gonādu histopatoloģijas novērtējumu, lai noteiktu testa dzīvnieku reproduktīvo veselību un lai testa rezultātus varētu novērtēt pēc pierādījumu svara. Gonādu histopatoloģija var netikt prasīta, ja ir pozitīvs VTG vai kāda sekundāra dzimumpazīme (t. i., VTG palielinājums vai samazinājums vai sekundāro dzimumpazīmju inducēšanās).

LITERATŪRA

- (1) OECD (2006a). Report of the Initial Work Towards the Validation of the 21-Day Fish Screening Assay for the Detection of Endocrine active Substances (Phase 1A). OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.60, Paris.
- (2) OECD (2006b). Report of the Initial Work Towards the Validation of the 21-Day Fish Screening Assay for the Detection of Endocrine active Substances (Phase 1B). OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.61, Paris.
- (3) OECD (2007). Final report of the Validation of the 21-day Fish Screening Assay for the Detection of Endocrine Active Substances. Phase 2: Testing Negative Substances. OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.78, Paris.

- (4) Owens JW (2007). Phase 3 report of the validation of the OECD Fish Screening Assay. CEFIC LRI Project, Endocrine. <http://www.cefic-lri.org/index.php?page=projects> (piekļuve 18/09/08).
- (5) US EPA (2007). Validation of the Fish Short-Term Reproduction Assay: Integrated Summary Report. 15 December 2007. US Environmental Protection Agency, Washington, DC. 104 pp.
- (6) OECD (2008). Report of the Validation Peer Review for the 21-Day Fish Endocrine Screening Assay and Agreement of the Working Group of the National Coordinators of the Test Guidelines Programme on the Follow-up of this Report. OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.94, Paris.
- (7) Sumpter J.P. and S. Jobling (1995). Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment. *Environmental Health Perspectives*; 103 Suppl 7:173-8 Review.
- (8) Pawlowski S., *et al.* (2004). Androgenic and estrogenic effects of the synthetic androgen 17alpha-methyltestosterone on sexual development and reproductive performance in the fathead minnow (*Pimephales promelas*) determined using the gonadal recrudescence assay. *Aquatic Toxicology*; 68(3):277-91.
- (9) Andersen L., *et al.* (2006). Short-term exposure to low concentrations of the synthetic androgen methyltestosterone affects vitellogenin and steroid levels in adult male zebrafish (*Danio rerio*). *Aquatic Toxicology*; 76(3-4):343-52.
- (10) Ankley G.T., *et al.* (2002). Evaluation of the aromatase inhibitor fadrozole in a short-term reproduction assay with the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Toxicological Sciences*; 67(1):121-30.
- (11) Panter G.H., *et al.* (2004). Successful detection of (anti-)androgenic and aromatase inhibitors in pre-spawning adult fathead minnows (*Pimephales promelas*) using easily measured endpoints of sexual development. *Aquatic Toxicology*; 70(1):11-21.
- (12) Parks L.G., *et al.* (1999). Fathead minnow (*Pimephales promelas*) vitellogenin: purification, characterization and quantitative immunoassay for the detection of estrogenic compounds. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part C Pharmacology, toxicology and endocrinology*; 123(2):113-25.
- (13) Panter G.H., *et al.* (1999). Application of an ELISA to quantify vitellogenin concentrations in fathead minnows (*Pimephales promelas*) exposed to endocrine disrupting chemicals. CEFIC-EMSG research report reference AQ001. CEFIC, Brussels, Belgium.
- (14) Fenske M., *et al.* (2001). Development and validation of a homologous zebrafish (*Danio rerio* Hamilton-Buchanan) vitellogenin enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and its application for studies on estrogenic chemicals. *Comp. Biochem. Phys. C* 129 (3): 217-232.
- (15) Holbech H., *et al.* (2001). Development of an ELISA for vitellogenin in whole body homogenate of zebrafish (*Danio rerio*). *Comparative Biochemistry and Physiology. Part C Pharmacology, toxicology and endocrinology*; 130: 119-131.
- (16) Rose J., *et al.* (2002). Vitellogenin induction by 17b-estradiol and 17a-ethinylestradiol in male zebrafish (*Danio rerio*). *Comp. Biochem. Physiol. C* 131: 531-539.
- (17) Brion F., *et al.* (2002). Development and validation of an enzyme-linked immunosorbent assay to measure vitellogenin in the zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental Toxicology and Chemistry*; vol 21: 1699-1708.
- (18) Yokota H., *et al.* (2001). Development of an ELISA for determination of the hepatic vitellogenin in Medaka (*Oryzias latipes*). *Jpn J Environ Toxicol* 4:87-98.
- (19) Tatarazako N., *et al.* (2004). Validation of an enzyme-linked immunosorbent assay method for vitellogenin in the Medaka. *Journal of Health Science* 50:301-308.
- (20) Ankley G.T., *et al.* (2003). Effects of the androgenic growth promoter 17-beta-trenbolone on fecundity and reproductive endocrinology of the fathead minnow. *Environmental Toxicology and Chemistry*; 22(6): 1350-60.

-
- (21) Seki M, *et al* (2004). Fish full life-cycle testing for androgen methyltestosterone on medaka (*Oryzias latipes*). *Environmental Toxicology and Chemistry*; 23(3):774-81.
- (22) OECD (2010). Guidance Document on Fish Gonadal Histopathology. OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 123, Paris.
- (23) OECD (2000) Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. Series on Testing and Assessment, no. Series on Testing and Assessment. No. No. 23. Paris
- (24) Hutchinson T.H., *et al.* (2006a). Acute and chronic effects of carrier solvents in aquatic organisms: A critical review. *Review. Aquatic Toxicology*, 76; pp.69–92.
- (25) Hutchinson T.H., *et al.* (2006b). Screening and testing for endocrine disruption in fish-biomarkers as “signposts,” not “traffic lights,” in risk assessment. *Environmental Health Perspectives*; 114 Suppl 1:106-14.
- (26) Miles-Richardson S.R., *et al.* (1999). Effects of waterborne exposure to 17B-estradiol on secondary sex characteristics and gonads of the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Aquat. Toxicol.* 47, 129-145.
- (27) Martinovic D., *et al.* (2008). Characterization of reproductive toxicity of vinclozolin in the fathead minnow and co-treatment with an androgen to confirm an anti-androgenic mode of action. *Environ. Toxicol. Chem.* 27, 478-488.
- (28) OECD (2006c), Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application, OECD Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No.54, OECD, Paris.
- (29) US EPA (2008), Peer-Review Results for the Fish Short-Term Reproduction Assay, dated 30 January 2008, US Environmental Protection Agency, Washington DC. 110 pp.
- (30) OECD (2012), *OECD Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disruptors*, OECD Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 150, OECD, Paris.
-

1. papildinājums

SAĪSINĀJUMI UN DEFINĪCIJAS

Ķimikālija: viela vai maisījums.

CV: variāciju koeficients

ELISA: imūnfermentatīvā analīze.

HPG ass: hipotalāma, hipofīzes un gonādu ass

Noslogojums: zivju mitrais svars uz vienu ūdens tilpuma vienību.

MPK: maksimāli pieļaujamā koncentrācija, kas atbilst aptuveni 10 % no letālās koncentrācijas LC_{50} .

Apdzīvotības blīvums: zivju skaits vienā ūdens tilpuma vienībā.

Testējamā ķimikālija: Jebkura viela vai maisījums, kuru testē, izmantojot šo testēšanas metodi.

VTG: olas dzeltenuma fosfolipīdu glikoproteīna prekursors, kas parasti veidojas organismā seksuāli aktīvām mugurkaulnieku mātītēm, kuras dēj olas/nērš ikrus.

2. papildinājums

ZIVJU ENDOKRĪNĀS SISTĒMAS SKRĪNINGA TESTA EKSPERIMENTĀLIE APSTĀKĻI

1. Ieteicamās sugas	Melngalvas mailīte (<i>Pimephales promelas</i>)	Medaka (<i>Oryzias latipes</i>)	Zebrzivs (<i>Danio rerio</i>)
2. Testa veids	Caurplūde	Caurplūde	Caurplūde
3. Ūdens temperatūra	25 ± 2°C	25 ± 2°C	26 ± 2°C
4. Apgaismojuma kvalitāte	Dienasgaismas spuldzes (plaša spektra)	Dienasgaismas spuldzes (plaša spektra)	Dienasgaismas spuldzes (plaša spektra)
5. Gaismas intensitāte	10-20 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$, 54 000-1 000 lux vai 50-100 ft-c (līmenis laboratorijā)	10-20 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$, 540-1 000 lux vai 50-100 ft-c (līmenis laboratorijā)	10-20 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$, 540-1 000 lux vai 50-100 ft-c (līmenis laboratorijā)
6. Fotoperiods (rītausmas/krēslas pārejas ir ieteicamas, taču netiek neuzskatītas par nepieciešamām)	16 h gaisma, 8 h tumsa	12-16 h gaisma, 12-8 h tumsa	12-16 h gaisma, 12-8 h tumsa
7. Noslogojums	< 5 g uz l	< 5 g uz l	< 5 g uz l
8. Testa kameras izmērs	10 l (minimālais izmērs)	2 l (minimālais izmērs)	5 l (minimālais izmērs)
9. Testa šķīduma tilpums	8 l (minimālais izmērs)	1,5 l (minimālais izmērs)	4 l (minimālais izmērs)
10. Testa šķīdumu tilpuma apmaiņu skaits	Vismaz 6 dienā	Vismaz 5 dienā	Vismaz 5 dienā
11. Testa organismu vecums	sk. 21. punktu.	sk. 21. punktu.	sk. 21. punktu.
12. Pieaugušu zivju aptuvenais mitrais svars (g)	Mātītes: 1,5 ± 20 % Tēviņi: 2,5 ± 20 %	Mātītes: 0,35 ± 20 % Tēviņi: 0,35 ± 20 %	Mātītes: 0,65 ± 20 % Tēviņi: 0,4 ± 20 %
13. Zivju skaits testa traukā	6 (2 tēviņi un 4 mātītes)	6 (3 tēviņi un 3 mātītes)	10 (5 tēviņi un 5 mātītes)
14. Apstrāžu skaits	= 3 (plus attiecīgās kontrolgrupas)	= 3 (plus attiecīgās kontrolgrupas)	= 3 (plus attiecīgās kontrolgrupas)
15. Trauku skaits katrā apstrādē	Vismaz 4	Vismaz 4	Vismaz 2
16. Zivju skaits uz katru testējamo koncentrāciju	16 pieaugušas mātītes un 8 tēviņi (4 mātītes un 2 tēviņi katrā replikāta traukā)	12 pieaugušas mātītes un 12 tēviņi (3 mātītes un 3 tēviņi katrā replikāta traukā)	10 pieaugušas mātītes un 10 tēviņi (5 mātītes un 5 tēviņi katrā replikāta traukā)

17. Barošanas režīms	Dzīvas vai saldētas pieaugušas vai nauplija stadijas okeāna garneles divas vai trīs reizes dienā (<i>ad libitum</i>), tirdzniecībā pieejama barība vai abu minēto veidu kombinācija	Nauplija stadijas okeāna garneles divas vai trīs reizes dienā (<i>ad libitum</i>), tirdzniecībā pieejama barība vai abu minēto veidu kombinācija	Nauplija stadijas okeāna garneles divas vai trīs reizes dienā (<i>ad libitum</i>), tirdzniecībā pieejama barība vai abu minēto veidu kombinācija
18. Aerācija	Nav, ja vien IS koncentrācija nav zemāka par 60 % no gaisa piesātinājuma	Nav, ja vien IS koncentrācija nav zemāka par 60 % no gaisa piesātinājuma	Nav, ja vien IS koncentrācija nav zemāka par 60 % no gaisa piesātinājuma
19. Atšķaidīšanas ūdens	Tīrs virszemes, akas vai rekonstituēts ūdens vai krāna ūdens, no kura attīrīts hlors	Tīrs virszemes, akas vai rekonstituēts ūdens vai krāna ūdens, no kura attīrīts hlors	Tīrs virszemes, akas vai rekonstituēts ūdens vai krāna ūdens, no kura attīrīts hlors
20. Pirmsekspozīcijas periods	Ieteicams 7–14 dienas	Ieteicams 7–14 dienas	Ieteicams 7–14 dienas
21. Ķīmiskās ekspozīcijas ilgums	21 diena	21 diena	21 diena
22. Bioloģiskie beigupunkti	— izdzīvotība — izturēšanās — auglība — sekund. dzimumpazīmes — VTG — pēc izvēles gonādu histopatoloģija	— izdzīvotība — izturēšanās — auglība — sekund. dzimumpazīmes — VTG — pēc izvēles gonādu histopatoloģija	— izdzīvotība — izturēšanās — auglība — VTG — pēc izvēles gonādu histopatoloģija
23. Testa pieņemamība	Izšķīdušais skābeklis > 60 % piesātinājuma; vidējā temperatūra $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$; kontrolgrupās zivju izdzīvotība 90 %; izmērītās testa koncentrācijas 20 % robežās no vidējām izmērītajām vērtībām katrā apstrādes līmenī.	Izšķīdušais skābeklis > 60 % piesātinājuma; vidējā temperatūra $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$; kontrolgrupās zivju izdzīvotība 90 %; izmērītās testa koncentrācijas 20 % robežās no vidējām izmērītajām vērtībām katrā apstrādes līmenī.	Izšķīdušais skābeklis > 60 % piesātinājuma; vidējā temperatūra $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$; kontrolgrupās zivju izdzīvotība 90 %; izmērītās testa koncentrācijas 20 % robežās no vidējām izmērītajām vērtībām katrā apstrādes līmenī.

3. papildinājums

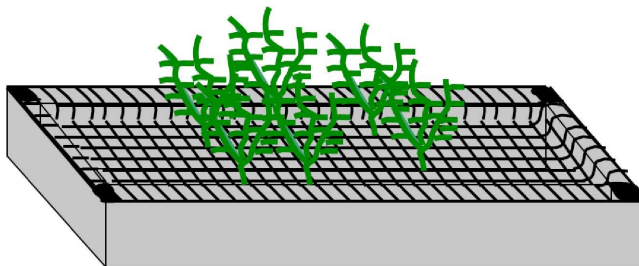
DAŽAS PIENĒMAMA ATŠĶAIDĪŠANAS ŪDENS ĶĪMISKĀS ĪPAŠĪBAS

SASTĀVDAĻA	KONCENTRĀCIJAS
Daļiņas	< 20 mg/l
Kopējais organiskais ogleklis	< 2 mg/l
Nejonizēts amonjaks	< 1 µg/l
Atlikušais hlors	< 10 µg/l
Kopējie fosfororganiskie pesticīdi	< 50 ng/l
Kopējie hlrororganiskie pesticīdi un polihlorbifenili	< 50 ng/l
Kopējais organiskais hlors	< 25 ng/l

4.A. papildinājums

ZEBRZIVS NĀRSTA SUBSTRĀTS

Nārstošanas paplāte: stikla instrumentu trauks, piemēram, $22 \times 15 \times 5.5$ cm (g × p × dz), kas pārklāts ar noņemamu nerūsošā tērauda sietiņu (acs 2 mm). Sietiņam instrumentu trauka atvere jāpārklāj līdz noteiktam līmenim zem trauka malas.



Uz sietiņa fiksē nārsta substrātu. Tam vajadzētu būt materiālam, kurā zivis var iepeldēt. Piemēram, piemēroti ir mākslīgi akvārija augi no zaļa plastmasas materiāla (NB: jāņem vērā testējamās ķīmiskās vielas iespējamā adsorbēšanās uz plastmasas materiāla). Plastmasas materiāls pietiekami ilgi jāskalo pietiekamā daudzumā silta ūdens, lai nodrošinātu, ka testa ūdenī nenonāk nekādas ķīmiskās vielas. Ja izmanto stikla materiālus, jāgādā, ka zivis enerģisku kustību laikā nesavainojas vai netiek saspīestas.

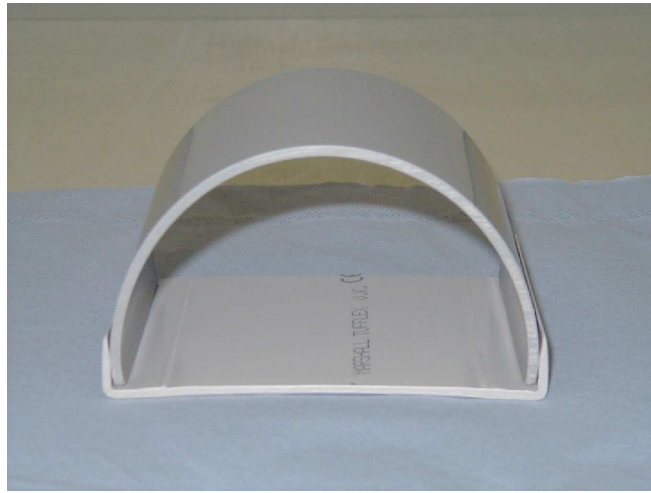
Attālumam starp paplāti un tvertnes sienām jābūt vismaz 3 cm, lai nodrošinātu, ka nārstošana nenotiek ārpus paplātes. Uz paplātes iznērstie ikri izkrīt cauri sietiņam, un 45–60 minūtes pēc apgaismošanas sākuma no tiem var ņemt paraugus. Caurspīdīgie ikri ir nelīpoši, un šķērsgaismā tos var viegli saskaitīt. Ja katrā traukā izmanto piecas mātītes, līdz 20 ikriem dienā uzskatāms par zemu, līdz 100 — par vidēju, bet vairāk nekā 100 — par augstu rādītāju. Nārsta paplāte jāizņem, ikri jāsavāc, un nārsta paplāte iespējami vēl vakarā vai ļoti agri no rīta jāievieto atpakaļ testa traukā. Laiks līdz atpakaļievietošanai nedrīkstētu pārsniegt vienu stundu, citādi nārsta substrāta ievietošana var ierosināt individuālu pārošanos un nārstošanu neraksturīgā laikā. Ja ir kādi apstākļi, kuru dēļ paplāte jāievieto vēlāk, tas jāizdara vismaz 9 stundas pēc apgaismošanas sākuma. Tik vēl dienā nārstošana vairs netiek ierosināta.

4.A papildinājums

MELNGALVAS MAILĪTES NĀRSTA SUBSTRĀTS

Katrā testa kamerā ievieto divas vai trīs kombinētas plastmasas/keramikas/stikla vai nerūsošā tērauda nārsta flīzes vai paplātes (piemēram, 80 mm garu pelēku pusapaļu caurulīti, kas novietota uz 130 mm garas paplātes ar atlokiem) (sk. attēlu). Ir pierādīts, ka nārsta substrātam ir piemērotas attiecīgi sagatavotas PVC vai keramikas flīzes (Thorpe *et al.*, 2007).

Lai uzlabotu sākeri, flīzes ieteicams padarīt abrazīvas. Paplātei ir vajadzīgs siets, lai zivis nevarētu piekļūt nokritušajiem ikriem, ja vien nav pierādīts, ka ikri efektīvi lip pie izmantotā nārsta substrāta.



Pamatne ir veidota tā, lai saturētu ikrus, kas nepielīp pie flīžu virsmas un nokrīt līdz tvertnes dibenam (vai ikrus, kas iznērsti tieši uz plakanās plastmasas pamatnes). Visus nārsta substrātus pirms izmantošanas vismaz 12 stundas skalo atšķaidīšanas ūdenī.

Thorpe KL, Benstead R, Hutchinson TH, Tyler CR, 2007. An optimised experimental test procedure for measuring chemical effects on reproduction in the fathead minnow, *Pimephales promelas*. *Aquatic Toxicology*, 81: 90-98.

5.A papildinājums

MELNGALVAS MAILĪTES SEKUNDĀRO DZIMUMPĀZĪMJU NOVĒRTĒŠANA NOTEIKTU ENDOKRĪNI AKTĪVU ĶĪMISKO VIELU DETEKTĒŠANAI**Pārskats**

Testējot endokrīnos disruptorus, potenciāli svarīgas izskata pazīmes pieaugušām melngalvas mailītēm ir ķermeņa krāsa (t. i., gaiša vai tumša), krāsojuma struktūra (t. i., ir vai nav vertikālas joslas), ķermeņa forma (t. i., galvas un krūšu daļas forma, vēdera apvidus uzpūšanās) un īpašas sekundārās dzimumpazīmes (t. i., nārsta kārpiņu skaits un lielums, pakauša segmenta un dējekļa lielums).

Nārsta kārpiņas reproduktīvi aktīviem melngalvas mailītes tēviņiem atrodas uz galvas (uz pakauša segmenta) un parasti ir izkārtotas abpusēji simetriskā struktūrā (Jensen *et al.* 2001). Kontrolgrupas mātītēm un jauniem tēviņiem un mātītēm kārpiņu attīstīšanās nav novērojama (Jensen *et al.* 2001). Tēviņiem ap acīm un starp nāsīm var būt līdz astoņām atsevišķām kārpiņām. Vairums lielāko kārpiņu ir izkārtotas divās paralēlās līnijās tieši zem nāsīm un virs mutes. Daudzām zivīm kārpiņu grupas atrodas zem apakšžokļa; mutes tuvumā parasti atrodas viens kārpiņu pāris, tomēr tuvāk vēderam var atrasties līdz četrām kārpiņām. Kārpiņu reti ir vairāk nekā 30 (diapazons, 18–28; Jensen *et al.* 2001). Galvenās (skaita ziņā) kārpiņas ir atsevišķas, salīdzinoši apaļas struktūras, kuru augstums aptuveni līdzinās to rādiusam. Vairumam reproduktīvi aktīvo tēviņu ir arī vismaz dažas kārpiņas, kas ir tik palielinātas un izteiktas, ka nav atšķiramas kā atsevišķas struktūras.

Dažu endokrīni disruptīvu ķīmikāliju ietekmē pretējā dzimuma īpatņiem var parādīties anormālas sekundārās dzimumpazīmes; piemēram, tādu androgēna receptoru agonistu kā 17 α -metilttestosterona vai 17 β -trenbolona ietekmē melngalvas mailītes mātītēm var izveidoties nārsta kārpiņas (Smith 1974; Ankley *et al.* 2001; 2003), savukārt estrogēna receptoru agonistu ietekmē tēviņiem nārsta kārpiņu skaits vai izmērs var samazināties (Miles-Richardson *et al.* 1999; Harries *et al.* 2000).

Turpinājumā sniegts melngalvas mailītes nārsta kārpiņu apraksts, pamatojoties uz procedūrām, kuras izmanto ASV Vides aizsardzības aģentūras laboratorija Minesotas štata Dulutā (U.S. Environmental Protection Agency lab in Duluth, MN). Konkrētos izstrādājumus un/vai aprīkojumu var aizstāt ar līdzvērtīgiem pieejamiem materiāliem.

Aplūkošanu vislabāk veikt ar apgaismotu palielināmo stiklu vai apgaismotu mikroskopu ar 3X palielinājumu. Zivi apskata no aizmugures un no priekšpuses (ar galvu pret skatītāju).

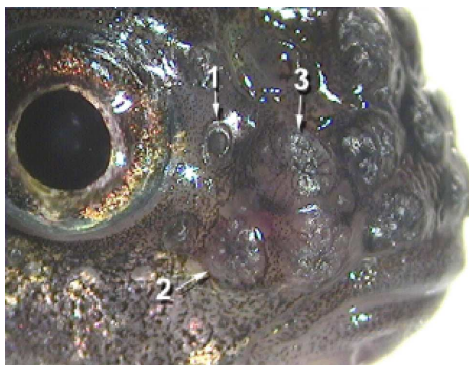
- [Zivi ievieto mazā Petri platē (piemēram, ar 100 mm diametru), pavēršot to ar galvu pret skatītāju un ar vēderu uz leju. Fokusē skatu meklētāju, lai atrastu kārpiņas. Zivi uzmanīgi un lēni apveļ no viena sāna uz otru, lai noteiktu kārpiņu zonas. Saskaita kārpiņas un reģistrē to skaitu.
- Apskati atkārtu uz galvas vēderpuses virsmas, Petri platē pavēršot zivi ar muguru pret skatītāju.
- Katra zivs jāapskata 2 minūšu laikā.

Kārpiņu skaitīšana un novērtēšana

Melngalvas mailītēm ir identificētas sešas konkrētas zonas, kurās novērtē kārpiņu esamību un attīstīšanos. Ir sagatavota veidlapa, kurā var norādīt kārpiņu izvietojumu un daudzumu (sk. šī papildinājuma beigās). Kārpiņu skaitu reģistrē un to lielumu katram organismam kvantitatīvi novērtē atbilstoši šādai skalai: 0 – nav novērojama, 1 – ir novērojama, 2 – palielināta un 3 – izteikta (1. attēls).

Vērtējums 0 – kārpiņas nav novērojamas. Vērtējums 1 – ir novērojama; jebkura kārpiņa, kurai ir punkts, kurā tās augstums ir gandrīz vienāds ar tās rādiusu. Vērtējums 2 – palielināta; svarīgi, ka audi izskatās pēc zvaigznītes; parasti ar starveida pamatni un rievojumu no centrālās daļas. Kārpiņu augstums bieži vien ir nevienmērīgs, bet reizēm tās var būt apaļas. Vērtējums 3 – izteikta; parasti diezgan liela un noapaļota, ar mazāk izteiktu struktūru. Dažkārt šīs kārpiņas savienojas, izveidojot vienotu masu atsevišķā vai vairākās zonās (turpmāk norādītā B, C un D zona). Krāsojums un struktūra ir līdzīga vērtējumam 2, tomēr reizēm pazīmes ir diezgan neskaidras. Šajā kārpiņu novērtēšanas sistēmā kopējais punktu skaits normālam kontrolgrupas tēviņam ar 18–20 kārpiņām parasti ir < 50 (Jensen *et al.* 2001).

1. attēls



Dažām zivīm faktiski kārpiņu var būt vairāk nekā veidnei attiecīgajai novērtējuma zonai paredzēts rūtiņu. Šādā gadījumā papildu novērtējuma skaitļus var atzīmēt turpat pa labi vai pa kreisi no rūtiņas. Līdz ar to veidlapā nav jābūt simetrijai. Papildu iespēja tādu kārpiņu kartēšanai, kas izvietotas pa pāriem vai vertikāli savienojušās gar mutes horizontālo plakni, ir divas reizes atzīmēt divu kārpiņu novērtējuma punktus vienā rūtiņā.

Kartēšanas zonas.

A – ap aci izvietotas kārpiņas. Kartē muguras-vēdera virzienā ap acs priekšējo gredzenu. Pieaugušiem kontrolgrupas tēviņiem parasti vairākas, kontrolgrupas mātītēm nav, androgēniem eksponētām mātītēm parasti pāris (pa vienai pie katras acs) vai viena.

B-kārpiņas starp nāsīm (sensoro kanālu porām). Vairāk nobriedušiem kontrolgrupas tēviņiem parasti pa pāriem (2 – palielināta vai 3 – izteikta). Kontrolgrupas mātītēm nav novērojamas, bet reizēm novērojamas un attīstās androgēniem eksponētām mātītēm.

C – kārpiņas, kas novietotas tieši nāšu priekšā, paralēli mutei. Nobriedušiem kontrolgrupas tēviņiem parasti palielinātas vai izteiktas. Mazāk attīstītiem tēviņiem vai androgēniem eksponētām mātītēm novērojamas vai palielinātas.

D – gar mutes līniju paralēli novietotas kārpiņas. Kontrolgrupas tēviņiem parasti tās vērtē kā attīstītas. Kontrolgrupas mātītēm to nav, bet androgēniem eksponētām mātītēm ir novērojamas.

E – kārpiņas uz apakšžokļa mutes tuvumā, parasti nelielas un pa pāriem. Mainīgā skaitā kontrolgrupas tēviņiem vai ar testējamo ķīmisko vielu apstrādātiem tēviņiem un ar testējamo ķīmisko vielu apstrādātām mātītēm.

F – kārpiņas izvietotas vēdera virzienā no E zonas. Parasti nelielas un pa pāriem. Novērojamas kontrolgrupas tēviņiem un androgēniem eksponētām mātītēm.

ATSAUCES

- (1) Ankley GT, Jensen KM, Kahl MD, Korte JJ, Makynen ME. 2001. Description and evaluation of a short-term reproduction test with the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Environ Toxicol Chem* 20:1276-1290.
- (2) Ankley GT, Jensen KM, Makynen EA, Kahl MD, Korte JJ, Hornung MW, Henry TR, Denny JS, Leino RL, Wilson VS, Cardon MC, Hartig PC, Gray EL. 2003. Effects of the androgenic growth promoter 17-β trenbolone on fecundity and reproductive endocrinology of the fathead minnow. *Environ Toxicol Chem* 22:1350-1360.
- (3) Harries JE, Runnalls T, Hill E, Harris CA, Maddix S, Sumpter JP, Tyler CR. 2000. Development of a reproductive performance test for endocrine disrupting chemicals using pair-breeding fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Environ Sci Technol* 34:3003-3011.

- (4) Jensen KM, Korte JJ, Kahl MD, Pasha MS, Ankley GT. 2001. Aspects of basic reproductive biology and endocrinology in the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Comp Biochem Physiol C* 128:127-141.
- (5) Kahl MD, Jensen KM, Korte JJ, Ankley GT. 2001. Effects of handling on endocrinology and reproductive performance of the fathead minnow. *J Fish Biol* 59:515-523.
- (6) Miles-Richardson SR, Kramer VJ, Fitzgerald SD, Render JA, Yamini B, Barbee SJ, Giesy JP. 1999. Effects of waterborne exposure of 17-estradiol on secondary sex characteristics and gonads of fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Aquat Toxicol* 47:129-145.
- (7) Smith RJF. 1974. Effects of 17 α -methyltestosterone on the dorsal pad and tubercles of fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Can J Zool* 52:1031-1038.

Kārpiņu veidlapa:

ID _____

Datums _____

Kopskaits _____

Skaitliskais novērtējums

1 – ir novērojamas

2 – palielināta

3 – izteikta

	A	X1	X1	X1	X1
--	---	----	----	----	----

	B	X1	X1	X1	X1
--	---	----	----	----	----

	C	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1
	D	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1

		E	X1	X1	
	F	X1	X1	X1	X1

5.B papildinājums

JAPĀNAS MEDAKAS SEKUNDĀRO DZIMUMPAZĪMJU NOVĒRTĒŠANA NOTEIKTU ENDOKRĪNI AKTĪVU ĶĪMISKO VIELU DETEKTĒŠANAI

Turpinājumā sniegts medakas (*Oryzias latipes*) sekundāro dzimumpazīmju — kārpīņveida izaugumu (*) — mērījumu apraksts.

- (1) Pēc aknu izgriešanas (6. papildinājums) ķermeni ievieto koniskā centrifūgas stobriņā, kas satur 10 ml 10 % neitrālā formalīna buferšķīduma (augšpusē: galva, leļpusē: aste). Ja gonāda ir fiksēta šķīdumā, kas nav 10 % neitrāls formalīna buferšķīdums, ar nazi veic šķērsgriezumus starp anālās spuras priekšējo daļu un anālo atveri, raugoties, lai nebojātu ģenitālo poru un pašu gonādu (3. attēls). Zivs ķermeņa priekšējo daļu ievieto fiksējošā šķīdumā, lai saglabātu gonādu, bet zivs astes daļu — 10 % neitrālā formalīna buferšķīdumā, kā norādīts iepriekš.
- (2) Kad zivs ķermenis ievietots 10 % neitrālā formalīna buferšķīdumā, ar pinceti satver anālās spuras priekšējo daļu un aptuveni uz 30 sekundēm to saliec, lai anālā spura būtu atvērta. Anālo spuru ar pinceti uzmanīgi satver aiz dažiem priekšējās daļas stariem tā, lai nesaskrāmbātu kārpīņveida izaugumus.
- (3) Pēc tam, kad anālā spura 30 sekundes ir turēta atplesta, zivs ķermeni līdz kārpīņveida izaugumu mērīšanai (jāmēra pēc vismaz 24 stundu fiksācijas) glabā istabas temperatūras 10 % neitrālā formalīna buferšķīdumā.

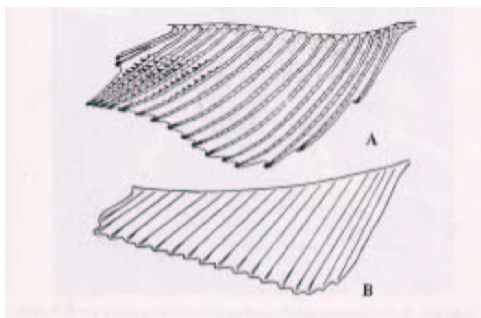
Mērīšana

- (1) Pēc tam, kad zivs ķermenis vismaz 24 stundas fiksēts 10 % neitrālā formalīna buferšķīdumā, to no koniskā centrifūgas stobriņa izņem un ar filtrpapīru (vai ar papīra dvieli) nosusina formalīnu.
- (2) Zivi novieto ar vēderu uz augšu. Tad uzmanīgi ar mazām secēšanai paredzētām šķērēm nogriež anālo spuru (anālo spuru ieteicams nogriezt kopā ar nelielu pterigiofora daudzumu).
- (3) Nogrieztās anālās spuras priekšējo daļu satver ar pinceti un noliek uz priekšmetstikliņa, uz kura ir daži pilieni ūdens. Pēc tam anālo spuru pārklāj ar segstikliņu. Anālo spuru ar pinceti satver saudzīgi, lai nesaskrāmbātu kārpīņveida izaugumus.
- (4) Izņemot skaitītāju zem bioloģiskā mikroskopa (stāteniskā mikroskopa vai invertētā mikroskopa), saskaita spuras staru skrimšļa posmus ar kārpīņveida izaugumiem. Kārpīņveida izaugumus atzīst tad, ja uz spuras staru skrimšļa posmu aizmugurējās daļas ir redzami nelieli izaugumi. Tabulā ieraksta spuras staru skrimšļa posmu skaitu katrā spuru kaulā (piemēram, pirmais spuru kauls: 0, otrais spuru kauls: 10, trešais spuru kauls: 12, utt.) un par katru zivi Excel tabulā ieraksta šo skaitļu summu. Ja nepieciešams, anālo spuru nofotografē un spuru staru skrimšļa posmos esošos kārpīņveida izaugumus saskaita fotogrāfijā.
- (5) Pēc mērīšanas anālo spuru ievieto glabāšanai 1. punktā minētajā konusveida kolbā.

(*) Kārpīņveida izaugumi parasti ir novērojami tikai pieaugušiem tēviņiem, un tie atrodas uz anālās spuras no otrā līdz septītajam vai astotajam spuru staram, skaitot no anālās spuras aizmugurējā gala (1. un 2. attēls). Tomēr kārpīņveida izaugumi tikai retumis ir vērojami uz pirmā spuras stara no anālās spuras aizmugurējā gala. Šī standartoperāciju procedūra (turpmāk "SOP") attiecas arī uz to, kā mēra kārpīņveida izaugumus uz pirmā spuras stara (šajā SOP spuras stara kārtas skaitlis norāda staru secību no anālās spuras aizmugurējā gala).

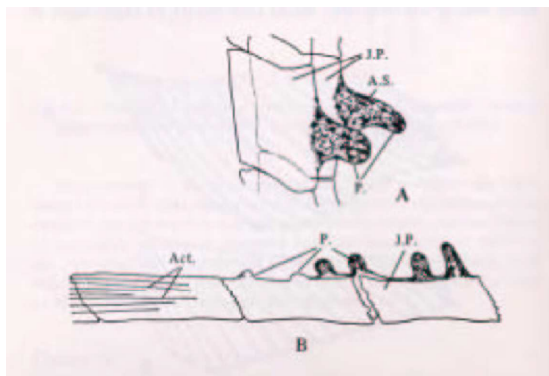
1. att.

Anālās spuras formas un lieluma atšķirības starp dzimumiem. A, tēviņš; B, mātīte. Oka, T. B., 1931. On the processes on the fin rays of the male of *Oryzias latipes* and other sex characters of this fish. J. Fac. Sci., Tokyo Univ., IV, 2: 209-218.



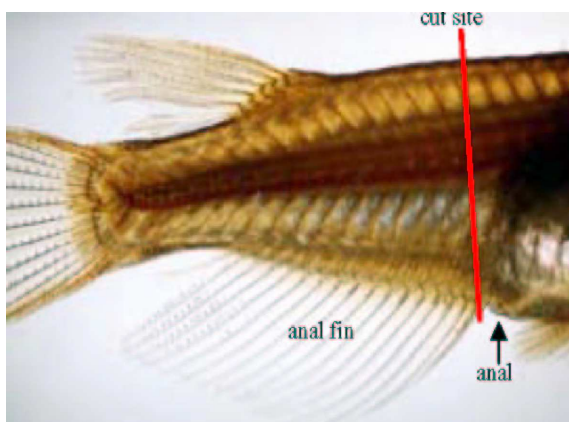
2. att.

A – izaugumi uz anālās spuras staru skrimšļa posmiem. J.P. – skrimšļa posmi, A.S. – attālums starp asīm; P – process. B – anālās spuras distālais izvērījums. Aktinotrihija šķiedras (Act.) atrodas spuras galā. Oka, T. B., 1931. On the processes on the fin rays of the male of *Oryzias latipes* and other sex characters of this fish. J. Fac. Sci., Tokyo Univ., IV, 2: 209-218.



3. att.

Zivs ķermeņa fotogrāfija, kurā redzama griezuma vieta, kur gonāda ir fiksēta fiksējošā šķīdumā, kas nav 10 % neitrāls formalīna buferšķīdums. Šajā gadījumā atlikušo ķermeņa daļu ar bārdas nazi nogriež starp anālās spuras priekšējo daļu un anālo atveri (sarkanā līnija), un zivs ķermeņa priekšdaļu ievieto gonādai paredzētajā fiksējošajā šķīdumā, bet zivs ķermeņa aste daļu ievieto 10 % neitrālā formalīna buferšķīdumā.



6. papildinājums

IETEICAMĀ PARAUGU ŅEMŠANAS KĀRTĪBA VITELOGENĪNA ANALĪZEI

Jāuzmanās, lai tēviņu un mātīšu VTG paraugi savstarpēji nekontaminētos.

1.A procedūra. Melngalvas mailīte; asins ņemšana no astes vēnas/artērijas

Pēc anestezēšanas ar skalpeļa asmeni daļēji atdala astes stumbru un ar heparinizētu mikrohematokrīta kapilār-mēģeni no astes vēnas/artērijas ievāc asinis. Pēc asins parauga paņemšanas plazmu ātri atdala, centrifugējot 3 minūtes ar paātrinājumu 15 000 g (vai 10 minūtes ar paātrinājumu 15 000 g 4 °C temperatūrā). Ja vēlas, pēc centrifugēšanas var noteikt hematokrīta līmeni. Tad plazmas daļu no mikrohematokrīta mēģenes izņem un glabā centrifūgas mēģenē ar 0,13 vienībām aprotinīna (proteāzes inhibitors) –80°C temperatūrā, līdz ir iespējama VTG noteikšana. Atkarībā no melngalvas mailītes lieluma (atkarīgs no dzimuma) ievācamā asins parauga tilpums parasti ir 5 līdz 60 mikrolitri no zivs (Jensen *et al.* 2001).

1.B procedūra. Melngalvas mailīte; asins ņemšana no sirds

Asinis var ņemt arī ar sirds punkcijas metodi, izmantojot heparinizētu šļirci (1 000 heparīna vienības uz ml). Asinis ievieto Ependorfa mēģenēs (uz ledus) un centrifugē (5 minūtes, 7 000 g, istabas temperatūra). Plazmu ievieto tīrās Ependorfa mēģenēs (ja ar plazmas daudzumu tas iespējams, alikvotās) un līdz analīzes veikšanai nekavējoties sasaldē –80°C temperatūrā (Panter *et al.*, 1998).

2.A procedūra. Japānas medaka; medakas aknu izgriešana

Testa zivju izņemšana no testa kameras

- (1) Testa zivis no testa kameras izņem ar sietiņkaroti. Jāraugās, lai testa zivis neiekristu citās testa kamerās.
- (2) Principā testa zivis izņem šādā secībā: kontrolgrupa, šķīdinātāja kontrolgrupa (attiecīgos gadījumos), zemākās koncentrācijas grupa, vidējās koncentrācijas grupa, augstākās koncentrācijas grupa un pozitīvā kontrolgrupa. Turklāt no vienas testa kameras vispirms izņem visus tēviņus, tikai pēc tam izņem mātītes.
- (3) Pēc ārējām sekundārām dzimum pazīmēm (piemēram, pēc anālās spuras formas) nosaka katras testa zivs dzimumu.
- (4) Testa zivi ievieto pārvietošanas traukā un pārnes uz darba vietu, kur notiek aknu izgriešana. Pēc marķējuma pārbauda testa kameru un pārvietošanas trauku un pārliecinās, ka no testa kameras izņemto zivju skaits un testa kamerā palikušo zivju skaits atbilst gaidītajam.
- (5) Ja dzimumu nav iespējams noteikt pēc zivju izskata, no testa kameras izņem visas zivis. Šādā gadījumā dzimumu nosaka, gonādu vai sekundārās dzimum pazīmes aplūkojot ar stereoskopisko mikroskopu.

Aknu izgriešana

- (1) Testa zivis no pārvietošanas trauka ar nelielu sietiņkaroti ieceļ anestēzijas šķīdumā.
- (2) Pēc testa zivju anestezēšanas tās ar pinceti (patēriņu preču tips) novieto uz filtrpapīra (vai uz papīra dvieļa). Testa zivi ar pinceti satver aiz galvas sāniem, lai nesalauztu asti.
- (3) Ūdeni no testa zivs virsmas nosusina ar filtrpapīru (vai ar papīra dvieļi).

- (4) Zivi novieto ar vēderu uz augšu. Pēc tam ar secēšanas šķērēm veic nelielu šķērsenisku iegriezumu pusceļā starp kakla vēderpuses daļu un vēdera vidusdaļu.
- (5) Secēšanas šķēres ievieto nelielajā iegriezumā un pa vēdera viduslīniju uzšķērš vēderu no bronhu apvalka astes puses punkta līdz anālajai atverei galvaskausa pusē. Jāraugās, lai secēšanas šķēres neievietotu pārāk dziļi, bojājot aknas vai gonādu.
- (6) Zem stereoskopiskā mikroskopa veic šādas darbības.
- (7) Testa zivi ar vēderu uz augšu novieto uz papīra dvieļa (ir pieejama arī stikla Petri plate vai priekšmetstikliņš).
- (8) Ar precīzijas pinceti paplēš vēdera dobuma sienas un izņem iekšējos orgānus. Ja nepieciešams, atdalot vienu no vēdera dobuma sienām, var izņemt iekšējos orgānus.
- (9) Ar vēl vienu precīzijas pincešu pāri vēdera dobumu paver tā, lai būtu redzamas aknu un žultspūšļa savienojuma vieta. Tad satver žultsceļu un nogriež žultspūsli. Jāraugās, lai žultspūslis nepārplīstu.
- (10) Satver barības vadu un tādā pašā veidā no aknām atdala kuņģa un zarnu traktu. Jāraugās, lai neizlītu kuņģa un zarnu trakta saturs. Kuņģa un zarnu traktu astes pusē atdala no anālās atveres, un traktu izņem no vēdera dobuma.
- (11) No aknām notīra taukus un citus audus. Jāraugās, lai aknas nesaskrābātu.
- (12) Ar precīzijas pinceti satver aknu portālo zonu, un aknas izņem no vēdera dobuma.
- (13) Aknas novieto uz priekšmetstikliņa. Ja nepieciešams, ar precīzijas pinceti no aknu virsmas noņem palikušos taukus un svešos audus (piemēram, vēderplēvi).
- (14) Aknas ievieto 1,5 ml mikromēģenē, ko izmanto par taru, un ar elektroniskiem analītiskajiem svariem nosaka aknu svaru. Vērtību reģistrē darba lapā (nolasījuma precizitāte: 0,1 mg). Pārbauda identifikācijas informāciju uz mikromēģenes etiķetes.
- (15) Mikromēģenei, kurā ir aknas, uzliek vāciņu. Mikromēģeni glabā dzesēšanas statīvā (vai statīvā ar ledu).
- (16) Pēc vienu aknu izgriešanas secēšanas instrumentus notīra vai aizvieto ar tīriem instrumentiem.
- (17) Pēc šiem norādījumiem aknas izņem visām pārvietošanas traukā esošajām zivīm.
- (18) Kad visām pārvietošanas traukā esošajām zivīm aknas ir izņemtas (t. i., visiem testa kameras tēviņiem vai mātītēm), visus aknu paraugus ievieto mēģeņu statīvā ar identifikācijas etiķeti un noglabā saldētavā. Ja aknas drīz pēc izgriešanas nodod priekšapstrādei, paraugus uz nākamo darba vietu nogādā dzesēšanas statīvā (vai statīvā ar ledu).

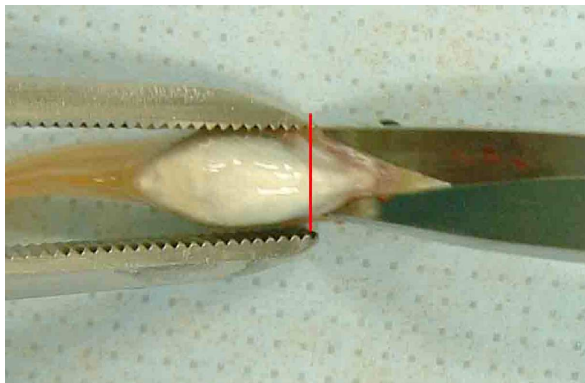
Pēc aknu izgriešanas zivs ķermeni var izmantot gonādu histoloģijai un sekundāro dzimum pazīmju mērīšanai.

Paraugi

Ja testa zivju aknu paraugus drīz pēc izgriešanas nenodod priekšapstrādei, tos glabā $\leq -70^{\circ}\text{C}$ temperatūrā.

1. att.

Ar šķērēm izdara griezumu tieši pirms krūšuspurām.



2. att.

Ar šķērēm līdz punktam aptuveni 2 mm no anālās atveres galvas virzienā uzšķērž vēdera viduslīniju.

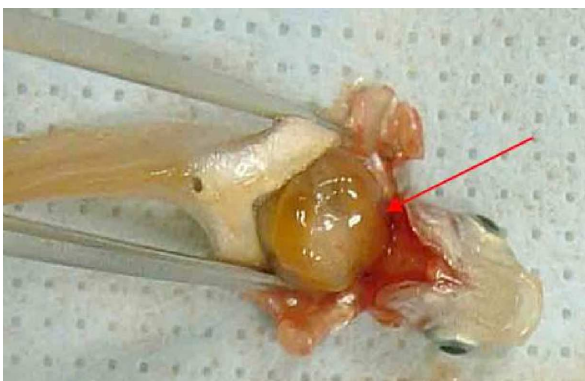


3. att.

Vēdera sienas paplēš ar knaiblītēm, lai atsegtu aknas un citus iekšējos orgānus.

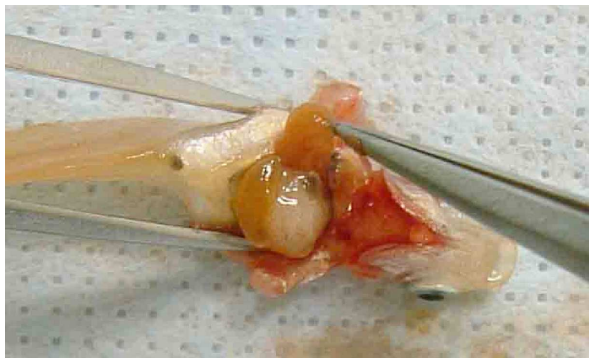
(Vēdera sienas var ar adatām atspraust uz sāniem.)

Bultiņa rāda uz aknām.



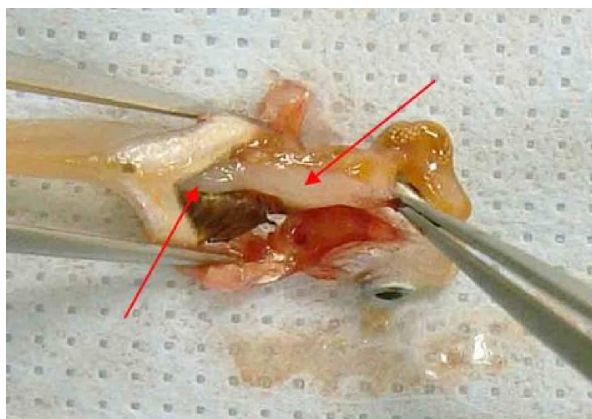
4. att.

Atdala un ar kņablītēm izgriež aknas.



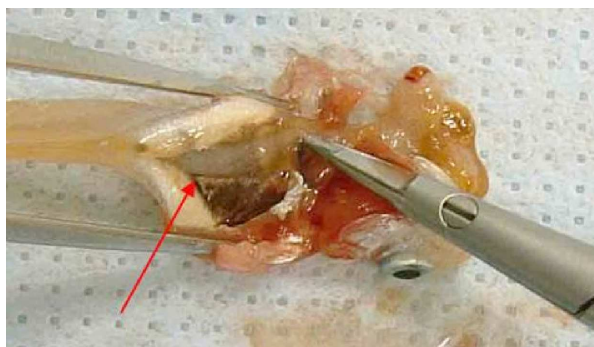
5. att.

Ar kņablītēm saudzīgi atvirza zarnas.



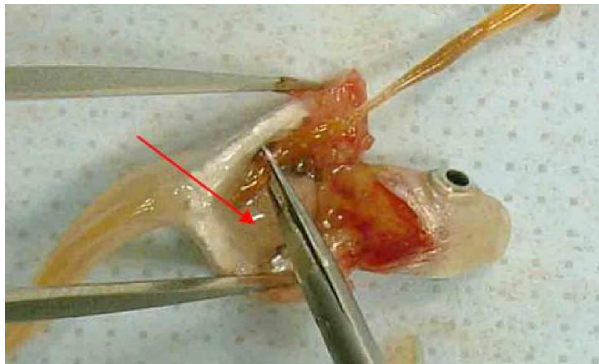
6. att.

Ar šķērēm atdala abus zarnu galus un jebkādas apzarņa daļas.



7. att. (mātīte)

Mātītēm veic identisku procedūru.



8. att.

Pabeigta procedūra.



2.B procedūra. Japānas medaka (*Oryzias latipes*), aknu priekšapstrāde vitelogenīna analīzes veikšanai

No ELISA komplekta ņem homogenāta buferšķīduma pudelīti un to atdzesē sasmalcinātā ledus šķīdumā (šķīduma temperatūra: $\leq 4^{\circ}\text{C}$). Ja izmanto *EnBio ELISA* sistēmas homogenāta buferšķīdumu, šķīdumu istabas temperatūrā atkausē, bet pēc tam pudelīti dzesē sasmalcinātā ledus šķīdumā.

Homogenāta buferšķīduma daudzumu aknām aprēķina, pamatojoties uz to svaru (uz 1 mg aknu svara pievieno 50 μl homogenāta buferšķīduma). Piemēram, ja aknu svars ir 4,5 mg, homogenāta buferšķīduma tilpums aknām ir 225 μl . Sagatavojiet homogenāta buferšķīduma tilpuma sarakstu visām aknām.

Aknu sagatavošana priekšapstrādei

- (1) 1,5 ml mikromēģeni ar aknām no saldētavas izņem tieši pirms priekšapstrādes.
- (2) Lai nepieļautu kontaminēšanos ar vitelogenīnu, tēviņu aknām priekšapstrādi veic, pirms apstrādā mātīšu aknas. Turklāt priekšapstrādi testa grupām veic šādā secībā: kontrolgrupa, šķīdinātāja kontrolgrupa (attiecīgā gadījumā), zemākās koncentrācijas grupa, vidējās koncentrācijas grupa, augstākās koncentrācijas grupa un pozitīvā kontrolgrupa;

- (3) Vienlaicīgi no saldētavas izņem 1,5 ml mikromēģenes ar aknu paraugiem, ne vairāk, kā attiecīgajā brīdī iespējams centrifugēt.
- (4) 1,5 ml mikromēģenes ar aknu paraugiem sakārto paraugu numuru secībā statīvā ar ledu (aknas atkausēt nav nepieciešams).

Priekšapstrādes veikšana

1) homogenāta buferšķīduma pievienošana

Sarakstā pārbauda attiecīgajam aknu paraugam izmantojamo homogenāta buferšķīduma tilpumu, un mikropipeti (tilpuma diapazons: 100–1 000 µl) pielāgo attiecīgajam daudzumam. Mikropipetei uzliek tīru uzgali.

1,5 ml mikromēģenē ar aknām no reaģenta pudelītes pievieno homogenāta buferšķīdumu.

Ievērojot iepriekš norādīto procedūru, homogenāta buferšķīdumu pievieno visām 1,5 ml mikromēģenēm ar aknām. Mikropipetes uzgali nav nepieciešams aizstāt ar jaunu. Tomēr, ja uzgalis ir kontaminēts vai varētu tāds būt, tas jānomaina.

2) Aknu homogenizācija

- Mikromēģenes homogenizatoram pievieno jaunu homogenizācijas piestu.
- Piestu ievieto 1,5 ml mikromēģenē. Mikromēģenes homogenizatoru tur tā, lai aknas piespiestu starp piestas virsmu un 1,5 ml mikromēģenes iekšējo sienīgu;
- Mikromēģenes homogenizatoru darbina 10 līdz 20 sekundes. Procesa laikā 1,5 ml mikromēģeni dzesē ar sasmalcinātu ledu.
- Piestu no 1,5 ml mikromēģenes izceļ un nogaida aptuveni 10 sekundes. Pēc tam suspensiju pārbauda vizuāli;
- Ja suspensijā ir novērojami aknu gabaliņi, (3) un (4) darbību atkārto, līdz ir sagatavots pieņemams aknu homogenāts.
- Suspendēto aknu homogenātu līdz centrifugēšanai dzesē statīvā ar ledu.
- Pēc katra homogenāta sagatavošanas piestu aizstāj ar jaunu.
- Visas aknas homogenizē ar homogenāta buferšķīdumu, ievērojot iepriekš norādīto procedūru.

3) Suspendēto aknu homogenāta centrifugēšana

- Pārlicinās, ka atdzesētajā centrifūgas kamerā temperatūra ir $\leq 5^{\circ}\text{C}$.
- 1,5 ml mikromēģenes ar suspendēto aknu homogenātu ievieto atdzesētā centrifūgā (ja, nepieciešams, noregulē līdzsvaru).
- Suspendēto aknu homogenātu 10 min. centrifugē ar $13\,000\text{ g} \leq 5^{\circ}\text{C}$. Tomēr, ja supernatanti ir pietiekami atdalīti, centrifugēšanas spēku un ilgumu var pielāgot pēc vajadzības.
- Pēc centrifugēšanas pārlicinās, ka supernatanti ir pietiekami atdalīti (virsslānis: lipīdi, vidējais slānis: supernatants, apakšslānis: aknu audi). Ja atdalījums nav pietiekams, suspensiju centrifugē vēlreiz, ievērojot tos pašus nosacījumus.
- Visus paraugus izņem no atdzesētās centrifūgas un paraugu numuru secībā sakārto statīvā ar ledu. Jāraugās, lai atdalītie slāņi pēc centrifugēšanas atkal nesususpendētos.

4) Supernatanta ievākšana

- Mēģeņu statīvā ievieto četras supernatanta glabāšanai paredzētas 0,5 ml mikromēģenes.
- Ar mikropipeti ievāc 30 µl katra supernatanta (atdalīts kā vidējais slānis) un ievada vienā 0,5 ml mikromēģenē. Jāraugās, lai neievāktu lipīdus no virsslāņa vai aknu audus no apakšslāņa.
- Tādā pašā veidā supernatantu ievāc un ievada citās divās 0,5 ml mikromēģenēs.
- Ar mikropipeti ievāc atlikušo supernatantu (ja iespējams: ≥ 100 µl). Pēc tam supernatantu ievada atlikušajā 0,5 ml mikromēģenē. Jāraugās, lai neievāktu lipīdus no virsslāņa vai aknu audus no apakšslāņa.
- 0,5 ml mikromēģeni aiztaisa ar vāciņu un uz etiķetes norāda supernatanta tilpumu. Pēc tam mikromēģenes nekavējoties atdzesē statīvā ar ledu.
- Katra supernatanta ievākšanai mikropipetes uzgali aizstāj ar jaunu. Ja uzgalim pielīp liels daudzums lipīdu, uzgali nekavējoties aizstāj ar jaunu, lai nepieļautu aknu ekstrakta piesārņošanu ar taukiem.
- Saskaņā ar iepriekš aprakstīto procedūru visu centrifugēto supernatantu ievada četrās 0,5 ml mikromēģenēs.
- Pēc supernatanta ievadīšanas 0,5 ml mikromēģenēs tās visas ievieto mēģeņu statīvā ar identifikācijas etiķeti un nekavējoties sasaldē saldētavā. Ja VTG koncentrācijas mēra tūlīt pēc priekšapstrādes, vienu 0,5 ml mikromēģeni (ar 30 µl supernatanta) atstāj dzesēties mēģeņu statīvā un nogādā darba vietā, kurā veic ELISA testu. Šādā gadījumā pārējās mikromēģenes ievieto mēģeņu statīvos un sasaldē saldētavā.
- Pēc supernatanta ievākšanas atliekas attiecīgi likvidē.

Paraugu glabāšana

Līdz izmantošanai ELISA aknu homogenāta supernatantu saturošās 0,5 ml mikromēģenes glabā ≤ -70 °C temperatūrā.

3.A procedūra. Zebrzivis; asins ņemšana no astes vēnas/artērijas

Uzreiz pēc anestēzijas astes stumbru šķērseniski atdala un ar heparinizētu mikrohematokrīta kapilāra mēģeni no astes artērijas/vēnas izvada asinis. Asins tilpums atkarībā no zivs lieluma var būt 5 līdz 15 mikrolitri. Mikrokapilāra mēģenē pievieno tādu pašu tilpumu aprotinīna buferšķīduma (6 mikrogrami/ml fosfātu fizioloģiskajā buferšķīdumā (PBS)) un centrifugējot atdala plazmu no asinīm (5 minūtes pie 600 g). Plazmu ievāc testa mēģenēs un līdz VTG vai citu interesējošo proteīnu analizēšanai glabā -20°C temperatūrā.

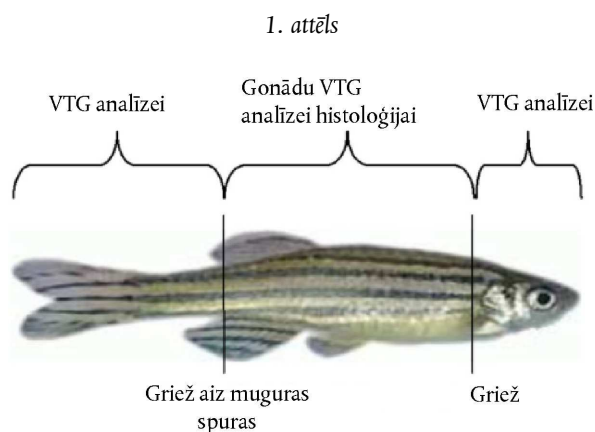
3.B procedūra. Zebrzivis; asins ņemšana ar sirds punkciju

Lai nepieļautu asins koagulāciju un proteīnu noārdīšanos, paraugus ievāc fosfātu fizioloģiskajā buferšķīdumā (PBS), kas satur heparīnu (1 000 vienības/ml) un proteāzes inhibitoru aprotinīnu (2 TIU/ml). Ieteicamās buferšķīduma sastāvdaļas ir heparīns, amonija sāls un liofilizētais aprotinīns. Asins paraugu ņemšanai ieteicams izmantot šļirci (1 ml) ar fiksētu smalku adatu (piemēram, *Braun Omnikan-F*). Šļircē iepriekš iepilda buferšķīdumu (aptuveni 100 mikrolitri), lai no katras zivs pilnībā eluētu mazus asins tilpumus. Asins paraugus ņem, izmantojot sirds punkciju. Vispirms zivi ar MS-222 (100 mg/l) anestezē. Pareizā anestēzijas līmenī iespējams noteikt zebrzivis sirdsdarbību. Veicot sirds punkciju, uz šļirces virzuli izdara nelielu spiedienu. Asins parauga tilpums var būt 20–40 mikrolitri. Pēc sirds punkcijas asins buferšķīduma maisījums jāiepilda testa mēģenē. Plazmu no asinīm atdala centrifugējot (20 min; 5 000 g) un līdz nepieciešamo analīžu veikšanai glabā -80°C temperatūrā.

3.C procedūra. SOP: zebrozivs; galvas un astes homogenizācija

1. Zivis atbilstoši testēšanas procedūrai anestezē un eitanazē.
2. Zivīm atbilstoši 1. attēlam nogriež galvu un asti.

Svarīgs atgādinājums: Pirms katras nākamās zivs apstrādes visi sadalīšanas instrumenti un griešanas paliktnis pienācīgi jānoskalo un jānotīra (piemēram, ar 96 % etanolu), lai neekspozētu tēviņu organismus "nepiesārņotu ar vitelogenīnu" no mātītēm vai ķīmiskajai vielai ekspozētiem tēviņiem.



3. Katras zivs apvienoto galvas un astes svaru nosaka, noapaļojot līdz tuvākajam mg.
4. Pēc nosvēršanas zivs daļas ievieto attiecīgās mēģenēs (piemēram, 1,5 mg Ependorfa mēģenēs) un līdz homogenizēšanai sasaldē -80°C temperatūrā vai tieši homogenizē uz ledus ar diviem plastmasas irbuļiem. (Ja darbības veic uz ledus un tiek iegūta viendabīga masa, var izmantot citas metodes.) Svarīgs atgādinājums: Mēģenes pienācīgi numurē, lai zivs galva un aste būtu sasaistāma ar attiecīgo ķermeņa daļu, ko izmanto gonādas histoloģijai.
5. Pēc viendabīgas masas iegūšanas pievieno ledus temperatūras **homogenizācijas buferšķīdumu** (*), kura svars 4 reizes pārsniedz audu svaru. Turpina darboties ar irbuļiem, līdz iegūst viendabīgu maisījumu. Svarīga piezīme: Katrai zivij izmanto jaunus irbuļus.
6. Līdz 30 min centrifugēšanai 4°C temperatūrā pie 50 000 g paraugus novieto uz ledus.
7. Ar pipeti vismaz divās mēģenēs katrā iepilda 20 μl supernatanta, pipetes uzgali ievietojot zem virspusē esošā tauku slāņa un rūpīgi iesūcot supernatantu bez tauku vai plāksniņu daļiņām.
8. Līdz izmantošanai mēģenes glabā -80°C temperatūrā.

(*) Homogenizācijas buferšķīdums:

— (50 mM Tris-HCl pH 7,4; 1 % proteāzes inhibitora maisījums (Sigma)): 12 ml Tris-HCl pH 7,4 + 120 μl proteāzes inhibitora maisījums.

— TRIS: TRIS-ULTRA PURE (ICN), piemēram, no Bie & Berntsen, Dānija.

— Proteāzes inhibitora maisījums: no Sigma (zīdītāju audiem); produkta numurs P 8340.

PIEZĪME. Homogenizācijas buferšķīdums jāizmanto ražotājsaņemšanas dienā. Izmantošanas laikā to novieto uz ledus.

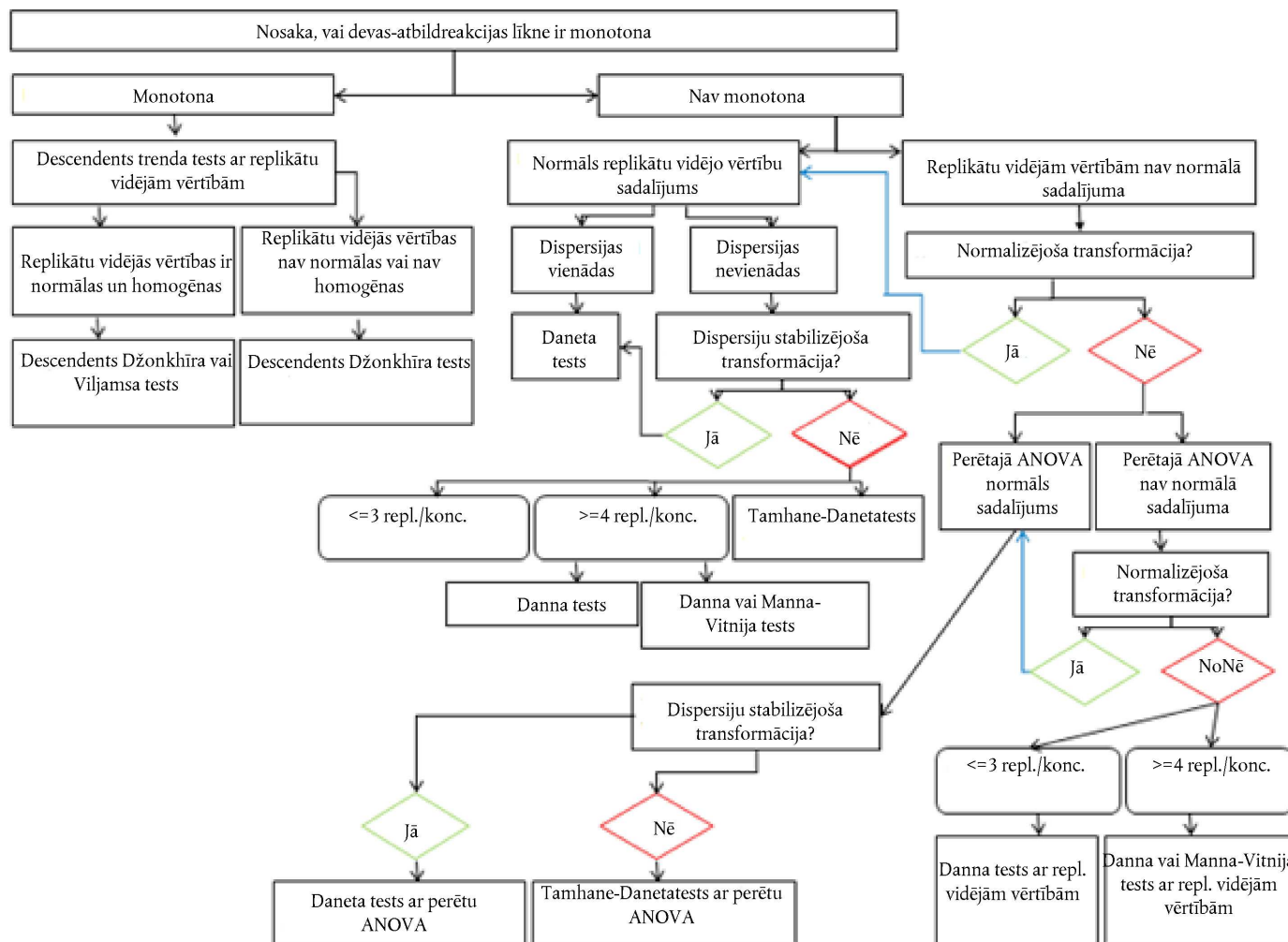
*7.papildinājums***STIPRINĀTI VITELOGENĪNA PARAUGI UN VAIRĀKIEM TESTIEM KOPĪGA REFERENCES
STANDARTVIELA**

Katrā VTG testu dienā analizē stiprinātu paraugu, kas gatavots, izmantojot vairākiem testiem kopīgu references standartvielu (7. papildinājums). Testiem kopīgās references standartvielas pagatavošanai izmantotais VTG nedrīkst būt no tās partijas, ko izmanto veicamā testa kalibrācijas standartu sagatavošanā.

Stiprināto paraugu sagatavo, kontrolgrupas tēviņa plazmas paraugam zināmā daudzumā pievienojot testiem kopīgo references standartvielu. Paraugu stiprina, lai VTG koncentrācija būtu 10 līdz 100 reizes lielāka nekā paredzamā vitelogenīna koncentrācija kontrolgrupas zivs tēviņa organismā. Kontrolgrupas tēviņa plazmas paraugs, kuru stiprina, var būt no vienas zivs vai no vairākām zivīm.

Vismaz divās dublikāties analizē apakšparaugu ar nestiprinātu kontrolgrupas tēviņa plazmu. Vismaz divās dublikāties analizē arī stiprināto paraugu. Lai noteiktu sagaidāmo koncentrāciju, vitelogenīna vidējo daudzumu abos nestiprinātajos kontrolgrupas tēviņa plazmas paraugos pieskaita aprēķinātajam VTG daudzumam, kas pievienots paraugu stiprināšanai. Šo sagaidāmās koncentrācijas un izmērītās koncentrācijas attiecību kopā ar katra attiecīgajā dienā veiktā testa rezultātiem norāda testēšanas ziņojumā.

PIEEJAS ORIENTĒJOŠU BCF APLĒŠANAI NO DATIEM, KAS IEGŪTI BARĪBEKSPŌZĪCIJAS PĒTĪJUMĀ



C.49. Zivju embriju akūtā toksiskuma (FET) tests**IEVADS**

1. Šī testēšanas metode ir līdzvērtīga ESAO testēšanas norādījumiem 236 (2013. gads). Tajā aprakstīts zivju embriju akūtā toksiskuma tests ar zebrzivi (*Danio rerio*). Šis tests ir paredzēts tam, lai noteiktu ķīmikāliju akūto toksiskumu zivs embrionālās attīstības stadijās. Zivju embriju akūtā toksiskuma testa pamatā ir ar zebrzivi veiktie pētījumi un validēšanas darbības ((1), (2), (3), (4), (5), (6), (7), (8), (9), (10), (11), (12), (13), (14)). Zivju embriju akūtā toksiskuma tests ir veiksmīgi izmantots dažādām ķīmikālijām, kam ir dažādi iedarbības veidi, šķīdība, gaistamība un hidrofobiskums (aplūkoti 15. un 16. punktā).
2. Šajā testēšanas metodē izmantotās definīcijas ir sniegtas 1. papildinājumā.

TESTA PRINCIPS

3. Tikko apaugļotus zebrzivis ikrus eksponē testējamai ķīmikālijai uz 96 stundām. Ik pēc 24 stundām kā letalitātes rādītājus reģistrē līdz četriem apikālo beigupunktu novērojumiem (6): i) apaugļotie ikri koagulējas, ii) neveidojas somīti, iii) astes dīgļis neatdalās no dzeltenuma maisiņa, un iv) nav sirdsdarbības. Beidzoties ekspozīcijas periodam, akūto toksiskumu nosaka, pamatojoties uz pozitīvu iznākumu jebkurā no četriem reģistrētajiem apikālo beigupunktu novērojumiem, un aprēķina LC_{50} .

SĀKOTNĒJIE APSVĒRUMI

4. Noderīga informācija par vielas specifiskajām īpašībām ir tās struktūrformula, molekulmasa, tīrība, noturība ūdenī un gaismā, pK_a un K_{ow} , šķīdība ūdenī un tās tvaika spiediens, kā arī bionoārdamības tests (TM C.4. (17) vai TM C.29. (18)) rezultāti. Šķīdību un tvaika spiedienu var izmantot, lai aprēķinātu Henrija likuma konstanti, kas norāda, vai var rasties testējamās vielas zudumi iztvaikošanas dēļ. Vajadzētu būt, ka vielas kvantitatīvai noteikšanai testa šķīdumos ir pieejama uzticama analītiska metode ar pārbaudītu precizitāti un noteikšanas robežu.
5. Ja šo testēšanas metodi izmanto, lai testētu maisījumu, iespējami jāraksturo tā sastāvs, piemēram, jānorāda tā komponentu ķīmiskā identitāte, komponentu kvantitatīvais sastopamības biežums un komponentvielu specifiskās īpašības (sk. 4. punktu). Pirms izmantot testēšanas metodi, lai regulatīvā nolūkā testētu maisījumu, ir jāapsver, vai ar to var iegūt paredzētajam regulatīvajam nolūkam pieņemamus rezultātus.
6. Attiecībā uz vielām, kas var aktivizēties metabolisma ceļā, ir pierādījumi, ka zebrzivis embriji ir spējīgi uz biotransformēšanu (19), (20), (21), (22). Tomēr zivs embriju vielmaiņas jauda ne vienmēr ir līdzvērtīga zivs mazuļu vai pieaugušu zivju jaudai. Piemēram, FET testā nav novērota reakcija uz toksiskas vielas prekursoru alilspirtu (9). Tāpēc, ja ir kādas liecības, ka metabolīti vai citi nozīmīgi transformācijas produkti var būt vairāk toksiski nekā izejvielu savienojums, ir ieteicams veikt testu arī ar šo metabolītu/transformācijas produktu un secinājumus par testējamās ķīmikālijas toksiskumu izdarīt, ņemot vērā arī šos rezultātus, vai arī veikt citu testu, kurā turpmāk ņem vērā vielmaiņu.
7. Nav paredzams, ka embriji būs jutīgi pret vielām ar molekulmasu $\geq 3\text{kDa}$, ar liелgabarīta molekulāro struktūru vai vielām, kas kavē izšķīlšanos un tādejādi var likvidēt vai samazināt pēcizšķīlšanās ekspozīciju, jo šādu vielu biopieejamība ir ierobežota, tādēļ piemērotāki varētu būt citi toksiskuma testi.

TESTA DERĪGUMS

8. Lai testa rezultāti būtu derīgi, piemēro šādus kritērijus:
 - a) Visu savāktu ikru kopējam apaugļošanās rādītājam testētajās partijās jābūt $\geq 70\%$.

- b) Testa kamerās visu testa laiku jāuztur ūdens temperatūra $26 \pm 1^{\circ}\text{C}$.
- c) Kopējai embriju izdzīvotībai negatīvajā (atšķaidīšanas ūdens) kontrolē un, ja tāda vajadzīga, šķīduma kontrolē līdz 96 h ekspozīcijas beigām jābūt $\geq 90 \%$.
- d) Ekspozīcijai pozitīvajā kontrolē (piemēram, zebrzivij 4,0 mg/l 3,4-dihloranilīna) 96 h ekspozīcijas beigās jābūt minimāla mirstība 30 %.
- e) Izšķīdinās rādītājam negatīvajā kontrolē (un šķīdinātāja kontrolē, ja tāda vajadzīga) 96 h ekspozīcijas beigās jābūt $\geq 80 \%$.
- f) Izšķīdusā skābekļa koncentrācijai negatīvajā kontrolē un augstākajā testējamajā koncentrācijā 96 h ekspozīcijas beigās jābūt $\geq 80 \%$ no piesātinājuma.

METODES APRAKSTS

9. Pārskats par ieteicamajiem turēšanas un testa apstākļiem ir pieejams 2. papildinājumā.

Aprīkojums

10. Ir nepieciešams šāds aprīkojums:

- a) Akvāriji no ķīmiski inerta materiāla (piemēram, stikla) ar piemērotu ietilpību attiecībā pret ieteicamo noslogojumu (sk. "Zivju pēcnācēju turēšana", 14. punkts).
- b) Mikroskops ar apgrieztu objektīva attēlu un/vai binokulāra ierīce ar vismaz 80 reižu palielinājumu. Ja novērojumu reģistrēšanas telpā temperatūru nevar noregulēt uz $26 \pm 1^{\circ}\text{C}$, ir nepieciešama pārvietojama instrumentu platforma ar regulējamu temperatūru vai citi temperatūras uzturēšanas paņēmieni.
- c) Testa kameras; piemēram, standartplates ar 24 iedobumiem, kuru dziļums ir apmēram 20 mm (sk. "Testa kameras", 11. punkts).
- d) Piemēram, pašlīmējošās plēves, ar ko apsegt 24 iedobumu plates.
- e) Ar kondicionētu gaisu un kontrolētu temperatūru aprīkots inkubators vai telpa, kurā iedobumos (vai testa kamerās) iespējams uzturēt temperatūru $26 \pm 1^{\circ}\text{C}$.
- f) pH mērīšanas aparāts.
- g) Skābekļa mērītājs (oksimetrs).
- h) Aprīkojums ūdens cietības un vadītspējas noteikšanai.
- i) Nārstošanas paplāte: instrumentu paplātes no stikla, nerūsošā tērauda vai cita inerta materiāla; stieplu sietīņš (acs 2 ± 0.5 mm) no nerūsošā tērauda vai cita inerta materiāla, kas aizsargātu nērstos ikrus; nārstošanas substrāts (piem., augu imitācijas no inerta materiāla) (TM C.48, 4.a papildinājums (23));
- j) Ikru savākšanas pipetes ar paplašinātām atverēm.
- k) Stikla trauki, kur sagatavot dažādas testējamās koncentrācijas un atšķaidīšanas ūdeni (vārglāzes, mērkolbas, mērcilindri un mērpipetes) vai ievākt zebrzivis ikrus (piemēram, mērglāzes, kristalizācijas trauki).
- l) Ja testa veikšanai izmanto alternatīvas ekspozīcijas sistēmas, piemēram, caurplūdi (24) vai pasīvo dozēšanu (25), ir nepieciešamas attiecīgas telpas un iekārtas.

Testa kameras

11. Izmanto stikla vai polistirola testa kameras (piemēram, 24 iedobumu plates ar 2,5-5 ml iepildes tilpumu katrā iedobumā). Ja ir aizdomas par adsorbēšanos uz polistirola (piemēram, nepolarizētas, planāras vielas ar augstu K_{ow}), jāizmanto inerti materiāli (stikls), lai samazinātu adsorbcijas radītos zudumus (26). Testa kameras inkubatorā jāizvieto randomizēti.

Ūdens un testa nosacījumi

12. Turēšanas ūdeni ieteicams atšķaidīt, lai panāktu dažādiem virszemes ūdeņiem raksturīgo cietības līmeni. Atšķaidīšanas ūdeni sagatavo no rekonstituēta ūdens (27). Galīgajai cietības pakāpei jābūt līdzvērtīgai 100-300 mg/l $CaCO_3$, lai pārmērīgi nenogulsnētos kalcija karbonāts. Var izmantot arī avota ūdenim līdzvērtīgu virszemes ūdeni vai avota ūdeni. Rekonstituēto ūdeni var pielāgot turēšanas ūdenim ar zemu cietības līmeni, to atšķaidot ar dejonizētu ūdeni attiecībā 1:5 līdz minimālajam cietības līmenim 30-35 mg/l $CaCO_3$. Ūdeni piesātina ar skābekli pirms testējamās ķīmikālijas pievienošanas. Visā testa laikā iedobumos jāuztur temperatūra $26 \pm 1^\circ C$. Savukārt pH līmenim jābūt starp pH 6,5 un 8,5, un testa laikā tas šajās robežās nedrīkst mainīties par vairāk nekā 1,5 vienībām. Ja nav sagaidāms, ka pH saglabāsies šajās robežās, pH jākorrigē pirms testa sākšanas. pH jākorrigē tā, lai izejšķiduma koncentrācija būtiski nemainītos un netiktu izraisīta nekāda testējamās ķīmikālijas ķīmiska reakcija vai izgulsnēšanās. pH līmeni šķīdumos, kas satur testējamo ķīmikāliju, ieteicams koriģēt ar ūdeņraža hlorīdu (HCl) un nātrija hidroksīdu (NaOH).

Testa šķīdumi

13. Testa šķīdumus izvēlētajās koncentrācijās var pagatavot, piemēram, atšķaidot izejšķīdumu. Izejšķīdumus vēlams pagatavot, testējamo ķīmikāliju vienkārši sajaucot vai kratot atšķaidīšanas ūdenī ar mehāniskiem līdzekļiem (piemēram, maisot un/vai izmantojot ultraskaņu). Ja testējamā ķīmikālija slikti šķīst ūdenī, jāievēro procedūras, kas aprakstītas ESAO Testēšanas norādījumos Nr. 23 par apiešanos ar sarežģītām vielām un maisījumiem (28). Jāvairās lietot šķīdinātājus, bet dažos gadījumos tie var būt nepieciešami, lai iegūtu piemērotas koncentrācijas izejšķīdumu. Ja šķīdinātājs tiek izmantots izejšķiduma pagatavošanā, tā galīgā koncentrācija nedrīkst pārsniegt 100 µl/l un visos testa traukos tai jābūt vienādei. Ja izmanto šķīdinātāju, ir nepieciešama šķīdinātāja papildu kontrole.

Zivju pēcnācēju turēšana

14. Ikru iegūšanai izmanto neekspozētas ikru veidošanai paredzētas savvaļas zebzivis ar labi dokumentētu ikru apaugļošanās rādītāju. Zivīm jābūt bez makroskopiski atpazīstamiem infekcijas un citu slimību simptomiem un 2 mēnešus pirms nārsta tām nedrīkst būt veikta farmakoloģiska (akūta vai profilaktiska) ārstēšana. Vairošanai paredzētās zivis tur akvārijos ar ieteicamo ietilpību 1 l ūdens uz zivi un fiksētu 12-16 stundu fotoperiodu (29), (30), (31), (32), (33). Jākorrigē optimālais filtrēšanas ātrums; nedrīkst pieļaut pārmērīgu filtrēšanas ātrumu, kas izraisa spēcīgu ūdens perturbāciju. Informāciju par barošanas režīmu sk. 2. papildinājumā. Nav ieteicams, ka rodas barības pārpalikumi, turklāt akvārijā regulāri jāuzrauga ūdens kvalitāte un tīrība un, ja vajadzīgs, tā jāatjauno sākotnējā stāvoklī.

Kompetences pārbaude

15. Lai kontrolētu testēšanā izmantoto zivju pasugas jutīgumu, standartvielu 3,4-dihloranilīnu (izmanto validēšanas pētījumos (1) (2)) testē pilnā koncentrācijas-atbildreakcijas diapazonā, vēlams divreiz gadā. Šī standartķīmikālija jāizmanto jebkurai laboratorijai, kas sāk veikt šo testu. Pirms jebkura laboratorija iesniedz datus regulatīviem mērķiem, tā var ar šīs ķīmikālijas palīdzību pierādīt savu tehnisko kompetenci šā testa veikšanā.

Ikru iegūšana

16. Zebrzivis ikrus var iegūt, izmantojot nārsta grupas (atsevišķās nārstošanas tvertnēs) vai izmantojot masveida nārstu (zivju turēšanas tvertnēs). Nārsta grupās katras vairošanās grupas zivju tēviņus un mātītes (piemēram, attiecībā 2:1) nārstošanas tvertnēs ievieto pirmstesta dienā dažas stundas pirms tumsas iestāšanās. Tā kā nārsta grupas zebrzivīm reizēm nārsts var neizdoties, ieteicams paralēli izmantot vismaz trīs nārsta tvertnes. Lai nerastos ģenētiskas cilmes novirzes, ikrus ievāc no vismaz trim vairošanās grupām, sajauc un izraugās randomizēti.
17. Lai ievāktu ikrus, nārsta krātiņus zivju nārstošanas vai turēšanas tvertnēs ievieto pirmstesta dienā pirms tumsas iestāšanās vai testa dienā pirms gaismas iestāšanās. Lai pieaugušās zebrzivis ikrus neapēstu, nārsta krātiņus pārklāj ar inerta materiāla režģi ar attiecīgu aci (apmēram $2 \pm 0,5$ mm). Ja uzskata par vajadzīgu, pie tīkla kā nārstošanas veicinātājus var piestiprināt no inerta materiāla (piemēram, plastmasas vai stikla) izgatavotus mākslīgos augus (3), (4), (5), (23), (35). Jāizmanto rūdītas plastmasas materiāli, no kuriem neizdalās vielas (piem., ftalāti). Pārošanās, nārsts un apaugļošanās notiek 30 minūšu laikā pēc gaismas iestāšanās, un tad nārsta krātiņus ar ievāktajiem ikriem var uzmanīgi izņemt. Kad ikri ievākti no nārsta krātiņiem, ieteicams tos skalot ar rekonstituētu ūdeni.

Ikru diferenciācija

18. 26°C temperatūrā apaugļoti ikri pirmoreiz dalās apmēram pēc 15 minūtēm, un sinhronās dalīšanās procesā, kas notiek pēc tam, veidojas 4, 8, 16 un 32 šūnu blastomēri (sk. 3. papildinājumu) (35). Šajās stadijās apaugļotos ikrus var skaidri identificēt, novērojot blastulas attīstību.

PROCEDŪRA

Ekspozīcijas nosacījumi

19. Testējamai ķimikālijai eksponē divdesmit embrijus uz katru koncentrāciju (viens embrijs uz iedobi). Ekspozīcijai jābūt tādai, lai visā testa laikā par ± 20 % saglabātos nominālā ķimikālijas koncentrācija. Ja statistiskā sistēmā tas nav iespējams, ir jāizmanto praktiski pielietojams pusstatistisks atjaunošanas intervāls (piem., atjaunošana ik pēc 24 stundām). Šajos gadījumos ekspozīcijas koncentrācijas vismaz augstākajā un zemākajā testējamās koncentrācijas kategorijā jāverificē katra ekspozīcijas intervāla sākumā un beigās (sk. 36. punktu). Ja ekspozīcijas koncentrāciju nevar uzturēt ± 20 % apjomā no nominālās koncentrācijas, visas koncentrācijas katra ekspozīcijas intervāla sākumā un beigās ir jāmēra (sk. 36. punktu). Pēc atjaunošanas jāgādā, ka embrijus no izžūšanas joprojām sargā neliels daudzums veco testa šķīdumu. Testa plānu var koriģēt, lai būtu apmierinātas konkrētu vielu testēšanas prasības (piem., viegli noārdāmām vai stipri adsorbītvām vielām (29) izmantojot caurplūdes (24) vai pasīvās dozēšanas sistēmas (25), vai gaistošām vielām (36) (37) citas sistēmas). Jebkurā gadījumā jāraugās, lai stresu embrijiem samazinātu līdz minimumam. Pirms testa sākšanas testa kameras vismaz 24 stundas ilgi jākonducionē ar testējamiem šķīdumiem. Testa nosacījumi ir apkopoti 2. papildinājumā.

Testējamās koncentrācijas

20. Atbilstību statistikas prasībām parasti var nodrošināt, ja ir piecas testējamās vielas koncentrācijas, ko citu no citas šķir konstants koeficients, kurš nepārsniedz 2,2. Ja izmanto mazāk nekā piecas koncentrācijas, tas jāpamato. Vēlams, lai augstākā testētā koncentrācija izraisītu 100 % letalitāti (definēta 28. punktā) un lai zemākā testētā koncentrācija neizraisītu nekādu novērojamu ietekmi. Attiecīgo koncentrāciju diapazonu var izraudzīties, pirms izšķirīgā testa veicot devu diapazona noteikšanas testu. Devu diapazonu parasti nosaka, uz vienu koncentrāciju izmantojot desmit embrijus. Turpmākie norādījumi attiecas uz testa veikšanu ar 24 iedobumu platēm. Ja izmanto atšķirīgus testa traukus (piem., mazas Petri plates) vai testē vairāk koncentrāciju, norādījumi attiecīgi jākorģē.

21. Detalizēta informācija un vizuāli norādījumi par koncentrāciju sadalījumu 24 iedobumu platēs ir pieejami 27. punktā un 4. papildinājuma 1. zīmējumā.

Kontroles

22. Atšķaidīšanas ūdens kontroles ir nepieciešamas gan kā negatīva kontrole, gan kā plašu iekšējās kontroles. Ja iekšējā plates kontrolē novēro vairāk nekā vienu nedzīvu embriju, plati atmet, tādējādi samazinot LC_{50} atvasināšanai izmantoto koncentrāciju skaitu. Ja atmet visu plati, novērotās ietekmes izvērtēt un izšķirt var kļūt daudz grūtāk, it īpaši, ja nederīgā plate ir šķīdinātāja kontroles plate vai plate, kurā ir arī apstrādāti embriji. Pirmajā gadījumā tests ir jāatkārto. Otrajā gadījumā sakarā ar to, ka iekšējā kontrolē novērotas mirstības dēļ zaudēta vesela apstrādes grupa vai grupas, spēja izvērtēt ietekmi un noteikt LC_{50} vērtības var samazināties.
23. Ar katru testēšanai izmantoto ikru partiju izdara pozitīvu kontroli ar fiksētu koncentrāciju — 4 mg/l 3,4-dihloranilīna.
24. Ja izmanto šķīdinātāju, šķīdinātājam atsevišķā 24 iedobumu platē eksponē papildu grupu ar 20 embrijiem, proti, izmanto par šķīdinātāja kontroli. Lai tests būtu uzskatāms par pieņemamu, būtu jāpierāda, ka šķīdinātājam nav nekādas būtiskas ietekmes uz izšķilšanās rādītāju vai izdzīvotību un nekādas citādas kaitīgas ietekmes uz embrijiem (sal. ar 8.c punktu).

Ekspozīcijas sākšana un testa ilgums

25. Testu uzsāk iespējami drīz pēc ikru apaugļošanās un izbeidz pēc 96 h ekspozīcijas. Embriji testa šķīdumos jāiegremdē, pirms sāk dalīties blastodisks vai vēlākais līdz 16 šūnu stadijai. Lai ekspozīcijas sākšana būtu kavēta minimāli, randomizēti atlasa ikrus tādā daudzumā, kas vismaz divreiz pārsniedz katrai apstrādes grupai vajadzīgo daudzumu, un ne vēlāk kā 90 minūtes pēc apaugļošanās ievieto attiecīgajās koncentrācijās un kontrolēs (piemēram, 100 ml kristalizācijas traukos; ikriem jābūt pilnībā nosegtiem).
26. Dzīvotspējīgi apaugļoti ikri jāatdala no neapaugļotiem ikriem un 180 minūšu laikā pēc apaugļošanās jāievieto 24 iedobumu platēs, kas iepriekš kondicionētas 24 stundas un piepildītas ar 2 ml svaigi pagatavota testējamā šķīduma uz iedobumu. Ar stereomikroskopu (vēlams ≥ 30 reižu palielinājums) atlasa apaugļotos ikrus, kuriem vērojama dalīšanās un dalīšanās laikā nav acīm redzamas novirzes (piemēram, asimetrija, vezikulas veidošanās) vai traumēts horijs. Par ikru savākšanu un atlasī sk. 3. papildinājuma 1. un 3. attēlu un 4. papildinājuma 2. attēlu.

Ikru sadalījums pa 24 iedobumu platēm

27. Ikri tiek sadalīti pa iedobumu platēm šādā skaitā (sk. arī 4. papildinājuma 1. attēlu).

- 20 ikri vienā platē katrai testējamajai koncentrācijai;
- 20 ikri šķīdinātāja kontrolē uz vienas plates (ja vajadzīgs);
- 20 ikri kā pozitīvā kontrole uz vienas plates;
- 4 ikri atšķaidīšanas ūdenī kā iekšējā plates kontrole katrā no iepriekš minētajām platēm;
- 24 ikri atšķaidīšanas ūdenī kā negatīvā kontrole uz vienas plates.

Novērojumi

28. Katram embrijam veiktie apikālo beigupunktu novērojumi ir: embriju koagulēšanās, somītu neveidošanās, astes neatdalīšanās un sirdsdarbības neesība (1. tabula). Šie novērojumi tiek izmantoti, lai noteiktu mirstību: pozitīvs rezultāts jebkurā no šiem novērojumiem nozīmē, ka zebrzivs embrijs ir nedzīvs. Turklāt testējamās grupās un kontrolgrupās katru dienu, sākot no 48 h, reģistrē izšķilšanos. Novērojumus reģistrē ik pēc 24 h līdz testa pabeigšanai.

1. tabula

Zebrzivs embriju akūtā toksiskuma apikālo beigupunktu novērojumi 24–96 h pēc apaugļošanās

	Ekspozīcijas laiks			
	24 h	48 h	72 h	96 h
Koagulējušies embriji	+	+	+	+
Neveidojas somīti	+	+	+	+
Neatdalās aste	+	+	+	+
Neesoša sirdsdarbība		+	+	+

29. *Embriju koagulēšanās*. Koagulējušies embriji ir pienbalti un mikroskopā izskatās tumši (sk. 5. papildinājuma 1. att.). Koagulējušos embriju skaitu nosaka pēc 24, 48, 72 un 96 h.
30. *Neveidojas somīti*. Normāli attīstītam zebrzivs embrijam $26 \pm 1^{\circ}\text{C}$ temperatūrā pēc 24 stundām izveidojas apmēram 20 somītu (sk. 5. papildinājuma 2. att.). Normāli attīstītam embrijam vērojamas spontānas kustības (sānvirziena kontrakcijas). Spontānas kustības liecina par somītu veidošanos. Somītu trūkumu reģistrē pēc 24, 48, 72 un 96 h. Somītu neveidošanās pēc 24 h varētu būt saistīta ar vispārīgu attīstības atpalcību. Somītu veidošanās procesam jāsākas vēlākais pēc 48 stundām. Ja tie neveidojas, embrijus uzskata par nedzīviem.
31. *Neatdalās aste*. Normāli attīstītam zebrzivs embrijam astes atdalīšanos (sk. 5. papildinājuma 3. att.) no dzeltenuma novēro pēc tam, kad pagarinājusies embrija ķermeņa mugurdaļa. Astes neatdalīšanos reģistrē pēc 24, 48, 72 un 96 h.
32. *Sirdsdarbības neesība*. Normāli attīstītam zebrzivs embrijam $26 \pm 1^{\circ}\text{C}$ temperatūrā pēc 48 stundām ir novērojama sirdsdarbība (sk. 5. papildinājuma 4. attēlu). Reģistrējot šo beigupunktu, jāievēro īpaša piesardzība, jo neregulāra (neparasta) sirdsdarbība nav jāreģistrē kā letāls iznākums. Turklāt par letālu netiek uzskatīta redzama sirdsdarbība bez asinsrites *aortas abdominalis*. Lai reģistrētu šo beigupunktu, embriji, kas neuzrāda nekādas sirdsdarbības pazīmes, izmantojot minimālo palielinājumu 80x, jānovēro vismaz vienu minūti. Sirdsdarbības neesību reģistrē pēc 48, 72 un 96 h.
33. Visās testa un kontroles grupās jāreģistrē izšķilšanās rādītājs un tas ziņojumā jāatspoguļo pēc 48 stundām un pēc tam. Izšķilšanās gan nav kritērijs, ko izmanto, lai aprēķinātu LC_{50} , taču tā nozīmē, ka embrijs tiek eksponēts bez horija kavējošās ietekmes, un tādējādi var palīdzēt datu interpretācijā.
34. Zebrzivs embrija normālas attīstības (35) un patoloģiskas attīstības piemēri ir sīki aprakstīti 3. un 5. papildinājumā.

Analītiskie mērījumi

35. Testa sākumā un beigās kontrolē(-s) un augstākajā testējamās ķīmikālijas koncentrācijā mēra pH līmeni, vispārējo cietību un vadītspēju. Pusstatiskās atjaunošanas sistēmās pH jāmēra gan pirms, gan pēc ūdens atjaunošanas. Izšķīdušā skābekļa koncentrāciju mēra testa beigās negatīvajās kontrolēs un augstākajā testējamajā koncentrācijā ar dzīvotspējīgiem embrijiem, un tai jāatbilst testa derīguma kritērijiem (sk. 8.f punktu). Ja ir bažas, ka temperatūra 24 iedobumu platēs svārstās, temperatūru mēra trīs randomizēti izraudzītos traukos. Temperatūru testa laikā vēlams reģistrēt nepārtraukti vai vismaz katru dienu.
36. Statiskā sistēmā testējamās vielas koncentrāciju mēra vismaz augstākajā un zemākajā testējamajā koncentrācijā, bet vēlams visās apstrādes grupās testa sākumā un beigās. Pusstatiskajos (atjaunošanas) testos, kuros sagaidāms, ka testējamās ķīmikālijas koncentrācija saglabāsies $\pm 20\%$ robežās no nominālajām vērtībām, ir ieteicams analizēt vismaz augstāko un zemāko testējamo koncentrāciju, kas pagatavota tieši pirms atjaunošanas. Testos, kuros sagaidāms, ka testējamās ķīmikālijas koncentrācija nesaglabāsies $\pm 20\%$ robežās no nominālās vērtības, ir jāanalizē visas testējamās koncentrācijas, kas pagatavotas tieši pirms atjaunošanas. Ja apjoms ir analīzei nepietiekams, var būt lietderīgi apvienot testa šķīdumus vai izmantot aizstājējkameras, kas izgatavotas no tā paša materiāla un kurām ir tāds pats tilpums attiecībā pret virsmas laukuma rādītājiem kā 24 iedobumu platēm. Ir ļoti ieteicams rezultātus pamatot ar izmērītajām koncentrācijām. Ja nesaglabājas koncentrācija 80–120 % no nominālās koncentrācijas, ietekmi izraisošā koncentrācija jāizsaka attiecībā pret ģeometrisku vidējo izmērīto koncentrāciju; sīkāku informāciju sk. ESAO norādījumos par sarežģītu vielu un maisījumu toksiskuma testēšanu ūdenī (28).

ROBEŽTESTS

37. Izmantojot šajā testēšanas metodē aprakstītās procedūras, robežtestu var veikt ar testējamo ķīmikāliju koncentrācijā 100 mg/l vai ar koncentrāciju pie tās šķīdības robežas testa barotnē (atkarībā no tā, kurš no šiem rādītājiem ir zemāks), lai pierādītu, ka LC_{50} pārsniedz šo koncentrāciju. Robežtests jāveic, izmantojot 20 apstrādes embrijus, pozitīvo kontroli un, ja vajadzīgs, šķīdinātāja kontroli un 24 embriju negatīvo kontroli. Ja testējamai koncentrācijai letalitātes procents par 10 % pārsniedz mirstību negatīvajā kontrolē (vai šķīdinātāja kontrolē), pētījums jāveic pilnībā. Jāreģistrē jebkāda novērota ietekme. Ja mirstība negatīvajā kontrolē (vai šķīdinātāja kontrolē) pārsniedz 10 %, tests kļūst nederīgs un ir jāatkārto.

DATI UN ZIŅOŠANA**Rezultātu apstrāde**

38. Šajā testā atsevišķie iedobumi tiek uzskatīti par statistiskās analīzes neatkarīgiem replikātiem. Tādu embriju procentuālos daudzumus, attiecībā uz kuriem 48 stundās un/vai 96 stundās ir pozitīvs vismaz viens no apikālo beigupunktu novērojumiem, atspoguļo grafiski atbilstoši testējamajām koncentrācijām. Lai aprēķinātu līknes virziena koeficientus, LC_{50} vērtības un ticamības robežas (95 %), jāizmanto attiecīgas statistikas metodes (38) un OECD Guidance Document on Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data (39).

Testēšanas pārskats

39. Testēšanas pārskatā norāda šādu informāciju:

Testējamā ķīmikālija:

Vienkomponenta viela:

— fiziskais izskats, šķīdība ūdenī un papildu attiecīgās fizikālķīmiskās īpašības;

- ķīmiskā identitāte, piemēram, IUPAC vai CAS nosaukums, CAS numurs, SMILES vai InChI kods, struktūrformula, tīrība, piemaisījumu ķīmiskā identitāte attiecīgā gadījumā un, ja praktiski iespējams, u. c. (attiecīgā gadījumā arī organiskā oglekļa saturs).

Vairākkomponentu viela, UVCB vielas un maisījumi:

- tiek iespējami izsmeljoši raksturoti pēc to komponentu ķīmiskās identitātes (sk. iepriekš), kvantitatīvās sastopamības un attiecīgajām fizikālķīmiskajām īpašībām.

Testa organismi:

- zinātniskais nosaukums, pasuga, izcelsmes avots un apaugļotu ikru savākšanas metode un turpmāka apstrāde.

Testa nosacījumi:

- izmantotā testa procedūra (piemēram, pusstatistiska atjaunošana);
- gaismas periods;
- testa plāns (piemēram, testa kameru skaits, kontroles veidi);
- ūdens kvalitātes īpašības zivju turēšanai (piemēram, pH, cietība, temperatūra, elektrovadītspēja, izšķīdušais skābeklis);
- izšķīdušā skābekļa koncentrācija, pH, kopējā cietība, temperatūra un testējamo šķīdumu vadītspēja testa sākumā un pēc 96 h;
- izejšķīdumu un testa šķīdumu sagatavošanas metode, kā arī atjaunošanas biežums;
- šķīdinātāja izmantošanas pamatojums un šķīdinātāja izveles pamatojums, ja tas nav ūdens;
- nominālās testējamās koncentrācijas un visu to analīžu rezultāti, ar kurām noteiktas testējamās ķimikālijas koncentrāciju testa traukos; ziņojumā jāatspoguļo arī metodei piemītošā atgūstamība un kvantitatīvās noteikšanas robeža (LoQ);
- pierādījumi, ka kontroles atbilstošas vispārējiem izdzīvotības derīguma kritērijiem;
- ikru apaugļošanās rādītājs;
- izšķilšanās rādītājs apstrādes un kontroles grupās.

Rezultāti:

- maksimālā koncentrācija, kas testa laikā neizraisa mirstību;
- minimālā koncentrācija, kas testa laikā izraisa 100 % mirstību;
- ieteiktajā novērošanas laikā kumulatīvā mirstība katrā koncentrācijā;
- LC_{50} vērtības pēc 96 h (un fakultatīvi pēc 48 h) attiecībā uz mirstību ar 95 % ticamības robežu, ja iespējams;
- koncentrācijas un mirstības līknes diagramma testa beigās;
- mirstība kontrolēs (negatīvajās kontrolēs, iekšējās plašu kontrolēs, kā arī izmantotajā pozitīvajā kontrolē un šķīdinātāja kontrolē);
- rezultātu dati par katru no četriem apikālā beigupunkta novērojumiem;
- morfoloģisko un fizioloģisko anomāliju biežums un apraksts, ja tādas novērotas (sk. piemērus 5. papildinājuma 2. attēlā);
- tādi incidenti testa gaitā, kas varējuši ietekmēt rezultātus;

- datu statistiskā analīze un apstrāde (probita analīze, logistiskās regresijas modelis un vidējais ģeometriskais attiecībā uz LC_{50});
- (pārveidota) koncentrācijas–atbildreakcijas regresijas līknes virziena koeficienti un ticamības robežas.

Jebkura novirze no testēšanas metodes un attiecīgi skaidrojumi.

Apspriešana un rezultātu interpretācija.

LITERATŪRA

- (1) OECD (2011) Validation Report (Phase 1) for the Zebrafish Embryo Toxicity Test: I un II daļa. *Series on Testing and Assessment* No. 157, OECD, Paris.
- (2) OECD (2012) Validation Report (Phase 2) for the Zebrafish Embryo Toxicity Test: Part I and Part II (Annexes). *Series on Testing and Assessment* No. 179, OECD, Paris.
- (3) Braunbeck, T., Böttcher, M., Hollert, H., Kosmehl, T., Lammer, E., Leist, E., Rudolf, M. and Seitz, N. (2005) Towards an alternative for the acute fish LC_{50} test in chemical assessment: The fish embryo toxicity test goes multi-species-an update. *ALTEX* 22: 87-102.
- (4) ISO (2007) International Standard Water quality – Determination of the acute toxicity of waste water to zebrafish eggs (*Danio rerio*). ISO 15088:2007(E) International Organization for Standardization.
- (5) Nagel, R. (2002) DarT: The embryo test with the zebrafish (*Danio rerio*) – a general model in ecotoxicology and toxicology. *ALTEX* 19: 38-48.
- (6) Schulte, C. and Nagel, R. (1994) Testing acute toxicity in embryo of zebrafish, *Brachydanio rerio* as alternative to the acute fish test – preliminary results. *ATLA* 22, 12-19.
- (7) Bachmann, J. (2002) Development and validation of a teratogenicity screening test with embryos of the zebrafish (*Danio rerio*). PhD-thesis, Technical University of Dresden, Germany.
- (8) Lange, M., Gebauer, W., Markl, J. and Nagel, R. (1995) Comparison of testing acute toxicity on embryo of zebrafish (*Brachydanio rerio*), and RTG-2 cytotoxicity as possible alternatives to the acute fish test. *Chemosphere* 30/11: 2087-2102.
- (9) Knöbel, M., Busser, F.J.M., Rico-Rico, A., Kramer, N.I., Hermens, J.L.M., Hafner, C., Tanneberger, K., Schirmer, K., Scholz, S. (2012). Predicting adult fish acute lethality with the zebrafish embryo: relevance of test duration, endpoints, compound properties, and exposure concentration analysis. *Environ. Sci. Technol.* 46, 9690-9700.
- (10) Kammann, U., Vobach, M. and Wosniok, W. (2006) Toxic effects of brominated indoles and phenols on zebrafish embryos. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 51: 97-102.
- (11) Groth, G., Kronauer, K. and Freundt, K.J. (1994) Effects of *N,N*-dimethylformamide and its degradation products in zebrafish embryos. *Toxicol. In Vitro* 8: 401-406.
- (12) Groth, G., Schreeb, K., Herdt, V. and Freundt, K.J. (1993) Toxicity studies in fertilized zebrafish fish eggs treated with *N*-methylamine, *N,N*-dimethylamine, 2-aminoethanol, isopropylamine, aniline, *N*-methylaniline, *N,N*-dimethylaniline, quinone, chloroacetaldehyde, or cyclohexanol. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 50: 878-882.
- (13) Nguyen, L.T. and Janssen, C.R. (2001) Comparative sensitivity of embryo-larval toxicity assays with African catfish (*Clarias gariepinus*) and zebra fish (*Danio rerio*). *Environ. Toxicol.* 16: 566-571.
- (14) Cheng, S.H., Wai, A.W.K., So, C.H. and Wu, R.S.S. (2000) Cellular and molecular basis of cadmium-induced deformities in zebrafish embryos. *Environ. Toxicol. Chem.* 19: 3024-3031.
- (15) Belanger, S. E., Rawlings J. M. and Carr G. J.. Use of Fish Embryo Toxicity Tests for the Prediction of Acute Fish Toxicity to Chemicals. *Environmental Toxicology and Chemistry* (Accepted).

- (16) Lammer, E., Carr, G. J., Wendler, K., Rawlings, J. M., Belanger, S. E., Braunbeck, T. (2009) Is the fish embryo toxicity test (FET) with the zebrafish (*Danio rerio*) a potential alternative for the fish acute toxicity test? Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.: 149 (2), 196-209
- (17) Šā pielikuma C.4. nodaļa: Ready Biodegradability.
- (18) Šā pielikuma C.29. nodaļa: Ready Biodegradability, CO₂ in sealed vessels.
- (19) Weigt, S., Huebler, N., Strecker, R., Braunbeck, T., Broschard, T.H. (2011) Zebrafish (*Danio rerio*) embryos as a model for testing proteratogens. Toxicology 281: 25-36.
- (20) Weigt, S., Huebler, N., Strecker, R., Braunbeck, T., Broschard, T.H. (2012) Developmental effects of coumarin and the anticoagulant coumarin derivative warfarin on zebrafish (*Danio rerio*) embryos. Reprod. Toxicol. 33: 133-141.
- (21) Incardona, J.P., Linbo, T.L., Scholz, N.L. (2011) Cardiac toxicity of 5-ring polycyclic aromatic hydrocarbons is differentially dependent on the aryl hydrocarbon receptor 2 isoform during zebrafish development. Toxicol. Appl. Pharmacol. 257: 242-249.
- (22) Kubota, A., Stegeman, J.J., Woodin, B.R., Iwanaga, T., Harano, R., Peterson, R.E., Hiraga, T., Teraoka, H. (2011) Role of zebrafish cytochrome P450 CYP1C genes in the reduced mesencephalic vein blood flow caused by activation of AHR2. Toxicol. Appl. Pharmacol. 253: 244-252.
- (23) Šā pielikuma C.48. nodaļa: Fish Short Term Reproduction Assay. Sk. 4.a papildinājumu.
- (24) Lammer, E., Kamp, H.G., Hisgen, V., Koch, M., Reinhard, D., Salinas, E.R., Wendler, K., Zok, S., Braunbeck, T. (2009) Development of a flow-through system for the fish embryo toxicity test (FET) with zebrafish (*Danio rerio*). Toxicol. in vitro 23: 1436-1442.
- (25) Brown, R.S., Akhtar, P., Åkerman, J., Hampel, L., Kozin, I.S., Villerius, L.A., Klammer, H.J.C., (2001) Partition controlled delivery of hydrophobic substances in toxicity tests using poly(dimethylsiloxane) (PDMS) films. Environ. Sci. Technol. 35, 4097-4102.
- (26) Schreiber, R., Altenburger, R., Paschke, A., Küster, E. (2008) How to deal with lipophilic and volatile organic substances in microtiter plate assays. Environ. Toxicol. Chem. 27, 1676-1682.
- (27) ISO (1996) International Standards. Water quality – Determination of the acute lethal toxicity of substances to a freshwater fish [*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae)]. ISO 7346-3: Flow-through method. Pieejams: [http://www.iso.org].
- (28) OECD (2000) Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. Series on Testing and Assessment No. 23, OECD, Paris.
- (29) Laale, H.W. (1977) The biology and use of zebrafish, *Brachydanio rerio*, in fisheries research. A literature review. J. Fish Biol. 10: 121-173.
- (30) Westerfield, M. (2007) The zebrafish book: A guide for the laboratory use of zebrafish (*Brachydanio rerio*). 5th edition. Eugene, University of Oregon Press, Institute of Neuroscience, USA.
- (31) Canadian Council on Animal Care (2005) Guidelines on: the Care and Use of Fish in Research, Teaching and Testing, ISBN: 0-919087-43-4 <http://www.ccac.ca/Documents/Standards/Guidelines/Fish.pdf>
- (32) Eiropas Komisija (2007). Komisijas 2007. gada 18. jūnija Ieteikums 2007/526/EK par izvietošanas un aprūpes vadlīnijām attiecībā uz dzīvniekiem, kurus izmanto izmēģinājumos un citiem zinātniskiem mērķiem (izziņots ar dokumenta numuru C(2007) 2525) [<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2007:197:0001:0089:EN:PDF>]
- (33) Eiropas Savienība (2010). Eiropas Parlamenta un Padomes 2010. gada 22. septembra Direktīva 2010/63/ES par zinātniskiem mērķiem izmantojamo dzīvnieku aizsardzību. (Eiropas Savienības Oficiālais Vēstnesis L 276:33-79.) 20.10.2010.

-
- (34) Nagel, R. (1986) Untersuchungen zur Eiproduktion beim Zebraabrbiling (*Brachydanio rerio*, Ham.-Buch.). J. Appl. Ichthyol. 2: 173-181.
- (35) Kimmel, C.B., Ballard, W.W., Kimmel, S.R., Ullmann, B. and Schilling, T.F. (1995) Stages of embryonic development of the zebrafish. Dev. Dyn. 203: 253-310.
- (36) Šā pielikuma C.2. nodaļa: *Daphnia* sp., Acute Immobilistaion Test.
- (37) Weil, M., Scholz, S., Zimmer, M., Sacher, F., Duis, K. (2009) Gene expression analysis in zebrafish embryos: a potential approach to predict effect concentrations in the fish early life stage test. Environ. Toxicol. Chem. 28: 1970-1978
- (38) ISO (2006) International Standard. Water quality – Guidance on statistical interpretation of ecotoxicity data ISO TS 20281. Pieejams: [<http://www.iso.org>].
- (39) OECD (2006) Guidance Document on Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: a Guidance to Application. Series on Testing and Assessment No. 54. OECD, Paris.
- (40) Braunbeck, T., Lammer, E., 2006. Detailed review paper "Fish embryo toxicity assays". UBA report under contract no. 20385422 German Federal Environment Agency, Berlin. 298 pp.
-

1. papildinājums

DEFINĪCĪJAS

Apikālais beigupunkts ir ietekmes radīšana populācijas līmenī.

Blastula ir tāds šūnu veidojums ap dzīvnieka olšūnas kodolu, kas aptver noteiktu daļu no dzeltenuma.

Ķīmikālija ir viela vai maisījums.

Epibolija ir — galvenokārt epidermas šūnu — masveida vairošanās embrija gastrulācijas stadijā un no muguras uz vēdera pusi notiekoša to pārvietošanās, ar kuru endodermas šūnu slāņi tiek iekļauti invaginācijai līdzīgā procesā un dzeltenums tiek ietverts embrijā.

Caurplūdes tests ir tests ar testējamo šķīdumu nepārtrauktu plūsmu caur testa sistēmu visā ekspozīcijas laikā.

Iekšēja plates kontrole ir iekšējā kontrole, kas sastāv no 4 iedobumiem, kuri katrā 24 iedobumu platē piepildīti ar atšķaidīšanas ūdeni, un kas paredzēta, lai noteiktu potenciālo piesārņojumu, ko procedūras laikā radījis ražotājs vai pētnieks, un jebkādu plates iedarbību, kas var ietekmēt testa rezultātus (piemēram, temperatūras gradients).

IUPAC ir Starptautiskā Teorētiskās un lietišķās ķīmijas savienība.

Turēšanas ūdens ir ūdens, kurā tur pieaugušas zivis.

Vidējā letālā koncentrācija (LC₅₀) ir testējamās ķīmikālijas koncentrācija, kas testa laikā tiek uzskatīta par letālu 50 % testa organismu.

Pusstatiskais atjaunošanas tests ir tests ar testa šķīdumu regulāru atjaunošanu pēc noteiktiem laika periodiem (piemēram, ik pēc 24 h).

SMILES ir Vienkāršotas molekulāro datu ievades lineāras izteiksmes sistēma.

Somīts jaunattīstītiem mugurkaulnieku embrijiem ir mezodermas slānis, kas klāj nervu caurulītes sienas un eventuāli attīstās par ādu (*dermatome*), skeleta muskuļiem (*myotome*) un skriemeļiem (*sclerotome*).

Statisks tests ir tests, kurā testa šķīdumus nemaina visā testa laikā.

Testējamā ķīmikālija ir jebkura viela vai maisījums, kuru testē ar šo testēšanas metodi.

UVCB ir vielas ar nezināmu vai mainīgu sastāvu, kompleksi reakcijas produkti vai bioloģiski materiāli.

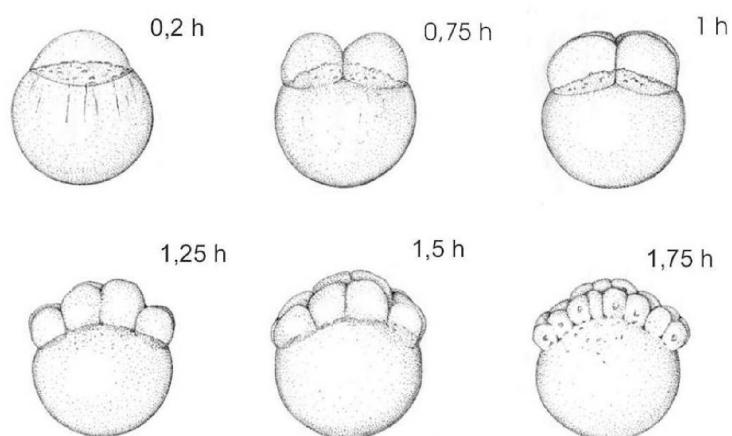
2. papildinājums

ZEBRZIVS TURĒŠANA, PAVAIROŠANA UN TIPISKI NOSACĪJUMI EMBRIJU AKŪTA TOKSISKUMA TESTIEM

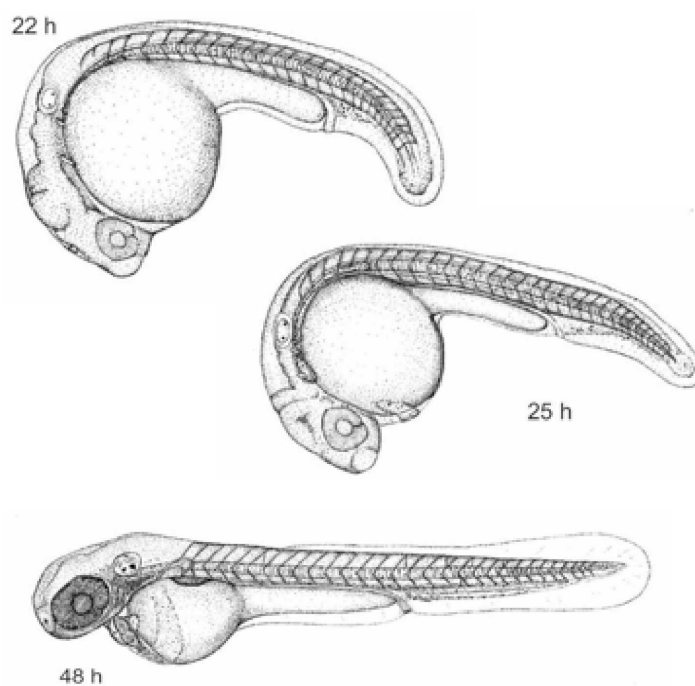
Zebrzivs (<i>Danio rerio</i>)		
Sugas izcelsmes vieta		Indija, Birma, Melaka, Sumatra
Dzimundimorfisms		Mātītes: izteikts vēders, kad tās iznēsā ikrus Tēviņi: tievāki, oranžs tonis zilās krāsas garenu svītru starpās (jo īpaši novērojams pie anālās spuras)
Barošanas režīms		Sausu pārslu barība (maks. 3 % no zivju svara dienā) 3–5 reizes dienā; papildus sālsūdens garneles (<i>Artemia</i> s.) un/vai no nepiesārņota avota iegūtas attiecīga lieluma mazas dafnijas. Barošana ar dzīvu barību bagātina vidi, tāpēc iespējami jābāro ar dzīvu barību. Lai nodrošinātu optimālu ūdens kvalitāti, apmēram vienu stundu pēc barošanas jāaizvāc liekā barība un fekālijas.
Pieaugušu zivju aptuvenais svars		Mātītes: 0,65 ± 0,13 g Tēviņi: 0,5 ± 0,1 g
Vecākvivju turēšana	Gaismas režīms	Dienasgaismas spuldzes (plaša spektra); 10-20 μE/m ² /s, 540-1080 lux vai 50-100 ft-c (ambienti laboratorijas līmeņi); fotoperiods 12-16 h
	Ūdens temperatūra	26° ± 1 °C
	Ūdens kvalitāte	O ₂ piesātinājums ≥ 80 %, cietība: piemēram, ~30-300 mg/l CaCO ₃ , NO ₃ ⁻ : ≤ 48 mg/l, NH ₄ ⁺ un NO ₂ ⁻ : < 0,001 mg/l, hlora atlikums < 10 μg/l, kopējais organiskais hlors < 25 ng/l, pH = 6,5-8,5
	Papildu ūdens kvalitātes kritēriji	Daļiņas < 20 mg/l, kopējais organiskais ogleklis < 2 mg/l, kopējais fosfororganisko pesticīdu daudzums < 50 ng/l, kopējais hlororganisko pesticīdu un polihlorēto bifenilu daudzums < 50 ng/l
	Zivju turēšanas tvertnes izmērs	piemēram, 180 l, 1 zivs uz litru
	Ūdens attīrīšana	Permanenta (ogles filtrēta); citas iespējas ir pusstatiskas atjaunošanas tehnisko uzturēšanu vai caurplūdes sistēmu kombinēt ar nepārtrauktu ūdens atjaunošanu
	Vairošanai ieteicamā tēviņu un mātīšu attiecība	2:1 (vai masveida nārsts)
Nārsta tvertnes		piemēram, 4 l tvertnes, aprīkotas ar tērauda režģa apakšu un augu imitācijām kā nārsta stimulētājiem; ārējās apsildes paklāji vai masveida nārstošana zivju turēšanas tvertnēs
Ikru struktūra un izskats		Stabils horijs (t. i., ļoti caurspīdīgs, bez lipīgas konsistences, ar diametru ~ 0,8–1,5 mm)
Nārstošanas intensitāte		Viena nobriedusi mātīte iznārsto vismaz 50-80 ikrus dienā. Atkarībā no pasugas nārstošanas intensitāte var būt krietni augstāka. Apauglošanās rādītājam jābūt ≥ 70 %. Pirmo reizi nārstojošām zivīm pirmajos nārstos ikru apauglošanās rādītājs var būt mazāks.
Testa veids		Statisks, pusstatiska atjaunošana, caurplūde, 26 ± 1°C, 24 h kondicionētas testa kameras (piemēram, 24 iedobumu plates ar 2,5-5 ml uz dobumu).

3. papildinājums

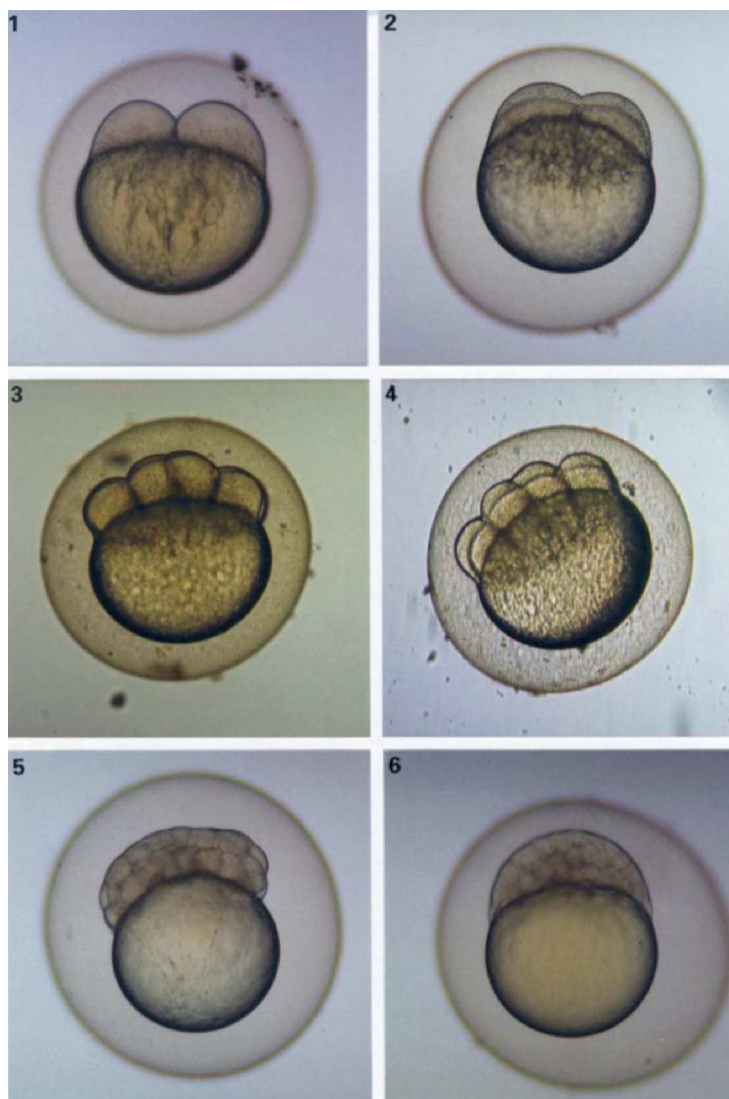
NORMĀLA ZEBRZIVS ATTĪSTĪBA 26°C TEMPERATūrĀ



1. attēls. Daži zebzivs (*Danio rerio*) agrīnās attīstības posmi: 0,2–1,75 h pēc apaugļošanās (Kimmel *et al.*, 1995 (35)). Pēc normālatīstības laika grafika var diagnosticēt gan ikru apaugļošanos, gan to dzīvotspēju (sk. 26. punktu “Apaugļoto ikru atlase”).



2. attēls. Izraudzītas ir zebzivs (*Danio rerio*) vēlinās attīstības stadijas (lai optimizētu redzamību, embrijam atdalīts horijs): 22–48 h pēc apaugļošanās (Kimmel *et al.*, 1995 (35)).

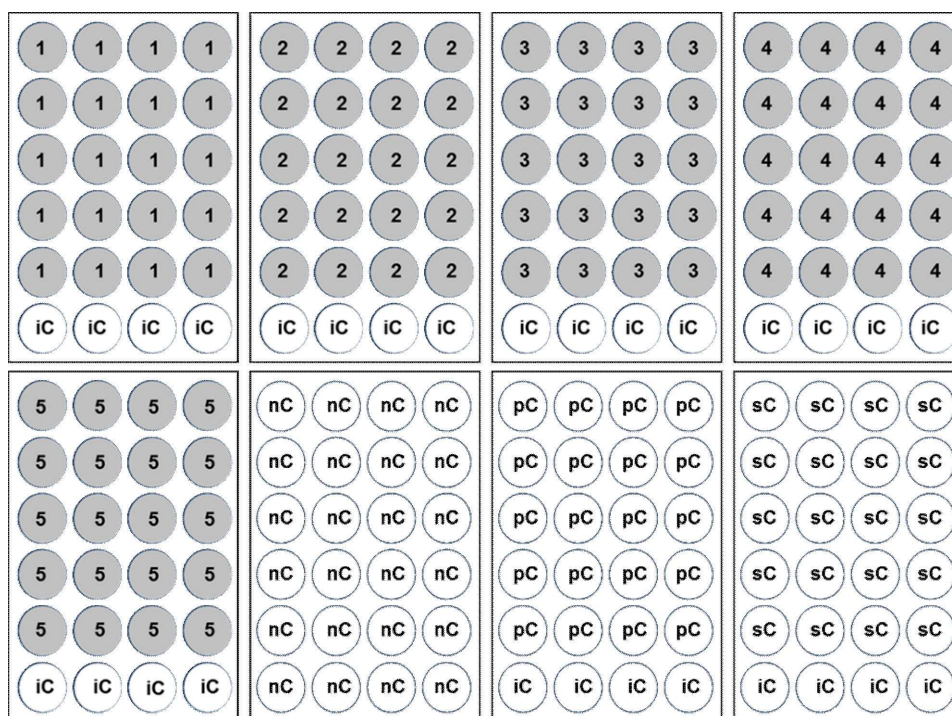


3. attēls. Zebrzivs (*Danio rerio*) embriju normāla attīstība: (1) 0,75 h, 2 šūnu stadija; (2) 1 h, 4 šūnu stadija; (3) 1,2 h, 8 šūnu stadija; (4) 1,5 h, 16 šūnu stadija; (5) 4,7 h, epibolijas sākums; (6) 5,3 h, apmēram 50 % epibolija (Braunbeck & Lammer 2006 (40)).

4. papildinājums

1. attēls

24 iedobumu plašu izkārtojums



1-5 = piecas testējamās koncentrācijas /ķimikālija;

nC = negatīvā kontrole (atšķaidīšanas ūdens);

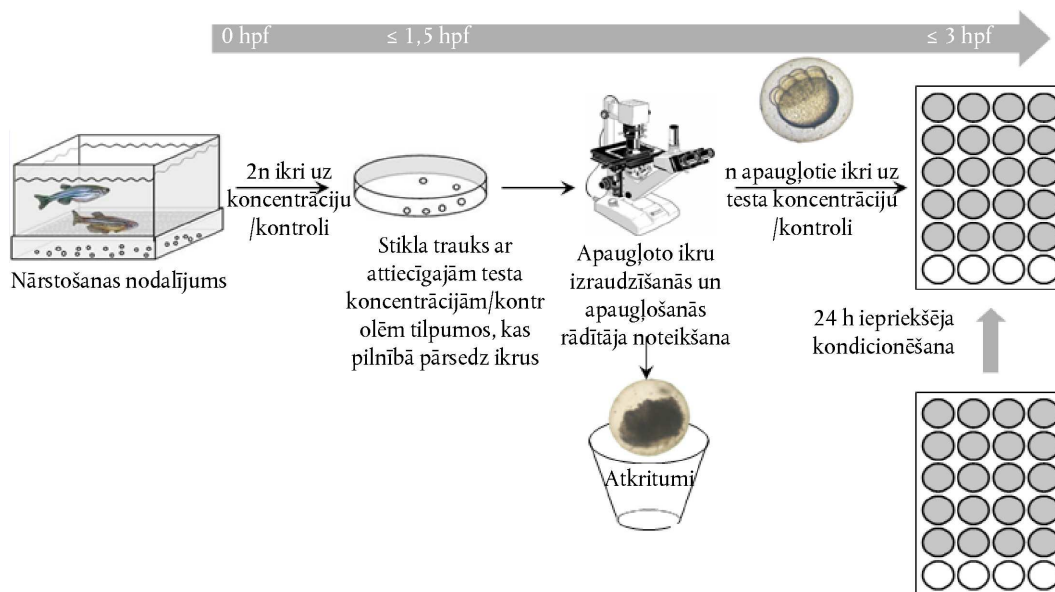
iC = iekšējā plates kontrole (atšķaidīšanas ūdens);

pC = pozitīvā kontrole (3,4-DCA 4 mg/l);

sC = šķīdinātāja kontrole

2. attēls

Zebrzivis embrija akūta toksiskuma testa procedūras shēma (no kreisās uz labo): ikru ražošana, ikru ievākšana, iepriekšēja ekspozīcija uzreiz pēc apaugļošanās stikla traukos, apaugļoto ikru izraudzīšanās, kurā izmanto mikroskopu ar apgrieztu objektīva attēlu vai binokulāru, un apaugļoto ikru sadale pa 24 iedobumu platēm, kurās sagatavotas attiecīgās testējamās koncentrācijas/kontroles, n = ikru skaits, kas nepieciešams katrai testējamajai koncentrācijai/kontrolei (šeit 20), hpf = stundas pēc apaugļošanās.



5. papildinājums

LETĀLU BEIGUPUNKTU ATLANTS ZEBRZIVS EMBRIJU AKŪTĀ TOKSISKUMA TESTAM

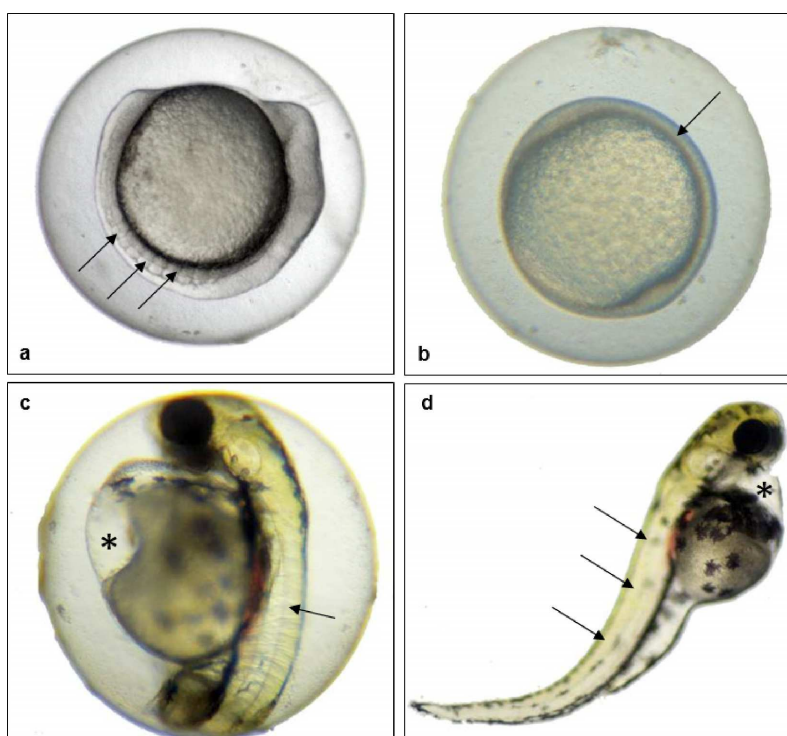
Par akūtu toksiskumu un līdz ar to par embriju nāvi liecina šādi apikālie beigupunkti: embrija koagulācija, astes neatdalīšanās, somītu neveidošanās un neesoša sirdsdarbība. Lai ilustrētu šos beigupunktus, tika atlasītas šādas mikrogrāfijas.

1. attēls

Embrija koagulēšanās.

Spilgtā lauka apgaismojumā koagulētos zebzivs embrijos redzami iekļauti dažādi necaurskatāmi veidojumi.

2. attēls

Somītu neveidošanās

Kaut apmēram par 10 h atpalicis attīstībā, 24 h vecs zebrzivs embrijs (a) uzrāda labi attīstītus somītus (→), bet embrijs (b) neuzrāda nekādas somītu veidošanās pazīmes (→). Lai gan konstatējama izteikta dzeltenuma maisīņa tūska (*), 48 h vecs zebrzivs embrijs (c) uzrāda skaidru somītu veidošanos (→), savukārt 96 h vecs zebras zivs embrijs, kas attēlots (d), neuzrāda nekādas somītu veidošanās pazīmes (→). Pievērsiet uzmanību arī mugurkaula izliekumam (skoliozei) un perikarda tūscai (*) embrijam, kas parādīts (d).

3. attēls

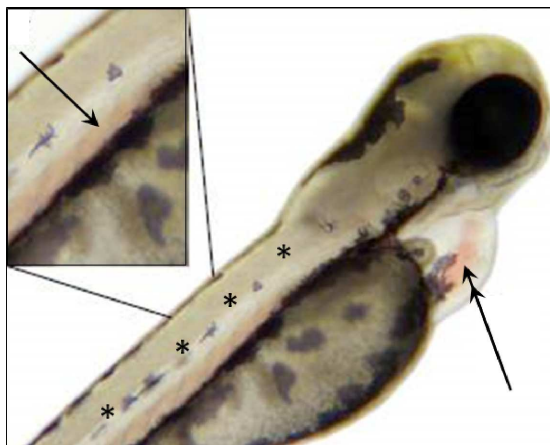
Astes dīgļa neatdališanās sānskatā



(a: →; 96 h vecs zebrzivs embrijs). Pievērsiet uzmanību arī acs dīgļa neesībai(*).

4. attēls

Neesošu sirds darbību



Neesošu sirds darbību pēc definīcijas ir grūti ilustrēt mikrogrāfijā. Par sirds darbības neesību liecina sirds konvulsiju neesība (dubultā bultiņa). Asins šūnu nekustīgums, piemēram, aortā *abdominalis* (→ iespraudumā) nav neesošas sirds darbības rādītājs. Pievērsiet uzmanību arī tam, ka šajā embrijā neveidojas somīti (*, muskuļi izskatās drīzāk viendabīgi, nevis segmentēti). Novērošanas laikam neesošas sirds darbības reģistrēšanai jābūt vismaz vienai minūtei ar minimālo palielinājumu 80×

C.50. *Myriophyllum spicatum* toksiskuma bezsedimentu tests

IEVADS

1. Šī testēšanas metode ir līdzvērtīga ESAO testēšanas norādījumiem 238 (2014. gads). Tie izstrādāti, lai novērtētu ķīmikāliju toksiskumu ūdens divdīgļlapjiem *Myriophyllum spicatum*, halorāgu dzimtas sugai. Tā pamatā ir ASTM standartnorādījumos ietilpstošā testēšanas metode (1), kas, lai novērtētu testējamo ķīmikāliju patieso ekotoksiskumu (neatkarīgi no tā, kā testējamā ķīmikālija sadalās pa ūdeni un sedimentiem), pārveidota par bezsedimentu testa sistēmu (2). Testa sistēma bez sedimentiem ir analītiski nesarežģīta (tikai ūdens fāzē), un rezultātus var analizēt paralēli un/vai salīdzinājumā ar rezultātiem, kas iegūti *Lemna sp.* testā (3); turklāt ar prasītajiem sterilajiem apstākļiem mikroorganismu un aļģu ietekmi (ķīmisko uzņemšanu/noārdīšanos u. c.) iespējams uzturēt pēc iespējas mazāku. Šis tests neaizstāj citus ūdenstoksiskuma testus; tas drīzāk papildina tos tādejādi, ka ir iespējams pilnīgāk novērtēt bīstamību un risku ūdensaugiem. Testēšanas metode ir validēta starplaboratoriju salīdzināšanā (4).
2. Ir sniegta detalizēta informācija par testēšanu ar testējamā šķiduma atjaunošanu (pusstatiskā metode) un bez atjaunošanas (statiskā metode). Atkarībā no testa mērķiem un regulatīvajām prasībām pusstatisko metodi ir ieteicams izmantot, piemēram, vielām, kas šķīdumos ātri zūd izgarošanas, adsorbcijas, fotodegradācijas, hidrolīzes, izgulsnēšanās vai bionoārdīšanās rezultātā. Papildu norādījumi ir sniegti (5). Šī testēšanas metode attiecas uz vielām, kurām šī testēšanas metode ir validēta (sīkāku informāciju sk. starplaboratoriju salīdzināšanas ziņojumā (4)), vai arī uz preparātiem vai zināmiem maisījumiem; ja testē maisījumu, iespējami jāidentificē tā komponenti un jāraksturo tie kvantitatīvi. *Myriophyllum spicatum* bezsedimentu testēšanas metode papildina *Myriophyllum spicatum* ūdens-sedimentu toksiskuma testu (6). Pirms testēšanas metodi izmantot, lai regulatīvā nolūkā testētu maisījumu, ir jāapsver, vai ar to var iegūt paredzētajam nolūkam pietiekamus rezultātus, un, ja var, tad kāpēc. Šādi apsvērumi nav vajadzīgi, ja attiecībā uz maisījuma testēšanu pastāv regulatīva prasība.

TESTA PRINCIPS

3. Nepārtraukti augošas *Myriophyllum spicatum* augu kultūras (tikai modificētā Andrews barotnē, sk. 2. papildinājumu) bezsedimentu testa sistēmā 14 dienas kā monokultūru audzē dažādās testējamās ķīmikālijas koncentrācijās. Testa mērķis ir, pamatojoties uz konkrētu mērījumu mainīgo novērtējumiem, kvantitatīvi noteikt ar ķīmikāliju saistīto ietekmi uz veģetatīvo augšanu šajā periodā. Mērījumu mainīgie ir dzinumu garuma, sānu zaru un sakņu pieaugums, kā arī svaigsvara un saussvara dinamika un mieturu skaita palielināšanās. Turklāt ņem vērā izteiktas kvalitatīvas pārmaiņas testa organismos, piemēram, kropļojumus vai hlorozi un nekrozi, par ko liecina dzeltēšana vai balta un brūna nokrāsa. Lai ar ķīmikāliju saistīto ietekmi noteiktu kvantitatīvi, augšanu testa šķīdumos salīdzina ar augšanu kontrolēs, nosaka, kāda koncentrācija rada noteiktu augšanas inhibēšanos x %, un to izsaka kā EC_x ; atkarībā no regulatīvajām prasībām " x " var būt jebkāda vērtība, piemēram, EC_{10} , EC_{20} , EC_{50} . Jānorāda, ka EC_{10} un EC_{20} vērtību aplēses ir uzticamas un piemērotas tikai testos, kuros variācijas koeficienti kontrolaugiem ir zemāki par lēsto ietekmes līmeni, t. i., lai varētu stabili novērtēt EC_{20} , variācijas koeficientiem jābūt < 20 %.
4. Neapstrādātiem un apstrādātiem augiem jānosaka gan vidējais īpatnējais augšanas rādītājs (ko aplēš, novērtējot pamatdzinumu garumu un trīs papildu mērījumu mainīgos), gan arī pieaugums (ko aplēš, izmantojot pamatdzinuma garumu un trīs papildu mērījumu mainīgos). Pēc tam īpatnējo augšanas rādītāju (r) un pieaugumu (y) izmanto, lai noteiktu E_{rC_x} (piem., $E_{rC_{10}}$, $E_{rC_{20}}$, $E_{rC_{50}}$) un attiecīgi E_{yC_x} (piemēram, $E_{yC_{10}}$, $E_{yC_{20}}$, $E_{yC_{50}}$).
5. Papildus var statistiski noteikt zemāko novērojamās ietekmes koncentrāciju (LOEC) un nenovērojamās ietekmes koncentrāciju (NOEC).

INFORMĀCIJA PAR TESTĒJAMO ĶIMIKĀLIJU

6. Ir jābūt pieejamai analītiskai metodei, kas ir pietiekami jutīga, lai noteiktu testējamās ķimikālijas daudzumu testa barotnē. Izstrādājot testa nosacījumus, par testējamo ķimikāliju var noderēt šāda informācija: struktūrformula, tīrība un piemaisījumi, šķīdība ūdenī, stabilitāte ūdenī un gaismā, skābes disociācijas konstante (pK_a), oktanola-ūdens sadalīšanās koeficients (K_{ow}), tvaika spiediens un bionoārdāmība. Šķīdību ūdenī un tvaika spiedienu var izmantot, lai aprēķinātu Henrija likuma konstanti, kas norāda, vai testa periodā ir varbūtīgi būtiski testējamās ķimikālijas zaudējumi. Tas palīdzēs noskaidrot, vai ir jāveic īpaši pasākumi, kas šādus zaudējumus kontrolētu. Ja informācija par testējamās vielas šķīdību un stabilitāti ir neprecīza, ieteicams to novērtēt testa apstākļos, t. i., ar barotni, temperatūru, apgaismojuma režīmu, ko izmantos testa laikā.
7. Testa barotnes pH kontrolēt ir īpaši svarīgi, piemēram, testējot metālus vai hidrolītiski nestabilas vielas. Papildu norādījumi par tādu ķimikāliju testēšanu, kuru testēšanu apgrūtina to fizikālķīmiskās īpašības, sniegti ESAO Norādījumu dokumentā (5).

TESTA DERĪGUMS

8. Lai tests būtu derīgs, kontroles pamatdzinumu garumam jādubultojas īsākā laikā nekā 14 dienās. Izmantojot šajā testēšanas metodē aprakstītās barotnes un testa nosacījumus, šo kritēriju var izpildīt, izmantojot statisku vai pusstatisku testa režīmu.
9. Pieauguma vidējais variācijas koeficients, kas iegūts no dzinumu svaigsvara mērījumiem (t. i., no testa sākuma līdz beigām) un papildu mērījumu mainīgajiem (sk. 37. punktu), kontrolkultūrās starp replikātiem nepārsniedz 35 %.
10. Vairāk nekā 50 % kontrolgrupas replikātu visā 14 dienu ekspozīcijas periodā uztur sterilus, kas nozīmē, ka tajos nav saskatāma kontaminācija ar citiem organismiem, piemēram, aļģēm, sēnītēm un baktērijām (skaidrs šķīdums). *Piezīme:* Norādījumi par to, kā novērtēt sterilitāti, sniegti starplaboratoriju salīdzināšanas ziņojumā (4).

STANDARTĶIMIKĀLIJA

11. Lai pārbaudītu testēšanas procedūru, var testēt standartķimikāliju(-as), piemēram, 3,5-dihlorfenolu, kas izmantots starplaboratoriju salīdzināšanā (4); saskaņā ar starplaboratoriju salīdzināšanas datiem 3,5-DCP vidējās EC_{50} vērtības attiecībā uz dažādajiem atkarīgiem mainīgajiem (sk. šīs testēšanas metodes 37.–41. punktu) ir no 3,2 mg/l līdz 6,9 mg/l (informāciju par šo vērtību ticamības intervālu sk. starplaboratoriju salīdzināšanas ziņojumā). Standartķimikāliju ieteicams testēt vismaz divreiz gadā vai, ja testus veic retāk, vienlaikus ar testējamās ķimikālijas toksiskuma noteikšanu.

METODES APRAKSTS

Aprīkojums

12. Visam aprīkojumam, kas nonāk saskarē ar testa barotni, jābūt no stikla vai cita ķīmiski inerta materiāla. No kultūras audzēšanai un testēšanai izmantotajiem stikla traukiem jānotīra ķīmiskie kontaminanti, kas var ieskaloties testa barotnē, un traukiem jābūt steriliem. Testa traukiem jābūt pietiekami augstiem, lai dzinumi kontroles traukos augtu ūdens fāzē, testa beigās nesasniedzot testa barotnes virsmu. Ieteicamas borsilikāta stikla mēģenes ar biežām sienām bez snīpja, iekšējais diametrs apmēram 20 mm, garums aptuveni 250 mm, ar alumīnija vāciņiem.
13. Tā kā modificēta *Andrews* barotne satur saharozi (kas stimulē sēnīšu un baktēriju augšanu), testa šķīdumi ir jāsasagatavo sterilos apstākļos. Visus šķīdumus un aprīkojumu pirms lietošanas sterilizē. Sterilizāciju veic, izmantojot 4 h ilgu apstrādi ar sakarsētu gaisu (210 °C) vai 20 min autoklavēšanu 121 °C temperatūrā. Turklāt tieši pirms lietošanas visas kolbas, traukus, kausus utt. un citu aprīkojumu uz sterila darbagalda apstrādā ar liesmu.

14. Kultūras un testa traukus nedrīkst turēt kopā. To vislabāk var panākt, izmantojot atsevišķas augšanas vides kameras, inkubatorus vai telpas. Apgaismojumam un temperatūrai jābūt kontrolējamiem, un tie jāuztur nemainīgā līmenī.

Testa organisms

15. Ūdens divdīgļlapis *Myriophyllum spicatum* ir halorāgu dzimtas suga. No jūnija līdz augustam virs ūdens virsmas redzami neuzkrītoši balti rozā ziedi. Augi sakņojas zemē ar spēcīgu sakneņu sistēmu un ir sastopami visā ziemeļu puslodē eitrofiskos, bet nepiesārņotos stāvošos ūdeņos ar dubļainu substrātu un samērā augstu kalcija saturu. *Myriophyllum spicatum* dod priekšroku saldūdenim, bet to var atrast arī iesālā ūdenī.
16. Bezsedimentu toksiskuma testam ir vajadzīgi sterili augi. Ja testēšanas laboratorijā *Myriophyllum spicatum* nekultivē, sterilu augu materiālu var iegūt no citas laboratorijas, (nesterilu) augu materiālu var ņemt no lauka vai to var nodrošināt komerciāls piegādātājs; ja augi ņemti no lauka, jāparedz sugas taksonomiskā verifikācija. No lauka ievākti vai komerciāla piegādātāja piegādāti augi jāsterilizē (1) un vismaz astoņas nedēļas pirms lietošanas jātur kultūrā tajā pašā barotnē, ko izmanto testēšanai. Ja augus vāc laukā, vietām, kur ievāc kultūras sākummateriālu, jābūt bez redzamiem kontaminācijas avotiem. Liela uzmanība jāpievērš tam, lai nodrošinātu, ka, *Myriophyllum spicatum* vācot no lauka, tiek iegūtas pareizās sugas, jo īpaši reģionos, kur augi var sakrustoties ar citām *Myriophyllum* sugām. Ja augu materiāls iegūts no citas laboratorijas, tie vismaz trīs nedēļas jātur līdzīgos apstākļos. Ziņojumā vienmēr jāatspoguļo augu materiāla avots un testēšanai izmantotā suga.
17. Testā izmantojamo augu kvalitāte un viendabīgums būtiski ietekmē testa rezultātus, tāpēc tie jāizraugās rūpīgi. Jāizmanto jauni, strauji augoši augi bez redzamiem bojājumiem vai krāsas izmaiņām (hlorozes). Sīkāka informācija par testa organisma sagatavošanu dota 4. papildinājumā.

Kultivēšana

18. Lai manipulācijas kultūras uzturēšanai varētu veikt retāk (piem., ja kādā periodā *Myriophyllum* testus neplāno), kultūru var turēt samazinātā apgaismojumā un temperatūrā ($50 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, $20 \pm 2^\circ\text{C}$). Sīkāka informācija par kultivēšanu dota 3. papildinājumā.
19. Vismaz 14 līdz 21 dienu pirms testēšanas pietiekamu skaitu testa organismu aseptiski ievieto svaigā, sterilā barotnē un 14 līdz 21 dienu testa apstākļos kultivē kā pirmskultūru. Detalizēta informācija par pirmskultūras sagatavošanu dota 4. papildinājumā.

Testa barotne

20. Bezsedimentu testa sistēmā *Myriophyllum spicatum* ieteicama tikai viena barotne, kas aprakstīta 2. papildinājumā. 1. punktā aprakstītajai *Myriophyllum spicatum* kultūras audzēšanai un testēšanai ar to ieteicama modificēta Andrews barotne. Modificēto Andrews barotni iegūst no pieciem atsevišķi sagatavotiem barības izejšķīdumiem, pievienojot 3 % saharozes. Detalizēta informācija par barotnes sagatavošanu dota 2. papildinājumā.
21. Testa šķīdumus iegūst no desmitkārtīgi koncentrētas modificētas Andrews barotnes (atšķaida pēc vajadzības). Šīs barotnes sastāvs dots 2. papildinājumā.

Testa šķīdumi

22. Testa šķīdumus parasti gatavo, atšķaidot izejšķīdumu. Testējamās ķīmikālijas izejšķīdumus parasti gatavo, ķīmikāliju izšķīdinot demineralizētā (destilētā vai dejonizētā) ūdenī. Barības elementus pievieno, izmantojot desmitkārtīgi koncentrētu modificēto Andrews barotni.

23. Testējamās ķīmikālijas izejšķīdumus var sterilizēt, tos 20 minūtes 121 °C temperatūrā apstrādājot autoklāvā vai izmantojot sterilu filtrāciju, ar nosacījumu, ka sterilizācijas metode nederīgā testējamo ķīmikāliju. Testa šķīdumus var sagatavot arī sterilā demineralizētā ūdenī vai barotnē sterilos apstākļos. Izvēloties testējamās ķīmikālijas izejšķīdumu sterilizācijas procedūras, jāņem vērā to termostabilitāte un adsorbēšanās uz dažādām virsmām. Tāpēc izejšķīdumus ieteicams sagatavot sterilos apstākļos, t. i., testējamās ķīmikālijas šķīdināšanai sterilā ūdenī sterilos apstākļos (piemēram, sterilizācija ar liesmu, laminārās plūsmas pārsegi u. c.) izmantojot sterilu materiālu. Šis sterilu izejšķīdumu sagatavošanas paņēmieni der gan vielām, gan maisījumiem.
24. Parasti testa apstākļos augstākā testējamās ķīmikālijas koncentrācija nedrīkst pārsniegt tās šķīdību ūdenī. Attiecībā uz testējamām ķīmikālijām, kas slikti šķīst ūdenī, lai testējamo ķīmikāliju būtu vieglāk precīzā daudzumā pievienot testa barotnei un lai ķīmikālija labāk disperģētu un šķīstu, var būt nepieciešams koncentrētu izejšķīdumu vai dispersiju sagatavot, izmantojot organisku šķīdinātāju vai izkļiedētāji. Jādara viss iespējamais, lai šādus materiālus neizmanto. Papildu šķīdinātāju vai izkļiedētāji izmantošana nedrīkst radīt fitotoksiskumu. Bieži izmantoti šķīdinātāji, kas koncentrācijās līdz 100 µl/l nav fitotoksiski, ir, piemēram, acetons un dimetilformamīds. Ja izmanto šķīdinātāju vai izkļiedētāji, ziņojumā jāatspoguļo tās galīgā koncentrācija, kas jāuztur minimāla ($\leq 100 \mu\text{l/l}$), un tā pati šķīdinātāja vai izkļiedētāji koncentrācija jāizmanto visās apstrādēs un kontrolēs. Papildu norādījumi par izkļiedētāji izmantošanu ir sniegti (5).

Testa grupas un kontrolgrupas

25. Piemērotas testējamās koncentrācijas izraudzīties palīdzēs diapazona noteikšanas testā iegūtas iepriekšējās zināšanas par testējamās ķīmikālijas toksiskumu attiecībā uz *Myriophyllum spicatum*. Galīgajā toksiskuma testā parasti ir no piecām (līdzīgi kā *Lemna* augšanas kavēšanas testā, C.26. nodaļa šajā pielikumā) līdz septiņām testējamajām koncentrācijām, kas sakārtotas ģeometriskās progresijās; tās jāizvēlas tā, lai koncentrācijas diapazons būtu no vērtības NOEC līdz vērtībai EC_{50} (sk. turpmāk). Vēlams, lai testējamo koncentrāciju atstatuma koeficients nepārsniegtu 3,2; tomēr, ja koncentrācijas-atbildreakcijas līkne ir taisna, var izmantot lielāku vērtību. Ja izmanto mazāk nekā piecas koncentrācijas, tas jāpamato. Katrai testējamajai koncentrācijai jāizmanto vismaz pieci replikāti.
26. Nosakot testējamo koncentrāciju diapazonu (diapazona noteikšanas un/vai galīgajā toksiskuma noteikšanas testā), jāņem vērā turpmāk minētais.

Nosakot EC_x attiecīgu ticamības līmeni var nodrošināt, ja testējamās koncentrācijas ir tādas, ka vērtība EC_x atrodas starp tām. Piemēram, ja aprēķina EC_{50} , augstākajai testējamajai koncentrācijai jāpārsniedz vērtība EC_{50} . Ja vērtība EC_{50} neiekļaujas testējamo koncentrāciju diapazonā, saistītie ticamības intervāli būs lieli, un var nebūt iespējams novērtēt modeļa statistisko piemērotību.

Ja mērķis ir novērtēt LOEC/NOEC, zemākajai testējamajai koncentrācijai jābūt pietiekami zemei, lai pieaugums nebūtu būtiski mazāks par pieaugumu kontrolē. Turklāt augstākajai testējamajai koncentrācijai jābūt pietiekami augstai, lai pieaugums būtu būtiski mazāks par pieaugumu kontrolē. Ja tas tā nav, tests ir jāatkārto, izmantojot citu koncentrāciju diapazonu (ja vien augstākā koncentrācija nepārsniedz šķīdības robežu vai maksimāli nepieciešamo robežkoncentrāciju, piemēram, 100 mg/l).

27. Katrā testā jāiekļauj kontroles, kuru sastāvā ir tā pati barotne, testa organisms (izvēloties iespējami viendabīgu augu materiālu, svaigus sānu zarus no pirmkultūras, kas saīsināti līdz 2,5 cm no pamatnes), ievēroti tie paši vides apstākļi un procedūras kā testa traukos, bet bez testējamās ķīmikālijas. Ja lieto papildu šķīdinātāju vai izkļiedētāji, iekļauj papildu kontroli, proti, apstrādi ar šķīdinātāju/izkļiedētāji tādā pašā koncentrācijā, kāda ir traukos ar testējamo ķīmikāliju. Kontroles trauku (un attiecīgā gadījumā šķīdinātāju trauku) replikātu skaitam jābūt vismaz desmit.

28. Ja nav jānosaka NOEC, testa plānu var mainīt, palielinot koncentrāciju skaitu un samazinot vienas koncentrācijas replikātu skaitu. Tomēr jebkurā gadījumā jābūt vismaz desmit kontroles replikātiem.

Ekspozīcija

29. No pirmkultūras ņemtus svaigus sānu zarus, kas saīsināti līdz 2,5 cm no pamatnes, aseptiskos apstākļos randomizēti sadala pa testa traukiem; katrā testa traukā jābūt vienam 2,5 cm sānu zaram, kam vienā galā ir galotnes meristēma. Visiem testa traukiem jāizraugās vienādi kvalitatīvs augu materiāls.
30. Lai samazinātu telpisko atšķirību ietekmi uz gaismas intensitāti vai temperatūru, testa trauku izvietojums inkubatorā jāplāno randomizēti. Bloķēts plānojums vai randomizēta trauku pārvietošana (vai biežāka pārvietošana) vajadzīga arī attiecībā uz novērojumu veikšanu.
31. Ja iepriekšējās stabilitātes tests parāda, ka visā testa laikā (14 dienas) testējamās ķīmikālijas koncentrāciju nevar uzturēt (t. i., izmērītā koncentrācija samazinās zem 80 % no izmērītās sākotnējās koncentrācijas), ieteicams pusstatistiskais testa režīms. Šajā gadījumā augi testa laikā vismaz vienreiz (piemēram, 7. dienā) jāeksponē svaigi sagatavotiem testa un kontroles šķīdumiem. Cik bieži eksponēt svaigai barotnei, būs atkarīgs no testējamās ķīmikālijas stabilitātes; lielāks biežums var būt nepieciešams, lai uzturētu gandrīz nemainīgu koncentrāciju ļoti nestabilām vai gaistošām ķīmikālijām.
32. Šī testēšanas metode neaptver ekspozīcijas scenārijus ar ievadīšanu uz lapām (aerosols).

Testa nosacījumi

33. Jāizmanto silti un/vai vēsi balts dienasgaismas apgaismojums, nodrošinot gaismas starojumu diapazonā apmēram 100–150 E m⁻² s⁻¹, to mērot kā fotosintēzes aktīvo starojumu (400–700 nm) punktus, kuri no gaismas avota ir tādā pašā atstatumā kā testa trauku dibens (ekvivalents ca. 6 000–9 000 lux), un izmantojot gaismas un tumsas ciklu 16:8 h. Izmērīto vērtību ietekmēs gaismas detektēšanas un mērīšanas metode, jo īpaši sensora veids. Salīdzinājumā ar vienvirziena sensoriem vēlāmāki ir sfēriski sensori (kas reaģē uz gaismu no visiem leņķiem virs mērīšanas plaknes un zem tās) un kosinusa formas sensori (kas reaģē uz gaismu no visiem leņķiem virs mērīšanas plaknes), ar kuriem var iegūt precīzākus šeit aprakstīto daudzleņķu gaismas avotu nolasījumus.
34. Temperatūrai testa traukos jābūt 23 ± 2 °C. Īpašos gadījumos, piemēram, testējot nestabilas ķīmikālijas vai metālus, papildu uzmanība jāvelti pH svārstībām; pH jāuztur robežās no 6 līdz 9. Sk. papildu norādījumus (5).

Ilgums

35. Testu beidz 14 dienas no brīža, kad augi ievietoti testa traukos.

Mērījumi un analītiskā noteikšana

36. Testa sākumā testa organisma pamatdzinumu garums ir 2,5 cm (sk. 29. punktu); to mēra ar mērlīniju (sk. 4. papildinājumu) vai analizējot fotogrāfijas un attēlus. Testa organisma pamatdzinumu garums — normāls vai anormāls — jānosaka testa sākumā, vismaz vienreiz 14 dienu ekspozīcijas perioda laikā un testa beigās. Piezīme. Kā alternatīva tiem, kam nav pieejama attēla analīze: ja darbgalds pirms augu ievietošanas testa traukos sterilizē, testa sākumā un testa laikā pamatdzinumu garumu mērīt var arī ar sterilu mērlīniju. Jāatzīmē pārmaiņas augu attīstībā, piem., dzinumu deformācijas, izskats, liecības par nekrozi, hlorozi, lūšanu vai peldspējas zudumu un sakņu garums un izskats. Jāatzīmē arī būtiskas testa barotnē novērotas pazīmes (piemēram, neizšķīduša materiāla, aļģu, sēnīšu un baktēriju klātbūtne testa traukā).

37. Papildus pamatdzinumu garuma noteikšanai testa laikā ir jānovērtē arī testējamās ķīmikālijas ietekme uz šādiem trīs (vai vairāk) mērījumu mainīgajiem:

- i. Kopējais sānu zaru garums.
- ii. Kopējais dzinumu garums.
- iii. Kopējais sakņu garums.
- iv. Svaigsvars.
- v. Saussvars.
- vi. Mieturu skaits.

1. piezīme.

Attiecīgus papildu mērījumus no sešiem šeit dotajiem mainīgajiem var izraudzīties, izmantojot diapazona noteikšanas testa laikā veiktos novērojumus.

2. piezīme.

Ļoti vēlama ir svaigsvara un saussvara noteikšana (iv un v parametrs).

3. piezīme.

Sakarā ar to, ka saharoze un gaisma (sakņu ekspozīcija gaismai testa laikā) var ietekmēt auksīna (augu augšanas hormons) transportētājus un ka dažām ķīmikālijām var būt auksīna veida iedarbība, sakņu beigupunktu (iii parametra) iekļaušana ir apšaubāma.

4. piezīme.

Starplaboratoriju salīdzināšanas rezultāti liecina par augstiem variācijas koeficientiem ($> 60\%$) attiecībā uz kopējo sānu zaru garumu (i parametrs). Kopējais sānu zaru garums jebkurā gadījumā ir ietverts kopējā dzinumu garuma mērījumā (ii parametrs), kam konstatēti pieņemamāki variācijas koeficientus $< 30\%$.

5. piezīme.

Kā izriet no iepriekš minētajiem apsvērumiem, ieteicamie galvenie mērījumu beigupunkti ir: kopējais dzinumu garums, svaigsvars un saussvars (ii, iv un v parametrs); vi parametrs – mieturu skaits – paliek eksperimenta veicēja ziņā.

38. Pamatdzinumu garums un mieturu skaits ir izdevīgi, jo katram testam un kontroles traukam tos testa sākumā, tā laikā un beigās var noteikt, izmantojot fotogrāfijas un attēla analīzi, lai gan var izmantot arī (sterilu) mērlineālu.

39. Kopējo sānu zaru garumu, kopējo sakņu garumu (kā visu sānu zaru vai sakņu garumu summu) un kopējo dzinumu garumu (kā pamatdzinumu garuma un kopējā sānu zaru garuma summu) var izmērīt ar mērlineālu ekspozīcijas beigās.

40. Svaigsvars un/vai saussvars ir jānosaka testa sākumā paraugam no pirmkultūras materiāla, kas izmantots testa sākšanai, un testa beigās augu materiālam no katra testa un kontroles trauka.

41. Kopējo sānu zaru garumu, kopējo dzinumu garumu, kopējo sakņu garumu, svaigsvaru, saussvaru un mieturu skaitu var noteikt šādi:

- i. Kopējais sānu zaru garums. Sānu zaru garumu var noteikt, ekspozīcijas beigās visus sānu zarus izmērot ar mērlineālu. Kopējais sānu zaru garums ir katra testa un kontroles trauka visu sānu zaru garumu summa.
- ii. Kopējais dzinumu garums. Pamatdzinumu garumu var noteikt ar attēlu analīzi vai izmantojot mērlineālu. Kopējais dzinumu garums ir katra testa un kontroles trauka kopējā sānu zaru garuma un pamatdzinumu garuma summa ekspozīcijas beigās.

- iii. Kopējais sakņu garums. Sakņu garumu var noteikt, ekspozīcijas beigās izmērot visas saknes ar mērlīnēalu. Kopējais sakņu garums ir katra testa un kontroles trauka visu sakņu garuma summa.
- iv. Svaigsvars. Svaigsvaru var noteikt, nosverot testa organismus ekspozīcijas beigās. Viss katra testa un kontroles trauka augu materiāls jānoskalo ar destilētu ūdeni, ar celulozes papīru jānosusina sauss. Pēc šīs sagatavošanas ar svēršanu nosaka svaigsvaru. Sākuma biomasu (svaigsvaram) nosaka, pamatojoties uz testa organismu paraugu, kas ņemts no tās pašas partijas, kura izmantota sēšanai testa traukos.
- v. Saussvars. Pēc sagatavošanās svaigsvara noteikšanai testa organismus žāvē 60 °C līdz konstantam svaram. Šī masa ir saussvars. Sākuma biomasu (saussvaram) nosaka, pamatojoties uz testa organismu paraugu, kas ņemts no tās pašas partijas, kura izmantota uzsēšanai testa traukos.
- vi. Mieturu skaits. Visus mieturus skaita uz āru gar pamatdzinumu.

Mērījumu biežums un analītiskā noteikšana

- 42. Ja izmantoto statisko testa plānu, pH jāmēra katrai apstrādei testa sākumā un beigās. Ja izmanto pusstatisku testa plānu, pH jāmēra katrai svaiga testa šķīduma partijai pirms katras atjaunošanas un arī citiem analogiem izlietotiem šķīdumiem.
- 43. Gaismas intensitāte audzēšanas kamerā, inkubatorā vai telpā jāmēra punktos, kas no gaismas avota atrodas tādā pašā attālumā kā testa organismi. Mērījumi testa laikā jāveic vismaz vienu reizi. Surogāttraukā, kur tiek uzturēti tādi paši apstākļi kā audzēšanas kamerā, inkubatorā vai telpā, vismaz katru dienu (vai nepārtraukti, izmantojot datu reģistrētāju) jāreģistrē barotnes temperatūra.
- 44. Testa laikā testējamās(-o) ķīmikālijas(-u) koncentrācijas nosaka attiecīgos intervālos. Statiskos testos minimālā prasība ir noteikt koncentrāciju testa sākumā un beigās.
- 45. Pusstatiskos testos, kuros nav gaidāms, ka testējamās(-o) ķīmikālijas(-u) koncentrācijas saglabāsies ± 20 % robežās no nominālās koncentrācijas, jāanalizē visi svaigi sagatavotie testa šķīdumi un tie paši šķīdumi katrā atjaunošanas reizē. Tomēr tādos testos, kur testējamās(-o) ķīmikālijas(-u) izmērītās sākotnējās koncentrācijas nav ± 20 % robežās no nominālās vērtības, bet kur var nodrošināt pietiekamus pierādījumus, ka sākotnējās koncentrācijas ir atkārtojamas un stabilas (t. i., 80–120 % robežās no sākotnējās koncentrācijas), ķīmisko noteikšanu var veikt tikai attiecībā uz augstāko un zemāko testējamo koncentrāciju. Visos gadījumos testējamās koncentrācijas pirms atjaunošanas attiecībā uz katru testējamo koncentrāciju jānoteic tikai viena replikāta traukā (vai replikātā apvienotam trauku saturam).
- 46. Ja ir pierādījumi, ka testējamā koncentrācija visā testa laikā ir apmierinoši uzturēta ± 20 % robežās no nominālās vērtības vai izmērītās sākotnējās koncentrācijas, rezultātus var analizēt, pamatojoties uz sākotnējām nominālajām vai izmērītajām vērtībām. Ja novirze no nominālās vai izmērītās sākotnējās koncentrācijas nav ± 20 % robežās, rezultāti jāanalizē, balstoties uz ģeometrisku vidējo koncentrāciju ekspozīcijas laikā vai modeļiem, kas apraksta testējamās ķīmikālijas koncentrācijas samazināšanos (5).

Robežtests

- 47. Dažos gadījumos, piemēram, ja iepriekšējais tests uzrāda, ka testējamai ķīmikālijai koncentrācijā līdz 100 mg/l, līdz tās šķīdības robežai testa barotnē, vai attiecībā uz preparātiem — līdz tās izkliedējamības robežai nav toksiskas iedarbības, var veikt robežtestu, kurā salīdzina atbildreakcijas kontroles grupā un vienā apstrādes grupā (100 mg/l vai koncentrācija, kas ekvivalenta šķīdības robežai). Ir ļoti ieteicams to pamatot ar ekspozīcijas koncentrācijas analīzi. Uz robežtestu attiecas visi iepriekš aprakstītie testa nosacījumi un derīguma kritēriji, izņemot, ka apstrādes replikātu skaits jādubulto. Augšanu kontroles un apstrādes grupā var analizēt, izmantojot statistikas testu, lai salīdzinātu vidējos rādītājus, piemēram, Stjudenta t testu.

DATI UN ZIŅOŠANA

Atkarīgie mainīgie

48. Testa mērķis ir noteikt testējamās ķīmikālijas ietekmi uz *Myriophyllum spicatum* veģetatīvo augšanu. Šī testēšanas metode apraksta divus atkarīgos mainīgos.
- Vidējais īpatnējais augšanas rādītājs. Šo atkarīgo mainīgo aprēķina, pamatojoties uz izmaiņām pamatdzinumu garuma logaritmā un turklāt pamatojoties uz logaritmu izmaiņām, kas skar pārējos mērījumu parametrus, t. i., kopējo dzinumu garumu, svaigsvāru, saussvaru vai mieturu skaitu laika periodā (izteikts dienās) kontroles grupās un katrā apstrādes grupā. Piezīme. Mērīšanas parametram kopējais sānu zaru garums un kopējais sakņu garums vidējo īpatnējo augšanas rādītāju aprēķināt nav iespējams. Sākot testu, testa organismam nav sānu zaru un nav saknes (pamatā ir sagatavojumi no pirmkultūras); ja sāk no nulles vērtības, vidējā īpatnējā augšanas rādītāja aprēķināšana nav nosakāma.
 - Pieaugums. Šo atkarīgo mainīgo aprēķina, par pamatu ņemot līdz testa beigām novērotās pamatdzinumu garuma pārmaiņas un turklāt pārmaiņas citos mērīšanas parametros — t. i., vēlams, kopējā dzinumu garumā, svaigsvārā, saussvarā vai mieturu skaitā un citos parametros, ja to uzskata par noderīgu — kontrolēs un katrā apstrādes grupā.
49. Toksiskuma aplēses jābalsta uz pamatdzinumu garumu un trīs papildu mērījumu mainīgajiem (t. i., vēlams, kopējo dzinumu garumu, svaigsvāru, saussvaru vai mieturu skaitu, sk. 37. punktu un šā punkta 2., 4. un 5. piezīmi), jo dažas ķīmikālijas citus mērījumu mainīgos var ietekmēt daudz vairāk nekā pamatdzinumu garumu. Ja aprēķinātu tikai pamatdzinumu garumu, šāda ietekme nebūtu atklāta.

Vidējais īpatnējais augšanas rādītājs

50. Vidējo īpatnējo augšanas rādītāju noteiktam periodam aprēķina kā logaritmisko pieaugumu attiecībā uz augšanas mainīgajiem — pamatdzinumu garumu un trīs papildu mērījumu mainīgajiem (t. i., kopējo dzinumu garumu, svaigsvāru, saussvaru vai mieturu skaitu) — katram kontroles un apstrādes replikām izmantojot šādu formulu:

$$\mu_{i-j} = \frac{\ln(N_j) - \ln(N_i)}{t}$$

kur:

μ_{i-j} : vidējais īpatnējais augšanas rādītājs no laika punkta i līdz j ;

N_i : mērījuma mainīgais testa vai kontroles traukā laikā i ;

N_j : mērījuma mainīgais testa vai kontroles traukā laikā j ;

t : laika periods no i līdz j .

Katrai apstrādes grupai un kontrolgrupai augšanas rādītāja vidējo vērtību aprēķina kopā ar dispersijas aplēsēm.

51. Vidējais īpatnējais augšanas rādītājs jāaprēķina visam testa periodam (iepriekš minētajā formulā laika punkts “ i ” ir testa sākums un laika punkts “ j ” ir testa beigas). Katrai testējamajai koncentrācijai un kontrolei aprēķina vidējā īpatnējā augšanas rādītāja vidējo vērtību, kā arī dispersiju. Turklāt, lai izvērtētu eksponēcijas periodā radušās testējamās ķīmikālijas ietekmes, augšanas rādītājs jāizvērtē pa posmiem, (piemēram, izmantojot logaritmiski transformētas augšanas līknes).

52. Augšanas rādītāja procentuālo inhibēšanos (I_r) katrai testējamajai koncentrācijai (apstrādes grupā) var aprēķināt saskaņā ar šādu formulu:

$$\%I_r = \frac{(\mu_c - \mu_T)}{\mu_c} \times 100$$

kur:

$\% I_r$: vidējā īpatnējā augšanas rādītāja inhibēšanās procents;

μ_c : vidējā vērtība μ kontrolē;

μ_T : vidējā vērtība μ apstrādes grupā.

Pieaugums

53. Ietekmi uz pieaugumu nosaka, pamatojoties uz mērījumu mainīgo "pamatdzinumu garums" un trīs papildu mērījumu mainīgajiem (t. i., vēlams kopējais dzinumu garums, svaigsvars, saussvars vai mieturu skaits) katrā testa traukā testa sākumā un beigās. Svaigsvaram vai saussvaram sākotnējo biomasu nosaka, pamatojoties uz testa organismu paraugu, kas ņemts no tās pašas partijas, kura izmantota sēšanai testa traukos. Katrai testējamajai koncentrācijai un kontrolei vidējo pieauguma vērtību aprēķina kopā ar dispersijas aplēsēm. Vidējo procentuālo pieauguma inhibēšanos ($\% I_y$) katrai apstrādes grupai var aprēķināt šādi:

$$\%I_y = \frac{(b_c - b_T)}{b_c}$$

kur:

$\% I_y$: pieauguma procentuālais samazinājums;

b_c : beigu biomasu mīnus sākotnējā biomasu kontroles grupai;

b_T : beigu biomasu mīnus sākotnējā biomasu apstrādes grupai.

Laika divkāršošana

54. Lai noteiktu pamatdzinumu garuma divkāršošanās laiku (T_d) un atbilstību šim derīguma kritērijam (sk. 8. punktu), izmanto šādu formulu ar datiem, kas iegūti no kontroles traukiem:

$$T_d = \ln 2 / \mu$$

μ ir vidējais īpatnējais augšanas rādītājs, ko nosaka, kā aprakstīts 50.–52. punktā.

Koncentrācijas-atbildreakcijas līkņu grafiskā attēlošana

55. Grafiski jāattēlo koncentrācijas-atbildreakcijas līknes, kas atspoguļo sakarību starp atkarīgā mainīgā vidējo procentuālo inhibēšanos (I_r vai I_y aprēķina, kā parādīts 53. punktā) un testējamās ķimikālijas logaritmizētu koncentrāciju.

EC_x aplēse

56. EC_x aplēses jābalsta gan uz vidējo īpatnējo augšanas rādītāju ($E_r C_x$), gan pieaugumu ($E_y C_x$), no kuriem katrs savukārt jābalsta uz pamatdzinumu garumu, un, iespējams, papildu mērījumu mainīgajiem (t. i., vēlams, kopējo dzinumu garumu, svaigsvaru, saussvaru vai mieturu skaitu). Tas ir tāpēc, ka ir ķimikālijas, kas atšķirīgi ietekmē pamatdzinumu garumu un citus mērījumu mainīgos. Tādēļ vēlami toksiskuma parametri katram aprēķinātajam inhibēšanās līmenim x ir četras EC_x vērtības: $E_r C_x$ (pamatdzinumu garums); $E_r C_x$ (i.e. t. i., vēlams kopējais dzinumu garums, svaigsvars, saussvars vai mieturu skaits); $E_y C_x$ (pamatdzinumu garums); un $E_y C_x$ (t. i., vēlams kopējais dzinumu garums, svaigsvars, saussvars vai mieturu skaits).

57. Jānorāda, ka EC_x vērtības, kas aprēķinātas, izmantojot šos divus atkarīgos mainīgos, nav salīdzināmas, un testa rezultātu izmantošanā šo atšķirību ņem vērā. Ja tiek ievēroti šīs testēšanas metodes testa nosacījumi, lielākajā daļā gadījumu (sakarā ar attiecīgo pieeju matemātisko pamatojumu) uz vidējo īpatnējo augšanas rādītāju (E_{rC_x}) balstītās EC_x vērtības būs lielākas par rezultātiem, kas balstīti uz pieaugumu (E_{yC_x}). Šo starpību nedrīkst interpretēt kā abu atkarīgo mainīgo jutības starpību, jo šīs vērtības gluži vienkārši ir matemātiski atšķirīgas.

Statistiskās procedūras

58. Mērķis ir regresijas analizē iegūt koncentrācijas–atbildreakcijas kvantitatīvu sakarību. Iespējams izmantot svērto lineāro regresiju pēc tam, kad veikta atbildreakcijas datu linearizējoša transformācija, piemēram, ar probita vai logita, vai Veibula sadalījuma modeļiem (7), bet priekšroka tiek dota nelineārās regresijas procedūru metodēm, ar kurām labāk risināt neizbēgamās datu neatbilstības un novirzes no līdzsvarota sadalījuma. Tuvu pie nulles vai pilnīgas inhibēšanās šādas neatbilstības var pastiprināt arī transformācija, kas traucē analīzi (7). Jāatzīmē, ka standarta analīzes metodes, kurās izmantoti probita, logita vai Veibula transformācijas modeļi, ir paredzētas tam, lai apstrādātu binārus datus (piemēram, mirstība vai izdzīvotība), un augšanas rādītāja vai pieauguma datiem tās būtu jāpielāgo. Īpašas procedūras EC_x vērtību noteikšanai, kurā izmanto nepārtrauktus datus, sk. (8), (9), (10).
59. Katram analizējamajam atkarīgam mainīgajam aprēķina EC_x vērtību punktu aplēses, izmantojot koncentrācijas–atbildreakcijas sakarību. Ja iespējams, katrai aplēsei jāparedz 95 % ticamības robeža. Atbildreakcijas datu atbilstība regresijas modelim jāvērtē vai nu grafiski, vai statistiski. Regresijas analīze jāveic, izmantojot atsevišķu replikātu atbildreakcijas, nevis apstrādes grupas vidējos rādītājus.
60. Ja pieejamie regresijas modeļi/metodes datiem nav piemēroti, EC_{50} aplēses un ticamības robežu var iegūt arī, izmantojot lineāro interpolāciju ar paškorelācijas (*bootstrapping*) metodi (10).
61. LOEC un līdz ar to NOEC novērtēšanai ir jāsalīdzina apstrādes vidējie rādītāji, izmantojot dispersijas analīzes (ANOVA) metodes. Katras koncentrācijas vidējo rādītāju, izmantojot piemērotu daudzskārtēju salīdzināšanu vai dinamikas rindas trendu analīzes metodi salīdzina ar kontroles vidējo rādītāju. Noderīgi var būt Daneta vai Viljamsa testi, (12), (13), (14), (15), (16). Ir nepieciešams novērtēt, vai ANOVA pieņēmums par dispersijas viendabīgumu ir spēkā. Šo novērtējumu var veikt grafiski vai ar formālu testu (15). Piemēroti testi ir Lēvena vai Bartleta tests. Ja nav izpildīts pieņēmums attiecībā uz dispersijas homogenitāti, to dažreiz var labot, datus transformējot logaritmiski. Ja dispersijas nevienadabīgums ir galējs un ar transformāciju korigēt to nevar, jāapsver, vai analīzi neveikt ar tādām metodēm kā descendenti Džonkhīra testi. Papildu norādījumus par NOEC noteikšanu var atrast (10).
62. Jaunāko zinātnisko sasniegumu rezultātā ir radies ieteikums atteikties no jēdziena NOEC un to aizstāt ar EC_x punktu aplēsēm, kuru pamatā ir regresija. Šim *Myriophyllum* testam nav noteikta piemērota x vērtība. Tomēr lietderīgs šķiet diapazons no 10 līdz 20 % (atkarībā no izvēlēta atkarīgā mainīgā), un ir vēlams ziņojumā atspoguļot gan EC_{10} , gan EC_{20} un to ticamības robežas.

Ziņošana

63. Testa pārskatā iekļauj šādu informāciju:

Testējamā ķīmikālija

Vienkomponenta viela

— fiziskais izskats, šķīdība ūdenī un papildu attiecīgās fizikālķīmiskās īpašības;

— ķīmiskā identifikācija, piemēram, IUPAC vai CAS nosaukums, CAS numurs, SMILES vai InChI kods, struktūrformula, tīrība, attiecīgā gadījumā un, ja praktiski iespējams, piemaisījumu ķīmiskā identitāte u. c. (attiecīgā gadījumā arī organiskā oglekļa saturs).

Vairākkomponentu viela, UVCB vai maisījums:

- tiek iespējami izsmēļoši raksturoti pēc to komponentu ķīmiskās identitātes (sk. iepriekš), kvantitatīvās sastopamības un attiecīgajām fizikālķīmiskajām īpašībām.

Testa suga

- Zinātniskais nosaukums un avots.

Testa nosacījumi

- Izmantotā testa procedūra (statiska vai pusstatiska).
- Testa sākšanas datums un tā ilgums.
- Testa barotne.
- Eksperimentālā plāna apraksts: testa trauki un pārsegs, šķīdumu tilpumi, pamatdzinumu garums uz vienu testa trauku testa sākumā.
- Testējamās koncentrācijas (nominālās un izmērītās, kā vajadzīgs) un replikātu skaits uz koncentrāciju.
- Izejšķīdumu un testa šķīdumu sagatavošanas metodes, tostarp jebkāda šķīdinātāja vai izkļiedētājielas lietošana.
- Temperatūra testa laikā.
- Gaismas avots, gaismas intensitāte un viendabīgums.
- Testa un kontroles barotņu pH vērtības.
- Testējamās ķimikālijas analīzes metode ar attiecīgiem kvalitātes novērtēšanas datiem (validācijas pētījumi, analīžu standartnovirzes vai ticamības robežas).
- Pamatdzinumu garuma un pārējo mērījumu mainīgo, piemēram, kopējā sānu zaru garuma, kopējā dzinumu garuma, kopējā sakņu garuma, svaigsvara, saussvara vai mieturu skaita noteikšanas metodes.
- Katra testa un kontroles trauka kultūras stāvoklis (sterila vai nesterila) katrā novērojumā.
- Jebkādas novirzes no šīs testa metodes.

Rezultāti

- Izejas dati: attiecībā uz katru testa un kontroles trauku katram novērojumam un izdarītai analīzei — pamatdzinumu garums un citi mērījumu mainīgie.
- Katra mērījuma mainīgā vidējie rādītāji un standartnovirzes.
- Augšanas līknes katram mērījumu mainīgajam.
- Aprēķinātie atkarīgie mainīgie katram apstrādes replikātam, ar vidējām vērtībām un variāciju koeficientu replikātiem.
- Koncentrācijas/ietekmes sakarības grafisks attēlojums.
- Aplēses par toksiskajiem beigupunktiem atkarīgajiem mainīgajiem, piemēram, EC_{50} , EC_{10} , EC_{20} , un saistītie ticamības intervāli. Ja aprēķinātas, $LOEC$ un/vai $NOEC$ un statistikas metodes, kas izmantotas to noteikšanai.
- Ja izmantota ANOVA, tad iedarbības lielums, ko var noteikt (piemēram, vismazākās būtiskās atšķirības).
- Jebkāda augšanas stimulēšana, kas konstatēta jebkurā apstrādē.
- Jebkādas fitotoksiskuma vizuālās pazīmes, kā arī testa šķīdumu novērojumi.
- Rezultātu apspriešana, tai skaitā jebkāda ietekme uz testa rezultātiem, kas izriet no novirzēm no šīs testēšanas metodes.

LITERATŪRA

- (1) ASTM Designation E 1913-04, Standard Guide for Conducting Static, Axenic, 14-Day Phytotoxicity Tests in Test Tubes with the Submersed Aquatic Macrophyte, *Myriophyllum sibiricum* Komarov.
 - (1) Maletzki, D. *et al.* (2010), *Myriophyllum spicatum* als ökotoxikologischer Testorganismus: Methodenentwicklung eines sedimentfreien Testsystems und erste Ergebnisse mit 3,5-Dichlorphenol, *Umweltwiss Schadst Forsch*, No. 22, pp. 702–710.
 - (2) Chapter C.26 of this Annex: *Lemna* sp. Growth Inhibition Test,.
 - (3) OECD (2014), “*Myriophyllum spicatum* Toxicity Test: Results of an inter-laboratory ring test using a sediment-free test system”, OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series Testing and Assessment, No. 205, OECD Publishing, Paris.
 - (4) OECD (2000), “Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures”, OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, No. 23, OECD Publishing, Paris.
 - (5) Šā pielikuma C.51. nodaļa: Water-Sediment *Myriophyllum spicatum* Toxicity Test
 - (6) Christensen, E.R., N. Nyholm (1984), Ecotoxicological Assays with Algae: Weibull Dose-Response Curves, *Environmental Science & Technology*, Vol. 18/9, 713-718.
 - (7) Nyholm, N. *et al.* (1992), Statistical treatment of data from microbial toxicity tests, *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 11/2, pp. 157-167.
 - (8) Bruce, R.D., D.J. Versteeg (1992), A statistical procedure for modelling continuous toxicity data, *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 11/10, pp. 1485-1494.
 - (9) OECD (2006), “Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application”, OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, No. 54, OECD Publishing, Paris.
 - (10) Norberg-King, T.J. (1988), An interpolation estimate for chronic toxicity: The ICp approach, National Effluent Toxicity Assessment Center Technical Report 05-88, US EPA, Duluth, MN.
 - (11) Dunnett, C.W. (1955), A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control, *Journal of the American Statistical Association*, Vol. 50/272, pp. 1096-1121.
 - (12) Dunnett, C.W. (1964), New tables for multiple comparisons with a control, *Biometrics*, Vol. 20/3, pp. 482-491.
 - (13) Williams, D.A. (1971), A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control, *Biometrics*, Vol. 27/1, pp. 103-117.
 - (14) Williams, D.A. (1972), The comparison of several dose levels with a zero dose control, *Biometrics*, Vol. 28/2, pp. 519-531.
 - (15) Brain, P., R. Cousens (1989), An equation to describe dose-responses where there is stimulation of growth at low doses, *Weed Research*, Vol. 29/2, pp. 93-96.
-

1. papildinājums

DEFINĪCIJAS

Biomasa ir populācijas dzīvās matērijas svaigsvars un/vai saussvars. Šajā testā biomasa ir pamatdzinumu, visu sānu zaru un visu sakņu summa.

Ķimikālija ir viela vai maisījums.

Hloroze ir testa organisma, jo īpaši mieturu, krāsas maiņa no zaļas uz dzeltējošu.

EC_x ir testa barotnē izšķīdinātās testējamās ķimikālijas koncentrācija, kas attiecīgajā ekspozīcijas periodā (īpaši jānorāda, ja ir novirzes no pilna vai normāla testa ilguma) rada *Myriophyllum spicatum* augšanas samazinājumu x % (piemēram, 50 %). Lai nepārprotami norādītu EC vērtību, kas izriet no augšanas rādītāja vai pieauguma, augšanas rādītājam izmanto simbolu “E_rC” un pieaugumam — “E_rC”, kam seko izmantotais mērījumu mainīgais, piemēram, “E_rC” (pamatdzinumu garums).

Augšana ir mērījumu mainīgā, piemēram, pamatdzinumu garuma, kopējā sānu zaru garuma, kopējā dzinumu garuma, kopējā sakņu garuma, svaigsvara, saussvara vai mieturu skaita palielināšanās testa periodā.

Augšanas rādītājs (vidējais īpatnējais augšanas rādītājs) ir mērījumu mainīgā logaritmisks pieaugums ekspozīcijas laikā. *Piezīme.* Ar augšanas rādītāju saistītie atkarīgie mainīgie nav atkarīgi no testa ilguma, ja vien neekspozētais kontroles organismu augšanas modelis ir eksponenciāls.

Zemākā novērotās ietekmes koncentrācija (LOEC) ir zemākā testējamās ķimikālijas koncentrācija, kurai noteiktā ekspozīcijas laikā salīdzinājumā ar kontroli novērota statistiski būtiska samazinoša ietekme ($p < 0,05$). Tomēr pie visām testējamajām koncentrācijām, kas augstākas par LOEC, ir jābūt kaitīgai ietekmei, kura vienāda ar vai lielāka par ietekmi, kas novērota pie LOEC. Ja šos divus nosacījumus nevar izpildīt, jāsniedz pilns paskaidrojums par to, kā LOEC (un līdz ar to arī NOEC) izraudzīta.

Mērījumu mainīgie ir jebkāda veida mainīgie, kas tiek mērīti, lai izteiktu testa beigupunktu, izmantojot vienu vai vairākus atkarīgos mainīgos. Šajā testēšanas metodē mērījumu mainīgie ir pamatdzinumu garums, kopējais sānu zaru garums, kopējais dzinumu garums, kopējais sakņu garums, svaigsvars, saussvars un mieturu skaits.

Monokultūra ir kultūra ar vienu augu sugu.

Nekroze ir nedzīvi (t. i., balti vai tumši brūni) testa organisma audi.

Nenovērotās ietekmes koncentrācija (NOEC) ir testējamās ķimikālijas koncentrācija, kas ir tūlīt zem LOEC.

Atkarīgais mainīgais ir toksiskuma aplēses mainīgais, ko ar dažādu aprēķina metožu palīdzību iegūst no jebkura mērītā mainīgā, kas apraksta biomasu. Šīs testēšanas metodes atkarīgie mainīgie ir augšanas rādītājs un pieaugums, kas iegūti no tādiem mērījumu mainīgajiem kā pamatdzinumu garums, kopējais dzinumu garums, svaigsvars, saussvars vai mieturu skaits.

Pusstatiskais (atjaunošanas) tests ir tests, kurā testa šķīdumu noteiktos intervālos testa laikā periodiski maina.

Statiskais tests ir testēšanas metode bez testa šķīduma atjaunošanas testa laikā.

Testējamā ķimikālija ir jebkura viela vai maisījums, ko testē, izmantojot šo testēšanas metodi.

Testa beigupunkts apraksta vispārīgo faktoru, kura mainīšana attiecībā pret testējamās ķimikālijas kontroli ir testa mērķis. Šajā testēšanas metodē testa beigupunkts ir augšanas inhibēšanās, ko var izteikt ar dažādiem atkarīgajiem rādītājiem, kas ir balstīti uz vienu vai vairākiem mērījumu mainīgajiem.

Testa barotne ir pilna sintētiskā augšanas barotne, uz kuras aug testa augi laikā, kad tos eksponē testējamai ķimikālijai. Testējamo ķimikāliju parasti izšķīdina testa barotnē.

UVCB ir viela ar nezināmu vai mainīgu sastāvu, komplekss reakcijas produkts vai bioloģisks materiāls.

Pieaugums ir mērījumu mainīgā vērtība, kas izsaka starpību starp biomasu ekspozīcijas perioda beigās un mērījumu mainīgo ekspozīcijas perioda sākumā. Piezīme. Ja neeksponētu organismu augšanas modelis ir eksponenciāls, uz pieaugumu balstīti atkarīgie mainīgie līdz ar testa ilgumu samazināsies.

2. papildinājums

MODIFICĒTA ANDREWS BAROTNE IZEJKULTŪRAI UN PIRMKULTŪRAI

No pieciem atsevišķi sagatavotiem barotņu izejšķīdumiem pagatavo izejkultūrai un pirmkultūrai vajadzīgo modificēto Andrews barotni, pievienojot 3 % saharozes.

1. tabula

Andrews barotnes sastāvs: (ASTM apzīmējums E 1913-04)

Barotņu izejšķīdumu pagatavošana			Barotnes pagatavošana
Izejšķīdums	Ķīmikālija	Sākotnējais svars uz 1 000	ml uz 5 l barotnes
1	KCl	74,6 mg	50
	KNO ₃	8,08 g	
	Ca(NO ₃) ₂ × 4 H ₂ O	18,88 g	
2	MgSO ₄ × 7 H ₂ O	9,86 g	50
3	Sk. zemāk izejšķīdumu 3.1		50
4	KH ₂ PO ₄	2,72 g	50
5	FeSO ₄ × 7 H ₂ O	0,278 g	50
	Na ₂ EDTA × 2 H ₂ O	0,372 g	

Izejšķīdumu ledusskapī var turēt 6 mēnešus (5–10 °C temperatūrā). Mazāks glabāšanas laiks (2 mēneši) ir tikai izejšķīdumam Nr. 5.

2. tabula

Izejšķīduma 3.1 gatavošana izejšķīduma 3 sagatavošanai

Ķīmikālija	Sākotnējais svars g/100 ml
MnSO ₄ × 4 H ₂ O	0,223
ZnSO ₄ × 7 H ₂ O	0,115
H ₃ BO ₃	0,155
CuSO ₄ × 5 H ₂ O	0,0125
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ × 4 H ₂ O	0,0037

Pēc izejšķīduma 3.1 pagatavošanas (2. tabula) šo šķīdumu sasaldē aptuveni 11 ml alikvotās daļās (vismaz – 18 °C temperatūrā). Stipri sasaldētu porciju derīguma termiņš ir pieci gadi.

Lai pagatavotu izejšķidumu 3, atkausē izejšķidumu 3.1, 10 ml iepilda 1 l mērkolbā un tam pievieno augstākajā pakāpē tīru ūdeni līdz kolbas atzīmei.

Lai iegūtu modificētu *Andrews* barotni, 5 l mērkolbā iepilda aptuveni 2 500 ml augstākajā pakāpē tīru ūdeni. Pēc 50 ml pievienošanas no katra izejšķiduma mērkolbu 90 % no tilpuma pilda ar augstākajā pakāpē tīru ūdeni un pH koriģē uz 5,8.

Pēc tam pievieno 150 g izšķīdinātas saharozes (3 % uz 5 l); tad mērkolbu līdz atzīmei piepilda ar augstākajā pakāpē tīru ūdeni. Visbeidzot, barotņu šķidumu iepilda 1 l *Schott* kolbās un 20 minūtes sterilizē autoklāvā 121 °C temperatūrā.

Šādi iegūtu barotni sterilu ledusskapī (5–10 °C) var uzglabāt trīs mēnešus.

Modificēta *Andrews* barotne bezsedimentu toksiskuma testā

No pieciem barotņu izejšķidumiem, kas jau minēti 1. un 2. tabulā, pagatavo desmitkārtīgi koncentrētu, modificētu *Andrews* barotni, kas nepieciešama, lai iegūtu testa šķidumus, pievienojot 30 % saharozes. Lai to izdarītu, 1 l mērkolbā iepilda aptuveni 100 ml augstākajā pakāpē tīra ūdens. Pievieno 100 ml no katra izejšķiduma, pH koriģē uz 5,8. Pēc tam pievieno 30 % izšķīdušu saharozi (300 g uz 1 000 ml); tad aizpilda mērkolbu ar augstākajā pakāpē tīru ūdeni līdz atzīmei.

Visbeidzot, barotņu šķidumu iepilda 0,5 l *Schott* kolbās un 20 minūtes sterilizē autoklāvā 121 °C temperatūrā.

Šādi iegūtu desmitkārtīgi koncentrētu modificētu barotņu šķidumu sterilu ledusskapī (5–10 °C) var glabāt trīs mēnešus.

3. papildinājums

IZEJKULTŪRAS UZTURĒŠANA

Šajā 3. papildinājumā ir aprakstīta izejkultūra ūdens divdīgļlapis *Myriophyllum spicatum* L ⁽¹⁾, halorāgu dzimtas suga. Laikā no jūnija līdz augustam virs ūdens virsmas redzami neuzkrītoši balti rozā ziedi. Augi sakņojas zemē ar spēcīgu sakneņu sistēmu un ir sastopami visā ziemeļu puslodē eitrofiskos, bet nepiesārņotos stāvošos ūdeņos ar dubļainu substrātu un samērā augstu kalcija saturu. *Myriophyllum spicatum* dod priekšroku saldūdenim, bet tos var atrast arī iesālā ūdenī.

Bezsedimentu izejkultūrai laboratorijas apstākļos ir vajadzīgi sterili augi. Sterili augi ir pieejami Vācijas *Umweltbundesamt* (Vācijas Federālā Vides aģentūra) ekotoksikoloģijas laboratorijā.

Testa organismus arī var sagatavot no nesteriliem augiem saskaņā ar ASTM apzīmējumu E 1913-04. Sk. turpmāk (citēts no ASTM Standarta norādījumiem) procedūra no lauka ievāktas *Myriophyllum sibiricum* audzēšanai:

“Ja sākumam izmanto no lauka vāktus nesterilus augus, *M. sibiricum* atvases vāc rudenī. Atvases ievieto 20 l akvārijā, kas satur 5 cm sterilu sedimentu, kuri ir pārklāti ar kvarca smiltīm vai, piemēram, *Turface*®, un 18 litrus reaģenta ūdens. 16 h dienā akvāriju apgādā ar skābekli un uztur 15 °C temperatūru un plūsmas ātrumu 200–300 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Augu kultūru akvārijā var saglabāt kā augu rezerves avotu gadījumiem, kur sterilās augu kultūras iet bojā audzēšanas skapja mehāniskas atteices, kontaminācijas vai cita iemesla dēļ. Akvārijā audzētie augi nav sterili, un sterilas kultūras nevar turēt partiju kultūraudzēšanas sistēmā. Lai kultūru sterilizētu, augus izņem no akvārija un aptuveni 0,5 h skalo zem tekoša dejonizēta ūdens. Aseptiskos apstākļos laminārās gaisa plūsmas skapī augus dezinficē nepilnas 20 min. (līdz lielākā daļa auga audu izbalē un zaļa ir vēl tikai auga galotne) 3 % (tilpuma) nātrija hipohlorīta šķīdumā, kas satur 0,01 % piemērota virsmaktīvā aģenta. Dezinfekcijas līdzekli un augu materiālu sakrata. Segmentus ar vairākiem mezgliem pārvieta sterilās kultūraudzēšanas mēģenēs, kas satur 45 ml sterilizētas modificētas *Andrews* barotnes, un aizvāko ar vienkāršiem kultūraudzēšanas mēģeņu aizbāžņiem. Katrā testa kamerā ievieto tikai vienu augu segmentu. Kultivēšanas trauka aizbāžņi nostiprina ar laboratorijas hermetizētāju. Kad ir izveidota sterila kultūra, tādi augu segmenti, kuros ir vairāki mezgli, ik pēc desmit līdz divpadsmit dienām jāievieto jaunās testa kamerās, kas satur svaigu šķidro barotni. To pierādot ar kultūru audzēšanu uz agara platēm, augiem jābūt steriliem un, pirms var sākt testu, tiem jābūt bijuši steriliem astoņas nedēļas.”

Tā kā modificēta *Andrews* barotne satur saharozi (kas stimulē sēnīšu un baktēriju augšanu), jebkādi materiāli un šķīdumi jānogatavo un audzēšana jāveic sterilos apstākļos. Visus šķīdumus, kā arī aprīkojumu pirms lietošanas sterilizē. Sterilizāciju veic, izmantojot 4 h sakarsēta gaisa apstrādi (210 °C) vai 20 min autoklavēšanu 121 °C temperatūrā. Turklāt pirms lietošanas visas kolbas, traukus, kausus utt. un citu aprīkojumu uz sterila darbagalda apstrādā ar liesmu.

Izejkultūras samazinātā apgaismojumā un temperatūrā (50 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 20 $\pm$ 2 °C) bez nepieciešamības tās atjaunot var turēt ilgākus laikposmus. *Myriophyllum* augšanas barotnei jābūt tādai pašai, kāda izmantota testēšanā, bet izejkultūrām var izmantot citu barības vielām bagātu barotni.

Augu segmentus, ievērojot sterilitāti, sadala pa vairākām 500 ml Erlenmeijera vai/2000 ml Fernbaha kolbām, katru attiecīgi piepilda ar aptuveni 450 un 1 000 ml modificētas *Andrews* barotnes. Tad kolbas, ievērojot sterilitāti, noslēdz ar celulozes aizbāžņi.

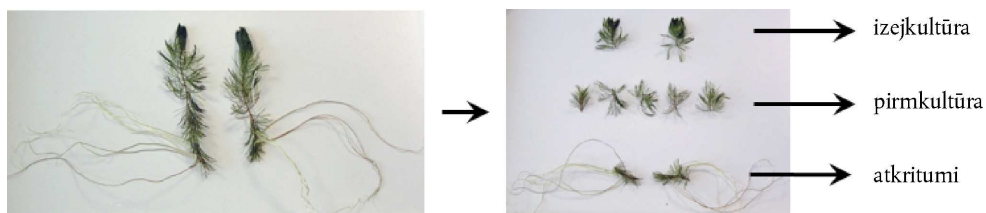
Turklāt tieši pirms lietošanas aprīkojums uz sterila darbagalda viscaur jāapstrādā ar liesmu. Atkarībā no to skaita un apjoma augus aptuveni ik pēc trīs nedēļām pārvieta uz svaigu barotni.

Šai atjaunotajai kultūrai var izmantot galotnes, kā arī stublāja vidusdaļas segmentus. Ievietoto augu (vai augu segmentu) skaits un lielums ir atkarīgs no tā, cik augu nepieciešams. Piemēram, vienā Fernbaha kolbā var ievietot piecus dzinumu segmentus, un vienā Erlenmeijera kolbā — trīs dzinumu segmentus, katru 5 cm garu. Jāizmet jebkādas daļas ar sakni, ziedošas, nedzīvas vai citādā veidā uzkrītošas daļas.

(¹) Carl von Linné (* May, 23th, 1707 in Råshult /Älmhult; † January, 10th, 1778 in Uppsala).

1. attēls

Augu griešana izejkultūrai un pirmkultūrai pēc 3 nedēļu ilgas kultivācijas.



Augi 500 ml Erlenmeijera un 2 000 ml Fernbaha kolbās jāaudzē dzesēšanas inkubatorā ar 20 ± 2 °C temperatūru un nepārtrauktu apgaismojumu apmēram $100\text{--}150 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ vai 6 000–9 000 Lux (ko izstaro kameras apgaismojums ar krāsas temperatūru “silti balta gaisma”).

2. attēls

Augu kultivēšana dzesēšanas inkubatorā ar kameras apgaismojumu.



Jāizmanto ķīmiski tīri (ar skābi mazgāti) un sterili stikla kultivēšanas trauki un aseptiskas apstrādes metodes. Ja izejkultūra ir kontaminēta, piemēram, ar aļģēm, sēnītēm un/vai baktērijām, ir jāsagatavo jauna kultūra vai šī viena kultūra jāatjaunina ar izejkultūru no citas laboratorijas.

4. papildinājums

PIRMKULTŪRAS UZTURĒŠANA UN TESTA ORGANISMA SAGATAVOŠANA TESTĒŠANAI

Lai iegūtu pirmkultūru, izejkultūras dzinumus sasmalcina segmentos ar diviem mieturiem katrā; segmentus ievieto Fernbaha kolbās, kas pildītas ar modificētu *Andrews* barotni (ar 3 % saharozes). Katra kolba var saturēt līdz pat 50 dzinumu segmentiem. Tomēr jāraugās, lai segmenti būtu dzīvotspējīgi un tiem nebūtu sakņu un sānu zarų vai to aizmetņu (sk. 1. att. 3. papildinājumā).

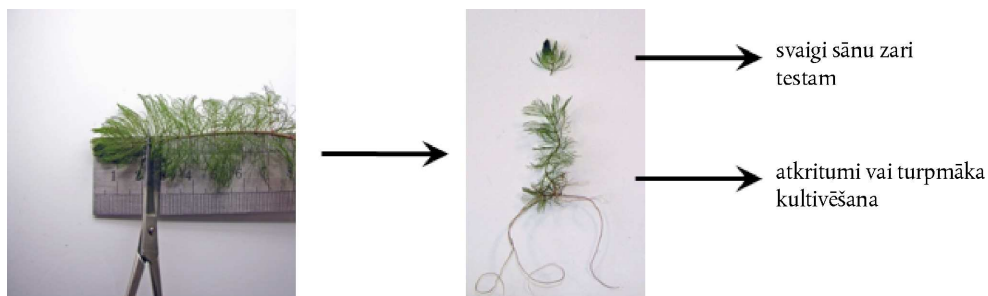
Pirmkultūras organismus sterilos apstākļos vides kamerā ar secīgām 16/8 h gaismas/tumsas fāzēm audzē 14 līdz 21 dienu. Gaismas intensitāti izraugās diapazonā $100\text{--}150\ \mu\text{E m}^{-2}\text{ s}^{-1}$. Temperatūrai testa traukos jābūt $23 \pm 2\ ^\circ\text{C}$.

Tā kā modificēta *Andrews* barotne satur saharozi (kas stimulē aļģu, sēnīšu un baktēriju augšanu), testējamās ķīmikālijas šķīdumi jāsgatavo un audzēšana jāveic sterilos apstākļos. Visus šķīdumus, kā arī aprīkojumu pirms lietošanas sterilizē Sterilizāciju veic, izmantojot 4 h ilgu apstrādi ar sakarsētu gaisu ($210\ ^\circ\text{C}$) vai 20 min autoklavēšanu $121\ ^\circ\text{C}$ temperatūrā. Turklāt pirms lietošanas visas kolbas, traukus, kausus utt. un citu aprīkojumu uz sterila darbagalda apstrādā ar liesmu.

Dzinumus, ievērojot sterilitāti, izņem no pirmkultūras kolbām, izraugoties iespējami viendabīgu materiālu. Katrai testēšanai vajadzīgi vismaz 60 testa organismi (testēšanai ar astoņām testējamās ķīmikālijas koncentrācijām). Testēšanai ņem svaigus sānu zarų no pirmkultūras, tos saīsina līdz 2,5 cm no pamatnes (ko mēra ar mērlīniju) un ievieto vārglāzē, kurā ir sterila modificēta *Andrews* barotne. Šos svaigos sānu zarų var izmantot *Myriophyllum spicatum* bezsedimentu toksiskuma testam.

2. attēls

Augu griešana no pirmkultūras *Myriophyllum spicatum* bezsedimentu toksiskuma testam.



C.51. *Myriophyllum spicatum* ūdens–sedimentu toksiskuma tests

IEVADS

1. Šī testēšanas metode ir līdzvērtīga ESAO testēšanas norādījumiem 239 (2014. gads). Testēšanas metodes ir pieejamas sugai *Lemna* (peldošs ūdensaugs, viendīgļlapis) (1), un aļģu sugām (2). Šīs metodes parasti izmanto, lai ģenerētu datus nolūkā novērst risku, ko testējamās ķimikālijas, jo īpaši herbicidālas iedarbības ķimikālijas, rada ūdensaugu sugām, kas nav mērķsugas. Tomēr dažos gadījumos var būt nepieciešami dati par papildu makrofitu sugām. Pēc Vides toksiskuma un ķīmijas apvienības (SETAC) semināra par ūdens makrofitu riska novērtējumu attiecībā uz pesticīdiem (AMRAP) nesen publicēti norādījumi ierosina, ka tad, ja zināms, ka *Lemna* un aļģes nav jutīgi pret iedarbības veidu, vai ja bažas rada tas, ka viela sadaloties nokļūst sedimentos, kā rezultātā notiek ekspozīcija caur sakņu sistēmu (3), attiecībā uz testējamām ķimikālijām var būt nepieciešami dati par sakņotām makrofitu sugām. Balstoties uz pašreizējo izpratni un pieredzi, gadījumiem, kad ir vajadzīgi dati par zem ūdens augošām, sakņotu divdīgļlapju sugām (4), (5), (6), kā vēlamo sugu izraudzījās *Myriophyllum* spp. Šis tests neaizstāj citus toksiskuma ūdenī testus; tas drīzāk papildina tos tādējādi, ka iespējams pilnīgāk novērtēt bīstamību un risku attiecībā uz ūdensaugiem. *Myriophyllum spicatum* ūdens–sedimentu testēšanas metode papildina *Myriophyllum spicatum* bezsedimentu toksiskuma testu (7).
2. Šis dokuments apraksta testēšanas metodi, kas ļauj novērtēt testējamās ķimikālijas ietekmi uz sakņotu ūdensaugu sugu *Myriophyllum spicatum*, kas aug ūdens–sedimentu sistēmā. Testēšanas metode ir daļēji balstīta uz esošajām metodēm (1), (2), (8), un tajā ņemti vērā nesen pētījumi, kas saistīti ar novērtējumu par risku ūdensaugiem (3). Ūdens–sedimentu metode ir validēta starptautiskā starplaboratoriju salīdzināšanā, kas statistiskos apstākļos veikta ar *Myriophyllum* sugas augiem, kuri eksponēti testējamai ķimikālijai, to ievadot ar vertikālā ūdens slāņa starpniecību (9). Tomēr testa sistēmu var viegli pielāgot, lai nodrošinātu ekspozīciju caur piesātinātiem sedimentiem vai ekspozīciju ūdens fāzē ar pusstatiskiem vai pulsveidīgu devu scenārijiem, lai gan šiem scenārijiem nav veikta starplaboratoriju salīdzināšana. Turklāt vispārīgo metodi var izmantot citām sakņotām zem ūdens un virs ūdens augošām sugām, tostarp citām *Myriophyllum* sugām (piemēram, *Myriophyllum aquaticum*) un *Glyceria maxima* (10). Alternatīvām sugām var būt nepieciešams modificēt testa nosacījumus, plānu un ilgumu. Konkrēti, vēl jāstrādā, lai noteiktu piemērotas procedūras attiecībā uz *Myriophyllum aquaticum*. Šajā testēšanas metodē šie varianti nav sīki izklāstīti, tā apraksta standarta pieeju *Myriophyllum spicatum* ekspozīcijai statiskā sistēmā, izmantojot ūdens fāzi.
3. Šī testēšanas metode attiecas uz vielām, attiecībā uz kurām tā ir validēta, (sīkāku informāciju sk. starplaboratoriju salīdzināšanas ziņojumā (9)), uz preparātiem vai zināmiem maisījumiem. *Myriophyllum* testu var veikt, lai izpildītu 1. līmeņa datu prasību, kas izriet no tā, ka testējamā ķimikālija sadalīšanās ceļā var nokļūt sedimentos, vai no jautājumiem par iedarbības veidu vai selektivitāti. Tāpat *Myriophyllum* laboratorijas tests var būt nepieciešams kā elements augstāka līmeņa stratēģijā, lai kļiedētu bažas par risku attiecībā uz ūdensaugiem. Ekspozīcijas ceļš (t. i., ūdens vai sedimenti) būs atkarīgs no testa veikšanas konkrētā iemesla. Pirms testēšanas metodi izmantot, lai regulatīvā nolūkā testētu maisījumu, ir jāapsver, vai ar to var iegūt paredzētajam nolūkam pietiekamus rezultātus, un, ja var, tad kāpēc. Šādi apsvērumi nav vajadzīgi, ja attiecībā uz maisījuma testēšanu pastāv regulatīva prasība.

TESTA PRINCIPS

4. Tests ir paredzēts, lai novērtētu ar ķimikāliju saistīto ietekmi uz veģetatīvo augšanu *Myriophyllum*, kas aug standartizētās barotnēs (ūdens, sedimenti un barības vielas). Šim nolūkam veselas, neziedošas dzinumu galotnes ievieto standartizētos, mākslīgos sedimentos, kas, lai augi pietiekami augtu, ir papildināti ar papildu barības vielām, un pēc tam tur Smārta un Barko barotnē (1. papildinājums). Pēc iejušanās perioda, kas paredzēts, lai izveidotu saknes, augus eksponē vairākām testējamajām koncentrācijām, kas pievienotas vertikālajam ūdens slānim. Ekspozīciju ar sedimentiem arī var simulēt, mākslīgos sedimentus piesātinot ar testējamo ķimikāliju un pārstādot augus šajos piesātinātajos sedimentos. Abos gadījumos pēc tam augus kontrolētos vides apstākļos tur 14 dienas. Ietekmi uz augšanu nosaka, kvantitatīvi novērojot dzinumu garumu, svaigsvāru un saussvāru, kā arī kvalitatīvi novērojot tādus simptomus kā hloroze, nekroze vai augšanas novirze.

5. Lai ar ķīmikāliju saistīto ietekmi noteiktu kvantitatīvi, augšanu testa šķīdumos salīdzina ar kontrolaugu augšanu un nosaka koncentrāciju, kas rada noteiktu x % augšanas inhibēšanās, to izsakot kā EC_x ; "x" atkarībā no regulatīvās prasības var būt jebkura vērtība, piemēram, EC_{10} , EC_{20} un EC_{50} . Jānorāda, ka EC_{10} un EC_{20} vērtību aplēses ir uzticamas un piemērotas tikai testos, kuros variācijas koeficienti kontrolaugiem ir zemāki par lēsto ietekmes līmeni, t. i., lai varētu stabili novērtēt EC_{20} , variācijas koeficientiem jābūt < 20 %.
6. Jānosaka neapstrādāto un apstrādāto augu vidējais īpatnējais augšanas rādītājs (aprēķina, novērtējot dzinumu garumu, dzinumu svaigsvāru un dzinumu saussvara) un pieaugums (aprēķina no dzinumu garuma, dzinumu svaigsvāra un dzinumu saussvara pieauguma). Pēc tam īpatnējo augšanas rādītāju (r) un pieaugumu (y) izmanto, lai noteiktu $E_r C_x$ (piemēram, $E_r C_{10}$, $E_r C_{20}$, $E_r C_{50}$) un attiecīgi $E_y C_x$ (piemēram, $E_y C_{10}$, $E_y C_{20}$, $E_y C_{50}$).
7. Ja nepieciešams, zemāko novērojamās ietekmes koncentrāciju (LOEC) un nenovērojamās ietekmes koncentrāciju (NOEC) no vidējā īpatnējā augšanas rādītāja un pieauguma aplēsēm var noteikt statistiski.

INFORMĀCIJA PAR TESTĒJAMO ĶĪMIKĀLIJU

8. Ir jābūt pieejamai analītiskai metodei, kas ir pietiekami jutīga, lai noteiktu testējamās ķīmikālijas daudzumu testa barotnē.
9. Informācijā par testējamo ķīmikāliju, kas var noderēt, lai izstrādātu testa nosacījumus, ietver tās strukturālo formulu, sastāvu (ja tā ir vairākkomponentu viela, UVCB, maisījums vai preparāts), tīrību un piemaisījumus, šķīdību ūdenī, stabilitāti ūdenī un gaismā, skābes disociācijas konstanti (pK_a), oktanola-ūdens sadalīšanās koeficientu (K_{ow}), ja pieejams, K_d attiecībā uz sedimentiem, tvaika spiedienu un bionoārdamība. Šķīdību ūdenī un tvaika spiedienu var izmantot, lai aprēķinātu Henrija likuma konstanti, kas norāda, vai ir iespējami būtiski testējamās ķīmikālijas zudumi testa periodā. Ja paredzami testējamās ķīmikālijas zudumi, šiem zudumiem jānosaka daudzums un jādokumentē turpmākās darbības, lai zudumus kontrolētu. Ja informācija par testējamās(-o) ķīmikālijas(-u) šķīdību un stabilitāti ir neskaidra, ieteicams šīs īpašības novērtēt testa apstākļos, t. i., tādā augšanas vidē, temperatūrā, apgaismojuma režīmā, ko izmanto testā. *Piezīme:* ja pārbauda gaismatkarīgus peroksīdāzes herbicīdus, jāizmanto laboratorijas apgaismojums ar dabiskajai saules gaismai līdzvērtīgu solāro ultravioleto gaismu.
10. Ja nepieciešams, testa barotnē jāmēra un jāpielāgo pH. Testa barotnes pH kontrole ir īpaši svarīga, piemēram, testējot metālus vai ķīmikālijas, kas ir hidrolītiski nestabili. Papildu norādījumi par tādu ķīmikāliju testēšanu, kuru testēšanu apgrūtina to fizikālķīmiskās īpašības, sniegti ESAO Norādījumu dokumentā (11).

TESTA DERĪGUMS

11. Lai testa rezultāti būtu derīgi, kontrolaugu vidējam kopējam dzinumu garumam un vidējam kopējam dzinumu svaigsvāram testa ekspozīcijas fāzes laikā vismaz jādivkāršojas. Turklāt kontrolaugi nedrīkst uzrādīt nekādus vizuālus hlorozes simptomus, un tiem jābūt acīmredzami nekontaminētiem ar citiem organismiem, piemēram, alģēm un/vai baktēriju plēvēm uz augiem, uz sedimentu virsmas un testa barotnē.
12. Kontrolkultūru replikātos vidējais variācijas koeficients pieaugumam, kura pamatā ir dzinumu svaigsvāra mērījumi (t. i., no testa sākuma līdz beigām), nepārsniedz 35 %.

STANDARTĶĪMIKĀLIJA

13. Standartķīmikāliju(-as), piemēram, 3,5-dihlorfenols, ko izmanto starplaboratoriju salīdzināšanā (9), laika gaitā regulāri jātestē, lai pārbaudītu testa procedūras veikspēju. Starplaboratoriju salīdzināšanas dati liecina, ka 3,5-DCP vidējās EC_{50} vērtības attiecībā uz dažādiem atkarīgajiem mainīgajiem bija no 4,7 līdz 6,1 mg/l (informācijai sk. starplaboratoriju salīdzināšanas ziņojumu par paredzamo ticamības intervālu ap šīm vērtībām). Standartķīmikāliju ieteicams testēt vismaz divas reizes gadā vai, ja testus veic retāk, vienlaikus ar testējamās ķīmikālijas toksiskuma noteikšanu. Paredzamo EC_{50} vērtību celvedis attiecībā uz 3,5-DCP sniegts Starptautiskās starplaboratoriju salīdzināšanas Statistikas ziņojumā (9).

METODES APRAKSTS

Testēšanas aprīkojums

14. Tests jāveic kontrolētos vides apstākļos, t. i., audzēšanas kamerā, audzēšanas telpā vai laboratorijā ar kontrolējamu dienas garumu, apgaismojumu un temperatūru (sk. iedaļu "Testa nosacījumi", 56.–58. punkts). Izejkultūras jāglabā atsevišķi no testa traukiem.
15. Pētījums jāveic, izmantojot stikla testa traukus, piemēram, akvārijus vai mērglāzes; parasti izmanto 2 l stikla mērglāzes (augstums apmēram 24 cm, diametrs 11 cm). Tomēr citi (t. i., lielāki) trauki var būt piemēroti ar nosacījumu, ka ir pietiekami liels ūdens dziļums, lai būtu iespējama neierobežota augšana un augi visu testa laiku atrastos zem ūdens.
16. Par tvertnēm augu stādīšanai sedimentos var izmantot plastmasas vai stikla augu podus (diametrs apmēram 9 cm, augstums 8 cm un tilpums 500 ml). Var izmantot arī stikla mērglāzes, un dažos gadījumos tās ir pat vēlamas (piemēram, testējot hidroforas ķīmikālijas vai ķīmikālijas ar augstu K_{ow}).
17. Poda/vārglāzes izmērs jāizraugās, ņemot vērā izraudzītos testa traukus un vēlamu testa plānu (sk. turpmāk). Ja izmanto testa plānu A (katrā podā viens dzinums, vienā traukā trīs podi), var būt vajadzīgi mazāki podiņi vai lielāki trauki. Ja izmanto testa plānu B (katrā podā trīs dzinumi, vienā traukā viens pods), norādīto podu un trauku izmēriem vajadzētu pietikt. Visos gadījumos minimālajam virsējā ūdens dziļumam jābūt 12 cm virs nosēdumu virskārtas un ir jāreģistrē nosēdumu virsmas laukuma/tilpuma attiecība pret ūdens virsmas laukumu/tilpumu.

Testa organisms

18. Šajā testēšanas metodē aprakstītās vispārīgās pieejas var izmantot, lai testētu dažādas ūdensaugu sugas. Tomēr šajā testēšanas metodē aprakstītie nosacījumi ir pielāgoti vārpainās daudzlapes *Myriophyllum spicatum* testēšanai. Šī suga pieder divdīgļlapju dzimtai *Haloragaceae*.
19. *Myriophyllum spicatum* (vārpainā daudzlape) ir zem ūdens augoša, sakņota suga, kas pacieš plašu diapazonu apstākļos un ir sastopama gan statiskās, gan tekošās ūdenstilpnēs. *M. spicatum* ir daudzgadīgs augs, kas ziemā līdz saknēm iet bojā. Augi parasti zied un brīvi izplata sēklas, lai gan jaunas kolonijas galvenokārt vairojas veģetatīvi ar žākles aizmetņiem vai stublāju fragmentiem, kas atdalās dabiski vai pēc mehāniskas iejaukšanās.

Testa organisma kultivēšana

20. Augus var iegūt no dabīgām populācijām vai no ūdensaugu piegādātājiem. Abos gadījumos augu avots jādokumentē un jāpārbauda sugu identitāte. Liela uzmanība jāpievērš tam, lai nodrošinātu, ka, vācot *Myriophyllum spicatum* no lauka, tiek iegūtas pareizās sugas, jo īpaši reģionos, kur augi var sakrustoties ar citām *Myriophyllum* sugām. Šādu gadījumā ieteicams izmantot verificētas laboratoriju kultūras no zināmiem avotiem. Šajā testā nedrīkst lietot augus, kas bijuši pakļauti jebkādai ķīmiskai kontaminācijai vai ir savākti no vietām, par kurām zināms, ka tās ir kontaminētas.
21. Reģionos, kur *M. spicatum* ziemas mēnešos nav viegli pieejama, var būt nepieciešams izejkultūras ilgstoši uzturēt siltumnīcas vai laboratorijas apstākļos. Izejkultūras jāuztur testa nosacījumiem līdzīgos apstākļos, lai gan starojumu un temperatūru var samazināt, lai samazinātu kultūras uzturēšanas biežumu (piemēram, ja *Myriophyllum* testi uz laiku netiek plānoti). Ieteicams izmantot lielākus akvārijus un augu podus nekā testos, lai tiem būtu telpa izplatīties. Sedimentu un ūdens-barotnes sastāvam jābūt tādām pašām kā testos izmantotajiem, kaut gan sedimentu mēslošanai var izmantot alternatīvas metodes (piemēram, izmantot lēnas iedarbības komerciālu mēslojuma preparātus).

22. Izejaugiem jābūt bez redzamas kontaminācijas, ko radījuši citi organismi, tostarp gliemeži, šķiedrveida aļģes, sēnītes un insekti, piemēram, kožu olas vai kāpuri *Paraponyx stratiotata* un smecernieku dzimtas kāpuri vai pieaugušie insekti *Eubrychius velutus*. Augu materiāls var būt jāskalo saldūdenī, lai likvidētu redzamu kontamināciju. Turklāt jāpūlas samazināt viensūnu aļģu un baktēriju kontaminācijas attīstīšanās, kaut gan augu materiālam nav jābūt pilnīgi sterilam. Izejkultūras jāuzrauga un, cik vajadzīgs, jāpārstāda, lai novērstu aļģu un baktēriju kontaminācijas attīstību. Ja kontaminācija ar aļģēm vai baktērijām kļūst problemātiska, var būt lietderīgi izejkultūras aerēt.
23. Visos gadījumos, pirms augus izmantot testā, tos pietiekami ilgu laiku (t. i., > 2 nedēļas) audzē/aklimatizē apstākļos, kas ir līdzīgi, bet ne obligāti identiski tiem, ko izmanto testā.
24. Testā nedrīkst izmantot ziedošas izejkultūras, jo veģetatīvas augšanas temps ziedēšanas laikā un pēc tās parasti samazinās.

Sedimenti

25. Šajā testā ir ieteicams izmantot sedimentus, kas pagatavoti uz tādu mākslīgo sedimentu bāzes, kas izmantoti šā pielikuma C.28. nodaļā (8). Sedimentus sagatavo, kā aprakstīts TM C.28., izņemot barības vielu pievienošanu, kas aprakstīta turpmāk:
- a) 4–5 % kūdras (saussvars pēc $2 \pm 0,5$ % organiskā oglekļa) ar pH, kas iespējami tuvāks 5,5 līdz 6,0; ir svarīgi izmantot smalki samaltu pulverveida kūdru (vēlams, daļiņu lielums < 1 mm) un tikai gaisā kaltētu.
 - b) 20 % (saussvars) kaolīna māli (kaolīnīta saturs vēlams virs 30 %).
 - c) 75–76 % (saussvars) kvarca smiltis (smalkas smiltis pārsvarā ar vairāk nekā 50 % daļiņu no 50 līdz 200 μm).
 - d) Pievieno ūdens šķīduma barotni, lai sedimentu gala partija saturētu 200 mg amonija hlorīda un nātrija fosfāta uz kilogramu sausu nosēdumu un mitruma saturs galīgajā maisījumā būtu 30–50 %.
 - e) Pievieno ķīmiski tīras kvalitātes kalcija karbonātu (CaCO_3), lai galīgā sedimentu maisījuma pH būtu pielāgots līdz $7,0 \pm 0,5$.
26. Kūdras, kaolīna māla un smilts avotam jābūt zināmam un dokumentētam. Ja izcelsme nav zināma vai rada zināmas bažas, attiecīgie komponenti jāpārbauda, vai tajos nav ķīmiskas kontaminācijas (piemēram, smagie metāli, hlororganiskie savienojumi, fosfora savienojumi).
27. Pirms sedimentos rūpīgi iejauc ūdens un barības vielu šķīdumu, sedimentu sausās sastāvdaļas sajauc līdz homogenitātei. Mitros sedimentus pagatavo vismaz divas dienas pirms lietošanas, lai nodrošinātu, ka kūdra viscaur izmirst un lai pēc barotnes uzliešanas uz sedimentiem virspusē neuzpeldētu hidroforas kūdras daļiņas; pirms lietošanas mitros sedimentus var glabāt tumšā.
28. Testam sedimentus ievieto piemērotā izmēra tvertnēs, piemēram, augu podos ar tādu diametru, lai tie ietilptu stikla traukos (sedimentu virsmai jābūt apmēram 70 % vai vairāk no trauka virsmas). Ja tvertnei apakšā ir caurumi, gabals filtrpapīra tvertnes apakšā palīdzēs sedimentus noturēt tvertnē. Podus piepilda ar sedimentiem tā, lai sedimentu virsma būtu līdzena, pēc tam tos pārklājot ar kārtiņu (~ 2–3 mm) inerta materiāla, piemēram, smiltīm, smalku dārzkopības granti (vai sasmalcinātiem koraļļiem), lai sedimenti paliktu attiecīgajā vietā.

Testa barotne

29. *Myriophyllum spicatum* audzēšanai un testēšanai ir ieteicama Smārta un Barko barotne (12). Šīs barotnes pagatavošana ir aprakstīta 1. papildinājumā. Lai augi optimāli augtu, testa sākumā barotnes pH (ūdens fāzei) jābūt no 7,5 līdz 8,0.

Eksperimentālais plāns

30. Testā jāiekļauj vismaz seši replikātu testa trauki neapstrādātai kontrolei un vismaz četri replikātu testa trauki katram no vismaz pieciem koncentrācijas līmeņiem.
31. Ja NOEC noteikšana nav nepieciešama, testa plānu var mainīt, palielinot koncentrāciju skaitu un samazinot vienas koncentrācijas replikātu skaitu.
32. Katrs tests trauks ir replikāts, kurā ir trīs dzinumi. Ir divas iespējas, kā katrā testa traukā audzēt trīs dzinumus:
 - Plāns A: viens dzinums katrā podā un trīs podi vienā traukā.
 - Plāns B: trīs dzinumi katrā podā un viens pods vienā traukā.
 - Alternatīvs testa plāns ar vienu dzinumu vienā podā uz testa trauku ir pieņemams, ja replikātus pielāgo pēc vajadzības, lai panāktu atbilstību paredzētajiem derīguma kritērijiem.
33. Atsevišķus testa traukus randomizēti sadala pa apstrādes grupām. Testa trauku atrašanās vietas testa zonā jāplāno randomizēti, lai samazinātu gaismas intensitātes vai temperatūras telpisko atšķirību ietekmi.

Testējamo ķīmikāliju koncentrācijas un kontroles grupas

34. Koncentrācijām parasti jābūt ģeometriskā progresijā; atstatuma koeficients starp testējamajām koncentrācijām nedrīkst pārsniegt 3,2. Piemērotas testējamās koncentrācijas palīdzēs izraudzīties diapazona noteikšanas testā iegūtas iepriekšējās zināšanas par testējamās ķīmikālijas toksiskumu.
35. Nosakot EC_x attiecīgu ticamības līmeni var nodrošināt, ja testējamās koncentrācijas ir tādas, ka vērtība EC_x atrodas starp tām. Piemēram, ja aprēķina EC_{50} , augstākajai testējamajai koncentrācijai jāpārsniedz vērtība EC_{50} . Ja vērtība EC_{50} neiekļaujas testējamo koncentrāciju diapazonā, saistītie ticamības intervāli būs lieli, un var nebūt iespējams novērtēt modeļa statistisko piemērotību. Precīzāku ticamības intervālu attiecībā uz EC_x vērtību būs iespējams iegūt, izmantojot vairāk testējamo koncentrāciju.
36. Lai noteiktu LOEC/NOEC (izvēles beigupunkts), zemākajai testējamajai koncentrācijai jābūt pietiekami zelai, lai augšana būtiski neatšķirtos no kontrolaugu augšanas. Turklāt augstākajai testējamajai koncentrācijai jābūt pietiekami augstai, lai augšana būtu ievērojami zemāka nekā kontrolē. Lielāka replikātu skaita izmantošana uzlabos nenovērojamas ietekmes koncentrācijas/ANOVA plāna statistisko jaudu.

Robežtests

37. Ja diapazona noteikšanas tests liecina, ka testējamajai ķīmikālijai koncentrācijā līdz 100 mg/l, līdz tās šķīdības robežai testa barotnē, vai — preparāta gadījumā — līdz izkliedēšanās robežai nav nelabvēlīgas ietekmes, ar 100 mg/l, ar šķīdības robežai līdzvērtīgu koncentrāciju vai ar 1 000 mg/kg sausu sedimentu var veikt robežtestu, lai būtu vieglāk salīdzināt kontroles grupas un vienas apstrādes grupas atbildreakciju. Šajā testā ir jāievēro devas—atbildreakcijas standarttesta vispārīgie principi, izņemot to, ka minimālo replikātu skaitu ieteikts palielināt līdz sešiem testa traukiem uz kontroli un koncentrāciju. Augšanu kontroles un apstrādes grupā var analizēt, izmantojot statistisku testu, kurā salīdzina vidējos rādītājus, piemēram, Stjūdenta t testu.

Testa šķīdumi

38. Testa šķīdumus parasti gatavo, atšķaidot izejšķīdumu, kas pagatavots, izšķīdinot vai izkliedējot testējamo ķīmikāliju Smārta un Barko barotnē, izmantojot demineralizētu (t. i., destilētu vai dejonizētu) ūdeni (sk. 1. papildinājumu).

39. Augstākā testējamajai koncentrācija parasti nedrīkst pārsniegt testējamās ķīmikālijas šķīdību ūdenī vai preparātu gadījumā, izkliedējamību testa apstākļos.
40. Attiecībā uz testējamām ķīmikālijām, kas slikti šķīst ūdenī, var būt nepieciešams sagatavot koncentrētu izejšķīdumu vai dispersiju, izmantojot organisko šķīdinātāju vai izkliedētāji, lai atvieglotu precīzu testējamās ķīmikālijas daudzumu pievienošanu testa barotnei un veicinātu tās dispersiju un izšķīšanu. Jādara viss iespējams, lai šādi šķīdinātāji vai izkliedētāji nebūtu jāizmanto. Papildu šķīdinātāju vai izkliedētāji izmantošana nedrīkst radīt fitotoksiskumu. Piemēram, parasti izmanto šķīdinātājus, kas neizraisa fitotoksiskumu koncentrācijās līdz 100 µl/l, tostarp acetonu un dimetilformamīdu. Ja izmanto šķīdinātāju vai izkliedētāji, tās gala koncentrācija jāatspoguļo ziņojumā un jāslabā minimāla (≤ 100 µl/l). Šādos apstākļos visām apstrādēm un (šķīdinātāja) kontrolēm jāsaturs tā pati šķīdinātāja vai izkliedētāji koncentrācija. Testa plānā iekļauj arī neapstrādātus kontroles replikātus, kas nesatur šķīdinātāju vai izkliedētāji. Papildu norādījumi par izkliedētāji izmantošanu doti ESAO Norādījumu dokumentā (11).

TESTA PROCEDŪRA

41. Testa procedūra atšķiras atkarībā no testējamās ķīmikālijas ievadīšanas ceļa (t. i., ūdens vai sedimentu fāzē). Lai informēti izvēlētos testā izmantoto ekspozīcijas režīmu (t. i., statisku sistēmu vai statiskas atjaunošanas sistēmu, piesātināta ūdens sistēmu vai piesātinātu sedimentu sistēmu), jāņem vērā testējamās ķīmikālijas iespējamā izturēšanās ūdens-sedimentu sistēmā. Piesātinātu sedimentu tests ir vēlamāks dažām ķīmikālijām, attiecībā uz kurām paredzams, ka liela daļa sadalījumā pārvietosies uz sedimentiem.

Iejušanās fāze

42. Kultūraugiem nogriež veselīgas dzinumu galotnes/galus, proti, bez sānu dzinumiem, raugoties, lai dzinumu garums būtu 6 cm (± 1 cm). Testa plānam A (viens dzinums uz podu un trīs podi uz vienu trauku) katrā podā pa vienam iestāda atsevišķus dzinumu galus. Testa plānam B (trīs dzinumi uz podu un viens pods uz vienu trauku) četras līdz piecas dzinumu galotnes stāda katrā podā ar sedimentiem.
43. Abos gadījumos materiāls jāstāda papildu podos, lai testa sākumā varētu atlasīt vienādus augus, kā arī nodrošināt rezerves augus, ko izmantot sakņu augšanas pārbaudei tieši pirms apstrādes, un rezerves augus, ko ievākt dzinumu biomasas un garuma mērījumiem 0. dienā.
44. Dzinumus ievieto tā, ka aptuveni trīs cm, kas aptver vismaz divus mezglus, ir zem sedimentu virsmas.
45. Podus pēc tam novieto testa traukos, kuros ir tādi paši vides apstākļi kā ekspozīcijas fāzē, un septiņas dienas tur Smārta un Barko barotnē, lai ierosinātu sakņu attīstību.
46. Pēc šā laika vairāki augi rezerves podos jāizņem sakņu augšanas pārbaudei. Ja sakņu augšana nav redzama (t. i., nav redzami sakņu gali), iejušanās fāze jāpagarina, līdz sakņu augšana ir redzama. Šis solis ir ieteicams, lai nodrošinātu, ka augi testa sākumā aktīvi aug.

Viendabīga augu materiāla atlase

47. Podus, kas izraudzīti tā, lai būtu vienādi, testa plānam A (viens dzinums uz podu un trīs podi uz vienu trauku) izraugās pirms testa sākšanas. Testa plānam B (trīs dzinumi uz podu un viens pods uz vienu trauku) pārpalikušos augus noņem, atstājot trīs augus, kas ir vienāda lieluma un izskata.

Ekspozīcija, izmantojot ūdens fāzi

48. Podus, kas izraudzīti tā, lai būtu vienādi, ievieto testa traukos, kā paredzēts eksperimenta plānā. Tad testa traukos pievieno Smārta un Barko barotni. Sedimentiem jāpaliek neuzjaukti. Šim nolūkam barotni var pievienot caur piltuvi vai, kamēr barotni ielej testa traukos, sedimentus pārklāt ar plastmasas disku, disku tūlīt pēc tam noteikti noņemt. Vai arī augu podus var ievietot testa traukos pēc barotnes pievienošanas. Ja vajadzīgs, lai mazinātu iespējamo aļģu un baktēriju uzkrāšanos, abos gadījumos ekspozīcijas fāzes sākumā var izmantot svaigu barotni vai atļaut, ka visiem replikātiem izmanto atsevišķas sagatavotas testa šķīduma partijas.
49. Dzinumu garumu virs sedimentiem mēra vai nu pirms, vai pēc barotnes pievienošanas.
50. Attiecīgus testējamās ķīmikālijas daudzumus var pievienot testa barotnei, pirms to pievieno testa traukiem. Vai arī testējamo ķīmikāliju var pievienot barotnei pēc tam, kad to pievieno testa traukiem. Šajā gadījumā raugās, ka testējamā ķīmikālija ir vienmērīgi sadalīta visā testa sistēmā, neuzjaucot sedimentus.
51. Visos gadījumos testa sākumā jāreģistrē testa barotnes izskats (piemēram, skaidra, duļķaina u. c.).

Ekspozīcija ar sedimentiem

52. Piesātinātus nosēdumus no izvēlētas koncentrācijas sagatavo, testējamās ķīmikālijas šķīdumu pievienojot tieši svaigiem sedimentiem. Dejonizētā ūdenī izšķīdinātu testējamās ķīmikālijas izejšķīdumu ar sedimentu preparātu sajauc ar velmēšanu, barības mikseri vai ar roku. Ja testējamā ķīmikālija slikti šķīst ūdenī, to var izšķīdināt piemērotā organiskā šķīdinātājā (piemēram, heksāns, acetons vai hlороforms), raugoties, lai tā tilpums būtu iespējami mazs. Pēc tam šo šķīdumu sajauc ar ca. 10 g smalku kvarca smilšu uz vienu testa trauku. Šķīdinātājam ļauj iztvaikot, un pēc tam smiltis sajauc ar piemērotu daudzumu sedimentu uz testa vārglāzi. Testējamo ķīmikāliju izšķīdināt, izkliedēt vai emulgēt drīkst tikai ar viegli iztvaikojošiem aģentiem. Jāpatur prātā, ka galīgajā sedimentu sagatavošanā jāņem vērā ar testējamo ķīmikāliju piesātināto smilšu tilpums/svars (t. i., sedimenti tādēļ jāpagatavo ar mazāku smilšu daudzumu). Jāraugās, lai sedimentiem pievienotā testējamā ķīmikālija sedimentos būtu sadalīta rūpīgi un vienmērīgi.
53. Piesātinātus sedimentus iepilda podos (kā aprakstīts iepriekš). Augus, kas izvēlēti tā, lai tie būtu vienādi un tiem būtu pietiekama sakņu sistēma, no iejušanās fāzē izmantotajiem podiem izņem un, kā iepriekš aprakstīts, pārstāda piesātinātajos sedimentos.
54. Podus ievieto testa traukos, kā paredzēts eksperimentālajā plānā. Tad uzmanīgi pievieno Smārta un Barko barotni (piemēram, izmantojot piltuvi), raugoties, lai sedimenti netiktu uzjaukti. Dzinumu garumu virs sedimentiem mēra vai nu pirms, vai pēc barotnes pievienošanas.

Ūdens līmeņu uzturēšana testa laikā

55. Jāreģistrē galīgais ūdens tilpums un jāatzīmē ūdens līmenis katrā testa traukā. Ja ūdens testa laikā iztvaiko par vairāk nekā 10 %, tā līmenis jāatjauno ar destilētu ūdeni. Ja nepieciešams, mērglāzes var brīvi pārklāt ar caurspīdīgu vāku, piemēram, caurspīdīgas plastmasas vāciņiem, lai samazinātu iztvaikošanu un kontamināciju ar aļģu sporām.

Testa nosacījumi

56. Izmanto silti un/vai vēsi baltu dienasgaismas apgaismojumu, lai nodrošinātu gaismas starojumu diapazonā apmēram $140 (\pm 20) \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, to mērot kā fotosintēzes aktīvo starojumu (400–700 nm) pie ūdens virsmas un izmantojot gaismas-tumsas attiecību 16:8 h. Jebkādas novirzes no izraudzītās apgaismojuma intensitātes testa zonā nedrīkst pārsniegt $\pm 15 \%$.

57. Temperatūra testa traukos ir $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$.
58. Testa laikā kontroles barotnes pH nedrīkst paaugstināties vairāk kā par 1,5 vienībām. Tomēr, ja var pierādīt, ka ir izpildīti iepriekš norādītie derīguma kritēriji, tests joprojām būs derīgs arī ar novirzēm, kas pārsniedz 1,5 vienības.

Testa ilgums

59. Ekspozīcijas periods ir 14 dienas.

Mērījumi un analītiskā noteikšana

60. Pēc iejušanās fāzes un tieši pirms apstrādes (t. i., 0. dienā) no pieciem randomizēti izraudzītiem podiem (plānā ar trim augiem uz podu) vai 15 podiem (plānā ar vienu augu uz podu) turpmāk apraksītajai dzinumu garuma un svaigsvara un saussvara novērtēšanai ievāc rezerves augus.
61. Augiem ekspozīcijas fāzē, kā parādīts 1. tabulā, novērtē šādus parametrus.
- Pamatdzinumu garuma, sānu dzinumu skaita un sānu dzinumu garuma novērtējumus reģistrē vismaz ekspozīcijas perioda beigās (piemēram, 14. dienā).
 - Vizuālos novērtējumus par augu veselību reģistrē vismaz trīs reizes ekspozīcijas perioda laikā (piemēram, 0., 7. un 14. dienā).
 - Dzinumu svaigsvara un saussvara novērtējumus veic testa beigās (t. i., 14. dienā).
62. Dzinumu garumu nosaka ar mērlineālu. Ja ir attīstījušies sānu dzinumi, jāmēra arī to skaits un garums.
63. Augu veselības vizuālos novērtējumus veic, reģistrējot augu izskatu un testa barotnes vispārējo stāvokli. Jāatzīmē arī šādi novērojumi.
- Nekroze, hloroze vai citas krāsu izmaiņas, piemēram, pārmērīgs apsārtums salīdzinājumā ar kontrolaugiem.
 - Radusies kontaminācija ar baktērijām vai aļģēm.
 - Augšanas anomālijas, piemēram, augšanas aizture, mainīts internodālais garums, deformēti dzinumi/lapas, sānu dzinumu savairošanās, lapu zaudējums, šūnas iekšējā spiediena (turgora) zudums un stublāju sadrumstalotība.
 - Sakņu veselību vizuāli novērtē testa beigās, no saknēm rūpīgi nomazgājot sedimentus, lai varētu izdarīt sakņu sistēmas novērojumus. Ierosinātā skala augu novērtēšanai salīdzinājumā ar kontrolaugiem:
 - 1) nav sakņu;
 - 2) sakņu ir maz;
 - 3) mērena sakņu attīstība;
 - 4) ļoti laba sakņu attīstība, līdzīga kontrolaugiem.
64. Testa sākumā un beigās novērtē svaigsvaru, nogriežot dzinumus sedimentu līmenī un pirms svēršanas nosusinot sausus. Jāraugās, lai noņemtu sedimentu daļiņas, kas var pielipt pie dzinuma pamatnes. Dzinumu materiālu pēc tam ievietoto kaltēšanas krāsnī ca. 60°C temperatūrā un kaltē līdz konstantai masai, pēc tam atkārtoti nosver un reģistrē saussvaru.
65. Kopsavilkums par minimālajiem bioloģiskajiem novērtējumiem, kas jāizdara visā testa laikā, ir sniegts 1. tabulā.

1. tabula

Novērtējuma plāns

Diena pēc apstrādes (DAT)	<i>Myriophyllum spicatum</i>			
	Dzinumu garums, sānu dzinumu garums un skaits	Dzinumu vizuālais novērtējums	Dzinumu svaigsvars un saussvars Sakņu vizuālais novērtējums	pH O ₂
0	A	A	A	A
4	—	—	—	—
7	—	A	—	A
14	A	A	A	A

A: liecina, ka šajos gadījumos ir vajadzīgi novērtējumi.

—: liecina, ka mērījumi nav vajadzīgi.

Mērījumu biežums un analītiskā noteikšana

66. Vismaz reizi dienā (vai nepārtraukti, izmantojot datu reģistrētāju), jāreģistrē barotnes temperatūra rezerves traukā, ko tur tādos pašos apstākļos kā audzēšanas kamerā, inkubatorā vai telpā.
67. Testa sākumā, vismaz reizi pētījuma laikā un pētījuma beigās visiem replikātu traukiem jāpārbauda testa barotnes pH un izšķīdušā skābekļa koncentrācija. Visos gadījumos mērījumi jāveic vienā un tajā pašā diennakts laikā. Ja visus replikātus katrai testējamajai koncentrācijai sagatavo ar vienu lielu šķīduma apjomu, ir pieņemami 0. dienā mērījumus katram lielapjoma šķīdumam izdarīt vienu reizi.
68. Audzēšanas kamerā, inkubatorā vai telpā punktos, kas ekvivalenti ūdens virsmas līmenim, jāmēra starojums. Mērījumi testa sākumā vai testa laikā jāizdara vismaz vienu reizi. Izmērīto vērtību ietekmēs gaismas noteikšanas un mērīšanas metode, jo īpaši sensora veids. Sfēriski sensori (kas reaģē uz gaismu no visiem leņķiem virs un zem mērīšanas plaknes) un kosinusa formas sensori (kas reaģē uz gaismu no visiem leņķiem virs mērīšanas plaknes) ir vēlāmāki par vienvirziena sensoriem, un tie dos precīzākus šeit aprakstīto daudzleņķu gaismas avotu nolasījumus.

Testējamās ķīmikālijas analītiskie mērījumi

69. Ar testējamās ķīmikālijas koncentrāciju analītiskajiem mērījumiem jāpamato, ka testējamā ķīmikālija ievadīta pareizi.
70. Ūdens paraugi testējamās ķīmikālijas analīzei jāievāc neilgi pēc testa sākuma (t. i., dienā, kad ievadītas stabilas testējamās ķīmikālijas, vai vienu stundu pēc nestabilu ķīmikāliju ievadīšanas) un visām testējamajām koncentrācijām testa beigās.
71. Vismaz augstākajai testējamajai koncentrācijai testa sākumā un beigās jānosaka koncentrācija sedimentos un sedimentu poru ūdenī, ja vien nav zināms, ka testējamās ķīmikālijas ūdenī ir stabilas (> 80 % no nominālā). Mērījumi sedimentos un poru ūdenī varētu nebūt nepieciešami, ja testējamo ķīmikāliju sadalīšanās pa ūdeni un sedimentiem ir precīzi noskaidrota salīdzināmos apstākļos (piemēram, attiecībā uz sedimentu un ūdens attiecību, ievadīšanas metodi, sedimentu veidu) veiktā ūdens/sedimentu pētījumā.

72. Sedimentu paraugu ņemšana testa sākumā var izjaukt testa sistēmu. Tāpēc var būt vajadzīgi papildu apstrādāti testa trauki, lai atvieglotu analītisko noteikšanu, testu sākot un beidzot. Tāpat, ja tiek uzskatīts, ka nepieciešami starpposma novērtējumi, t. i., 7. dienā, un analīzēm vajadzīgi lieli sedimentu paraugi, ko nevar viegli paņemt testa sistēmā, analītiskā noteikšana jāveic, izmantojot papildu testa traukus, kas ir apstrādāti tādā pašā veidā kā tie, kas izmantoti bioloģiskajiem novērtējumiem.
73. Lai izolētu intersticiālo ūdeni, ieteicama centrifugēšana, piemēram, 10 000 g un 4 °C 30 minūtes. Tomēr, ja ir pierādīts, ka testējamā ķīmikālija uz filtriem neabsorbējas, var būt pieņemama arī filtrēšana. Dažos gadījumos, ja paraugs ir pārāk mazs, koncentrāciju poru ūdenī analizēt var nebūt iespējams.
74. Pusstatiskos testos (t. i., ekspozīcija caur ūdens fāzi), kuros nav paredzams, ka testējamās(-o) ķīmikālijas(u) koncentrācija, testa šķīdumus neatjaunojot, saglabāsies 20 % robežās no nominālās koncentrācijas, katrā atjaunošanas reizē testējamās ķīmikālijas koncentrācijas jāanalizē, ņemot paraugus no izlietotajiem, kā arī no svaigi pagatavotajiem testa šķīdumiem.
75. Ja izmērītā sākotnējā testējamās ķīmikālijas koncentrācija nav 20 % robežās no nominālās, bet ja var nodrošināt pietiekamus pierādījumus, ka sākotnējās koncentrācijas ir atkārtojamas un stabilas (t. i., 80–120 % robežās no sākotnējās koncentrācijas), ķīmisko noteikšanu var veikt tikai attiecībā uz augstāko un zemāko testējamo koncentrāciju.
76. Visos gadījumos testējamās ķīmikālijas koncentrācijas noteikšana attiecībā uz katru testējamo koncentrāciju jāveic tikai vienā replikātu traukā. Katrai koncentrācijai analīzi nolūkā var arī apvienot visu replikātu testa šķīdumus.
77. Ja ir pierādījumi, ka testējamās ķīmikālijas koncentrācija visā testa laikā ir saglabājusies 20 % robežās no nominālās vai izmērītās sākotnējās koncentrācijas, rezultātu analīzi un turpmāku beigupunktu atvasināšanu var balstīt uz nominālajām vai izmērītajām sākotnējām vērtībām.
78. Šajos gadījumos ietekmi izraisošās koncentrācijas iegūst, balstoties uz nominālajām vai testa sākumā izmērītajām ūdens koncentrācijām.
79. Tomēr, ja ir pierādījumi, ka visā testa laikā koncentrācija ir samazinājusies (t. i., apstrādātajā nodaļījumā nesaglabājas 20 % robežās no nominālās vai izmērītās sākotnējās koncentrācijas), rezultātu analīzei jābalstās uz ģeometrisko vidējo koncentrāciju iedarbības laikā vai uz modeļiem, kas apraksta testējamās ķīmikālijas koncentrācijas samazināšanos šajā apstrādātajā nodaļījumā (11).

DATU NOVĒRTĒŠANA

80. Ja jāizmanto šķīdinātāji/izkaldētāji, statistiskajai analīzei datus par šķīdinātāja kontrolēm un neapstrādātajām kontrolēm var apvienot ar nosacījumu, ka šķīdinātāja atbildreakcija un neapstrādātās kontroles atbildreakcija statistiski nozīmīgi neatšķiras.

Atkarīgie mainīgie

81. Testa mērķis ir noteikt testējamās ķīmikālijas ietekmi uz testa augu veģetatīvo augšanu, izmantojot divus atkarīgos mainīgos: vidējo īpatnējo augšanas rādītāju un pieaugumu.

Vidējais īpatnējais augšanas rādītājs

82. Šis atkarīgais mainīgais ir balstīts uz visā laika gaitā novērotām kopējā dzinumu garuma, kopējā dzinumu svaigsvara un kopējā dzinumu saussvara logaritmu pārmaiņām kontrolē un katrā apstrādes grupā. Šo mainīgo aprēķina katram katras kontroles un apstrādes grupas replikātam. Trim augiem uz katru testēšanas trauku (replikāts) vidējo garumu un svaru un pēc tam augšanas rādītāju katram replikātam aprēķina, izmantojot šādu formulu:

$$\mu_{i-j} = \frac{\ln(N_j) - \ln(N_i)}{t}$$

kur:

μ_{i-j} : vidējais īpatnējais augšanas rādītājs no laika punkta i līdz j

N_i : mērījuma mainīgais testa vai kontroles traukā laika punktā i

N_j : mērījuma mainīgais testa vai kontroles traukā laika punktā j

t: laiks no i līdz j

83. No replikātu atbildreakcijām jāaprēķina augšanas rādītāja vidējā vērtība kopā ar dispersijas aplēsēm attiecībā uz katru apstrādes un kontroles grupu.
84. Vidējais īpatnējais augšanas rādītājs jāaprēķina visam testa periodam (laikpunkts "i" iepriekš minētajā formulā ir testa sākums un laika punkts "j" ir testa beigas). Katrai testējamajai koncentrācijai un kontrolei aprēķina vidējā īpatnējā augšanas rādītāja vidējo vērtību, kā arī dispersiju.
85. Augšanas rādītāja procentuālo inhibēšanos (I_r) katrai testējamajai koncentrācijai (apstrādes grupai) var aprēķināt saskaņā ar šādu formulu:

$$\%I_r = \frac{(\mu_c - \mu_r)}{\mu_c} \times 100$$

kur:

% I_r : vidējā īpatnējā augšanas rādītāja procentuālā inhibēšanās

μ_c : vidējā vērtība μ kontrolē

μ_r : vidējā vērtība μ apstrādes grupā

Pieaugums

86. Šis atkarīgais mainīgais ir balstīts uz visā laika gaitā novērotām kopējā dzinumu garuma, kopējā dzinumu svaigsvara un kopējā dzinumu saussvara pārmaiņām kontrolē un katrā apstrādes grupā. Vidējo procentuālo pieauguma inhibēšanos (% I_y) katrai apstrādes grupai var aprēķināt šādi:

$$\%I_y = \frac{(b_c - b_r)}{b_c}$$

kur:

% I_y : pieauguma procentuālais samazinājums

b_c : beigu biomasa mīnus sākotnējā biomasa kontroles grupai

b_r : beigu biomasa mīnus sākotnējā biomasa apstrādes grupai

Koncentrācijas–atbildreakcijas līknes zīmēšana

87. Jāzīmē koncentrācijas–atbildreakcijas līknes, kas atspoguļo atkarīgā mainīgā vidējo procentuālo inhibēšanos (I_t vai I_y) un ko aprēķina, kā parādīts iepriekš, un grafiski attēlo testējamās ķīmikālijas logaritmizētu koncentrāciju.

EC_x aplēse

88. EC_x aplēses (piemēram, EC₅₀) jābalsta gan uz vidējo īpatnējo augšanas rādītāju ($E_t C_x$), gan pieaugumu ($E_y C_x$), no kuriem katrs savukārt jābalsta uz dzinumu kopējo svaigsvaru, dzinumu kopējo saussvaru un dzinumu kopējo garumu.
89. Jāatzīmē, ka EC_x vērtības, kas aprēķinātas, izmantojot šos divus atkarīgos mainīgos, nav salīdzināmas, un šī starpība tiek atzīta, izmantojot testa rezultātus. Ja tiek ievēroti šīs testēšanas metodes testa nosacījumi, lielākajā daļā gadījumu (sakarā ar attiecīgo pieeju matemātisko pamatojumu) uz vidējo īpatnējo augšanas rādītāju ($E_t C_x$) balstītās EC_x vērtības būs lielākas par rezultātiem, kas balstīti uz pieaugumu ($E_y C_x$). Šo starpību nedrīkst interpretēt kā abu atkarīgo mainīgo jutības starpību, jo šīs vērtības vienkārši ir matemātiski atšķirīgas.

Statistiskās procedūras

90. Mērķis ir regresijas analīzē iegūt koncentrācijas–atbildreakcijas kvantitatīvu sakarību. Iespējams izmantot svērto lineāro regresiju pēc tam, kad veikta atbildreakcijas datu linearizējoša transformācija, piemēram, probita, logita vai Veibula vienībās (13), bet priekšroka tiek dota nelineārās regresijas procedūru metodēm, ar kurām labāk risināt neizbēgamās datu neatbilstības un novirzes no līdzsvarota sadalījuma. Tuvu pie nulles vai pilnīgas inhibēšanās šādas neatbilstības var pastiprināt arī transformācija, kas traucē analīzi (13). Jāatzīmē, ka standarta analīzes metodes, kurās izmantoti probita, logita vai Veibula transformācijas modeļi, ir paredzētas tam, lai apstrādātu binārus datus (piemēram, mirstība vai izdzīvotība), un augšanas rādītāja vai pieauguma datiem tās būtu jāpielāgo. Īpašas procedūras EC_x vērtību noteikšanai, kurā izmanto nepārtrauktus datus, sk. (14), (15), (16) (17).
91. Katram analizējamajam atkarīgajam mainīgajam, izmantojot koncentrācijas–atbildreakcijas sakarību, aplēs EC_x vērtību punktus. Katrai aplēsei nosaka 95 % ticamības robežu, un vai nu grafiski vai statistiski novērtē atbildreakcijas datu atbilstību regresijas modelim. Regresijas analīze jāveic, izmantojot atsevišķo replikātu atbildreakcijas, nevis apstrādes grupas vidējos rādītājus.
92. EC₅₀ aplēses un ticamības robežu var iegūt arī, izmantojot lineāro interpolāciju ar paškorelācijas (*bootstrapping*) metodi (18), ja datiem nav piemēroti pieejamie regresijas modeļi/metodes.
93. LOEC un līdz ar to NOEC novērtēšanai ir jāsalīdzina apstrādes vidējie rādītāji, izmantojot dispersijas analīzes (ANOVA) metodes. Tad katras koncentrācijas vidējo lielumu salīdzina ar kontroles vidējo lielumu, izmantojot piemērotu testēšanas metodi (piemēram, Daneta vai Viljamsa testi) (19), (20), (21), (22). Ir nepieciešams izvērtēt, vai attiecībā uz dispersiju spēkā ir ANOVA pieņēmums par normālu sadalījumu (ND) un dispersijas viendabīgumu (VH). Šis novērtējums jāveic ar Šapiro-Vilksa testu (ND) vai Lēvena testu (VH). Neatbilstību pieņēmumam par ND un dispersijas viendabīgumu dažkārt var koriģēt ar datu logaritmisko transformāciju. Ja dispersijas neviendabīgums un/vai novirze no ND ir ļoti izteikts un to nevar koriģēt ar transformāciju, jāapsver, vai analīzi neveikt ar tādām metodēm kā Bonferoni-Velča t-tests, descendents Džonkhīra-Terpstra tests un Bonferoni-mediānas tests. Papildu norādījumus par NOEC noteikšanu var atrast (16).

ZIŅOŠANA

94. Testēšanas pārskatā norāda šādu informāciju:

Testējamā ķīmikālija

Vienkomponenta viela:

— fiziskais izskats, šķīdība ūdenī un papildu attiecīgās fizikālķīmiskās īpašības;

- ķīmiskā identifikācija, piemēram, IUPAC vai CAS nosaukums, CAS numurs, SMILES vai InChI kods, struktūrformula, tīrība, piemaisījumu ķīmiskā identitāte attiecīgajā gadījumā un, ja praktiski iespējams, u. c.

Vairākkomponentu viela, UVCB un maisījumi:

- tiek iespējami izsmeljoši raksturoti pēc to komponentu ķīmiskās identitātes (sk. iepriekš), kvantitatīvās sastopamības un attiecīgajām fizikālķīmiskajām īpašībām.

Testa suga

- zinātniskais nosaukums un avots.

Testa nosacījumi

- iejušanās fāzes ilgums un apstākļi;
- izmantotā testa procedūra (statiska, pusstatiska, pulsācijas);
- testa sākuma datums un tā ilgums;
- testa barotne, t. i., sedimenti un šķidra barotne ar barības elementiem;
- eksperimentālā plāna apraksts: audzēšanas kamera/telpa vai laboratorija, testa trauki un pārsegi, šķidrumu tilpumi, testa augu garums un svars uz vienu testa trauku testa sākumā, sedimentu virsmas un ūdens virsmas attiecība, sedimentu un ūdens tilpuma attiecība;
- testējamās koncentrācijas (nominālās un izmērītās, kā vajadzīgs) un replikātu skaits uz koncentrāciju;
- Izejšķidrumu un testa šķidrumu sagatavošanas metodes, tostarp jebkāda šķīdinātāja vai izkļaidētājielas lietošana.
- temperatūra testa laikā;
- gaismas avots, izstarojums ($\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\text{ s}^{-1}$);
- testa un kontroles barotņu pH vērtības, kā arī testa barotņu izskats testa sākumā un beigās;
- skābekļa koncentrācijas;
- analīzes metode ar attiecīgiem kvalitātes novērtēšanas datiem (validācijas pētījumi, analīžu standartnovirzes un ticamības robežas);
- metodes mērījumu mainīgo, piemēram, garuma, saussvara, svaigsvara, noteikšanai;
- jebkādas novirzes no šīs testēšanas metodes.

Rezultāti

- izejas dati: katram saskaņā ar 1. tabulā sniegto novērtēšanas grafiku veiktam novērojumam un izdarītai analīzei — dzinumu garums un augu dzinumu/podu svars un citi mērījumu mainīgie;
- katra mērījuma mainīgā vidējie rādītāji un standartnovirzes.
- augšanas līknes katrai koncentrācijai;
- divkārtots laiks/augšanas rādītājs kontrolē, pamatojoties uz dzinumu garumu un svaigsvaru, tostarp variāciju koeficientu attiecībā uz svaigsvara pieaugumu;
- katram apstrādes replikātam aprēķinātie atkarīgie mainīgie, ar replikātu vidējiem rādītājiem un variācijas koeficientu;
- Koncentrācijas/ietekmes sakarības grafisks attēlojums.
- aplēses par toksiskajiem beigupunktiem attiecībā uz atkarīgajiem mainīgajiem, piemēram, EC_{50} , un saistītie ticamības intervāli. Ja aprēķinātas, LOEC un/vai NOEC un statistikas metodes, kas izmantotas to noteikšanai;

- ja izmantota ANOVA, tad nosakāmais ietekmes apjoms (piemēram, vismazākās būtiskās atšķirības);
- jebkāda augšanas stimulēšana, kas konstatēta jebkurā apstrādē;
- jebkādas fitotoksiskuma vizuālās pazīmes, kā arī testa šķīdumu novērojumi;
- rezultātu apspriešana, tostarp jebkāda ietekme uz testa rezultātiem, kas izriet no novirzēm no šīs testēšanas metodes.

LITERATŪRA

- (1) Šā pielikuma C.26. nodaļa: *Lemna* sp. Growth Inhibition Test.
- (2) Šā pielikuma C.3. nodaļa: Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test.
- (3) Maltby, L. et al. (2010), Aquatic Macrophyte Risk Assessment for Pesticides, Guidance from the AMRAP Workshop in Wageningen (NL), 14-16 January 2008.
- (4) Arts, G.H.P. et al. (2008), Sensitivity of submersed freshwater macrophytes and endpoints in laboratory toxicity tests, *Environmental Pollution*, Vol. 153, pp. 199-206.
- (5) ISO 16191:2013 Water quality – Determination of the toxic effect of sediment on the growth behaviour of *Myriophyllum aquaticum*.
- (6) Knauer, K. et al. (2006), Methods for assessing the toxicity of herbicides to submersed aquatic plants, *Pest Management Science*, Vol. 62/8, pp. 715-722.
- (7) Šā pielikuma C.50. nodaļa: Sediment-free *Myriophyllum spicatum* Toxicity Test.
- (8) Šā pielikuma C.28. nodaļa: Sediment-Water Chironomid Toxicity Using Spiked Water.
- (9) Ratte, M., H. Ratte (2014), "Myriophyllum Toxicity Test: Result of a ring test using *M. aquaticum* and *M. spicatum* grown in a water-sediment system", OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, No. 206, OECD Publishing, Paris.
- (10) Davies, J. et al. (2003), Herbicide risk assessment for non-target aquatic plants: sulfosulfuron – a case study, *Pest Management Science*, Vol. 59/2, pp. 231 – 237.
- (11) OECD (2000), "Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures", OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, No. 23, OECD Publishing, Paris.
- (12) Smart, R.M., J.W. Barko (1985), Laboratory culture of submersed freshwater macrophytes on natural sediments, *Aquatic Botany*, Vol. 21/3, pp. 251-263.
- (13) Christensen, E.R., N. Nyholm (1984), Ecotoxicological Assays with Algae: Weibull Dose-Response Curves, *Environmental Science Technology*, Vol. 18/9, pp. 713-718.
- (14) Nyholm, N. et al. (1992), Statistical treatment of data from microbial toxicity tests, *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 11/2, pp. 157-167.
- (15) Bruce, R.D., D.J. Versteeg (1992), A statistical procedure for modelling continuous toxicity data, *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 11/10, 1485-1494.
- (16) OECD (2006), "Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application", OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, No. 54, OECD Publishing, Paris.
- (17) Brain, P., R. Cousens (1989), An equation to describe dose-responses where there is stimulation of growth at low doses, *Weed Research*, Vol. 29/2, pp/ 93-96.

-
- (18) Norberg-King, T.J. (1988), An interpolation estimate for chronic toxicity: The ICp approach, National Effluent Toxicity Assessment Center Technical Report 05-88. US EPA, Duluth, MN.
- (19) Dunnett, C.W. (1955), A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control, Journal of the American Statistical Association, Vol. 50/272, pp. 1096-1121.
- (20) Dunnett, C.W. (1964), New tables for multiple comparisons with a control, Biometrics, Vol. 20/3, pp. 482-491.
- (21) Williams, D.A. (1971), A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control, Biometrics, Vol. 27/1, pp. 103-117.
- (22) Williams, D.A. (1972), The comparison of several dose levels with a zero dose control, Biometrics, Vol. 28/2, pp. 519-531.
-

1. papildinājums

SMĀRTA UN BARKO BAROTNES SASTĀVS

Komponents	Reāģenta daudzums, kas pievienots ūdenim (*) (mg/l)
$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	91,7
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	69,0
NaHCO_3	58,4
KHCO_3	15,4
pH (gaisa līdzsvars)	7,9
(*) demineralizēts (t. i., destilēts un dejonizēts) ūdens	

2. papildinājums

DEFINĪCIJAS

Biomasa ir populācijas dzīvās matērijas svaigsvars un/vai saussvars. Šajā testā biomasa ir pamatdzinumu, visu sānu zaru un visu sakņu summa.

Ķimikālija ir viela vai maisījums.

Hloroze ir testa organisma, jo īpaši mieturu, krāsas maiņa no zaļas uz dzeltējošu.

EC_x ir testa barotnē izšķīdinātās testējamās ķimikālijas koncentrācija, kas attiecīgajā ekspozīcijas periodā (īpaši jānorāda, ja ir novirzes no pilna vai normāla testa ilguma) rada *Myriophyllum spicatum* augšanas samazinājumu $x\%$ (piemēram, 50 %). Lai nepārprotami apzīmētu no augšanas rādītāja vai pieauguma izrietošo vērtību EC, augšanas rādītājam izmanto simbolu “E_rC” un pieaugumam — “E_pC”, kam seko izmantotais mērījumu mainīgais, piemēram, “E_rC” (pamatdzinumu garums).

Augšana ir mērījumu mainīgā, piemēram, pamatdzinumu garuma, kopējā sānu zaru garuma, kopējā dzinumu garuma, kopējā sakņu garuma, svaigsvara, saussvara vai mieturu skaita palielināšanās visā testa periodā.

Augšanas rādītājs (vidējais īpatnējais augšanas rādītājs) ir mērījumu mainīgā logaritmisks pieaugums ekspozīcijas laikā. *Piezīme.* Ar augšanas rādītāju saistītie atkarīgie mainīgie nav atkarīgi no testa ilguma, ja vien neeksponētas kontroles organismu augšanas modelis ir eksponenciāls.

Zemākā novērojamās ietekmes koncentrācija (LOEC) ir zemākā testējamās ķimikālijas koncentrācija, kurai noteiktā ekspozīcijas laikā salīdzinājumā ar kontroli novērota statistiski būtiska ietekme ($p < 0,05$). Tomēr pie visām testējamajām koncentrācijām, kas augstākas par LOEC, ir jābūt kaitīgai ietekmei, kura vienāda ar vai lielāka par ietekmi, kas novērota pie LOEC. Ja šos divus nosacījumus nevar izpildīt, jāsniedz pilns paskaidrojums par to, kā LOEC (un līdz ar to arī NOEC) izraudzīta.

Mērījumu mainīgie ir jebkāda veida mainīgie, kas tiek mērīti, lai izteiktu testa beigupunktu, izmantojot vienu vai vairākus atkarīgos mainīgos. Šajā testēšanas metodē mērījumu mainīgie ir pamatdzinumu garums, kopējais sānu zaru garums, kopējais dzinumu garums, kopējais sakņu garums, svaigsvars, saussvars un mieturu skaits.

Monokultūra ir kultūra ar vienu augu sugu.

Nekroze ir nedzīvi (proti, balti vai tumšbrūni) testa organisma audi.

Nenovērojamās ietekmes koncentrācija (NOEC) ir testējamās ķimikālijas koncentrācija, kas ir tūlīt zem LOEC.

Atkarīgais mainīgais ir toksiskuma rādītājs, ko ar dažādu aprēķina metožu palīdzību iegūst no jebkura mērītā rādītāja, kas apraksta biomasu. Šīs testēšanas metodes atkarīgie mainīgie ir augšanas rādītājs un pieaugums, kas iegūti no tādiem mērījumu mainīgajiem kā pamatdzinumu garums, dzinumu kopējais garums, svaigsvars, saussvars vai mieturu skaits.

Pusstatisks (atjaunošanas) tests ir tests, kurā testa šķīdumu noteiktos intervālos testa laikā periodiski maina.

Statiskais tests ir testēšanas metode bez testa šķīduma atjaunošanas testa laikā.

Testējamā ķimikālija ir jebkura viela vai maisījums, ko testē, izmantojot šo testēšanas metodi.

Testa beigupunkts apraksta vispārīgo faktoru, kura mainīšana attiecībā pret testējamās ķimikālijas kontroli ir testa mērķis. Šajā testēšanas metodē testa beigupunkts ir augšanas inhibēšanās, ko var izteikt ar dažādiem atkarīgajiem rādītājiem, kuri balstās uz vienu vai vairākiem mērījumu mainīgajiem.

Testa barotne ir pilna sintētiskā augšanas barotne, uz kuras aug testa augi laikā, kad tos eksponē testējamai ķimikālijai. Testējamo ķimikāliju parasti izšķīdina testa barotnē.

UVCB ir viela ar nezināmu vai mainīgu sastāvu, komplekss reakcijas produkts vai bioloģisks materiāls.

Pieaugums ir mērījumu mainīgā vērtība, kas izsaka starpību starp biomasu ekspozīcijas perioda beigās un mērījumu mainīgo vērtību ekspozīcijas perioda sākumā. Piezīme. Ja neeksponētu organismu augšanas modelis ir eksponenciāls, uz pieaugumu balstīti atkarīgie mainīgie līdz ar testa ilgumu samazināsies.”
